

secondary to loss of M_4 and M_3H forms, this perhaps being magnified by the washing out of considerable enzyme activity during tissue extraction plus the utilization of lactate as substrate, an assay system which requires relatively large amounts of enzyme.

In summary, a comparison of lactate dehydrogenase patterns in normal and tumor tissues suggests only a quantitative difference in tumors represented by the appearance of greater relative amounts of M -type subunits. A more complete presentation of our data in this regard is planned shortly.

This work was supported in part by National Institutes of Health Contract SA-43-ph-2440, American Cancer Society grant P77D (The Thomas S. Miller Memorial Grant for Cancer Research) and a U.S. Public Health Service Fellowship (No. GSP-16 561) to R.D.G.

*Graduate Department of Biochemistry,
Brandeis University,
Waltham, Mass. (U.S.A.)*

ROBERT D. GOLDMAN
NATHAN O. KAPLAN

¹ W. H. STARKWEATHER AND H. K. SCHOCH, *Biochim. Biophys. Acta*, 62 (1962) 440.

² J. S. NISSELBAUM AND O. BODANSKY, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 969.

³ I. H. FINE, N. O. KAPLAN AND D. KUFTINEC, *Biochemistry*, 2 (1963) 116.

⁴ E. FREIREICH, personal communication.

⁵ R. D. CAHN, N. O. KAPLAN, L. LEVINE AND E. ZWILLING, *Science*, 136 (1962) 962.

⁶ N. O. KAPLAN AND M. M. CIOTTI, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 94 (1961) 701.

Received May 20th, 1963

Biochim. Biophys. Acta, 77 (1963) 515-518

PN 10072

Composition en amino acides et hydrolyse trypsique des anhydrases carboniques humaines X_1 et Y

Un ensemble de recherches poursuivies depuis 1956 nous a conduits (a) à individualiser un groupe de protéines érythrocytaires "lentes" désignées par Y , X_1 , X_2 dans l'ordre de leur mobilité électrophorétique croissante à pH 8.6 (ref. 1); (b) à les isoler par chromatographie sur Amberlite CG-50 de l'"extrait éthanol-chloroforme" de l'hémolysat, dans lequel elles sont régulièrement présentes à raison d'environ 0.07, 0.6 et 0.05% de l'hémoglobine totale² et (c) à les identifier respectivement par un ensemble de leurs propriétés³ aux trois formes moléculaires de l'anhydrase carbonique (EC 4.2.1.1) que NYMAN⁴ a désignées par CA V, CA III et CA II.

Nous avons ainsi confirmé la multiplicité de ces enzymes et leur distinction en anhydrases carboniques de haute et de faible activité spécifique, Y étant environ 15 fois plus active que X_1 et X_2 (ref. 3). Ces données sont également en accord avec celles d'EDSALL *et al.*⁵ qui ont isolé et désigné par CA II l'enzyme de haute activité et par CA I le plus abondant des deux enzymes de faible activité, seul retrouvé par ces auteurs.

Il importait, dès lors, de chercher à caractériser les diverses formes moléculaires de l'anhydrase carbonique par une étude comparée de leur composition en acides aminés et des peptides libérés par leur hydrolyse enzymatique. La présente note a pour objet de rapporter les premiers résultats des recherches entreprises dans cette

TABLEAU I

COMPOSITION EN AMINO ACIDES DES ANHYDRASES CARBONIQUES X₁ ET Y

Amino acide	Anhydrase carbonique X ₁ (poids moléculaire = 29 350)			Anhydrase carbonique Y (poids moléculaire = 31 900)		
	Résidus (g/100 g sèche)	Nb. de résidus par mole		Résidus (g/100 g de protéine sèche)	Nb. de résidus par mole	
		Brut	Arrondi		Brut	Arrondi
Ala	4.55	18.80	19	3.19	14.31	14
Arg	4.29	8.07	8	3.92	8.01	8
Asp	11.80	30.08	30	11.00	30.50	30-31
Glu	9.61	21.86	22	10.46	25.86	26
Gly	2.91	14.96	15	4.29	24.00	24
His	5.21	11.16	11	5.78	13.45	13-14
Ileu	3.16	8.22	8	3.27	9.22	9
Leu	7.75	20.10	20	10.27	29.00	29
Lys	7.43	17.04	17	10.70	26.64	27
Met	0.88	1.98	2	0.47	1.16	1
Phé	5.77	11.51	11-12	6.11	13.28	13
Pro	5.72	17.31	17	4.98	16.40	16
Ser	8.57	28.90	29	5.13	18.80	19
Thr	4.65	13.50	13-14	3.85	12.16	12
Tyr	4.73	8.52	8-9	4.50	8.80	9
Val	5.55	16.45	16-17	5.09	16.40	16
Try*	3.59	5.66	6	4.17	7.14	7
½ Cys**	0.47	1.33	1	0.46	1.43	1
Amide***	1.55	28.47	(28-29)§	1.17	23.27	(23)§
Totaux	98.19	253-257		98.81	274-276	

* Déterminé par colorimétrie⁹.

** Déterminé à l'état d'acide cystéique.

*** Déterminé par microdiffusion après hydrolyse dans HCl 2 N.

§ Non inclus dans le total.

voie sur des préparations d'Y (activité spécifique: 428) et d'X₁ (activité spécifique: 28) isolées selon la technique décrite² et dont l'homogénéité a été contrôlée par électrophorèse sur papier et en gel d'amidon, de même que par ultracentrifugation (poids moléculaire X₁ = 29 350 et poids moléculaire Y = 31 900)⁶.

La composition en acides aminés des deux enzymes a été déterminée par la technique de PIEZ⁷, à l'aide de l'Auto-Analyzer Technicon, sur des hydrolysats chlorhydriques (20 et 70 h) préparés selon les indications de STEIN ET MOORE⁸. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau I.

Les cartes des peptides libérés par hydrolyse trypsique des deux protéines ont été établies par chromatographie et électrophorèse en deux dimensions selon la méthode décrite par CHERNOFF ET LIU¹⁰. Le schéma représenté sur la Fig. 1 rend compte des résultats reproductibles obtenus par quatre expériences sur chaque enzyme.

Il ressort de l'examen du Tableau I et de la Fig. 1 que les anhydrases carboniques X₁ et Y présentent des différences significatives portant à la fois sur leur composition en divers amino acides et sur la distribution de leurs peptides trypsiques. De telles différences ne sont pas compatibles avec l'hypothèse selon laquelle l'anhydrase carbonique X₁, de faible activité et de poids moléculaire = 29 350, dériverait

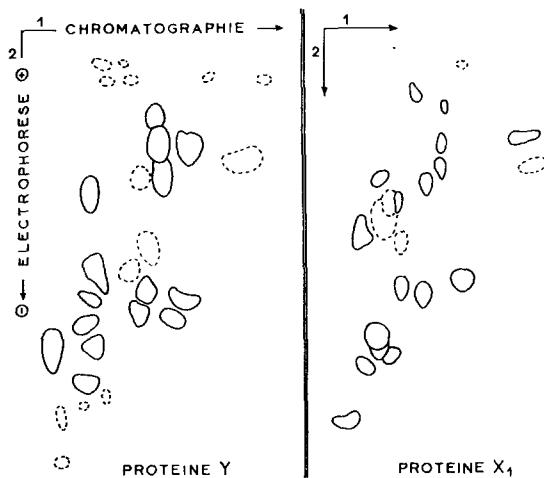


Fig. 1. Reproduction schématique de la séparation par chromatographie-électrophorèse des peptides libérés par hydrolyse trypsique des deux anhydrases carboniques Y et X₁. La chromatographie a été réalisée en solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5, v/v) et l'électrophorèse en tampon pyridine-acide acétique-eau (1:10:289, v/v), pH 3.6. Les zones nettement colorées et celles faiblement colorées par la ninhydrine ont été respectivement délimitées par des traits continus et par des traits discontinus.

par amputation d'un polypeptide de l'enzyme Y de haute activité et de poids moléculaire = 31 900. Elles paraissent également exclure l'hypothèse d'une relation génétique entre ces deux enzymes. Ceux-ci diffèrent en outre par leurs propriétés antigéniques¹¹. Nous établirons dans une prochaine communication que tel n'est pas le cas des deux anhydrases carboniques X₁ et X₂ dont la similitude d'activité spécifique va de pair avec une profonde analogie de constitution.

Nous remercions le Dr. M. ROLLAND et le Dr. M. ROVERY dont les conseils nous ont permis d'effectuer ce travail et Mme S. LASRY pour sa précieuse collaboration technique.

*Laboratoire de Chimie biologique,
Faculté de Médecine et Pharmacie,
Marseille (France)*

G. LAURENT
M. CASTAY
C. MARRIQ
D. GARCON
M. CHARREL
Y. DERRIEN

¹ G. LAURENT, M. CHARREL, C. MARRIQ ET Y. DERRIEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 419.
² G. LAURENT, C. MARRIQ, D. NAHON, M. CHARREL ET Y. DERRIEN, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 156 (1962) 1456.

³ G. LAURENT, M. CHARREL, M. CASTAY, D. NAHON, C. MARRIQ ET Y. DERRIEN, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 156 (1962) 1461.

⁴ P. O. NYMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 1.

⁵ B. R. GIBBONS ET J. T. EDSALL, *Science*, 140 (1963) 381.

⁶ J. REYNAUD, G. RAMETTA, J. SAVARY ET Y. DERRIEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 77 (1963) 521.

⁷ K. A. PIEZ ET L. MORRIS, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 187.

⁸ S. MOORE ET W. H. STEIN, *Methods in Enzymology*, sous presse.

⁹ J. R. SPIES ET D. C. CHAMBERS, *Anal. Chem.*, 21 (1949) 1249.

¹⁰ A. I. CHERNOFF ET J. C. LIU, *Blood*, 17 (1961) 54.

¹¹ J. M. FINE, G. BOFFA, M. CHARREL, G. LAURENT ET Y. DERRIEN, *Nature*, sous presse.

Reçu le 16 Juillet, 1963

Biochim. Biophys. Acta, 77 (1963) 518-520