

Extrémités N et C-terminales du chymotrypsinogène de boeuf

Aucun résidu C-terminal n'a pu être décelé dans le chymotrypsinogène de boeuf (ChTg) par la technique classique à la carboxypeptidase A¹ ou par hydrazinolyse². Or, le zymogène contient un résidu N-terminal de $\frac{1}{2}$ cystine³ et la chymotrypsine- α qui en dérive par formation de 2 chaînes ouvertes⁴, donne naissance à 3 chaînes indépendantes A, B et C par oxydation performique⁵. On peut donc supposer qu'une chaîne existe déjà dans ChTg et que, pour une raison quelconque, le résidu C-terminal de cette chaîne n'a pas encore été trouvé. D'après MEEDOM⁵, ChTg oxydé, ChTg dénaturé par l'urée 6 M et la chaîne C de la chymotrypsine- α (qui doit en principe correspondre à la région C-terminale du zymogène) posséderaient un résidu C-terminal de tyrosine accessible à la carboxypeptidase A. La question se pose de savoir si ce résidu appartient à ChTg ou à l'un des neochymotrypsinogènes qu'il engendre facilement par rupture d'une liaison tyrosyl-thréonine⁴.

Quand ChTg est complètement dépourvu d'activité chymotrypsique et de neochymotrypsinogène, la carboxypeptidase A (6 h à 25° dans une solution 0.02 M en véronal pH 7.8 et 0.1 M en NaCl; rapport enzyme/substrat: 0.03; incubation préalable de l'enzyme avec le diisopropylfluorophosphate (DFP); présence de 1 mole/mole de DFP pendant l'attaque) libère des quantités de tyrosine et de leucine n'excédant pas 0.05 mole/mole. Mais, quand l'attaque carboxypeptidasique se produit au sein de l'urée 6 M, on obtient des quantités presque stoechiométriques d'asparagine, d'alanine et de leucine ainsi que des quantités moindres de valine. Quand l'attaque est renouvelée après dialyse, des quantités substantielles de thréonine apparaissent. La tyrosine est absente dans tous les cas. Les courbes de viscosité de la Fig. 1 montrent que les conditions expérimentales adoptées provoquent une dénaturation complète du zymogène. Cette dénaturation rend complètement accessible une séquence C-terminale qui peut être: -Thr.Val.Leu.Ala.Asp-NH₂. Il est également possible que la leucine soit après l'alanine. Dans ce cas, un 2° résidu d'alanine existerait dans la séquence.

Cette séquence est aussi accessible dans ChTg oxydé.

La Fig. 2 indique que l'accessibilité de l'extrémité C-terminale est proportionnelle au taux de dénaturation. Ce taux correspond, soit à la coexistence de molécules natives et complètement dénaturées, soit, comme nous préférons le penser, à une déformation progressive de toutes les molécules mises en présence de concentrations croissantes d'urée.

Quand, après une simple dénaturation dans l'urée 6 M, on dialyse l'urée contre HCl 10⁻³ M, la viscosité de ChTg retombe à sa valeur initiale. La protéine n'est cependant pas intégralement "renaturée" car son extrémité C-terminale reste accessible à la carboxypeptidase. Les mêmes amino acides sont libérés en quantités sensiblement égales. Nous sommes donc en présence de formes partiellement dénaturées de ChTg, dans lesquelles l'une des déformations permanentes peut être localisée au niveau de l'extrémité C-terminale de la chaîne. Le fait que cette extrémité soit située en dehors des ponts disulfure, explique sans doute le caractère permanent de la déformation. Ces formes (chymotrypsinogènes "U") sont activables par la trypsin à la même vitesse que la forme native. Mais leur activité potentielle est réduite d'un tiers environ (Fig. 3). Elles doivent donc être rapprochées des neochymotrypsinogènes⁴. Dans les deux cas, la vulnérabilité extrême d'une liaison Arg-Ileu

vis-à-vis de la trypsine⁶ a été conservée et un centre actif s'est formé. Mais l'altération de la structure native s'est manifestée par une diminution sensible de l'"activité" du centre. Les deux cas ne sont cependant pas identiques. La dénaturation partielle des chymotrypsinogènes "U" est obtenue sans toucher aux liaisons covalentes de la molécule.

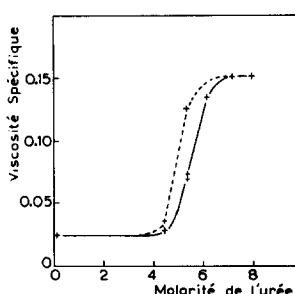


Fig. 1.

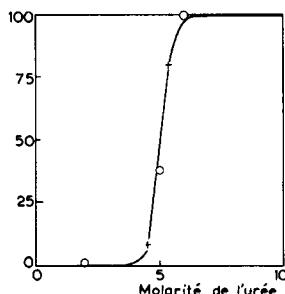


Fig. 2.

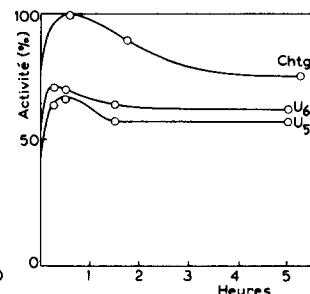


Fig. 3.

Fig. 1. Viscosité du chymotrypsinogène en fonction de la concentration de l'urée. Après 15 min: trait plein. Après 6 h: trait pointillé. Les conditions de la dénaturation sont données dans le texte.

Fig. 2. Taux de dénaturation du chymotrypsinogène et accessibilité de son extrémité C-terminale. +: Viscosité spécifique (en % de la viscosité maximum). O: Quantités d'alanine libérées par la carboxypeptidase en 6 h (en % de la quantité maximum libérée quand la dénaturation est totale). L'alanine a été déterminée de préférence à l'asparagine C-terminale car le dosage quantitatif de cette dernière en présence d'urée est assez difficile.

Fig. 3. Activation des chymotrypsinogènes "U" par la trypsine. Concentration du zymogène: 2.4%; rapport trypsine/zymogène: 0.025; temp.: 0°; pH = 7.8. Activité estérasique vis-à-vis de l'acétyl-L-tyrosine éthylester. ChTg: chymotrypsinogène natif. ChTg-U₅ et U₆: chymotrypsinogènes préalablement dénaturés pendant 6 h dans l'urée 5 ou 6 M, dialysés contre HCl 10⁻³ M et lyophilisés.

En outre, la chaîne C de la chymotrypsine- α correspond bien à la région C-terminale de ChTg car elle donne des résultats négatifs à l'hydrazinolyse et elle libère au contact de la carboxypeptidase A les amino acides cités précédemment. Le résidu N-terminal de cette chaîne et les résidus terminaux des chaînes A et B sont ceux annoncés par MEEDOM⁵. La chaîne B en particulier, qui donne des résultats douteux avec la carboxypeptidase, engendre exclusivement de la tyrosine par hydrazinolyse. Un schéma cohérent de la molécule de chymotrypsine- α , compatible à la fois avec la structure du zymogène et avec le mécanisme connu de l'activation "lente"⁴, peut maintenant être établi.

L'action de l'aminopeptidase sur ChTg a également été étudiée, surtout dans l'espoir que la rupture de la liaison située derrière le résidu N-terminal de $\frac{1}{2}$ cystine permette l'ablation en bloc de toute la chaîne A au moment de l'activation trypsique. Cet espoir ne s'est pas réalisé. L'aminopeptidase (C_1 : 70–140, 100 unités pour 1 μ mole de ChTg, tampon tris(hydroxymethyl)aminométhane-MgCl₂ à pH 8.5; 24 h à 40°, incubation préalable de l'enzyme avec DFP; présence de 200 mole/mole de DFP pendant le traitement) n'attaque pas ChTg, que celui-ci soit pris à l'état natif, dénaturé par l'urée ou oxydé. 25 unités d'enzyme par μ mole attaquent néanmoins la chaîne A en donnant: au bout de 6 h, de l'acide cystéique et un peu de glycocolle; au bout de 24 h, 1 mole d'acide cystéique, 0.8 mole de glycocolle et un peptide à

valine N-terminale. Quand l'hydrolyse est plus poussée, il apparaît d'un seul coup de faibles quantités de valine, de proline et d'isoleucine. Ces résultats sont compatibles avec la séquence CySO₃H.Gly.Val- proposée par MEEDOM⁷. Ils suggèrent en outre, étant donné les difficultés qu'éprouve l'enzyme à détacher la valine, que la proline occupe la 4° position dans la chaîne A.

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

M. ROVERY
C. GABELOTEAU
P. DE VERNEJOUL
A. GUIDONI
P. DESNUELLE

- ¹ J. A. GLADNER ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 345.
- ² C. I. NIU ET H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 5882.
- ³ F. R. BETTELHEIM, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 235.
- ⁴ M. ROVERY, M. POILROUX, A. YOSHIDA ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 608.
- ⁵ B. MEEDOM, *Acta Chem. Scand.*, 10 (1956) 881.
- ⁶ M. ROVERY, M. POILROUX, A. CURNIER ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 56.
- ⁷ B. MEEDOM, communication personnelle.

Reçu le 22 aout 1958

Chromatographic behaviour of hemoglobins

The successful application of adsorption chromatography has been complicated by the instability of protein molecules on supporting media and their tendency to be irreversibly adsorbed or to give strongly curved adsorption isotherms. However, a number of inorganic adsorbents and ion exchangers have been reported as suitable for protein chromatography. Recently, two rather complete reviews were published by MOORE AND STEIN¹ and by SOBER AND PETERSON².

The main object of the present work was to study the chromatographic behaviour of hemoglobins on adsorbents like calcium phosphate, hydroxylapatite and the cellulosic cation exchanger, carboxymethyl cellulose (CM-cellulose) and to find out the conditions for the separation of human adult hemoglobin (Hb A) and human fetal hemoglobin (Hb F). The chromatographic behaviour of some avian hemoglobins on Amberlite IRC-50 is also reported.

The blood samples were collected from normal adults by venipuncture and from the umbilical cord. The avian blood was obtained by cutting the jugular vein. The red cells were washed with isotonic saline and hemolysed as described earlier^{3, 4}. The clear hemoglobin solution thus obtained was stored at -4° in small test tubes and thawed prior to their application on the column.

Hydroxylapatite was prepared as described by TISELIUS *et al.*⁵. CM-cellulose of 0.46 mequiv/g dry material was prepared and regenerated by treating the used material with 0.5 M NaOH-0.5 M NaCl as described by PETERSON AND SOBER⁶. The columns were washed with the starting buffer till the pH of the effluent reached that of the buffer. Hydroxylapatite columns were packed under 0.8-1.0 kg/cm² pressure and slight pressure (0.4-0.5 kg/cm²) was found to be sufficient for the CM-cellulose columns. Initial treatment of Amberlite resin IRC-50 XE 64 was performed according to