

50376  
1979  
199

N° d'ordre 468

50376  
1979  
199

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

# T H E S E

présentée à l'Université de Lille I  
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES  
OPTION BIOCHIMIE

par

Brigitte DEBUIRE

STRUCTURE COVALENTE PARTIELLE  
DE L'ATP : L-ARGININE PHOSPHOTRANSFERASE  
DU MUSCLE DE HOMARD (*Homarus vulgaris*)



présentée le 30 novembre 1979 devant la Commission d'Examen

**JURY :** *Président* : M. J. MONTREUIL  
*Rapporteurs* : M. G. BISERTE  
M. Y. BOULANGER  
M. R. KASSAB  
Mlle G. SPIK  
*Examineurs* : M. M. DAUTREVAUX  
M. K.K. HAN

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,  
CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET,  
GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE,  
LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,  
MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN,  
ZAMANSKI.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique

M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mme MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés d'Enseignement)

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie

M<sup>lle</sup> SPIK Geneviève  
M. STERBOUL François  
M. TAILLIEZ Roger  
M. TOULOTTE Jean-Marc  
M. TREANTON Jean-René  
M. VANDORPE Bernard  
M. WALLART Francis  
M<sup>me</sup> ZINN-JUSTIN Nicole

Biochimie  
Informatique  
Biologie  
Automatique  
Sociologie  
Chimie Minérale  
Chimie  
Algèbre

## AVANT - PROPOS

---

L'aboutissement de ce travail nous donne l'occasion de témoigner notre reconnaissance à ceux qui en ont permis la réalisation.

Nous remercions en particulier Monsieur le Docteur K. K. HAN qui en a été l'instigateur ; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Ce travail doit beaucoup à Monsieur le Professeur G. BISERTE, pour la confiance qu'il nous a accordée en nous intégrant au sein de son équipe et la bienveillance qu'il a toujours manifestée à notre égard.

Cette thèse a été réalisée dans le Laboratoire de Biochimie Structurale de Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX dont les conseils précieux ne nous ont jamais fait défaut et qui nous a constamment aidée et encouragée.

Qu'il nous soit permis aujourd'hui d'exprimer notre reconnaissance et notre admiration à Monsieur le Professeur Paul BOULANGER ; nous avons été heureuse et fière de participer aux travaux de l'Ecole qu'il a créée.

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur J. MONTREUIL qui nous fait l'honneur de présider ce jury de thèse ainsi que Mademoiselle G. SPIK, Monsieur R. KASSAB et Monsieur le

Professeur Y. BOULANGER qui ont bien voulu accepter de juger notre travail.

Nous remercions également nos amis des Laboratoires de Biochimie du C. H. U. de Lille ainsi que nos amis du Laboratoire de Biochimie Cellulaire du CNRS de Montpellier, en particulier Mademoiselle F. REGNOUF, avec qui nous avons collaboré et dont nous avons apprécié la franche amitié.

Que Monsieur le Docteur N. V. THOAI et Mademoiselle L. A. PRADEL trouvent également ici l'expression de notre gratitude.

L'aide efficace de Madame B. MASSELOT, et de Mademoiselle S. WOJCIK a grandement facilité notre tâche, qu'elles en soient chaleureusement remerciées.

LES RÉSULTATS INCLUS DANS CETTE THÈSE

ONT FAIT L'OBJET DES PUBLICATIONS

ET COMMUNICATIONS SUIVANTES :

- 1) HAN, K. K., DEBUIRE, B., DAUTREVAUX, M., BISERTE, G., FATTOUM, A., REGNOUF, F., KASSAB, R. et PRADEL, L. A. (1972)  
Séquence des amino-acides d'un fragment obtenu par coupure de l'arginine kinase de Homard par le bromure de cyanogène.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 274, 324-326.
  
- 2) DEBUIRE, B., HAN, K. K., DAUTREVAUX, M. and BISERTE, G. (1975)  
Isolation and characterization of the cyanogen bromide fragments of Lobster arginine kinase (*Homarus vulgaris*)  
Int. J. Peptide Protein Res. 7, 69-80.
  
- 3) DEBUIRE, B., HAN, K. K., REGNOUF, F. and KASSAB, R.  
Amino-acid sequence of CNBr fragments of 3, 11, 17 amino-acid residues ·N-acetyl terminal ·Sequence ·Isolation and characterization of the fragments produced by BNPS-skatole cleavage.  
Congrès de la FEBS - Paris (1975)



- 4) DEBUIRE, B., HAN, K. K., DAUTREVAUX, M., BISERTE, G., REGNOUF, F.,  
KASSAB, R., PRADEL, L. A.

Structure partielle de l'arginine kinase de Homard.  
Communication aux Journées Biochimiques franco-  
belges, 24-26juin 1976 (Lille).

- 5) DEBUIRE, B., HAN, K. K., DAUTREVAUX, M. and BISERTE, G. (Lille)  
REGNOUF, F. and KASSAB, R. (Paris) (1977)

Amino-acid Sequence of a cyanogen bromide fragment  
containing the two tryptophanyl residues of Lobster  
arginine kinase.

J. Biochem. Japan. 81, 611-619.

- 6) REGNOUF, F. and KASSAB, R., DEBUIRE, B. and HAN, K. K. (1979)

Primary structure of Lobster arginine kinase : amino-  
and carboxyl-terminal structure of the enzyme and complete  
alignment of the cyanogen bromide peptides.

Soumis pour publication.

- 7) HAN, K. K., TETAERT, D., DEBUIRE, B., DAUTREVAUX, M. and  
BISERTE, G. (1977)

Dégradation récurrente d'EDMAN.

Biochimie, 59, 7, 557-576.

## TABLE DES MATIERES

-----

### INTRODUCTION :

PAGE

L'ATP : L-arginine phosphotransférase parmi les  
phosphogène-phosphotransférases.

I	Réaction catalysée et substrats.	2
II	Préparation.	6
III	Composition en amino-acides et extrémités N et C-terminales.	7
IV	Conformation moléculaire.	10
V	Topographie du centre actif.	13
VI	Etude cristallographique.	22
VII	Propriétés antigéniques.	22

### PREMIÈRE PARTIE :

Technique de base utilisée lors de la détermination  
de la structure primaire de l'arginine kinase : la  
dégradation récurrente d'EDMAN. 25

### DEUXIÈME PARTIE :

Stratégie d'étude de la structure covalente de  
l'arginine kinase. 49

## CHAPITRE I

PAGE

Isolement et caractérisation des fragments obtenus par hydrolyse de l'arginine kinase par le bromure de cyanogène.

50

## CHAPITRE II

Séquence en amino-acides du fragment BrCN APK IV b contenant les 2 résidus de tryptophane de l'arginine kinase.

80

## CHAPITRE III

Séquence partielle du peptide BrCN APK III d' contenant la cystéine essentielle de l'arginine kinase.

93

## CHAPITRE IV

Séquences N et C-terminales de l'arginine kinase. Détermination de l'ordre d'enchaînement complet des fragments au bromure de cyanogène.

101

## CONCLUSIONS

148

## BIBLIOGRAPHIE

151

## ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

---

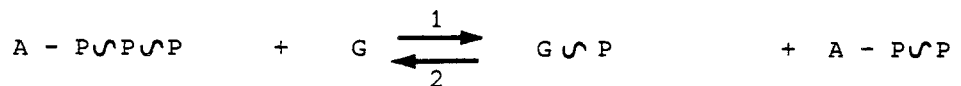
ATP	:	acide adénosine triphosphorique
ADP	:	acide adénosine diphosphorique
APK	:	arginine kinase
CPK	:	créatine kinase
BrCN	:	bromure de cyanogène
S-AE-APK	:	S-aminoéthyl arginine kinase
S-CM-APK	:	S-carboxyméthyl arginine kinase
Hse	:	homosérine
PCA	:	acide pyrrolidone carboxylique
DTT	:	dithiothréitol
EDTA	:	acide éthylène diamino tétra acétique
PITC	:	phénylisothiocyanate
PTH amino- acide	:	phényl thiohydantoïne amino-acide
HPLC	:	chromatographie liquide à haute pression
CPA	:	carboxypeptidase A
CPB	:	carboxypeptidase B
DNS-Cl	:	chlorure de dansyl
DNS amino- acide	:	dansyl amino-acide
DEAE	:	diéthylaminoéthyl
DTNB	:	acide 5-5' dithio-bis-nitrobenzoïque
Tris	:	tris (hydroxyméthyl)-amino-méthane

# **INTRODUCTION**

L'ATP : L-ARGININE PHOSPHOTRANSFÉRASE PARM  
LES PHOSPHAGÈNE-PHOSPHOTRANSFÉRASES.

## I RÉACTION CATALYSÉE ET SUBSTRATS

Les ATP - guanidino-phosphotransférases ou phosphagène phosphotransférases sont des enzymes qui catalysent le transfert du groupement phosphoryle terminal d'un nucléotide triphosphate purique, l'acide adénosine triphosphorique (ATP) sur le groupement guanidyle d'une base, dite base guanidinée, selon le schéma réactionnel suivant :



ATP

Base  
guanidinée

Base guanidinée  
phosphorylée ou  
phosphagène

ADP

Ces enzymes sont localisés dans le tissu musculaire (muscles lisses, striés et cardiaque) et dans le tissu cérébral (créatine kinase) ; on ne les décèle pas dans un organe tel que le foie où se forment pourtant les bases guanidinées.

Leur rôle connu est lié à la régénération de l'ATP consommé au cours de la contraction musculaire. (voir ci-dessus : réaction prépondérante dans le sens 2). Par ailleurs STOREY et al (1 - 2) ont montré que la créatine phosphate exerce un contrôle sur deux enzymes clés du système glycolytique : la phosphofructokinase et la pyruvate kinase. Plus récemment, au cours de l'étude de la phosphofructokinase du muscle adducteur de l'hippocampe, cet auteur démontrait pour la première fois, le rôle possible de l'APK et de l'arginine phosphate dans la régulation des enzymes glycolytiques (3).

Des investigations effectuées sur le rôle du système APK-arginine phosphate dans le muscle de manteau de Calmar (4) permettent d'affirmer qu'en définitive le système APK-arginine phosphate aurait un rôle limité en tant que "réservoir d'énergie" et servirait surtout à régler réversiblement la glycolyse chez les Invertébrés.

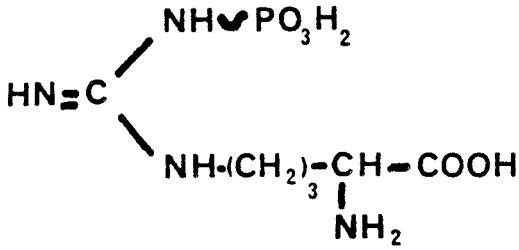
La créatine kinase caractérise les Vertébrés et l'arginine kinase les Invertébrés.

Chez les Annélides et les animaux d'embranchements voisins, outre ces enzymes, d'autres phosphokinases du même type sont responsables de la formation de six phosphagènes moins bien connus : phosphoglycocyamine, phosphotaurocyamine, phosphohypotaurocyamine, phospholombricine, phosphotalassémine et phosphoophéline (Figure I).

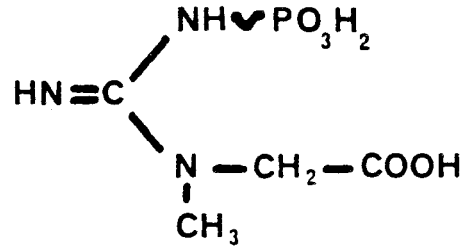
Les phosphagène kinases qui diffèrent par leur taille, leur conformation, leur spécificité, présentent cependant quelques analogies : les pourcentages des différents groupes d'acides aminés (dicarboxyliques, diaminés, aromatiques) sont remarquablement constants pour la plupart de ces enzymes (DER TERROSSIAN et al - 5, THOAI et al - 6).

Les cartes peptidiques tryptiques de cinq phosphagène-phosphotransférases sont similaires (créatine kinase, arginine kinase, taurocyamine kinase, lombricine kinase, glycocyamine kinase) (KASSAB et al - 7, PRADEL et al - 8) ainsi que les séquences en acides aminés autour du groupe SH essentiel (Tableau I.- 9 - 10 - 11 - 12).

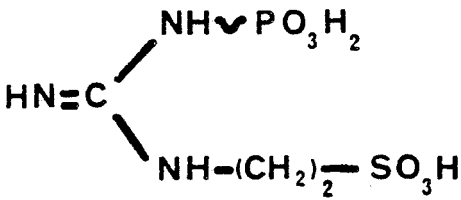
L'étude des phosphagène-phosphotransférases montre que, pendant l'évolution, des structures minimales essentielles ont été conservées (nature et nombre de résidus d'acides aminés essentiels, structure primaire des peptides de centre actif, microenvironnement des sites de fixation des substrats) mais que de très légers changements de position des résidus d'acides aminés essentiels sont suffisants pour modifier le mécanisme de transphosphorylation.



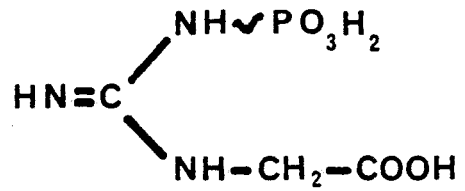
PHOSPHOARGININE



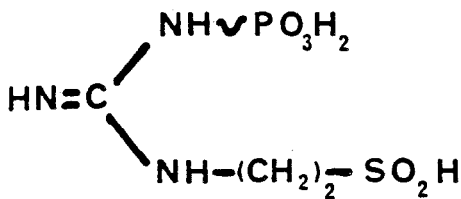
PHOSPHOCREATINE



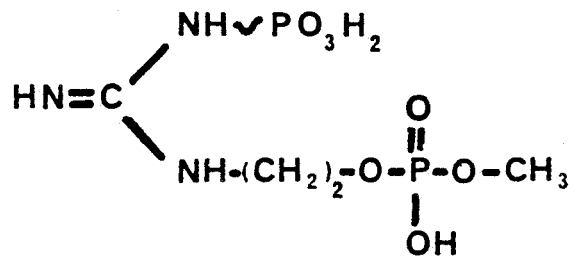
PHOSPHOTAUROCYAMINE



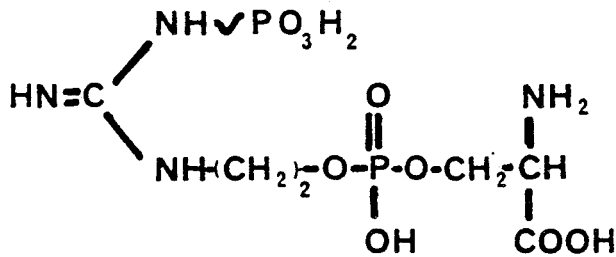
PHOSPHOGLYCOCYAMINE



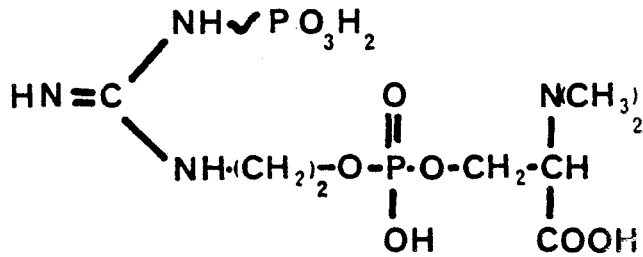
PHOSPHOHYPOTAUROCYAMINE



PHOSPHOOPHELININE



PHOSPHOLOMBRICINE



PHOSPHOTHALASSEMININE

# PHOSPHAGENES



FIGURE 1



Tableau I : Séquences des résidus d'acides aminés autour du résidu cystéinyle essentiel de la créatine kinase de cerveau de Boeuf (9), de l'arginine kinase de Homard (10), de la lombricine kinase de Lombric (11) et de la taurocyamine kinase d'Arénicole (12).

Créatine kinase (cerveau de Boeuf).

-Asn-His-Leu-Gly-Tyr-Ile-Leu-Thr-**CYS**-Pro- Ser-Asn-Leu-Gly-Thr-Gly-Leu-Arg

Arginine kinase (Homard).

-Gln-Thr-**CYS**-Pro-Thr-Ser-Asn-Leu-Gly-Thr- Val-Arg

Lombricine kinase (Lombric).

-Leu-Gly-Tyr-Ile- Thr-**CYS**-Pro-Gly-Ser-Asn-Leu-Gly-Thr- Leu-Arg

Taurocyamine kinase (Arénicole)

-Leu-Gly-Tyr-Leu-Gly-Thr-**CYS**-Pro-Thr- Asn-Ile-Gly-Thr-Gly-Leu-Arg



L'évolution biochimique réside donc dans une divergence des tailles et poids moléculaires, qui, à son tour, peut entraîner une modification du mécanisme réactionnel. Mais les structures minimales essentielles au type de réaction enzymatique sont maintenues (THOAI - 13).

## II PRÉPARATION DE L'ATP : L - ARGININE PHOSPHOTRANSFÉRISE

L'arginine kinase nous a été fournie par le Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée (Collège de France-Paris) puis par le Laboratoire de Biochimie Macromoléculaire (CNRS - Montpellier).

L'enzyme est préparé à partir du muscle de Homard (*Homarus vulgaris*) selon une méthode décrite par PRADEL et KASSAB (14) dont l'avantage est de permettre la purification de l'enzyme à partir de quantités importantes de muscle. Le mode opératoire est le suivant :

Après congélation à  $-70^{\circ}$  C pendant 24 heures, les muscles de Homard sont broyés jusqu'à homogénéisation en présence de 3 volumes d'une solution d'EDTA  $10^{-3}$  M, pH 7. L'extrait est centrifugé 30 minutes à 29 000 g à  $0^{\circ}$  C et le liquide surnageant recueilli ; le culot est extrait de façon identique par 1,5 volume de la même solution d'EDTA et, après centrifugation, les surnageants sont réunis (Fraction I).

La fraction I est précipitée à  $+4^{\circ}$  C, sous agitation, par du sulfate d'ammonium cristallisé (31,5 g/100 ml de liquide) et le milieu est maintenu à pH 7 par addition d'ammoniaque 5 N. Après centrifugation immédiate (30 mn à 29 000 g et à  $0^{\circ}$  C) le surnageant est enrichi en sulfate d'ammonium (15,5 g/100 ml de liquide) et après une nuit à  $+4^{\circ}$  C le précipité est recueilli et redissous dans une solution d'EDTA  $10^{-3}$  M, pH 7 (solution à 30 mg de protéine par ml : Fraction II).

La fraction II est additionnée de sulfate d'ammonium en solution saturée à +4° C jusqu'à 59 % de saturation en sel. Après centrifugation, le surnageant est additionné de la même solution de sulfate d'ammonium jusqu'à 69 % de saturation en sel. Après une nuit à +4° C, le précipité est centrifugé 30 mn à 29 000 g à 0° C.

Le précipité est alors dissous dans un tampon tris-acétate 0,01 M, EDTA  $10^{-3}$  M, pH 8 et dialysé 24 H à +4° C contre ce tampon. La concentration protéique doit être alors d'environ 30 mg/ml et son activité égale ou supérieure à 200 unités/mg.

La solution est soumise à une chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50, forme acétate, équilibré par un tampon tris-acétate de 0,01 M à 0,5 M; EDTA  $10^{-3}$  M, pH 8. L'arginine kinase est éluée à une molarité de 0,06 M (Fraction IV) et possède une activité spécifique supérieure à 300 unités par mg.

L'enzyme obtenu est homogène (ultracentrifugation analytique, électrophorèse en gel de polyacrylamide) et possède la plus haute activité spécifique jamais décrite.

### III COMPOSITION EN AMINO-ACIDES ET EXTRÉMITÉS N ET

#### C-TERMINALES

##### 1. Composition en acides aminés

L'arginine kinase de Homard est une protéine monocaténaire dont la masse moléculaire avoisine 38 500 daltons.

Son obtention à l'état cristallisé a permis la détermination de sa composition en acides aminés (320 à 340 résidus d'acides aminés) (15 - 16 et tableau II : résultats personnels). Cette protéine comporte 4 ou 5 résidus de cystéine et aucun pont disulfure ; les

TABLEAU II

RESIDUS D'ACIDES AMINES DOSES ET CALCULES PAR MOLE d'ARGININE KINASE

Acides aminés	Micromoles par g de protéine			Résidus d'acides aminés (g % de protéine) **	Poids moléculaire minimum ***	Résidus d'Acides aminés par mole de protéine ****	Nbre entier d'acides aminés par mole de protéine ****
	24 h*	72h*	temps 0				
Lysine	851	841	846	10,84	1180	32,20	32
Histidine	295	269	282	3,87	3533	10,75	11
Arginine	454	450	452	7,05	2212	17,17	17
Ac.aspartique	895	899	897	10,31	1115	34,07	34
Thréonine	456	456	456	4,63	2183	17,40	17
Sérine	440	417	452	3,94	2207	17,21	17
Ac.glutamique	1063	1077	1070	13,81	934	40,68	41
Proline	299	319	309	3,14	3084	12,32	12
Glycocolle	713	713	713	4,06	1402	27,10	27
Alanine	665	659	662	4,70	1510	25,16	25
Cystéine	106	118	112	1,15	8928	4,25	5
Valine	474	468	471	4,66	2123	17,89	18
Méthionine	220	216	218	2,85	4587	8,28	8
Isoleucine	434	456	456	5,15	2192	17,33	17
Leucine	855	897	876	9,90	1141	33,30	33
Tyrosine	272	284	278	4,53	3597	10,56	11
Phénylalanine	468	470	469	6,88	2136	17,79	18

\* moyenne effectuée sur 4 dosages du même échantillon  
 \*\* calculé à partir du poids moléculaire de l'anhydro-amino-acide correspondant  
 \*\*\* calculé selon la relation 
$$\frac{\text{poids moléculaire du résidu d'acide aminé} \times 100}{\% \text{ de résidu dans la protéine}}$$

\*\*\*\* poids moléculaire de l'arginine kinase : 38 000



teneurs en acides aminés dicarboxyliques (75 résidus) et en acides aminés basiques (60 résidus) sont relativement élevées.

## 2. Amino-acides N et C-terminaux

L'étude des séquences N et C-terminales a fait l'objet de la thèse d'Ingénieur Docteur de Mademoiselle F. REGNOUF (17) avec qui nous collaborons depuis le début de ce travail. Nous faisons ici un exposé très succinct des travaux qui ont conduit à la détermination de ces séquences.

### a) Séquence N-terminale

Une étude qualitative effectuée sur la protéine ainsi que sur le fragment BrCN de 107 résidus d'acides aminés a révélé la présence du groupe acétyle dans ces deux matériaux.

Une étude quantitative et séquentielle a été alors menée sur la protéine entière et ses hydrolysats à la pronase. Elle a permis successivement de doser la présence d'une mole de groupe acétyle par mole d'APK et d'identifier la N-acétyl-alanine comme acide aminé N-terminal de la protéine.

Le dérivé N-acétylé a été caractérisé à partir d'un acétyl-pentapeptide isolé quantitativement d'hydrolysats à la pronase dont la séquence primaire est :

N-acétyl-Ala-Asx-Ala-Ala-Thr

### b) Séquence C-terminale

L'acide aminé C-terminal libéré par hydrazinolyse

est la méthionine (REGNOUF - 18).

L'action simultanée des carboxypeptidases A et B a permis d'identifier la séquence -Lys-Glu-Met(OH) à l'extrémité C-terminale de la protéine. Malheureusement deux peptides obtenus par coupure spécifique par le BrCN (nous verrons ultérieurement le protocole d'isolement de ces peptides) possèdent la même séquence C-terminale.

La carboxypeptidase A, utilisée seule, ne détache que les 2 derniers amino-acides de l'APK pour donner la des-Glu-Met-APK ; en coupant cette des-Glu-Met-APK par le BrCN il était logique d'espérer isoler l'un de ces deux peptides sous une forme amputée de ces 2 résidus d'acides aminés et qui serait donc le peptide C-terminal. Il n'en a rien été, les deux peptides précédents ont été retrouvés porteurs de la séquence C-terminale Lys-Glu-Met(OH), ce qui prouve que le fragment recherché est différent de ceux déjà connus et qu'il n'a pas été isolé des hydrolysats BrCN.

Cela prouve par ailleurs que la séquence Lys-Glu-Met(OH) se répète 3 fois dans la protéine.

C'est l'électrophorèse diagonale des peptides tryptiques à méthionine qui a permis d'isoler ce fragment C-terminal, segment de 14 résidus d'acides aminés dont un acide aminé en position N-terminale est masqué ce qui empêche sa détection par les méthodes habituelles de révélation des chromatogrammes sur papier (ninhydrine, fluorescence).

#### IV CONFORMATION MOLÉCULAIRE

##### 1. Comportement hydrodynamique de l'arginine kinase

L'arginine kinase manifeste les caractéristiques hydrodynamiques (coefficient de sédimentation, rapport de friction et viscosité

intrinsèque) (Tableau III) d'une protéine globulaire.

Son comportement en solution est assimilable à celui d'un globule imparfaitement sphérique comparable à un ellipsoïde allongé dont le rapport axial serait de 3 à 4. Toutefois, c'est l'analyse par diffraction aux rayons X qui permettra d'en élucider complètement la forme.

## 2. Structure conformationnelle

Les résultats obtenus en dispersion optique rotatoire (ORIOLE - 19, LANDON - 20) et en dichroïsme circulaire (ORIOLE et LANDON - 21) permettent de décrire l'arginine kinase comme un enzyme de forme globulaire, renfermant 0,37 g d'eau par gramme de protéine et dont la structure ordonnée est faite de 40 % d'hélice  $\alpha$  et probablement de 10 % de structure  $\beta$ . La majeure partie de l'hélice semble être à la surface de la molécule, région où se logent 4 résidus de tyrosine sur les 11 que renferme l'enzyme.

## 3. Variations conformationnelles de l'arginine kinase

L'évolution des conformations adoptées par l'arginine kinase sous l'effet de la fixation des substrats ou des agents connus pour leur action déstabilisante, agents physiques (températures élevées, pH extrêmes) ou agents chimiques modificateurs de certains amino-acides, a été étudiée par LANDON et ORIOLE (22).

Alors que l'action des substrats sur l'arginine kinase n'entraîne pas de changements conformationnels tels qu'ils puissent être mis en évidence par les méthodes globales utilisées, l'action d'agents dénaturants classiques (pH extrêmes, élévation de température) produit des transitions structurales coopératives entre deux

<u>Coefficient de sédimentation, <math>s_{20,w}^{\circ}</math></u>	3,35 $10^{-13}$ sec
<u>Coefficient de diffusion, <math>D_{20,w}^{\circ}</math></u>	7,42 $10^{-7}$ $\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$
<u>Masse moléculaire</u>	
$\bar{M}_{s,D}$	41.500
$\bar{M}_w$ (équilibre de sédimentation YPHANTIS-60,5 mg/ml)	44.000
$\bar{M}_w = \bar{M}_z$ (équilibre de sédimentation YPHANTIS - 64, 0,3 mg/ml)	39.300
<u>Hydratation</u>	
Volume spécifique partiel anhydre, $\bar{v}$	0,734 ml/g
Volume spécifique partiel hydraté, $\bar{v}^*$	0,806 ml/g
Eau d'hydratation	0,375 g/g
<u>Forme et dimensions moléculaires</u>	
Viscosité intrinsèque	3,9 ml/g
Rapport de friction, $f/f_0$	1,27
Coefficient de SCHERAGA-MANDELKERN	2,09 $10^6$
Volume molaire anhydre	49.000 $\text{Å}^3$
Volume molaire hydraté	73.500 $\text{Å}^3$
Rapport axial, $a/b$	3-4
Grand axe, $2a$	44 - 53 $\text{Å}$
Petit axe, $2b$	15 - 13 $\text{Å}$

TABLEAU III

PARAMETRES HYDRODYNAMIQUES DE L'ARGININE KINASE



états : l'état initial contenant 40 % d'hélice $\alpha$  et l'état final ayant une structure tertiaire plus ou moins déployée et une structure hélicoïdale plus ou moins détruite suivant l'agent dénaturant employé.

De plus, les réactifs des groupements thiols et des tyrosines perturbent également la structure native, de sorte que l'arginine kinase adopte alors une structure partiellement déroulée.

Les faits relatés suggèrent la grande fragilité d'au moins 50 % de la structure hélicoïdale de l'état natif ; ceci est en accord avec la position superficielle qu'il semble possible d'attribuer à ce fragment d'hélice.

## V TOPOGRAPHIE DU CENTRE ACTIF

### 1. Rôle des résidus d'acides aminés essentiels

L'arginine kinase extraite du muscle de Homard comporte 4 résidus d'acides aminés essentiels : les résidus cystéinyle, lysyle, histidyle et tyrosyle.

Donc, une cystéine sur 4 ou 5, une lysine sur 32, une histidine sur 8, une tyrosine sur 11 que renferme l'enzyme sont indispensables à son activité.

Le rôle essentiel de ces groupes a été étudié par les méthodes spectroscopiques et les réactions d'échange isotopique en comparant le comportement de l'enzyme natif à celui de l'enzyme spécifiquement modifié. (THOAI - 23).

a) Rôle du résidu cystéinyne

L'intérêt des expériences réalisées par KASSAB et al en 1967 (7) a été de mettre en relief dans l'arginine kinase native la présence d'une fonction thiol particulière.

L'emploi du DTNB permet de distinguer un groupe SH immédiatement accessible au réactif. Ce groupe SH présente 2 caractéristiques : d'une part sa disparition provoque l'inactivité complète de l'enzyme et d'autre part, il présente une forte affinité pour l'arginine qui le protège efficacement contre l'inhibition par le DTNB.

Par ailleurs, il a été montré que lorsque le groupement SH essentiel de l'arginine kinase est bloqué, l'enzyme continue à fixer normalement les substrats nucléotidiques mais ne fixe plus ni l'arginine, ni l'arginine phosphate (ROUSTAN et al - 24).

Des travaux récents, effectués par DER TERROSSIAN et KASSAB (25) et MAGGIO et KENYON (26) (27) sur la CPK substituée par des groupes de petite taille et chimiquement inertes, ont montré que le groupe SH essentiel n'est impliqué ni dans la fixation des nucléotides ni dans celle de la créatine mais aurait un rôle conformationnel.

Comme nous le signalions précédemment, la remarquable ressemblance des séquences en amino-acides entourant la cystéine essentielle des différentes phosphagène-kinases fait que, par analogie avec la CPK, il est possible de supposer que le mécanisme d'action du SH essentiel est identique chez l'APK.

b) Rôle du résidu lysyle

La dansylation du groupe lysyle essentiel qui entraîne l'inactivation totale de l'enzyme, à raison de la fixation

d'une mole de 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulfochlorure par mole d'arginine kinase (KASSAB et al - 24) n'empêche pas la fixation des nucléotides mais supprime la protonation de l'ADP, les spectres de fixation des 2 nucléotides devenant alors semblables.

Ces faits, en accord avec la configuration de l'ATP étudiée en spectrométrie de rayons X, laissent supposer que le groupe  $\text{-NH}_3^+$ -lysyle aide à la fixation de l'ADP-Mg par protonation de son noyau adénine et de l'ATP-Mg par établissement d'une liaison électrostatique avec son groupe phosphoryle terminal. L'une des charges négatives de ce dernier serait ainsi neutralisée, l'autre l'étant déjà par l'une des 2 charges positives du cation  $\text{Mg}^{2+}$  impliqué dans la réaction ce qui satisfait aux conditions de polarisation positive du phosphore terminal nécessaire à son transfert.

En fait le problème est beaucoup plus complexe et d'autres alternatives de liaisons chimiques pourraient exister. Le groupement lysyle ne semble pas être concerné par l'échange de phosphore puisque l'enzyme dansylé continue à catalyser l'échange isotopique  $\text{ATP} + \text{ADP-C}^{14}$  (ROUSTAN - 28).

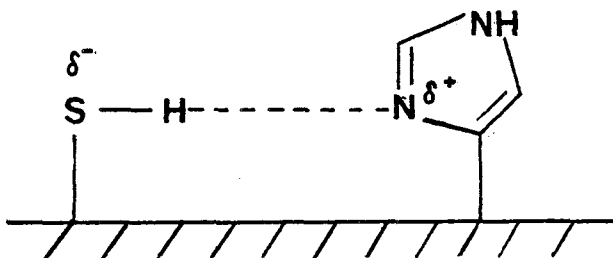
Des études effectuées sur la CPK et plus précisément sur le site de fixation de l'anion formiate dans le complexe CPK-ADP-Mg-HCOO<sup>-</sup>-créatine, analogue du complexe transitoire catalytique, montrent (JAMES and COHN - 29) que la dansylation de la CPK ne change pratiquement pas les constantes de dissociation de la créatine et de l'ADP au cours de leur fixation sur l'enzyme mais supprime la fixation du formiate.

D'autres travaux comme l'identification d'une lysine dansylée dans un hydrolysat de muscle de Lapin (30) et la détermination de la structure primaire du peptide tryptique correspondant dans l'enzyme de muscle de Poulet (31) permettent de conclure à l'existence d'un résidu de lysine essentiel par site actif de la protéine.

c) Rôle du résidu histidyle

Les études cinétiques faites sur la créatine kinase ainsi que celles ayant trait à la réactivité particulière des fonctions SH essentielles de cet enzyme et de l'arginine kinase ont suggéré la participation d'un groupement imidazole.

Puisque la réactivité des groupes SH essentiels dans les phosphokinases est indépendante du pH, RABIN et WATTS (32) VIRDEN et WATTS (33) ont émis l'hypothèse de l'existence de ces groupements dans la molécule enzymatique native, à l'état intermédiaire entre la forme mercaptan et l'ion mercaptide ; cette structure serait rendue possible par la présence d'une liaison hydrogène liant le groupement sulfhydryle à un résidu tel que le noyau imidazole selon le schéma suivant :



Ce couple thiol-imidazole pourrait alors promouvoir une catalyse de type acide-base au niveau du site actif de l'enzyme (WATTS - 34).

PRADEL et KASSAB (35) ont décrit les résultats obtenus concernant la modification de l'activité de l'arginine kinase par action du pyrocarbonate d'éthyle, réactif spécifique du noyau imidazole à pH 6. (MUHLRAD et al - 36).

L'enzyme dont le résidu histidyle essentiel est carbéthoxylé fixe normalement les substrats nucléotidiques et guanidinés mais il est alors complètement inactif.

Ces faits démontrent qu'on peut attribuer à ce groupement imidazole un rôle de catalyseur acide-base ; WATTS avait d'ailleurs émis cette hypothèse en 1973.

#### d) Rôle du résidu tyrosyle

La nitration de l'arginine kinase par le tétrani-trométhane a été étudiée après blocage réversible des groupes thiols (KASSAB et al - 37). La formation d'une mononitrotyrosine par mole d'enzyme entraîne une perte totale d'activité. La mononitrotyrosyl-arginine kinase est incapable de fixer les substrats guanidinés et nucléotidiques, les résultats obtenus en spectrophotométrie différentielle en font preuve.

Des mesures de dispersion optique rotatoire effectuées sur l'enzyme mononitré indiquent que celui-ci a perdu près de 50 % de sa teneur en  $\alpha$ -hélice, contrairement à l'enzyme dont les résidus cystéinyle, lysyle, histidyle essentiels ont été modifiés et dont la conformation moléculaire n'a pas subi de changement en dispersion optique rotatoire.

L'étude de l'effet Cotton à 233 nm montre le changement conformationnel très important produit au cours de cette modification.

Le résidu tyrosyle essentiel apparaît ainsi indispensable au maintien de la conformation moléculaire active de l'arginine kinase (KASSAB et al - 38).

En ce qui concerne la CPK, les travaux de FATTOUM (39) montrent que les résidus de tyrosine ne peuvent être bloqués que par

iodation et que l'enzyme ainsi modifié devient incapable de fixer ses substrats ; cependant la conformation globale reste inchangée, seul un changement dans l'environnement du site actif a pu être observé.

#### e) Rôle probable d'un résidu arginyle

Après les études effectuées par BORDERS et RIORDAN (40) et JAMES (41) sur la CPK qui tendent à prouver qu'un résidu arginyle essentiel fixerait, par son groupement guanidique chargé positivement, le phosphoryle du nucléotide, il est permis en raison de l'homologie des deux protéines de supposer qu'un résidu arginyle serait impliqué dans le mécanisme catalytique de l'arginine kinase.

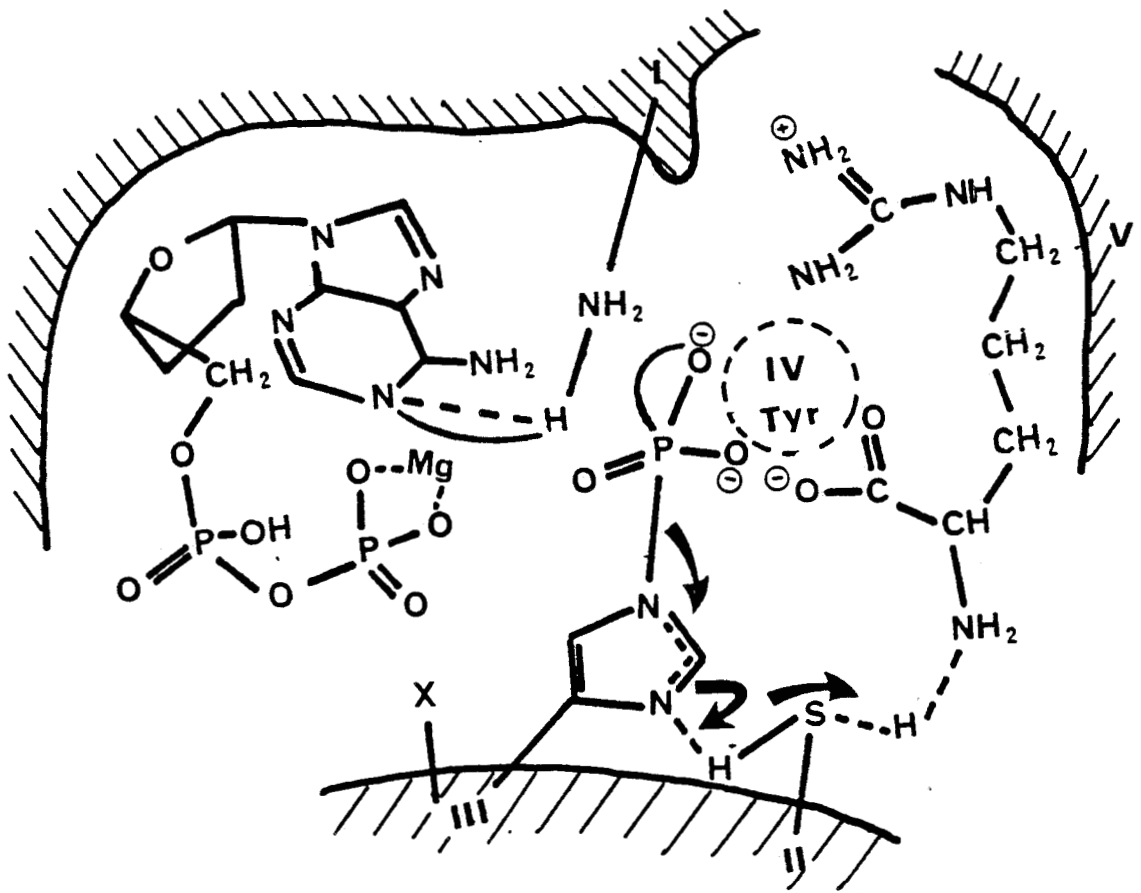
Cette hypothèse est encore renforcée par le fait que d'autres kinases telles que la phosphofructokinase (42) l'adénylate kinase (43), la phosphoglycérate kinase (44) et l'hexokinase (45) comportent un ou deux résidus d'arginine essentiels.

Le rôle de ce résidu serait sans doute, par son groupement guanidique de fixer les groupes phosphates au site actif.

#### 2. Topographie du centre catalytique

En fonction des résultats rapportés précédemment une représentation schématique du site actif de l'arginine kinase avait été élaborée (fig. 2) (ROUSTAN - 24).

Au cours de la réaction de transphosphorylation on observe l'élimination d'un proton du groupe guanidique et l'addition d'un proton à l'ADP, le phénomène étant réversible.



SCHEMA SUGGERANT LA TOPOGRAPHIE DU  
CENTRE ACTIF DE L' ARGININE KINASE

FIGURE 2



Bien que l'on ait d'abord pensé que la cystéine et l'histidine essentielles seraient impliquées dans ce rôle de capteur ou de donneur de proton (46) aucune preuve n'est venue étayer cette hypothèse (46, 47, 48, 27).

Au cours de la mise en place du complexe catalytique, la polarisation du groupement guanidique doit être telle que la partie  $\text{HN}=\text{C}$  s'oriente vers le phosphoryle  $\gamma$  de l'ATP pour que l'attaque nucléophile  $\text{N} \rightarrow \text{P}$  se produise (46, 49).

ROUSTAN et al (50) ont montré que l'arginine se fixe par son extrémité  $\alpha$ -CH  $\begin{matrix} \nearrow \text{NH}_2 \\ \searrow \text{COOH} \end{matrix}$  terminale, la chaîne carbonée de l'arginine présentant un plissement au niveau des carbones  $\text{C}_3$  et  $\text{C}_4$  il devrait donc exister une région hydrophobe de la protéine adaptée à ce plissement.

Au moment de l'acte catalytique le groupement phosphoryle transférable adopterait une forme plane ce qui faciliterait le transfert sur le substrat accepteur (46).

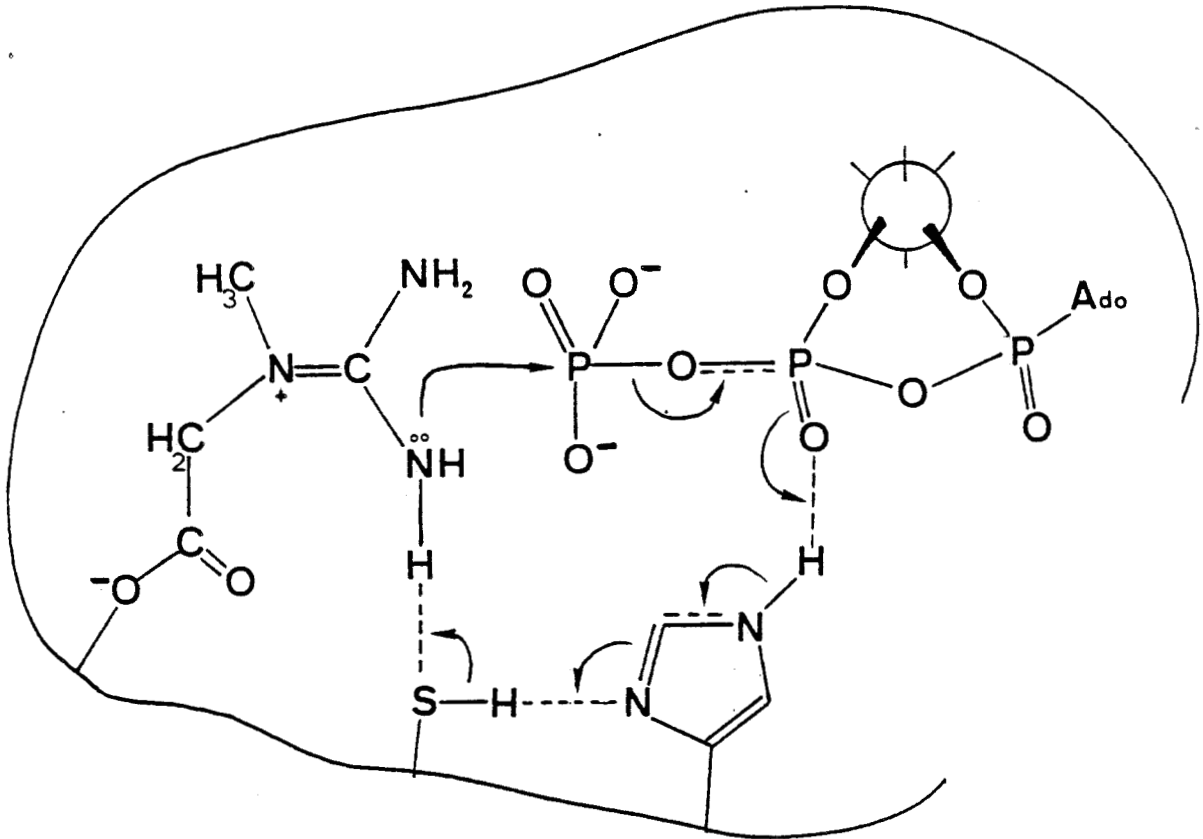
Il se pourrait qu'il y ait interaction entre le résidu histidyle essentiel et le groupe phosphoryle  $\beta$  de l'ADP qui sont relativement proches (la fig. 3 montre la créatine kinase dont le mécanisme réactionnel peut être considéré comme similaire).

Le métal lié aux groupes phosphoryles  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP subit une migration vers les phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ADP (51).

Le résidu lysyle essentiel sous sa forme  $\text{NH}_3^+$  faciliterait l'attaque nucléophile sur le phosphate par le groupe guanidique (29).

L'arginine essentielle fournirait une charge positive pour la fixation du phosphoryle du nucléoside (52), et le résidu tyrosyle serait indispensable au maintien de la conformation active de l'enzyme.





CENTRE CATALYTIQUE DE LA  
CREATINE KINASE

FIGURE 3



## VI ÉTUDE CRISTALLOGRAPHIQUE

Des cristaux d'arginine kinase de taille convenable ont été obtenus en utilisant la méthode de diffusion gazeuse de REID et al (53) modifiée par DUBORD et al (17).

Les cristaux ont des dimensions moyennes de l'ordre de  $0,8 \times 0,4 \times 0,3 \text{ mm}^3$ .

Les paramètres de la maille cristalline ont été mesurés (54) et l'appartenance au groupe spatial  $P_2$  confirmée.

Les premiers essais d'infiltration de monocristaux d'APK par des sels de métaux lourds (sels de samarium, de rose bengale et de platine) ont conduit assez rapidement à un résultat positif avec le sel de platine  $K_2PtCl_4$ .

Les spectres complets ont été enregistrés à des résolutions de  $2,9 \text{ \AA}$  pour l'APK native et  $3,3 \text{ \AA}$  pour le dérivé infiltré par le platine (RENAUD et al 17).

Des cristaux d'APK native ont été exposés au rayonnement synchrotron. La qualité optique de ce rayonnement permet une augmentation de la résolution qui, pour l'APK, passe de  $2,9 \text{ \AA}$  à  $2 \text{ \AA}$ .

## VII PROPRIÉTÉS ANTIGÉNIQUES DE L'APK

Des travaux de BENYAMIN et al (55) sur l'activité antigénique de l'APK et de la CPK se dégagent les points suivants :

- l'arginine kinase de Homard possède 7 sites antigéniques simultanément réactifs.

L'étude de fragments obtenus par coupure de l'enzyme par le BrCN montre que sur 5 peptides étudiés (qui équivalent environ à 90 % de la chaîne polypeptidique) 4 sont antigéniques.

Par ailleurs une étude antérieure (56) a établi que les hydrolysats tryptiques de l'APK conservent une activité antigénique importante, ce qui permet d'avancer que la structure antigénique de l'enzyme ne se limite pas à une portion restreinte de sa chaîne polypeptidique.

- Les résidus histidyle, lysyle et cystéinyle essentiels de l'APK ne sont pas impliqués dans les propriétés antigéniques de l'enzyme (57).

Par contre, le résidu tyrosyle essentiel situé à la surface de l'enzyme fait partie d'un déterminant antigénique de l'APK.

La participation des lysines à l'antigénicité de l'APK et de la CPK tend à être prouvée par l'augmentation de la capacité d'inhibition d'hydrolysats tryptiques quand le clivage est limité aux arginines. Ceci a été vérifié chez l'APK par des essais avec des dérivés à lysines modifiées. (58)

- La fixation séparée des substrats guanidique et nucléotidique sur la CPK n'entraîne aucune altération de l'antigénicité, une modification n'est observable que lorsque tout le site actif est occupé y compris le site de fixation du groupement phosphoryle transférable.

Au contraire la réactivité antigénique de l'APK est modifiée par la fixation de l'un des deux substrats, la fixation simultanée des substrats guanidique et nucléotidique se traduisant par un effet cumulatif qui est indépendant de la forme phosphorylée ou non phosphorylée du complexe.

Ces résultats traduisent des différences appréciables dans la réactivité antigénique des deux enzymes.

# **PREMIERE PARTIE**

TECHNIQUE DE BASE UTILISÉE LORS DE LA  
DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE  
L'ARGININE KINASE :

LA DÉGRADATION RÉCURRENTÉ D'EDMAN.

## I N T R O D U C T I O N

---

LA DÉGRADATION RÉCURRENTÉ DES PROTÉINES ET DES PEPTIDES, MISE AU POINT PAR EDMAN EN 1950, EST UNIVERSELLEMENT UTILISÉE PAR LES CHIMISTES DES PROTÉINES.

DANS LA PUBLICATION CI-APRÈS NOUS FAISONS UNE DESCRIPTION DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DÉGRADATION EMPLOYÉES AINSI QUE DE PROCÉDÉS D'IDENTIFICATION DES PHÉNYLTHIOHYDANTOÏNE-AMINO-ACIDES.

## Dégradation récurrente d'EDMAN. (\*)

Kia-Ki HAN \*\*, Daniel TETAERT \*,  
Brigitte DEBUIRE \*\*, Michel DAUTREVAUX \*\* et Gérard BISERTE \*\*.

\* Laboratoire des Protéines Fibreuses, Unité 16 de l'INSERM,  
Place de Verdun — 59045 Lille-Cédex (France).

\*\* Faculté de Médecine, Place de Verdun — 59045 Lille-Cédex (France).

Laboratoire Associé 268 du CNRS.

**Summary.** — Since Edman's first publication in 1950, the stepwise degradation of proteins and peptides is universally performed by protein chemists. We extensively reviewed the different manual degradations. We take two examples of manual degradation: a semi-micromethod and a micromethod in order to illustrate the evolution of manual degradation. The « dansyl-Edman » procedure proposed by Hartley in 1963 completes the manual N-terminal determination of peptides. We describe the different procedures of identification of PTH\*-amino acids: paper chromatography, thin layer chromatography, gas chromatography and liquid chromatography under high pressure and various modified Edman degradation procedures. Possibilities and limits of the liquid phase Sequenator of Edman reported in 1967 and the solid phase Sequencer of Laursen reported in 1971 are also considered in detail.

### I INTRODUCTION.

Depuis la détermination de la gramicidine-S en 1947 par Conden, Gordon, Martin et Syngé [1], la chimie des peptides et des protéines a fait des progrès considérables et un nombre important de résultats s'est accumulé depuis trente ans. Grâce au perfectionnement simultané des méthodes de fractionnement, des analyses automatiques des acides aminés, des hydrolyses endo- et exopeptidasiques spécifiques, des coupures chimiques et des modifications chimiques spécifiques et de la dégradation récurrente d'Edman, de nombreuses substances peptidiques ou protéiques ont été isolées et analysées. Les premiers efforts dans le domaine de la détermination des structures peptidiques ont porté sur des peptides relativement courts (vasopressine, oxytocine, etc.), puis plus longs (insuline, glucagon, ACTH, etc.) et enfin sur des protéines (ribonucléase, hémoglobine, protéines de virus, myoglobine, etc.). Maintenant les chimistes des protéines n'hésitent plus à s'attaquer à des molécules encore beaucoup plus complexes (par exemple: glutamate déhydrogénase: 500 résidus (déterminé), tropoélastine: 870 résidus, aminopeptidase P.M. — 80 000, phosphorylase: P.M. — 100 000, etc. (en cours de détermination)). Mais si l'on étudie les méthodologies utilisées, on trouve une méthode commune: la dé-

gradation d'Edman. Toutefois, si l'on étudie de près la méthode utilisée pour la dégradation d'Edman, on constate que chaque équipe utilise « sa technique » propre. Pour en donner un exemple personnel, la méthode de dégradation d'Edman, pratiquée au Laboratoire depuis 1960 a été modifiée huit fois, soit en vue de diminuer la quantité des peptides au départ, soit pour améliorer le rendement de la réaction et obtenir un ou deux résidus supplémentaires. La mort récente du pionnier de la dégradation récurrente, le Dr Pehr Edman, nous incite à décrire la conséquence de sa découverte et de faire une mise au point de cette méthode qui est universellement appliquée par tous les chimistes des protéines.

### II — PRINCIPE GENERAL.

En 1927, Bergmann *et al.* [2] proposent une méthode de détermination de l'acide aminé N-terminal d'une chaîne peptidique en utilisant le phényl isocyanate comme réactif. Le phénylisocyanate réagit facilement avec les groupements alpha-aminés libres à pH 8 et à 0°C. Le phénylcarbamylopeptide obtenu est cyclisé à 100°C pendant une heure en présence d'une solution aqueuse d'HCl ou dans le méthanol. Le produit de cyclisation obtenu est une 3-phénylhydantoïne. Le schéma de dégradation est le suivant: fig. 1.

Cette méthode fut utilisée par Abderhalden et Brockman en 1930 [3] puis par Jensen et Evans en 1935 [4]. Ces auteurs [3-4] utilisaient cette

(\*) Nous dédions cet article à la mémoire du Dr P. Edman décédé en 1977.

\* PTH: phényl-thio-hydantoïne.

○ A qui toute correspondance doit être adressée.

technique pour la détermination du groupement N-terminal d'un peptide en éliminant un seul résidu. Cependant, les conditions de clivage sont trop drastiques et provoquent l'hydrolyse des liaisons peptidiques, ce qui interdit son utilisation comme méthode de dégradation récurrente.

isothiocyanate pour recommencer le deuxième cycle et ainsi de suite.

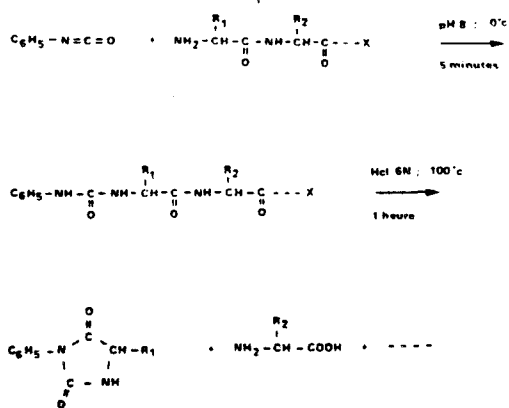


Fig. 1.

En 1950, Pehr Edman modifie le procédé de Bergmann, en remplaçant le phénylisocyanate par le phénylthioisocyanate et préconise d'une façon générale cette méthode pour arriver à un procédé de dégradation récurrente (5-8).

La dégradation d'Edman permet d'enlever les acides aminés à partir de l'extrémité N-terminale les uns après les autres et de les identifier sans détruire les autres liaisons peptidiques. Dans son procédé, on fait agir le peptide ou la protéine avec le phénylthioisocyanate pour obtenir un peptide N-phénylthiocarbamylé (réaction de couplage). En milieu acide, ce dérivé se cyclise en une thiazolinone, ce qui entraîne la rupture de la liaison peptidique terminale (réaction de cyclisation). La cyclisation est généralement effectuée en milieu hydraté et au cours de la même réaction de « réarrangement » en milieu acide à chaud une autre réaction a lieu qui transforme la thiazolinone en une thiohydantoïne beaucoup plus stable (réaction de conversion). La réaction globale est schématisée dans la figure 2. La thiohydantoïne est très soluble dans les solvants organiques et peut être extraite et identifiée par chromatographie notamment. Nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe consacré à l'identification des PTH-amino acides. La chaîne peptidique résiduelle, diminuée d'un résidu acide aminé, peut-être traitée à nouveau avec du phényl-

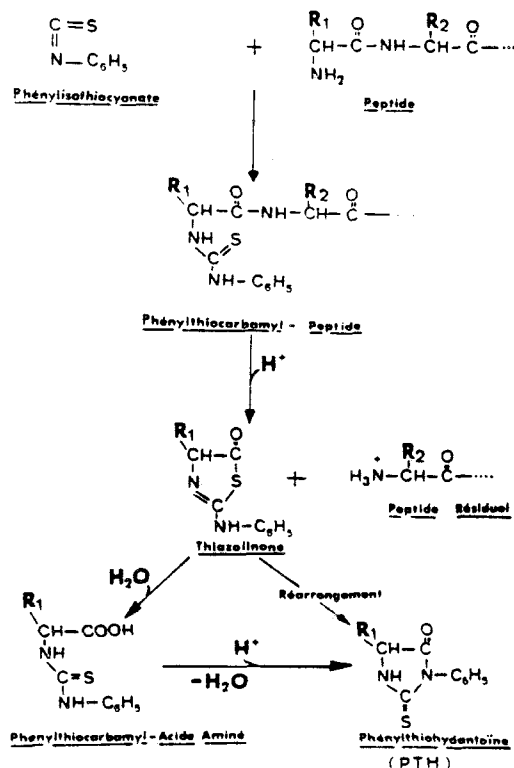


Fig. 2.

### III - EVOLUTION DE LA DEGRADATION D'EDMAN (MANUELLE).

Edman [5-6], en 1950, pratiquait la réaction de couplage à 40°C à pH 8.9. La réaction de clivage était effectuée en milieu anhydre (nitrométhane saturé d'HCl gazeux) pour éviter l'hydrolyse des liaisons peptidiques.

Cette méthode a été reprise par Fraenkel-Courat *et al.* (9) en 1955. Ils utilisent le dioxane et la soude 0,01 N comme tampon de « couplage ». La réaction de couplage durait 90 minutes, à 40°C. A la fin de la réaction, l'ensemble est extrait par du cyclohexane et par du benzène. La phase aqueuse est séchée sous vide. Le phénylthiocarbamyl-peptide est dissous dans 2 ml d'eau. Les réactions de clivage et conversion s'effectuent en même temps en incubant le PTC-peptide en milieu acide (HCl 3 N) à 40°C pendant 2 h. environ. Ainsi, le phénylthiohydantoïne-amino acide (PTH-amino-acide) est formé et est extrait par de

l'acétate d'éthyle. Tous les PTH-amino acides sont extraits sauf le PTH-His, le PTH-Arg et le PTH-cystéique. La phase organique est séchée sous vide, reprise par 2 ml d'eau et 2 ml de dioxane pour être à nouveau traitée par le phénylisothiocyanate (PITC) de façon à recommencer un autre cycle. Les PTH-amino acides étaient identifiés à l'époque par chromatographie sur papier (voir plus loin). Le protocole décrit par Fraenkel-Conrat *et al.* [9], bien qu'il soit assez ancien, reste à la base de toutes les variantes de la dégradation d'Edman manuelle publiées plus tard par les autres auteurs.

Margoliash [10] en 1962 a utilisé comme tampon de couplage une solution à 25 p. 100 de triméthylamine dans l'eau. L'intérêt de cette technique réside dans l'utilisation d'un tampon de couplage volatil et dans la réduction des quantités de peptide utilisées. De plus, cet auteur vérifie le résultat de chaque étape de dégradation par hydrolyse totale acide ou enzymatique du peptide résiduel. Cependant le temps de cyclisation est trop long (1 h à 12 h) et le PTH-Trp est détruit au cours de la cyclisation.

Konigsberg et Hill [11] en 1962 ont mis au point une technique dite « Edman soustractive ». En effet, au lieu d'identifier les PTH-amino-acides libérés après chaque étape de dégradation, ces auteurs soumettent le peptide résiduel à une hydrolyse totale acide suivie d'un dosage des acides aminés : la méthode est donc quantitative. Cette technique a été reprise et modifiée par Travis et Liener [12], Moore *et al.* [13], Elzinga *et al.* [14-15], par DeLange et Smith [16] et par Greene et Giordano [17]. Cette technique utilise le tampon volatil dans lequel le peptide et le PITC sont solubles. La cyclisation est réalisée dans un acide très volatil : l'acide trifluoroacétique. Ces techniques soustractives sont très précises et chaque étape est déterminée sans ambiguïté. Toutefois, la glutamine, l'asparagine et le tryptophane sont détruits au cours de l'hydrolyse totale à moins que l'on utilise une hydrolyse enzymatique sur le peptide résiduel.

Ces méthodes furent largement utilisées par de nombreux chimistes des protéines entre 1962 et 1973 et le sont encore actuellement pour déterminer certaines séquences en amino-acides particulières. Si cette méthode est théoriquement très précise de la première jusqu'à la cinquième (ou même jusqu'à la septième étape) au-delà, elle laisse subsister parfois des ambiguïtés. En effet, à partir de la 7<sup>e</sup> étape, la différence de composition porte sur des fractions de mole de plus en plus faibles (différence de 0,4, 0,3, 0,2 mole) (voir par exemple, l'exemple de Wu *et al.* [18]).

C'est Niall et Edman, qui, en 1962 ont utilisé le tampon pyridine/diméthylallylamine  $H_2O$ , ajusté à pH 9 par de l'acide trifluoroacétique pour dissoudre le peptide ou la protéine à dégrader et comme milieu de couplage avec le PITC [19]. Le clivage s'effectue par l'acide trifluoroacétique fumant et anhydre. La conversion s'effectue en HCl N/1 à 80°C pendant 10 minutes. Les PTH-amino acides sont directement identifiés par chromatographie sur papier ou sur couche mince (voir plus loin).

Nous voudrions résumer l'évolution de la dégradation d'Edman manuelle par la description des deux méthodes, une semi-micro et une micro-méthode pratiquées dans notre laboratoire.

#### A - Semi-micro méthode modifiée et adaptée d'après les protocoles de Steiner *et al.* [20] et de Kopeyan et Rochat [21].

Dans un tube conique rodé on dissout 1  $\mu$ mole de peptide ou de protéine par millilitre d'un tampon diméthylallylamine/propanol/ $H_2O$  (1,2:15:10, v/v/v) ajusté à pH 9,5 par l'acide trifluoroacétique (100  $\mu$ l de tampon) ; on y ajoute 5 à 10  $\mu$ l de PITC. On laisse passer de l'azote à la surface du liquide pendant 5 à 10 secondes, le tube est placé dans un bain-marie à 50°C pendant 10 minutes, avec agitation toutes les 5 minutes ; on refroidit immédiatement après la réaction de couplage. Si le PITC est en excès, il précipite ; sinon, il faut ajouter à nouveau 5  $\mu$ l de PITC et recommencer l'opération pendant 20 minutes avec agitation toutes les 5 minutes. On extrait le mélange 7 fois par le benzène (1 ml) et on centrifuge pour éliminer la phase benzénique (2 000 1/minute) ; on sèche alors la phase aqueuse sous azote et on lave le résidu par 1 ml d'acétate d'éthyle, on centrifuge et on sèche à nouveau sous azote le produit qui reste collé sur la paroi. On parfait la dessiccation dans un dessiccateur thermostaté à 55°C dans lequel on fait un vide très poussé pendant 30 minutes. Le clivage s'effectue à 50°C pendant 7 minutes par 150  $\mu$ l d'acide trifluoroacétique anhydre préalablement traité par  $C_2O_2$  et redistillé ; on sèche le produit par un léger courant d'azote : un film rougâtre se forme d'où on extrait la thiazolinone par grattage à l'aide d'une baguette de verre avec 2 ml d'éther privé de peroxyde et contenant de l'éthylmercaptan (20  $\mu$ l pour 50 ml d'éther) (trois fois). Les phases étherées sont réunies et séchées sous azote. La conversion est accomplie par 200  $\mu$ l d'HCl N/1 à 80°C pendant 10 minutes (8 minutes pour PTH-Ser et PTH-Thr) ; le PTH-amino-acide est ensuite extrait par 3 fois 0,7 ml d'acétate d'éthyle conservé sur de l'acide ascorbique solide (1 litre d'acétate d'éthyle est



conservé sur 1 g d'acide ascorbique). Le peptide résiduel est séché sous vide en présence de KOH solide et peut être soumis à une deuxième dégradation. Pour réussir cette méthode il est indispensable de traiter les solvants et les réactifs d'après le protocole décrit par Edman [22]. Nous avons traité la plupart de nos solvants ou nous avons acheté les réactifs et solvants dits « Sequenal grade » chez Pierce Chemicals aux U.S.A. Les phases d'acétate d'éthyle sont réunies et séchées sous azote et on reprend le résidu par 20 ul d'acétate d'éthyle. On identifie les PTH-aminoacides par chromatographie sur couche mince ou par chromatographie en phase gazeuse (voir plus loin). Cette technique est très efficace. Nous avons ainsi déterminé le segment C-terminal de Papomyoglobine de blaireau obtenu après la coupure des liaisons méthionyl par le BrCN sur la globine. Ce segment est constitué par 22 résidus d'acides aminés. Nous avons effectué 20 cycles sur 22 résidus et nous avons pu déterminer sans ambiguïté la séquence des 20 premiers résidus. Le 22<sup>e</sup> résidu, l'acide aminé en position C-terminale, a été

déterminé par hydrazinolyse et le 21<sup>e</sup> résidu est placé par différence. Ainsi, la structure complète d'un polypeptide de 22 résidus a été établie en 7 jours à partir d'une amole de peptide.

Il s'agit cependant d'une semi-microméthode, car il faut 500 nmoles ou 1 µmole de peptide au départ.

B — Micro-méthode d'après le protocole de Tarr [23].

Le couplage s'effectue avec le peptide lyophilisé. On y ajoute une goutte de pyridine aqueuse à 30 p. cent, une goutte de triméthylamine aqueuse à 30 p. cent et 4 gouttes de PITC à 10 p. cent dans la pyridine. On incube pendant 25 à 30 minutes à 50°C.

Le lavage s'effectue par 400 ul du mélange heptane-acétate d'éthyle (10:1) (une fois). Ensuite, le lavage est répété par 400 ul de mélange heptane-acétate d'éthyle (2:1) (5 fois). On élimine à chaque fois la phase supérieure. On sèche la phase inférieure sous azote pendant 5 à 10 minutes à 20°C.

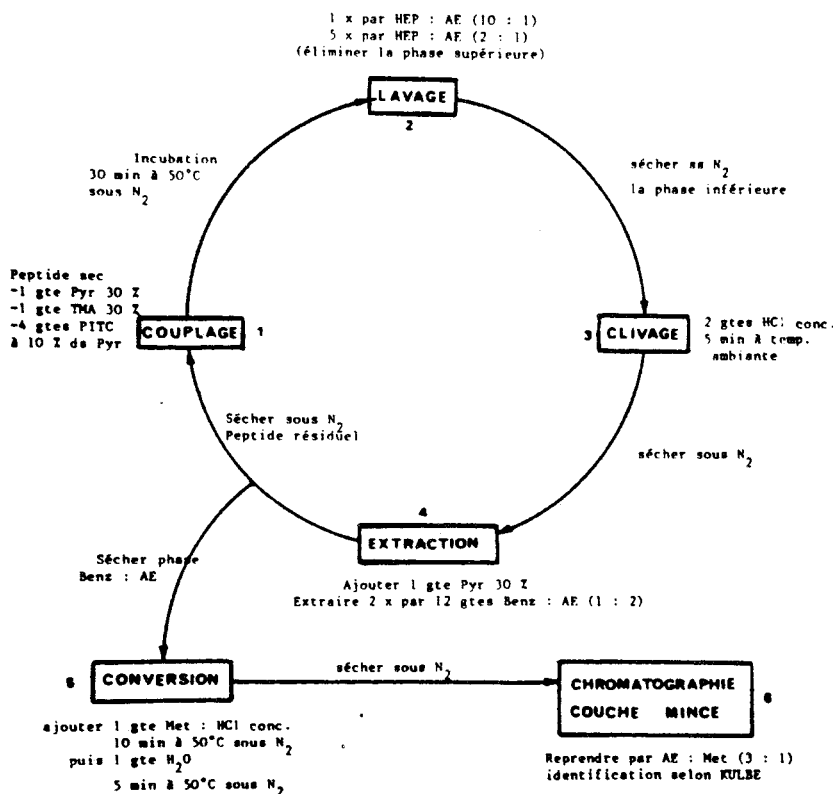


FIG. 3. — Etape de la dégradation d'Edman manuelle selon Tarr [23].  
Abréviation utilisée : HEP = heptane, MET = méthanol, AE = acétate d'éthyle, TMA = triméthylamine, PITC = phénylthioisocyanate, Benz = benzène, Pyr = pyridine.

### Dégradation récurrente d'EDMAN.

561

Le clivage s'effectue par addition d'une goutte d'HCl concentré et on laisse la réaction se dérouler pendant 5 minutes à 20°C. Puis on sèche sous azote pendant 7 à 15 minutes.

L'extraction s'effectue par addition d'une goutte de pyridine à 30 p. cent, puis 12 gouttes d'un mélange benzène-acétate d'éthyle (1:2). On mélange d'abord et on centrifuge ensuite. On récupère la phase supérieure. Cette extraction est complétée par une deuxième opération en y ajoutant 12 gouttes d'un mélange benzène-acétate d'éthyle (1,2). On mélange, on centrifuge et on récupère la phase supérieure. On sèche la phase organique.

La conversion s'effectue par addition de 3 gouttes d'un mélange méthanol-HCl (10:1). On laisse la réaction se dérouler pendant 10 min à 50°C. On ajoute une goutte d'eau et on laisse le tout à 50°C pendant 5 minutes. On sèche.

Tarr <sup>23</sup> préconise l'utilisation d'une petite plaque en silice gel fluorescent pour identifier les PTH-amino acides en chromatographie monodimensionnelle. Mais nous préférons l'utilisation de la méthode de Kulbe <sup>24</sup> sur feuille de polyamide (5 × 5 cm) pour l'identification des PTH-amino acides (voir plus loin).

La figure 3 illustre le cycle complet de la dégradation récurrente. Cette méthode est une micro-méthode. Elle permet d'identifier et de mettre en évidence les PTH-Ser et PTH-Thr.

On peut faire la séquence de courts peptides de 2 à 8 résidus en partant de 50 nmoles.

Nous avons déterminé complètement la structure du segment C-terminal de l'arginine-kinase de homard (11 résidus) en partant de 200 nmoles de peptide (Debuire, Han et Regnouf : travaux non publiés). Cette méthode permet d'identifier tous les PTH-acides aminés y compris les PTH-Arg, PTH-His et PTH-cystéique qui restent d'habitude dans la phase aqueuse avec les autres méthodes de dégradation. Si dans le peptide, l'arginine ou l'histidine se trouve en position C-terminale, il n'y a aucun problème d'identification des PTH-amino acides.

Les PTH-Arg ou PTH-His apparaissent en fin d'étape. Cependant, si le peptide contient un résidu d'arginine ou d'histidine en position « interne » les PTH-Arg et PTH-His traînent dans toutes les étapes suivantes : ce qui rend l'identification ultérieure pratiquement impossible. Les séquences du type -X-Arg-Arg-X- ou -X-Arg-His-Y ne peuvent pas être déterminées par cette méthode.

### IV -- DETERMINATION SEQUENTIELLE DES PEPTIDES PAR LE COUPLAGE DANSYL-EDMAN.

Pour remplacer la méthode de dinitrophenylation de Sanger publiée en 1945 <sup>25</sup>, Gray et Hartley <sup>26</sup> ont proposé une méthode cent fois plus sensible : la méthode de dansyl-amino-acides. En effet, le chlorure de l'acide 1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonique (chlorure de dansyl) peut réagir facilement avec les fonctions aminées en formant des dérivés fluorescents (dansyl-peptides). Les dansyl-amino-acides obtenus par hydrolyse acide des peptides ainsi « marqués » sont identifiés par électrophorèse, ou par chromatographie sur silice, ou sur feuille de polyamide. La détection est faite sous lumière ultra-violette. L'identification d'un dansyl-amino-acide peut être réalisée sur 1 nmole par chromatographie sur plaque de silice et 0,1 à 0,2 nmoles sur feuilles de polyamide.

En raison de sa très grande sensibilité, cette méthode se prête très heureusement à la détermination de l'acide aminé N-terminal du peptide résiduel obtenu à chaque étape de la dégradation d'Edman. Si on fait réagir une petite quantité de peptide ou de protéine avec le chlorure de dansyl, on peut identifier le premier acide aminé qui est en position N-terminale. Une première étape de dégradation d'Edman sur le reste du peptide enlève cet acide aminé N-terminal. On prélève une faible quantité du peptide résiduel et on détermine son amino-acide N-terminal par le chlorure de dansyl ; on peut ainsi identifier le deuxième résidu de la séquence N-terminale. Par cette méthode dite « dansyl-Edman », on peut ainsi identifier la structure d'un peptide court (2 à 8 résidus) et aller parfois jusqu'au 10<sup>e</sup> résidu, parfois jusqu'au 15<sup>e</sup> ou 18<sup>e</sup> résidu.

Les dansyl-amino-acides peuvent être identifiés sur couche mince de gel de silice. Nous utilisons de préférence la technique de Gros et Labouesse <sup>27</sup> pour les polypeptides ou les protéines. On peut également identifier les dansyl-amino-acides par la chromatographie sur feuilles de polyamide. En effet, Hartley <sup>28</sup> utilise les petites feuilles de polyamide (5 × 5 cm) pour identifier les dansyl-amino-acides. Cette chromatographie a l'avantage sur la chromatographie en gel de silice d'être plus rapide et plus sensible. Elle est destinée surtout aux peptides relativement courts (de 2 à 10 résidus).

Cette méthode s'est encore perfectionnée en séparant la phase aqueuse de la phase organique (éther sans peroxyde ou acétate d'éthyle « seque-

nal grade ») par micro-extraction qui extrait tous les dansyl-amino-acides (sauf les dansyl- $\alpha$ -Lys, dansyl-Arg, dansyl-His, dansyl- $\epsilon$ -Lys, dansyl-OH, dansyl-O-Tyr qui restent dans la phase aqueuse [Hartley, 29]). Cette méthode sépare très aisément le dansyl-OH (\*) qui rend parfaite la résolution des dansyl-amino-acides.

*Protocole expérimental de la dégradation d'Edman d'après Hartley [28] en vue du procédé « dansyl-Edman ».*

Ce procédé est publié en 1963.

Dans le protocole préconisé par Hartley [27] pour la dégradation d'Edman, cet auteur utilise la pyridine récemment distillée comme tampon de couplage avec le PFTC. La réaction de couplage s'effectue sous azote à 45°C pendant 90 minutes. Le PTC-peptide (sans extraction au préalable) ainsi obtenu est desséché sous vide à 56°C en présence de  $P_2O_5$ ,  $H_2SO_4$  et NaOH. Le clivage est pratiqué par incubation sous azote avec l'acide trifluoroacétique anhydre à 45°C pendant 30 minutes. Après un nouveau séchage, le résidu est repris par l'eau (200  $\mu$ l) et 1 ml d'acétate de butyle afin d'extraire la thiazolinone formée. Après centrifugation, on élimine la phase organique et la phase aqueuse est séchée et reprise par 200  $\mu$ l d'eau dont on prélève 5  $\mu$ l pour la détermination de l'acide aminé en position N-terminale par dansylation. Après cette identification on peut recommencer un nouveau cycle de dégradation sur les 195  $\mu$ l qui restent.

Le principal intérêt de cette méthode réside en l'utilisation d'une quantité minimale de peptide (de 20 à 100 nmoles pour une dizaine de cycles), car le dansyl-amino-acide est visible en UV avec un minimum de 0,1 à 0,2 nmoles sur feuille de polyamide. Pour un chercheur expérimenté, cette méthode peut permettre de réaliser jusqu'à 15-16 cycles en partant de 100 nmoles de peptide [Perham, 30].

Personnellement, dans notre laboratoire, nous avons établi la séquence d'un hexapeptide de la myoglobine de blaireau en partant de 20 nmoles de peptide avec identification des dansyl-amino-acides sur 0,1-0,2 nmoles. Nous avons aussi déterminé la séquence d'un peptide de 11 résidus de l'arginine-kinase de homard en partant de 100 nmoles. Nous avons rarement dépassé 11 cycles avec 100 nmoles de peptide au départ. Encore actuellement, de très nombreux chercheurs utilisent cette méthode.

(\*) Dansyl-OH : acide-1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonique.

*Microméthode de « dansyl-Edman » d'après Chen [31].*

Chen [31] a récemment utilisé le couplage dansyl-Edman avec 5-10 nmoles de peptide au départ. On dissout 5-10 nmoles de peptide dans 50  $\mu$ l d' $H_2O$  bidistillée. On y ajoute 50  $\mu$ l de solution de PFTC (5 p. cent dans la pyridine tri-distillée) dans un tube conique rodé et sous azote. La réaction de couplage s'effectue à 45°C pendant 60 mn. On sèche sous vide poussé après la réaction. Pour la réaction de clivage, il utilise l'acide trifluoroacétique bidistillé (100  $\mu$ l), on agite et on laisse 30 minutes à 45°C. Après la réaction de clivage, on sèche sous vide poussé, on dissout le produit par 50  $\mu$ l d' $H_2O$  bidistillée et on extrait 3 fois par 200  $\mu$ l de *n*-butylacétate. On isole ainsi la thiazolinone qui sera convertie ultérieurement pour identification des amides. On conserve la thiazolinone à -18°C. Lorsque la thiazolinone est extraite, on peut recommencer le cycle suivant.

D'après cet auteur, on peut déterminer la séquence d'un peptide de 2 à 13 résidus.

*Discussion sur la dégradation manuelle.*

Il suffit de suivre la littérature pour comprendre l'évolution de la dégradation manuelle d'Edman.

Par exemple, pour le segment C-terminal de la myoglobine de cheval (22 résidus) en 1967 [Han et al., 32], nous avons utilisé les méthodes classiques de l'époque et travaillé 4 mois en utilisant 10  $\mu$ moles de polypeptide. En 1973, nous avons terminé la structure covalente de segment C-terminal de la myoglobine de blaireau en 7 jours en consommant 1  $\mu$ mole de peptide [Tetaert et Han et al., 33]. Tous les spécialistes de la Chimie des Protéines ont été sensibles à cette évolution. Nous reviendrons plus loin sur la dégradation automatique qui améliore encore les performances des méthodes manuelles.

## V IDENTIFICATION DES PTH-AMINO-ACIDES.

### 1) Chromatographie sur papier ou sur couche mince.

En 1953-1956, on identifiait les PTH-amino-acides par chromatographie sur papier avec les systèmes décrits par Sjoquist [34] et Sjoquist et Edman [35]. Cette méthode a été abandonnée au profit de la chromatographie sur couche mince. Par exemple, les plaques fluorescentes (Merck : DC Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 - - 20 x

Dégradation récurrente d'EDMAN.

20 cm) ou Merck : HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254 — 10 × 10 cm).

L'identification des PTH-amino acides en chromatographie en couche mince sur silica gel permet de résoudre la plupart des problèmes de séparation sans ambiguïté. Nous utilisons couramment les systèmes D et H préconisés par Edman et Begg [22] et nous avons modifié le système E [36] d'Edman [22].

Solvants d'Edman.

Système D : Xylène et acétone/formamide (7/3).

On trempe d'abord la plaque dans le mélange acétone-formamide on fait sécher à l'air et on fait migrer dans le xylène purifié. Durée de migration : 60 minutes pour plaque de 20 cm ; 25 à 30 minutes pour plaque de 10 cm.

Système H : Chlorure d'éthylène : acide acétique (60:14 ; V/V).

La migration doit être effectuée dans une cuve saturée par les solvants à l'aide d'une feuille de

mélange 97 ml d'acétate de butyle et 3 ml d'eau et on agite, on laisse ensuite décanter une nuit. On recueille la phase supérieure que l'on filtre. On y ajoute 4 ml de formamide et 3 ml d'acide propionique ; on laisse équilibrer le mélange pendant 2 heures. Il faut saturer la cuve en garnissant l'intérieur de papier filtre Whatman n° 3 imprégné des solvants. Ce système est pratiqué sans trempage ni équilibration préalable. Il permet d'identifier les PTH-amino-acides surtout le PTH-Asp, le PTH-Asn, le PTH-Glu et le PTH-Gln et le PTH-Cys (Cm). Durée 75-90 minutes pour plaque de 20 cm et 40 minutes pour plaque de 10 cm (voir figure 4).

La chromatographie est ascendante et unidimensionnelle ; elle permet d'identifier une vingtaine de PTH-amino-acides séparément, ce qui est très utile pour l'analyse des PTH-amino-acides sortis en série du séquenceur automatique. Le système D permet d'identifier le PTH-Pro, le PTH-Ala (qui se chevauchent dans le système E), le PTH-Val, le PTH-Leu et le PTH-Ile sans trop de problèmes. De plus, dans le système D, le PTH-Gly est coloré naturellement en rose et le PTH-Trp est en jaune après séchage de la plaque (après la migration) ce qui facilite leur identification.

Les PTH-amino-acides peuvent être également identifiés par chromatographie unidimensionnelle en couche mince sur silica gel sur le support plastique [Inagami et Murakami, 37] ; elle permet d'identifier simultanément plusieurs échantillons. Kulbe [21] a mis au point une nouvelle technique d'identification des PTH-amino-acides y compris le PTH-His, PTH-Arg et PTH-CysO3 : la chromatographie unidimensionnelle et bidimensionnelle dans des systèmes solvants contenant un indicateur fluorescent : PBD (2-phényl-5-(4-biphényl)-1,3,4-oxadiazole) ou butyl-PBD (2-(4-tert-butylphényl)-5-(4"-biphényl)-1,3,4-oxadiazole). Ceux-ci permettent de localiser 0,05 à 0,2 nmoles de PTH-amino-acides. La durée de migration est de 10 minutes pour la première dimension. Les systèmes de solvants sont les suivants :

- I : Toluène/n-pentane/acide acétique (60:30:10).
- II : Acide acétique à 25 p. cent aqueux.
- III : Pyridine à 40 p. cent acide acétique (9:1).

Toutes ces méthodes de chromatographie en couche mince sont qualitatives. Si l'on ne dispose pas de la chromatographie en phase gazeuse, on peut cependant déterminer quantitativement les PTH-amino-acides en les éluant par le méthanol et en les dosant par spectrophotométrie en UV [Smith et Murray, 38]. D'après ces auteurs [38], cette méthode permet d'éluier presque quantitativement (avec 93-100 p. cent de rendement)

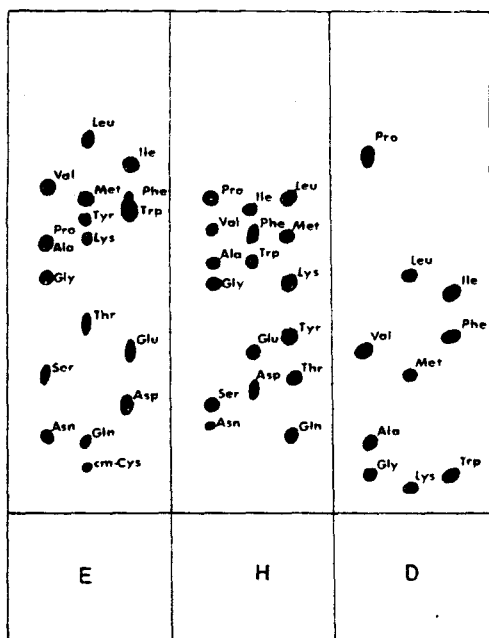


FIG. 4. — Chromatographie des PTH-amino acides sur couche mince de Silicagel dans les systèmes E, H et D [d'après Edman et Begg, 22].

papier. Durée 65 mn pour une plaque de 20 cm et 30 mn pour une plaque de 10 cm.

Système E modifié : Acétate de butyle saturé d'eau (97/3) + acide propionique/formamide (3/1) ; on

presque tous les PTH-amino-acides car elle permet de doser 10 nmoles de PTH-amino-acides.

Récemment, Cohen-Solal *et al.* [39] ont mis au point une technique de TLC-chromatographie unidimensionnelle sur silicagel sur support plastique (10 × 10 cm ou 6.5 × 6.5 cm). Cette méthode d'identification est très sensible, très précise et très rapide (sensibilité 0,1-0,2 nmoles, durée de migration : varie entre 5 et 8 minutes).

Leurs systèmes utilisés sont les suivants :

- Système V : chloroforme-méthanol (9:1).
- Système I : chloroforme (10).
- Système VI : chloroforme-méthanol (4:1).
- Système VII : *n*-heptane-pyridine (7:3).

Pratiquement, on peut identifier tous les PTH-amino-acides sans ambiguïté en combinant les différents systèmes de solvants cités plus haut.

#### RÉVÉLATION DES PTH-AMINO-ACIDES.

Pour les plaques de silica gel sur support en verre, fluorescentes après la chromatographie, la plaque est séchée à 100°C pendant 5 minutes. On peut ainsi localiser les PTH-amino-acides en lumière UV. On peut également les identifier par trempage dans une solution de ninhydrine à 0,2 p. cent dans l'acétone. Roseau et Pantel [40] trempent la plaque de verre dans une solution de ninhydrine-collidine et la séchent à l'étuve pendant un temps variable. La coloration des différents PTH-amino-acides est différente, ce qui facilite leur identification. Nous avons utilisé cette méthode pour différencier le PTH-Ala de PTH-Pro dans le système E modifié d'Edman [22] et pour déterminer les PTH-Asn, PTH-Asp, PTH-Gln, PTH-Glu. Le PTH-Gly est différencié du PTH-aminoéthyl-cystéine par sa coloration spécifique. Cette méthode est sensible jusqu'à 5 à 10 nmoles de PTH-amino-acides. Lorsque la quantité des PTH-amino-acides est faible, on peut placer la plaque de silicagel fluorescente, après migration et séchage à l'étuve, dans une cuve saturée de vapeur d'iode. Après 5 minutes les PTH-amino-acides sont colorés en jaune. On les localise en lumière UV. Cette méthode est 10 fois plus sensible que le procédé classique [41].

On peut également localiser les PTH-amino-acides par révélation à l'aide d'un mélange d'amidon-iode-azoture de sodium [Cohen-Solal, 39], et Bernard [39] trempent avant la migration les feuilles de TLC (silicagel sur le support plastique) dans une solution d'amidon soluble à 1 p. cent et pulvérisent après la migration une solution contenant azoture de sodium (10 p. cent p/v)/0,1 N d'iode/H<sub>2</sub>O (15:10:25). Cette méthode

est sensible jusqu'à 0,1-0,2 nmoles. Nous pratiquons cette méthode de la manière suivante : on trempe d'abord la feuille de silicagel sur le support plastique dans une solution d'amidon soluble à 1 p. cent. On fait migrer dans le système de Cohen-Solal [39], on sèche ensuite les feuilles par un courant d'air chaud et on localise les PTH-amino-acides sous la lumière U.V. (sensibilité : 0,1-0,2 nmoles).

*Cas particuliers* : PTH-Cys (CM), PTH-S-AE-Cys, PTH-Arg, PTH-His et PTH-CySO<sub>3</sub>.

Les PTH-Cys (CM) et le PTH-S-AE-Cys sont organosolubles. Dans le système E modifié à partir du protocole d'Edman [22], le PTH-Cys (CM) ne migre pas. Son R<sub>F</sub> est très faible; il migre juste en dessous du PTH-Asn (figure 4). Le PTH-S-AE-Cys possède le même R<sub>F</sub> que le PTH-Gly dans le système E. On peut le différencier en le révélant par une solution de ninhydrine-collidine [40]. Le PTH-Gly est coloré en orange tandis que le PTH-S-AE-Cys est coloré en rose (Han, Debuire, travaux non publiés).

Les PTH-Arg, His et CySO<sub>3</sub> sont hydrosolubles. Ils ne sont pas extraits par les solvants organiques au cours de la dégradation manuelle ou automatique. Ils restent dans la phase aqueuse. Aucune révélation n'est possible si l'on dépose la phase aqueuse directement sur papier suivie de révélations spécifiques. Une couleur verdâtre apparaît qui gêne la révélation spécifique. On sèche la phase aqueuse, on reprend par un minimum d'éthanol-H<sub>2</sub>O (50 p. cent) et on étudie les phases aqueuses en présence de témoins externes (PTH-Arg, His et CySO<sub>3</sub>) par électrophorèse sur papier à pH 3,9 (pyridine-acide acétique-H<sub>2</sub>O ; 30:100:4870). Le PTH-CySO<sub>3</sub> est séparé des PTH-Arg et His. Le PTH-Arg peut être identifié par la réaction de Sakaguchi modifiée par Itano *et al.* [42] (lecture sous U.V. à 340 nm). Le PTH-His peut être révélé par la réaction de Pauly [Needleman, 43].

#### IDENTIFICATION DES PTH-AMINO ACIDES PAR RÉGÉNÉRATION EN ACIDES AMINÉS.

Il est très difficile de différencier le PTH-Leu du PTH-Ile en chromatographie sur couche mince ou même en chromatographie en phase gazeuse, même après silylation (voir plus loin). Parallèlement, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse, certains chercheurs, pour avoir une idée quantitative du rendement au cours de la dégradation d'Edman, préfèrent la régénération des PTH-amino-acides en acides aminés qu'ils dosent ensuite sur un Autoanalyseur d'acides aminés. Cependant, quelles que soient les méthodes utilisées,

Dégradation récurrente d'EDMAN.

les PTH-Asn et Gln sont transformés en Asp et Glu.

a) *Régénération par HCl* (HCl 5,6 N, 130-150°C, 16 à 24 h) [Van Orden et Carpenter, 44].

Cette méthode détruit les résidus de sérine, thréonine avec un rendement de régénération assez médiocre. Nous pratiquons cette méthode de régénération suivant le protocole décrit par Jollès *et al.* [45] (HCl 6 N, 150°C, 24 h en présence de mercaptoéthanol à 1/2000 (v/v)). En plus, nous ajoutons 2 gouttes de phénol aqueux à 5 p. cent pour préserver la tyrosine. Nous avons comparé cette méthode de régénération par HCl avec celle qui utilise l'acide iodhydrique sur les peptides réticulés de Pélastine (Davril et Han, Travaux en cours de publication) et nous avons obtenu des rendements comparables. Dans le cas de la lysine, le rendement de régénération par HI est de 70 p. cent et celui par HCl est de 80-85 p. cent. Nous avons obtenu des résultats comparables à ceux de Rangarajan *et al.* [46].

b) *Régénération par la soude* (Africa et Carpenter, 47).

L'hydrolyse alcaline par la soude (NaOH 0,1 N, 120°C, 12 h) transforme le PTH-Thr en glycine et le PTH-Arg en ornithine. Les PTH-Ser et CysO<sub>3</sub> sont complètement détruits et le PTH-Trp est détruit partiellement.

Smithies *et al.* [48] préfèrent la régénération à partir des thiazolinone-amino-acides avant l'extraction ou la conversion en PTH-amino-acides. Ces auteurs utilisent une hydrolyse alcaline en présence de dithionite (0,1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> dans 0,2 N de NaOH à 127°C pendant 3 heures et demie). Les PTH-Ser, Cys, Cys(CM), Thr, Arg sont détruits mais les PTH-Met et Trp sont préservés.

c) *Régénération par l'acide iodhydrique*

HI 5 N, 140°C pendant 24 h [48, 49].

Cette méthode de régénération a été utilisée presque simultanément par Smithies *et al.* [48] et par Inglis *et al.* [49]. Au cours de l'hydrolyse acide, les PTH-Ser et Cys (CM) sont convertis en alanine, le PTH-Thr est transformé en acide alpha-amino-butyrique. Le PTH-Ile est transformé en *allo*-isoleucine et le PTH-Trp est détruit en donnant glycine et alanine.

Nous avons résumé le rendement de régénération d'après différents protocoles dans le tableau I.

IDENTIFICATION ET DOSAGE DES PTH-AMINO-ACIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

Pisano et Bronzert [50] ont mis au point plusieurs systèmes de séparation des PTH-amino-acides par chromatographie en phase gazeuse. Seul le PTH-Arg n'a pas pu être identifié par cette méthode.

TABLEAU I.  
Régénération des PTH-amino-acides par HCl, HI ou par la soude.

Acide aminé	Produit transformé au cours de régénération acide	HCl [Carpenter, 44]	HI [Smithies, 48]	NaOH [Carpenter, 47]
Asp		88	78	99
Asn		N.D.	89	88
Thr	2-amino-butyrique	1	78	64 (Gly)
Ser	alanine	1	97	1
Glu		81	87	66
Gln		N.D.	52	59
Pro		88	87	91
Gly		104	98	77
Ala		78	85	83
Cys (Cm)	alanine	—	60	5
Val		88	66	102
Met		N.D.	détruite	90
Ile	Allo-Ile + Ile	90	70	94
Leu		59	88	88
Tyr		76	81	96
Phe		86	76	103
His		N.D.	46	100
Trp	Glycine + alanine	N.D.	43	83
Lys		N.D.	78	81
Arg		N.D.	70 (Arg)	45 (Orn)

(Les chiffres indiquent le rendement après régénération).

Le dosage des PTH-amino-acides par chromatographie en phase gazeuse a été mis au point par ces auteurs [50] et Pisano *et al.* [51]. Elle permet de doser les PTH-dérivés de Ala, Gly, Val, Pro, Leu + Ile, Met, Phe, Tyr, Trp et ceux de Asn, Gln, His. Après triméthylsilylation, elle permet d'analyser les PTH dérivés de Cys(CM), CySO<sub>3</sub>, Ser, Thr, Asp, Gln, Glu et de Lys.

L'identification des PTH-Leu et PTH-Ile n'est pas très satisfaisante : en chromatographie en phase gazeuse, après silylation, le PTH-Ile se dédouble tandis que le PTH-Leu reste en un pic unique. Mais parfois, le PTH-Ile même silylé ne se dédouble pas. Il faut le régénérer en l'hydrolysant et le faire passer sur l'analyseur d'amino-acides (figure 5).

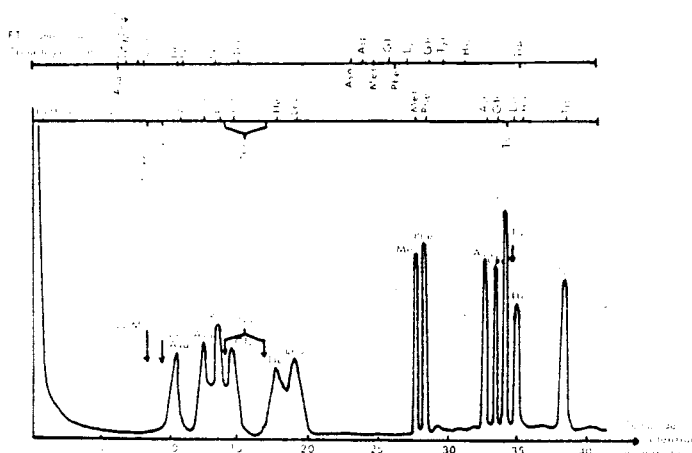


Fig. 5. -- Séparation des PTH-amino-acides par chromatographie en phase gazeuse d'après Pisano *et al.* [51].

Sur une colonne de CFC (121 × 0,2 cm) qui est mélangé à un volume égale de 7,33 p. cent de SP-400, 5,33 p. cent de OV-210 et 0,66 p. cent de OV-225.

1 µg de chaque PTH-Ala, Val, Pro, Gly, Ile, Leu et Tyr.

2 µg de chaque PTH-Asn, Gln, His et Trp.

0,5 µg de chaque PTH-Met et Phe.

(Débit d'hélium : 105 ml/min).

Les colonnes utilisées pour la chromatographie en phase gazeuse doivent être en verre, car les PTH-amino-acides sont détruits partiellement à chaud dans les colonnes métalliques. Les PTH-amino-acides possèdent différentes polarités dues à la chaîne latérale. Il est donc très difficile d'obtenir une bonne séparation des PTH-amino-acides en utilisant une seule colonne, à moins que l'on fasse au préalable une silylation par le BAS (N,O-bis-(triméthyl-silyl) acétamide). Généralement, on utilise deux phases stationnaires complémentaires : une seule phase constituée de silicone DC 560 employé pour identifier les PTH-amino-acides les plus volatils et les moins polaires, et une autre phase constituée de silicone XE-60 pour identifier les moins volatils et les plus polaires.

Pisano *et al.* [51] ont décrit un autre système en utilisant une phase stationnaire unique faite de silicone SP-100, OV-210 et OV-225. Un troisième système, ayant pour phase stationnaire le mélange

de silicone DC-560, XE-60 et OV-22 (DXO) a été employé pour identifier les PTH-amino-acides.

Eyen et Sjoquist [52] ont décrit la chromatographie en phase gazeuse (GC) avec une colonne en verre (4,5 m de long et 0,13 mm de diamètre). Leur méthode permet de séparer tous les PTH-amino-acides ou les méthyl-thio-hydantoïnes (MTH)-amino-acides.

Les méthodes de chromatographie en phase gazeuse décrites initialement en 1969 par Pisano *et al.* [50] sont très sensibles. Elles permettent d'analyser quantitativement les PTH-amino-acides en partant d'une mole. Toutefois, si l'on utilise une échelle de grande sensibilité, on peut descendre jusqu'à 0,2-0,5 nmole. Elles sont utilisées sur-

tout dans le calcul de rendement des PTH-amino-acides sortis d'un séquenceur automatique (voir plus loin).

IDENTIFICATION ET DOSAGE DES PTH-AMINO-ACIDES PAR LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE SOUS HAUTE PRESSION (HPLC).

La chromatographie en phase liquide sous haute pression (HPLC) est d'application récente. En effet, un adsorbant polaire, tel que la silice peut être considéré comme une phase stationnaire qui contient des sites d'adsorption à sa surface. Une compétition a lieu entre la phase liquide mobile et les PTH-amino-acides pour leur adsorption sur ces sites. L'utilisation de la silice pour la séparation des PTH-amino-acides est très efficace, car les dérivés des PTH-amino-acides non polaires sont élués les premiers. La haute performance de la colonne permet par exemple de séparer les PTH-Leu et Ile. Cependant, la sépara-

Dégradation récurrente d'EDMAN.

tion des PTH-CySO<sub>3</sub>, His, Arg, Asp, Glu exige des conditions d'éluion spéciales. Pour leur séparation il est nécessaire d'utiliser un adsorbant moins polaire que la phase mobile : la chromatographie en phase inversée. Dans ce cas, l'ordre d'éluion est inverse de celui de la silice. Le pouvoir d'éluion de la phase mobile croît en même temps que le solvant devient moins polaire.

polaires : Trp, Gly, Lys, Tyr, Thr, Ser, Asn, Gln. Parce que ces composés englobent une large étendue de polarités, un gradient d'éluion est nécessaire. Le troisième groupe est celui des dérivés fortement polaires : Glu, Asp, CySO<sub>3</sub>, His, Arg et leur séparation reste difficile.

Bridgen, Graffeo et Karger [53] ont réussi à séparer sur une seule colonne les 19 PTH-amino-

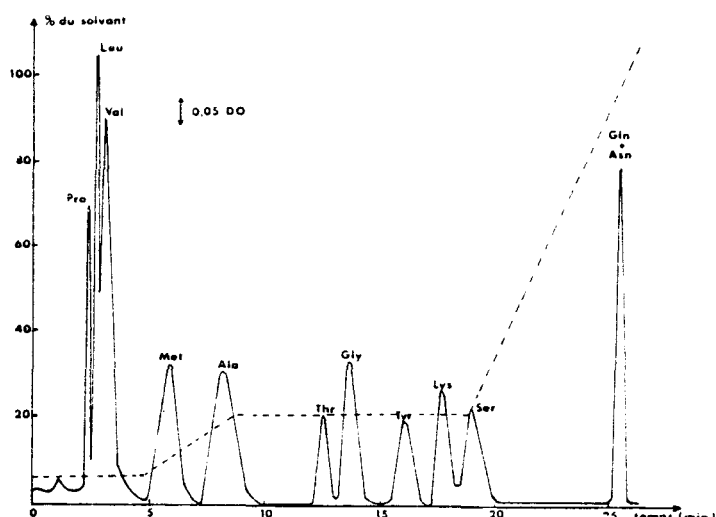


Fig. 6. — Séparation des PTH-amino acides par chromatographie en phase liquide sous haute pression d'après Bollet et Caude [54].

Séparation des PTH-Pro, Leu, Val, Met, Ala, Thr, Gly, Tyr, Lys, Ser et Gln + Asn par les éluants suivants : I, hexane, II, chlorure de méthylène-isopropanol (5:5). Débit 50 ml/h. 45-100 bars. La courbe en pointillés indique la polarité de l'éluant.

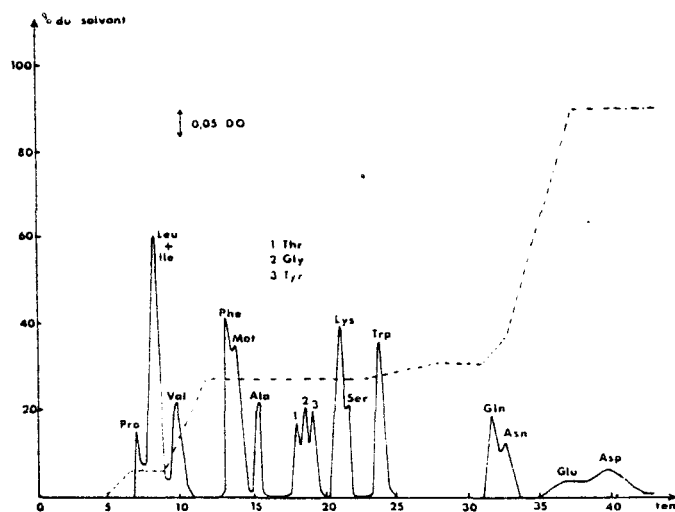


Fig. 7. — Séparation des PTH-amino acides par chromatographie en phase liquide sous haute pression d'après Bollet et Caude [54].

Colonne Micropak CN : (phase moyennement polaire alkylnitrile greffée sur silice poreuse 10 µm). Elution par les solvants suivants : I, hexane, II, chlorure de méthylène-isopropanol (5:5). Débit 50 ml/h. 45-100 bars.

La courbe en pointillés représente la polarité de l'éluant.

Les chiffres 1, 2 et 3 indiquent les emplacements des PTH-Thr, Gly et Tyr.

Pour envisager la séparation de l'ensemble des PTH-amino-acides, on peut distinguer trois groupes : premier groupe qui comprend les PTH non polaires Pro, Leu, Ile, Val, Phe, Met, Ala. Leur séparation exige des solvants lipophiles. Le deuxième groupe est celui des PTH relativement

acides sauf les PTH-CySO<sub>3</sub>, His, Arg en utilisant un gradient d'éluion sur colonne de 30 cm garnie de silice de 5 µm. Leur système de solvants est le suivant : Solvant A : 75 p. cent d'heptane/25 p. cent de chloroforme ; solvant B : isopropanol contenant 1 p. cent d'acide perchlorique



0,1 M-gradient concave 10 à 40 p. cent de solvant B, débit 1 ml/bn.

Bollet et Caude [54] ont récemment réussi à séparer les 17 PTH-amino-acides sur une seule colonne de Micropak CN (phase moyennement polaire : alkyl-nitrile greffé sur silice poreuse (10 µm), élution par mélange hexane-chlorure de méthylène-isopropanol. La séparation ne dure que 40 min environ (sensibilité de 0,1 nmole). (Voir figures 6 et 7 d'après Bollet et Caude [54].

VI - VARIANTES DE LA DEGRADATION D'EDMAN.

Toutes les méthodes de dégradation citées plus haut ont utilisé différents tampons de couplage, différents acides de clivage ou de conversion, mais le réactif de couplage est toujours le phényl-isothiocyanate. Ce dernier peut être remplacé par d'autres réactifs.

A -- Le méthylisothiocyanate [Laursen, 55 et Richards et al., 56].

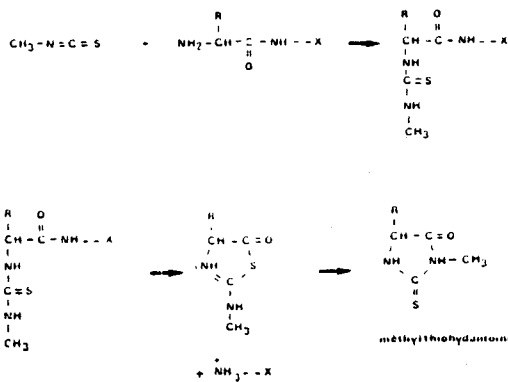


FIG. 8.

Les méthylthiohydantoïnes amino-acides sont plus volatils que les phénylthiohydantoïnes, donc plus faciles à identifier en chromatographie en phase gazeuse [Pisano, 51 ; Eyem, 52].

B -- Le naphthylisothiocyanate [Katsuki et al., 57].

Les naphthylthiohydantoïnes amino-acides ont une absorption plus importante en U.V. que les PTH-amino-acides et sont plus facilement repérables (fig. 9).

C -- Les dérivés du phénylisothiocyanate [Drobnica et Kristian, 58].

1) Le p-nitrophénylisothiocyanate.

Ce composé est plus « actif » que le phénylisothiocyanate en raison de la présence en para du groupement nitré : la réaction de couplage est plus rapide.

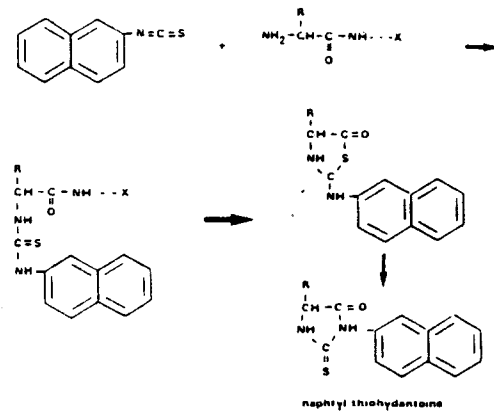


FIG. 9.

2) Le 4-diméthylamino-3,5-dinitrophénylisothiocyanate.

Reith et Waldron [59] ont mis au point une variante de la méthode de dégradation en utilisant un dérivé dinitré. Les thiohydantoïnes obtenues sont fortement colorées et leur localisation facile sur un chromatogramme.

D -- Le penta-fluorophénylisothiocyanate (PFPTC).

Ce réactif a été utilisé par Lequin et Niall [60] pour dégrader les peptides. Les PFPTC-amino-acides sont moins polaires que les PTH ou MTH-amino-acides sauf pour l'arginine ou Phistidine. Ils peuvent être identifiés par chromatographie en phase gazeuse. Ils sont plus volatils que les PTH-amino-acides et leur identification en lumière U.V. est beaucoup plus facile.

Toutes ces variantes des agents de couplage apportent plus ou moins d'avantages que le PITC initialement décrit par Edman. Mais les méthyl-TH-amino-acides sont très intéressants pour la chromatographie en phase gazeuse. Les p-naphthyl-TH-amino-acides n'amènent pas d'avantage majeur. Mais Braunitzer et al. (voir plus loin) ont utilisé des composés sulfonés de naphthyl-ITC qui peuvent se fixer sur le groupe epsilon-amino des résidus de lysine des peptides qui perdent leur propriété organophile. Ainsi, on peut éviter l'extraction de peptide au cours de la dégradation automatique.

VII - METHODES AUTOMATIQUES D'EDMAN.

Parmi les techniques utilisées par les chimistes des protéines certaines ont pu être automatisées, permettant chaque fois des progrès importants. C'est ainsi que l'on a vu naître l'autoanalyseur des acides aminés il y a une vingtaine d'années, les

synthétiseurs automatiques selon la méthode de Merrifield, il y a une dizaine d'années et également depuis 10 ans un troisième appareillage qui permet d'établir la structure primaire des protéines. Le principe de cet appareil est fondé sur la méthode classique d'Edman.

Il existe un séquenceur en phase liquide construit par Edman et Begg [22] et un séquenceur en phase solide construit par Laursen [61].

#### A - SÉQUENCEUR EN PHASE LIQUIDE.

Les appareils commerciaux (Beckman aux U.S.A., Jeolco au Japon et Ex-Socosi en France) possèdent un programmeur électronique qui contrôle les différentes étapes de la dégradation, ainsi que leur durée: le programme reflète fidèlement celui d'Edman [22] mais peut être adapté à chaque type de protéine. Nous avons [Han *et al.*, 62] déjà décrit en détail nos protocoles expérimentaux pour la dégradation d'Edman des protéines ou des polypeptides en fin d'année 1973. Nous ne décrivons que les modifications apportées récemment.

##### a) Programme et protocole pour les protéines ou les polypeptides

Pour le programme normal, le meilleur, ou l'un des meilleurs tampons de couplage reste le quadrol. Ce produit contient un peu d'aldéhyde. Il est peu volatil et n'est extrait que par un excès de lavage à l'acétate d'éthyle (28 à 32 ml d'acétate d'éthyle de lavage par cycle) si l'on utilise du quadrol 1 M. Il peut être remplacé par un tampon au diméthylaminopropyne qui ne contient pas d'aldéhyde [Braunitzer, 61; Brandt et Van Hold, 63]. Au cours d'utilisation de quadrol 1 M et au cours d'un long lavage à l'acétate d'éthyle, les peptides organophiles et les peptides courts sont extraits par l'acétate d'éthyle d'où leur perte. Ce phénomène représente un problème majeur par l'utilisation de quadrol (voir les programmes de peptides plus loin).

Les solvants et les réactifs sont tous « sequenal grade »; dans l'acétate d'éthyle, le benzène et surtout dans le chlorobutane, on ajoute 50-100 µl de butane-dithiol par litre [Niall, 65] pour mieux protéger le thiazolinone-amino-acide.

Ce dernier réactif est plus avantageux que le dithiothréitol qui risque de cristalliser et de boucher les canalisations du séquenceur.

Hermudsen *et al.* [66] recommandent l'utilisation du tampon diméthylbenzylamine (DMBA) pour remplacer le quadrol pour les protéines ou les polypeptides d'une longueur comprise entre 50 et 150 résidus. La quantité mise en œuvre est de

300 nmoles pour les protéines et de 500 nmoles pour les polypeptides. Avec cette quantité, on peut faire 30 à 50 cycles de dégradation. Cette quantité peut être considérablement réduite si l'on utilise du quadrol 0,1 M (quadrol: 50 ml, *n*-propanol: H<sub>2</sub>O - - 192:256, ajusté à pH 9 à l'aide d'acide trifluoroacétique).

En effet, Brauer, Margolies et Haber [67] ont décrit en détail l'utilisation de quadrol 0,1 M comme tampon de couplage. Ils utilisent le mélange de solvant benzène-acétate d'éthyle comme solvant de lavage. Le temps de lavage est également réduit, c'est-à-dire le volume de solvant réduit pour éviter les pertes de peptides résiduels. D'après ces auteurs, ils ont pu identifier 30 résidus N-terminaux à partir de 7 nmoles d'apomyoglobine. Avec seulement 3 nmoles d'apomyoglobine, ils ont pu identifier les 20 résidus N-terminaux. Cependant, l'un d'entre nous (Han et Michel Chrétien - travaux non publiés), au cours d'un séjour à Montréal n'a pu reproduire leur expérience avec 7 nmoles de protéines en utilisant le même modèle de Séquenceur (Beckman) et le même protocole.

Jacobs et Niall [68] ont décrit un protocole très sensible en utilisant un agent de couplage radioactif <sup>35</sup>S-PITC avec une modification mineure du programme du séquenceur. Ces auteurs identifient les PTH-amino-acides radioactifs à l'aide d'une chromatographie en couche mince bidimensionnelle (autoradiographie et scintillation liquide) à l'échelle de 10 à 100 picomoles à partir de 5 nmoles de protéine. On peut réaliser 15 cycles ou plus de dégradation avec cette méthode.

Récemment, Friedson, Hora et Wang [69] ont utilisé la diméthylallylamine (DMAA) seul solvant d'extraction pour réaliser 66 cycles pour une protéine et 40 cycles pour un peptide.

Edman *et al.* [70] ont montré que les résidus de proline sont incomplètement détachés au cours de la dégradation automatique sur séquenceur. Ces auteurs ont expliqué que la réaction de couplage est incomplète comme la réaction de clivage (ou les deux) au cours de la dégradation automatique. Ils ont précisé le mécanisme de la réaction.

##### b) Programme et protocole pour les peptides.

Ce protocole est surtout destiné à des peptides dont la longueur est inférieure à 100 résidus. Généralement, le programme du séquenceur pour les protéines est difficilement applicable aux peptides, car les peptides résiduels peuvent être extraits par les solvants organiques. Les expériences sur les peptides radioactifs ont montré que leur perte est provoquée par l'extraction par

le chlorobutane suivie d'un clivage acide (acide heptafluorobutyrique ou HFBA). Pour les peptides courts (peptides trypsiques par exemple) possédant un résidu de lysine en position C-terminale leur perte est encore plus accentuée par les lavages à l'acétate d'éthyle ou au benzène. Il faut donc réduire les temps de lavage et de clivage. Au lieu du double clivage par l'acide et de deux lavages au chlorobutane dans le programme de protéines, on n'utilise qu'un seul clivage et un seul lavage au chlorobutane. Le tampon Quadrol 0,1 M dilué par le mélange *n*-propanol-H<sub>2</sub>O à pH 9 peut être utilisé. L'avantage du *n*-propanol est de maintenir le PITC en une phase monophasique dans la solution de couplage contenant le peptide, le tampon et le PITC. Le lavage à l'acétate d'éthyle peut être réduit. Le remplacement de Quadrol, même à 0,1 M, par des tampons volatils tels que DMAA, DMBA et diméthylaminopropyne peut éviter le lavage par l'acétate d'éthyle. Le problème d'utilisation de ces tampons volatils réside dans la maintenance du pH de couplage au cours de la dégradation. Généralement, on effectue deux ou trois injections de tampon au cours de la réaction de couplage.

Beaucoup de méthodes ont été décrites dans la littérature pour la dégradation des peptides à l'aide d'un séquenceur automatique en phase liquide. Avec le séquenceur en phase solide de Laurson, ces problèmes sont presque tous résolus. Nous voulons d'abord rappeler les méthodes récentes sur la dégradation automatique en phase liquide (Phase solide : voir plus loin).

1) Procédé de Braunitzer et al.

Braunitzer, Schrank et Rufus [71, 72] ont apporté une autre solution au problème des peptides solubles dans les solvants organiques. Pour un peptide trypsique contenant la lysine en position C-terminale, qui devient plus extractible par le benzène et l'acétate d'éthyle du fait de la formation du groupement phénylthiocarbamylé en epsilon-NH<sub>2</sub>, ils greffent un réactif chimique hydrophile au niveau des groupements alpha et epsilon aminés. Ces réactifs sont des dérivés de 1-sulfo-phényl-isothiocyanate (SPITC) ou sulfonaphthyl-isothiocyanate. Les formules chimiques de ces réactifs sont présentées sur la figure 10. Cette méthode a été utilisée par Braunitzer et al. [72] et par Jollès et al. [45] pour des peptides contenant la lysine en position C-terminale avec un programme de quadrol pour des peptides assez longs et le programme de DMAA pour des peptides plus courts.

Inman, Hannon et Appella [73] ont utilisé le procédé de Braunitzer et al. [71] pour caractériser la séquence complète de 6 peptides trypsiques dont la longueur varie entre 5 et 26 résidus. Ces peptides trypsiques possèdent un résidu de lysine (ou S-AE-Cys) en position C-terminale qui ont été préalablement traités par le sulfo-phényl-isothiocyanate (SPITC). Ces auteurs ont démontré l'efficacité du procédé décrit par Braunitzer et al. [71] pour éviter la perte des peptides contenant la lysine au cours de la dégradation automatique en phase liquide.

Dwulet et Gurd [74] ont utilisé le 3-sulfo-phényl-isothiocyanate, le 3-SPITC, l'isomère du 4-SPITC comme agent de couplage du groupement epsilon NH<sub>2</sub> des peptides contenant la lysine en position C-terminale. Ils ont obtenu un rendement bien meilleur avec le 4-SPITC. La raison en est la suivante : l'isomère en *para*, le 4-SPITC a été utilisé pour rendre les peptides contenant la lysine en position C-terminale plus hydrophiles et moins solubles dans les solvants organiques au cours de la dégradation automatique. Mais le 4-SPITC réagit aussi bien avec le groupement alpha-NH<sub>2</sub> qu'avec le groupement epsilon-NH<sub>2</sub> de la lysine en position C-terminale. On utilise généralement le 4-SPITC pour la réaction initiale (1<sup>re</sup> étape) et le PITC pour les étapes suivantes.

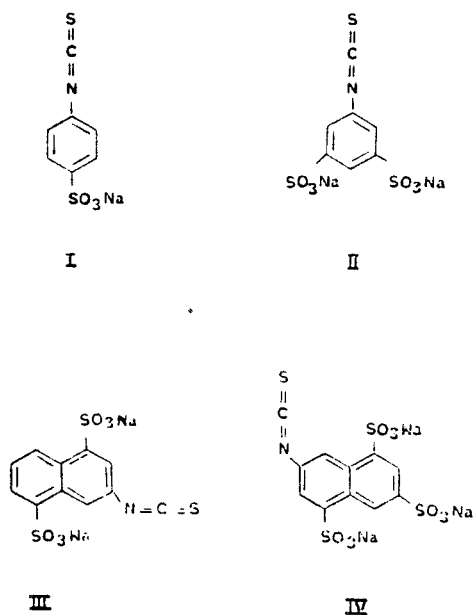


Fig. 10. Réactifs destinés à modifier la solubilité des peptides contenant la lysine en position C-terminale d'après Braunitzer et al. [71, 72].

- Réactif I : 4-sulfo-phényl-isothiocyanate, sel mono sodique.
- Réactif II : 3,5-disulfo-phényl-isothiocyanate, sel didique.
- Réactif III : 1,5-disulfo-naphtyl-3-isothiocyanate, sel disodique.
- Réactif IV : 3,5-trisulfo-naphtyl-7-iso thiocyanate, sel trisodique.

Le 4-SPITC possède un rendement de cyclisation dans l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) assez bas. Il en résulte un détachement incomplet du premier résidu de la séquence, ce qui peut rendre difficile l'identification des résidus suivants. L'isomère en méta le 3-SPITC permet d'éviter cet inconvénient. Ainsi, le dernier résidu d'un peptidase trypsique (lys en position C-terminale) peut-il être régénéré en lysine libre d'une manière plus satisfaisante.

2) Programme Quadrol 0,1 M.

Crewther et Inglis [75] ont utilisé le programme Quadrol 0,75 M (au lieu de 1 M) et 0,08 M respectivement pour des peptides dont la longueur varie entre 3 et 29 résidus. Leur modification du programme d'Edman consiste à utiliser le tampon Quadrol 0,18 M. Ils additionnent le tampon, avant l'injection de PITC, et remplacent l'extraction à l'acétate d'éthyle par une extraction au chlorobutane et pratiquent un seul clivage au lieu de deux. La première extraction par le chlorobutane est séchée sous vide. Ensuite, ils pratiquent le clivage et l'extraction de la thiazolinone par le chlorobutane. D'après ces auteurs, ce programme permet de précipiter le peptide résiduel et d'éliminer complètement le HFBA.

Les cystéines des peptides peuvent être modifiées en S-sulfo-éthyl-cystéine par le sel de sodium du 2-bromo-éthane-sulfonate et soumise ensuite au séquenceur en utilisant le programme avec le Quadrol 0,1 M. Ce procédé a été utilisé par Nikètic *et al.* [76] pour l'étude des séquences des chaînes A et B de l'insuline.

3) Modification à l'aide de carbodiimide.

Foster, Bruenger *et al.* [77] ont utilisé un autre moyen de modifier les propriétés physiques des peptides qui consiste à greffer un composé hydrophile au niveau du résidu C-terminal. L'acide 2-amino-naphtalène-1,5-disulfonique est fixé par l'intermédiaire d'une carbodiimide. Si la réaction est réalisée à pH 4 en présence d'HI 0,01 N, il n'est pas nécessaire de bloquer au préalable les groupements alpha-aminés libres de la chaîne peptidique dont le pK est environ de 9,5. Le groupement carboxylique des chaînes latérales des acides dicarboxyliques réagit de la même façon que celui du résidu C-terminal du peptide. Les acides dicarboxyliques (Glu et (ou) Asp) peuvent être identifiés après une hydrolyse totale acide de la phase aqueuse ou par déduction à partir de la composition en acides aminés du peptide. La technique est simple et l'addition d'un composé naphthalénique a en plus l'avantage d'augmenter la qualité du film formé par le peptide dans la coupe du séquenceur.

4) Modification d'un agent protecteur du peptide à dégrader.

Comme nous l'avons rappelé plus haut, la quasi-totalité des peptides relativement courts sont extraits par des solvants organiques au cours de la dégradation automatique en phase liquide. Différents auteurs ont eu l'idée d'utiliser un agent « protecteur » pour éviter l'extraction. Cet agent doit cependant être « inerte » vis-à-vis de la dégradation d'Edman afin qu'il ne gêne pas l'identification des PTH-amino-acides provenant du peptide à étudier.

Nous avons rassemblé dans le tableau II les différents agents protecteurs proposés.

A moins que l'on utilise comme agent de couplage le <sup>35</sup>S-PITC radioactif, la quantité de peptide utilisée au départ est de l'ordre de 100 nmoles, même en présence d'entraîneur ou d'agent protecteur. Avec le programme de tampon DMBA (Bonicel *et al.*, 84) on peut déterminer la séquence complète d'un décapeptide en partant de 100 nmoles. D'après ces auteurs, pour un autre peptide, le rendement à la 5<sup>e</sup> étape (Val-5) est de 10 p. cent sans agent protecteur contre 61,5 p. cent en présence d'agent protecteur.

TABEAU II.

Agent protecteur	Auteurs et références
Polyornithine-succinylé	Silver et Hood [78]
Copolymère norleucine-arginine	Niall <i>et al.</i> [79]
Polyornithine-sulfonylé	Waterfield et Bridgen [80]
Apomyoglobine succinylée	Kopeyan <i>et al.</i> [81]
Lysozyme modifié	Frank et Zuber [82]
Parvalbumine	Rochat <i>et al.</i> [83]
Cytochrome c	Bonicel <i>et al.</i> [84]

L'utilisation comme agent protecteur de la parvalbumine est efficace (Rochat et Kopeyan, communication personnelle et référence 83 pour l'étude d'un peptide sur un séquenceur automatique en phase liquide). Cette protéine est en effet très soluble dans l'eau ou dans d'autres solvants aqueux (acide dilué, etc.). Cette méthode est, de plus, rapide (75-90 mn par cycle), ce qui évite la modification préalable des peptides comme dans le procédé de Braunitzer et élimine la fixation du peptide sur résine en vue de la dégradation sur le séquenceur en phase solide (voir plus loin). Une quantité initiale de 100 moles de peptide est raisonnable si l'on veut identifier le PTH-amino-acide par plusieurs méthodes simultanément.

## B — SÉQUENCEUR EN PHASE SOLIDE.

Pour éviter la perte du peptide résiduel au cours des extractions par les solvants organiques, Laursen [61] a construit un séquenceur en phase solide dont le principe est de fixer covalentiellement le peptide par son résidu C-terminal sur une résine avant de réaliser la dégradation classique. Ainsi, les multiples lavages et extractions par les solvants organiques sont pratiqués sans perte de peptide.

Cet appareil était initialement destiné à l'étude des peptides relativement courts. Mais depuis 1971, des progrès considérables ont été réalisés.

Nous avons rassemblé dans le tableau III les différents supports utilisés pour fixer des peptides ou des polypeptides.

Le problème essentiel de la dégradation en phase solide est celui de la fixation des peptides sur résine ou sur les supports insolubles. Mais, malheureusement, il n'existe pas encore de méthodes universelles qui permettent de fixer tous les peptides. Cependant, en utilisant plusieurs méthodes, la plupart des peptides peuvent être fixés sur un support insoluble. L'idéal serait de fixer le peptide par son extrémité C-terminale. Mais il existe des groupements carboxyliques des chaînes latérales des peptides et il n'est pas facile de les bloquer sélectivement sans toucher le groupement carboxylique en position C-terminale. Il faut plusieurs méthodes pour résoudre le problème.

a) *Peptides tryptiques contenant la lysine ou de la S-AE cystéine en position C-terminale.*

Ces peptides peuvent être couplés sur l'aminostyrène par leur groupement epsilon-NH<sub>2</sub>. Le peptide doit être d'abord traité par un excès de

*p*-phénylène-diisothiocyanate (DITC). Ensuite, on ajoute l'aminostyrène. Après le traitement acide, la réaction de clivage a lieu et la première liaison peptidique est rompue. Le premier résidu est attaché sur la résine et le peptide résiduel peut être dégradé normalement. La nature du premier résidu peut être établie soit par différence à partir de la composition en acides aminés ou par dansylation du peptide initial. Le résidu C-terminal (lysine ou S-AE-cystéine) est également fixé sur la résine.

Pour des peptides tryptiques possédant un résidu d'arginine en position C-terminale, il faut transformer l'arginine en ornithine par hydrazinolyse partielle (50 p. cent d'hydrazine, 75°C pendant 15 mn) [Morris *et al.*, 91]. Mais des réactions secondaires ont eu lieu notamment sur l'asparagine. On peut cependant déterminer la séquence des peptides de taille de 10 résidus environ. La méthode de fixation à l'aide du DITC a un rendement relativement bon (80 p. cent environ) et est efficace pour les peptides tryptiques.

b) *Peptides provenant de la coupure chimique au BrCN et possédant un résidu d'homosérine sous forme lactone en position C-terminale.*

Pour les peptides provenant de la coupure chimique à l'aide du bromure de cyanogène (BrCN) au niveau des liaisons méthionyl des protéines, Horn et Laursen [86] ont réussi à les fixer par leur extrémité C-terminale (Hse ou Hse lactone) sur une résine possédant un groupement aminé. Ces auteurs ont converti d'abord l'homosérine (Hse) en homosérine lactone par un traitement à l'acide trifluoroacétique. Ensuite, ils ajoutent la TETA-résine en présence de triéthylamine. La fixation est efficace avec un bon rendement. Cette technique peut être appliquée à des polypeptides

TABLEAU III.

Support	Groupement fonctionnel	Méthode d'attache et utilisation	Références
Aminopolystyrène	-NH <sub>2</sub>	DITC (petits peptides)	Laursen <i>et al.</i> [85]
Triéthyltétraminostyrène ou TETA-résine	NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	Homosérine (petits peptides après coupure par le BrCN)	Horn <i>et al.</i> [86]
3-aminopropyl sur billes de verre poreux	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	DITC (protéines, polypeptides)	Wachter <i>et al.</i> [87]
N-(2-aminoéthyl)-3 aminopropyl-verre poreux	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	DITC ou homosérine (protéines, polypeptides)	Bridgen <i>et al.</i> [88]
β-alanylhexaméthylène-diaminopolydiméthyl acrylamide	-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -NHCO-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	DITC (peptides et protéines)	Atherton <i>et al.</i> [89]
N-aminoéthyl-polyacrylamide	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	DITC (protéines)	Cavadore <i>et al.</i> [90]



sidu par 20 µl d'acétate d'éthyle et on identifie les PTH-amino-acides par chromatographie en couche mince ou par chromatographie en phase gazeuse. L'acétate d'éthyle est conservé sur acide ascorbique (1 g/l) et HCl N/1 contient 300 µl d'éthylmercaptan par litre.

La phase aqueuse obtenue après extraction à l'acétate d'éthyle est conservée pour identifier éventuellement les PTH-amino-acides hydrosolubles : si l'extrait « acétate d'éthyle » ne contient aucun PTH identifiable par TLC ou GC ou encore HPLC, la phase aqueuse est séchée sous vide et reprise par un minimum du mélange éthanol-H<sub>2</sub>O (1/1), déposée sur une feuille de 20 × 40 cm de papier Whatman n° 3 puis soumise à une électrophorèse à pH 3,9 (tampon pyridine-acide acétique-H<sub>2</sub>O ; 30:100:1870). Le PTH-CySO<sub>3</sub> est séparé du couple formé par les PTH-His et PTH-Arg. La révélation est réalisée par trempage dans une solution de ninhydrine à 1 p. cent dans l'acétone pour distinguer PTH-CySO<sub>3</sub>. On décolore l'électrophorégramme par le mélange HCl-acétone (1:4, v/v), on le sèche et on révèle les PTH-His et Arg par les réactions spécifiques. On peut également identifier les PTH-His et Arg par la TLC ou par HPLC. On peut également régénérer les acides aminés à partir des PTH-amino-acides. Les acides aminés sont identifiés sur l'autoanalyseur. Les méthodes d'identification et de dosage des PTH-amino-acides sont identiques à celles citées dans la dégradation manuelle (voir plus haut).

#### VIII - CONCLUSION GENERALE.

La chimie des protéines a fait des progrès considérables au cours de ces 25 dernières années et le fait marquant a été la mise au point par Edman de la méthode de dégradation récurrente des peptides et protéines.

Cette méthode fait d'ailleurs l'objet de perfectionnements constants. Ainsi, en 1950, à partir de 1 µmole d'un oligopeptide, on identifiait par dégradation manuelle les 3 ou 4 résidus N-terminaux, alors qu'actuellement la structure complète d'un polypeptide d'une vingtaine de résidus peut être facilement établie.

L'apparition du séquenceur automatique d'Edman et Begg en 1967 a transformé les données acquises par la dégradation manuelle. Il y a 27 ans on faisait manuellement 2 cycles de dégradation par jour et aujourd'hui on peut en faire 6 ou 7. Actuellement, la performance d'un séquenceur oscille autour de 15 à 20 cycles par 24 h., la quantité de peptide et de protéine étant par ailleurs de plus en plus réduite.

L'utilisation de l'agent de couplage radioactif <sup>35</sup>S-PTC préconisée par Niall et l'identification des PTH-amino-acides radioactifs permet encore de diminuer la quantité de substrat nécessaire.

Enfin, la mise au point par Laursen en 1971 d'un séquenceur en phase solide a résolu l'un des problèmes majeurs de la dégradation séquentielle, à savoir la perte de peptide résiduel au cours des cycles successifs. On peut actuellement, à partir de 100 picomoles de protéines déterminer en 2 jours les 30 résidus N-terminaux (Bridgen).

Cependant, les techniques automatiques sont extrêmement onéreuses et nécessitent une infrastructure complémentaire pour l'identification des PTH-amino-acides : appareil de chromatographie en phase gazeuse, chromatographie liquide de haute pression, autoanalyseur d'amino-acides et éventuellement scintillation liquide pour identifier les PTH-amino-acides radioactifs.

Pour des raisons financières évidentes, on conçoit que seuls des laboratoires importants puissent s'équiper d'un tel appareillage.

La détermination de la structure primaire d'une protéine reste néanmoins délicate, car chaque protéine constitue en effet un cas particulier.

Les chimistes des protéines doivent donc persévérer dans la voie tracée par Pehr Edman et continuer à étudier la structure primaire des protéines de plus en plus complexes. Ce travail doit se faire en collaboration très étroite avec les physico-chimistes qui peuvent aborder, eux, les structures secondaire, tertiaire et quaternaire. Tous leurs efforts sont complémentaires et doivent aboutir à une meilleure connaissance des structures des macro-molécules biologiques, car il est incontestable que la Biologie moléculaire doit associer les aspects « statistiques » et « dynamiques » de nos connaissances.

#### RÉSUMÉ.

Depuis la première publication d'Edman en 1950 sur la dégradation récurrente, des progrès considérables ont été réalisés dans ce domaine. Nous avons passé en revue l'évolution de la dégradation manuelle. Nous avons pris deux méthodes manuelles comme exemples : l'une semi-microméthode et l'autre, une microméthode. Le couplage dit « Dansyl-Edman » décrit par Hartley en 1963 ouvre une nouvelle voie de la détermination des acides aminés N-terminaux des peptides. Ensuite, nous avons décrit des différentes méthodes d'identification des PTH-amino-acides : la chromatographie sur papier ou sur couche mince. Leur révélation, la régénération des PTH-amino-acides en acides aminés ; dosage et identification des PTH-amino-acides par la chromatographie en phase gazeuse ; dosage et identification des PTH-amino-acides par la chromatographie en phase liquide sous haute pression ; les variantes de la dégradation d'Edman.

## Dégradation récurrente d'EDMAN.

575

L'apparition du « Sequenator » d'Edman en 1967 en phase liquide, a accéléré l'évolution de cette méthode. En plus l'apparition du Sequenator en phase solide de Laursen en 1971 a complété le Sequenator en phase liquide. Le Sequenator en phase solide est utilisé pour des peptides ou polypeptides tandis que le Sequenator en phase liquide trouve sa pleine utilisation dans la détermination des séquences N-terminales des protéines.

## BIBLIOGRAPHIE.

1. Conden, R., Gordon, A. H., Martin, A. J. & Syngé, R. L. (1947) *Biochem. J.*, **41**, 596-607.
2. Bergmann, M., Mickleley, A. & Kann, E. (1927) *Ann.*, **458**, 40-56.
3. Abderhalden, E. & Brockman, H. (1930) *Biochem. Z.*, **225**, 386.
4. Jensen, H. & Evans, E. A. (1935) *J. Biol. Chem.*, **108**, 1-10.
5. Edman, P. (1950) *Acta Chem. Scand.*, **4**, 277-281.
6. Edman, P. (1950) *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283-293.
7. Edman, P. (1953) *Acta Chem. Scand.*, **7**, 700-701.
8. Edman, P. (1956) *Acta Chem. Scand.*, **10**, 761-768.
9. Fraenkel-Conrat, H., Harris, J. I. & Levy, A. L. (1955) *Methods of Biochemical Analysis*, **2**, 359-425.
10. Margoliash, E. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 2161-2174.
11. Konigsberg, W. & Hill, R. J. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 2547-2561.
12. Travis, J. & Liener, I. E. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 1967-1973.
13. Doppeide, T. A. A., Moore, S. & Stein, W. H. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1833-1837.
14. Elzinga, M., Lai, G. Y. & Hirs, C. H. W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 353-360.
15. Elzinga, M. & Hirs, C. H. W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 361-367.
16. DeLange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L. & Bonnet, J. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 319-334.
17. Greene, L. J. & Giordano, J. S. Jr. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 285-298.
18. Wu, T. C., Crumm, C. & Saffran, M. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 6043-6063.
19. Niall, H. D. & Edman, P. (1962) *J. Gen. Physiol.*, **45**, 185-190.
20. Peterson, J. D., Nehrlisch, S., Oyer, P. E. & Steiner, D. F. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4866-4871.
21. Kopeyan, C. & Rochat, H. (1972) Communication personnelle.
22. Edman, P. & Begg, G. (1967) *Europ. J. Biochem.*, **1**, 80-91.
23. Tarr, G. E. (1975) *Anal. Biochem.*, **63**, 361-370.
24. Kulbe, K. D. (1974) *Anal. Biochem.*, **59**, 564-573.
25. Sanger, F. (1945) *Biochem. J.*, **39**, 507-515.
26. Gray, W. R. & Hartley, B. S. (1963) *Biochem. J.*, **89**, 379-380.
27. Gros, G. & Labouesse, B. (1969) *Europ. J. Biochem.*, **7**, 463-470.
28. Hartley, B. S. (1970) *Biochem. J.*, **119**, 805-822.
29. Bruton, J. & Hartley, B. S. (1970) *J. Mol. Biol.*, **52**, 165-178.
30. Forcina, B. G. & Perham, R. N. (1971) *FEBS Letters*, **18**, 59-63.
31. Chen, R. (1976) *Z. Physiol. Chem.*, **357**, 873-886.
32. Dautrevaux, M., Han, K., Boulanger, Y. & Biserte, G. (1967) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 1409-1410.
33. Tetaert, D., Han, K., Dautrevaux, M., Ducastaing, S., Hombrados, I. & Neuzil, E. (1973) *FEBS Letters*, **29**, 38-42.
34. Sjoquist, J. (1953) *Acta Chem. Scand.*, **7**, 337-340.
35. Edman, P. & Sjoquist, J. (1956) *Acta Chem. Scand.*, **10**, 1507-1509.
36. Han, K., Planchon, B., Dautrevaux, M. & Biserte, G. (1973) *Ann. Pharm. Franc.*, **31**, 539-550.
37. Inagami, T. & Murakami, K. (1972) *Anal. Biochem.*, **47**, 501-504.
38. Smith, G. F. & Murray, M. (1968) *Anal. Biochem.*, **23**, 183-195.
39. Cohen-Solal, M. & Bernard, J. L. (1973) *J. Chromatog.*, **80**, 140-143.
40. Roseau, E. & Pantel, P. (1969) *J. Chromatog.*, **44**, 392-395.
41. Inglis, A. S., Nicholls, P. W. & Sparrow, L. G. (1974) *J. Chromatog.*, **90**, 362-364.
42. Yamada, S. & Iiano, H. A. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 538-540.
43. Needleman, S. B. (1975) *Protein Sequence Determination*, Springer Verlag (Editor), p. 245.
44. Van Orden, H. O. & Carpenter, F. H. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **14**, 399-403.
45. Jollès, J., Schoentgen, F., Hermann, J., Alais, C. & Jollès, P. (1974) *Europ. J. Biochem.*, **46**, 127-132.
46. Rangarajan, M. & Darbre, A. (1975) *Biochem. J.*, **147**, 435-438.
47. Africa, B. & Carpenter, F. H. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 113-119.
48. Smithies, O., Gibson, D., Fanning, E. M., Goodflesh, R. M., Gilman, J. G. & Ballantyne, D. L. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4912-4921.
49. Inglis, A. S., Nicholls, P. W. & Roxburgh, C. M. (1971) *Austr. J. Biol. Sci.*, **24**, 1247-1250.
50. Pisano, J. J. & Bronzert, T. J. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 5597-5607.
51. Pisano, J. J., Bronzert, T. J. & Brewer, H. B., Jr. (1972) *Anal. Biochem.*, **45**, 43-59.
52. Eyem, J. & Sjoquist, J. (1973) *Anal. Biochem.*, **52**, 255-271.
53. Bridgen, J., Graffeo, A. P. & Karger, B. L. (1977) Travaux non publiés.
54. Bollet, C. & Caude, M. (1976) *J. Chromatog.*, **121**, 323-328.
55. Laursen, R. A. (1966) *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5344-5346.
56. Richards, F. F., Barnes, W. T., Lovins, R. E., Salomone, R. & Waterfield, M. D. (1969) *Nature*, **221**, 1241-1244.
57. Katsuki, S., Scott, I. E. & Yamashima, J. (1965) *Biochem. J.*, **97**, 25c.
58. Kristian, P. & Drobnica, L. (1966) *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, **31**, 1333.
59. Reith, W. S. & Waldron, N. M. (1954) *Biochem. J.*, **56**, 116-120.
60. Lequin, R. M. & Niall, H. D. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 76-82.
61. Laursen, R. A. (1971) *Europ. J. Biochem.*, **20**, 89-102.
62. Han, K., Planchon, B., Dautrevaux, M. & Biserte, G. (1973) *Ann. Pharm. Franc.*, **31**, 623-632.
63. Brandt, W. F. & Van Holt, C. (1972) *FEBS Letters*, **23**, 357-360.
64. Braunitzer, G. & Schrank, B. (1970) *Z. Physiol. Chem.*, **351**, 417-418.
65. Niall, H. D. (1973) *Methods in Enzymology*, **27** part D, p. 942. Acad. Press, U.S.A.
66. Hermodsen, M. A., Ericsson, L. H., Titani, K., Neurath, H. & Walsh, K. A. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4493-4502.
67. Brauer, A. W., Margolies, M. N. & Haber, E. (1975) *Biochemistry*, **14**, 3029-3035.
68. Jacobs, J. W. & Niall, H. D. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 3629-3636.
69. Friedenson, B., Hora, J. & Wang, L. S. (1976) *Biochemistry*, **15**, 4876-4880.
70. Brandt, W. F., Edman, P., Henschen, A. & Von Holt, C. (1976) *Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1505-1508.
71. Braunitzer, G., Schrank, B. & Ruhfus, A. (1970) *Z. Physiol. Chem.*, **351**, 1589-1590.
72. Braunitzer, G., Schrank, B., Petersen, S. & Petersen, U. (1973) *Z. Physiol. Chem.*, **354**, 1563-1566.
73. Inman, J. K., Hannon, J. E. & Appella, E. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 2075-2081.
74. Dwulet, F. E. & Gurd, F. R. N. (1976) *Anal. Biochem.*, **76**, 530-538.
75. Crewther, W. G. & Inglis, A. S. (1975) *Anal. Biochem.*, **68**, 572-585.
76. Nketic, V., Thomsen, J. & Kristiansen, K. (1974) *Europ. J. Biochem.*, **46**, 547-551.



77. Foster, J. A., Bruenger, E., Hu, C. C., Albertson, K. & Franzblau, C. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 70-74.
78. Silver, J. & Hood, L. E. (1974) *Anal. Biochem.*, **60**, 285-292.
79. Niall, H. D., Jacobs, J. W., Van Rietschoten, J. & Tregear, G. W. (1974) *FEBS Letters*, **41**, 62-63.
80. Waterfield, M. D. & Bridgen, J. (1975) *Instrumentation in Amino acid sequence analysis*, Perham, R. H., Editor, Acad. Press, London - U.S.A.
81. Kopeyan, C., Miranda, F. & Rochat, H. (1975) *Europ. J. Biochem.*, **58**, 117-122.
82. Frank, G. & Zuber, H. (1976) *Z. Physiol. Chem.*, **357**, 585-592.
83. Rochat, H., Bechis, G., Kopeyan, C., Gregoire, J. & Van Rietschoten, J. (1976) *FEBS Letters*, **64**, 404-408.
84. Bonicel, J., Bruschi, M., Couchoud, P. & Bovier-Lapierre, G. (1977) *Biochimie*, **59**, 111-113.
85. Laursen, R. A., Horn, M. J. & Bonner, A. G. (1972) *FEBS Letters*, **21**, 67-70.
86. Horn, M. J. & Laursen, R. A. (1973) *FEBS Letters*, **36**, 285-288.
87. Wachter, E., Machleidt, W., Hofner, H. & Otto, J. (1973) *FEBS Letters*, **35**, 97-102.
88. Bridgen, J. (1975) *FEBS Letters*, **50**, 159-162.
89. Atherton, E., Bridgen, J. & Sheppard, R. G. (1976) *FEBS Letters*, **64**, 173-175.
90. Cavadore, J. C., Derancourt, J. & Previero, A. (1976) *FEBS Letters*, **66**, 155-157.
91. Morris, H. R., Dickinson, R. J. & Williams, D. H. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 247-255.
92. Previero, A., Derancourt, J., Colelli-Previero, M. A. & Laursen, R. A. (1973) *FEBS Letters*, **33**, 135-138.
93. Mech, C., Jeschkeit, H. & Schellenberger, A. (1976) *Europ. J. Biochem.*, **66**, 133-138.
94. Bridgen, J. (1976) *Biochemistry*, **15**, 3600-3604.
95. Bridgen, J. (1976) *Methods in Enzymology* (in press) Acad. Press, N. Y. (U.S.A.).
96. Bridgen, J., Snary, D., Crompton, M. J., Barnstaple, C., Goodfellow, P. & Bodmer, W. F. (1976) *Nature*, **261**, 200-205.

## D I S C U S S I O N

-----

Notre principal souci, au cours de ce travail, a été la miniaturisation des différentes techniques employées.

Aussi, en ce qui concerne la dégradation d'EDMAN manuelle, avons nous principalement utilisé la microméthode d'après le protocole de TARR, particulièrement bien adaptée aux petits peptides que nous devons analyser dont la taille ne dépassait pas 30 résidus d'acides-amino.

Nous avons peu utilisé le couplage dansyl-EDMAN qui, bien que très sensible, nous semble trop lent : pour un peptide donné il est en effet possible, en une journée, d'identifier 4 à 6 résidus d'acides-amino par la méthode de TARR contre un seul par la méthode de dansyl-EDMAN.

Dans l'espoir de réduire encore les quantités de peptide nécessaires à la dégradation d'EDMAN nous avons essayé de mettre au point une technique utilisant le PITC-S<sup>35</sup> et d'identifier les PTH-acides-amino marqués par autoradiographie après chromatographie sur couche mince de silicagel.

Malheureusement, la qualité médiocre des résultats obtenus due à l'abondance de produits de décomposition du PITC-S<sup>35</sup>, ne nous a pas permis d'obtenir des résultats probants susceptibles d'être appliqués aux peptides de l'arginine kinase.

L'identification des PTH-acides-amino est toujours très délicate et l'expérience a montré que plusieurs méthodes d'identification étaient souvent indispensables afin d'obtenir des résultats

non ambigus.

Avant de disposer d'un appareil de chromatographie liquide à haute pression, nous utilisions pour identifier les PTH-amino-acides provenant de dégradations manuelles, la chromatographie sur couche mince selon KULBE ou COHEN-SOLAL et la régénération en amino-acide par l'acide iodhydrique.

Pour les séries de PTH-amino-acides provenant de la dégradation automatique nous utilisions principalement la chromatographie sur couche mince de silicagel dans différents systèmes solvants.

Les résultats, parfois difficiles à interpréter, de la chromatographie sur couche mince sont désormais confirmés ou infirmés par la chromatographie liquide à haute pression.

En ce qui concerne la miniaturisation des techniques que nous avons utilisées, nous pouvons également mentionner qu'au début de nos travaux nous contrôlions la pureté et l'homogénéité de nos peptides par électrochromatographie sur papier. Or l'électrochromatographie sur couche mince de cellulose a considérablement réduit les quantités de substrat requises, à tel point que nous pouvons maintenant expérimenter une coupure enzymatique sur 20 nanomoles de peptide et séparer de cette façon les fragments obtenus.

# **DEUXIEME PARTIE**

STRATÉGIE D'ÉTUDE DE LA STRUCTURE

COVALENTE DE L'ARGININE KINASE.

RÉSULTATS

## INTRODUCTION

-----

L'arginine kinase comporte 8 résidus de méthionine dont un en position C-terminale ce qui devrait nous permettre d'isoler 8 fragments peptidiques lors de la coupure chimique par le BrCN.

Nous avons utilisé le protocole mis au point par HAN et al (62) pour la myoglobine de Cheval.

Au cours de la réaction chimique la méthionine est transformée en homosérine. Dans le cas où la méthionine est suivie d'un résidu de thréonine ou de sérine nous verrons que la coupure est incomplète.

# CHAPITRE I

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES FRAGMENTS  
OBTENUS PAR HYDROLYSE DE L'ARGININE KINASE  
PAR LE BROMURE DE CYANOGENÈNE.

Les indications fournies par la composition en acides aminés ont déterminé la stratégie que nous avons utilisée lors de l'étude de la structure primaire de l'arginine kinase.

- L'arginine kinase est une molécule monocaténaire comportant 4 ou 5 résidus de cystéine et ne présentant pas de pont disulfure.

Afin d'éviter l'oxydation des résidus de cystéine et la formation éventuelle de ponts disulfure au cours des diverses manipulations, il a fallu envisager l'utilisation de méthodes de blocage des groupes SH libres.

Par ailleurs, il est nécessaire que l'alkylation donne, par la suite, des fractions peptidiques solubles, sinon dans l'eau, tout au moins dans des solutions de faible force ionique.

Il nous a semblé que l'aminoéthylation était, dans ce cas, une technique très adéquate.

- De plus, il ressort de l'examen de la composition en amino-acides que la protéine (P. M. 38 500) contient 28 résidus de lysine et 16 résidus d'arginine d'une part, 10 résidus de tyrosine, 18 résidus de phénylalanine et 31 résidus de leucine d'autre part : le nombre de peptides qui se formeraient lors d'un clivage de l'enzyme par une protéase telle que la trypsine ou la chymotrypsine serait alors important et nous avons dû renoncer à l'éventualité du fractionnement de mélanges peptidiques aussi complexes.

- Par contre la présence de 8 résidus de méthionine est tout à fait intéressante et a orienté notre choix vers l'hydrolyse sélective des liaisons méthionyle par le bromure de cyanogène.

D'après GROSS et WITKOP (59), le mécanisme de clivage des liaisons méthionyle est le suivant : il se forme initialement un bromure de cyanosulfonium qui, en milieu acide, se scinde en méthyl-thiocyanate et bromhydrate d'iminolactone d'homosérine ;

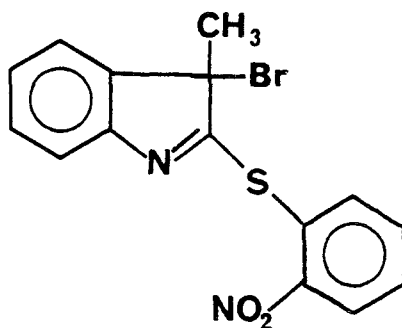
celui-ci se décompose spontanément en libérant d'une part la lactone de l'homosérine et d'autre part un fragment peptidique ayant en position N-terminale l'acide aminé dont le groupe  $\text{NH}_2$  était primitivement uni au COOH de la méthionine (Fig. 4).

Dans le cas où la liaison méthionyle est suivie d'un résidu de thréonine ou de sérine, la coupure est incomplète (Fig. 5) (60).

C'est la raison pour laquelle on essaie de remédier à cet inconvénient en effectuant la réaction en solution aqueuse d'acide formique à 70 %.

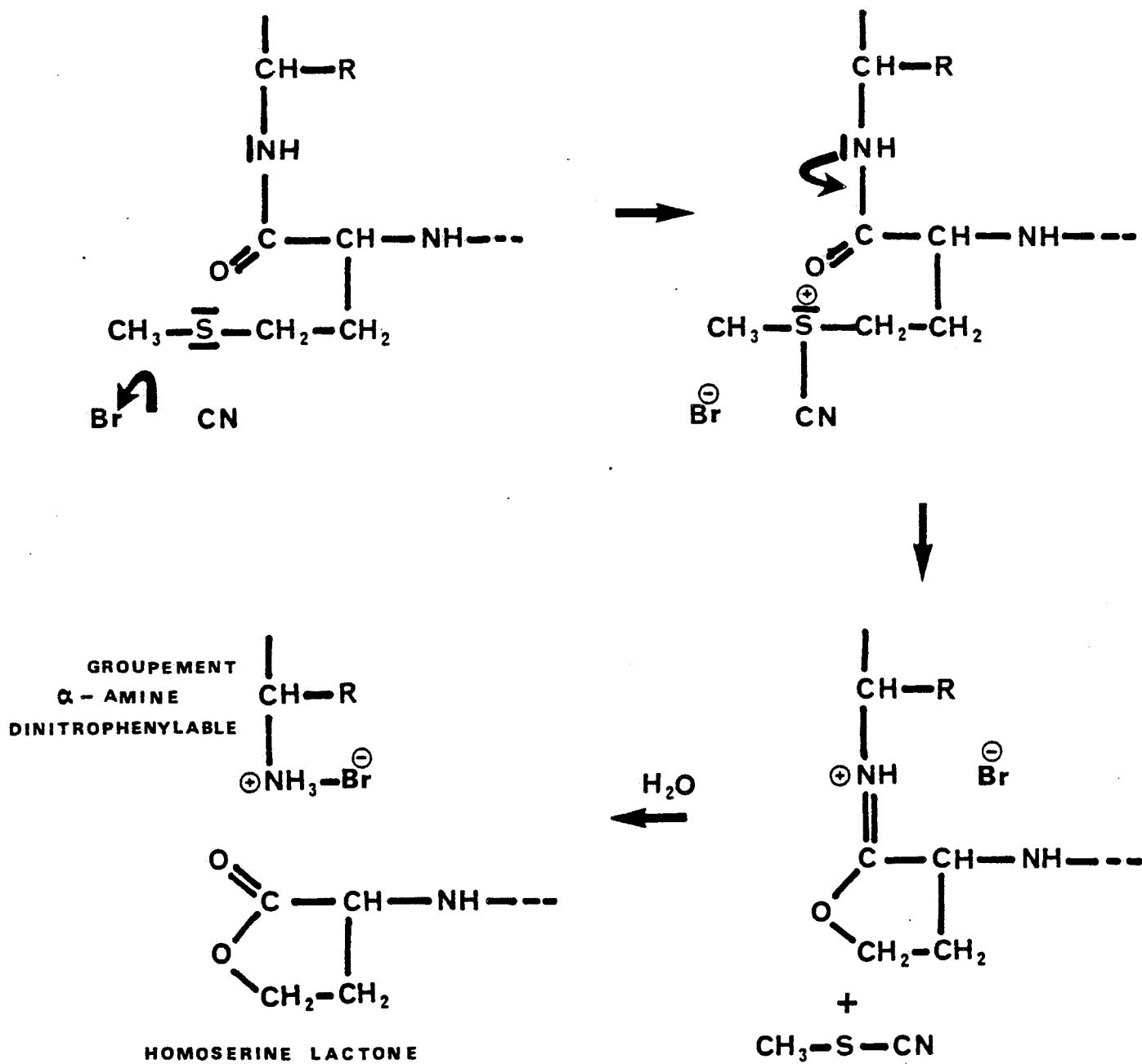
- La présence de deux résidus de tryptophane a également retenu notre attention et nous a permis d'effectuer un second type de coupure chimique : la coupure par le BNPS-skatole, caractéristique des liaisons tryptophanyle.

Le 2(2-nitrophénylsulfényl)-3-méthyl-3-bromoindole ou BNPS-skatole (61) dont la structure figure ci-après :



a une action comparable à celle de la N-bromo-succinimide, mais l'analogie de structure qu'il présente avec le tryptophane oriente préférentiellement la coupure vers cet amino-acide. Le BNPS-skatole

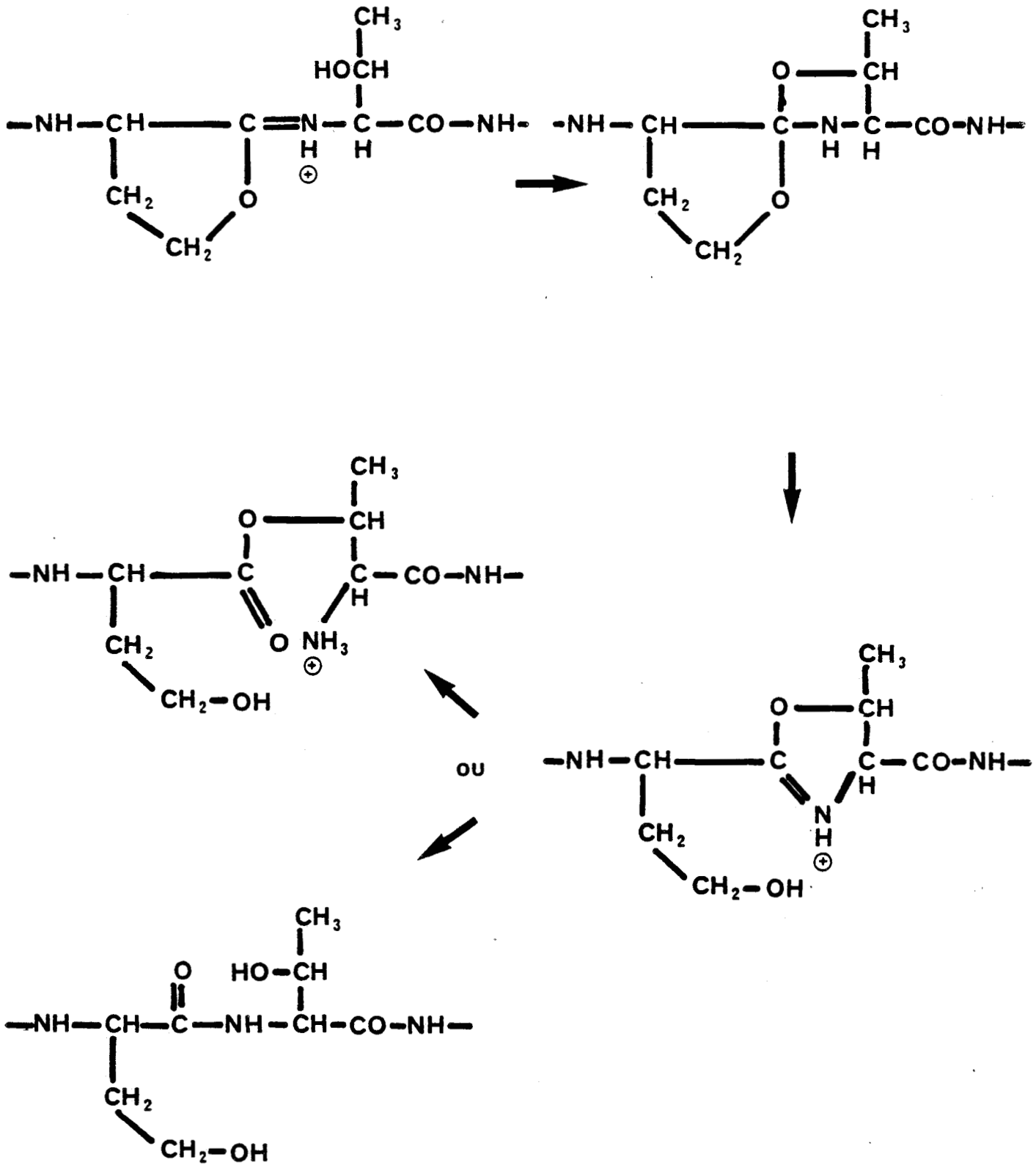




**COUPURE CHIMIQUE DES LIAISONS**

**METHIONYLE-X PAR LE BrCN**





MECANISME DE LA FORMATION DES LIAISONS INTRA-MOLECULAIRES ENTRE IMINOLACTONE ET HYDROXYLE DES RESIDUS DE SERINE ET DE THREONINE AU COURS DE LA COUPURE CHIMIQUE DES LIAISONS MET-THR ET MET-SER PAR LE **BrCN**



FIGURE 5

est cependant un agent oxydant moins puissant que la N-bromo-succinimide.

La coupure de l'arginine kinase du côté carboxylique des deux résidus de tryptophane a facilité la détermination de l'ordre d'enchaînement complet des peptides au BrCN.

- Ce travail d'alignement des peptides au bromure de cyanogène ainsi que l'étude des séquences N et C-terminales ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Laboratoire de Biochimie Macromoléculaire du CNRS de Montpellier (REGNOUF et al).

*Int. J. Peptide Protein Res.* 7, 1975, 69-80

Published by Munksgaard, Copenhagen, Denmark

No part may be reproduced by any process without written permission from the author(s)

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE CYANOGEN BROMIDE FRAGMENTS OF LOBSTER ARGININE KINASE (*HOMARUS VULGARIS*)

BRIGITTE DEBUIRE, KIA-KI HAN, MICHEL DAUTREVAUX and GÉRARD BISERTE

*Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Lille Cédix, France*

Received 16 April 1974

*Arginine kinase was aminoethylated in order to block the five free thiol groups on the native enzyme, and then submitted to BrCN cleavage. The BrCN resulting peptides were soluble in propionic acid (10%) and subsequently submitted to gel-filtration. The large polypeptide subfractions were citraconylated and resubmitted to different gel-chromatographies, whereas the short peptide subfractions were submitted to preparative paper electrochromatographies. Eight peptides of 2, 11, 17, 25, 61, 82, 86 and 132 amino acid residues were isolated, one of which is the overlapping of two peptides. The amino acid composition and the end group of all the isolated peptides were established. The short peptides (2, 11 and 17 residues) were sequenced. All peptides possess homoserine at C-terminal position because one methionyl residue is situated at the C-terminal position in the native protein. The polypeptide with 132 residues possessed N-acetylated residue at N-terminal position: therefore this polypeptide is located at the N-terminal position in the protein. The sum and account of each amino acid of the seven isolated peptides were compared to those of the intact protein: the sum of the seven peptides is 331 amino acid residues, whereas the whole protein contains 342 residues. The molecular weight of arginine kinase is revised and calculated on the basis of the present results (37, 687).*

Arginine kinase from *Homarus vulgaris* muscle is one of the seven guanidine phosphotransferases investigated in Dr. N.G. Van Thoai's laboratory in the College of France in Paris which was obtained in a crystal state for X-ray studies. Subsequently, investigation of the three-dimensional structure of this enzyme was undertaken and the essential amino acids involved in the active centre of this enzyme have been studied extensively in Dr. Thoai's laboratory. Therefore,

Unusual abbreviations: SAE:S-aminoethylated; Dansyl or DNS: 1-dimethyl-aminonaphthalene-5-sulphonyl; Glx: Glutamine or glutamic acid; Hse: Homoserine; Citraconic anhydrid: 2-methyl-maleyl-anhydrid; PTH: Phenylthiohydantoine. Code number of enzyme: arginine kinase (EC: 2.7.3.3.)

it would be interesting to investigate the covalent structure of this enzyme, because knowledge of the covalent structure will help towards a better understanding of the conformational data.

Kassab et al. (1) reported the isolation and characterization of the BrCN resulting peptides of the carboxymethylated arginine kinase. However, the BrCN resulting peptides obtained from carboxymethylated arginine kinase yield insoluble derivatives in the classical elution buffers and are soluble only in the urea medium. These authors used ion exchange chromatography on sulphopropyl-Sephadex and gel filtration on Sephadex G 50 fine in urea medium, as well as electro-chromatography.

Our purpose was to reinvestigate the report by Kassab et al. by using other procedures for

BRIGITTE DEBUIRE, KIA-KI HAN, MICHEL DAUTREVAUX AND GÉRARD BISERTE

thiol alkylation. The protein was aminoethylated and then submitted to BrCN cleavage; the resulting peptides were soluble in 10% propionic acid.

In this paper, we shall deal with the new alkylation and new fractionation procedures in order to determine and confirm the Paris group's results.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

##### Materials

Arginine kinase from the *Homarus vulgaris* muscle was prepared as described previously (2).

Ethylene-imine, cyanogen bromide, citraconic anhydride were purchased from Pierce Chemicals, dansyl chloride was sequenal grade and obtained from Sigma. Sephadex G 50, G 75, G 100 were products from Pharmacia; resin used was from ion exchange chromatography in Chromobeads P (Technicon). Polyamide sheets were purchased from Schleicher & Schüll (Germany). Pyridine, phenylthioisocyanate, butylacetate used for Edman degradation were sequenal grade, obtained from Pierce Chemicals. Other chemical reagents used were analytical grade.

##### Methods

*Reduction and S-aminoethylation of cysteine residues.* Twenty five  $\mu$ Moles (1 g) of enzyme was dissolved in 2 M Tris buffer adjusted to pH 8.6 with HCl. The buffer contains 4 M urea (deionized) and 250 mg of EDTA; 1.5 ml of mercaptoethanol was added. The reaction of reduction was performed under nitrogen for 4 h at room temperature. Afterwards, 1 ml of ethylencimine was added; the same amount of ethylencimine was added after 10 min intervals (6 times) (always under nitrogen). We checked the completion of the reaction by sodium nitroprussiate-ammonia (Brandt's reaction) staining, and stopped by lowering the pH to 7 with 5.6 N HCl. The alkylated protein was then dialysed against water for 48 h with repeated change of water at 4°C. The retentate was frozen and lyophilized. Twenty-five nanomoles of alkylated protein were submitted to total acid hydrolysis and the hydrolysate was submitted to amino acid analyser. We found the quantitative disappearance of cysteine content and the corresponding increase of S-AE-cysteine residues in the hydrolysate of alkylated protein.

*Cyanogen bromide cleavage.* The experimental procedure reported by Han et al. (3) for the cleavage of methionyl bonds in sheep heart myoglobin was applied.

*Gel filtration.* The amount of 150 mg of BrCN resulting peptides was applied to a column of Sephadex G 75 (4 cm  $\times$  100 cm) with a flow rate of 48 ml/h. The elution solution used both for dissolving the peptide mixture and for equilibrating and eluting the column was 10% propionic acid. Location of the subfractions was obtained by monitoring UV absorption, Lowry's reaction and ninhydrine reaction in an autoanalyser (Technicon). The column was loaded with no more than about 150 mg of peptide material; otherwise, the separation was poor.

Some large peptides isolated from the Sephadex G 75 column were previously citraconylated and then submitted to gel filtration on Sephadex G 50 or G 100 in the dilute ammonia pH 10 (column 2  $\times$  100 cm).

*Citraconylation and decitraconylation.* The technique used to disaggregate the peptide mixtures' subfractions isolated from the Sephadex column was based on the experimental procedure reported by Atassi & Singhal (4).

Two hundred milligrams of polypeptide mixture were dissolved in 20 ml of 0.05M ammonium bicarbonate; the pH was maintained at 8.2-8.4 with 2 N NaOH. Twenty  $\mu$ l of citraconic anhydride were added at 20 min intervals (6 times). The cloudy solution progressively clarified after citraconylation. The reaction was maintained during 2 h, then extensively dialysed against water (24 h) containing ammonia (pH 9.0) and lyophilized.

Decitraconylation of pure subfractions obtained from gel filtration (Sephadex G 100) was performed by dissolving the citraconylated polypeptide in 5% formic acid during 16 h at room temperature.

*Preparative and analytical paper electrophoresis and chromatography.* This was used to isolate the short peptides (11, 17 and 25 residues). The experimental procedure used for sheep heart myoglobin by Han et al. (3) was applied. The control of homogeneity of short peptides by electrochromatography was systematically ap-

CNBr FRAGMENTS OF ARGININE KINASE

plied under the conditions reported by Biserte et al. (5).

*End group determination.* For short peptides, the dansyl method of Gray & Hartley (6) was used, and for large peptides, the dansyl method of Gros & Labouesse (7). For some peptides, Edman degradation with direct identification of PTH-amino acids was used under the experimental conditions reported by Han et al. (8).

*Polyacrylamide gel electrophoresis.* In order to control the homogeneity of large peptides, the acrylamide gel electrophoresis was performed under the experimental conditions reported by Davis (9).

*Amino acid analysis.* Samples of peptides were submitted to acid hydrolysis at 110 C *in vacuo* in 5.6 N HCl for 24 h or 72 h. Homoserine lactone in acid hydrolysates, in some cases, was converted to homoserine by the methods of Ambler (10) and Young et al. (11). Amino acid analysis was performed with a Jeolco analyser. Homoserine was separated from glutamic acid under normal programme. No correction was made for threonine and serine destructions during hydrolysis for peptides; the correction was made for the hydrolysate of whole protein. The tryptophan content in the peptide was determined qualitatively by Ehrlich reagent on paper staining (12).

*Edman degradation.* For short peptides, Edman degradation was used with pyridine-H<sub>2</sub>O buffer reported by Hartley (13) (Dansyl Edman procedure).

For large peptides, Edman degradation with direct identification of PTH-amino acid on silica gel thin layer chromatography was used under the experimental conditions reported by Han et al. (8).

RESULTS

Fractionation of the cyanogen bromide resulting peptides

*Primary fractionation*

Primary separation of the BrCN resulting fragments was performed by gel filtration on a column of Sephadex G 75 (Fig. 1). In Fig. 1, seven major

subfractions were resolved after monitoring the eluate by UV absorption, Lowry's reaction and the ninhydrine reaction. Further purifications will reveal that APK-V, APK-VI, APK-VII correspond to four short peptides, whereas APK-IV, APK-III, APK-II correspond to a mixture of several main large peptides. The subfraction APK-I corresponds to the residual protein un-cleaved by BrCN.

*Isolation and characterization of short peptides*

(a) *APK-VII (2 residues).* The subfraction APK-VII is highly ninhydrine positive. The analytical electrochromatography control reveals a homogeneous fraction. The short peptide is homogeneous on paper electrochromatography. Its amino-acid composition is; Glx: 1; Hse: 1. Therefore it is a dipeptide. Its N-terminal amino acid established by Edman degradation (Han) (8), with direct identification of PTH-amino acid, is Gln. Therefore, its structure is Gln-Hse.

(b) *APK-VI-A2B2 (11 residues) and APK-VI-A1B1 (17 residues).* APK-VI, the subfraction obtained from gel-filtration on Sephadex G 75, was submitted to further purifications on preparative paper electrophoresis and paper chromatography. Four peptides were isolated: APK-VI-A1, APK-VI-B1 and APK-VI-A2 as well as APK-VI-B2. However, APK-VI-A1 and APK-VI-B1 were found to have the same amino acid composition (17 residues) and the same N-terminal amino acid (Glx). APK-VI-A2 and APK-VI-B2 have the same amino acid composition (11 residues) and the same N-terminal amino acid (Gly). Therefore, the APK-VI-A1 and APK-VI-B1 (17 residues) as well as APK-VI-A2, APK-VI-B2 (11 residues) seem to be the amide and deamide forms of two single peptides.

The covalent structure of APK-VI-A2B2 was found by the dansyl Edman procedure to be: Gly-Leu-Thr-Glx-Phe-Glx-Ala-Val-Lys-Glx-Hse.

The experimental procedure applied to determine the complete structure of APK-VI-A1B1 (17 residues) has been reported elsewhere (Han et al.) (14). It is Glu-Gly-Phe-Pro-Tyr-Glu-Ala-Gln-Tyr-Asp-Cys-Thr-Pro-Leu-Lys-Glu-Hse.

(c) *APK-V (25 residues).* This peptide was isolated by preparative paper electrophoresis. Two

BRIGITTE DEBUIRE, KIA-KI HAN, MICHEL DAUTREVAUX AND GÉRARD BISERT

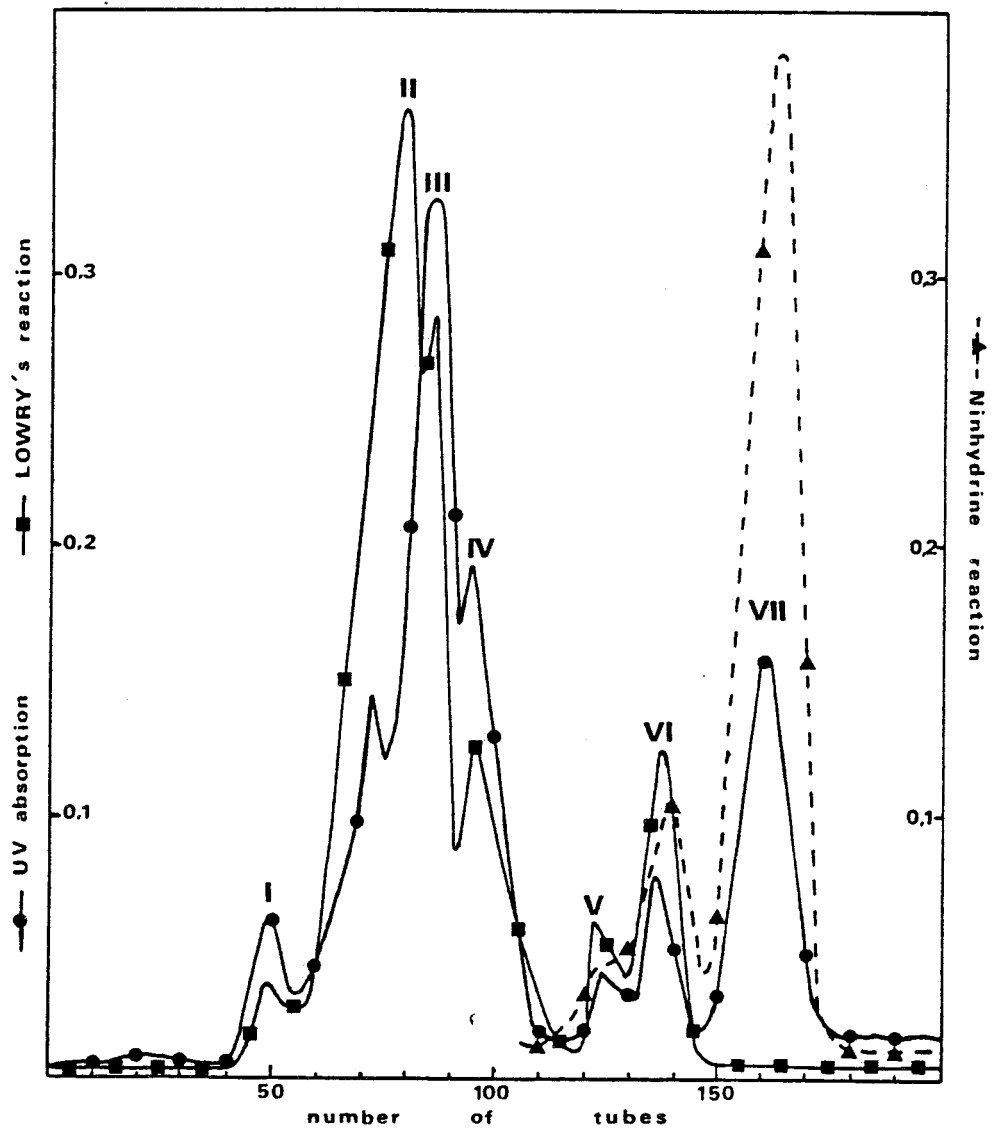


FIGURE I  
Primary fractionation on Sephadex G 75 of cyanogen bromide resulting peptides of S-amino-ethylated arginine kinase.  
● : UV absorption  
■ : Lowry's reaction  
▲ : Ninhydrine reaction.

CNBF FRAGMENTS OF ARGININE KINASE

forms of the same peptide were obtained: amide and deamide forms.

The N-terminal glutamic acid was identified by Edman degradation with direct identification of PTH-amino acid.

*Isolation and characterization of main large peptides*

(a) *APK-II-b* (132 residues) (Fig. 2). The subfraction *APK-II*, isolated from Sephadex G-75, was

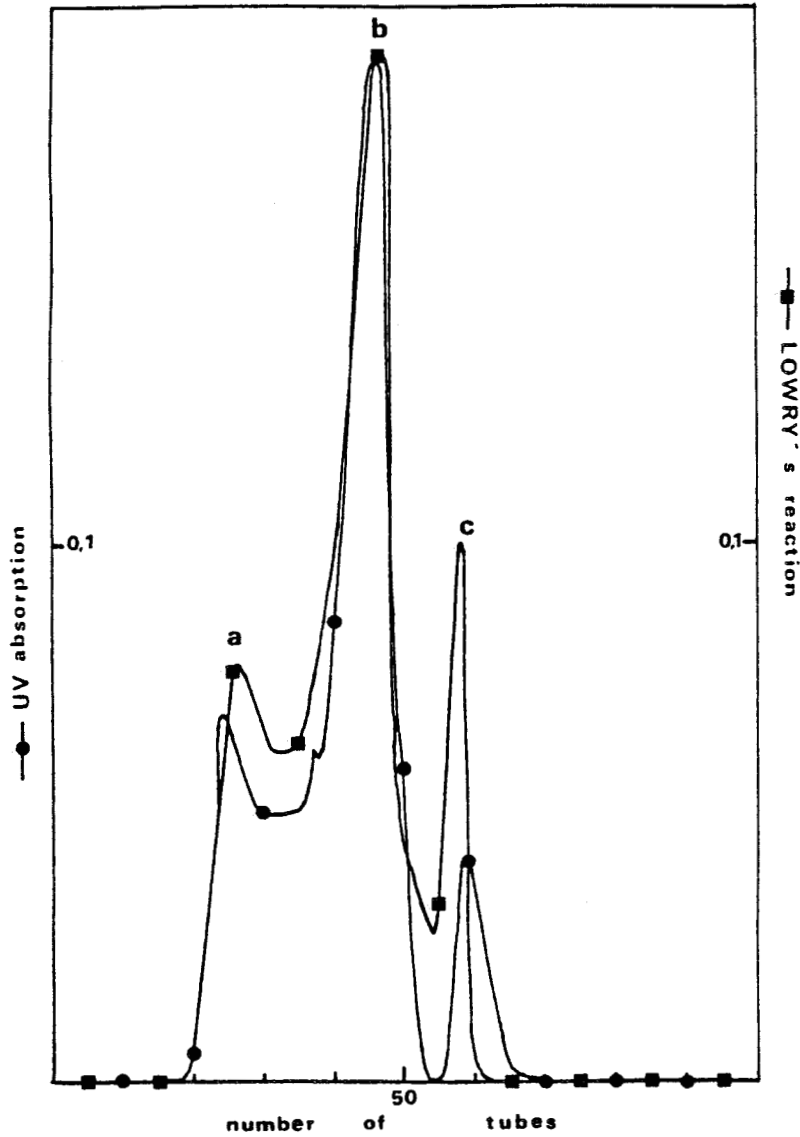


FIGURE 2  
Gel-filtration on Sephadex G 100 of APK II (after citraconylation)  
● : UV absorption  
■ : Lowry's reaction



BRIGITTE DEBUIRE, KIA-KI HAN, MICHEL DAUTREVAUX AND GÉRARD BISFERT

citraconylated and submitted to gel filtration on Sephadex G 100. Three fractions were obtained: APK-IIa, APK-IIb and APK-IIc. Only APK-IIb is homogeneous on acrylamide gel electrophoresis and corresponds to the major fraction. The APK-IIa and APK-IIc are heterogeneous and

could correspond to minor fractions which were discarded.

No N-terminal amino acids were detected by dansylation of this peptide. It could correspond to the N-terminal portion of the enzyme which is N-acetylated.

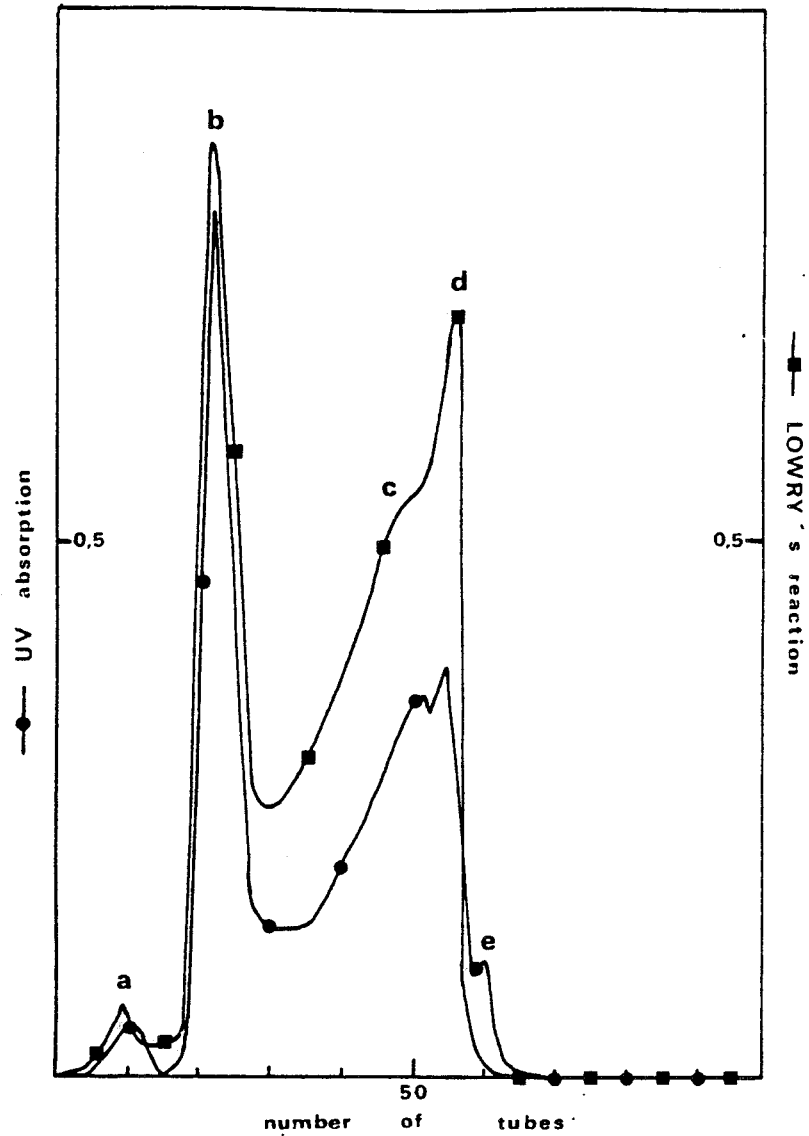


FIGURE 3  
Gel-filtration on Sephadex G 100 of APK-III (after citraconylation).



CNBT FRAGMENTS OF ARGININE KINASE

(b) *APK-IIIc'* and *APK-III d'* (86 residues and 82 residues) (Figs. 3 and 4). *APK-III*, the subfraction obtained from gel filtration on Sephadex G 75, was citraconylated. The chemically modified polypeptide mixture was submitted to two gel chromatographies: first on Sephadex G100, five fractions were separated. Only *APK-IIIc* and *APK-III d* were isolated and resubmitted to a second gel chromatography on Sephadex G 50. *APK-IIIa* and *APK-IIIe* could correspond to minor subfractions; they were discarded. *APK-IIIb* corresponds to *APK-IIb* previously isolated.

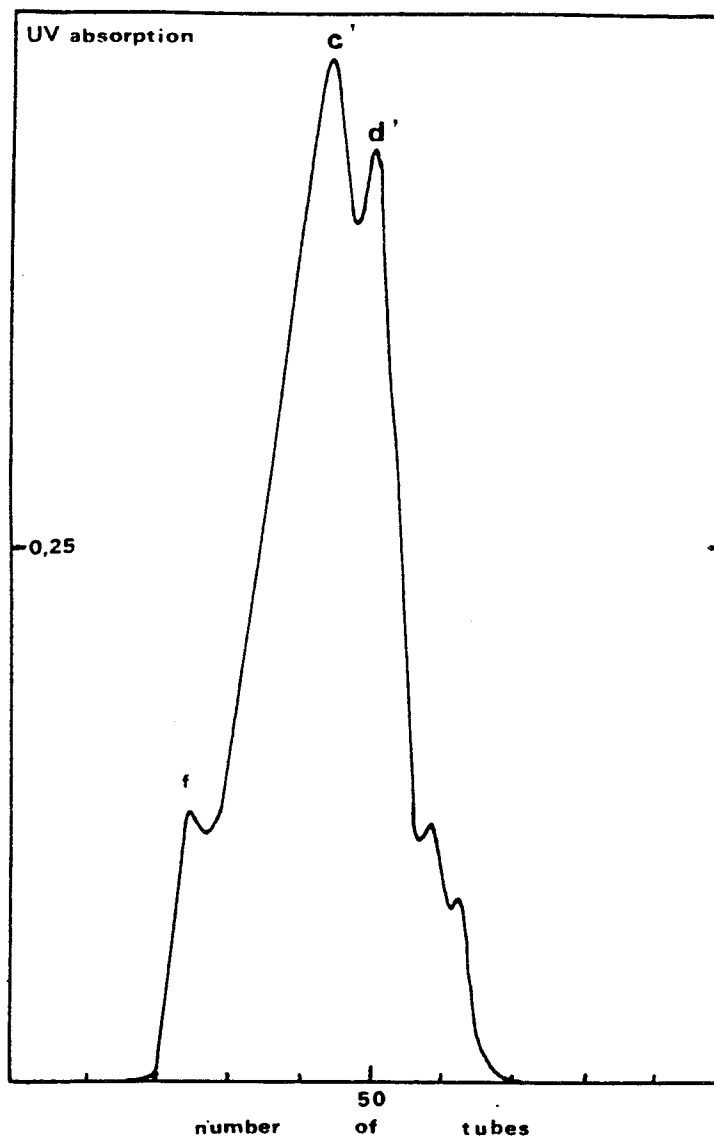


FIGURE 4  
Gel-filtration on Sephadex G 50 of *APK-III(c+d)* (after citraconylation).



BRIGITTE DEBUIRE, KIA-KI HAN, MICHEL DAUTREVAUX AND GÉRARD BISERTÉ

Two polypeptide subfractions were then isolated: APK-IIIc' (86 residues) and APK-IIIId' (82 residues). The homogeneity of these peptides was controlled by dansylation: APK-IIIc': DNS-Glx, and APK-IIIId'-DNS-Gly. APK-IIIc' (86 residues) is an overlap of two peptides APK-IVb

(61 residues)- APK-V (25 residues) and it contains tryptophan as revealed by Ehrlich reaction (because APK-IVb contains tryptophan).

(c) *APK-IVb* (61 residues). APK-IV, obtained from primary gel filtration on Sephadex G 75,

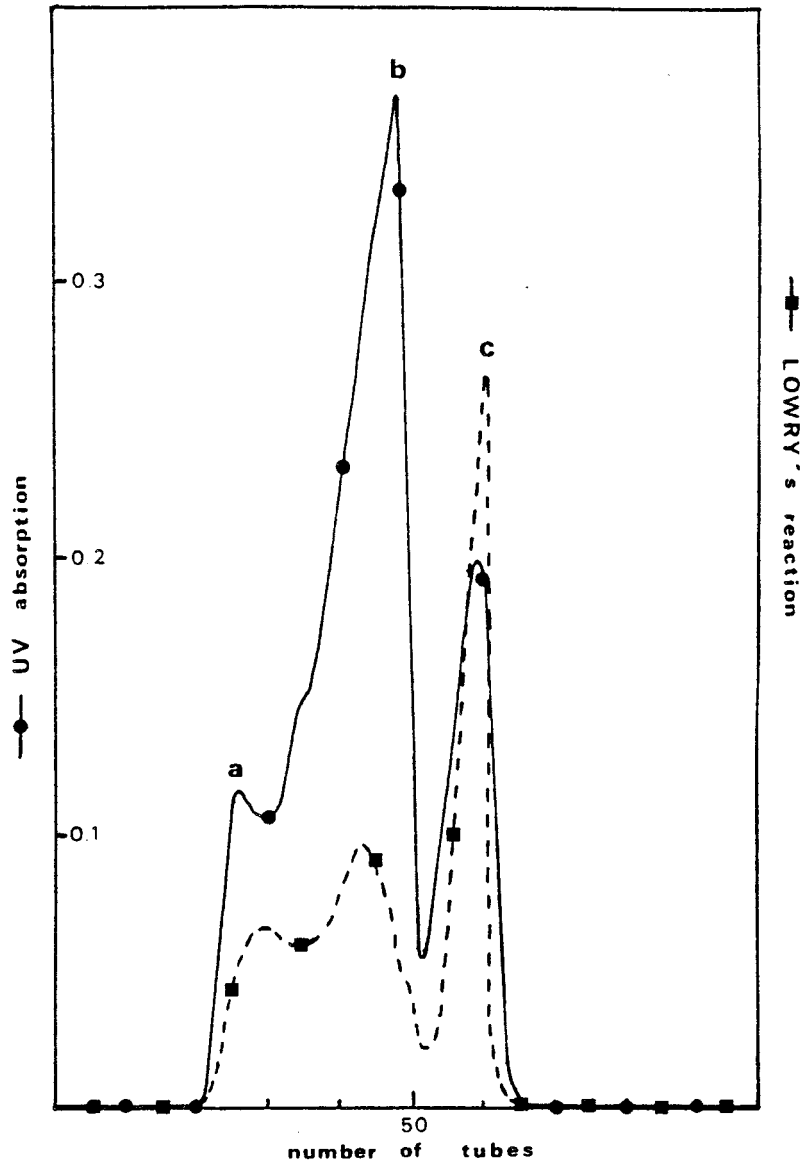
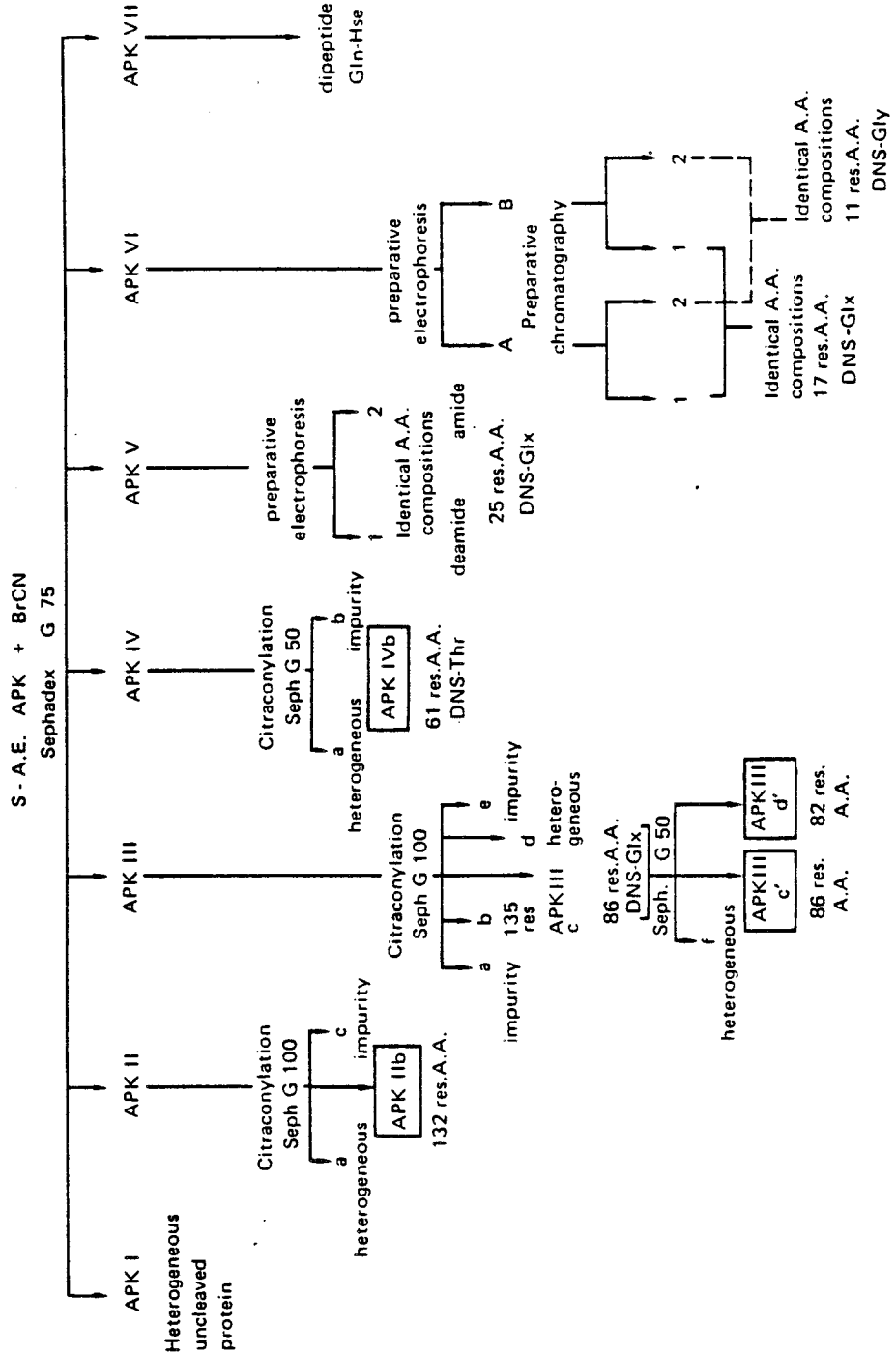


FIGURE 5  
Gel-filtration on Sephadex G 50 of APK IV (after citraconylation).



CNBT FRAGMENTS OF ARGININE KINASE

TABLE I  
The experimental procedures used to isolate different peptides from cyanogen bromide cleaved arginine-kinase



BRIGITTE DEBUIRE, KIA-KI HAN, MICHEL DAUTREVAUX AND GÉRARD BISERTE

was citraconylated and then submitted to gel chromatography (Sephadex G 50). Three sub-fractions were obtained. One fraction, the main fraction, was homogeneous, its N-terminal residue was threonine, the other two fractions (minor) were discarded (Fig. 5). This peptide contains tryptophan as revealed by Ehrlich reaction.

Table 1 summarizes the experimental procedure of successive fractionations of the BrCN resulting peptides of arginine kinase.

that it is N-acetylated. The carboxyl terminal has been found to be a methionyl residue (17).

We have isolated two which are an overlap. APK-IIIc' (86 residues) overlaps APK-V (25 residues) and APK-IVb (61 residues) and contains two homoserine. In the other overlap, one of the 2 methionyl bonds is not cleaved by BrCN, presumably because during the S-aminoethylation, the side chain of methionyl residue might react with ethylene-imine. Schroeder et al. (18

TABLE 2

*Amino acids composition and the N-terminal residue of isolated peptides. The sum of each amino acid from all peptides is compared to native protein*

	APK VII	APK VI A2B2	APK VI A1B1	APK V	APK IVb	APK IIIc	APK IIIc'	APK IIb	Total	Native APK
LYS		1	1	2	6	8	8	10	28	32
A.E. CYS			1		2	2	1	1	5	5
HIS					2	2	3	3	8	8
ARG					4	4	4	8	16	17
TRP		-	-	+	+	+	-	-		
ASX			1	1	8	9	8	14	32	34
THR		1	1	2	3	4	4	6	17	17
SER				3	2	5	6	6	17	17
HSE	1	1	1	1	1	2	1	2	8	8
GLX	1	3	4	4	7	11	9	15	44	41
PRO			2	1	2	3	3	4	12	12
GLY		1	1	4	4	7	8	10	28	27
ALA		1	1		4	5	5	12	23	25
VAL		1		1	2	4	4	10	18	18
ILE				1	4	4	3	6	14	17
LEU		1	1	3	4	8	9	14	32	33
TYR			2	1	2	3	2	4	11	11
PHE		1	1	1	4	5	4	7	18	18
TOTAL	2	11	17	25	61	86	82	132	331	340
N-TERM	GLN	GLY	GLU	GLU	THR	GLX	GLY	N-acetyl X		

Table 2 summarizes the amino acid compositions and N-terminal amino acid of all the isolated peptides.

DISCUSSION

The Paris group (15,16) reported that the arginine kinase contains 330 residues of amino acid with 2 tryptophanyl, 5-6 cysteinyl, 7-8 methionyl residues and no disulphide bridges. The N-terminal amino acid has not been identified but it is shown

observed that methionine residues in the protein were altered during aminoethylation in a way that interfered with their subsequent reaction with cyanogen bromide, preventing complete cleavage of the protein by this reagent. Therefore APK-IIb (132 residues) might correspond to the overlap of CB4 (39 residues) and CB7 (103 residues) reported by Kassab et al. (1).

APK-IIIc' (86 residues) is the overlap of APK-V (25 residues) and APK-IVb (61 residues); in this case the methionyl-threonine bond has not been

CNBF FRAGMENTS OF ARGININE KINASE

completely cleaved by cyanogen bromide (Han et al.) (19).

The sums of the same amino acids (APK-VII-P1, APK-VI-A2B2, APK-VI-A1B1, APK-V, APK-IVb, APK-III d' and APK-IIb) obtained by addition of each amino acid in different peptides such as cysteine, histidine, threonine, serine, homoserine, proline, valine, tyrosine and phenylalanine are in perfect agreement with the corresponding amino acids in the whole protein.

The sums of arginine, glycine and leucine in the different isolated peptides differ by only one residue if compared to the same amino acids in the native arginine kinase.

However, we did find differences of 4 lysyl residues, 2 aspartyl residues, 2 alanyl residues, 3 isoleucyl residues and 3 glutamyl residues.

Nevertheless, it appears that, within the limits of experimental error, the seven isolated peptide fragments do account for the amino acid composition of the whole protein. The amino acid composition of the entire molecule of arginine kinase has been reinvestigated in the present work and calculations have been based on an estimated molecular weight of 38,000.

The present work confirms the recent report of Kassab et al. (1) by using different experimental procedures for thiol alkylation and different procedures of fractionation. However, it seems to us that Kassab et al. (1) lost a dipeptide Gln-Hse during their fractionation of carboxymethylated arginine kinase cleaved by cyanogen bromide, because glutamine might be cyclized to pyroglutamyl residue during their primary fractionation, by using sulphopropyl-Sephadex at 37°C during 48 h. In this case, this peptide is ninhydrine negative and is not absorbed in U.V.

The purpose of the present study was to isolate, identify and characterize all peptide fragments resulting from BrCN cleavage of S-AE-arginine kinase, and thereby provide a new basis for establishing the covalent structure of this protein. From a technician's point of view, the S-amino-ethylation introduces five groups of isostere of lysyl residues. The S-AE-cysteinyl bonds might become the new trypsin sensitive sites. It is of great interest for our subsequent sequence investigations, and may explain the solubility of BrCN resulting fragments in acid medium; this solubility greatly facilitates their subsequent fractionations. However, some main large poly-

peptides form aggregates. The use of chemical modification, citraconylation, permits us to interrupt the ionic bonds and thus disaggregate different polypeptides without using urea solution. This purification procedure was found to be an excellent tool for a better way of handling separation and isolation of peptides.

Finally, the BrCN resulting peptides isolated and characterized in the present investigation made it possible to begin sequence studies as illustrated by the results of AKP-VII, APK-VI-A2B2, APK-VI-A1B1. Knowledge of the covalent structure of arginine kinase will give a better understanding of its catalytic function and make it possible to form an evolutionary basis for its relationship to the other homologous guanidinokinases.

REFERENCES

1. KASSAB, R., REGNOUF, F., FATTOUM, A. & PRADEL, L. A. (1973) 9th International Congress of Biochemistry, Stockholm, July.
2. PRADEL, L. A. & KASSAB, R. (1973) *C.R. Acad. Sci. Paris* **276**, série D, 2843-2846.
3. HAN, K. K., TETAERT, D., MOSCHETTO, Y., DAUTREVAUX, M. & KOPEYAN, C. (1972) *Eur. J. Biochem.* **27**, 585-592.
4. SINGHAL, R. P. & ATASSI, M. Z. (1971) *Biochemistry* **10**, 1756-1762.
5. BISERTE, G., HAN, K. K., PAYSANT, P. & BOULANGER, P. (1963) *Clin. Chim. Acta* **8**, 359-375.
6. GRAY, W. R. & HARTLEY, B. S. (1963) *Biochem. J.* **89**, 379-380.
7. GROS, G. & LABOUESSE, B. (1969) *Eur. J. Biochem.* **7**, 463-470.
8. HAN, K. K., PLANCHON, B., DAUTREVAUX, M. & BISERTE, G. (1973) *Ann. Pharm. Franç.* **31**, 539-550.
9. DAVIS, B. J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
10. AMBLER, R. P. (1965) *Biochem. J.* **96**, 32P.
11. YOUNG, M., BLANCHARD, M. H. & BROWN, D. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **61**, 1087-1094.
12. SMITH, I. (1953) *Nature (Lond.)* **171**, 43-44.
13. HARTLEY, B. J. (1970) *Biochem. J.* **119**, 805-822.
14. HAN, K. K., DEBUIRE, B., DAUTREVAUX, M., BISERTE, G., FATTOUM, A., REGNOUF, F., KASSAB, R. & PRADEL, L. A. (1972) *C.R. Acad. Sci. Paris* **274**, 324-326.
15. THOAI, N. V., KASSAB, R. & PRADEL, L. A. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 532-539.
16. DER TERROSSIAN, E., KASSAB, R., PRADEL, L. A. & THOAI, N. V. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 462-469.

BRIGITTE DEBUIRE, KIA-KI HAN, MICHEL DAUTREVAUX AND GÉRARD BISERTE

17. REGNOUF, F., KASSAB, R. & FATTOUM, A. (1973) *Eur. J. Biochem.*, submitted for publication. Address:  
*Dr. K. Han*
18. SCHROEDER, W. A., SHELTON, J. R. & ROBBERSON, B. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 590-592. Laboratoire de Biochimie  
Faculté de Médecine
19. HAN, K. K., DAUTREVAUX, M., BOULANGER, Y., MOSCHETTO, Y. & BISERTE, G. (1966) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**, 371-379. Place de Verdun  
59045 Lille Cédex  
France

## D I S C U S S I O N

-----

### I LES PEPTIDES DE FAIBLE POIDS MOLÉCULAIRE

#### 1. La fraction APK VII

Les études ultérieures concernant l'ordre d'enchaînement des peptides au BrCN ont confirmé l'existence de ce dipeptide Gln-Hse.

#### 2. La fraction APK VI

- Peptide APK VI -A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>- (11 résidus d'acides-amino)

L'article précédent donne la structure de ce peptide déterminée par la méthode de dansyl-EDMAN donc sans établir la distinction entre Glu et Gln car la méthode nécessite une hydrolyse acide du dansyl-peptide résiduel.

La structure établie par la méthode de dégradation d'EDMAN manuelle selon TARR a confirmé cette séquence et précisé la nature des résidus Glx :

Gly-Leu-Thr-Glu-Phe-Gln-Ala-Val-Lys-Glu-Met(OH).  
→ → → → → → → → →



● Peptide BrCN C-terminal de l'APK (14 résidus)

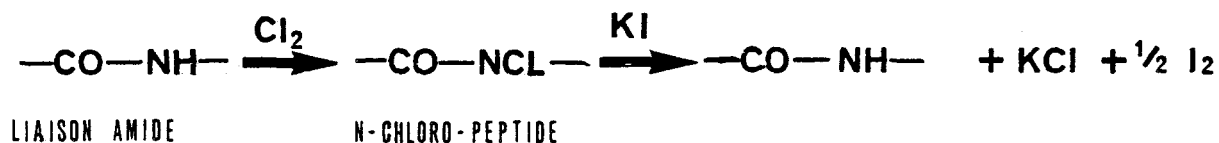
Lors de l'étude des séquences N et C-terminales de l'APK par REGNOUF et al (voir page 9 ) il est apparu que le peptide C-terminal n'avait pas été isolé des hydrolysats au BrCN.

Ultérieurement, la révélation de l'électrochromatographie sur couche mince de cellulose de la fraction APK VI par le réactif chlore-amidon a permis de mettre en évidence le peptide recherché (Figure 6).

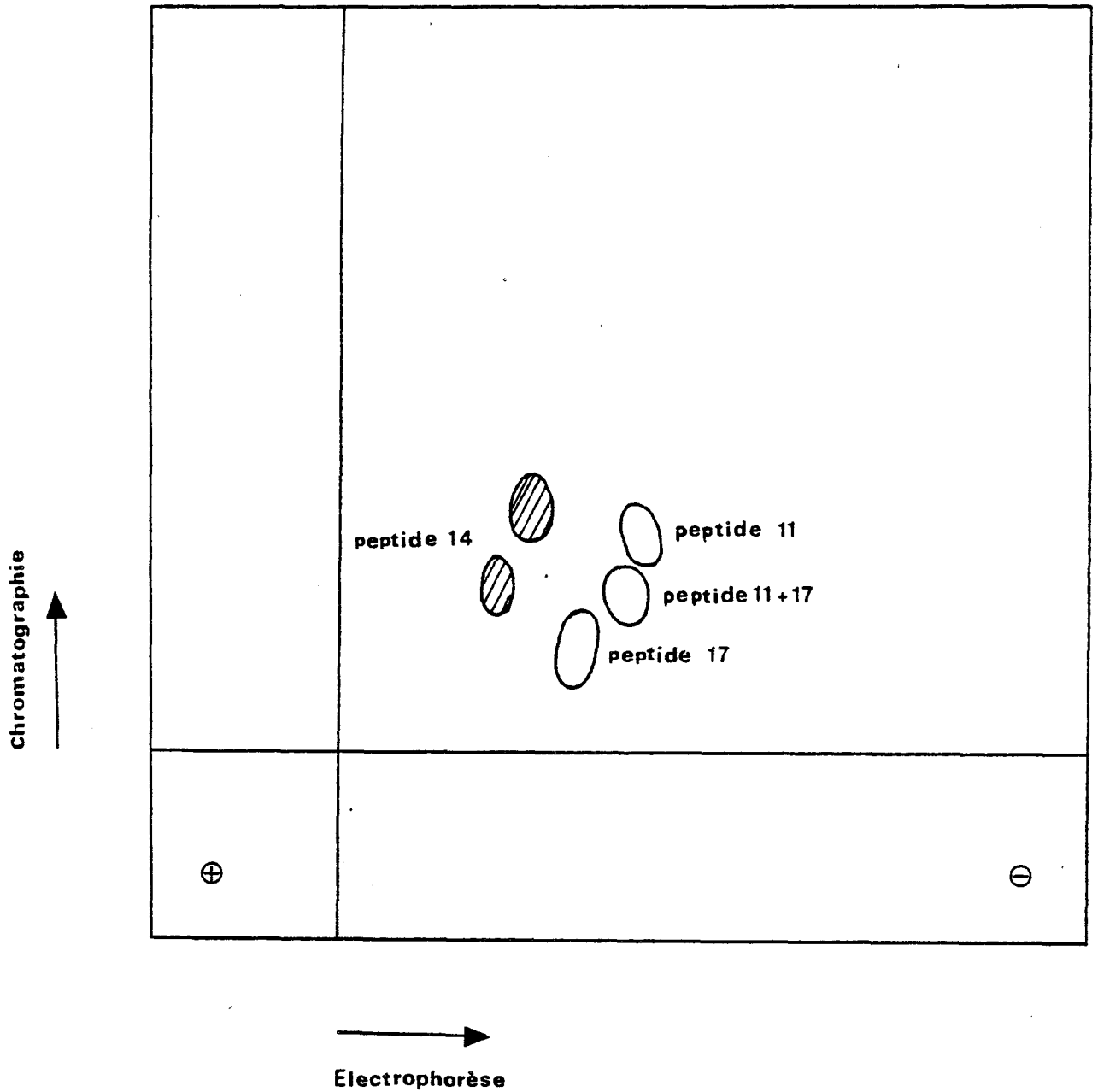
Le peptide est porteur d'un acide aminé bloqué en position N-terminale et n'avait donc pas été révélé par la ninhydrine ou le fluram.

En 1952, RYDON et SMITH (63) ont préconisé une méthode d'identification des peptides et protéines, notamment ceux à extrémité N-terminale bloquée, qui pallie les limites d'utilisation de la ninhydrine.

Les peptides et protéines peuvent être aisément détectés par chloration puis par pulvérisation d'un mélange amidon-iodure de potassium ; la coloration qui se développe provient de la libération d'iode provoquée par le N-chloropeptide formé après pulvérisation d'hypochlorite.



Il a donc été possible d'isoler le peptide C-terminal à partir de la fraction APK VI par électrochromatographie préparative sur papier (Fig. 7) et d'en déterminer la composition en acides



1. Révélation positive à la Ninhydrine et au Chlore-Amidon : ○

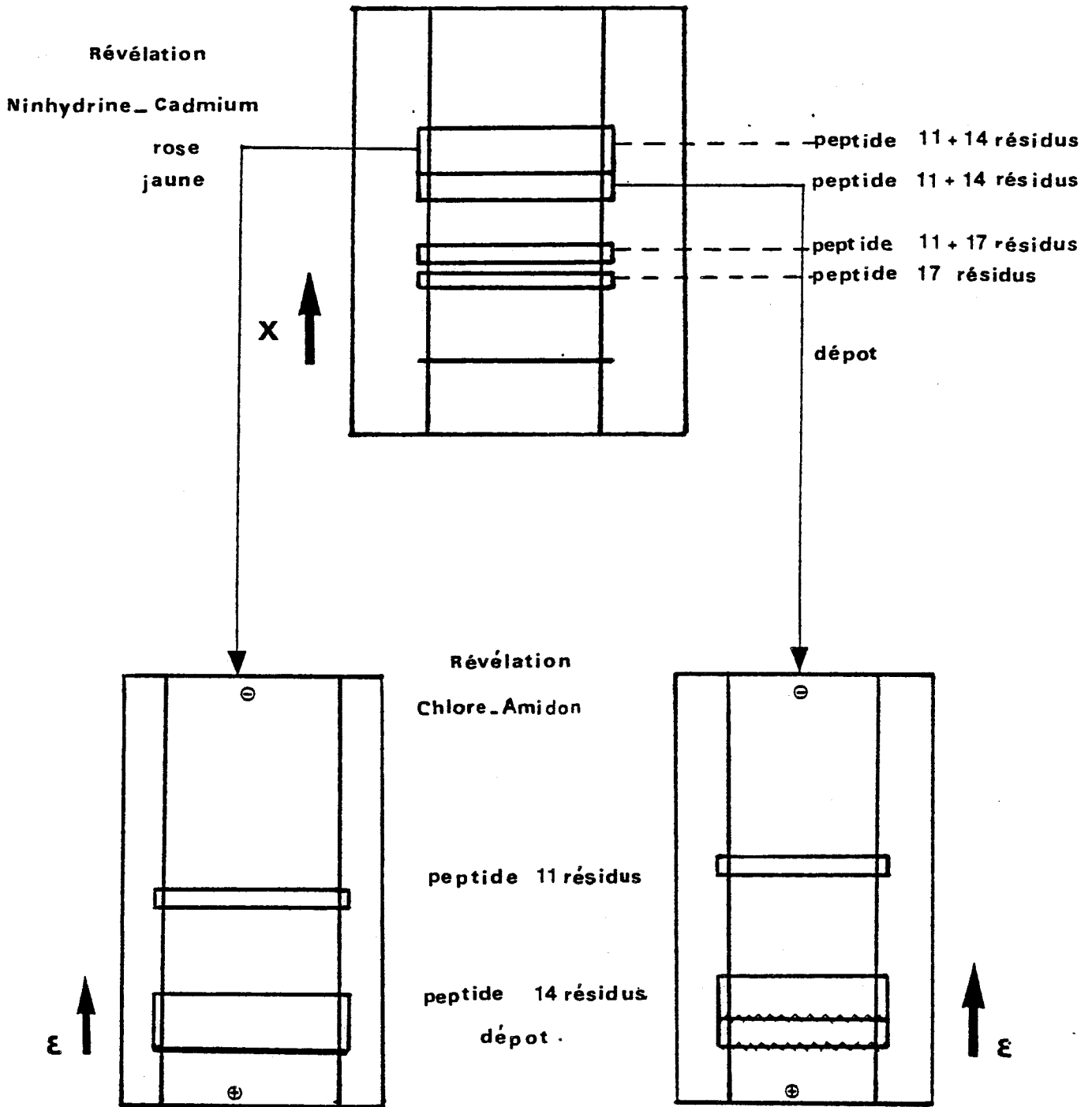
2. Révélation positive au Chlore-Amidon seul : ◐

ELECTROCHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE SUR COUCHE  
MINCE DE CELLULOSE DE LA FRACTION AE\_APK VI

FIGURE 6



FIGURE 7



ELECTROCHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE SUR PAPIER DE  
LA FRACTION AE - APK VI



aminés (Tableau IV).

L'existence de 2 taches en électrochromatographie sur couche mince de cellulose peut être attribuée à la présence d'homosérine en position C-terminale, soit sous forme d'homosérine, soit sous forme d'homosérine lactone.

Nous verrons plus loin les problèmes posés par la détermination de la structure primaire de ce peptide.

● Peptide APK VI  $-A_1B_1-$  (17 résidus d'acides-amino)

Lorsque nous avons entrepris l'étude de ce peptide nous ne disposions pas des microméthodes de dégradation récurrente d'EDMAN avec identification directe des PTH-amino-acides.

Le peptide APK VI  $-A_1B_1-$  avait donc été coupé par la chymotrypsine et les peptides isolés par électrochromatographie sur papier, les taches peptidiques ayant été mises en évidence, avant récupération, par réaction avec une solution acétonique de ninhydrine à 0,01 %.

Les peptides étaient alors dégradés par la méthode de dansyl-EDMAN décrite par GRAY et HARTLEY c'est-à-dire la dégradation d'EDMAN couplée à la dansylation du peptide résiduel obtenu à chaque étape.

Les acides aminés dicarboxyliques et leur forme amidée étaient identifiés et dosés après hydrolyse par l'aminopeptidase M.

Par la suite, nous avons vérifié la séquence de ce peptide en utilisant la microméthode de dégradation d'EDMAN selon TARR avec identification des PTH-amino-acides par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de polyamide selon la méthode de KULBE.

COMPOSITION EN AMINO - ACIDES DU PEPTIDE 14 RÉSIDUS

---

Asx	1,21 (1)	1,18 (1)
Hse + Glx	5,34 (5)	5,20 (5)
Gly	1,80 (2)	1,89 (2)
Ile	2,02 (2)	2,12 (2)
Leu	1,92 (2)	1,91 (2)
Lys	1,66 (2)	1,71 (2)

TABLEAU IV

---





## II LES POLYPEPTIDES

### 1. Polypeptide APK IIb (132 résidus d'acides-amino)

Nous avons isolé un peptide de 132 résidus d'acides-amino APK IIb, comportant 2 résidus de méthionine dont 1 sous forme d'homosérine et qui semblait correspondre à la somme des peptides de 103 (CB<sub>7</sub>) et 39 résidus (CB<sub>4</sub>) isolés par REGNOUF et al (Tableau V) à partir de la S-carboxyméthyl-APK.

Des études ultérieures réalisées sur un polypeptide de l'hydrolysate au BNPS-skatole de l'APK (fragment F1 - voir page 87) ont montré que le peptide N-terminal comporte 107 résidus d'acides-amino et 1 seul résidu de méthionine situé en position C-terminale.

Ceci tend à prouver que nos premiers dosages avaient été entachés d'erreur, certainement par l'agrégation sur le peptide APK IIb d'un peptide de faible poids moléculaire, et que ce fragment APK IIb, fragment N-terminal de l'APK, comporte donc 107 résidus d'acides-amino.

### 2. Polypeptide APK IIIc (86 résidus d'acides-amino)

Ce peptide est le peptide de chevauchement des peptides APK V et APK IVb.

APK V	:	25 résidus,	N-terminal	:	Glu.
APK IVb	:	61 résidus,	N-terminal	:	Thr.
APK IIIc	:	86 résidus,	N-terminal	:	Glu.

Table 2. Amino-acid composition of arginine kinase and CNBr-fragments of S-carboxymethylated arginine kinase

The integral values in parentheses are based on the results shown plus analyses of the purified peptides from other preparations. The data for arginine kinase are average of analyses of 24, 48 and 72-h acid hydrolyzates. Calculations were made on the basis of 8 histidine residues per molecule of protein

Amino acid	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB3—CB5	Total	Arginine kinase
CM-Cysteine		0.9 (1)		0.74 (1)	1.8 (2)	0.8 (1)		1.6 (2)	5	4.9 (5) <sup>a</sup>
Aspartic acid		1.0 (1)	0.5 (0)	8.6 (9)	8.6 (8)	7.1 (7)	12.0 (12)	8.9 (9)	37	32.1 (32)
Threonine	1.0 (1)	1.0 (1)	1.8 (2)	1.1 (1)	1.4 (2)	4.6 (5)	5.1 (5)	4.0 (4)	17 <sup>b</sup>	17.2 (17) <sup>c</sup>
Serine			2.9 (3)		1.1 (1)	3.8 (4)	5.5 (6)	4.5 (5)	14 <sup>b</sup>	18.5 (18) <sup>c</sup>
Homoserine	1.3 (1)	0.96 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.8 (2)	7	6.9 (7) <sup>d</sup>
Glutamic acid	3.2 (3)	4.5 (4)	4.1 (4)	5.2 (5)	6.9 (7)	7.7 (8)	8.7 (9)	9.7 (10)	40	37.7 (38)
Proline		1.8 (2)	0.8 (1)		1.6 (2)	2.5 (3)	3.5 (4)	2.2 (2)	12	12.2 (12)
Glycine	1.1 (1)	1.1 (1)	3.9 (4)	3.0 (3)	3.2 (3)	7.0 (7)	7.6 (8)	0.7 (7)	27	25.8 (26)
Alanine	1.1 (1)	1.0 (1)		3.6 (4)	3.9 (4)	6.1 (6)	10.0 (10)	5.8 (6)	26	24.2 (24)
Valine	1.0 (1)		1.4 (1)	1.8 (2)	2.3 (2)	5.9 (6)	6.1 (6)	3.7 (4)	18	17.7 (18)
Isoleucine				1.7 (2)	3.7 (4)	3.0 (4)	5.7 (6)	3.9 (4)	16	16.7 (17)
Leucine	0.9 (1)	1.1 (1)	3.0 (3)	3.0 (3)	4.8 (5)	7.9 (8)	9.7 (10)	9.4 (9)	31	30.8 (31)
Tyrosine		2.0 (2)	0.8 (1)	1.1 (1)	2.3 (2)	2.3 (2)	2.8 (3)	3.1 (3)	11	9.6 (10)
Phenylalanine	1.0 (1)	1.0 (1)	1.2 (1)	2.6 (3)	3.9 (4)	3.7 (4)	6.8 (7)	4.6 (5)	21	17.5 (18)
Histidine					2.8 (3)	3.0 (3)	1.9 (2)	2.6 (3)	8	8.0 (8)
Lysine	1.0 (1)	1.1 (1)	2.1 (2)	2.0 (2)	3.9 (4)	5.4 (5)	10.0 (10)	6.5 (6)	25	23.0 (23)
Arginine				1.9 (2)	3.7 (4)	7.2 (7)	3.7 (4)	3.9 (4)	17	15.5 (16)
Tryptophan					1.54 (2) <sup>e</sup>			2.2 (2) <sup>e</sup>	2	1.9 (2) <sup>f</sup>
Total residues	11	17	23	39	60	81	103	87	334	327
Yield (%)	50	50	18	3.3	23.2	28	9.2	7.1		
N-terminal residuo	Gly	Glu	Glx	Tyr	Thr	Gly	N-A	Glx		
Molecular weights <sup>g</sup>	1224	2050	2430	4456	7231	9104	11352	10000	37767	
Molecular weights <sup>h</sup>									37687	36730

<sup>a</sup> Cysteine was estimated as cystoic acid (4.9) after performic oxidation [32] and as carboxymethylcysteine (4.0) after reduction and carboxymethylation [13].

<sup>b</sup> Not extrapolated to zero time.

<sup>c</sup> Extrapolated to zero time.

<sup>d</sup> Methionine was determined as methionine residuo (6.0) from acid hydrolyzates containing 8% thioglycolic acid and as methionine sulfone (6.8) after performic oxidation [32].

<sup>e</sup> From spectrophotometric measurements.

<sup>f</sup> Tryptophan was estimated from tyrosine-tryptophan ratio (2.07 residues tryptophan) by ultraviolet spectrum [11, 28] and from acid hydrolyzates containing 8% thioglycolic acid (1.7) according to Matubara [32], using a Beckman 125 G automanalyzer.

<sup>g</sup> Values calculated with CM-cysteine and homoserine molecular weights.

<sup>h</sup> Values calculated with cysteine and methionine molecular weights.



Une liaison Met-Thr a donc été imparfaitement coupée par le BrCN.

3. Polypeptide APK IIIId' (82 résidus d'acides-amino)

Ce peptide a été isolé avec un meilleur degré de pureté à partir de l'hydrolysate au BNPS-skatole de l'APK (voir article suivant).

De nouvelles déterminations de sa composition en acides-amino montrent qu'il comporte 81 et non pas 82 résidus d'acides-amino.

Il contient la cystéine du centre actif.

Nous verrons plus loin les différents protocoles utilisés pour la détermination de sa structure primaire.

4. Peptide APK IVb (61 résidus d'acides-amino)

La structure primaire est actuellement connue (voir article suivant) et a montré qu'il comporte en réalité 60 résidus d'acides-amino.

III COMPARAISON DE LA SOMME DES AMINO-ACIDES DES DIFFÉ-  
RENTS PEPTIDES AVEC LA COMPOSITION EN AMINO-ACIDES  
DE L'ARGININE KINASE

Le tableau de la page 65 montre que la somme des acides aminés des fragments BrCN est en accord avec la composition en acides-amino de l'APK.

Les 8 fragments BrCN renfermant chacun un résidu d'homosérine sont tous constitutifs de la protéine et confirment les résultats de DER TERROSSIAN (5) et VIRDEN (16) qui ont dosé 8 résidus de méthionine par mole d'enzyme.

La figure 8 résume les résultats obtenus au cours de ce premier chapitre.

•• L'hydrolyse de l'APK par le BrCN a permis d'isoler 9 fragments ; ils renferment respectivement 2, 11, 17, 25, 60, 81, 107 et 14 résidus d'acides aminés, le 9<sup>ème</sup> est un peptide de chevauchement des fragments de 25 et 60 résidus.

•• Notre protocole de fractionnement, à la différence de celui utilisé par REGNOUF et al, n'inclut pas l'utilisation de solutions tampons à base d'urée qui peut se révéler gênante lors des études structurales ultérieures.

•• Le polypeptide de 107 résidus à extrémité N-terminale bloquée et renfermant un groupement acétyle occupe la partie N-terminale de la protéine.

Par contre, tous les peptides comportant un résidu d'homosérine en position C-terminale, l'identification directe du peptide C-terminal n'a pas été possible.

Les résultats de ces travaux ont été corroborés par ceux de REGNOUF et al (64).

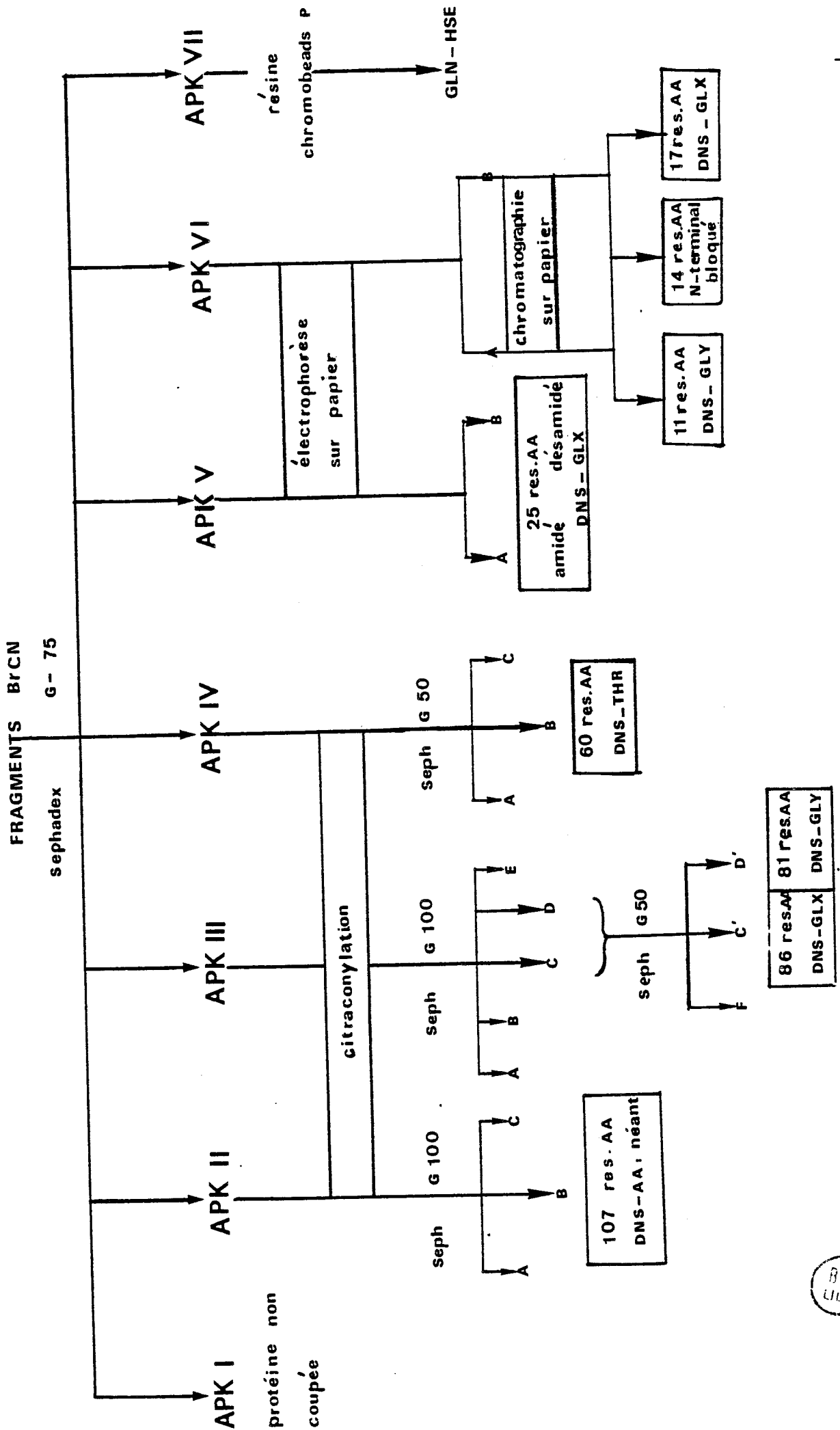


FIGURE 8



## CHAPITRE II

SÉQUENCE EN AMINO-ACIDES DU FRAGMENT  
BRCN APK IV B CONTENANT LES 2 RÉSIDUS DE  
TRYPTOPHANNE DE L'ARGININE KINASE.

## I N T R O D U C T I O N

---

La connaissance de la structure complète de ce peptide a nécessité l'utilisation de deux coupures chimiques (BrCN et BNPS-skatole) et d'une coupure enzymatique (coupure trypsique).

Le lecteur ne devra pas être étonné par une phrase de l'article suivant :

"L'arginine kinase de Homard contient 2 résidus de tryptophanne et 9 résidus de méthionine".

Cet article a en effet été rédigé à une époque où nous nous interrogeons encore sur le nombre exact de résidus de méthionine dans la protéine (avec certaines données en faveur du nombre de 9 résidus).

Seul l'établissement de l'ordre d'enchaînement complet des peptides au BrCN a permis de lever cette ambiguïté.

## Amino Acid Sequence of a Cyanogen Bromide Fragment Containing the Two Tryptophanyl Residues of Lobster Arginine Kinase (*Homarus vulgaris*)

Brigitte DEBUIRE, Kia-Ki HAN,<sup>1</sup> Michel DAUTREVAUX,  
Gérard BISERTE, Françoise REGNOUF,\* and  
Ridha KASSAB\*

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine Place de Verdun, 59045  
LILLE-Cédex, France, and \*Laboratoire de Biochimie cellulaire, Collège  
de France Place Marcellin Berthelot, 75231 PARIS-Cédex 05, France

Received for publication, July 20, 1976

Lobster arginine kinase [EC 2.7.3.3] contains 2 tryptophanyl residues and 9 methionyl residues. The whole carboxymethylated protein was first subjected to CNBr cleavage and the resulting fragments were isolated by gel filtration and other experimental approaches. One fragment, CB5, which contains 60 residues including the two tryptophanyl residues and two of the five cysteinyl residues of the protein, was characterized and the results are reported in this paper. The overall strategy for the establishment of the complete sequence of this fragment was based on the use of three types of peptides: (a) whole cyanogen bromide peptide CB5 which was partially characterized by automatic Edman degradation using a sequencer: 42 steps were performed out of 60 residues, (b) tryptic peptides of CB5, (c) peptides formed by cleavage of S-carboxymethylated arginine kinase (whole protein) at the two tryptophanyl residues with BNPS-skatole. The complete amino acid sequence of the CNBr polypeptide (CB5) which contains the two tryptophanyl residues of the whole protein was established.

Lobster arginine kinase [EC 2.7.3.3] from *Homarus vulgaris* muscle is representative of a group of seven guanidine phosphotransferases studied in the laboratory of the College of France at Paris (Dr. N.Y. van Thoai) (1, 2). As X-ray diffraction analysis of its structure is now well advanced in Prof. Renaud's Laboratory at Paris, we have undertaken a study of the amino acid sequence of this enzyme. Arginine kinase is composed of a single polypeptide chain with a molecular weight in the vicinity of 40,000 daltons (3-5).

<sup>1</sup> To whom all correspondence should be addressed.

Recent studies (Debuire, Regnouf *et al.*, unpublished work) on its chemical structure have shown that it contains about 329 residues with 2 tryptophanyl, 5-6 cysteinyl and 9 methionyl residues and no disulfide bridge. The N-terminal amino acid sequence is N-acetyl-Ala-Asx-Ala-Ala-Thr-... and the C-terminal amino acid sequence is ...Lys-Glu-Met-COOH.

In the previous papers (6, 7), we described the isolation and characterization of fragments which are derived from CNBr cleavage of both S-carboxymethylated (6) and S-aminoethylated (7) protein. Sequence analyses of the short peptides (6) (3

612 B: DEBUIRE, K.K. HAN, M. DAUTREVAUX, G. BISERTE, F. REGNOUF, and R. KASSAB

residues, 11 residues, 17 residues, 26 residues) are complete and preliminary results of sequence investigations have been published elsewhere (7-9).

This paper describes the characterization of the CNBr fragment (CB5) (60 residues) which contains the 2 tryptophanyl residues of the whole protein.

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials**—Arginine kinase from *Homarus vulgaris* muscle was prepared as described previously (10). Diphenylcarbamyl chloride-treated trypsin [EC 3.4.21.4] was purchased from Miles Seravac. Carboxypeptidase A [EC 3.4.12.2] treated with diisopropylphosphoridate was from Worthington Biochemical Corp. Aminopeptidase M [EC 3.4.11.2] was purchased from Sigma. Urea was purchased from Merck; the 10 M aqueous solutions were deionized as described by Duesberg (11) using resin AG-11-A-8 (Biorad). Bromide adduct of 2-(nitrophenyl-sulphenyl)-3-methylindole (BNPS-skatole), dansyl chloride, dansyl-amino acids, PTH-amino acids used as standards, maleic anhydride, citraconic anhydride, and reagents for Edman degradation (automatic and manual) were purchased from Pierce Chemical Company. Resin Chromobeads-P was obtained from Technicon. Sephadex G-15, G-50, and G-100 were products of Pharmacia (Uppsala, Sweden). Polyamide sheets were purchased from Schleicher and Schüll (Germany), and cellulose plates and silica gel plates for TLC of PTH-amino acids, DC Fertigplatten Kiesel-gel 60 F-254, from Merck.

**Isolation of CB5**—Isolation of this fragment (CB5), produced by cyanogen bromide cleavage, is reported in a previous paper (6).

**Analysis by Edman's Procedure and Identification of PTH-Amino Acids**—The type PC 100 SOCOSI sequencer (France) was used with the normal quadrol program. The experimental procedures were very similar to those reported in a previous paper (12). The PTH-amino acids were identified by TLC on silica gel in the systems D and H described by Edman (13) and in the modified system E reported by Han *et al.* (14). The PTH-amino acid spots could be visualized directly on the plate under UV light (254 nm). The silica gel plate, once dried, was dipped in a ninhydrin-collidine solution in order to confirm their identification by the specific coloration of most PTH-amino acids (15).

**Tryptic Digestion of Whole Fragment CB5 and Separation of Tryptic Peptides**—Digestion with diphenylcarbamyl chloride-treated trypsin was performed with 10 mg of CB5 (1.4  $\mu$ mol) at pH 8.85 for 2.5 h at 38°C with E/S 4% (w/w). The tryptic peptides were routinely separated on a column of Chromobeads P. Elution was performed with pyridine-formate and acetate buffer (Varigrad: 9 chambers) as described in a previous paper (16). The column eluates were automatically monitored (Technicon Autoanalyser) by ninhydrin colorimetric assay.

Peptide fractions (6 ml/tube) were pooled, lyophilized, and redissolved in water or in 1% acetic acid. Each peptide subfraction was tested by thin layer electrochromatography on a cellulose plate (20  $\times$  20 cm). Because of the small amount of tryptic peptides, only the peptides homogeneous on TL electrochromatography were kept for further characterization.

**The N-terminal Determination of Peptides**—The N-terminal determination of polypeptide CB5 was performed by the dansyl chloride procedure described by Gros and Labouesse (17), whereas the N-terminal analysis of short tryptic peptides of CB5 was performed by the dansyl chloride procedure reported by Bruton and Hartley (18). The dansyl amino acids were subsequently identified by polyamide-layer chromatographies using the solvent systems detailed by Hartley (19).

**Amino Acid Compositions**—Total acid hydrolysis was performed with whole peptide CB5 and each homogeneous tryptic peptide of CB5, using 5.6 N HCl at 110°C, in the presence of 2 drops of 5% aqueous phenol in vacuum-sealed tubes. Quantitative amino acid analyses were performed in an automatic amino acid analyzer (JEOL 5 AH and Technicon TSM 1).

**Cleavage of Whole Protein with BNPS-skatole**—Cleavage of S-carboxymethylated arginine kinase with BNPS-skatole was performed according to Eylar *et al.* (20) with some modifications. To a solution of 5.8  $\mu$ mol of S-carboxymethylated protein in 75% acetic acid (12 ml), 420 mg of BNPS-skatole (100 equivalents per tryptophan residue) and 1.150 mg of exogenous tyrosine (100 equivalents per endogenous tyrosine) were added. The reaction mixture was incubated with stirring in the dark at 20°C for 68 h. Thioglycolic acid was added to a final concentration of 4% v/v and the incubation

tion was continued for 18 h. After centrifugation (27,000 *g*) of the thick reaction mixture, the yellow supernatant was desalted by gel filtration at room temperature on two columns (4 × 100 cm) of Sephadex G-15, eluting with 50% acetic acid. The resulting peptides were either maleylated (21) or citraconylated (22) and fractionated on Sephadex G-100 as described in the legend to Fig. 3. Peptides from the Sephadex columns were detected by measuring the absorbancies at 230 nm and 280 nm. Demaleylation was performed in 5% acetic acid-1% pyridine, pH 3.5, for 1 h at 60°C and decitraconylation in 5% formic acid for 16 h at 20°C.

**Polyacrylamide Gel Electrophoresis**—Electrophoresis was carried out as reported previously (6) in 12% acrylamide, 0.2% bisacrylamide, 6.25 M urea, 0.9 M acetic acid at 3 mA/gel of 5.5 cm length for 1 h.

**Amide Determination**—The occurrence of asparagine and glutamine residues in the tryptic peptides of CB5 isolated during this study was suspected on comparing the amino acid compositions of peptides with their electrophoretic mobilities on thin layer cellulose plates at pH 6.5 (pyridine-acetic acid-water, 10:0.4:90, v/v/v). High-voltage electrophoresis was performed at 50 to 75 V/cm for 40 to 80 min. The electrophoretic mobilities of the peptides were also compared with the retention times on ion-exchange resin.

Since the occurrence of Asn and/or Gln was suspected, the peptide was digested with aminopeptidase M and the resulting free amino acids were determined by automatic column chromatographic analysis. The position of the amide and/or carboxylic residues in the peptide chain was unambiguously elucidated by Edman degradation followed by the identification of PTH-amino acids. In some cases the PTH-amino acids spots on the silica gel plate were stained with ninhydrin-collidine buffer. The specific color of Asn is yellow, Gln brown-green, Asp pink, and Glu deep brown (15). Therefore the amide distribution was identified without ambiguity.

**Sequence Analysis of BNPS-skatole Peptide (F3)**—Manual stepwise degradation of the peptide (F3) was carried out by a modification of the basic Edman procedure as described by Tarr (23) and the PTH-amino acids were identified by TLC on polyamide sheets according to Kulbe (24) and by TLC on silica gel as described by Han *et al.* (14). We checked experimental procedure for Edman

degradation reported by Tarr (23) by using the known structure of C-peptide of badger myoglobin as a standard (25). This procedure confirmed the complete structure of the C-peptide of badger myoglobin. Therefore we adopted Tarr's procedure for Edman degradation.

No sequence determination was performed on the tryptic peptides of CB5 due to the small amount of peptide materials.

**Treatment of Homoserine Lactone**—Homoserine lactone at the C-terminal position of polypeptide CB5 was converted to homoserine by the method of Ambler (26) as modified by Young *et al.* (27). The peptide CB5 was placed in a buffer at pH 6.5 (pyridine 10%; acetic acid 0.4%) and heated in an oven for 1 h at 100°C. The treated peptide was then subjected to carboxypeptidase digestion.

**Carboxypeptidase Digestion** In a typical experiment, samples (100 nmol) were dissolved in 1.0–2.0 ml of 0.1 M ammonium acetate and the pH of the solution was adjusted to 7.5 with dilute NH<sub>4</sub>OH. Carboxypeptidase A was first dissolved in 10% LiCl. 10  $\mu$ l of the solution was diluted with 50  $\mu$ l of LiCl solution and the enzymic solution (10  $\mu$ l) was added. The mixture was incubated at 30°C or at 38°C for an appropriate time. After incubation, aliquots were withdrawn from the solution and the reaction was stopped by the addition of 0.025 ml of glacial acetic acid. The solution was evaporated to dryness and the released amino acids were directly analyzed with an amino acid analyzer.

The maleylated fragment F2 was digested with carboxypeptidase A at pH 7.5 with a molar ratio E/S 1/10 before and after treatment with 15% mercaptoethanol at 30°C for 72 h under N<sub>2</sub> to convert methionine sulfoxide into methionine.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Sequence Determination of Residues 1–42**—Automatic Edman degradation of whole peptide CB5 provided the sequence of residues 1–31 without any ambiguity. Continuous running yielded the sequence from 32 to 42 with 2 gaps at positions 38 and 39, but after the 42nd cycle, the "overlapping" became significant in polypeptide degradation. Therefore we stopped the machine. The absolute theoretical yield of polypeptide degradation was more than 97% as estimated for 42 cycles out of 60 residues. However non-quantitative data on rela-





tive repetitive yields were obtained because the final PTH-derivative in each cycle was detected qualitatively by thin layer chromatography.

It is interesting to note that the 31st residue was determined to be tryptophan. This residue is the first tryptophanyl residue in CB5 and in the whole protein (Fig. 1). The sequence as determined is in agreement with the N-terminal structure from the corresponding pure tryptic peptides T2, T3, T4, T5, and T6 (Table I). As the yield or homogeneity of the tryptic peptides covering residues 32-60 was not sufficient for sequence studies, these were performed on the fragments released by BNPS-skatole cleavage of the whole protein at its two tryptophanyl residues. As these two amino acids are contained in fragment CB5, the cleavage was expected to provide material corresponding to the carboxyl-terminal region of each tryptophan. Therefore the two gaps in the sequence at positions 38 and 39 are bridged by the characterization of the BNPS-skatole fragment of the whole protein.

*Isolation and Characterization of BNPS-skatole Fragments of Intact Arginine Kinase*—Initially, BNPS-skatole was used on the CB5 peptide, but the isolation of released fragments proved to be rather difficult. Successful results were obtained by working on the S-carboxymethylated intact protein. Analytical polyacrylamide gel electrophoresis of the cleavage mixture (Fig. 2) revealed,

in addition to a small amount of residual protein, two main large components which after maleylation could be isolated by gel filtration as F1 and F2 (Fig. 3); a third peptide which could not be detected by polyacrylamide gel electrophoresis, because of its small molecular weight, was also isolated as F3. The yields of F1, F2, and F3 after BNPS-skatole cleavage, maleylation and gel filtration were 90% for F1, 80% for F2, and 30% for F3 (Table II).

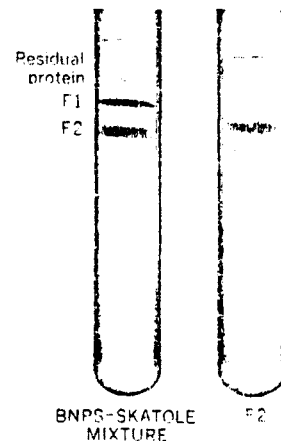


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of BNPS-skatole cleavage mixtures of S-carboxymethylated arginine kinase and isolated fragment F2.

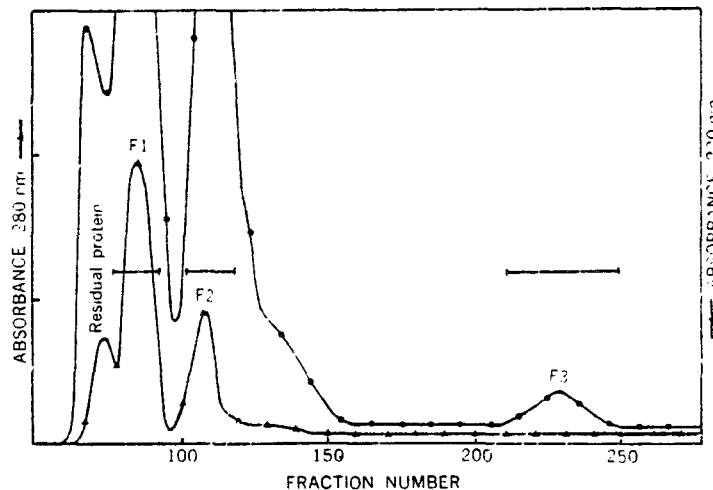


Fig. 3. Gel filtration on Sephadex G-100 of the maleylated fragments of the BNPS-skatole cleavage mixture. A 3.3 × 133 cm column was eluted with 0.05 M ammonium bicarbonate, pH 9; flow rate 25 ml/h; fraction volume 4 ml; sample size 100 mg.

616 B. DEBUIRE, K.K. HAN, M. DAUTREVAUX, G. BISERTE, F. REGNOUF and R. KASSAB

TABLE II. Amino acid compositions of arginine kinase, CB 5 and BNPS-skatole fragments.

	Arginine kinase	Fragments			Total residues			CB 5
		F1	F2	F3	F1	F2	F3	
Cys(Cm)	5	0.8 (1)	0.4 (1)		2			2
Asp	32	25.4 (25)	10.3 (10)	2.8 (3)	38			8
Thr	17	10.1 (10)	5.6 (5)	1.0 (1)	17			2
Ser	18	11.5 (12)	4.5 (5)		17			1
Hse								1
Glu	38	23.1 (23)	15.9 (16)		39			8
Pro	12	6.9 (7)	3.5 (4)	0.95 (1)	12			2
Gly	26	15.2 (15)	8.9 (9)	1.9 (2)	26			3
Ala	24	18.3 (18)	8.4 (8)	1.2 (1)	27			3
Val	18	11.2 (11)	7.8 (8)	1.2 (1)	20			3
Met	9	4.3 (5)	4.0 (4)		9			
Ile	17	9.9 (10)	7.7 (8)	1.1 (1)	19			4
Leu	31	21.3 (21)	11.3 (11)	1.1 (1)	33			4
Tyr	10	3.6 (4)	0.77 (1)	0.49 (1)	6			2
Phe	18	14.4 (14)	5.0 (5)	1.1 (1)	20			4
His	8	3.3 (3)	3.7 (4)	1.0 (1)	8			2
Lys	28	21.1 (21)	8.2 (8)	0.9 (1)	30			5
Arg	16	5.7 (6)	7.1 (7)	0.97 (1)	14			3
Trp	2	+		+	++			2
Total residues	329	207 <sup>a</sup>	115	17 <sup>a</sup>	339 <sup>a</sup>			60
Yield (%)		90	80	30				
N-terminal residue	N-Acetyl	N-Acetyl	Pro	Pro				Thr
C-terminal residue	Glu-Met		Glu-Met <sup>b</sup>					Ile-Ile-Hse

<sup>a</sup> Including tryptophan. <sup>b</sup> Methionine was released as methionine sulfoxide from the initial isolated fragment F2, and as methionine after reduction of this fragment with 15% aqueous 2-mercaptoethanol at 30°C under N<sub>2</sub> for 70-72 h.

However, although the fragmentation occurred with high selectivity, releasing only the 3 expected peptides, the procedure used did not avoid losses of amino acids sensitive to oxidation. Tyrosine and carboxymethylcysteine were recovered in 50% and 25% yield, respectively, and methionine sulfoxide is only partially converted into methionine during the reduction step, since a consistent amount of methionine sulfoxide was released in the carboxypeptidase digestion of F2. End group analysis showed F2 to have proline as the N-terminal residue, as determined by dansylation, and the sequence Glu-Met at the carboxyl end.

This last result is of particular importance since it suggests that fragment F2 occupies the C-terminal

portion of the protein, which is known to have methionine at the C-terminal end (6). In order to measure the amount of methionine which should be released from F2 by carboxypeptidase digestion, quantitative reduction of methionine sulfoxide present in this fragment was attempted. Optimal conditions for complete reduction of methionine sulfoxide into methionine were first determined by subjecting a sample of methionine sulfoxide to reduction under various experimental conditions. The best results were obtained with 15% aqueous mercaptoethanol at 30°C for 72 h (Table III). When fragment F2 was reduced under these conditions and digested with carboxypeptidase A, methionine was released as the C-terminal amino

acid with only a trace of methionine sulfoxide. On the basis of the results shown in Table IV, the sequence Glu-Met corresponds to the C-terminal structure of both the native protein and fragment

F2. Furthermore, proline was found as the N-terminal residue. Thus F2 constitutes the C-terminal portion of the protein and is derived from the carboxyl part of the second tryptophan. F1 corresponds to the N-acetylated portion of the protein and covers the amino part of the first tryptophan. F3 is left (Fig. 4). Consequently F3 and F2 were investigated to extend the sequence of fragment CB5.

TABLE III. Reduction of methionine sulfoxide to methionine. A solution of 2  $\mu$ M methionine sulfoxide in 4% thioglycolic acid-50% acetic acid (2-4 ml) in aqueous 2-mercaptoethanol (2-8 ml) was incubated under N<sub>2</sub>.

Conditions of reduction	Reduction %			
	24 h	48 h	70 h	93 h
4% thioglycolic acid in 50% acetic acid, 30°C	46	44	67	
10% aqueous 2-mercaptoethanol, 22°C	30			
15% aqueous 2-mercaptoethanol, 30°C	57	80	100	100

*Sequence Determination of Residues 32-60*—Automatic Edman degradation established the sequence from residues 1 to 42 of the whole polypeptide CB5 with gaps at positions 38 and 39. However the gaps were bridged and identified without ambiguity by the following procedures. The sequence from 32 to 60 was determined in two steps: manual Edman degradation of the intact peptide F3 provided the sequence of residues 32-48 and automatic sequencing of the N-terminal 12 residues of F2 allowed the establishment of the remaining unknown sequence of CB5 (Fig. 1).

TABLE IV. Results of carboxypeptidase A digestions of BNPS-skatole fragment F2, compared with these of native arginine kinase (Regnoui and Debuire, unpublished results).

Sample	pH of digestion	Time of digestion (h)	Amino acid released $\mu$ mol/ $\mu$ mol sample		
			Met-SO	Met	Glu
Native arginine kinase	7.8	1		0.78	
		2		1.0	
	6.0	2.5	0.95		0.97
BNPS-skatole F2 before reduction	7.5	1.5	++++		0.4
After reduction for 72 h in 15% 2-mercaptoethanol	7.5	1.5		0.17	0.24

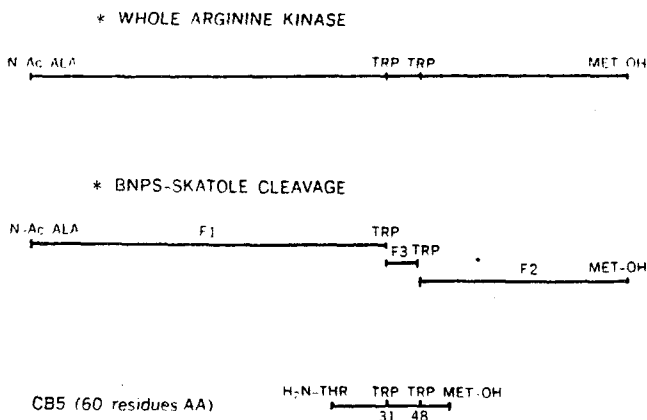


Fig. 4. Diagrammatic representation of BNPS-skatole cleavage of arginine kinase.

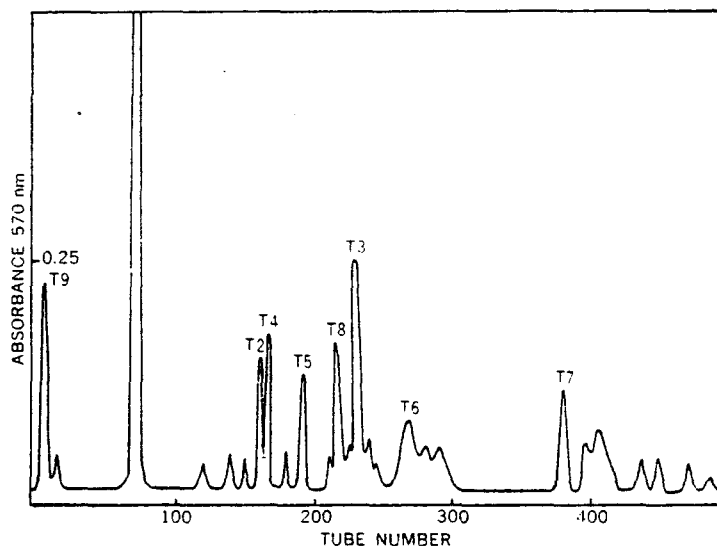


Fig. 5. Elution pattern of tryptic peptides of CB5. The tryptic digests of CB5 were applied to a column of Chromobeads P on a Technicon (0.9 × 130 cm) at a flow rate of 36 ml/h. Fractions of 6 ml were collected with an automatic collector. The elution pattern was established by means of ninhydrin assay without alkaline hydrolysis. The tryptic peptides are designated as T with a subscript corresponding to their position in the sequence, beginning at the N-terminus.

Finally, the use of BNPS-skatole for selective cleavage of the two tryptophanyl peptide bonds of arginine kinase proved to be useful in the sequence study presented in this report. The structural properties of fragments F1 and F2 were helpful in investigations on the ordering of CNBr peptides isolated from the protein.

*Isolation of Tryptic Peptides of Whole Polypeptide CB5*—The intact polypeptide CB5 was subjected to tryptic digestion and the enzymic digests were subjected to ion exchange column chromatography. The peptide subfractions were located by ninhydrin assay. Figure 5 shows the elution pattern of tryptic digests of whole peptide CB5. The isolated peptide subfractions were routinely controlled by thin layer electrochromatography on cellulose plates. Because the small amount of peptide materials, only homogeneous peptide fractions were kept for further investigations; the heterogeneous peptide fractions were discarded. Most of the tryptic peptides were homogeneous. However T1 (theoretically Thr-Lys) was not isolated. T1 might have been present

in the miscellaneous peptides fractions. Due to the small amount of peptide materials, non-preparative paper electrochromatography was performed in order to isolate pure peptide subfractions. The subfractions T2, T3, T4, T5, and T9 were homogeneous as determined by the fingerprint technique and dansylation.

The subfractions T6, T7, T8 were slightly contaminated by other peptides as revealed by fingerprints and dansylation. However the contaminant amounted to at most about 5 to 20% as determined from the amino acid composition and qualitative characterization by dansylation.

The determination of Glu, Gln, Asp, and Asn of the tryptic peptides was based in their electrophoretic mobilities on thin layer electrochromatography and their amino acid compositions after digestion with aminopeptidase M.

The yield of each tryptic peptide isolated after ion exchange chromatography is given in Table I. The maximum yield was 50% (T4) and the lowest yield was 12% (T3 and T9). The yield is based on the quantity of each tryptic peptide as determined

with the amino acid autoanalyzer.

The peptide T9 is necessarily located at the C-terminal position of whole peptide CB5 because it is the only peptide which contains homoserine. Its structure is Ser-Ile-Ile-Hse. Because the N-terminal residue is serine (established by dansylation) and the C-terminal is homoserine, the 2 residues of isoleucine were positioned by difference. This structure was confirmed by the carboxypeptidase digestion of whole peptide CB5. The peptide CB5 was treated by pyridine-acetic acid buffer at pH 6.5 at 100°C for 1 h in order to transform the homoserine lactone to homoserine before carboxypeptidase digestion. The carboxypeptidase digests were directly and quantitatively analyzed on the amino acid analyzer. The following results were obtained.

Ile: 1.00; Ile: 1.64; after digestion for 1.5 h

Ile: 1.00; Ile: 1.80; Ser: trace after digestion for 3 h

the C-terminal sequence of whole peptide CB5 is:

.....Ser-Ile-Ile-Hse.

Therefore the different experimental approaches permitted us to determine the complete amino acid sequence of peptide CB5, which contains the 2 tryptophanyl residues of the protein. Based on these results and those reported elsewhere, the sequence of about 111 residues out of 329 residues of the whole protein is now established (7-9).

This work was supported by C.N.R.S. grants (ERA 32) to Prof. Biserte and Prof. Renaud (ERA 4 CO3). The authors are indebted to Mrs. Demouveau, M. Ducatez and Mlle Hemon (Lille) for technical assistance and to Mlle G. Desvages (Paris) for performing the amino acid analyses.

REFERENCES

1. Thoai, N.V., Pradel, L.A., & Kassab, R. (1970) in *Methods in Enzymology* Vol. 17A, pp. 1002-1007, Academic Press, New York
2. Morrison, J.F. (1973) in *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), Vol. 8, 3rd Ed., pp. 457-486, Academic Press, New York

3. Thoai, N.V., Kassab, R. & Pradel, L.A. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 532-539
4. Virden, R., Watts, D.C., Watts, R.L., Gammack, D.B., & Raper, J.M. (1966) *Biochem. J.* **99**, 155-158
5. Oriol, C., Landon, M.F., & Thoai, N.V. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **207**, 514-521
6. Regnouf, F., Kassab, R., & Fattoum, A. (1974) *Eur. J. Biochem.* **44**, 67-69
7. Debuire, B., Han, K.K., Dautrevaux, M., & Biserte, G. (1975) *Int. J. Peptide and Protein Res.* **7**, 69-80
8. Han, K.K., Debuire, B., Dautrevaux, M., Biserte, G., Fattoum, A., Regnouf, F., Kassab, R., & Pradel, L.A. (1972) *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Série D. Sci. Nat.* (Paris) **274**, 324-326
9. Debuire, B., Han, K.K., Dautrevaux, M., & Biserte, G. (1974) *C.R. Acad. Sci. Paris* **279**, 101-104
10. Pradel, L.A. & Kassab, R. (1973) *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. Série D. Sci. Nat.* (Paris) **276**, 2843-2846
11. Duesberg, P.M. & Rueckert, R.R. (1965) *Anal. Biochem.* **11**, 342-361
12. Han, K.K., Tetaert, D., Moschetto, Y., & Dautrevaux, M. (1972) *Eur. J. Biochem.* **27**, 585-592
13. Edman, P. & Begg, G. (1967) *Eur. J. Biochem.* **1**, 80-89
14. Han, K.K., Planchon, B., Dautrevaux, M., & Biserte, G. (1973) *Ann. Pharm. Franç.* **31**, 539-550
15. Roseau, G. & Pantel, P. (1969) *J. Chromatog.* **44**, 392-395
16. Dautrevaux, M., Boulanger, Y., Han, K.K., & Biserte, G. (1969) *Eur. J. Biochem.* **11**, 267-277
17. Gros, C. & Labouesse, B. (1969) *Eur. J. Biochem.* **7**, 463-470
18. Bruton, J. & Hartley, B.S. (1970) *J. Mol. Biol.* **52**, 165-175
19. Hartley, B.S. (1970) *Biochem. J.* **119**, 805-822
20. Eylar, E.H., Jackson, J.J., Bennett, C.D., Kniskern, P.J., & Brostoff, S.W. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 3710-3716
21. Butler, P.J., Harris, J.I., Hartley, B.S., & Leberman, R. (1967) *Biochem. J.* **103**, 78p
22. Dixon, H.B.F. & Perham, R.N. (1968) *Biochem. J.* **109**, 312-314
23. Tarr, G.E. (1975) *Anal. Biochem.* **63**, 361-370
24. Kulbe, K.D. (1974) *Anal. Biochem.* **59**, 564-573
25. Tetaert, D., Han, K.K., Dautrevaux, M., Ducastaing, S., Hombrados, I., & Neuzil, E. (1973) *FEBS Lett.* **29**, 39-42
26. Ambler, R.P. (1965) *Biochem. J.* **96**, 32p
27. Young, M., Blanchard, M.H., & Brown, D. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **61**, 1087-1094

## DISCUSSION

-----

### I LA COUPURE CHIMIQUE PAR LE BNPS-SKATOLE

La coupure de l'arginine kinase par le BNPS-skatole du côté carboxylique des 2 résidus de tryptophanne est très spécifique (65).

Le noyau du tryptophanne est oxydé ainsi que la méthionine. Il se forme de la méthionine-sulfoxyde qui pourra ultérieurement être assez facilement réduite (66) en vue des études de séquence.

Des essais de coupure sur le peptide de 60 résidus lui-même (APK IVb) nous avaient donné des résultats médiocres en raison de la difficulté de séparer par gel-filtration des peptides de tailles relativement voisines (31, 17, 12 résidus).

Par contre la coupure de l'enzyme carboxyméthylé par le BNPS-skatole a donné des résultats remarquables ; malgré une oxydation des résidus de tyrosine et CM-cystéine, la somme des acides aminés des 3 fragments  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  est en bon accord avec la composition de la protéine totale (Tableau II dans l'article).

Nous verrons par ailleurs que l'obtention des fragments BNPS-skatole a été d'une grande utilité lors de l'établissement de l'ordre d'enchaînement des peptides au BrCN.

## II SÉQUENCE C-TERMINALE

La détermination automatique de la séquence du segment F<sub>2</sub> (peptide C-terminal), la digestion du peptide CB5 par la carboxypeptidase A et l'isolement du peptide T<sub>9</sub> obtenu par hydrolyse tryptique de CB5 avaient permis de conclure à la séquence C-terminale de CB5 (Ser-Ile-Ile-Hse).

Mais lors de la détermination de l'ordre d'enchaînement des peptides BrCN de l'arginine kinase, F. REGNOUF a isolé un peptide présentant la composition suivante :

Asx 1,0 ; Ser 1,2 ; Hse 1,1 ; Glu 2,3 ; Gly 3,1 ; Val 1,0 ;  
Met 0,17 ; Ile 2,3 ; Leu 1,1 ; Tyr 0,7 ; Arg 1,2.

Nous en avons déterminé la séquence N-terminale par dégradation d'EDMAN manuelle :

Ile-Ile-Ser-Met-Gln- (Asx<sub>1</sub>, Met<sub>1</sub>, Glu<sub>1</sub>, Gly<sub>3</sub>, Val<sub>1</sub>, Leu<sub>1</sub>,  
Tyr<sub>1</sub>) Arg.

Des études complémentaires ont montré que ce peptide était bien le peptide de jonction des peptides BrCN de 60,2 et 81 résidus (APK IVb, APK VII et APK IIIId').

La séquence définitive est donc :

Ile-Ile-Ser-Met-Gln-Met-Gly-Gly-Asp-Leu-Gly-Gln-Val-Tyr-Arg.

Peptide 60  
résidus

Peptide 81 résidus

Ceci nous donne par ailleurs des informations complémentaires sur l'ordre d'enchaînement des peptides BrCN.

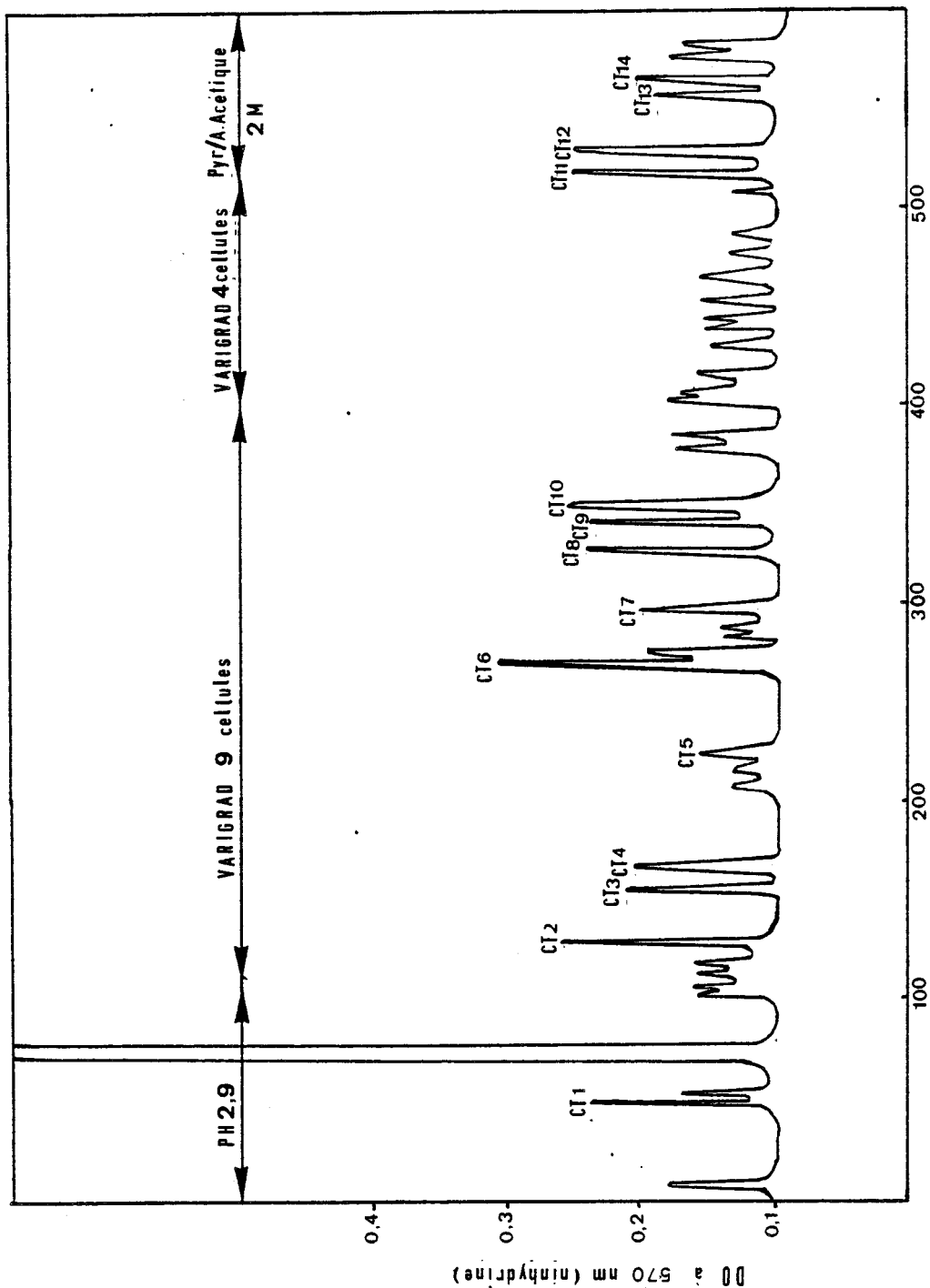


## CHAPITRE III

SÉQUENCE PARTIELLE DU PEPTIDE BRCN APK III D'  
CONTENANT LA CYSTÉINE ESSENTIELLE DE L'ARGININE  
KINASE.



figure 9

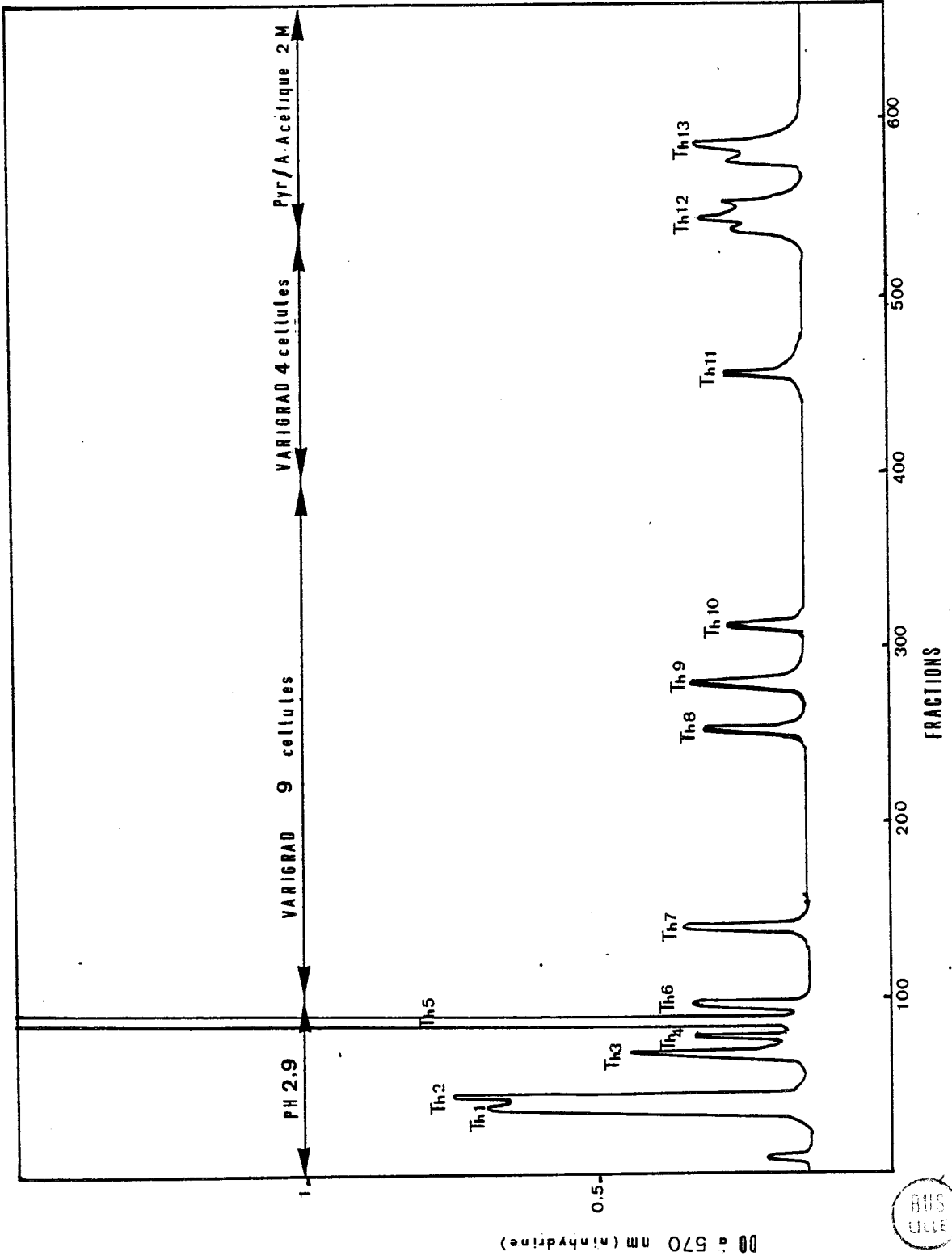


FRACTIONS

COURBE D'ELUTION DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYSIQUE DU PEPTIDE APK III d' (81 résidus d' amino-acides)

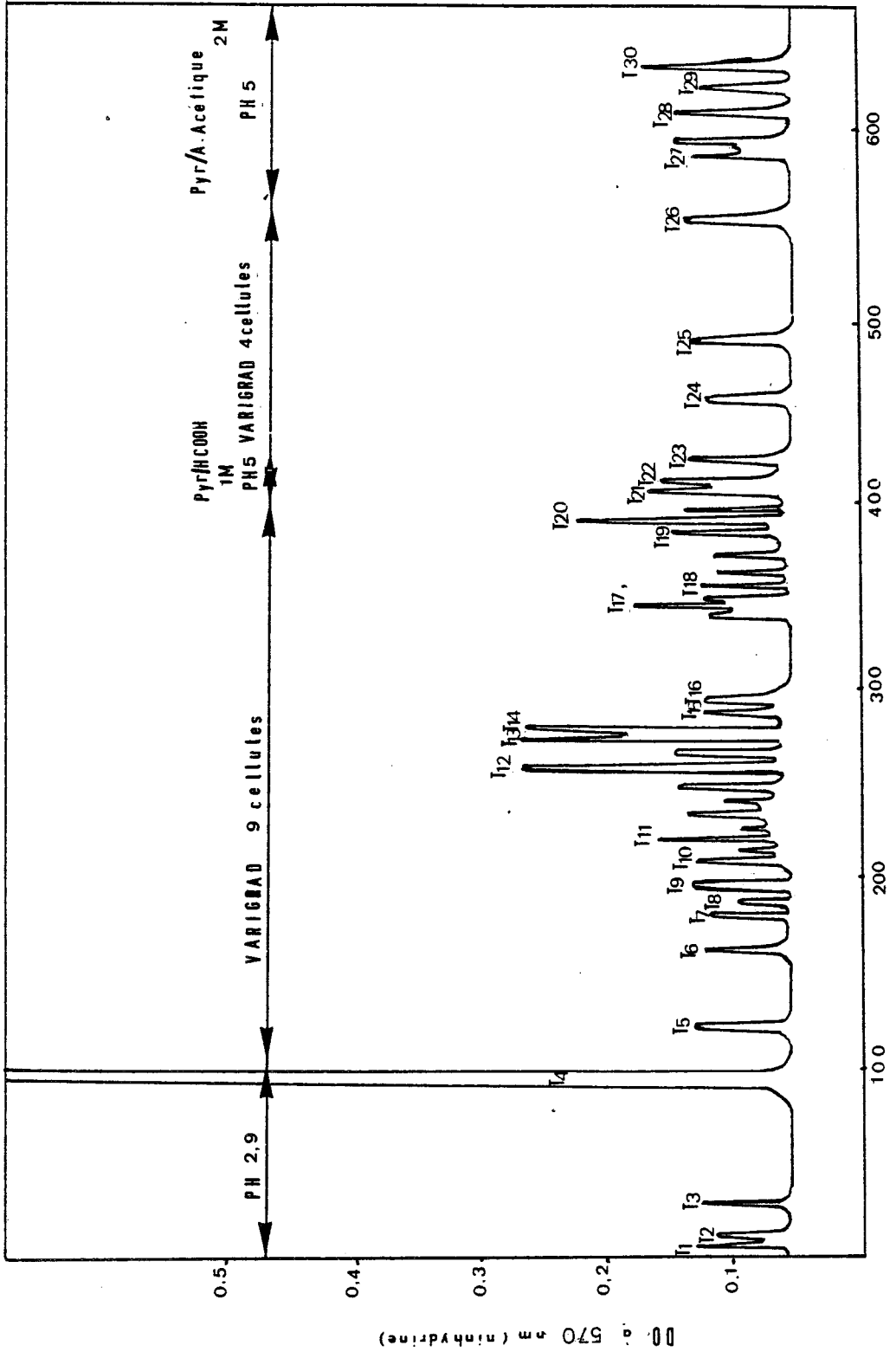


figure 10



COURBE D'ELUTION DE L'HYDROLYSAT THERMOLYSIQUE DU PEPTIDE APK III d' (81 résidus d' amino-acides)

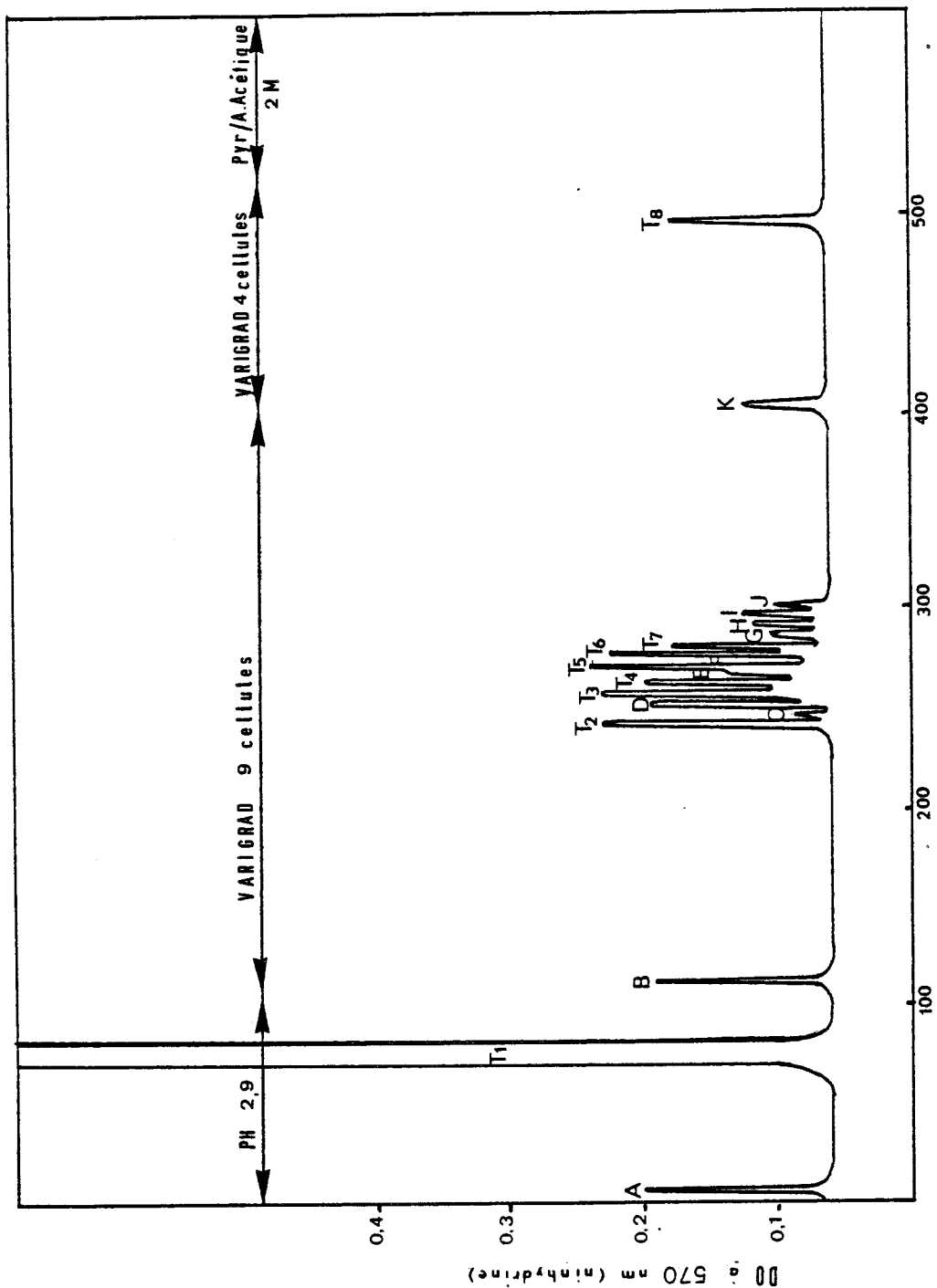
figure 11



COURBE D'ELUTION DE L'HYDROLYSAT TRYPTIQUE DU PEPTIDE APK III d' (81 résidus d'acides)



figure 12



FRACTIONS

COURBE D'ELUTION DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE (HYDROLYSE LIMITEE AUX LIAISONS ARGINYLE)

DU PEPTIDE APK III d' (81 résidus d' amino-acides)



L'hydrolyse par la trypsine a cependant permis d'isoler le peptide à cystéine essentielle dont la séquence était déjà partiellement connue (page 5 ).

Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Thr-Cys-Pro-Thr-Ser-Asn-Leu-Gly-Thr-Val-Arg.

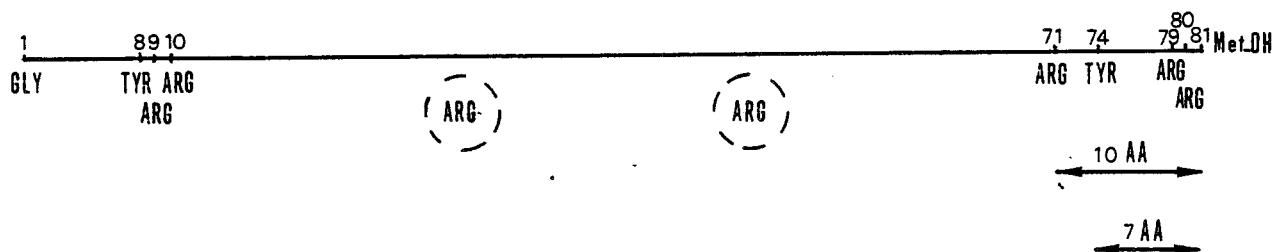
L'hydrolyse tryptique limitée n'a pas donné les résultats escomptés.

### III CONCLUSION

Les informations obtenues par F. REGNOUF grâce à des essais de coupure au niveau des tyrosines sont les suivantes :

Le peptide comporte 2 tyrosines qui se situeraient l'une du côté N-terminal, l'autre du côté C-terminal.

Schématiquement les informations que nous possédons sont les suivantes :



Par ailleurs les coupures endopeptidasiques laissent présager que le peptide à cystéine essentielle (16 résidus) se situe du côté C-terminal.

Nous pensons donc que la coupure chimique au niveau des résidus de tyrosine serait une solution permettant de résoudre le problème de la structure primaire de ce peptide.

En effet, l'isolement du peptide médian (65 résidus) et sa séquence automatique apporteraient sans doute les éléments de structure qui nous manquent encore.



## CHAPITRE IV

SÉQUENCES N ET C-TERMINALES DE  
L'ARGININE KINASE.

DÉTERMINATION DE L'ORDRE D'ENCHAÎ-  
NEMENT COMPLET DES FRAGMENTS AU  
BROMURE DE CYANOGENÈ.

## I N T R O D U C T I O N

---

### I EXTRÉMITÉ N-TERMINALE

L'arginine kinase possède une extrémité N-terminale bloquée et REGNOUF et al ont mis en évidence la présence d'un groupe acétyle à l'extrémité N-terminale de la protéine.

Le groupement acétyle a été caractérisé sous forme d'acétylhydrazide (67) à partir des hydrolysats à la pronase.

### II EXTRÉMITÉ C-TERMINALE

L'extrémité C-terminale de l'arginine kinase est occupée par un résidu de méthionine (18).

Tous les fragments BrCN possèdent l'homosérine en position C-terminale ce qui a confirmé ce résultat mais rendu impossible l'identification directe du fragment C-terminal de l'enzyme.

Il a donc fallu une connaissance approfondie des structures C-terminales de l'enzyme et des peptides BrCN afin de résoudre ce problème.

### III ORDRE D'ENCHAÎNEMENT DES PEPTIDES AU BrCN

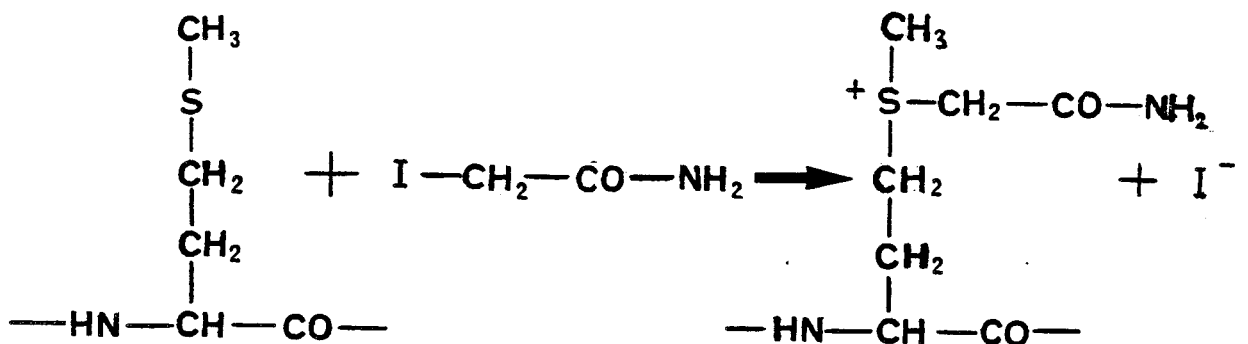
Deux méthodes ont principalement été utilisées pour obtenir l'ordre d'enchaînement des peptides BrCN.

°° La coupure de l'arginine kinase par le BNPS-skatole, comme nous l'avons vu précédemment, a fourni des indications très intéressantes.

°° Puis l'hydrolyse par la trypsine de la protéine entière et des fragments BNPS-skatole F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> a permis à F. REGNOUF d'isoler les peptides à méthionine par la méthode de l'électrophorèse diagonale sur papier (17).

Le principe de la méthode est le suivant :

L'hydrolysate trypsique est soumis à une première électrophorèse, puis les peptides sont traités sur le papier par une solution d'iodoacétamide à pH 3,5 qui convertit spécifiquement les résidus de méthionine en leurs sels de sulfonium.



Au cours de la seconde électrophorèse, à angle droit par rapport à la première direction, les peptides renfermant la carbo-  
moylméthylméthionine se détachent de la diagonale constituée par  
les autres peptides (non modifiés) de l'hydrolysat trypsique;

Nous avons déterminé la séquence de ces peptides trypsiques  
à méthionine.

L'un d'entre eux, le peptide C-terminal de la protéine,  
a été d'un abord très délicat.

Nous consacrerons la majeure partie de la discussion à  
ce problème.

PRIMARY STRUCTURE OF LOBSTER-MUSCLE ARGININE KINASE

Amino and carboxyl-terminal structure of the enzyme and  
alignment of the cyanogen-bromide peptides.

Françoise REGNOUF<sup>°)</sup> and Ridha KASSAB<sup>°)</sup>

Laboratoire de Biochimie Cellulaire, Collège de France, Paris

Brigitte DEBUIRE and Kia-Ki HAN

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Place de Verdun,  
59045 Lille-Cedex, France.

<sup>°)</sup> Present address : Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire  
CNRS, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France.

## SUMMARY

a) The acetylation state of the blocked  $\text{NH}_2$ -terminal end of arginine kinase was characterized by the occurrence of 1 mole acetyl group/mole protein ; a 5-residue segment corresponding to the amino-terminal portion enzyme was isolated from a pronase digest of the enzyme and its amino acid sequence determined as N-acetyl Ala-Asx-Ala-Ala-Thr.

b) Arginine kinase is terminated at the carboxyl end by the sequence Lys-Glu-MetOH ; this particular 3-residue sequence is repeated three times in the overall structure of the protein and is present in three CNBr fragments. On of them, a peptide of 14 amino acid residues, was identified in the course of this study and its amino acid sequence determine Its location at the COOH-terminal end of the enzyme was recognized on the basis of investigations carried out with des-Glu-MetOH arginine kinase, a specific proteolytic derivative.

c) The alignment of the eight CNBr-fragments which constitute the arginine kinase molecule was established according to the sequential and compositional properties of seven unique tryptic methionyl peptides isolated from the whole protein. The alignment was confirmed by using BNPS-skatole fragments of the enzyme as another protein source.

## INTRODUCTION

Arginine kinase from lobster muscle is the only well known monomeric ATP : guanidine phosphotransferase (1). Investigations directed towards the elucidation of the structure-function relationships in this enzyme are of special interest since its activity is linked to muscle contraction, a major physiological event, whereas, as reported recently (2,3) it may be also involved in the regulation of the glycolytic pathway in vertebrate muscle cells. Moreover this enzyme can serve as a useful model in attempts to understand the catalytic function of kinases in general and of guanidino kinases in particular. At present porcine adenylate kinase is the only phosphoryl group transferring enzyme of known primary and tertiary structure (4,5). Consequently we have undertaken a study with the aim to elucidate the complete amino acid sequence of arginine kinase. X-ray diffraction studies are in progress to determine the three-dimensional structure of the enzyme as well (6). First, we have described the isolation by different experimental approaches and the characterization of the fragments produced by cyanogen bromide cleavage of S-carboxymethylated and S-aminoethylated arginine kinase (7,8) ; these were seven major peptides of 2, 11, 17, 24, 60, 81 and 103 amino acid residues and one overlap of about 87 residues. More recently we have reported the isolation and characterization of the 3 fragments formed by cleavage of the protein at its two tryptophanyl residues with BNPS-skatole ; these peptides were used to supplement the sequence

performed on the isolated CNBr-fragments (9). The present work extends further our knowledge on the primary structure of arginine kinase and provides the information concerning three important structural features of the enzyme : the acetylation state and amino acid sequence of the amino-terminal portion, the identification and amino acid sequence of a new CNBr peptide which occupies the carboxyl terminus and the alignment of all the CNBr fragments which constitute the intact protein.

#### Experimental procedure

##### Material

Arginine kinase (EC 2-7-3-3) was prepared as previously described (10). Pronase was from Serva. Diphenylcarbonyl chloride-treated trypsin, and carboxypeptidase A and B treated with diisopropylphosphoridate were from Worthington. Acetate kinase, pyruvate kinase were purchased from Bohringer and lactate dehydrogenase from Calbiochem. N-acetylalanine was obtained from Sigma. Dowex 50 X2, 200-400 mesh was from Bio-Rad.

##### Enzymic cleavages

Digestion with pronase. 2  $\mu$ moles of heat denatured protein were digested with 8 mg of pronase in 8 ml 0.05M ammonium bicarbonate pH 8.1 at 37°C for 5 or 24 h. The digest adjusted to pH 4 with 6N HCl was applied on a Dowex 50 X2 (H<sup>+</sup>) column (1.1 cm x 12 cm) which was developed with water (6 vol.). The eluate was lyophilized and the residue dissolved in water : this solution was referred to as "unretarded Dowex 50 fraction".



Tryptic digestion and isolation of methionine peptides. Digestion of S-carboxymethylated protein and of fragments F1 and F2 was carried out in 0.2M ammonium bicarbonate buffer pH 8.6 (10mg/ml) at 37°C for 24h with E/S = 2 % (w/w). Methionine peptides were isolated by the diagonal electrophoretic method according to Tang & Hartley (11).

Digestion with carboxypeptidases. The digestion of N-acetylated peptides with carboxypeptidase A was performed at pH 7.5 in 0.2M ammonium bicarbonate 5 h at 30°C with a molar ratio E/S = 1/10, and at pH 6 in 0.4M ammonium acetate 3 h at 30°C with E/S = 1/5. After each digestion the mixture adjusted to pH 4 was applied on a Dowex 50 column. The digestion of native and S-carboxymethylated arginine kinase was performed first with carboxypeptidase A at pH 6 in 0.01M ammonium acetate, 1 % SDS, 2 h at 30°C with E/S = 1/5 ; the pH of the reaction mixture was brought to 7.5 with 1M Tris and the digestion was continued with carboxypeptidase B at 30°C with E/S = 1/15. The reaction were stopped by lowering the pH to about 4 with acetic acid. The digestion of CNBr fragment CB8 was performed in the same conditions in the absence of SDS. The other CNBr peptides were treated with carboxypeptidases A and B at pH 7.5 in 0.05M Tris-HCl, 1 % SDS. Before digestion homoserine lactone was converted to homoserine as previously reported (7).

Preparation and CNBr cleavage of des-MetOH-Glu-arginine kinase.

S-carboxymethylated and citraconylated arginine kinase (2  $\mu$ moles) was digested with carboxypeptidase A at pH 7.3 in 0.05M Tris HCl 3 h at 30°C with E/S = 1/10. Amino acid analysis of the digest showed the

removal of methionine (0.7 mole) and glutamic acid (1.1 mole). The digest was immediately applied onto a Sephadex G-100 column (4 x 56 cm) equilibrated with 0.05M ammonium bicarbonate, pH 9. Des-MetOH-Glu-arginine kinase emerged in the first 200 to 280 ml of eluate followed by carboxypeptidase A which was eluted after 360 ml of eluate. Although arginine kinase and carboxypeptidase have very similar molecular weight, their separation could be easily achieved on the basis of the large difference in their stoke radius introduced by the acylation state of the kinase. Des-MetOH-Glu-arginine kinase was decitraconylated (9), and characterized by the presence of lysine at the C-terminal after carboxypeptidase B digestion. Des-MetOH-Glu-arginine kinase was cleaved by cyanogen bromide and the fragments CB1 and CB2 were isolated as previously described (7):

#### Characterization and estimation of acetyl group

The acetyl group was characterized as acetyl hydrazide (7) by cellulose thin layer chromatography using 0.02 to 0.04 umole of "unretarded Dowex 50 fraction". The acetate kinase micromethod of Kuo et al (12) was used for the quantitative estimation of acetate in arginine kinase with the following modifications in the final concentration of the reagents : 70 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, 5.4 mM ATP and 0.3 mM NADH. Calculations were based on a molecular weight of 37,000 (7).

#### Carboxymethylation and aminoethylation

These chemical modifications were performed as previously described (7, 8).

### Citraconylation

The procedure was carried out according to Dixon and Perham (13) in 4M urea ; the reaction mixture was desalted on Sephadex G-15 in 0.1M ammonium hydroxide.

### BNPS-skatole cleavage

Cleavage of S-carbomethylated arginine kinase with BNPS-skatole, and isolation of the resulting fragments F1 and F2 were performed as previously reported (9). Before use, methionine sulfoxides in each fragment were converted to methionine as described earlier (9).

### Preparative and analytical electrophoresis

Thin layer and paper electrophoresis were performed as previously reported (7). In the preparative runs the peptide bands were eluted with one of the following solutions 0.01N HCl, 10 % acetic acid, pyridine acetic buffer pH 6.5 or 50 % pyridine. Peptides were located with fluorescamine (0.01 % in acetone) or with a ninhydrin cadmium spray followed by hypochlorite reagent (7).

The net charge of N-acetyl amino acid and peptides was determined relative to aspartic acid at pH 6.5 according to Offord (14).

### Amino acid analysis and sequence determinations

Amino acid analysis were performed as reported earlier (7) using a Technicon TSM 1 autoanalyzer. Before and after acid hydrolysis, peptides containing S-carboxymethylated methionine were treated according to Tand and Hartley (11).

Amino acid sequence determinations were performed by manual

and automatic Edman's procedure as previously reported (9). The carboxyl-terminal peptide was sequenced after opening of the pyrrolidone ring with 1N HCl at 100°C for 10 min (15).

## RESULTS

### Characterization and estimation of the acetyl group

Acetylhydrazide from arginine kinase was identified in the "unretarded Dowex 50 fraction" in both the 5h and 2½ h digests ; a pronase control showed no acetylhydrazide. 0.95 mole of acetyl group per mole of arginine kinase was found by the acetate kinase micromethod (Fig. 1) ; this value was obtained after correction for the 80 % yield we found with a standard acetate solution.

### N-terminal structure of arginine kinase

N-acetylated peptides were isolated from the "unretarded Dowex 50 fraction" obtained after 5h pronase hydrolysis of the protein ; a short digestion time was selected in order to reduce the release of pyroglutamyl peptides and pyroglutamic acid contaminants which were observed in 24h hydrolysate. Amino acid analysis of the "unretarded Dowex 50 fraction" showed the presence of two main amino acids, aspartic acid and alanine in a molar ratio 1:3 (Table 1). From this fraction, 4 components reactive with the hypochlorite reagent but not with ninhydrin, were identified by electrophoresis at pH 6.5 (Fig. 2). They were isolated by cellulose thin layer electrophoresis at pH 6.5 and 3.9, and their amino acid composition and net charge were established (Table 1) ; the results indicated that they were 4 acetylated peptides deriving from each other. The peptide mixture was treated by carboxypeptidase A at pH 7.5 and

the digest applied to a Dowex 50 column ; amino acid analysis of the effluent showed that the ratio of aspartic acid to alanine had changed to 1:2 (Table 2A). This "CPA unretarded Dowex 50 fraction" was submitted to a second carboxypeptidase A treatment at pH 6 and the digest was again filtered on Dowex 50. The effluent analysed by electrophoresis at pH 6.5 was found to contain 2 components which were isolated and analysed. Table 2B shows component a to be alanine with a mobility similar to a standard acetylalanine, while component b contained one alanine and one aspartic acid residues. It can be concluded that component a is acetylalanine and component b is a dipeptide acetyl-Ala-Asp identical to component 1 of the initial "unretarded Dowex 50 fraction" (Table 1). Consequently the amino acid sequence of the 3 other acetyl peptides already identified in this fraction (Fig. 2) could be easily deduced : component 2 : acetyl-Ala-Asp-Ala ; component 3 : acetyl-Ala-Asp-Ala-Ala and component 4 : acetyl-Ala-Asx-Ala-Ala-Thr. In this last peptide Asx was probably asparagine since the net charge was -1 (Table 1) ; extensive deamidation of this residue might have occurred during peptide preparation.

Isolation and amino acid sequence of the carboxyl-terminal fragment of arginine kinase.

We have determined earlier (7) the COOH-terminal sequence of the enzyme as Glu-MetOH. The presence of methionine at the end of the protein did not allow direct identification of the CNBr fragment located at the C-terminal portion. Consequently in order to gain further structural information the carboxyl-terminal sequence of the protein

was again investigated using carboxypeptidase A digestion at pH 6 followed by carboxypeptidase B treatment at pH 7.5. Lysine was quantitatively released from native and S-carboxymethylated protein after methionine and glutamic acid (Table 3) ; thus we ascribe the C-terminal sequence as Lys-Glu-MetOH. Unfortunately two CNBr peptides among the eight that we have analysed in regard to their C-terminal end (see also Table 6) namely 11 and 17 residue fragments CB1 and CB2 presented the above C-terminal sequence. In order to identify which one is the C-terminal peptide, use was made of des-MetOH-Glu-arginine kinase, the cleavage of which with CNBr was thought to provide the C-terminal fragment devoided of glutamic acid and homoserine. Fragments CB1 and CB2 were therefore isolated from this new protein material and analysed. The amino acid composition of the two peptides were found unchanged with the presence of quantitative amounts of homoserine in each peptide. This important result indicated that neither CB1 nor CB2 were the C-terminal fragment of arginine kinase, and this latter has not yet been isolated. Consequently a new cyanogen bromide hydrolysate of S-amino-ethylated arginine kinase was fractionated on Sephadex G-75 as previously reported (8). The fractions V and VI were analysed by chromatography and electrophoresis at pH 3.9 on thin layer cellulose ; while fraction V contained only the expected peptide material corresponding to the 25-residue fragment CB3, fraction VI showed in addition to the known fragments CB1 and CB2 the presence of two new components reactive with the hypochlorite reagent but not with ninhydrin (fig. 3). They were isolated by paper chromatography and electrophoresis at pH 3.9 ; they had the same amino acid composition

(Table 4) and represented a new fragment of 14 residues with pyroglutamic acid at the N-terminal end. The two components are probably the homoserine and homoserine lactone forms of the fragment. The complete sequence of this peptide (referred to as CB8) was established by manual Edman degradation and carboxypeptidases A and B digestion (Table 4). The originality of this fragment and its location at the carboxyl-terminal portion of the protein were further supported by results obtained during the establishment of the order of the CNBr fragments.

#### Ordering of the CNBr fragments of arginine kinase

The ordering of CNBr fragments of arginine kinase was determined on the basis of the amino acid sequences and amino acid composition of the methionyl peptides isolated from tryptic digests of two protein materials : the whole protein molecule and the BNPS-skatole fragments F1 and F2 previously described (9).

Isolation and characterization of methionine peptides from tryptic digests of arginine kinase. Fig. 4 shows the pH 6.5 "methionine diagonal" of a tryptic digest of S-carboxymethylated arginine kinase : 10 peptides lie off the diagonal ; they were isolated and purified by subsequent electrophoresis at pH 6.5 and 3.9. Their amino acid compositions and for most of them the partial or complete amino acid sequences were determined (Table 5). They were positioned according to the structural information available concerning the amino and carboxyl-terminal sequences of all the CNBr fragments (Tables 6, 7).

T2a and T2b : these two peptides have the same amino acid composition, their N-terminal sequence shows that they represent overlapping material of fragments CB1 and CB2.

T3 : its amino acid sequence shows without ambiguity that it connects the fragments CB2 and CB3.

T4 : the C-terminal portion of the sequence of this material, Thr-Gly-Met-Thr-Lys allows to locate fragment CB3 at the N-terminal end of CB5. This positioning is in accord with the presence in the CNBr digest of an overlap peptide that we have shown earlier to be CB3-CB5 (7) and which was issued from incomplete cleavage of the Met-Thr bond.

T5a, T5b, T5c : these three peptides have the same amino acid composition, each containing 2 methionines which are found during amino acid analysis as homoserine and methionine, the ratio of which is different in each peptide ; this suggests that they arise from differences in the relative extent of carboxymethylation of the two methionine residues.

The position of T5 is assigned according to the amino terminal sequence of the BNPS-skatole fragment F2 (Table 7). This sequence starts from the C-terminal-12-residue sequence of CNBr fragment CB5 and extends to the N-terminal portion of CNBr fragment CB6 ; the two fragments are joined by the sequence -Gln-Met- (Table 7) which is that of a short CNBr peptide identified earlier and that we now refer to as CB9 (8). Thus T5 which contains two methionine residues includes the latter peptide and covers the region between CB5 and CB6.



T6 : The amino acid sequence of this peptide is identical to that corresponding to the first 12 residues of the CNBr C-terminal fragment CB8 described above, but with methionine at the N-terminal end ; this result indicates the presence of a basic residue preceding methionine. Only fragments CB7 and CB6 have the sequence Arg-Hse at the C-terminus. CB7 is N-acetylated and occupies the N-terminal part of the protein ; therefore T6 provides the material which connects CB6 and CB8.

T7 : On the basis of its amino acid composition, the presence of glutamic acid at the N-terminus and its electrophoretic mobility before and after carboxymethylation, the sequence of this peptide is Glu-Met. It represents clearly the C-terminal end of CB8 and that of the whole protein.

T1 : Is composed of the first 9 residues of CB1 and one methionine ; it can be positioned only between CB7 and CB1.

Characterization of methionine peptides from tryptic hydrolysates of BNPS-skatole fragments F1 and F2.

F1 and F2 occupy respectively the NH<sub>2</sub> and COOH-terminal portions of the protein and contain all the methionine residues (9). pH 6.5 "methionine diagonals" of tryptic digests of these two materials were used to confirm the positioning of the methionine peptides. Fig. 5 shows the results obtained : F1 give the expected 4 peptides T1, T2, T3 and T4. F2 contains three main peptides corresponding to T5, T6 and T7 ; T5 is present in different forms (T5a, b, c and d) which show the same amino acid composition as noticed above for the same material isolated from the whole protein.

Consequently F1 is composed of CNBr fragments CB7, CB1, CB2, CB3 and the thirty first residues of CB5, while F2 contains the twelve last residues of CB5, and the fragments CB9, CB6 and CB8 (Table 7).

## DISCUSSION

In the present work three important structural properties of arginine kinase have been defined : the acetylation state of its N-terminus, the identification and amino acid sequence of the CNBr fragment located at its C-terminal end and the linear arrangement of all the CNBr peptides which build up the entire protein molecule. We shall comment these three aspects of our investigation with special emphasis on the unusual difficulties we have met.

N-acetylalanine was identified at the amino-terminal end of a 5-residue segment : N-acetyl Ala-Asx-Ala-Ala-Thr which was released by pronase digestion as a mixture of N-acetylated di-, tri-, tetra- and pentapeptides. The amount of aspartic acid present in this mixture was nearly equal to that of the starting protein indicating that the acetylated material arose only from arginine kinase. These peptides are also normal products of pronase which does not readily cleave polyalanyl as well as aspartyl peptide bonds (16). To obtain the complete sequence of the segment only determination of its N-terminus as acetyl-Ala or acetyl-Asp was required. This was not achieved easily as the peptides proved to be refractory to further proteolysis by other proteases. Only repeated degradations of the peptide mixture by CPA resulted finally in the liberation of sufficient amount of acetyl-Ala. The data confirm our earlier findings indicating the presence of an acetyl group at the NH<sub>2</sub> terminus of the CNBr fragment CB7 (7).

Several serious problems were faced and fortunately resolved when we have been concerned with the carboxyl-terminal structure of

arginine kinase. The unusual presence of methionine at the C-terminal end of the protein prevented direct identification of the C-terminal CNBr fragment since all the CNBr peptides were terminated with homoserine. Furthermore, the 3-residue C-terminal sequence of the protein, Lys-Glu-MetOH that we used to recognize the C-terminal peptide proved to be repeated three times in the overall sequence of the protein. Of particular value was the use of des-Glu-MetOH arginine kinase, a new protein specie issued from selective digestion of the enzyme at neutral pH by CPA (7), the study of which led us to identify the actual C-terminal material as a new 14-residue CNBr fragment. This peptide escaped characterization earlier owing to the fact that its N-terminus was blocked as pyrrolidone carboxylic acid. Indeed glutamine was its original N-terminal residue as indicated by the amino acid sequence of the overlapping tryptic peptide T6 which includes the NH<sub>2</sub>-terminal portion of this fragment.

Seven unique methionyl peptides one of which containing two methionine residues (T5) were liberated by tryptic cleavage of arginine kinase. This result was ascertained at the level of the isolated BNPS-skatole fragments F1 and F2 which represent the quasi totality of the protein and contain all the methionines (9). The methionyl peptides provided the overlapping material corresponding to the eight CNBr fragments constituting the enzyme molecule. Although T1 and T6 had methionine at the N-terminus, their correct positioning is supported by their presence respectively in the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal fragments F1 and F2 and also by the results obtained with des-Glu-

MetOH arginine kinase indicating CB1 and therefore T1 to be located in the inner part of the protein, leaving CB8 and consequently T6 as C-terminal materials. The tryptic peptides were also helpful as additional material that we used to check many individual portions of the sequence of the isolated CNBr fragments. Thus, the sequence information given by T5 showed the exact sequence of the C-terminus of CB5 to be Ile-Ile-Ser-Hse instead of Ser-Ile-Ile-Hse found previously (9). Position 11 in the sequence of CB8 was attributed by difference to a glutamic acid residue ; this assignment was in accord with the compositional and sequential properties of T6 and T7. No overlapping peptide could be found which accounts for the 39-residue peptide CB4 identified earlier (6) but in very low yield (about 3 %). This material appears to be a minor component not belonging to the protein. The eight CNBr fragments we have aligned comprise about 320 amino acid residues with a calculated molecular weight of 36,100 ; these values are in good agreement with those estimated previously on the intact protein (7).

Finally the two tryptophanyl residues at position 191 and 208 are of particular interest in regard to the catalytic behaviour of the enzyme. Interaction of nucleotide substrates with arginine kinase as well as with creatine kinase is accompanied by a specific alteration of the microenvironment of tryptophanyl side chains which has been studied by different spectroscopic methods (17,18,19). This observation may lead to the assumption that tryptophanyl residues are being present at or near the nucleotide binding site. Some insight into a possible role of these residues in arginine kinase can emerge by

evaluating their eventual position in the secondary structure of the protein. A Chou-Fasman analysis (20) of the sequence of residues 106-231 (Table 7) leads to the prediction that the two tryptophan residues should be part of a large  $\beta$ -pleated sheet formed by the region between residues 187-231. Further sequential information will help to precise any involvement of this region in the nucleotide binding domain of the enzyme.

Figure 1 : Quantitative estimation of acetyl group in arginine kinase with acetate kinase. The amount of NADH oxidized was converted into acetyl equivalents.

Figure 2 : Electrophoresis on thin layer cellulose at pH 6.5 of the "unretarded Dowex 50 fraction" after 5 h pronase digestion of arginine kinase. Staining with the hypochlorite reagent. S = sample ; P = pyroglutamic acid.

Figure 3 : Cellulose thin layer peptide map of fraction VI isolated from CNBr hydrolysate of arginine kinase (4). 1. Chromatography in butanol-pyridine-acetic acid-water (15:10:3:12, by vol.), 2. electrophoresis at pH 3.9 (50 V/cm, 30 min) . Hatched spots reactive with hypochlorite reagent white spots reactive with ninhydrin and hypochlorite reagent.

Figure 4 : Methionine diagonal (pH 6.5/pH 6.5) pattern of a tryptic digest of S-carboxymethylated arginine kinase.

Figure 5 : Methionine diagonal (pH 6.5/pH 6.5) patterns of a tryptic digest of BNPS-skatole fragments F1 and F2.

REFERENCES

1. Morrison, J.F. (1973) in *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) vol. 8, 3rd. ed., pp 457-486, Academic Press, New York.
2. Storey, K.B. (1976) *Eur. J. Biochem.* 70, 331-337.
3. Storey, K.B. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 518-526
4. Heil, A., Müller, G., Nodal, L., Pinder, T., Schirmer, H., Schirmer, I. & von Zabern, I. (1974) *Eur. J. Biochem.* 43, 131-144
5. Schulz, G.E., Elzinga, M., Marx, F. & Schirmer, R.H. (1974) *Nature* 250, 120-123.
6. Berthou, J., Rerat, C., Rerat, D., Cadet, A., Fourme, R., Renaud, M., Dubord, C., Pradel, L-A., Roustan, C. & Thoai, N.V. (1975) *J. Mol. Biol.* 95, 331-333
7. Regnouf, F., Kassab, R. & Fattoum, A. (1974) *Eur. J. Biochem.* 44, 67-79
8. Debuire, B., Han, K.K., Dautrevaux, M. & Biserte, G. (1975) *Int. J. Peptide Res.* 7, 69-80
9. Debuire, B., Han, K.K., Dautrevaux, M., Biserte, G., Regnouf, F. & Kassab, R. (1977) *J. Biochem.* 81, 611-619
10. Pradel, L-A. & Kassab, R. (1973) *C. R. Acad. Sci. Paris, sér. D*, 276, 2843-2846
11. Tang, J. & Hartley, B.S. (1967) *Biochem. J.* 102, 593-599
12. Kuo Su, C. & Younathan Ezzat, S. (1973) *Anal. Biochem.* 55, 1-8.
13. Dixon, H.B.F. & Perham, R.N. (1968) *Biochem. J.* 109, 312-314
14. Offord, R.E. (1966) *Nature* 211, 591-593
15. Erickson, R.P. & Steers, E. Jr. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37, 736-743

16. Trop, M. & Birk, Y. (1970) *Biochem. J.* 116, 19-25
17. Roustan, C., Kassab, R., Pradel, L-A. & Thoai, N. V. (1968)  
*Biochim. Biophys. Acta* 167, 326-338
18. Roustan, C., Pradel, L-A., Kassab, R., Fattoum, A. & Thoai, N. V.  
(1970) *Biochim. Biophys. Acta* 206, 369-379
19. Kägi, J. H. R., Ting-Kai Li & Vallee, B. L. (1971) *Biochem.* 10,  
1007-1015
20. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1974) *Biochem.* 13, 222-244



TABLE 1

Amino acid analyses of the "unretarded Dowex 50 fraction" from 5h pronase digest, and of the 4 components deriving from it

Amino acid	"Unretarded Dowex 50 fraction"	Component 1	Component 2	Component 3	Component 4
Aspartic acid	1.25	1.25	0.85	1.0	0.96
Threonine	0.19				0.93
Glutamic acid	0.37	0.39	0.3	0.12	0.15
Glycine	0.13	0.56	0.4	0.23	0.4
Alanine	3.0	1.0	2.0	3.0	3.0
Amino acid Composition suggested		(Asp 1, Ala 1)	(Asp 1, Ala 2)	(Asp 1, Ala 3)	(Asp 1, Ala 3, Thr 1)
Mobility	1.28		1.12	0.86	0.53
Net charge	- 2		- 2	- 2	- 1

TABLE 2

- A. Amino acid composition of the "CPA unretarded Dowex 50 fraction" obtained after digestion at pH 7.5.
- B. Amino acid composition of two components isolated from the "CPA unretarded Dowex.50 fraction" obtained after digestion at pH 6.

Amino acid	A	B	
		component a	component b
Aspartic acid	1.28		1.03
Alanine	2.0	1.0	1.0
Glutamic acid	0.34		
Glycine	0.13		
Mobility		0.91	1.28
Net charge		- 1	- 2

TABLE 3

Digestion of native and S-carboxymethylated arginine kinase with carboxypeptidases A and B. Aliquots were analysed at different times after addition of carboxypeptidase B to the reaction mixture containing carboxypeptidase A (see experimental procedure). Values are expressed in  $\mu\text{mol}$  amino acid released/ $\mu\text{mol}$  protein.

Protein sample	Time of digestion in presence of car- boxypeptidase B (min.)	Amino acid released				
		Met	Glu	Lys	Ile	Leu
S-carboxymethylated protein	18	0.78	1.07	0.43	0.14	0.14
	35	0.84	1.03	0.7	0.25	0.35
	60	0.87	1.13	0.83	0.32	0.47
	180	0.72	1.01	0.8	0.42	0.5
Native protein	40	0.83	1.04	0.48	0.19	0.39
	80	0.94	1.25	0.67	0.33	0.53
	140	0.97	1.19	0.8	0.42	0.7



TABLE 4

Amino acid composition and complete amino acid sequence of the C-terminal CNBr fragment CB8.

A. Amino acid composition of the two isolated components

B. Amino acid sequence of CB8 :—→ manual Edman degradation, ←— carboxypeptidase A and B digestion.

A.

	Component 1	Component 2
Asp	0.97 (1)	0.93 (1)
Thr	0.39	0.4
Ser	0.28	
Hse	1.0 (1)	1.0 (1)
Glu	3.66 (4)	4.07 (4)
Gly	1.69 (2)	1.72 (2)
Ala	0.46	
Val	0.32	
Ile	2.7 (3)	2.29 (2)
Leu	2.18 (2)	2.01 (2)
Phe	0.38	0.28
Lys	1.96 (2)	1.74 (2)

B.

PyroGlu-Asp-Gly-Ile-<sup>5</sup>Leu-Gly-Leu-Ile-<sup>10</sup>Lys-Glu-Glu-Lys-Glu-<sup>14</sup>Hse



TABLE 5

Amino-acid compositions, complete or partial amino-acid sequences of tryptic methionine peptides of S-carboxymethylated arginine kinase. —→ manual Edman degradation. \* determined by dansyl method.

Tryptic methionine peptides	Amino-acid compositions, complete or partial amino-acid sequences
T1	Thr 0.98, Hse 0.54, Glu 2.4, Gly 1.2, Ala 1.1, Val 1.2, Leu 1.3, Phe 1.0, Lys 1.0
T2a, T2b	CMCys 0.96, Asp 1.4, Thr 1.0, Hse 0.9, Glu 3.9, Pro 1.7, Gly 1.6, Ala 1.1, Leu 1.3, Tyr 1.5, Phe 1.1, Lys 1.1 <u>Glu-Met-Glu-Gly-Phe</u> (Glu <sub>2</sub> ,Pro <sub>2</sub> ,Tyr <sub>2</sub> ,Ala <sub>1</sub> ,Leu <sub>1</sub> ,Thr <sub>1</sub> ,CMCys <sub>1</sub> ,Asp <sub>1</sub> )Lys
T3	Hse 1.0, Glu 2.9, Lys 1.07 <u>Glu-Met-Glu-Glu-Lys</u>
T4	Thr 1.8, Ser 0.97, Hse 1.0, Pro 0.85, Gly 1.9, Leu 1.2, Tyr 0.76, Phe 1.0, Lys 1.0 <u>Gly-Ser-Tyr-Phe-Pro-Leu-Thr-Gly-Met-Thr-Lys</u>
T5a, T5b, T5c	Asp 1.0, Ser 1.2, Hse 1.9, Glu 2.3, Gly 3.1, Val 1.0, Met 0.17, Ile 2.3, Leu 1.1, Tyr 0.7, Arg 1.2 <u>Ile-Ile-Ser-Met</u> (Asp <sub>1</sub> ,Met <sub>1</sub> ,Glu <sub>2</sub> ,Gly <sub>3</sub> ,Val <sub>1</sub> ,Leu <sub>1</sub> ,Tyr <sub>1</sub> )Arg
T6	Asp 1.16, Hse 0.71, Glu 2.8, Gly 1.4, Ile 2.3, Leu 2.2, Lys 1.4 <u>Met-Gln-Asp-Gly-Ile-Leu-Gly-Leu-Ile-Lys-Glu-Glu-Lys</u>
T7	Hse 1.0, Glu 0.9
	*Glu-Met

TABLE 6

Amino and carboxyl-terminal sequences of CNBr fragments of arginine kinase.

a. determined by manual Edman degradation.

b. determined by automatic Edman degradation.

c. determined by carboxypeptidase A and B digestion.

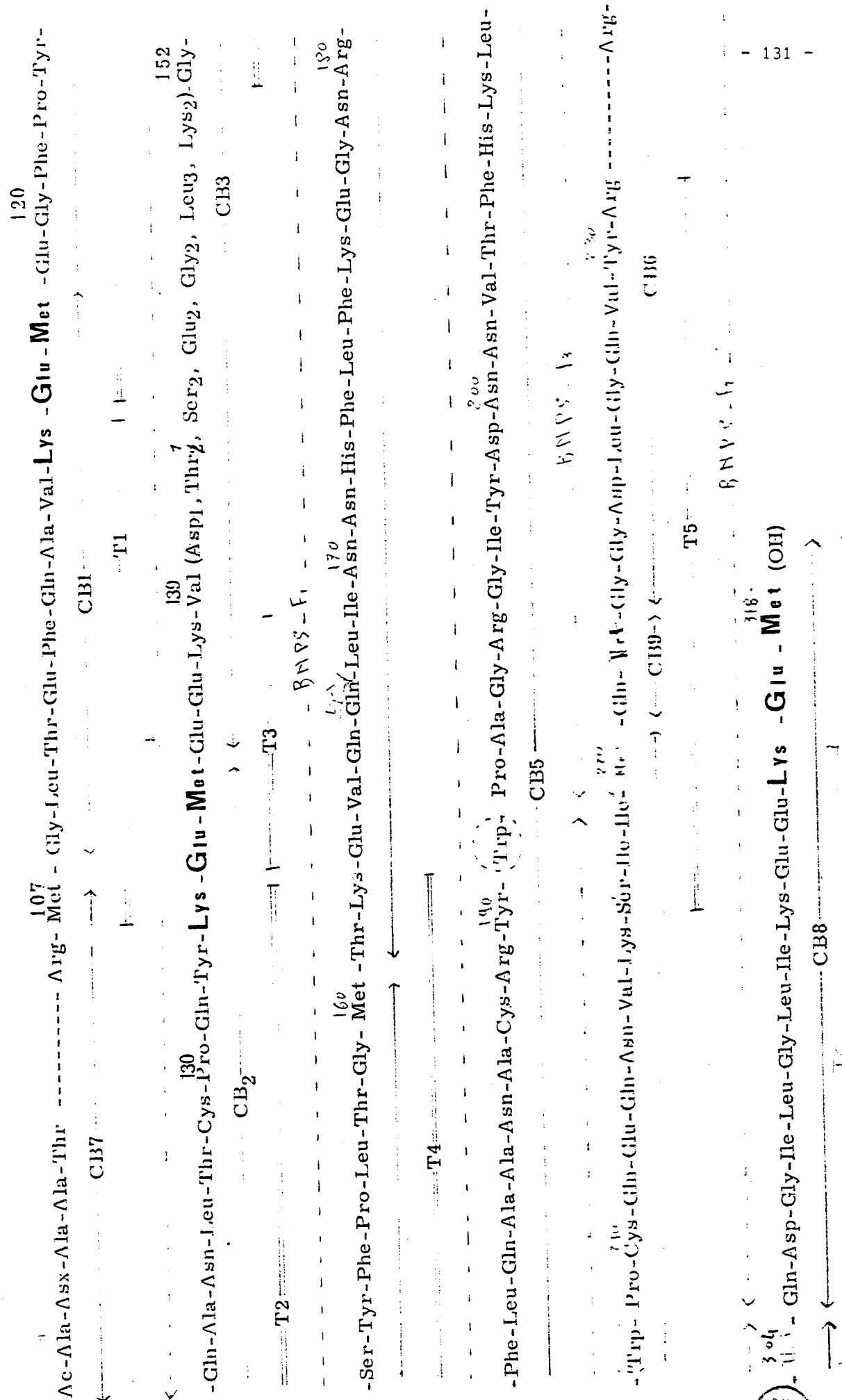
BrCN peptides	Number of residues	Amino-terminal sequence	Carboxyl-terminal sequence
CB7	103	N-acetyl-Ala	Arg-Hse <sup>c</sup>
CB1	11 (7)	Gly-Leu-Thr-Glu-Phe	Lys-Glu-Hse
CB2	17 (7)	Glu-Gly-Phe-Pro	Lys-Glu-Hse
CB3	25	Glu-Glu-Lys-Val <sup>a</sup>	Gly-Hse <sup>c</sup>
CB5	60 (8)	Thr-Lys-Glu-Val	(Ile <sub>2</sub> , Ser <sub>1</sub> )-Hse
CB6	81	Gly-Gly-Asp-Leu <sup>b</sup>	Arg-Hse <sup>c</sup>
CB8	14	Glu-Asp-Gly-Ile	Lys-Glu-Hse
CB9	2 (7)	Gln	Hse

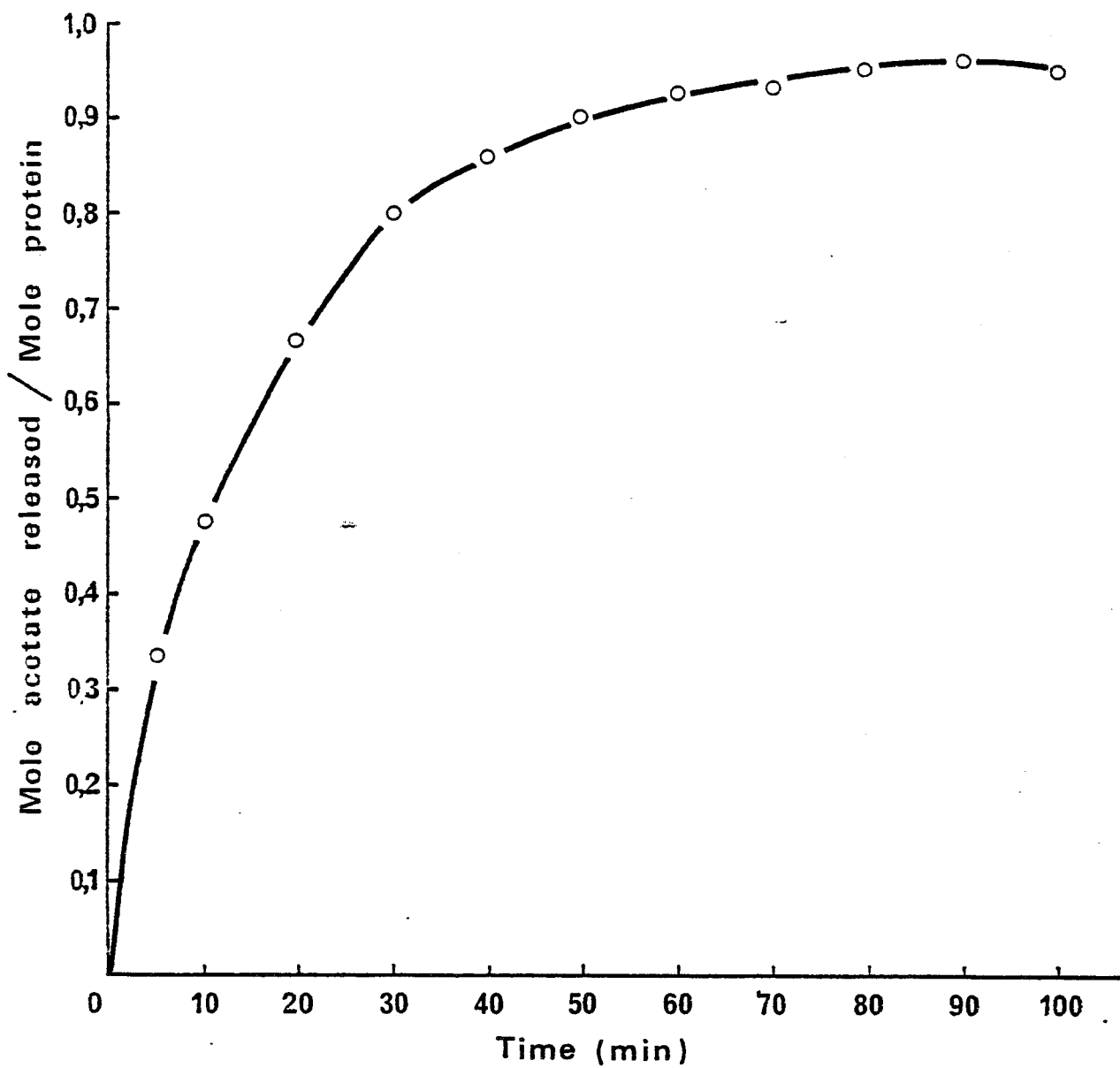


Table 7. Ordering of the cyanogen bromide fragments of arginine kinase.

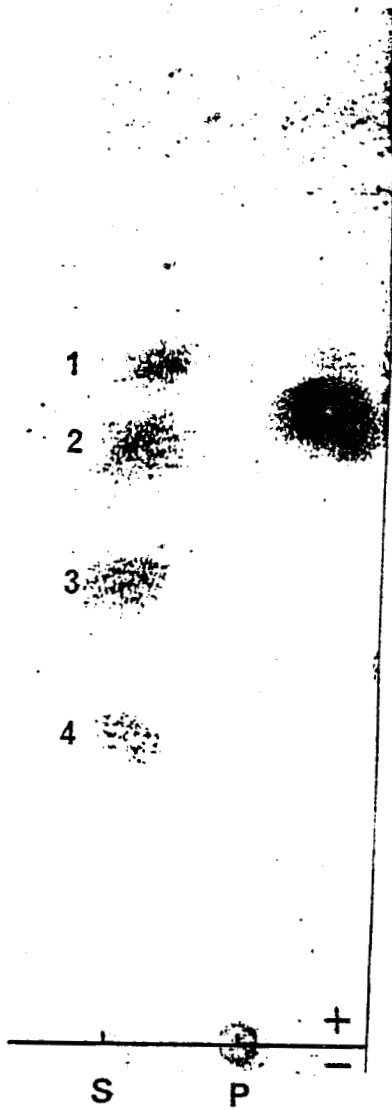
CNBr fragments  $\longleftrightarrow$ , tryptic peptides  $\equiv$ , BNPS-skatole fragments (5)  $\leftarrow$

For convenience the numbering of the residues is used provisionally

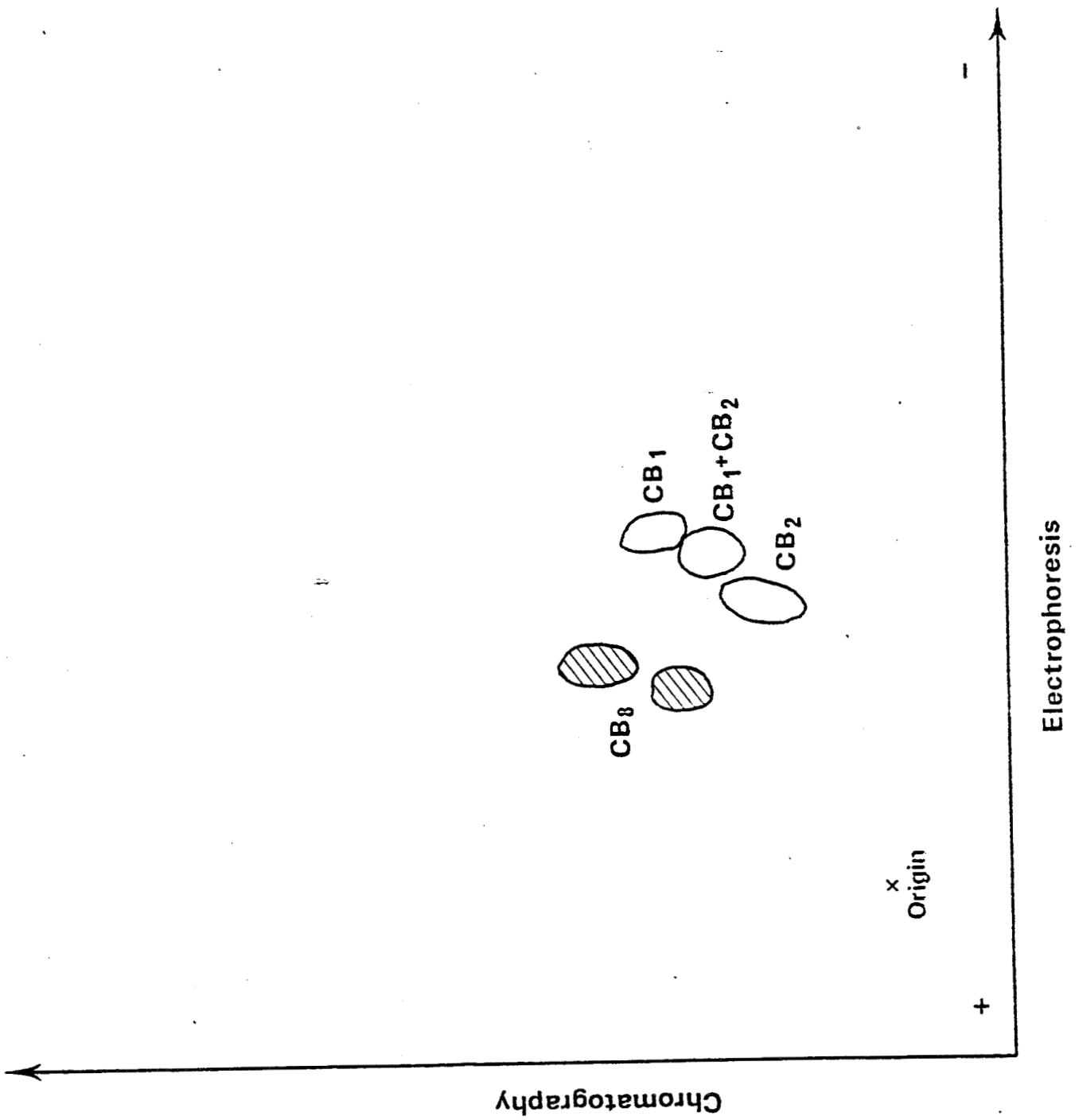




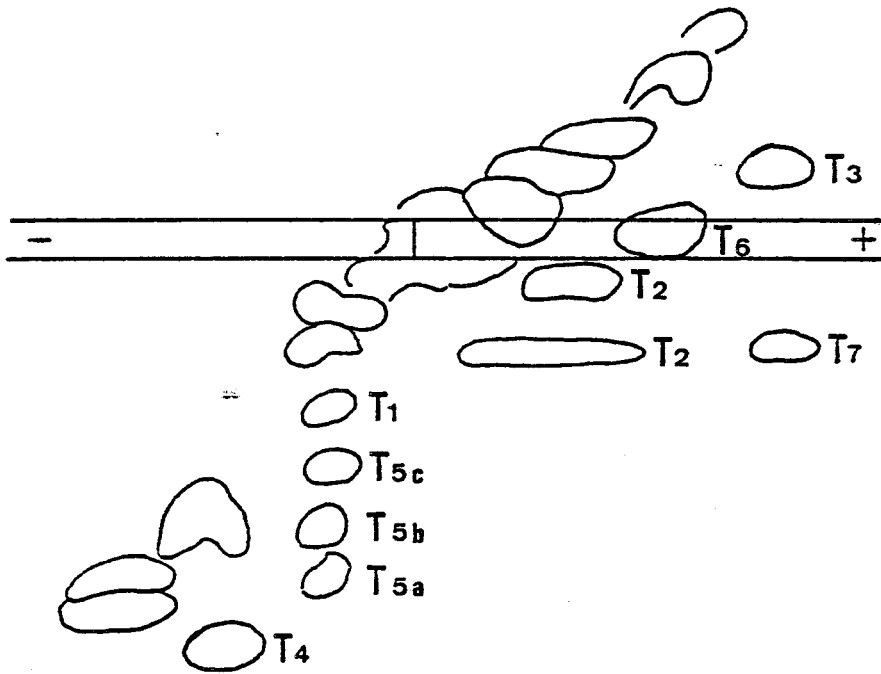




25  
1964

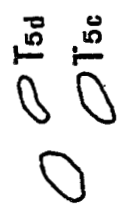
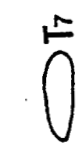
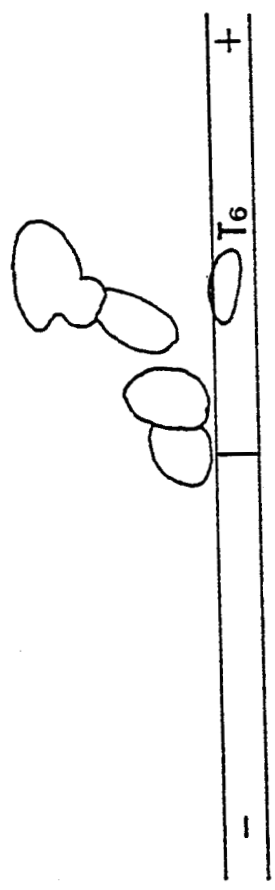


+



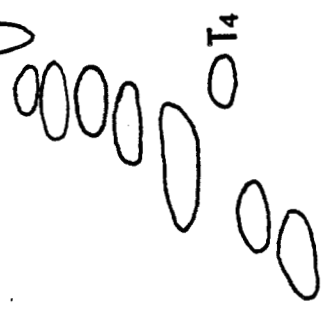
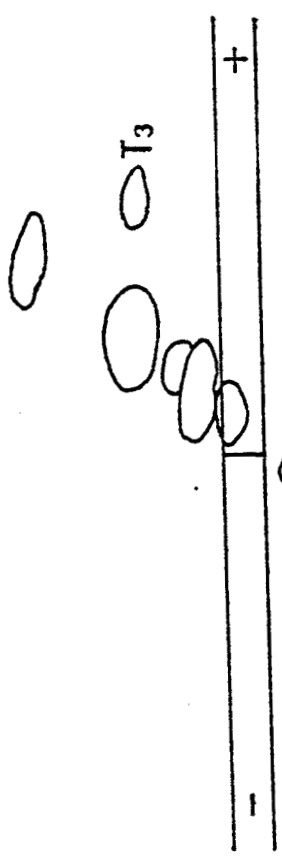
95

+



F<sub>2</sub>

+



F<sub>1</sub>



## DISCUSSION

-----

### I ISOLEMENT DU PEPTIDE C-TERMINAL DE L'ARGININE KINASE

Les résultats de l'action des carboxypeptidases A et B sur l'enzyme natif ont montré que les 3 derniers acides aminés constitutifs de la protéine sont Lys-Glu-Met(OH).

Or les peptides de 11 et 17 résidus d'acides-amino possèdent cette séquence C-terminale.

L'étude des peptides BrCN issus de la des-Glu-Met-arginine kinase constituerait une méthode élégante permettant de savoir lequel des 2 peptides est amputé de la séquence Glu-Met(OH).

Nous avons vu précédemment que cette démarche s'est soldée par un échec, échec riche d'informations cependant puisqu'il a conduit à mettre en évidence le peptide C-terminal de l'APK (14 résidus, extrémité N-terminale bloquée).

### II STRUCTURE DU PEPTIDE C-TERMINAL A EXTRÉMITÉ

#### N-TERMINALE BLOQUÉE

APK VI - 14 résidus.

La composition en acides-amino est la suivante :

Asp 1, Hse 1, Glx 4, Gly 2, Ile 2, Leu 2, Lys 2.

Le nombre de résidus Glx nous a fait immédiatement penser à la présence d'une glutamine en position N-terminale, glutamine cyclisée en acide pyroglutamique (PCA), ce qui expliquerait le manque de réactivité de ce peptide vis à vis de la ninhydrine.

Par ailleurs, F. REGNOUF a isolé un peptide tryptique à méthionine (T<sub>6</sub>) présentant la composition en acides-aminés suivante :

Asp 1,16 , Hse 0,71 , Glu 2,8 , Gly 1,4 , Ile 2,3  
Leu 2,2 , Lys 1,4.

Nous en avons déterminé la séquence par dégradation d'EDMAN manuelle avec identification des PTH-amino-acides par chromatographie sur couche mince.

Met-Gln-Asp-Gly-Ile-Leu-Gly-Leu-Ile-Lys-Glu-Glu-  
→ → → → → → → → → →

L'analogie que présente ce peptide avec le fragment APK VI de 14 résidus quant à sa composition en acides aminés a tout de suite fait supposer la localisation de ce peptide dans la partie C-terminale de l'APK. La présence d'une glutamine après le résidu de méthionine N-terminal renforce l'hypothèse d'un résidu de PCA à l'extrémité N-terminale du fragment APK 14 résidus dont la séquence pourrait être :

Gln-Asp-Gly-Ile-Leu-Gly-Leu-Ile-Lys-Glu-Glu-Lys-Glu-Met(OH).

On peut cependant s'interroger sur la séquence de ce peptide :

- par digestion de l'APK native et S-carboxyméthylée par les carboxypeptidases A et B, outre la méthionine, l'acide glutamique et

la lysine, sont libérées des quantités appréciables de Leu et Ile.  
(F. REGNOUF).

- L'hydrolyse trypsique de l'APK n'a pas coupé à la Lys 313 et a coupé à la Lys 316. Or, si la lysine 316 est bien entourée des résidus de glutamique, c'est plutôt celle-ci qui aurait dû ne pas être coupée.

Nous avons donc vérifié la séquence du peptide APK VI - 14 résidus après utilisation d'une méthode de déblocage de l'extrémité N-terminale.

#### Méthodes d'ouverture du cycle Pyroglutamique

°° Action de la pyroglutamyl-peptide-hydrolase (EC 3.4.11.8).  
-----

La pyroglutamyl-peptide-hydrolase agit sur les protéines et les peptides en détachant l'acide pyroglutamique N-terminal.

Le protocole que nous avons utilisé s'inspire des travaux de PODELL et ABRAHAM (68).

L'enzyme (BOEHRINGER) est isolée du foie de veau et possède des propriétés identiques à celles de la pyroglutamyl-amino-peptidase bactérienne (69, 70, 71).

Un groupement SH est essentiel à son activité.

Le tampon utilisé lors de la réaction comportera donc :

- un agent antioxydant tel que le dithiothréitol
- un agent chélateur des ions  $Hg^{2+}$  tel que l'EDTA disodique.

PODELL et ABRAHAM ont étudié les effets des conditions d'incubation sur l'activité de l'enzyme. Il en ressort qu'une incubation du mélange réactionnel à +4° C, sous azote, suivie d'une seconde incubation à température ambiante doit assurer une efficacité maximale de l'enzyme.

- Dans un premier temps nous avons testé l'action de l'enzyme sur un tripeptide de synthèse PCA-Ala-Phe. L'électrochromatographie sur couche de cellulose avant et après action de l'enzyme est significative (Fig. 13 et 14).

- Nous avons donc fait agir l'enzyme sur 60 nanomoles du peptide APK -14 résidus- et effectué un cycle de dégradation d'EDMAN afin de vérifier l'élimination du résidu PCA.

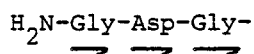
Le résultat négatif obtenu (aucune tache en chromatographie sur couche mince de polyamide selon KULBE) prouve que l'enzyme n'a pas agi.

Nous avons donc orienté notre étude vers une méthode chimique d'ouverture du cycle PCA.

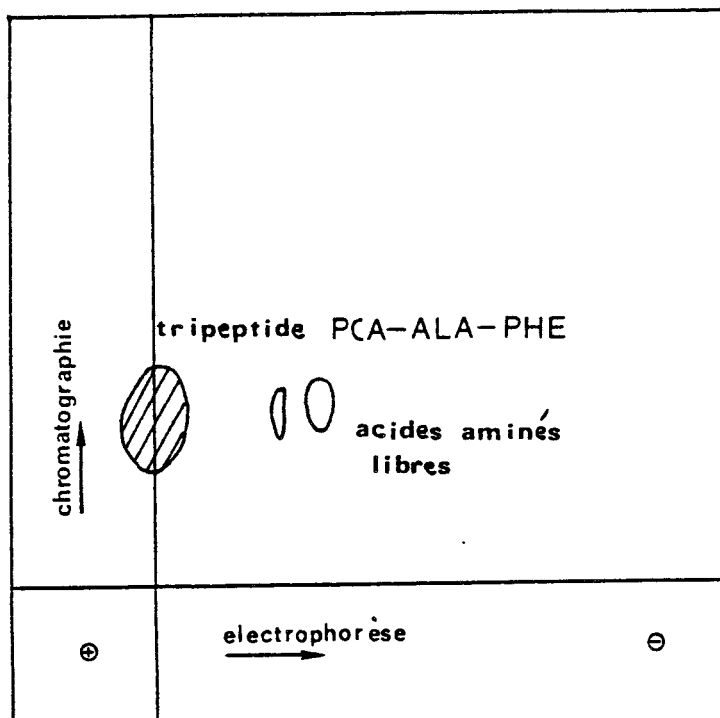
°° Action de l'HCl N.

L'HCl N, 10 mn à 100° C ouvre le cycle PCA (72).

Un premier lot de peptide (600 nanomoles) a été traité de cette façon ; la dégradation d'EDMAN manuelle avec identification des PTH-amino-acides par chromatographie liquide à haute pression montre que la séquence des 3 résidus N-terminaux est :








avant passage sur résine sulfonée

Révélation positive au Chlore-Amidon seul : 

Révélation positive à la Ninhydrine seule : 

après passage sur résine sulfonée

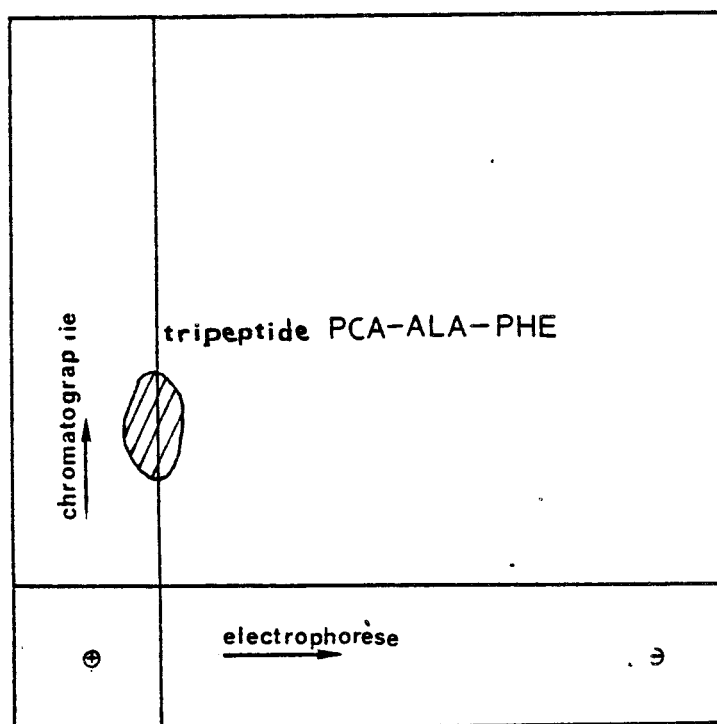
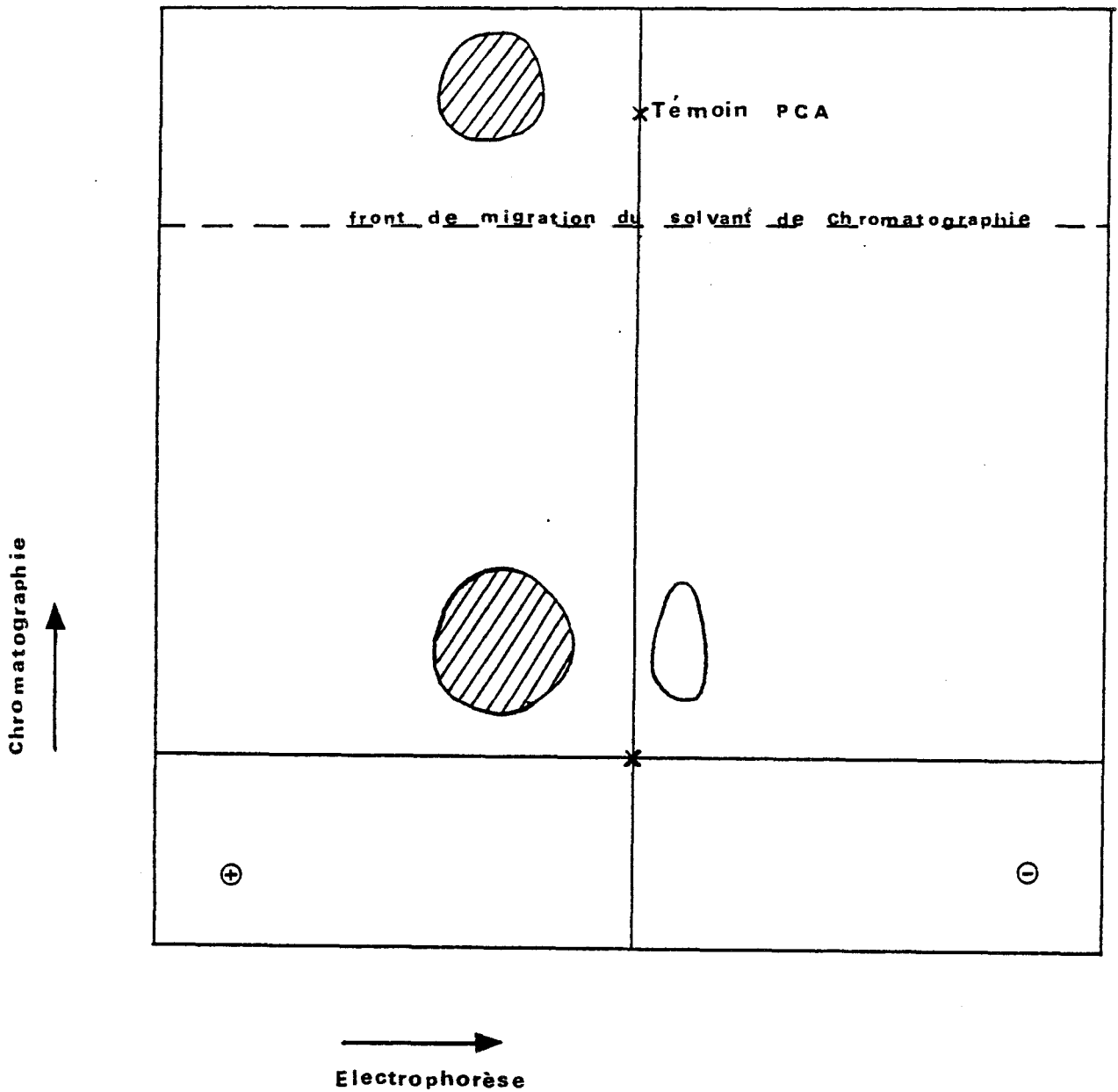


FIG. 13

ELECTROCHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE CELLULOSE DU TRIPEPTIDE  
PCA - ALA - PHE





- 1. Révélation positive à la Ninhydrine et au Chlore-Amidon : ○
- 2. Révélation positive au chlore-Amidon seul : ⊙

ELECTROCHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE SUR COUCHE  
MINCE DE CELLULOSE APRES ACTION DE LA PYRO-  
GLUTAMYLAMINOPEPTIDASE SUR LE PEPTIDE DE SYNTHÈSE

FIGURE 14





Les erreurs d'identification entre Leucine et Isoleucine enregistrées précédemment s'expliquent facilement par la difficulté d'identification de ces PTH-amino-acides sur couche mince.

L'interversion entre le Glycocolle et l'acide Glutamique (1↔6) peut s'expliquer par le fait que PTH-Gly migre en couche mince au niveau de produits de décomposition du PITC (phénylthiourée) et peut être alors considéré comme une tache majeure alors qu'il n'en est rien.

La chromatographie liquide à haute pression a montré qu'elle était une méthode de choix dans la résolution de tels problèmes.

### III ORDRE D'ENCHAÎNEMENT DES FRAGMENTS BrCN DE L'ARGININE KINASE

#### 1. Hydrolyse de l'arginine kinase par le BNPS-skatole

Les fragments obtenus ont fourni d'excellentes informations sur l'ordre des peptides BrCN de la protéine.

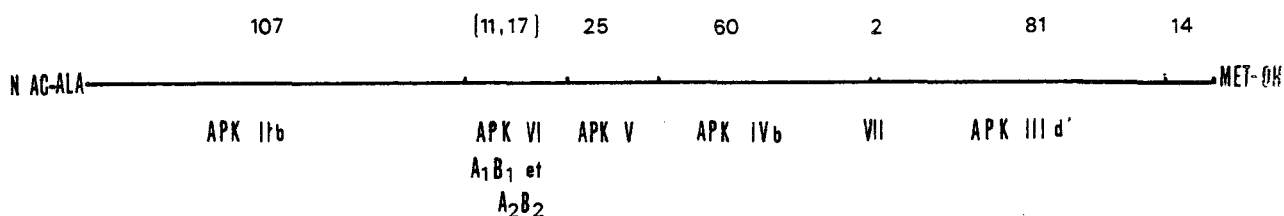
La somme de leurs acides aminés constitutifs est en bon accord avec celle de la protéine entière.

La séquence du fragment  $F_2$  a permis de montrer qu'il comporte la séquence C-terminale du peptide APK IVb, de montrer que le dipeptide Gln-Met (APK VII) lui fait suite et qu'il se continue par une séquence qui correspond à la séquence N-terminale du peptide de 81 résidus (APK IIIId').

Le fragment  $F_1$  est donc composé des peptides de 107, 11, 17, 25 résidus (APK IIb, APK VI-A<sub>1</sub> B<sub>1</sub>-APK V) ainsi que des 31 résidus N-terminaux du peptide de 60 résidus (APK IVb).

La somme des acides aminés de ces peptides est en accord avec la composition du fragment  $F_1$ .

Un ordre partiel d'enchaînement des fragments BrCN pouvait être proposé à ce stade de nos connaissances.



## 2. Les peptides tryptiques à méthionine

C'est la détermination de la structure primaire des peptides tryptiques à méthionine qui a fourni la preuve structurale directe de l'ordre d'enchaînement complet des 8 fragments BrCN.

F. REGNOUF a isolé 7 peptides majeurs et leur structure totale ou partielle alliée à celle des séquences N et C-terminales des fragments BrCN ont permis de reconstituer le puzzle.

Le peptide  $T_5$  a confirmé la présence du dipeptide Gln-Met.

L'ordre d'enchaînement des fragments BrCN est ainsi complètement établi (Tableau VI).





## **CONCLUSIONS**



Nos travaux sur l'arginine kinase ont essentiellement contribué à la détermination de la structure primaire de cet enzyme.

Cette protéine comporte environ 320 résidus d'acides aminés et son acide aminé N-terminal est acétylé (d'autres enzymes catalysant également le transfert d'un groupement phosphorylé telles que l'adénylate kinase (74) ou la pyruvate kinase (75) sont des acétyl-protéases).

Le peptide C-terminal a été très difficile à caractériser en raison de la séquence Lys-Glu-Met(OH) qui se répète 3 fois dans la protéine.

La séquence N-terminale de ce peptide Gly-Asp-Gly qui entraîne la formation d'un cycle à 7 sommets, empêche sa détection par les moyens classiques de révélation des protéines et des peptides.

Seule la révélation par le réactif chlore-amidon permet de la mettre en évidence.

Nous constatons par ailleurs que ce peptide est riche en acides aminés dicarboxyliques (Asp 1, Glu 4 sur 14 résidus).

F. REGNOUF, lors de dosages effectués sur la protéine entière et ses hydrolysats BrCN a estimé à 5 le nombre de résidus cystéinyle alors que dans les fragments BrCN de 17 (APK VI-A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>-) 60 (APK IVb) et 81 (APK IIIId') résidus d'acides aminés ne sont retrouvés que 4 résidus cystéinyle.

Par ailleurs F. REGNOUF a essayé d'isoler les peptides tryptiques et pepsiques à cystéine par électrophorèse diagonale et par chromatographie d'affinité (76) (77) : aucun résultat probant n'a été enregistré et seule la détermination de la structure complète de l'arginine kinase, permettra de dire si l'enzyme renferme 4 ou 5 cystéines.

Au cours de notre étude du peptide APK IIIId' (81 résidus) nous avons caractérisé le peptide tryptique renfermant le résidu

cystéinyle essentiel (page 99).

Selon FATTOUM et al (78) le résidu tyrosyle essentiel se situerait dans le segment N-terminal de l'enzyme.

Les deux résidus de tryptophanne ne sont distants l'un de l'autre que de 17 résidus d'acides-amino. L'un de ces deux résidus serait adjacent au site de fixation du nucléotide (79, 80, 12).

Ce travail de structure primaire est d'autant plus intéressant que la structure cristallographique est menée en parallèle.

L'aboutissement des efforts des différentes équipes permettra de décrire avec précision le site actif de l'arginine kinase et d'élucider complètement le mécanisme de la fonction catalytique des ATP-guanidino-phosphotransférases.

Ce travail nous a permis d'utiliser de nombreuses méthodes de la chimie des protéines.

Nous avons mis au point certaines d'entre elles et, en dix ans, nous avons pu mesurer les progrès réalisés dans le sens d'une miniaturisation de techniques déjà éprouvées.

## **BIBLIOGRAPHIE**

LES RÉFÉRENCES SONT CLASSÉES PAR ORDRE  
D'APPARITION DANS LE TEXTE.

- 1) STOREY, K. B. and HOCHACHKA, P. W. (1974)  
FEBS Letters 46, 337-339.
- 2) STOREY, K. B. and HOCHACHKA, P. W. (1974)  
J. Biol. Chem. 249, 1417-1422.
- 3) STOREY, K. B. (1976)  
Eur. J. Biochem. 70, 331-337.
- 4) STOREY, K. B. (1977)  
Arch. Biochem. Biophys. 179, 518-526.
- 5) DER TERROSSIAN, E., KASSAB, R., PRADEL, L. A.,  
and THOAI, N. V. (1966)  
Biochim. Biophys. Acta, 122, 462-469.
- 6) THOAI, N. V., DER TERROSSIAN, E., PRADEL, L. A.,  
KASSAB, R., ROBIN, Y., LANDON, M. F., LACOMBE, G.  
and THIEM, N. V. (1968)  
Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 63-67.
- 7) KASSAB, R., PRADEL, L. A., DER TERROSSIAN, E.  
and THOAI, N. V. (1967)  
Biochim. Biophys. Acta, 132, 347-360.
- 8) PRADEL, L. A., KASSAB, R., CONLAY, C.  
and THOAI, N. V. (1968)  
Biochim. Biophys. Acta, 154, 305-314.
- 9) ATHERTON, R. S., LAWS, J. F., MILES, B. J.  
and THOMSON, A. R. (1970)  
Biochem. J. 120, 589-600.
- 10) DER TERROSSIAN, E., PRADEL, L. A., KASSAB, R.  
and THOAI, N. V. (1969)  
Eur. J. Biochem. 11, 482-490.
- 11) DER TERROSSIAN, E., DESVAGES, G., PRADEL, L. A.,  
KASSAB, R., THOAI, N. V. (1971)  
Eur. J. Biochem. 22, 585-592.
- 12) BREVET, A., ZEITOUN, Y. and PRADEL, L. A. (1975)  
Biochim. Biophys. Acta, 393, 1-9.
- 13) THOAI, N. V. (1969)  
in "Colloquium on Biochemical Evolution"  
FEBS meeting, Madrid 1969 (Elsevier Publ.  
Amsterdam - 1971).
- 14) PRADEL, L. A. and KASSAB, R. (1973)  
C. R. Acad. Sci. Paris, 276, Série D,  
2843-2846.

- 15) DER TERROSSIAN, E., KASSAB, R., PRADEL, L. A.  
and THOAI, N. V. (1966)  
Biochim. Biophys. Acta, 122, 462-469.
- 16) VIRDEN, R. and WATTS, D. C. (1966)  
Biochem. J. 99, 159-161.
- 17) REGNOUF, F. (1978)  
Thèse d'Ingénieur Docteur  
Université Pierre et Marie Curie  
Paris VI.
- 18) REGNOUF, F., PRADEL, L. A., KASSAB, R.  
and THOAI, N. V. (1969)  
Biochim. Biophys. Acta, 194, 540-547.
- 19) ORIOL-AUDIT, C., LANDON, M. F., ROBIN, Y.  
and THOAI, N. V. (1969)  
Biochim. Biophys. Acta, 188, 132-139.
- 20) LANDON, M. F. (1969)  
Thèse de Doctorat es-Sciences.  
Faculté des Sciences d'Orsay  
Université de Paris.
- 21) ORIOL, C. and LANDON, M. F. (1970)  
Biochim. Biophys. Acta, 214, 455-462.
- 22) LANDON, M. F., ORIOL, C. and THOAI, N. V. (1970)  
Biochim. Biophys. Acta, 214, 168-177.
- 23) THOAI, N. V. (1972)  
Bulletin de la Société Française  
de Minéralogie et de Cristallographie,  
95, 231-241.
- 24) ROUSTAN, C., PRADEL, L. A., KASSAB, R.  
and THOAI, N. V. (1970)  
Biochim. Biophys. Acta, 206, 369-379.
- 25) DER TERROSSIAN, E. and KASSAB, R. (1976)  
Eur. J. Biochem. 70, 623-628.
- 26) MARKHAM, G. D. and REED, G. H., MAGGIO, E. T.  
and KENYON, G. L. (1977)  
J. Biol. Chem. 252, 1197-1201.
- 27) MAGGIO, E. T. and KENYON, G. L., MARKHAM, G. D.  
and REED, G. H. (1977)  
J. Biol. Chem. 252, 1202-1207.

- 28) ROUSTAN, C., PRADEL, L. A., KASSAB, R.  
and THOAI, N. V. (1971)  
Biochim. Biophys. Acta, 250, 103-116.
- 29) JAMES, T. L. and COHN, M. (1974)  
J. Biol. Chem. 249, 2599-2604.
- 30) KASSAB, R., ROUSTAN, C. and PRADEL, L. A. (1968)  
Biochim. Biophys. Acta, 167, 308-316.
- 31) BOSE, S. and FRIEDBERG, F. (1971)  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 271-277.
- 32) RABIN, B. R. and WATTS, D. C. (1960)  
Nature, 188, 1153-1165.
- 33) VIRDEN, R. and WATTS, D. C. (1966)  
Biochem. J. 99, 162-172.
- 34) WATTS, D. C.  
in K. A. MUNDAY (1965)  
"Studies on Comparative Biochemistry"  
Pergamon Press, Oxford, p. 162.
- 35) PRADEL, L. A. and KASSAB, R. (1968)  
Biochim. Biophys. Acta, 167, 317-325.
- 36) MUHLRAD, A., HEGYI, G. and TOTH, G. (1967)  
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 2, 19-24.
- 37) KASSAB, R., FATTOUM, A. and PRADEL, L. A. (1970)  
Eur. J. Biochem. 12, 264-269.
- 38) KASSAB, R., FATTOUM, A. and PRADEL, L. A. (1971)  
Eur. J. Biochem. 22, 445-456.
- 39) FATTOUM, A. (1974)  
Thèse de Doctorat es-Sciences. Paris.
- 40) BORDERS, C. L. and RIORDAN, J. F. (1975)  
Biochemistry, 14, 4699-4704.
- 41) JAMES, T. L. (1976)  
Biochemistry, 15, 4724-4730.
- 42) RIORDAN, J. F., Mc ELVANY, K. A.  
and BORDERS Jr, C. L. (1977)  
Science 195, 884-885.
- 43) BERGHAUSER, J. (1975)  
Biochim. Biophys. Acta, 397, 370-376.

- 44) PHILIPS, M., ROUSTAN, C., FATTOUM, A.  
and PRADEL, L. A. (1978)  
Biochim. Biophys. Acta, 523, 368-376.
- 45) PHILIPS, M., PHO DANG, B. A.  
and PRADEL, L. A.  
Soumis pour publication.
- 46) WATTS, D. C. (1973)  
in "The Enzymes" 3ème Ed. (BOYER, P. D. ed.)  
Vol. 8, pp. 383-455, Academic Press, New York.
- 47) ROUSTAN, C., DER TERROSSIAN, E. and PRADEL, L. A. (1970)  
Eur. J. Biochem. 17, 467-471.
- 48) COHN, M., DIEFENBACH, H. and TAYLOR, J. S. (1971)  
J. Biol. Chem. 246, 6037-6042.
- 49) MILNER-WHITE, E. J. and WATTS, D. C. (1971)  
Biochem. J. 122, 727-740.
- 50) ROUSTAN, C., KASSAB, R., PRADEL, L. A.  
and THOAI, N. V. (1968)  
Biochim. Biophys. Acta, 167, 326-338.
- 51) MILDVAN, A. S. (1970)  
in "The Enzymes" 3ème ed.  
(BOYER, P. D. Ed.) Vol. 2, p. 446.  
Academic Press New York.
- 52) JAMES, T. L. (1976)  
Biochemistry, 15, 4724-4730.
- 53) REID, B. R., KOCH, G. L. E., BOULANGER, Y.,  
HARTLEY, B. S. and BLOW, D. M. (1973)  
J. Mol. Biol. 80, 199-201.
- 54) BERTHOU, J., RERAT, C., RERAT, B., GADET, A.,  
FOURME, R., RENAUD, M., DUBORD, C., PRADEL, L. A.,  
ROUSTAN, C., THOAI, N. V. (1975)  
J. Mol. Biol. 95, 331-333.
- 55) BENYAMIN, Y. (1977)  
Thèse de Doctorat es-Sciences. Paris.
- 56) BENYAMIN, Y., ROBIN, Y. and REGNOUF, F. (1977)  
C. R. Acad. Sc. Paris, 284, Série D, 1955-1958.
- 57) BENYAMIN, Y., ROBIN, Y. and THOAI, N. V. (1973)  
Eur. J. Biochem. 37, 459-466.



- 58) BENYAMIN, Y., GUILLOU, Y., DESORMEAU-BEDOT, J. P.  
and ROBIN, Y. (1976)  
Eur. J. Biochem. 68, 489-496.
- 59) GROSS, E. and WITKOP, B. (1961)  
J. Am. Chem. Soc. 83, 1510-1511.
- 60) GROSS, E. and WITKOP, B. (1962)  
J. Biol. Chem. 237, 1856-1860.
- 61) EYLAR, E. H., JACKSON, J. J., BENNETT, C. D.,  
KNISKERN, P. J. and BROSTOFF, S. W. (1974)  
J. Biol. Chem. 249, 3710-3716.
- 62) HAN, K. K., TETAERT, D., MOSCHETTO, Y., DAUTREVAUX, M.  
and KOPEYAN, C. (1972)  
Eur. J. Biochem. 27, 585-
- 63) RYDON, N. M. and SMITH, P. W. G. (1952)  
Nature 169, 922-923.
- 64) REGNOUF, F., KASSAB, R. and FATTOUM, A. (1974)  
Eur. J. Biochem. 44, 67-79.
- 65) OMMEN, G. S., FONTANA, A. and ANFINSEN, C. B. (1970)  
J. Biol. Chem. 245, 1895-1902.
- 66) ADELSTEIN, S. and KUELH, W. M. (1970)  
Biochem. 9, 1355-1364.
- 67) AKABORI, S., OHNO, K. and NARITA, K. (1952)  
Bull. Chem. Soc. Jap. 25, 214-218.
- 68) PODELL, N. and ABRAHAM, G. N. (1978)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 1, 176-185.
- 69) SZEWCZUK, A. and MULCZYK, M. (1969)  
Eur. J. Biochem. 8, 63-67.
- 70) DOOLITTLE, E. F. and ARMENTROUT, R. W. (1968)  
Biochemistry, 7, 2, 516-521.
- 71) MROSS, G. A. and DOOLITTLE, R. F. (1967)  
Arch. Biochem. Biophys. 122, 674-684.
- 72) ERICKSON, R. P. and STEERS, E. (1969)  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 5, 736-743.
- 73) JORNVAL, H. (1974)  
FEBS Letters, 38, 3, 329-333.

- 74) HEIL, A., MULLER, G., NODAL, L., PINDER, T., SCHIRMER, H.,  
SCHIRMER, I. and ZABERN, I. V. (1974)  
Eur. J. Biochem. 43, 131-144.
- 75) COTTAM, G. L., HOLLENBERG, P. F. and COON, M. J. (1969)  
J. Biol. Chem. 244, 1481-1486.
- 76) WEEDS, A. G. and HARTLEY, B. S. (1968)  
Biochem. J. 107, 531-548.
- 77) SVENSON, A., CARLSSON, J. and EAKER, D. (1977)  
FEBS Letters, 73, 171-174.
- 78) FATTOUM, A., KASSAB, R. and REGNOUF, F. (1975)  
Biochimie, 57, 859-863.
- 79) PADIEU, P. and MOMMAERTS, W. F. (1960)  
Biochim. Biophys. Acta, 37, 72-77.
- 80) STOREY, K. B. and HOCHACHKA, P. W. (1974)  
FEBS Letters, 46, 337-339.

