

Short Communications and Preliminary Notes

CRISTALLISATION D'UNE NOUVELLE CHYMOTRYPSINE FORMÉE PAR ACTIVATION RAPIDE DU CHYMOTRYPSINOGENE DE BOEUF

par

M. ROVERY, M. POILROUX ET P. DESNUELLE

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

La nouvelle chymotrypsine dépourvue d'alanine N-terminale, dont une récente note¹ laissait prévoir l'existence, a été cristallisée sous forme de son dérivé diisopropylphosphorylé (DFP). Un hydrolysât de chymotrypsinogène¹, préparé selon JACOBSEN² (activité spécifique (K): 3.6), est additionné à pH = 7.6 de 5 mole de DFP par mole de zymogène. Au bout de 1 h à 0° (K : $0.16 \cdot 10^{-2}$), il est traité dans des conditions analogues à celles décrites pour la cristallisation de la DFP-chymotrypsine- α^3 . Après 3 cristallisations, on obtient des aiguilles bien formées (Fig. 1) avec un rendement global d'environ 30%.

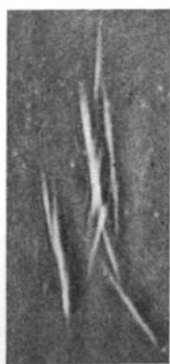


Fig. 1.

Forme cristalline de la nouvelle DFP-chymotrypsine.

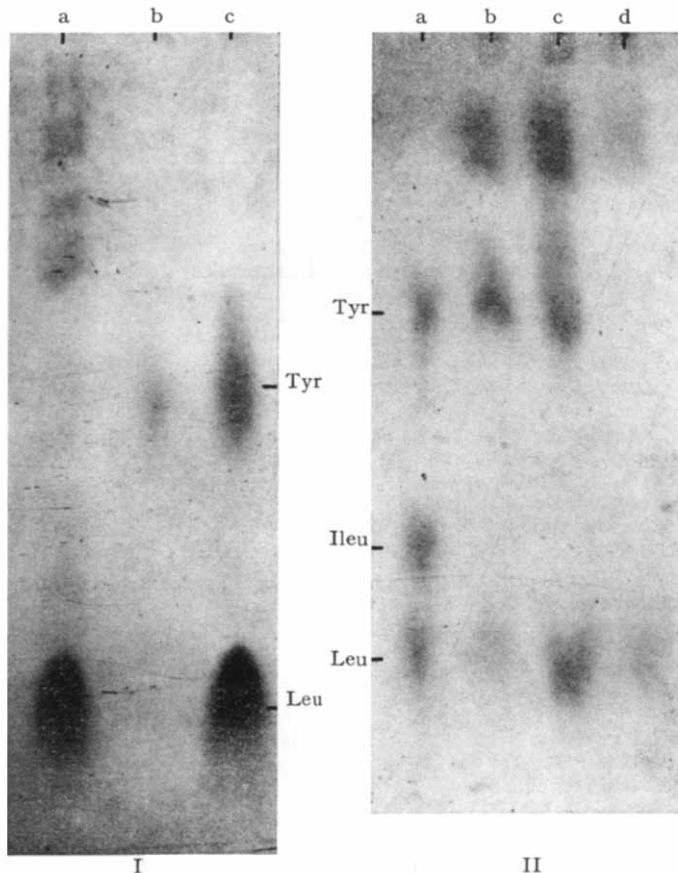


Fig. 2. Amino acides libérés par la carboxypeptidase. I: Solvant: butanol, acide formique, eau: (a) nouvelle chymotrypsine à l'état de dérivé DFP; (b) témoin tyrosine (1/10° de mole par mole de protéine); (c) témoin tyrosine + leucine (1 mole par mole de protéine). II: Solvant: alcool amylique tertiaire saturé d'eau: (a) témoin; (b) et (c) DFP-chymotrypsines- α et γ . (d) dérivé DFP de la nouvelle chymotrypsine.

* Seule la concentration en sulfate d'ammonium doit être plus faible au début de la cristallisation.

La protéine (5 fois cristallisée; $K: 1.2 \cdot 10^{-2}$) contient 0.92–1.04 atome de P par mole (22,500 g). C'est donc manifestement une chymotrypsine sélectivement inhibée sur son centre actif par un radical diisopropylphosphoryle. Traitée par la technique de SANGER, elle engendre 0.8 mole de DNP-isoleucine. Aucun autre résidu N-terminal (l'alanine en particulier) ne peut y être décelé. Le deuxième résidu de la séquence N-terminale est la valine, comme dans la chaîne "isoleucine" de la chymotrypsine- α et dans la chaîne unique de la trypsine⁴. Un traitement de 3 ou 5 h par la carboxypeptidase (rapport molaire enzyme/substrat: 0.03; incubation pendant 15 min de l'enzyme en solution dans LiCl avec une quantité équimolaire de DFP) libère 0.8 mole⁵ de leucine et des quantités insignifiantes de différents autres amino acides*. Les deux chromatogrammes de la Fig. 2 montrent clairement que, à l'inverse des DFP-chymotrypsines- α et γ^{**} , la protéine ne contient pas de tyrosine C-terminale accessible à la carboxypeptidase.

Tous ces résultats suggèrent que la nouvelle chymotrypsine possède un seul des deux résidus N-terminaux de la chymotrypsine- α (l'isoleucine sans l'alanine⁴) et un seul des résidus C-terminaux de cet enzyme (la leucine sans la tyrosine⁷). L'idée la plus simple est donc d'admettre qu'elle représente une étape dans la conversion chymotrypsinogène $\rightarrow$ chymotrypsine- α . Selon cette première hypothèse, le nouvel enzyme se formerait par rupture tryptique d'une liaison Ileu-Leu dans le zymogène et il se convertirait ultérieurement en enzyme- α par autolyse d'une liaison Ala-Tyr. Toutefois, les mesures cinétiques de JACOBSEN², la spécificité bien connue de la trypsine et l'isolement annoncé par GLADNER ET NEURATH⁷ d'un peptide basique formé pendant l'activation, font qu'il est difficile d'abandonner à l'heure actuelle le concept² d'une chymotrypsine primaire (π) très instable avec un résidu C-terminal basique⁷. La protéine nouvellement cristallisée serait alors le dérivé DFP de la chymotrypsine- δ de JACOBSEN et le processus d'activation pourrait, tout au moins dans ses grandes lignes, être schématisé comme il est indiqué dans la Fig. 3.

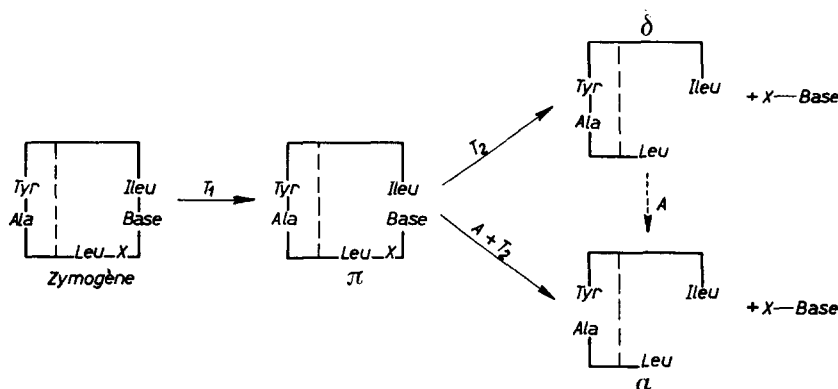


Fig. 3. Schéma provisoire de l'activation du chymotrypsinogène. T_1 et T_2 : 1° et 2° hydrolyses tryptiques. A: autolyse. —: chaînes peptidiques fondamentales. ---: pont(s) inter ou intra chaînes. $\longrightarrow$ Conversions prévues par la théorie de JACOBSEN. ---- $\longrightarrow$ Autre conversion.

Ce schéma précise et modifie celui de GLADNER ET NEURATH⁷ sur quelques points importants: (a) L'activation "rapide" engendre l'enzyme- δ parce que la trypsine, employée en fortes quantités, scinde le peptide X-Base avant que la liaison Ala-Tyr ait eu le temps de s'autolyser. (b) Etant donné la position externe de la liaison X-Leu, l'enzyme- δ ne contient qu'une seule chaîne ouverte, bien que sa formation exige la rupture de deux liaisons. (c) Rien ne s'oppose en principe dans ce schéma à ce que l'enzyme- δ se convertisse en enzyme- α par autolyse. Si, comme le pense JACOBSEN², cette conversion ne se produit pas, il faudrait admettre que le départ du peptide X-Base réduit considérablement la tendance de la molécule à l'autodigestion. (d) Si le chymotrypsinogène est bicyclique⁴, un schéma analogue peut être établi en plaçant les liaisons Ileu-Base et X-Leu dans le premier cycle et la liaison Ala-Tyr dans le second. Le mode d'association des résidus N et C-terminaux de l'enzyme- α doit seul être changé.

* La résine Zeocarb 225 utilisée au cours de cette étude nous a été aimablement fournie par Dr. S. M. PARTRIDGE.

** Les chymotrypsines α et γ contiennent donc, non seulement les mêmes résidus N-terminaux⁴, mais aussi les mêmes résidus C-terminaux.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 300.
² C. F. JACOBSEN, *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, Série Chim.*, 25 (1947) 325.
³ E. F. JANSEN, M. D. F. NUTTING, R. JANG ET A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 189.
⁴ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 547.
⁵ R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1975.
⁶ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 481.
⁷ J. A. GLADNER ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 345.

Reçu le 22 mars 1954

EVIDENCE FOR DIFFERENT SPECIFICITIES OF DNase I AND DNase II*

by

M. PRIVAT DE GARILHE** AND M. LASKOWSKI

*Department of Biochemistry, Marquette University School of Medicine,
Milwaukee, Wisconsin (U.S.A.)*

Up till now the conclusion that the desoxyribonuclease from pancreas (DNase I) is different from the DNase II from thymus was based on differences in the optimum pH and thermolability of the two enzymes, their behaviour toward magnesium and citrate^{1,2,3,4}, and toward a naturally occurring inhibitor^{4,5,6,7}. A partial purification of the DNase II from thymus⁸ established that the two enzymes have also different characteristics of solubility and stability, and offered a new opportunity to compare the two enzymes in respect to the products formed. While only very few of these products have been identified so far, they were strikingly different for the two enzymes. Therefore the conclusion that the DNase I and the DNase II are non-identical is now supported by apparent differences in their specificity.

Desoxyribonucleic acid (DNA) was prepared according to DOUNCE and co-workers⁹. Once crystallized DNase I*** was prepared according to KUNITZ¹⁰, and partially purified DNase II was prepared according to the previously described method⁸. The digests were made using 100 or 200 mg DNA in 5 or 10 ml, at 37°. In studies of DNase II, 2 to 4 mg of the lyophilized enzyme were used in 0.1 M acetate buffer pH 5.0 without Mg; incubation time 4–8 hours. In case of DNase I either 0.2 M borate buffer pH 7 or 0.1 M acetate buffer pH 6 were used; in either case Mg was added to attain 0.025 M, 5–10 mg of enzyme was used and the incubation time was 8–16 hours. Invariably (with both enzymes) toward the end of the digestion period when the viscosity of the solution decreased a white precipitate became apparent. This precipitate was centrifuged down and discarded.

Fig. 1 represents a chromatogram obtained according to the method of MARKHAM AND SMITH¹¹ using 5 mg quantities of the digests. Among the products of DNase II digestion, adenylic acid and guanylic acid were identified by their spectra. Among the digestion products of DNase I thymidylic and cytidylic acids were identified. Similar experiments were then repeated on a preparative scale using 100 mg quantities of the digests. The bands thus obtained were then either rechromatographed according to MARKHAM AND SMITH¹¹, CARTER¹², or HOTCHKISS¹³ (the latter to exclude nucleosides), or ionophorized according to MARKHAM AND SMITH¹¹. In addition to the previously identified nucleotides thymidylic acid was found in the digest of the DNase II.

In the next series of experiments, 200 mg quantities of digests were fractionated on columns of Dowex 1, 2% cross linkage, according to a slightly modified method of SINSHEIMER¹⁴. We are greatly indebted to Dr. R. L. SINSHEIMER for letting us read his manuscript prior to publication. In order to obtain salt-free fractions, SINSHEIMER's sodium acetate buffer pH 5.5 was substituted by ammonium formate buffer pH 4.5, which sublimated *in vacuo*; formic acid of indicated molarity was titrated with ammonia to pH 4.5 (glass electrode). Under these conditions a fair resolution of mononucleotides and dinucleotides was obtained in the first run. Only initial parts of elution patterns are reproduced in Fig. 2. The patterns of the digests by the two DNases were strikingly different. In agreement with the previous data^{15,16,17}, only a small portion of the DNase I digest was represented

* Aided by a grant from the American Cancer Society upon recommendation of the Committee on Growth of the National Research Council.

** Fulbright Scholar.

*** We are indebted to Mr. R. J. PEANASKY for this preparation. When fresh it had a high activity, but was losing it on storage.