

where  $T$  = TPNH,  $E$  = free enzyme,  $C_1$  = enzyme-TPNH complex,  $G$  = L-glutamate, and  $C_2$  = enzyme-TPNH-glutamate complex. If we now make the critical assumption that the molar coefficient of fluorescence is identical for  $C_1$  and  $C_2$ , we obtain the following expression for  $\Delta f = ([C_1] + [C_2])$  in arbitrary units:

$$\frac{I}{\Delta f} = \frac{I}{[E_t]} + \frac{K_T}{[T][E_t]} \left( \frac{I}{1 + \frac{[G]}{K_G}} \right) \quad (3)$$

where  $K_T = k_2/k_1$ ;  $K_G = k_4/k_3$ ;  $E_t$  = total enzyme. In the absence of glutamate, the equation reduces to:

$$\frac{I}{\Delta f} = \frac{I}{[E_t]} + \frac{K_T}{[T][E_t]} \quad (4)$$

Equations (3) and (4) represent straight lines with identical intercepts on the ordinate ( $I/[E_t]$ ) but different intercepts on the abscissa. The data shown in Fig. 1 are therefore consistent with this model, and the assumption that the molar fluorescence intensity of the binary complex and of the ternary complex are identical is not only justified, but required.

Where  $I/\Delta f = 0$ , eqn. (3) simplifies to:  $K_G = \frac{[T][G]}{K_T + [T]}$  (5)

Using the value of  $K_A$  from curve A (eqn. 4), and the value of ( $T$ ) obtained from the intercepts on the abscissa of curves B and C at their respective values of ( $G$ ), we can calculate values for  $K_G$ . This calculation gives values for  $K_G$  of  $2.6 \cdot 10^{-4}$  and  $3.6 \cdot 10^{-4} M$  respectively. The agreement of these values, within the experimental error of their determination, provides a totally independent check on the agreement of the data with the mechanism proposed. We are led, then, to two conclusions:

1. L-glutamate forms a ternary complex which hinders TPNH leaving, thereby suppressing the dissociation of the enzyme-TPNH complex.

2. L-glutamate does not change the fluorescence of the enzyme-TPNH complex itself, but only causes an increase in the fluorescence intensity of the solution by increasing the number of molecules of enzyme-bound TPNH in that solution.

This work was supported in part by Research Grant No. RG-5638 from the National Institutes of Health, Public Health Service.

*Edsel B. Ford Inst. for Medical Research, Henry Ford Hospital,  
Detroit, Mich. (U.S.A.)*

HARVEY F. FISHER  
LOIS L. McGREGOR

<sup>1</sup> H. F. FISHER AND L. L. McGREGOR, *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 562.

<sup>2</sup> H. F. FISHER, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1830.

<sup>3</sup> A. D. WINER AND G. W. SCHWERT, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 424.

Received August 16th, 1960

*Biochim. Biophys. Acta*, 43 (1960) 557-559

### **Sur la structure chimique de la partie peptidique de la cire D d'une souche humaine de *Mycobacterium tuberculosis***

Les souches humaines de *M. tuberculosis* contiennent un peptido-glycolipide appelé cire D, qui peut remplacer les Mycobactéries dans l'adjuvant de FREUND<sup>1</sup>. L'activité

Abréviations: DAP, acide diaminopimélique; Glu, acide glutaminique; Ala; alanine; DNP, dinitrophényle.

adjuvante semble liée à la présence d'une partie peptidique, car les cires D de souches bovines de *M. tuberculosis* qui ne contiennent pas d'acides aminés sont inactives comme adjuvants. La cire D de la souche humaine virulente "Brévannes" contient 7 molécules d'acides aminés (pour un poids moléculaire de 54,000): 2 meso-DAP, 2 D-Glu, 2 L-Ala et 1 D-Ala<sup>2</sup>. La présence d'acides aminés de configuration D est remarquable et semble assez générale pour des peptido-lipides et peptido-glycolipides des Actinomycetales<sup>3</sup>. La présente note étudie la structure chimique de la partie peptidique et les liaisons existant entre les parties peptidique et glucidique.

La partie hydrosoluble de la cire D a d'abord été dessalifiée sur Amberlite MB 3. Une chromatographie sur résine Dowex 50 × 2 a montré que le produit semble homogène.

#### *Structure chimique de la partie peptidique*

Comme la plupart des acides aminés sont présents sous la forme D, il n'était pas possible de faire appel à des enzymes protéolytiques pour établir la structure chimique. Des essais d'hydrolyse par la pepsine se sont d'ailleurs révélés infructueux. La cire D a été soumise à des hydrolyses acides partielles (HCl 6 N; 37°) de durées variables (20, 60, 72, 172 h) et les produits de réaction ont été séparés par chromatographie sur colonne de Dowex 50 × 2. Lorsque la durée de l'hydrolyse dépasse 60 h, on caractérise toujours 5 pics principaux.

Le pic 1 ne contient que des sucres, le pic 4 que des traces de produit. Les différentes fractions constituant un pic ont été réunies puis dessalifiées soit sur Dowex 2 × 8 (pics 2, 3, 3bis) soit sur Dowex 50 × 2 (pic 5)<sup>4</sup>. La pureté des pics a été vérifiée par chromatographie sur papier Whatman No. 1 et lorsque cela s'est révélé nécessaire, des chromatographies préparatives sur papier ont achevé la purification. Le Tableau I donne une liste des différents peptides obtenus. Les *R<sub>F</sub>* ont été établis dans le solvant: n-butanol-acide formique-eau (75:15:10, v/v/v); les acides aminés N-terminaux ont été déterminés par la méthode de SANGER<sup>5</sup> et la configuration optique de lalanine par la méthode de WOOD ET GUNSLAUS<sup>6</sup> modifiée par SZULMAJSTER<sup>7</sup>.

Le Tableau I montre aussi comment, grâce aux peptides obtenus par hydrolyse acide partielle, on peut envisager d'attribuer à la partie peptidique de la cire D la structure d'un heptapeptide linéaire (I). Mais comme par la méthode de Sanger on n'a pas pu obtenir de meso-di-DNP-DAP sur la cire D initiale, et comme de plus

TABLEAU I

Pic	Peptide	<i>R<sub>F</sub></i>	Structure des peptides obtenus par hydrolyse partielle
2	a	0	D-Glu.(L-Ala, <i>meso</i> -DAP) + sucres
2	b	0.03	D-Glu.(L-Ala, <i>meso</i> -DAP,L-Ala)
3	a	0.31	D-Glu.Ala
2	c	0.16	D-Glu.D-Glu
3bis	a	0.31	D-Ala.D-Glu
5	c	0.08	<i>meso</i> -DAP.D-Ala
(I)			<i>meso</i> -DAP.D-Ala.D-Glu.D-Glu.L-Ala. <i>meso</i> -DAP.L-Ala
(II)			<i>meso</i> -DAP → D-Ala → D-Glu ↓ L-Ala ← D-Glu → <i>meso</i> -DAP

\* Contrairement à ce que nous avions observé précédemment<sup>2</sup>.

la carboxypeptidase n'a pas pu détacher la L-alanine en position terminale\*, il semble que les deux groupements aminés du *meso*-DAP N-terminal et le groupement carboxylique de l'alanine C-terminale soient impliqués dans des liaisons non encore déterminées. On peut alors envisager une structure cyclique (II) qui tient également compte de tous les peptides partiels isolés. Dans le cyclopeptide (II) l'un des résidus de *meso*-DAP porte sur l'un de ses carboxyles la deuxième molécule de L-Ala.

#### *Liaisons entre les parties peptidique et glucidique*

Lorsque l'on dessalifie les fractions correspondant au pic 2 non plus sur Dowex  $2 \times 8$  mais sur Dowex  $50 \times 2$ , on peut caractériser 2 substances A et B ayant respectivement dans le *n*-butanol acide des  $R_F$  de 0 et 0.03 et qui, après hydrolyse acide totale ( $HCl 6\text{ N}$ ; 18 h,  $110^\circ$ ) libèrent du *meso*-DAP ( $R_F$  dans le même solvant du DAP, 0.05). Après une hydrolyse plus douce ( $HCl 1\text{ N}$  ou  $2\text{ N}$ ; 2 ou 4 h;  $110^\circ$ ) il a été possible de déceler la présence de galactosamine et de D-arabinose dans A, de galactosamine dans B. Si A ou B sont d'abord soumis à l'action du dinitrofluorobenzène puis à une hydrolyse acide il est possible de caractériser du di-DNP-*meso*-DAP et de la galactosamine. Une des liaisons entre les parties peptidique et glucidique de la cire D est donc constituée par une *liaison entre un groupement carboxylique du meso-DAP et la galactosamine*. Cetter dernière à son tour est liée au D-arabinose. Il n'a pas encore été possible de préciser la nature de la liaison DAP-galactosamine ni duquel des 2 résidus de *meso*-DAP il s'agit.

Une *deuxième liaison* entre les parties peptidique et glucidique a pu être caractérisée grâce à l'étude d'un hydrolysat acide partiel de cire D de 20 h seulement. Après chromatographie sur Dowex  $50 \times 2$  on obtient deux pics. Dans le premier il a été possible d'isoler un glycopeptide ( $R_F$ , 0). La structure de la partie peptidique est: Ala.Glu, et de plus on a caractérisé du D-arabinose et du D-galactose. Nous sommes donc en présence d'une liaison ester entre le groupement carboxylique de l'acide glutamique (résidu No. 3 de l'heptapeptide) et un groupement hydroxyle, soit de l'arabinose soit du galactose.

A l'heure actuelle il n'est cependant pas encore possible d'affirmer si les deux liaisons entre les parties peptidique et glucidique qui viennent d'être signalées sont les seules ou s'il en existe d'autres.

Nous remercions vivement le Dr. SZULMAJSTER d'avoir bien voulu nous aider pour la détermination des résidus L- et D-alanine.

Ce travail a bénéficié d'une subvention du National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Grant E 28-38), National Institute of Health, Bethesda.

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

P. JOLLÈS  
H. NGUYEN-TRUNG-LUONG-CROS  
E. LEDERER

<sup>1</sup> R. G. WHITE, L. BERNSTOCK, R. G. S. JOHNS ET E. LEDERER, *Immunology*, 1 (1958) 54.

<sup>2</sup> J. ASSELINEAU, H. BUC, P. JOLLÈS ET E. LEDERER, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 1953.

<sup>3</sup> M. IKAWA, E. E. SNELL ET E. LEDERER, *Nature*, 187 (1960) sous presse.

<sup>4</sup> J. JOLLÈS-THAUREAUX, P. JOLLÈS ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 298.

<sup>5</sup> F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 168.

<sup>6</sup> W. A. WOOD ET I. C. GUNSLAS, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 403.

<sup>7</sup> J. SZULMAJSTER, communication personnelle.

Reçu le 27 juillet 1960