

Evidently thyroxine affects more than one enzyme system of oxidation in tissue preparations and has a stimulating effect on some, an inhibiting effect on others.

REFERENCES

- ¹ W. RADSMAN AND H. L. GOLTERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 80.
- ² S. B. BARKER, *Physiol. Reviews*, 31 (1951) 205.
- ³ C. L. GEMMILL, *J. Clin. Endocrin. and Metabolism*, 12 (1952) 1300.
- ⁴ G. FELDOTT AND H. A. LARDY, *Fed. Proceedings*, 10 (1951) 182.

Received March 3rd, 1954

ÉTUDE DES PEPTIDES DE LA PHÉNYLALANINE RÉSULTANT DE L'HYDROLYSE ACIDE ET ENZYMATIQUE DU LYSOZYME

par

R. ACHER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT
Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

Le lysozyme du blanc d'oeuf de poule ne contient que trois résidus de phénylalanine par molécule¹. L'étude des peptides de la phénylalanine résultant de l'hydrolyse ménagée de la protéine est donc susceptible de fournir des enchaînements "repères" en vue d'une investigation plus complète de la structure.

Hydrolyse acide. 1 g de carbonate de lysozyme cristallisé (Armour Laboratories, Chicago) dissous dans 20 ml d'acide chlorhydrique 11 N est hydrolysé pendant 4 ou 8 jours à 37° dans les conditions décrites antérieurement². Les peptides aromatiques sont d'abord séparés des peptides non aromatiques par chromatographie sur une colonne de 1.5 g de charbon Activit 50 XP³, puis fractionnés en peptides acides, neutres et basiques par ionophorèse dans un appareil à 4 compartiments selon SANGER ET TUPPY⁴. Dans chaque fraction, les peptides de la phénylalanine sont isolés en utilisant plusieurs chromatographies sur papier (Whatman n° 1) à une dimension dans les mélanges butanol-acide formique, pyridine — collidine, et phénol tamponné à pH 4⁵. La composition est établie, après hydrolyse totale par HCl 5.7 N, au moyen de la chromatographie sur papier. Les peptides isolés ainsi sont tous des di- ou des tripeptides. L'acide aminé en position initiale a été déterminé par deux méthodes dans chaque cas: désamination⁶ et utilisation du dinitrofluorobenzène⁷. Pour les tripeptides, l'acide aminé en position terminale a été déterminé par la carboxypeptidase. Les peptides Val. Phe et Lys. Val. Phe; Phe. Asp et Ser. Phe. Asp; Phe. Glu, ont pu être caractérisés. Les peptides Val. Phe et Lys. Val. Phe proviennent très probablement de l'enchaînement Lys. Val. Phe. Gly établi par SCHROEDER au moyen de l'hydrolyse acide⁸. Les trois résidus de phénylalanine sont donc nécessaires pour tenir compte de tous les peptides déterminés.

Hydrolyse trypsique. Le lysozyme en solution aqueuse, après dénaturation par la chaleur, est laissé 24 heures à 37° à pH 7.5–8.0 au contact de la trypsine cristallisée Worthington (concentration en protéine 2%, rapport enzyme: substrat 1:100). Après élimination des grands peptides et de la protéine par précipitation par l'alcool, le liquide surnageant est concentré, chromatographié sur charbon, et les peptides de la fraction absorbée sont purifiés par chromatographie sur papier. Un tétrapeptide contenant de la phénylalanine a été ainsi isolé; sa composition en acides aminés a été établie, après hydrolyse, par la technique de MOORE ET STEIN⁹; sa structure a été déterminée par la technique de SANGER⁷ et par l'étude des fragments obtenus par hydrolyse acide; elle a été vérifiée au moyen de la méthode de dégradation récurrente d'EDMAN^{10, 11}. Il s'agit du peptide Val. Phe. Gly. Arg.

SCHROEDER⁸ ayant montré que la molécule de lysozyme, chaîne peptidique unique, est constituée dans sa partie initiale par la séquence Lys. Val. Phe. Gly, le peptide Val. Phe. Gly. Arg. ne peut que provenir de cette partie de la protéine, car dans le cas contraire, il faudrait supposer l'existence d'un quatrième enchaînement presqu'identique à l'enchaînement initial. En outre, en appliquant la technique d'EDMAN au lysozyme, il a été possible de confirmer que l'arginine occupe effectivement la cinquième position dans la chaîne. Ceci ressort des expériences suivantes: la protéine subit quatre dégradations successives selon EDMAN puis est copulée avec le dinitrofluorobenzène. On effectue l'hydrolyse totale de la DNP-protéine obtenue et on extrait d'abord à l'éther, puis à la méthyléthylcétone. Les dérivés dinitrophényles de chaque extrait sont purifiés par passage sur colonne d'Hyflo-supercel tamponnée, puis identifiés par chromatographie sur papier^{12, 13} et dosés. La dinitrophényl-arginine est présente dans l'extrait méthyléthylcétone. D'autres dérivés ont été identifiés en pro-

portion moindre; pour 1.00 molécule de DNP-arginine, on trouve DNP-sérine 0.14, DNP-thréonine 0.13, DNP-aspartique 0.12; des coupures aberrantes s'effectuent donc en faible proportion au niveau des acides aminés hydroxyles; ceci expliquerait que LANDMAN *et al.*⁴, utilisant uniquement la technique d'Edman, aient observé une libération de sérine à la cinquième scission. L'isolement d'un peptide *Val. Phe. Gly. Arg* après hydrolyse trypsique concorde avec la spécificité admise pour cet enzyme, et d'autre part est en accord avec l'enchaînement initial *Lys. Val. Phe. Gly. Arg* trouvé par les méthodes chimiques.

Le détail de ces investigations paraîtra ultérieurement dans ce journal.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. C. LEWIS, N. S. SNELL, D. J. HIRSCHMANN ET H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 23.
- 2 R. ACHER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 493.
- 3 R. ACHER, J. CHAUVET, C. CROCKER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 167.
- 4 F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 463.
- 5 R. ACHER, J. THAUREAUX, C. CROCKER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 339.
- 6 R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
- 7 F. SANGER ET E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 353.
- 8 W. A. SCHROEDER, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5118.
- 9 S. MOORE ET W. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663.
- 10 P. EDMAN, *Acta Chim. Scand.*, 4 (1950) 283.
- 11 P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 700.
- 12 G. BIZERT ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- 13 M. ROVERY ET C. FABRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 541.
- 14 W. A. LANDMANN, M. P. DRAKE ET J. DILLAHAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 3638.

Reçu le 26 février 1954

THE ACTIVATION OF THROMBOPLASTIN BY CALCIUM*

by

GERARD F. LANCHANTIN AND ARNOLD G. WARE

Department of Biochemistry and Nutrition, University of Southern California School of Medicine,
Los Angeles, California (U.S.A.)

The role of calcium in the physiological coagulation of blood has been a much disputed question for many years (for a review see WOHLISCH¹). This preliminary report presents data which indicates that calcium is an activator of the thromboplastic enzyme. It has been a frequent observation in our Laboratory using one-stage clotting systems^{2,3} that incubation of human brain thromboplastin with calcium greatly increases its clotting activity.

TABLE I

A RECONSTRUCTED COAGULATION SYSTEM COMPOSED OF PURIFIED CLOTTING FACTORS
ISOLATED FROM HUMAN BLOOD AND TISSUES

Clotting factor	Concentration	Activity	Method of preparation
Prothrombin	0.09 mg protein/ml	142 units/ml*	(4)
Plasma Ac-Globulin	0.18 mg protein/ml	94 %**	(4), (5)
Brain Thromboplastin	0.81 mg protein/ml	100 %**	(3)
Fibrinogen	10 mg clottable protein/ml	—	(6)
Calcium chloride	0.008 M	—	—

* Activity comparable to normal human plasma.

** Activity giving 13.0 secs in reconstructed clotting system.

* Supported by the Medical Research and Development Board, Office of the Surgeon General, Department of the Army, under Contract # DA-49-007-MD-193 and by the USPHS RG 2684.