

ETUDE CALORIMETRIQUE DES INTERACTIONS DES IONS CALCIUM ET MAGNESIUM AVEC LA CALMODULINE

Mladen MILOS¹ et Jean-Jacques SCHAEER¹

Michelle COMTE² et Jos. A. COX²

¹Département de Chimie Physique, Université de Genève, 30, quai Ernest-Ansermet
1211 Genève 4 (Suisse)

²Département de Biochimie, Université de Genève, 30, quai Ernest-Ansermet
1211 Genève 4 (Suisse)

RESUME

La détermination des paramètres thermodynamiques ΔH° , ΔG° , ΔS° et la constante d'affinité K relatifs aux interactions du Ca^{2+} et du Mg^{2+} avec la Calmoduline du cerveau de bovin, comportant 4 domaines de liaison avec les ions, a été effectuée par microcalorimétrie. A pH 7,5, les fixations du Ca^{2+} et du Mg^{2+} sur la Calmoduline sont endothermiques et s'accompagnent de variations d'enthalpie de 19,5 et 72,8 kJ par mol de Calmoduline, respectivement. Les variations d'enthalpie sont identiques pour chacun des 4 domaines de liaison avec les ions. Les constantes intrinsèques d'affinité K sont également identiques et valent 10^5 pour Ca^{2+} et 140 pour Mg^{2+} . Il n'y a pas de compétition entre Ca^{2+} et Mg^{2+} pour les mêmes sites de liaison; à concentration élevée des deux ions, la formation de l'espèce Calmoduline· Ca_4^{2+} · Mg_4^{2+} s'accompagne d'une variation d'enthalpie de + 24,4 (kJ mol⁻¹) à partir du complexe Calmoduline· Ca_4^{2+} et d'une valeur de - 28,8 (kJ mol⁻¹) à partir du complexe Calmoduline· Mg_4^{2+} . Les antagonismes Ca^{2+} - H^+ et Mg^{2+} - H^+ ont été étudiés par calorimétrie et par potentiométrie; les résultats montrent que la libération des protons dépend fortement du pH auquel la fixation du Ca^{2+} et du Mg^{2+} se produit.

INTRODUCTION

Dans les cellules eukariotiques, la calmoduline (CaM) est une protéine qui réagit à diverses stimulations (hormonales, nerveuses etc...) en fixant le Ca^{2+} dont la concentration peut alors activer un certain nombre d'enzymes. Du fait que cette activation dépend de manière critique du nombre d'ions Ca^{2+} fixés sur la protéine (1), il est de la plus grande importance de connaître en détail les caractéristiques de la liaison CaM- Ca^{2+} et l'influence, même faible, d'autres ions présents dans ce type de cellule. Il existe à ce sujet certaines controverses portant notamment sur l'affinité des ions Ca^{2+} pour les quatre sites de liaison (2), (3), les effets éventuels de coopérativité lors de la liaison CaM- Ca^{2+} (4), (5) et de la compétitivité du Ca^{2+} et Mg^{2+} quant à leur fixation sur la CaM (2), (3), (6), (7), (8). Les contradictions observées entre les

résultats que nous avons obtenus jusqu'ici avec ceux d'autres auteurs (9), en particulier au sujet des caractéristiques de la liaison CaM-Ca²⁺ et de la compétitivité Ca²⁺-Mg²⁺ par rapport à la calmoduline, nous ont incité à effectuer une étude calorimétrique détaillée de ces interactions.

METHODES

Réactifs

La CaM a été purifiée par chromatographie (10), (11) et sa concentration déterminée par UV (12). La concentration des solutions de Ca²⁺ et Mg²⁺ a été déterminée par spectrométrie d'absorption atomique. Ces solutions sont préparées à partir de CaCl₂ et MgCl₂ pro anal. (Merck, Darmstadt, FRG).

Technique de mesure

L'ensemble des mesures a été effectué à 298 K au moyen d'un microcalorimètre à écoulement continu LKB 2277. Les enthalpies d'interaction de la CaM avec le Ca²⁺ et le Mg²⁺ en l'absence et en présence respectivement de Mg²⁺ et de Ca²⁺, ont été déterminées par titration enthalpique en milieu tampon pipérazine-N,N'-bis-(2-éthane-sulfonate) (PIPES) à pH 7,5. Les solutions de CaM, de concentrations constantes, et les solutions de Ca²⁺ ou Mg²⁺, de concentrations variables, étaient mélangées dans le calorimètre au moyen d'une pompe péristaltique à deux canaux, le débit des solutions étant de 9 ml/h (13). Les concentrations indiquées dans le texte et sur les figures s'entendent après le mélange des réactifs. Pour tenir compte de la chaleur de dilution et de l'interaction éventuelle des ions métalliques avec le tampon, la ligne de base était fixée par le mélange de leurs solutions (pour chaque concentration) avec la solution du tampon.

Calcul de ΔH et K des interactions étudiées

En faisant l'hypothèse (voir section "RESULTATS ET DISCUSSION") que l'affinité des ions Ca²⁺ et Mg²⁺ est la même pour les quatre sites de la protéine, la concentration des complexes protéine-ion est liée à K et ΔH par les équations suivantes :



$$K = \frac{X_i}{(\nu \cdot |\text{CaM}| - X_i) (|\text{M}|_i - X_i)} \quad (2)$$

$|\text{CaM}|$ = concentration constante de CaM

$|\text{M}|_i$ = concentration variable du métal

X_i = concentration du complexe formé correspondant à chaque $|\text{M}|_i$

v = nombre de sites sur la CaM

K = constante de formation du complexe

L'équation (2) peut s'écrire sous la forme d'une équation du 2ème degré (Richards and Vitkayathil, 1959) :

$$x_i^2 - (v|CaM| + |M|_i + \frac{1}{K})x_i + v \cdot |CaM| \cdot |M|_i = 0 \quad (3)$$

Le degré d'avancement ξ_i de la réaction (1) pour chaque concentration $|M|_i$ peut être exprimé par :

$$\xi_i = \frac{x_i}{v \cdot |CaM|} \quad (4)$$

La chaleur échangée au cours de chaque expérience (i) devrait être :

$$Q_i = \xi_i \cdot \Delta H \quad (5)$$

à partir de (3) et (4), on trouve :

$$Q_i = \frac{(v \cdot |CaM| + |M|_i + \frac{1}{K}) - \sqrt{(v \cdot |CaM| + |M|_i + \frac{1}{K})^2 - 4 \cdot v \cdot |CaM| \cdot |M|_i}}{2 \cdot v \cdot |CaM|} \cdot \Delta H \quad (6)$$

Pour trouver les valeurs ΔH et K à partir des m points mesurés, on fait varier itérativement les deux paramètres. Les valeurs de ΔH et de K les plus représentatives sont celles pour lesquelles la fonction $Y = f(\Delta H, K)$ est minimum.

$$Y = \sum_{i=1}^{i=m} (Q_i - Q_i \text{ expt})^2 \quad (7)$$

$Q_i \text{ expt}$ = chaleur mesurée au cours de la $i^{\text{ème}}$ expérience

Q_i = chaleur calculée pour la $i^{\text{ème}}$ mesure et pour un couple de valeurs de ΔH et de K choisies pour l'iteration

ΔH = variation d'enthalpie relative à la formation d'une mole de complexe

La libération de protons provoquée par la fixation des ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} a été étudiée par potentiométrie à l'aide d'un pH-stat (12) et par calorimétrie.

Au moyen de la seconde méthode, on a mesuré les chaleurs Q_1 et Q_2 mises en jeu par l'interaction de la CaM et du Ca^{2+} ou Mg^{2+} , ajustées au même pH. Le nombre n de mol de H^+ libérés a été calculé à partir des relations suivantes :

$$Q_1 = \xi_1 \cdot (\Delta H^O + n \cdot \Delta H_1) \quad \text{et} \quad Q_2 = \xi_1 \cdot (\Delta H^O + n \cdot \Delta H_2)$$

$$\text{d'où } n = \frac{Q_1 - Q_2}{(\Delta H_1 - \Delta H_2) \cdot \xi_1}$$

où $\Delta H_1 = -47,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ = enthalpie de protonation du 1,1,1-Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (TRIS)

$\Delta H_2 = -11,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ = enthalpie de protonation du PIPES

ΔH^0 = enthalpie d'interaction corrigée (protonation)

RESULTATS ET DISCUSSION

Interactions CaM-Ca²⁺ et CaM-Mg²⁺

La Fig. 1 donne les profils des courbes de titration enthalpique, par le Ca²⁺, de la CaM à trois concentrations dans le PIPES, à pH 7,5. Les trois courbes tendent vers un plateau lorsque la CaM est saturée par le Ca²⁺; ΔH vaut alors $+17 \pm 0,3 \text{ kJ/mol}$ de CaM.

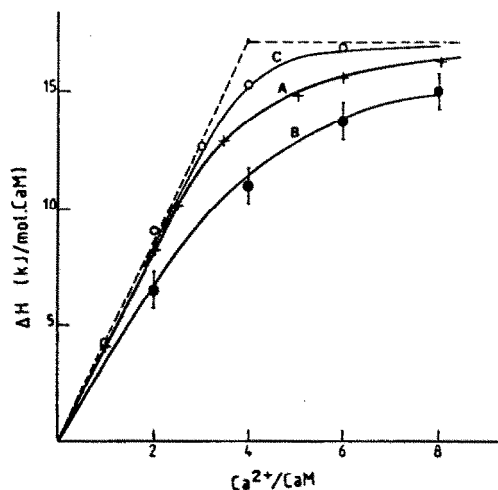


Fig. 1. Titration enthalpique de la CaM par le Ca²⁺.

$[CaM] = 16 \mu\text{M}$ (B), $50 \mu\text{M}$ (A), $200 \mu\text{M}$ (C).

La courbe (C) indique que la protéine atteint cette saturation lorsque le rapport $r = [Ca^{2+}]/[CaM] = 4$, ce qui correspond à la présence de 4 sites de liaison du Ca²⁺ sur la CaM. La partie rectiligne de cette même courbe montre que l'occupation des quatre sites s'accompagne d'une même variation d'enthalpie. D'autre part, la courbe (B), calculée en faisant l'hypothèse d'une constante d'affinité unique pour les quatre sites, s'ajuste très bien aux données expérimentales. En revanche, l'ajustement est nettement moins bon si l'on admet l'hypothèse selon laquelle la CaM possède deux paires de sites à forte et faible affinité (4), (5), (14). La valeur de la constante unique, calculée par la méthode

itérative vaut $K = 10^5$.

La valeur de ΔH doit être corrigée pour tenir compte de la libération de protons et de leur neutralisation par le tampon. Les mesures calorimétriques dans le PIPES et le TRIS à pH 7,5 montrent qu'il y a libération de $n = 0,22$ mol de H^+ /mol de CaM liée à 4 Ca^{2+} conduisant à une valeur corrigée d'enthalpie $\Delta H^0 = +19,5$ kJ/mol de CaM. La valeur de n dépend fortement du pH puisqu'à pH 5,3, mesurée dans les tampons d'histidine et d'acétate, $n = 2,1$ mol de H^+ par mol de CaM ($n = 2,3$ par potentiométrie). L'allure de la courbe de titration enthalpique (A) de la Fig. 2 montre que la progression de la fixation du Mg^{2+} sur la protéine est beaucoup plus faible qu'avec le Ca^{2+} , ce qui correspond à une constante d'affinité nettement plus basse. Le calcul par itération donne $K = 140$ et $\Delta H^0 = 7,28$ kJ/mol de CaM. Dans le PIPES à pH 7,5 on ne détecte aucune libération de proton; en revanche, les mesures calorimétriques dans les tampons d'histidine et d'acétate à pH 5,3 montrent qu'il y a libération de 2,45 mol de H^+ par mole de CaM.

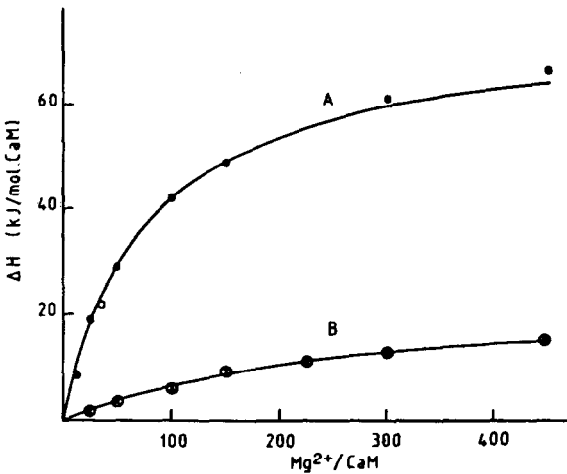


Fig. 2. Titrations enthalpiques de la CaM 100 μ M : par Mg^{2+} (A); par Mg^{2+} en présence de Ca^{2+} 1 mM (B).

Antagonisme Ca^{2+} - Mg^{2+} par rapport à la Calmoduline

La Fig. 3 représente le profil de titration enthalpique de la CaM par le Ca^{2+} en présence de Mg^{2+} 30 mM. La courbe calculée avec une constante d'affinité $K = 7,2 \cdot 10^4$, s'ajuste très bien aux données expérimentales.

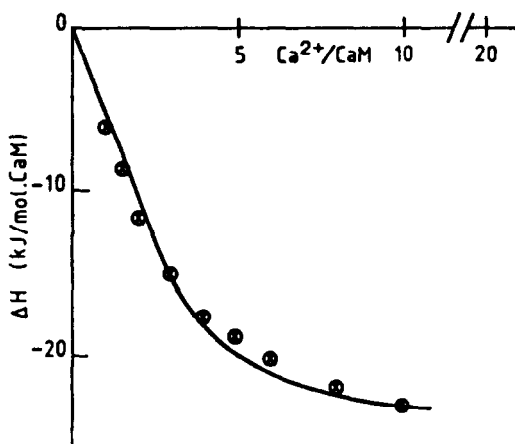


Fig. 3. Titration enthalpique de la CaM 100 μM par Ca^{2+} en présence de Mg^{2+} 30 mM.

La valeur corrigée (protonation) de l'enthalpie vaut $\Delta H^{\circ} = -22,6$ kJ/mol de CaM. Lorsqu'on titre la CaM par Mg^{2+} en présence de Ca^{2+} 1 mM, courbe B de la Fig. 2., le calcul donne les valeurs $K = 35$ et $\Delta H^{\circ} = +24,4$ kJ/mol de CaM. L'ensemble des paramètres thermodynamiques est consigné dans le tableau I.

TABLEAU I

Paramètres thermodynamiques des interactions CaM-Ca et CaM-Mg (valeurs par mole de site)

Interactions	K	ΔG° kJ mol ⁻¹	ΔH° kJ mol ⁻¹	ΔS° J K ⁻¹ mol ⁻¹
CaM + Ca^{2+}	10^5	- 28.7	+ 4.9	+ 113
CaM + Mg^{2+}	140	- 12.2	+ 18.2	+ 102
CaM·Ca + Mg^{2+}	35	- 8.8	+ 6.1	+ 50
CaM·Mg + Ca^{2+}	2.6×10^4	- 27.7	- 5.7	+ 60

CONCLUSIONS

Les mesures calorimétriques confirment l'existence de 4 sites de liaison CaM- Ca^{2+} . En outre, nos résultats montrent, contrairement aux études de Anderson et al. 1982 et Thulin et al. 1984, que non seulement les quatre sites ont la même affinité, déjà mis en évidence par Kotz et Hunston, 1979, et Burger et al. 1984 - mais encore que leur enthalpie est la même soit

soit 4,9 (kJ mol-site⁻¹). D'autre part, l'interaction CaM-Mg²⁺ en présence de Ca²⁺, ne devrait pas s'accompagner d'effet thermique, le Mg²⁺ ne pouvant déplacer le Ca²⁺ ($K_{Mg} = 140 \ll K_{Ca} = 10^5$). Cependant, on observe un tel effet dont $\Delta H^{\circ} = + 24,4$ kJ mol⁻¹, ce qui suggère que le Mg²⁺ doit tout de même se lier à la CaM sur d'autres sites et qu'il n'y a donc pas de compétition entre Ca²⁺ et Mg²⁺. Les mesures directes de fixation de Mg²⁺ en présence de Ca²⁺ (12) montrent en effet que 4 Mg²⁺ se fixent sur la CaM même si le Ca²⁺ occupe déjà ses 4 sites spécifiques

REFERENCES

- 1 Cox, J.A. Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 43 (1984) 3000.
- 2 Burger, D., Cox, J.A., Comte, M., & Stein, E.A. Biochemistry, (1984) 23, 1966-1971.
- 3 Ogawa, Y., & Tanokura, M. J. Biochem., 95 (1984) 19.
- 4 Andersson, T., Drakenberg, T., Forsén, S., & Thulin, E. Eur. J. Biochem. 126 (1982), 501-505.
- 5 Bayley, P.M., Ahlström, P., Martin, S.R., & Forsén, S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, (1984) 185-191.
- 6 Haiech, J., Klee, C.B., & Demaille, J.G. Biochemistry, 20, 3890-3897.
- 7 Potter, J.D. Strang-Brown, P., Walker, P.L., & Iida, S. Methods Enzymol. 102, (1983) 135-143.
- 8 Cox, J.A., Malnoë, A., & Stein, E.A. J. Biol. Chem. 256, (1981) 3218-3222.
- 9 Tanokura, M., & Yamada, K. J. Biochem. 95, (1984) 643-649.
- 10 Gopalakrishna, R., & Anderson, W.B. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, (1982) 830-836.
- 11 Wallace, R.W., & Cheung, W.Y. J. Biol. Chem. 254 (1979) 6454-6571.
- 12 Milos, M., Schaer, J.J., Comte, M., & Cox, J.A., Biochemistry 25 (1986) 6279-6287.
- 13 Schaer, J.J., Milos, M., and Cox, J.A., FEBS Lett., 190 (1985) 77.
- 14 Thulin, E., Andersson, A., Drakenberg, T., Forsén, S., and Vogel, H.J., Biochemistry 23, (1984) 1862-1870.
- 15 Klotz, I.M., and Hunston, D.L., Arch. Biochem. Biophys. 193, (1979) 314-328
- 16 Richards, F.M., and Vithayathil, P.J., J. Biol. Chem. 243, (1959) 1459-1465.