

BBA 3808

SUR LE TRYPSINOGENÈ ET LA TRYPSINE DE PORC

M. CHARLES, M. ROVERY, A. GUIDONI ET P. DESNUELLE

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

(Reçu le 26 juin, 1962)

SUMMARY

On porcine trypsinogen and trypsin

A chromatographic procedure on carboxymethyl cellulose at pH 5.0 is described for the simultaneous purification of porcine trypsinogen and one of the porcine chymotrypsinogens. The yield calculated from the first extract of the gland in dilute sulfuric acid is 45% with a 2–3 fold purification. 1 kg of fresh pancreas gives at least 2.8 g of pure product.

The amino acid compositions of bovine and porcine trypsinogens reveal some similarities. The molecular weight of both proteins is of the same order. But, a series of sizable differences of composition suggest that large regions of the molecules have in fact quite different structures.

The diisopropylphosphoryl derivative of the trypsin formed by autoactivation of porcine trypsinogen can be purified by chromatography on carboxymethyl cellulose at pH 5.0. When the same technique is applied to active trypsin, a highly active, but slightly autolyzed, product is obtained.

Autoactivation of porcine and bovine trypsinogens proceeds at about the same rate to give about the same maximal specific activity. Calcium ions have the same effect. In both cases, the activation process involves the specific splitting of a Lys-Ileu bond belonging to the N-terminal sequence of the chain and having on its left 4 aspartic acid residues. However, this bond is the 8th of the sequence in the case of porcine trypsinogen. The peptide set free is the octapeptide Phe-Pro-Thr-(Asp)₄-Lys. Thus, the apparently essential region having the same structure in both trypsinogens is very narrowly restricted. Beyond it, structural modifications reflecting deep changes in the genetical information can be noted.

Porcine trypsinogen and porcine trypsin have the same C-terminal sequence: Thr-(Ileu, Glu(NH₂))-Ala-Asp(NH₂).

This identity is the first direct proof that trypsinogen activation does not involve any covalent modification in the C-terminal region of the chain.

INTRODUCTION

L'une des tâches fondamentales de la biochimie est d'établir une corrélation entre la structure des protéines actives et leur fonction. Cette tâche peut être facilitée par

Abréviations: DP-trypsine, dérivé diisopropylphosphorylé inactif de la trypsine; V_R , volume de rétention (ou volume "mort") des colonnes de chromatographie.

l'obtention sous une forme chimiquement définie de séries de protéines homologues exerçant la même fonction chez diverses espèces. Il est en effet concevable qu'au sein des molécules appartenant à une série donnée, les centres responsables de l'activité biologique aient une structure identique ou analogue permettant de les reconnaître. Des différences spécifiques dans d'autres régions moins essentielles seraient par contre susceptibles de nous indiquer jusqu'à quel point les mécanismes de la biosynthèse protéique ont pu être modifiés au cours de l'évolution des espèces, sans supprimer d'indispensables fonctions.

Depuis leur première cristallisation^{1,2}, les chymotrypsinogènes et le trypsinogène de boeuf, ainsi que les chymotrypsines et la trypsine qui en dérivent, ont fait l'objet de nombreux travaux^{3,4}. Mais il est dommage que nos informations soient limitées jusqu'ici au cas somme toute particulier des précurseurs et des enzymes protéolytiques du pancréas de boeuf. Le suc pancréatique de porc possède un équipement enzymatique fort complet⁵ dans lequel figurent un trypsinogène et au moins un chymotrypsinogène. Ces deux protéines peuvent être obtenues par chromatographie dans un état apparemment homogène⁶. L'objet du présent travail est de décrire en détail la purification du trypsinogène de porc, de donner quelques informations concernant sa structure, d'étudier le mécanisme chimique de son autoactivation et enfin de caractériser la trypsine qu'il engendre au cours de cette autoactivation.

TECHNIQUES

Détermination des activités enzymatiques

L'activité trypsique est déterminée au moyen d'une technique titrimétrique à pH constant⁷ fondée sur la mesure continue durant 3 min environ de la vitesse d'hydrolyse du benzoyl-L-arginine éthyl ester à 25° et pH 7.9. En accord avec les recommandations de la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie⁸, les activités spécifiques sont exprimées en μ -équival/min/mg protéine. Les quantités de protéine sont mesurées spectrophotométriquement à 280 m μ (absorbance d'une solution à 1% de trypsinogène pur vue sous 1 cm ($E_1^{1\%}$) à 280 m μ , 13.9).

Pour déterminer ce que l'on peut appeler l'activité potentielle du trypsinogène, il est nécessaire d'activer le précurseur avant de procéder à la mesure. L'activation est réalisée à 4° durant 18 h sur une solution à pH 7.8 de 150 μ g de protéines dans 1 ml de CaCl₂ 0.05 M en présence de 6 μ g de trypsine.

D'autre part, les activités chymotrypsiques de la Fig. 1 sont mesurées à l'aide de l'acétyl-L-tyrosine éthyl ester et exprimées comme il est indiqué plus haut. Le chymotrypsinogène (100 μ g), dissous dans du phosphate 0.2 M (pH 7.6) est activé à 35° durant 90 min par la trypsine (10 μ g), le volume total de la solution étant 5 ml.

Résidus terminaux et séquences C-terminales

Les résidus N-terminaux des peptides et des protéines sont déterminés par condensation avec le dinitrofluorobenzène dans le bicarbonate. Les DNP-dérivés sont hydrolysés sous vide en tubes scellés durant 18 h dans HCl 6 N à 115°. Les DNP-amino acides éthero-solubles sont étudiés par la technique classique de LEVY⁹ pour le trypsinogène et par la technique de MURACHI ET NEURATH¹⁰ pour la trypsine. La dernière donne une meilleure séparation de DNP-Leu et DNP-Val. Son rendement

est également plus élevé. Afin de distinguer l'isoleucine et la leucine en position N-terminale, les DNP-dérivés sont hydrolysés par l'ammoniaque et les amino acides obtenus sont chromatographiés sur papier dans l'alcool amylique *tert.* saturé d'eau. Des essais spéciaux sont réalisés en vue de rechercher la présence éventuelle de DNP-proline, de DNP-glycocolle, de mono DNP-cystine et des DNP-amino acides hydro-solubles.

Les séquences C-terminales sont déterminées par la technique à la carboxypeptidase. La présence d'un résidu d'asparagine en position C-terminale dans le trypsinogène et la trypsine de porc est confirmée par le caractère négatif des résultats obtenus au cours de l'hydrazinolyse. Les hydrazinolyse sont effectuées en l'absence de catalyseur¹¹ durant 8 h à 100°. Après extraction des hydrazides par le benzaldéhyde, les amino acides libres restant dans la phase aqueuse sont dosés quantitativement à l'aide d'un analyseur automatique Spinco-Beckman.

Les précautions suivantes sont prises au cours de l'application de la technique à la carboxypeptidase: (a) Contrôle avant chaque essai de l'activité des préparations commerciales utilisées (carboxypeptidase Worthington). (b) Emploi d'un analyseur automatique Spinco-Beckman, et non de la simple chromatographie sur papier, pour l'identification et le dosage quantitatif des amino acides libérés. Outre sa précision plus grande, cette technique a l'avantage d'éviter la dessalification complète des solutions d'amino acides. (c) Traitement préalable de la carboxypeptidase par le diisopropylfluorophosphate afin de bloquer ses impuretés endopeptidasiques et addition du même réactif durant les hydrolyses. L'instabilité propre au trypsinogène et à la trypsine en milieu alcalin pose toutefois un problème particulier. Il semble que la meilleure méthode pour les protéines de ce genre soit de les convertir en dérivés S-sulfo^{12,13} au sein desquels l'activité protéolytique est définitivement détruite et les séquences C-terminales sont pleinement accessibles.

Les dérivés S-sulfo du trypsinogène et de la trypsine de porc sont obtenus par la méthode décrite pour le S-sulfo trypsinogène de boeuf¹². Une solution de 10 mg de carboxypeptidase dans 1 ml de NaCl 1 M est incubée à pH 8.0 et 25° avec du diisopropylfluorophosphate 10^{-3} M. On suspend 6 μ moles du dérivé dans 0.6 ml de cette solution et, après avoir porté le volume à 6 ml avec de l'eau, ajusté le pH à 8.0 et amené de nouveau la concentration du diisopropylfluorophosphate à 10^{-3} M, on maintient le mélange à 25°. On prélève de temps à autre des échantillons correspondant à 1 μ mole de protéine, on y ajoute 0.3 ml d'acide acétique, on centrifuge les protéines qui précipitent à ce moment, on les lave et on dose directement les amino acides dans les supernatants au moyen de l'analyseur automatique Spinco-Beckman. Des essais témoins réalisés avec du trypsinogène réduit additionné d'un mélange standard d'amino acides montrent que le rendement de récupération des amino acides est dans ces conditions de 92-95%.

Dans certains cas, on fait agir la carboxypeptidase sur les protéines simplement dénaturées par l'urée. La technique est alors différente car il faut éliminer la majeure partie de l'urée avant de doser les amino acides dans l'analyseur. Cette élimination s'effectue en traitant à pH 2 sous agitation les échantillons (correspondant cette fois à 2 μ moles de protéine) par du Dowex-50, X8 (20-50 mailles) durant 2 h. La résine est lavée 4 fois à l'eau et les amino acides sont élués par l'ammoniaque 5 M. Des essais témoins doivent être faits pour déterminer les pertes en amino acides au cours des lavages de la résine. Ces pertes sont naturellement d'autant plus élevées que la vitesse

de migration des amino acides dans les colonnes de Dowex-50 est plus grande.

La présence simultanée d'asparagine et de glutamine dans la séquence C-terminale du trypsinogène et de la trypsine de porc nécessite enfin une étude particulière car l'analyseur automatique ne sépare pas les deux amides. Au cours d'une première opération, on analyse le mélange et on applique au pic mixte la formule de SPACKMAN, STEIN ET MOORE¹⁴. La valeur de ce pic est:

$$HW = 13.1x + 9.1y$$

où x et y sont les nombres respectifs de mole d'asparagine et de glutamine, 13.1 et 9.1 sont les coefficients correspondant à chacun des amides pris dans l'ordre ci-dessus. Dans une deuxième opération, on débranche la canalisation de sortie de la colonne et on recueille à l'extérieur de l'appareil les fractions formant le pic mixte (20 ml environ). Ces fractions sont évaporées à sec, le résidu est hydrolysé dans 3 ml d'HCl 3 M à 110° durant 3 h. Après une nouvelle évaporation à sec, le résidu est repris dans 10 ml d'eau et la solution est introduite dans l'appareil afin de déterminer les proportions relatives des acides aspartique et glutamique engendrés par l'hydrolyse des amides. Pour une raison mal connue, le coefficient de récupération de l'acide glutamique à partir de la glutamine ne dépasse pas 62.4 si celui de l'acide aspartique à partir de l'asparagine est pris égal à 100. Associé à la première équation, ce coefficient donne les proportions des deux amides dans le mélange initial. Un essai témoin réalisé sur un mélange contenant 0.492 μ mole d'asparagine et 0.294 μ mole de glutamine et utilisant les coefficients précédents a fourni des résultats satisfaisants.

Dégradation récurrente de l'octapeptide

La structure de l'octapeptide scindé au moment de l'autoactivation du trypsinogène de porc (voir plus loin) est trouvée en détachant successivement ses 3 premiers résidus par la technique récurrente d'Edman (voir réf. 15). Les condensations avec le phényl isothiocyanate sont faites dans un mélange à parties égales de pyridine et d'eau, à pH 9 et 40° durant 1 h. Les cyclisations sont réalisées à 35° dans un mélange acide acétique-HCl (5:1, v/v) durant 4 h (voir réf. 16). Après chaque étape, le peptide restant est récupéré et analysé¹⁷. On enregistre ainsi la disparition totale ou au moins partielle des résidus apparaissant successivement en position N-terminale au cours des dégradations.

*Détermination du point isoionique**

On place dans un tube de 1 cm de diamètre intérieur: (a) sur 4 cm, de l'Amberlite IR-120 forme H⁺; (b) sur 10 cm, un mélange de 3 parties d'Amberlite IRA-400 forme OH⁻ et d'Amberlite IR-120 forme H⁺; (c) sur 5 cm, un deuxième lit mixte d'Amberlite IRA-400 forme acétate et d'Amberlite IR-120 forme NH₄⁺. Le lit inférieur a pour objet de retenir les amines provenant de la décomposition de l'Amberlite IRA-400. Le lit supérieur évite les variations extrêmes de pH qui risqueraient de dénaturer le trypsinogène. Le lit mixte médian assure la désionisation de la solution.

On fait traverser des colonnes de ce type (débit, 1 ml/min; temp., 4°) par plusieurs solutions de trypsinogène de diverses concentrations. Les solutions ainsi désionisées

* Cette technique, déjà utilisée pour le trypsinogène de boeuf¹⁸, nous a été aimablement communiquée par Dr. N. M. GREEN.

sont additionnées de KCl (concentration finale, 0.005 M) afin de leur assurer une conductibilité convenable et elles sont transférées, en évitant leur contact avec le gaz carbonique atmosphérique, dans de petits récipients où l'on mesure leur pH à 14° sous un courant d'azote pur.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Purification du trypsinogène de porc.

Les premières étapes de la technique comportent des fractionnements par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, analogues à ceux préconisés par NORTHROP *et al.*¹ pour la préparation du trypsinogène de boeuf. Le trypsinogène de porc est cependant moins soluble que son homologue du boeuf puisqu'il précipite en partie avant la saturation 0.4. L'étape finale est une chromatographie sur CM-cellulose qui permet d'obtenir à la fois le trypsinogène et l'un des chymotrypsinogènes du porc⁶. Toutes les opérations sont faites dans un bain de glace ou à la chambre froide.

Les pancréas frais (1500 g), prélevés rapidement et débarrassés des tissus adipeux adhérents, sont broyés dans SO_4H_2 0.25 N (2000 ml). Au bout de 24 h, la solution est filtrée sur mousseline, puis sur filtre à plis*. L'extrait limpide, dont le pH est 1.8 et dont les teneurs en trypsinogène et chymotrypsinogène sont déjà, respectivement, d'environ 40 et 16 g pour 100 g de protéines totales, est additionné de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ jusqu'à 0.4 saturation**. Le précipité est dissous dans HCl 10^{-3} M (concentration en protéines, 2.5%) et le pH de la solution est amené à 3 avec HCl 1 N. Le nouveau précipité obtenu entre les saturations 0.2 et 0.4 est dissous dans HCl 10^{-3} M. La solution est dessalifiée par dialyse ou passage à travers une colonne de Sephadex G-25 et finalement lyophilisée. La poudre contient une partie du trypsinogène et le chymotrypsinogène-A qui peuvent être séparés par une chromatographie sur CM-cellulose. La Fig. 1

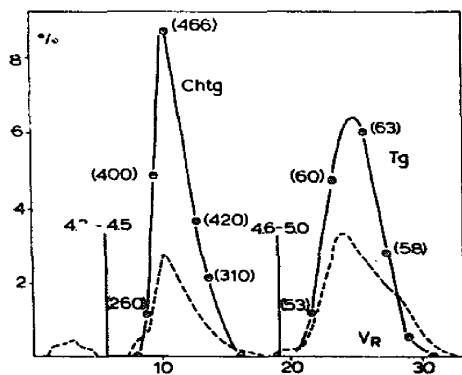


Fig. 1. Préparation du trypsinogène et du chymotrypsinogène-A de porc par chromatographie sur CM-cellulose (méquiv acides/g, 0.50; pK , 4.6) préparée au Laboratoire selon les indications de PETERSON ET SOBER¹⁹. Elle est équilibrée avec un tampon citrate de Na 0.05 M (pH 4.3). La colonne (3 × 9 cm; V_R , 25 ml) est lavée avec 250 ml de tampon (10 V_R), on y introduit 1.5 g de poudre lyophilisée dissoute dans 10 ml de tampon (0.4 V_R). Au moment indiqué par les flèches dans la figure, le tampon initial est remplacé par des tampons de même molarité, mais de pH 4.6, puis 5.0. Le choix du moment où le tampon doit être changé est facilité par l'emploi d'un enregistreur continu d'absorbance monté sur la canalisation de sortie de la colonne. Débit de la colonne, 1.6 V_R /h. Volume des fractions, 0.4 V_R . Ordonnées, activités potentielles (trait continu) et protéines (trait pointillé) trouvées

dans les fractions, en pour-cent des quantités totales introduites dans la colonne. Abscisses, volume de l'éluat exprimé en nombre de V_R . Les nombres le long des pics indiquent les activités spécifiques (chymotrypsique pour le pic de chymotrypsinogène (ChTg) et trypsique pour le pic de trypsinogène (Tg)). Les protéines de la charge se répartissent à concurrence de 3% dans le premier pic, 25% dans le deuxième et 60% dans le troisième.

* La filtration est plus rapide lorsque la suspension contient déjà un peu de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

** Ce fractionnement dans $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à la saturation 0.4 est utile lorsqu'on désire préparer à la fois le chymotrypsinogène-A et le trypsinogène de porc. Il est inutile pour le trypsinogène seul, dont une partie doit être ultérieurement récupérée en élevant le degré de saturation à 0.8.

indique les résultats de cette chromatographie. La colonne est équilibrée et chargée à pH 4.3. Après la sortie d'un petit pic inactif et non-activable, le chymotrypsinogène-A est élué en élevant le pH à 4.6 et le trypsinogène, en élevant à nouveau le pH jusqu'à 5.0.

Une chromatographie identique est réalisée avec les protéines précipitées par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ entre 0.4 et 0.8 saturation. Les fractions contenant du trypsinogène sont immédiatement acidifiées à pH 3. Celles présentant une activité spécifique de 61-63 sont réunies, dialysées contre $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$ et lyophilisées. Lorsque le diamètre de la colonne est 3 cm, comme il est spécifié dans la légende de la Fig. 1, chaque chromatographie permet d'obtenir environ 300 mg de trypsinogène purifié. Le Tableau I suggère que le rendement global des opérations est de 2.8 g de précurseur à partir de 1 kg de pancréas frais. Etant donné l'abondance du trypsinogène dans le pancréas de porc, ce rendement doit pouvoir être augmenté de façon sensible en perfectionnant par exemple la technique d'obtention du premier extrait. Dans l'état actuel, il est de 43% à partir de l'extrait avec un taux de purification de 2.6 fois environ.

TABLEAU I
BILAN D'UNE PURIFICATION

Les poids de protéines et les nombres d'unités sont rapportés à 1 kg de pancréas frais. Les rendements et les taux de purification sont calculés à partir de l'extrait sulfurique initial.

Étape	Poids de protéine (g)	Rendement au trypsinogène		Activité spécifique	Taux de purification
		Nb. d'unités $\times 10^3$	(%)		
Extrait sulfurique*	16.6	400	100	24	1.0
Précipité 1 (0.2-0.4 saturation)	8.7	282	70	32	1.3
Précipité 2 (0.4-0.8 saturation)	1.4	64	16	46	1.9
Total (1 + 2)	10.1	344	86	34	1.4
Chromatographie	2.8	172	43	61-63	2.6

* Cet extrait contient, non seulement des protéines mais aussi des acides nucléiques qui augmentent fallacieusement son absorption à 280 m μ . On purifie donc les protéines par précipitation dans $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0.8 saturation, avant de procéder à leur dosage spectrophotométrique.

Le trypsinogène finalement obtenu à l'état lyophilisé peut être conservé plusieurs mois à -20° sans activation ni altération notables. Ses solutions à pH 3 sont également stables. A pH 5 et 4°, il éprouve un début d'autoactivation et une baisse d'activité potentielle au bout de 4 h environ, même en présence de diisopropyl-fluorophosphate 10^{-4} M . Il est donc essentiel d'acidifier immédiatement les fractions sortant de la colonne de chromatographie.

La pureté de ce trypsinogène paraît satisfaisante. Nous verrons plus loin qu'un seul résidu N-terminal et un seul résidu C-terminal y sont décelés. La Fig. 2 donne les résultats d'une deuxième chromatographie sur CM-cellulose réalisée à pH 6.0 dans des conditions d'équilibre avec un échantillon d'activité spécifique 62. Il est vraisemblable que le trypsinogène commence à se dégrader sérieusement à pH 6. Néanmoins, le diagramme est presque celui que l'on peut attendre d'une protéine homogène. Plus de 90% des protéines se trouvent sous un seul pic dont toutes les fractions ont la même activité spécifique.

Composition en amino acides; résidu N-terminal; séquence C-terminale

Le Tableau II donne les résultats de 2 analyses complètes effectuées sur 2 préparations différentes de trypsinogène, à l'aide de l'analyseur d'acides aminés Spinco-Beckman. La protéine désionisée et lyophilisée est équilibrée avec l'air ambiant durant 12 h. Chaque analyse comporte 2 déterminations de poids sec par chauffage à 100° sous vide en présence de P_2O_5 , 2 mesures d'absorbance à 280 m μ , 2 déterminations de la teneur en azote par la méthode Kjeldahl, 2 déterminations de N-amide par micro-

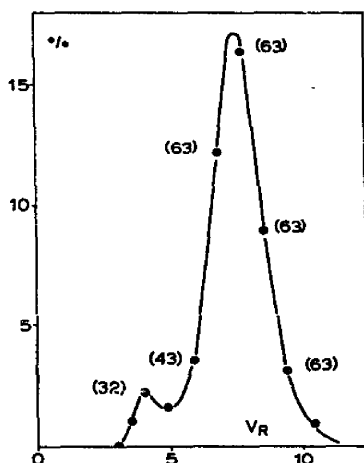


Fig. 2. Test d'homogénéité du trypsinogène de porc au moyen d'une chromatographie d'équilibre. Le trypsinogène (30 mg) d'activité spécifique 62 est chromatographié à 4° dans une colonne (0.9 × 9 cm) de CM-cellulose équilibrée avec un tampon citrate 0.015 M (pH 6.0) contenant du diisopropylfluorophosphate à la concentration 10⁻⁴ M. Volume de rétention (V_R), 2.25 ml. Débit, 1.8 V_R /h. Volume des fractions, 0.44 V_R .

diffusion après hydrolyse dans HCl 3 N et enfin l'étude de 3 hydrolysats de 24, 48 et 72 h. Chaque hydrolysat a fait l'objet de 2 chromatographies complètes comportant chacune le dosage des acides aminés basiques dans une colonne de 15 cm et celui des autres acides aminés dans une colonne de 150 cm¹⁴. La cystine est déterminée à l'état d'acide cystéique après oxydation performique de la protéine désionisée.

Les analyses reproduites dans les 2 premières colonnes du Tableau II donnent des résultats remarquablement concordants. Elles ne laissent subsister que deux incertitudes, concernant le glycofolle (24 ou 25 résidus par mole) et les amides (26 ou 27 résidus). La somme des poids des résidus est égale à 95.6% du poids de la protéine en jeu. Le bilan d'azote est de 99.6%. Le trypsinogène de porc apparaît ainsi comme étant composé de 228–229 résidus avec 15 centres basiques (4 arginines et 11 lysines) et 18–19 centres acides (45 dicarboxyliques moins 26–27 amides). Le poids moléculaire déduit de l'analyse est 25 000 environ. La teneur en azote est 16.9% et le point isoionique est 7.5.

Traités par le fluorodinitrobenzène et hydrolysés, deux échantillons de trypsinogène engendrent, d'autre part, 0.37–0.47 mole/mole de DNP-phénylalanine, 0.08–0.00 mole de DNP-valine et 0.04–0.03 mole de DNP-sérine. Un mélange équimolaire de chymotrypsinogène-A de boeuf et de phénylalanine fournit dans les mêmes conditions 0.32 mole de DNP-phénylalanine. On peut donc dire que le trypsinogène de porc possède une extrémité N-terminale occupée par la phénylalanine.

Comme le trypsinogène de boeuf²², le trypsinogène de porc n'engendre aucun amino acide libre par hydrazinolyse. Effectuée dans les mêmes conditions, l'hydrazinolyse de la chymotrypsine- α de boeuf permet sans difficulté de mettre en évidence deux des trois résidus C-terminaux de cette protéine, la tyrosine (63% de la quantité théorique) et la leucine (55%).

Toutefois, contrairement à ce que l'on observe avec le trypsinogène de boeuf, la carboxypeptidase-A attaque le trypsinogène de porc, même à l'état natif. Cette attaque est accélérée par une dénaturation préalable dans l'urée 6 M et, davantage encore, par la rupture des ponts disulfure. Le diagramme de gauche de la Fig. 3 indique la cinétique de libération des amino acides à partir du S-sulfo trypsinogène de porc. On voit que l'asparagine et l'alanine apparaissent en premier lieu à un rythme sensiblement équivalent. L'asparagine, toutefois, occupe certainement la position

TABLEAU II
ANALYSE DU TRYPSINOGENE DE PORC

Amino acide	Trypsinogène de porc			Trypsinogène de boeuf (à titre de comparaison)	
	Nb. de résidus par mole		Nb. de résidus le plus probable	(18)	(20)
	Première analyse	Deuxième analyse			
Ala	15.5	15.2	15	13	—
Arg	4.1	4.0	4	2	2
Asp	27.9	28.1	28	24	26
Glu	16.8	17.0	17	10	11
Gly	25.2	24.2	24-25	21	—
His	3.8	3.9	4	3	3
Ileu	15.0	15.3	15	12	—
Leu	16.2	15.8	16	12	—
Lys	10.7	10.8	11	14	14-15
Met	2.0	2.0	2	1	—
Phe	5.2	5.2	5	4	3
Pro	10.8	10.8	11	14	14-15
Ser	25.2	25.2	25	38	40
Thr	11.0	11.1	11	9-11	11
Tyr	8.0	7.7	8	9	4
Val	15.8	15.8	16	15	—
Try*	—	4.0	—	—	—
1/2 Cys	12	12	12	—	12
Amide	—	26.4	26-27	23	—
Poids moléculaire	24900 \pm 550	25327 \pm 492	—	23800	23320 \pm 280
$E_{1\%}^{1\text{ cm}}$ à 280 m μ	13.9	13.9	—	13.9	—
N%	16.9	16.9	—	—	—
Point isoionique	—	7.5	—	9.3	—

* Le tryptophane est dosé par 2 techniques différentes. L'une¹³ comporte une hydrolyse alcaline de la protéine (10 mg de protéine dans 1 ml de N₂H 5 N. Chauffage en tube scellé sous N₂ durant 20 h) suivie d'une chromatographie dans la colonne de 15 cm de l'appareil. Les résultats, corrigés de la perte de tryptophane au cours de l'hydrolyse (coefficient de correction, 100/80), indiquent 4.0 résidus de tryptophane par mole de trypsinogène de porc et 7.4 résidus pour le chymotrypsinogène-A de boeuf. La technique colorimétrique de SPIES ET CHAMBERS²¹ donne, respectivement, 4.0 et 7.9 résidus. La valeur de 4.0 résidus de tryptophane par mole de trypsinogène de porc est donc adoptée.

C-terminale puisque l'hydrazinolyse fournit des résultats négatifs. Puis, viennent la glutamine, l'isoleucine et la thréonine. L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que la séquence C-terminale du trypsinogène de porc est: Thr-(Ileu, Glu(NH₂))-Ala-Asp(NH₂).

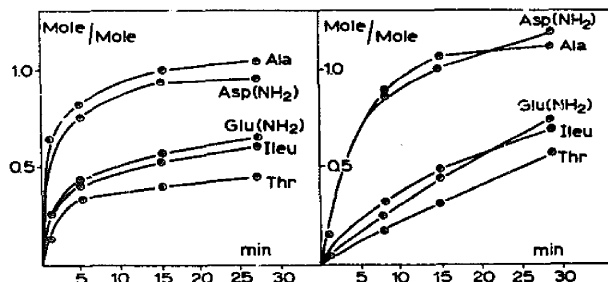
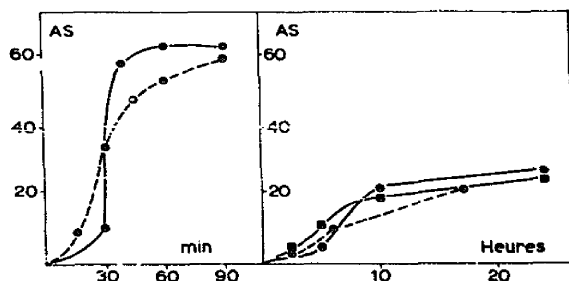


Fig. 3. Action de la carboxypeptidase-A sur les dérivés S-sulfo du trypsinogène et de la DP-trypsin de porc. A gauche, S-sulfo trypsinogène de porc. A droite, dérivé S-sulfo de la DP-trypsin de porc. Les conditions opératoires sont données dans le chapitre des TECHNIQUES.

Lorsqu'on fait agir la carboxypeptidase sur le trypsinogène dénaturé au sein de l'urée 6 M, les mêmes amino acides sont libérés avec, en plus, un peu de leucine et de valine. Cette observation indique, d'une part, que le trypsinogène subit, même après dénaturation par l'urée, une légère dégradation secondaire durant le traitement à la carboxypeptidase et, d'autre part, que la réduction par le sulfite ne provoque aucune rupture de liaisons peptidiques. Ce sont les résultats obtenus avec le S-sulfo trypsinogène qui sont les plus nets et les plus aisément interprétables.

Autoactivation du trypsinogène de porc

La Fig. 4 reproduit des courbes d'activation spontanée des trypsinogènes de porc et de boeuf à pH 7.9 et 4°, en présence ou en absence d'ions calcium. L'échantillon de trypsinogène de boeuf utilisé a été purifié au préalable sur CM-cellulose²³, ce qui augmente beaucoup l'intérêt de la comparaison. Le trypsinogène cristallisé commercial, en effet, contient à la fois des inhibiteurs de trypsin et de la trypsin active. Son autoactivation a donc peu de rapport avec celle du produit pur. L'examen de la Fig. 4 montre que les autoactivations des deux précurseurs de boeuf et de porc sont analogues, pour ce qui concerne la vitesse du phénomène, la limite supérieure de l'activité trypsique finalement obtenue (activité potentielle) et l'influence des ions calcium. Dans les deux cas, ces ions augmentent considérablement la vitesse et em-



blancs). Les activités propres à la trypsin ajoutée sont déduites du diagramme de droite.

Fig. 4. Autoactivation du trypsinogène de porc. Toutes les activations sont réalisées à pH 7.9 et 4° sur des solutions à 1.3% de précurseurs totalement dépourvus à l'origine d'activité trypsique. Signes noirs et traits pleins, trypsinogène de porc. Signes blancs et traits pointillés, trypsinogène de boeuf. A gauche, autoactivations spontanées en présence de CaCl₂, 0.05 M. A droite, activations en l'absence de calcium du trypsinogène de porc seul (cercles noirs) ou additionné de 2% de trypsin (carrés noirs) et du trypsinogène de boeuf additionné de 9% de trypsin (cercles

pêchent que la moitié des molécules du précurseur soit convertie en protéines "inertes"¹.

Ces résultats étant acquis, il devient intéressant de savoir si l'autoactivation du trypsinogène de porc s'accompagne, comme celle du trypsinogène de boeuf, de l'ablation de la séquence N-terminale de la molécule sous la forme d'un peptide libre et, dans ce cas, quelle est la nature du peptide. Une solution de 4 μ moles de trypsinogène de porc dans 4 ml de CaCl_2 0.05 M est incubée durant 2 h à 4° et pH 7.9. On vérifie sur une partie aliquote que l'activation est bien complète et on ajoute du diisopropyl-fluorophosphate au reste de la solution jusqu'à une concentration 0.04 M. Après 2 h à 0°, on amène le pH à 3 par HCl 1 N et on dialyse 6 fois contre 10 ml d'HCl 10^{-3} M pendant 12 h. Les dialysats sont réunis, lyophilisés et chromatographiés dans une colonne (0.9 \times 60 cm) de Dowex-50 X 2 forme Na^+ (100-400 mesh) équilibrée avec un tampon citrate 0.2 M (pH 4.0). La colonne est éluée par 50 ml du tampon précédent,

TABLEAU III
DÉGRADATION RÉCURRENTÉ DU PEPTIDE DE L'ACTIVATION

	<i>Phe</i>	<i>Pro</i>	<i>Thr</i>	<i>Asp</i>
Peptide initial	0.94	1.08	1.01	4.00
Première dégradation	0.00	1.18	0.98	4.00
Deuxième dégradation	0.00	0.00	0.96	4.00
Troisième dégradation	0.00	0.00	0.62	4.00

de 50 à 250 ml par un gradient exponentiel de 0.2 M (pH 4.0) à 0.3 M (pH 5.5), enfin, de 250 à 350 ml par un deuxième gradient exponentiel de 0.3 M (pH 5.5) à 1.0 M (pH 5.6) (volume de la chambre de mélange, 360 ml).

Le diagramme d'éluéon comporte une série de petits pics contenant chacun plusieurs peptides, et un grand pic dont le sommet correspond à 140 ml d'éluat et qui fournit après hydrolyse 5 amino acides: phénylalanine, proline, thréonine, acide aspartique et lysine, dans les rapports molaires 0.96:1.11:1.01:3.96:1.04. L'analyse indique également que ce peptide est libéré à concurrence d'au moins 0.7 mole par mole de trypsinogène durant une activation dont le rendement, rappelons-le, est 0.9. L'équivalent-leucine du peptide est 0.95.

La présence de phénylalanine en position N-terminale montre que, comme dans le cas du précurseur du boeuf, le peptide en question provient de la séquence N-terminale de la chaîne. Comme dans le cas du trypsinogène de boeuf également, le peptide contient 1 résidu de lysine et 4 résidus d'acide aspartique. Mais il renferme 2 résidus supplémentaires, la proline et la thréonine qui en font un octapeptide. Le Tableau III donne les résultats obtenus durant les dégradations récurrentes de ce peptide qui permettent de déterminer l'ordre d'enchaînement de ses résidus. Dans un but de simplification, les résultats sont calculées dans le tableau par rapport à l'acide aspartique dont les proportions sont uniformément fixées à 4 moles/mole. La lysine C-terminale n'a pas été dosée.

Le Tableau III montre que les 2 premières dégradations donnent des résultats remarquablement nets. La phénylalanine d'abord, puis la proline, disparaissent totalement. La troisième dégradation, par contre, ne fait baisser les proportions de thréonine que de 0.96 à 0.62 mole. Afin de confirmer que la thréonine occupe bien la

troisième position, on effectue alors deux dégradations successives sur un autre échantillon du peptide et on condense le produit restant avec le dinitrofluorobenzène. Après hydrolyse, seule la DNP-thréonine peut être identifiée. La lysine est certainement C-terminale puisque le peptide provient d'une hydrolyse trypsique. Sa formule s'écrit donc: Phe-Pro-Thr-(Asp)₄-Lys.

Purification et caractérisation de la trypsine de porc

Une solution à 2.5% de trypsinogène de porc dans CaCl_2 0.05 M est incubée à pH 7.9 et 4° durant 1 h. Le mélange (activité spécifique, 63) est amené à pH 5.0 par addition de HCl 1 N et chromatographié dans une colonne de CM-cellulose équilibrée avec un tampon (pH 5.0) 0.06 M en citrate et 0.01 M en CaCl_2 . L'élution de la colonne par le même tampon provoque la sortie des deux pics tracés dans le diagramme de gauche de la Fig. 5. Le premier est inactif. Le deuxième contient la trypsine active

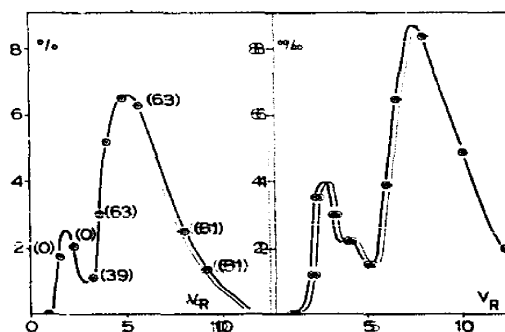


Fig. 5. Chromatographie de la trypsine de porc sur CM-cellulose. Colonnes (0.9 × 9 cm) de CM-cellulose (méquivalents acides par g, 0.50; pK' 4.66) équilibrées et éluées avec un tampon (pH 5.0) 0.06 M en citrate et 0.01 M en CaCl_2 . Temp. 4°. Débit, 5.6 V_R/h . Volume des fractions, 0.4 V_R . Ordonnées, absorbance des fractions à 280 m μ , en pour-cent de l'absorbance totale de la solution introduite dans la colonne. Abscisses, volume de l'éluat exprimé en volume de rétention de la colonne. A gauche, chromatographie de la trypsine active. Les nombres le long de la courbe indiquent l'activité spécifique des fractions. A droite, chromatographie de la DP-trypsine. Les chromatographies préparatives sont réalisées dans les mêmes conditions à l'aide de colonnes de 1.5 cm de diamètre intérieur.

qui, si l'on en croit les valeurs élevées de l'activité spécifique (61–63), est dans un état satisfaisant de pureté. Toutefois, étant donné que 10% environ des protéines du mélange ont été éliminés dans le premier pic inactif, l'activité spécifique de la trypsine purifiée par chromatographie devrait être supérieure à l'activité spécifique du trypsinogène, c'est à dire supérieure à 63. Les problèmes posés par la chromatographie de la trypsine active seront discutés dans une prochaine publication traitant de façon détaillée le cas de la trypsine de boeuf. Signalons simplement ici que, dans les conditions opératoires adoptées, la trypsine active subit vraisemblablement quelques dégradations au cours même de la chromatographie. Il est beaucoup plus aisé, lorsque de simples considérations de structure moléculaire sont en jeu, de chromatographier la trypsine inhibée par le diisopropylfluorophosphate (DP-trypsine). La solution activée précédemment est traitée 2 h à 0° par le diisopropylfluorophosphate 0.04 M et amenée à pH 5.0 par HCl 1 N. Sa chromatographie sur CM-cellulose est illustrée par le diagramme de droite de la Fig. 5. On notera que la migration de la trypsine de porc sur CM-cellulose à pH 5.0 est moins rapide que celle du trypsinogène de la même espèce

à pH 6.0 (voir Fig. 2). Ce fait est en bon accord avec la perte nette de 3 centres acides durant l'activation (4 acides aspartiques moins 1 lysine). En outre, le trypsinogène et la trypsine de porc ayant des points isoioniques plus bas que leurs homologues du boeuf migrent plus vite qu'eux²³ sur CM-cellulose.

Le petit pic à gauche des diagrammes de la Fig. 5 représente vraisemblablement les protéines "inertes" de NORTHROP *et al.*¹ qui se forment en faibles quantités, même en présence d'ions calcium, durant l'activation du trypsinogène. La purification provoquée par la chromatographie de la DP-trypsine ressort d'ailleurs clairement des résultats suivants: Lorsqu'on condense avec le fluorodinitrobenzène, après une simple dialyse, le mélange brut engendré par l'activation, on trouve 0.6 mole/mole de DNP-isoleucine, 0.1 mole de DNP-isoleucylvaline, 0.2 mole de DNP-valine, 0.07 mole de DNP-sérine et 0.08 mole d'acides DNP-aspartique et glutamique. Lorsque la même technique est appliquée à la DP-trypsine purifiée par chromatographie, on trouve 0.7 mole/mole de DNP-isoleucine et des traces seulement des autres DNP-dérivés. La DP-trypsine ainsi chromatographiée paraît donc être une protéine pure. Sa chaîne débute, comme celle de la trypsine de boeuf²⁴, par l'enchaînement Ileu-Val.

En outre, si l'on se reporte au diagramme de droite de la Fig. 3, on constate que la carboxypeptidase libère à partir du dérivé S-sulfo de la DP-trypsine de porc, les mêmes amino acides qu'à partir du dérivé S-sulfo du trypsinogène. Les deux diagrammes de la Fig. 5 sont en fait presque identiques. Comme, d'autre part, l'hydrazinolyse de la DP-trypsine de porc donne des résultats négatifs, on peut dire que cette trypsine a la même séquence C-terminale que son précurseur.

DISCUSSION

La technique classique de purification du trypsinogène et de la trypsine de boeuf est fondée sur des fractionnements au sulfate d'ammonium et des cristallisations en milieu alcalin¹. Les produits cristallisés sont loin d'être purs et l'on a cherché depuis plusieurs années à les purifier davantage par chromatographie²⁵⁻²⁷. On a réussi récemment, en particulier, à purifier directement le trypsinogène de boeuf à partir des eaux-mères de cristallisation du chymotrypsinogène-A et à débarrasser la trypsine cristallisée de certaines impuretés inactives, au moyen de chromatographies sur CM-cellulose à pH 6.0 (voir réf. 23). Au cours du présent travail, les techniques de cristallisation ont été définitivement abandonnées. Le trypsinogène de porc et le dérivé diisopropylphosphorylé de la trypsine engendrée par autoactivation de ce nouveau précurseur peuvent être obtenus à l'état pur par chromatographie sur CM-cellulose à pH 5.0. Bien qu'elle fournisse un produit doué d'une activité spécifique très élevée, la chromatographie à ce pH de la trypsine active s'accompagne d'un début d'autolyse trahi par l'apparition de quelques résidus terminaux supplémentaires.

Le trypsinogène représente à lui seul près de 25% des protéines du suc pancréatique de porc⁵. Il est donc particulièrement abondant dans le pancréas de cette espèce. Sous sa forme actuelle, la technique permet d'obtenir sans grandes difficultés environ 2.8 g de trypsinogène à partir de 1 kg de pancréas frais. Il est toutefois vraisemblable que ce chiffre pourrait être largement dépassé en centrifugeant par exemple les extraits sulfuriques au lieu de les filtrer. Le problème des rendements susceptibles d'être atteints au cours de la préparation des chymotrypsinogènes et des trypsinogènes de boeuf et de porc fera l'objet d'une prochaine publication.

La composition en amino acides du trypsinogène de porc ne nous apprend évidemment pas grand chose sur sa structure. Les résultats du Tableau II suggèrent néanmoins que les précurseurs du porc et du boeuf ont un poids moléculaire voisin de l'ordre de 24000-25000 et, vraisemblablement aussi, le même nombre de ponts disulfure (12 résidus de $\frac{1}{2}$ cystine par mole). L'impression d'ensemble laissée par les autres résultats est que les deux précurseurs appartiennent à une même famille de protéines relativement pauvres en arginine, histidine, méthionine et phénylalanine, mais relativement riches en acide aspartique, glycofolle et sérine. Les différences parfois sensibles existant entre les résultats concernant certains résidus nous incitent cependant à penser que de larges secteurs des deux protéines ont en fait une structure franchement dissemblable. On notera que la valeur plus faible trouvée pour le point isoélectrique du trypsinogène de porc (7.5 au lieu de 9.3 pour le trypsinogène de boeuf) s'explique aisément par une balance différente entre les centres cationiques et anioniques (5 centres cationiques en excès dans le trypsinogène de boeuf; 3-4 centres anioniques en excès dans celui de porc).

De toute évidence, la comparaison la plus intéressante entre les deux précurseurs se place pour l'instant au niveau du mécanisme de leur autoactivation. Ce phénomène implique dans les deux cas la rupture spécifique par la trypsine d'une liaison Lys-Ileu appartenant à la région N-terminale de la chaîne. Dans les deux cas également, la liaison est flanquée sur sa droite des résidus Ileu-Val et, sur sa gauche, de quatre résidus contigus d'acide aspartique. Une telle accumulation de résidus aspartiques au voisinage immédiat de la liaison stratégique n'est sans doute pas l'effet du hasard. On sait que la proximité de centres anioniques ralentit d'habitude l'action de la trypsine sur les liaisons basiques. Il est vraisemblable que, dans le cas présent, elle parvient au contraire à l'accélérer, surtout en présence d'ions calcium. En d'autres termes, les quatre résidus contigus d'acide aspartique jouent probablement un rôle déterminant dans la rupture spécifique de la liaison Lys-Ileu et il est remarquable de les rencontrer en même nombre et à la même place dans les deux trypsinogènes connus à l'heure actuelle.

On notera, par contre, que, avant ces résidus aspartiques, on trouve un unique résidu de valine chez le trypsinogène de boeuf et une séquence de trois résidus différents (Phe-Pro-Thr) chez le trypsinogène de porc. La structure commune aux deux précurseurs et apparemment essentielle pour leur bonne activation a donc des dimensions fort limitées, tout au moins vers la gauche où elle est précédée par deux structures totalement dissemblables.

Un autre point digne d'intérêt est que, contrairement au trypsinogène de boeuf, le trypsinogène de porc possède une séquence C-terminale accessible à la carboxypeptidase. Le fait que le trypsinogène de porc et la trypsine qui en dérive possèdent la même séquence, prouve de façon définitive que l'autoactivation de ce type de précurseurs n'implique aucune modification d'ordre covalent dans la région C-terminale de la chaîne et qu'elle est par conséquent exclusivement déterminée par la rupture de la liaison Lys-Ileu de la séquence N-terminale. On sait que cette preuve n'était fondée jusqu'ici que sur des considérations indirectes, du fait de l'incapacité dans laquelle se trouve la carboxypeptidase d'attaquer les séquences C-terminales du trypsinogène et de la trypsine de boeuf.

La figure suivante permet de comparer les phénomènes d'ordre covalent intervenant au cours de l'activation des trypsinogènes de boeuf et de porc:

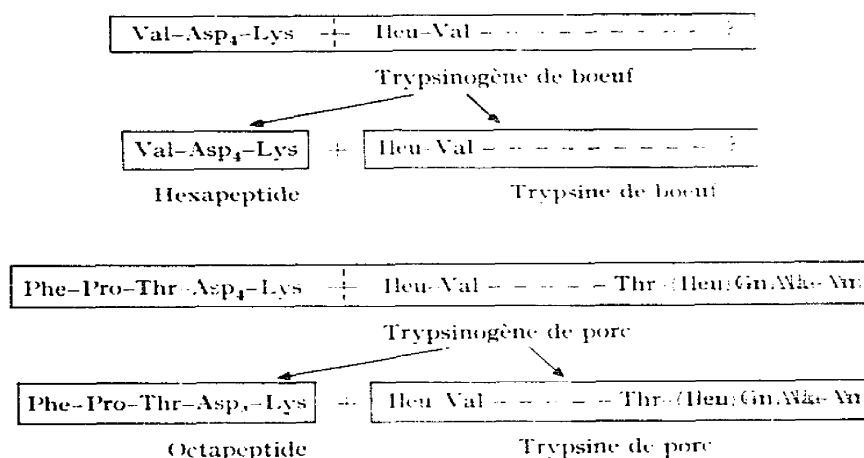


Fig. 6. Représentation comparée des activations des trypsinogènes de boeuf et de porc. Gn, glutamine; An, asparagine.

PÉSUMÉ

Le trypsinogène de porc peut être purifié, en même temps que l'un des diisomotrypsinogènes de la même espèce, en soumettant les extraits de pancréas à des fractionnements préliminaires par le sulfate d'ammonium et à des chromatographies sur CM-cellulose à pH 5.0. Le trypsinogène est ainsi purifié 2.6 fois par rapport aux extraits initiaux, avec un rendement de 45%. Dans l'état actuel de la technique, 1 kg de pancréas frais donne 2.8 g de produit pur.

La composition en amino acides des trypsinogènes de boeuf et de porc présentent quelques analogies. Les poids moléculaires sont du même ordre. Cependant, des différences de composition parfois très sensibles suggèrent que de larges secteurs des deux protéines ont en fait des structures dissemblables.

Le dérivé diisopropylphosphorylé de la trypsine issue de l'autoactivation du trypsinogène de porc peut être purifié par chromatographie sur CM-cellulose à pH 5.0. Appliquée à la trypsine active, la même technique donne naissance à un produit dénué d'une activité spécifique élevée, mais légèrement autolysé.

L'autoactivation du trypsinogène de porc suit à peu près le même rythme que celle du précurseur de boeuf. Les activités spécifiques maximum atteintes dans les deux cas sont du même ordre et les ions calcium exercent les mêmes effets. Dans les deux cas également, l'activation implique la rupture d'une liaison Lys-Ileu appartenant à la séquence N-terminale de la chaîne et flanquée sur sa gauche par quatre résidus contigus d'acide aspartique. Toutefois, au lieu d'être la sixième, cette liaison occupe la huitième position de la chaîne du trypsinogène de porc. Le peptide libéré est l'octapeptide Phe-Pro-Thr (Asp)₄-Lys. La région commune aux deux précurseurs et apparemment essentielle à leur bonne activation est donc très étroitement limitée. Au delà, des modifications de structure trahissant de profonds changements dans l'information génétique sont constatées.

Accessible à la carboxypeptidase, la séquence C-terminale du trypsinogène et de la trypsine de porc est Thr-(Ileu;Glu(NH₂))-Ala-Asp(NH₂). Le fait qu'elle soit iden-

tique dans les deux protéines prouve de façon définitive que l'activation des trypsino-gènes n'implique aucune rupture de la chaîne dans cette région.

REMERCIEMENTS

Au cours de ce travail, nous avons bénéficié d'une aide matérielle du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), du Fonds de Développement de la Recherche Scientifique et Technique (Convention 61-FR-113), du National Institute of Health (Grant A-4642) et de la Fondation Rockefeller.

RÉFÉRENCES

- ¹ J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, Columbia Univ. Press, New York, 1948.
- ² C. K. KEITH, A. KAZENKO ET M. LASKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 170 (1947) 227.
- ³ P. DESNUELLE, in P. D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 4, Academic Press, 1960, pp. 93 et 119.
- ⁴ P. DESNUELLE ET M. ROVERY, *Advances in Protein Chem.*, 16 (1961) 139.
- ⁵ G. MARCHIS-MOUREN, M. CHARLES, A. BEN ABDELJIL ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 50 (1961) 186.
- ⁶ M. ROVERY, M. CHARLES, O. GUY, A. GUIDONI ET P. DESNUELLE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960) 235.
- ⁷ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 547.
- ⁸ *Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, IUB Symposium Series*, Vol. 20, Pergamon Press, London, 1961.
- ⁹ A. L. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.
- ¹⁰ T. MURACHI ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 99.
- ¹¹ S. AKABORI ET K. OHNO, *Bull. Chem. Soc. (Japan)*, 25 (1952) 214.
- ¹² J. F. PECHÈRE, G. H. DIXON, R. H. MAYBURY ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1364.
- ¹³ B. KASSEL ET M. LASKOWSKI, Sr., *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 413.
- ¹⁴ D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN ET S. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1190.
- ¹⁵ H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS ET A. L. LEVY, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 2, Interscience Publishers, 1955, p. 359.
- ¹⁶ R. ACHER, U. R. LAURILA ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 97.
- ¹⁷ C. H. W. HIRS, S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 633.
- ¹⁸ N. M. GREEN ET H. NEURATH, in K. BAILEY ET H. NEURATH, *The Proteins*, Vol. 2, Part B, Academic Press, New York, 1954, p. 1057.
- ¹⁹ E. A. PETERSON ET H. A. SOBER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 751.
- ²⁰ H. NEURATH ET W. J. DREYER, *Discussion Faraday Soc.*, 20 (1955) 32.
- ²¹ J. R. SPIES ET D. C. CHAMBERS, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 1249.
- ²² J. F. PECHÈRE ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 229 (1957) 389.
- ²³ S. MAROUX, M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 56 (1962) 202.
- ²⁴ M. ROVERY, C. FABRE ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 702.
- ²⁵ H. H. TALLAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 407.
- ²⁶ I. E. LIENER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 88 (1960) 216.
- ²⁷ R. D. COLE ET J. M. KINKADE, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2443.