

SUR LA SÉQUENCE N-TERMINALE DU TRYPSINOGENE ET SON ABLATION PENDANT L'ACTIVATION DE CE ZYMOGÈNE

par

P. DESNUELLE ET C. FABRE

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

Le trypsinogène subit au contact de la trypsine une activation autocatalytique¹ qui résulte vraisemblablement d'une protéolyse limitée. En d'autres termes, il est permis de penser que la rupture par la trypsine de quelques liaisons peptidiques au sein du zymogène provoque directement ou indirectement l'apparition de l'activité enzymatique. Certains renseignements concernant cette protéolyse ont été récemment acquis grâce à l'étude comparée des résidus terminaux des deux protéines.

On sait en effet²⁻⁴ que le trypsinogène et la trypsine possèdent un seul résidu N-terminal. L'activation n'implique donc pas comme celle du chymotrypsinogène l'ouverture de chaînes cycliques. Mais ces résidus sont différents (valine pour le trypsinogène et *isoleucine* pour la trypsine). On peut donc supposer que la trypsine rompt une liaison X-*isoleucine* dans la chaîne du trypsinogène au moment de l'activation et que cette rupture provoque le départ de la séquence N-terminale de la chaîne.

Peu de temps après que cette hypothèse de travail ait été formulée, DAVIE ET NEURATH⁵ ont étudié les résidus C-terminaux de la trypsine et du trypsinogène au moyen de la carboxypeptidase. Les résultats obtenus sont malheureusement équivoques et, avant que d'autres techniques aient pu les confirmer, il semble préférable de limiter la discussion à la région N-terminale des molécules.

Si la séquence N-terminale du trypsinogène est réellement éliminée pendant l'activation, l'étude de sa structure devient fort intéressante. Dans le présent travail, nous avons abordé cette étude en hydrolysant partiellement le dinitrophényl (DNP)-trypsinogène⁶ au moyen de l'acide chlorhydrique.*

I. TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1. Obtention et hydrolyse partielle du DNP-trypsinogène

Le DNP-trypsinogène est obtenu à partir d'un échantillon de trypsinogène de boeuf cristallisé une fois et purifié par précipitation trichloracétique¹. Sa teneur en trypsinogène, déterminée à une échelle microanalytique⁴ par l'intermédiaire de l'amide, est 86 %.

Cette préparation est hydrolysée pendant des laps de temps variables par HCl 12 N à 37° ou par HCl 5.6 N, 3 N et 0.1 N à l'ébullition. Il n'est pas inutile de rappeler ici que l'acide chlorhydrique 5.6 N doit être distillé 3 fois dans un appareil en verre; il est ensuite dilué avec de l'eau bidistillée ou au contraire enrichi par barbotage de vapeurs d'HCl.

* L'analyse de quelques peptides N-terminaux du trypsinogène de boeuf a déjà fait l'objet d'une note préliminaire⁷.

Bibliographie p. 56.

2. Extraction et chromatographie des DNP-peptides

Au moment de l'extraction, il y a lieu de séparer aussi complètement que possible les α -DNP-peptides N-terminaux dont la forme acide est en principe soluble dans les solvants organiques, et les peptides non-terminaux de l' ϵ -DNP-lysine qui sont en principe retenus dans la phase aqueuse par leur fonction NH_2 libre. Cette séparation n'est pas toujours très nette et, quand on chromatographie les extraits, il n'est pas rare de rencontrer des bandes formées par des DNP-peptides non-terminaux.

L'hydrolysat est extrait 4 fois par l'acétate d'éthyle, l'extrait est lavé avec un peu d'eau puis avec du bicarbonate à 1%. La solution bicarbonatée est acidifiée puis extraite 4 fois par l'acétate d'éthyle. Le nouvel extrait est lavé avec un peu d'eau puis évaporé sous vide. Le résidu est repris dans un mélange saturé d'eau contenant 90% de chloroforme et 10% de *n*-butanol en volume (mélange 10B). Les solvants sont préalablement purifiés avec le plus grand soin et ils sont conservés à la glacière jusqu'au moment de l'emploi.

Les chromatographies sont faites à l'aide d'une série de colonnes de silicagel tamponné. On fait d'abord passer la solution à travers une colonne 10 B. On néglige les DNP-dérivés qui ne migrent pas sur ce type de colonne. Ce sont généralement des peptides de l' ϵ -DNP-lysine. On recueille séparément les bandes lentes ($R < 1$) et on les analyse sans autre purification. La bande rapide ($R > 1$) est évaporée, reprise dans un solvant moins riche en butanol et étudiée sur une colonne avec ce même solvant. On arrive ainsi de proche en proche au chloroforme pur, lequel dans le cas présent ne permet d'identifier que la DNP-valine. Cette façon d'opérer avec des concentrations en butanol décroissantes a l'avantage d'éviter les adsorptions irréversibles. Mais elle risque de provoquer des estérifications au moment où l'on évapore de grands volumes de solvants riches en butanol. Aussi est-il bon de faire bouillir chaque résidu quelques secondes dans HCl 5.6 N avant de procéder à une nouvelle chromatographie.

3. Analyse des DNP-peptides

On dissout le contenu de chaque bande dans CO_3HNa 1% et on mesure l'adsorption de la solution à 3500 Å. Cette mesure permet d'évaluer le nombre de mole de DNP-peptide formé si l'on suppose que tous les DNP-peptides possèdent à 3500 Å le même coefficient d'adsorption molaire que les α mono DNP-aminoacides⁶. Certains peptides contiennent plusieurs groupements DNP. Il faut alors en tenir compte. Pour le peptide P₃ qui contient de l' ϵ -DNP-lysine, nous avons utilisé le coefficient molaire d'absorption de la di DNP-lysine, lequel est à peu près le double de celui des α mono DNP-aminoacides ordinaires.

L'hydrolyse est effectuée en tube scellé sous azote dans HCl 5.6 N pendant 24 h à 115°. L'hydrolysat est extrait par l'éther dépourvu de peroxydes. On vérifie que l'extrait contient bien exclusivement le DNP-aminoacide N-terminal du trypsinogène (DNP-valine) et on étudie la phase aqueuse sur papier dans les systèmes phénol-NH₃ et butanol-acide formique.

Cette première enquête qualitative permet quelquefois de se faire une idée précise de la composition du DNP-peptide. Mais, dans le cas présent, une véritable analyse quantitative s'est avérée indispensable. L'analyse du peptide P₃ a même été particulièrement difficile car: (a) ce peptide contient comme nous le verrons tout à l'heure 4 résidus d'acide aspartique. Pour déterminer sans ambiguïté un nombre de résidus aussi élevé, une précision de l'ordre de 10% est nécessaire; (b) malgré tous nos efforts, nous n'avons pas pu trouver des conditions d'hydrolyse engendrant plus de 0.1-0.2 μ mole de ce peptide (soit environ 100-200 μ g) à partir de 4 μ mole de DNP-trypsinogène (soit environ 100 mg). La technique classique de STEIN ET MOORE⁸ n'est donc pas utilisable puisqu'elle exige des quantités de substances au moins 10 fois plus fortes.

Le problème posé par la détermination de 4 résidus d'un aminoacide donné dans 0.1-0.2 μ mole de DNP-peptide semble présenter un certain intérêt sur le plan analytique. Aussi allons-nous le discuter en détail dans le cas particulier d'une famille de peptides possédant un résidu de DNP-valine et plusieurs résidus d'acide aspartique.

Deux techniques ont été utilisées. La première dérive de celle décrite récemment par BOISSONNAS⁹. Elle consiste à chromatographier sur une même feuille et dans le système butanol, acide acétique et eau (4:1:5) une partie aliquote de l'hydrolysat et une série de solutions contenant des quantités connues d'acide aspartique pur. Le papier est débarrassé de son ammoniaque par un traitement à la potasse alcoolique. Les zones occupées par l'acide aspartique sont élues et un dosage colorimétrique à la ninhydrine est effectué sur les éluats. Trois blancs sont en outre faits avec des zones d'égale surface mais dépourvues d'aminoacides. Les témoins permettent de tracer une courbe de référence à l'aide de laquelle on calcule la teneur en acide aspartique de l'hydrolysat. Cette teneur est ensuite comparée sur une base molaire à la quantité d'acide aspartique fournie dans des conditions rigoureusement identiques par l'hydrolyse du peptide P₁, lequel comme nous le verrons par la suite est l'acide DNP-valylaspartique. On en déduit le nombre de résidus d'acide aspartique dans le peptide étudié.

La Fig. 1 reproduit une des courbes de référence obtenue au cours de nos essais. Comme on le voit, l'interpolation entre deux valeurs expérimentales est très simple et elle n'introduit certainement pas d'erreurs importantes. La principale cause d'erreur est la décomposition très notable que subit l'acide aspartique pendant l'hydrolyse du DNP-peptide.

La deuxième technique consiste à traiter l'hydrolysat par le fluorodinitrobenzène, à chromatographier les DNP-aminoacides sur papier avec du tampon citrate¹⁰ 0.7 M à pH = 6.2, à éluer les taches et à faire un dosage colorimétrique à 3500 Å sur les éluats. La condensation de l'acide aspartique avec le fluorodinitrobenzène s'effectue généralement avec un assez mauvais rendement¹¹. Aussi, avons-nous opéré à 40°¹² pendant 2 h dans 100 µl de triméthylamine à 1% en présence de 2 µl de fluorodinitrobenzène dans 200 µl d'éthanol. Dans ces conditions, l'acide aspartique se condense à 96%. Pour éluer les taches, on les découpe en bandes minces que l'on agite doucement pendant 15 min avec 4 ml d'eau à 60°. La couleur diffuse dans l'eau à concurrence de 93%.

Cette dernière technique semble excellente pour la microdétermination de la composition d'un peptide ordinaire. Nous avons en effet obtenu avec 0.1 µ mole d'acide valylaspartique pur* un rapport molaire DNP-Asp/DNP-Val égal à 1.04. Mais son application aux DNP-peptides est plus délicate car le résidu N-terminal subit pendant l'hydrolyse une décomposition beaucoup plus importante que les autres résidus. C'est ainsi par exemple que l'acide DNP-valylaspartique pur donne un rapport molaire DNP-Asp/DNP-Val, non plus égal à 1 comme on pourrait s'y attendre, mais égal à 1.47. Il est donc indispensable d'effectuer à l'avance une série d'essais témoins afin de déterminer les valeurs prises par le rapport DNP-Asp/DNP-Val en fonction du nombre de résidus d'acide aspartique dans le peptide. Les essais ont été réalisés avec des mélanges

* Cet échantillon nous a été aimablement fourni par Dr. E. BRICAS. Sa pureté a été contrôlée par chromatographie.

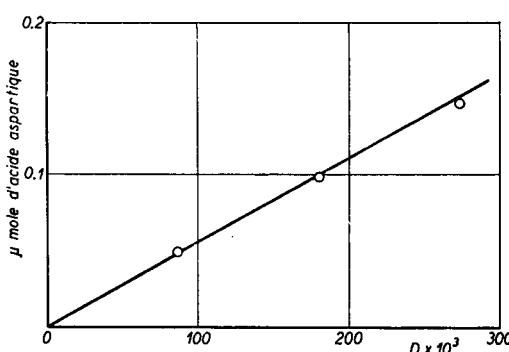


Fig. 1. Exemple de courbe de référence utilisée pendant la chromatographie quantitative sur papier. Les lectures sont faites à 5700 Å avec un spectrophotomètre de Beckmann.

contenant une quantité donnée d'acide DNP-valylaspartique et des quantités croissantes d'acide aspartique. La Fig. 2 montre que les points obtenus s'alignent sensiblement le long d'une droite. Il est donc facile de trouver le nombre de résidus d'acide aspartique dans un DNP-peptide inconnu, dès que le rapport DNP-Asp/DNP-Val de ce peptide est connu.

Le peptide P_3 dont nous parlerons plus précisément tout à l'heure contient en outre un résidu d' ϵ DNP-lysine, lequel doit être converti en di DNP-lysine au moment de la condensation de l'hydrolysat avec le fluorodinitrobenzène. Cette condensation s'effectue, tout au moins dans nos conditions expérimentales, avec un rendement d'environ 28%.

II. RÉSULTATS

Les hydrolysats partiels de DNP-trypsino-gène donnent naissance à diverses bandes pendant la chromatographie sur colonnes. Trois seulement correspondent à des DNP-peptides N-terminaux. Ces peptides sont désignés par les lettres P_1 , P_2 et P_3 . L'hydrolyse totale de P_1 et de P_2 engendre exclusivement de la DNP-valine et de l'acide aspartique. L'hydrolyse de P_3 fournit en plus de l' ϵ DNP-lysine.

Fig. 2. Détermination du nombre de résidus d'acide aspartique en fonction du rapport DNP-Asp/DNP-Val. Dans chaque essai, il y a 0.1 μ mole d'acide DNP-valyl-aspartique.

Le Tableau I indique combien il se forme de peptides P_1 , P_2 et P_3 quand on hydrolyse le DNP-trypsino-gène dans diverses conditions. Le tableau donne également quelques renseignements sur le comportement chromatographique de ces peptides.

Comme on le voit, c'est le peptide P_1 que l'on obtient le plus aisément. Les peptides P_2 et P_3 ne se forment qu'au cours de certaines hydrolyses et leurs proportions sont toujours très faibles (rendement: 2 à 8%).

Les Tableaux II et III d'autre part indiquent les résultats obtenus au cours du dosage quantitatif de l'acide aspartique dans les trois DNP-peptides.

Les chiffres des Tableaux II et III appellent les quelques commentaires suivants:

1. Le peptide P_1 est certainement l'acide DNP-valylaspartique car la condensation de son hydrolysat avec le fluorodinitrobenzène permet de trouver (Tableau III) un rapport DNP-Asp/DNP-Val sensiblement égal à celui fourni dans les mêmes conditions par l'acide DNP-valylaspartique pur (Fig. 2). En outre, le comportement chromatographique des deux peptides est identique (Tableau IV).

2. P_1 étant bien l'acide DNP-valylaspartique, on s'aperçoit aisément que P_2 contient deux résidus d'acide aspartique puisque l'hydrolyse de ce peptide engendre à peu près deux fois plus d'acide aspartique que l'hydrolyse de P_1 (Tableau II). La structure de P_2 est donc: DNP-Val. Asp.Asp.

3. En raisonnant de la même façon, la chromatographie quantitative sur papier (Tableau II) nous indique que P_3 contient 4.2-4.5 résidus d'acide aspartique par mole. Or, quand on détermine ce nombre par condensation avec le fluorodinitrobenzène

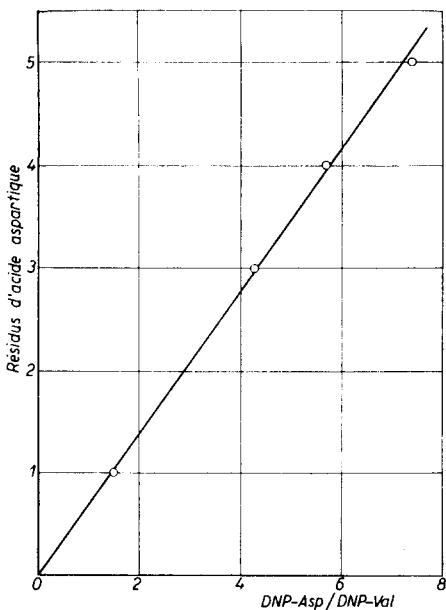


TABLEAU I

RÉSULTATS DE L'HYDROLYSE PARTIELLE DU DNP-TRYPSINOGENE
(μ mole de DNP-peptides N-terminaux pour 1 μ mole de DNP-protéine)

Les symboles 3B, 5B et 10B placés entre parenthèses dans les têtes de certaines colonnes signifient que les R correspondants ont été mesurés avec des mélanges contenant du chloroforme et 3, 5 ou 10% de *n*-butanol en volume. Les mélanges étaient saturés d'eau avant l'emploi. Les essais 3a et 4a ont été réalisés en hydrolysant davantage les substances non-extractibles à l'acétate d'éthyle, engendrées respectivement par les essais 3 et 4.

No. des essais	DNP-trypsinogène (mg)	Conditions de l'hydrolyse partielle	DNP valine $R = 0.6 (CHCl^3)$	P_1 $R = 0.33 (3B)$	P_2 $R = 0.15 (5B)$	P_3 $R = 0.30 (10B)$
1	25	HCl 3 N 1/2 h à reflux	# 0	0.13	—	0.08
2	25	HCl 12 N 7 jours à 37°	# 0	0.10	—	0.04
3	83	HCl 3 N 1/2 h à reflux	0.02	0.18	—	0.04
3a	83	HCl 5.6 N 1/2 h à reflux	0.05	0.12	—	—
4	100	HCl 3 N 1/2 h à reflux	# 0	0.18	—	0.07
4a	100	HCl N/10 18 h à reflux	0.1	0.06	0.02	—
5	93	HCl N/10 18 h à reflux	0.2	0.15	—	—
6	196	HCl 3 N 1/2 h à reflux	# 0	0.05	—	0.01
7	150	HCl 12 N 7 jours à 37°	# 0	0.04	—	0.02

TABLEAU II

DÉTERMINATION DU NOMBRE DE RÉSIDUS D'ACIDE ASPARTIQUE DANS P_1 , P_2 ET P_3 PAR
OBSERVATION VISUELLE ET CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE SUR PAPIER

No. des essais	Méthode utilisée	Nombre de résidus d'acide aspartique dans					
		P_1		P_2		P_3	
		Trouvé	Réel	Trouvé	Corrigé	Trouvé	Corrigé
Observation visuelle							
1	par comparaison avec une	0.5-1	1.0	—	—	> 2	—
2	série de taches de référence	0.5-0.8	1.0	—	—	> 2	—
3	Chromatographie	0.63	1.0	—	—	2.83	4.5
4	quantitative	0.67	1.0	—	—	2.80	4.2
4a	sur papier	0.63	1.0	1.4	2.2	—	—

TABLEAU III

DÉTERMINATION DU NOMBRE DE RÉSIDUS D'ACIDE ASPARTIQUE DANS P_1 ET P_3
PAR CONDENSATION AVEC LE FLUORODINITROBENZÈNE

No. des essais	DNP-Asp/DNP-Val.		Nombre de résidus d'acide aspartique (calculé à partir de la courbe de la Fig. 2)	
	P_1	P_3	P_1	P_3
6	1.32	4.75	0.90	3.34
7	1.41	5.55	0.96	3.91

TABLEAU IV
COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE DE P_1 ET DE L'ACIDE DNP-VALYLASPARTIQUE PUR

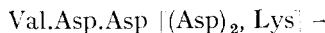
	R_f sur colonne de silicagel tamponnée à $pH \approx 6.7$	R_F^* sur Whatman No. 1, Solvant: tampon citrate 0.7 M à $pH \approx 6.2$
Acide DNP- valylaspartique pur	0.35	0.75
P_1	0.33	0.75

* Le plus rapide des DNP-aminoacides, l'acide DNP-aspartique, possède dans ce système un R_F égal à 0.69.

(Tableau III) on trouve 3.4 et 3.9 résidus. Il est donc clair que P_3 contient en fait 4 résidus d'acide aspartique.

4. On sait d'autre part que l'hydrolyse totale de P_3 fournit, en plus de la DNP-valine et de l'acide aspartique, des quantités très notables d' ϵ DNP-lysine. La simple observation visuelle après chromatographie sur papier (tampon citrate) permet de se rendre compte que ce dérivé et la DNP-valine se trouvent dans les hydrolysats en quantités sensiblement équivalentes. L' ϵ DNP-lysine appartient donc bien au peptide P_3 et non à une impureté quelconque accompagnant fortuitement ce peptide. L'observation suggère d'autre part que P_3 contient un résidu de lysine par mole. Après hydrolyse de P_3 et condensation de l'hydrolysat avec le fluorodinitrobenzène, on peut d'ailleurs doser 0.20 mole de diDNP-lysine alors qu'on en dose 0.28 quand on part d' ϵ DNP-lysine pure. Si l'on tient compte des pertes pendant l'hydrolyse, la présence du 1 résidu de lysine dans le peptide se trouve démontrée.

La formule brute de P_3 est donc DNP-Val [(Asp)₄, ϵ DNP-Lys]. L'étude du peptide P_2 nous ayant appris que la valine est suivie de deux résidus d'acide aspartique, cette formule devient DNP-Val.Asp.Asp. [(Asp)₂, ϵ DNP-Lys] et la structure suivante peut être attribuée à la séquence N-terminale du trypsinogène.



Autrement dit, cette séquence contient après son résidu valine deux résidus d'acide aspartique en 2^o et 3^o position puis, dans un ordre indéterminé, deux nouveaux résidus d'acide aspartique et un résidu de lysine.

5. Cette formule étant établie, on comprend pourquoi P_1 se forme avec un bon rendement puisque la liaison Val-Asp est stabilisée par la valine et pourquoi les autres peptides ne se forment pas ou se forment en très faibles quantités. Il faut la présence d'un résidu ϵ DNP-lysine pour permettre l'obtention par un hasard heureux de quantités notables du peptide P_3 .

6. Tous les peptides étant obtenus par hydrolyse acide, il nous est impossible de savoir si certains résidus Asp se trouvent ou non sous forme d'asparagine dans la séquence initiale. L'hydrolysat acide du peptide correspondant à cette séquence contient 0.3 mole d'ammoniaque¹³.

III. DISCUSSION DES RÉSULTATS*

DAVIE ET NEURATH¹⁴ ont récemment entrepris d'étudier le ou les peptides qui, d'après la théorie rappelée dans l'introduction, doivent être libérés pendant l'activation

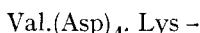
* La présente discussion est strictement limitée à la région N-terminale du trypsinogène et de la trypsine.

du trypsinogène. Les auteurs ont identifié un peptide contenant de la valine (1 mole), de la lysine (1 mole) et de l'acide aspartique. Le nombre de résidus d'acide aspartique, d'abord fixé à 5-6, a ensuite été ramené à 4. Les résultats du présent travail montrent que la composition globale du peptide et celle de la séquence N-terminale du trypsinogène sont rigoureusement identiques.

Quatre hypothèses intéressantes ont en outre été formulées à propos de ce peptide^{13, 14}:

1. Par analogie avec le trypsinogène, la valine s'y trouve en position N-terminale. Cette première hypothèse a d'ailleurs été confirmée expérimentalement un peu plus tard¹³ au moyen de la technique de SANGER.

2. Le peptide est libéré par la trypsine et la trypsine rompt préférentiellement les liaisons possédant un résidu basique sur leur flanc carbonyle. La lysine occupe donc vraisemblablement la position C-terminale dans le peptide. Tout ce que l'on sait à l'heure actuelle sur le comportement de la trypsine suggère fortement que cette deuxième hypothèse est exacte et qu'il convient par conséquent d'écrire comme suit la formule développée du peptide et de la séquence N-terminale du trypsinogène:



Néanmoins, cette formule ne saurait dès maintenant être considérée comme définitivement démontrée. Tous les essais effectués en vue d'identifier le résidu C-terminal de P₃ ont jusqu'ici échoué*.

3. La formation du peptide est due, non à une dégradation générale des molécules protéiques, mais à la protéolyse spécifique provoquant l'activation. Cette troisième hypothèse est également vraisemblable car: (a) le peptide apparaît dès les premières minutes et ses proportions semblent croître au fur et à mesure que progresse l'activation¹³. (b) La séquence N-terminale du trypsinogène étant différente de celle de la trypsine, il faut penser que cette séquence est éliminée ou masquée pendant l'activation⁴. Puisqu'on la retrouve à l'état de peptide, c'est qu'elle est bien éliminée. Ainsi, grâce à la confrontation de divers résultats, se confirme peu à peu notre théorie initiale, selon laquelle l'activation du trypsinogène implique l'ablation de la séquence N-terminale de cette protéine.

4. Au sein du trypsinogène, la lysine N-terminale du peptide est directement liée au résidu *isoleucine* qui deviendra N-terminal dans la trypsine. Autrement dit, seule la liaison *lysyl-isoleucine* est rompue et aucun peptide intermédiaire n'est libéré. Il n'est pas exclu que cette quatrième hypothèse soit aussi valable que les précédentes. Mais, comme DAVIE l'indique lui-même¹³, une enquête plus approfondie semble nécessaire avant de formuler de façon précise l'ensemble du phénomène d'activation.

5. Rappelons pour finir que la séquence N-terminale de la trypsine⁷ est Ileu.Val.Gly-. Si toutes les hypothèses précédentes se révèlent exactes, la séquence N-terminale du trypsinogène serait donc connue sur une longueur de neuf résidus:



RÉSUMÉ

1. Il est possible d'analyser 0.1 μmole d'un certain dinitrophénol (DNP) peptide avec une précision suffisante pour dire sans ambiguïté que ce peptide contient quatre résidus d'acide aspartique.

* La carboxypeptidase en particulier ne libère aucun aminoacide à partir du peptide P₃. Mais ce fait n'apporte aucun argument pour ou contre la position C-terminale de la lysine car la présence du radical *e* DNP dans le peptide modifie certainement le comportement de l'enzyme.

2. L'hydrolyse ménagée du DNP-trypsinogène permet d'identifier trois DNP-peptides N-terminaux: l'acide DNP-valylaspartique, l'acide DNP-valylaspartylaspartique et un DNP-peptide contenant de la DNP-valine (1 mole), de l'acide aspartique (4 mole) et de l' ϵ DNP-lysine (1 mole). La séquence N-terminale du trypsinogène possède donc la même composition globale que le peptide de DAVIE ET NEURATH libéré pendant l'activation du zymogène. Notre théorie selon laquelle l'activation implique l'ablation de la séquence N-terminale de la chaîne se trouve ainsi confirmée.

3. Cette séquence N-terminale répond à la formule: Val·Asp·Asp·[(Asp)₂, Lys] —. La position de la lysine ne peut pas à l'heure actuelle être précisée davantage sans faire intervenir une hypothèse concernant la spécificité d'action de la trypsine.

SUMMARY

1. It is possible to analyse 0.1 mole of a certain dinitrophenyl (DNP) peptide sufficiently accurately to allow one to state that this peptide contains four aspartic acid residues.

2. By the controlled hydrolysis of DNP-trypsinogen one can identify three N-terminal DNP-peptides: DNP-valylaspartic acid, DNP-valylaspartylaspartic acid and a DNP-peptide containing DNP-valine (1 mole), aspartic acid (4 moles) and ϵ DNP-lysine (1 mole). The N-terminal sequence of trypsinogen possesses therefore the same total composition as the peptide of DAVIE AND NEURATH, liberated during activation of zymogen. Our theory that the activation implies the removal of the N-terminal sequence of the chain is thus confirmed.

3. This N-terminal sequence corresponds to the formula: Val·Asp·Asp·[(Asp)₂, Lys] —. The position of the lysine cannot at present be more exactly determined without bringing in an hypothesis concerning the specific action of trypsin.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es besteht die Möglichkeit, 0.1 μ Mol. eines bestimmten Dinitrophenyl-(DNP)-Peptides mit genügender Genauigkeit zu analysieren, um mit Sicherheit behaupten zu können, dass dieses Peptid 4 Asparaginsäurereste enthält.

2. Durch eine mässige Hydrolyse konnten 3 aminoendständige DNP-Peptide des DNP-Trypsinogens identifiziert werden: DNP-Valyl-Asparaginsäure, DNP-Valyl-Asparagyl-Asparaginsäure und ein DNP-Peptid, welches DNP-Valin (1 Mol.), Asparaginsäure (4 Mol.) und ϵ -DNP-Lysin (1 Mol.) enthält. Die aminoendständige Reihenfolge weist also die gleiche globale Zusammensetzung auf, wie das während der Zymogenaktivierung befreite, von DAVIE UND NEURATH beschriebene Peptid. Somit wird also unsere Theorie bestätigt, laut welcher die Aktivierung die Entfernung der aminoendständigen Aminosäurenfolge mit sich zieht.

3. Diese aminoendständige Reihenfolge ist wie folgt: Val·Asp·Asp·[(Asp)₂, Lys] —. Die Position des Lysinrestes kann zur Zeit noch nicht näher bestimmt werden, ohne eine die Trypsinwirkungsspezifität betreffende Hypothese aufzustellen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, 2nd Ed., Columbia University Press, New York, 1948.
- ² M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 702.
- ³ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *The Chemical Structure of Proteins*, Churchill, London, 1953, p. 58.
- ⁴ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 547.
- ⁵ E. W. DAVIE ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 6305.
- ⁶ F. SANGER, *Biochem. J.*, 45 (1949) 563.
- ⁷ P. DESNUELLE ET C. FABRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 181.
- ⁸ S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- ⁹ R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950) 1975.
- ¹⁰ M. ROVERY ET C. FABRE, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 541.
- ¹¹ W. A. SCHROEDER ET J. LEGETTE, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4612.
- ¹² A. L. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.
- ¹³ E. W. DAVIE, *Univ. Microfilms Publ.*, No. 8345.
- ¹⁴ E. W. DAVIE ET H. NEURATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 442.

Reçu le 5 mars 1955

Notes ajoutées sur épreuves

1. BETTELHEIM a récemment signalé (*J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 235) que le chymotrypsinogène possède un demi-résidu de cystine N-terminale, lequel est déterminé à l'état d'acide DNP-cystéique après oxydation performique et hydrolyse de la DNP-protéine. Un résidu semblable n'existe pas dans le trypsinogène. Ce zymogène et la trypsine doivent donc toujours être considérés comme possédant un seul résidu N-terminal (respectivement, valine et *isoleucine*).

2. Un moyen élégant pour prouver la position C-terminale de la lysine dans le peptide de DAVIE ET NEURATH et pour démontrer l'existence d'une liaison directe entre ce peptide et l'*isoleucine* N-terminale de la trypsine, consisterait à isoler un peptide contenant à la fois et dans l'ordre convenable les derniers résidus du peptide et les premiers résidus de la trypsine. En extrayant longuement par l'acétate d'éthyle la solution acide des DNP-peptides engendrés au cours de l'hydrolyse partielle du DNP-trypsinogène, on trouve des quantités très substantielles (0.8 mole par mole) d'un DNP-tripeptide contenant de l'*e*-DNP-lysine en position N-terminale et de la valine. Le 3^o résidu est malheureusement la leucine (et non l'*isoleucine*). Le fait mérite cependant d'être signalé car il suggère que le mode d'enchaînement des résidus est presque identique en deux points différents de la molécule de trypsinogène.