

Konstitutionsermittlung bei Peptiden und Proteinen

Von Dr. G. BRAUNITZER*)

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

Bereits 1907 wurde von Emil Fischer erstmalig die Konstitution eines natürlichen Peptids ermittelt. Obwohl in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Verfahren zur Konstitutionsbestimmung einer Peptid-Kette diskutiert wurden, sind die Methoden, mit denen eine systematische und erfolgreiche Erforschung der Konstitution der Peptide und Proteine in Angriff genommen werden konnte, erst in den letzten zehn Jahren beschrieben worden. Es wird eine Übersicht gegeben, mit welchen Methoden die Endgruppe und die Reihenfolge der Aminosäuren ermittelt werden. An den Beispielen des Gramacidin-S, des Insulins und des Tabakmosaik-Virus werden die modernen Wege der Konstitutionsermittlung beschrieben.

I. Einleitung

Die Proteine wurden bereits 1784 von *Francois de Fourcroy* als Stoffklasse erkannt. Die erste Aminosäure, Cystein, wurde 1809 isoliert. *E. Fischer* bearbeitete erstmals systematisch die Chemie der Aminosäuren der Peptide und Proteine (1900—1918). *Svedberg* konnte durch mathematische Analyse der Sedimentationsbande des Hämoglobins in der Ultrazentrifuge zeigen, daß Proteine — im Gegensatz zu anorganischen Kolloiden — ein definiertes, diskretes Molekulargewicht besitzen. Nach Einführung der Verteilungschromatographie gelang erstmals eine Trennung sämtlicher Aminosäuren und ihrer Derivate. Die erste vollständige Bausteinanalyse wurde 1945 veröffentlicht (β -Lactoglobulin, *E. Brand*). Durch *F. Sanger* wurde mit Erfolg die Erforschung der chemischen Konstitution der Eiweißstoffe in Angriff genommen und von ihm selbst das Insulin aufgeklärt (1945 bis 1954).

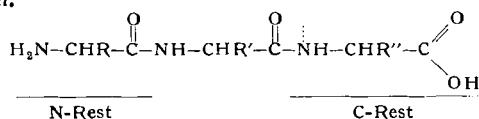
Im Gegensatz zu anderen Makromolekeln — natürlichen oder synthetischen Ursprungs — kommt den Eiweißstoffen eine ganz bestimmte chemische Konstitution zu. Bei Skleroproteinen sind die Verhältnisse noch nicht völlig geklärt. Den globulären Proteinen jedoch, z. B. Insulin, muß eine Formel im Sinne der klassischen, organischen Chemie zuerkannt werden.

Für die biologische Aktivität eines Proteins ist neben der chemischen Konstitution auch seine physikalische Struktur von Bedeutung, diese wird mit physikalischen Methoden, wie Röntgenstrahlen usw. ermittelt. Sie soll jedoch nicht berücksichtigt werden, da sie bereits an anderer Stelle behandelt wurde¹⁾.

Die Erforschung der chemischen Konstitution der Eiweißstoffe stellt heute die wesentliche Aufgabe der Protein-Chemie dar. Im folgenden soll eine Übersicht über die Methoden zur Konstitutionsaufklärung bei Eiweißstoffen und über die bisher erzielten Ergebnisse gegeben werden.

II. Ermittlung der Konstitution einer Peptid-Kette

Proteine bestehen aus einer oder mehreren Peptidketten. Eine solche kann 16 verschiedene Aminosäuren enthalten.



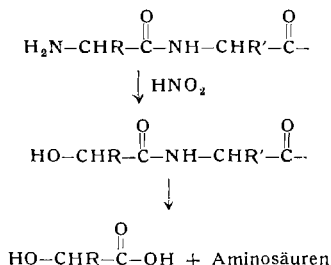
Als N-terminale Gruppe oder N-terminaler Rest wird die Aminosäure mit freier α -NH₂-Gruppe, als C-terminale Gruppe oder C-terminaler Rest die mit freier α -Carboxyl-Gruppe bezeichnet. Der erste Schritt zur Aufklärung der Konstitution einer Peptid-Kette besteht in der Bestimmung der Endgruppen. Hierzu wurden bereits von *E. Fischer* Methoden entwickelt; das erste brauchbare Verfahren wurde jedoch erst 1945 von *F. Sanger* angegeben.

Die generelle Schwierigkeit besteht darin, daß Proteine und Peptide als typische Dipole nur in polaren Lösungsmitteln, wie H_2O löslich sind, die Reaktionen, die zur Bestimmung verwendet werden, hingegen am besten im wasserfreien Medium vor sich gehen.

Zur Bestimmung der Endgruppe wurde bis heute eine sehr große Anzahl von Reaktionen vorgeschlagen, von denen die meisten allerdings nur akademischen Charakter besitzen. Man kann sie in drei Hauptgruppen unterteilen.

1.) Bestimmung der Endgruppe durch Umwandlung der endständigen Aminosäure

Die N-terminale Aminosäure wird nach diesem Verfahren in eine andere Verbindung z. B. eine Oxysäure übergeführt²⁾. Nach totaler Hydrolyse kann sie durch Charakterisierung des Umwandlungsproduktes oder durch ein Differenzverfahren ermittelt werden.



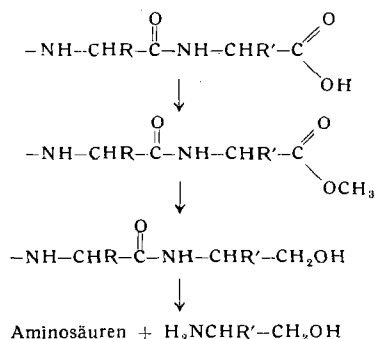
Die Oxysäure kann z. B. extrahiert und chromatographisch identifiziert werden. Bei kleinen Peptiden ist die Bestimmung der Aminosäuren vor und nach der Umwandlung empfehlenswert, wobei die nach Behandlung und Hydrolyse fehlende Aminosäure als Endgruppe vorliegen muß.

*) Neue Anschrift: Max-Planck-Institut für Biochemie, München XV.

¹⁾ H. Zahn, diese Ztschr. 64, 295 [1952].

²⁾ I. H. Quastel, C. P. Stewart u. H. E. Tunnicliffe, Biochem. J. 17, 586 [1923].

Ein mehrfach verwendetes Verfahren zur Bestimmung des C-Restes ist die Reduktion mit Lithium-aluminium- oder Natriumborhydrid^{3, 4, 5)}.



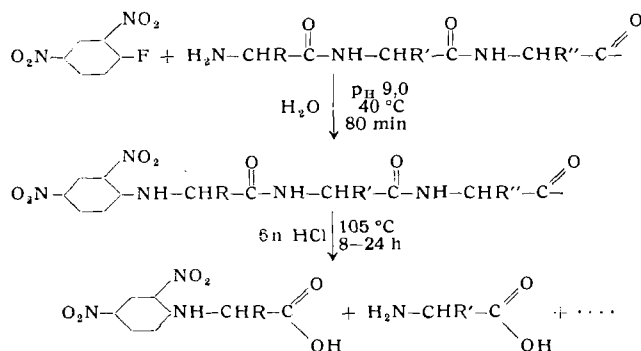
Das Peptid oder Protein wird direkt oder besser nach Veresterung (z. B. mit Diazomethan) hydriert, wobei die C-terminale Aminosäure in den entsprechenden Aminoalkohol übergeführt wird. Dieser wird nach Hydrolyse der Peptid-Kette extrahiert und chromatographisch identifiziert oder — noch besser — nach vollständigem Umsatz des Hydrolysates mit Dinitrofluorbenzol als Dinitrophenyl-Derivat identifiziert^{5, 6)}.

Weitere Verfahren zur Bestimmung eines Restes durch Umwandlung sind: Die Überführung einer N-terminalen Aminosäure in die Ketosäure⁷⁾ oder das Nitril⁸⁾, ferner die Bestimmung des C-Restes nach der Dakinschen Reaktion⁹⁾, bzw. nach Hundsicker¹⁰⁾.

2.) Bestimmung der Endgruppe durch Blockierung der endständigen Aminosäure

Die endständige Aminosäure wird dermaßen substituiert, daß das Derivat gegen Hydrolyse beständig ist. Nach totaler Hydrolyse kann daher die terminale, substituierte Aminosäure leicht extrahiert und chromatographisch identifiziert werden. Nach einer partiellen Hydrolyse kann man im allgemeinen nicht nur die endständigen, sondern auch die benachbarten Bausteine ermitteln. Werden neben der endständigen, substituierten Aminosäure RA (R = substituierter Rest) die Peptide RAB, RABC, RABCD erfaßt, so kann auf die Reihenfolge ABCD geschlossen werden.

Das bekannteste Verfahren dieser Gruppe, wie der Methoden zur Bestimmung der Endgruppen überhaupt, ist die Dinitrophenyl-Methode nach Sanger¹¹⁾. Das



³⁾ A. C. Chibnall u. M. W. Riss, ebenda 48, XLVII [1951].

⁴⁾ C. Fromageot, M. Justiz, D. Meyer u. L. Penasse, Biochem. biophysica Acta [Amsterdam] 6, 283 [1950].

⁵⁾ W. Grassmann, H. Hörmann u. H. Endress, Chem. Ber. 86, 1477 [1953].

⁶⁾ H. Jatzkewitz u. Nguyen Dang Tam, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 236, 188 [1954].

⁷⁾ S. Goldschmidt, E. Wiberg, F. Nagel u. K. Martin, Liebigs Ann. Chem. 456, 1 [1927].

⁸⁾ S. Goldschmidt u. K. Strauss, ebenda 471, 1 [1929].

⁹⁾ R. A. Turner u. G. Schmerzler, J. Amer. chem. Soc. 76, 949 [1954].

¹⁰⁾ K. Heyns u. K. Stange, Z. Naturforsch. 10b, 129 [1955].

¹¹⁾ F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 [1945].

Protein oder Peptid wird mit 1,2,4-Dinitrofluorbenzol umgesetzt.

Nach totaler Hydrolyse wird die N-terminale 2,4-Dinitrophenyl-Aminosäure extrahiert, chromatographisch gereinigt und identifiziert.

Die Dinitrophenyl-Methode nach Sanger war das erste brauchbare Verfahren zur Bestimmung der Endgruppen und stellt heute noch eine Standardmethode dar. Die Dinitrophenyl-Aminosäuren, die als Modellsubstanzen dienen, stellt man entweder mit 1,2,4-Dinitrochlorbenzol nach Abderhalden¹²⁾ oder Fluordinitrobenzol in alkoholischer Lösung nach Sanger¹¹⁾ her oder — am besten — in wäßriger, sodaalkalischer Lösung bei 40 °C nach Levy (Ausbeuten 97 %)^{13, 14)}.

Zur Substitution eines Peptids oder Proteins werden diese in 10%iger NaHCO₃-Lösung unter Zugabe von 2 Volumenteilen einer 5%igen alkoholischen Lösung von Fluordinitrobenzol 2 h bei Zimmertemperatur geschüttelt¹¹⁾. Empfehlenswerter ist die Substitution in wäßriger Lösung bei p_H 9,0 und 40 °C mit Hilfe eines Autotitrators¹³⁾. Das Dinitrophenyl-Protein wird nach der Reinigung mit 6 n HCl hydrolysiert (8–24 h), die Dinitrophenyl-aminosäuren werden mit Äther extrahiert: Dinitrophenylhistidin, -arginin und -cysteinsäure verbleiben in wäßriger Lösung und werden gesondert nachgewiesen. In der Seitenkette werden noch Lysin, Cystein, Tyrosin und Histidin substituiert.

Die Brauchbarkeit einer Blockierungsmethode hängt von der Stabilität der substituierten Aminosäure gegenüber saurer Hydrolyse ab. Die Dinitrophenylaminosäuren sind sehr stabil, nur Dinitrophenylprolin, -glykokoll und Bis-Dinitrophenylcystein werden weitgehend zerstört.

Man identifiziert eine Dinitrophenyl-Komponente am besten durch Verteilungschromatographie. Früher wurde fast ausschließlich in Säulen getrennt^{15, 16, 17)}. Für analytische Untersuchungen wird heute jedoch lediglich die Identifizierung durch 2-dimensionale Papierchromatographie verwendet, mit der sämtliche Komponenten sehr leicht nachgewiesen werden^{14, 18)}. Bei der quantitativen Bestimmung eluiert man den Fleck mit H₂O oder 1 % NaHCO₃ und mißt die Absorption im UV bei 360 mμ.

Infolge der intensiven Farbe der Dinitrophenyl-Derivate wird für eine Bestimmung nur sehr wenig Substanz benötigt, im Durchschnitt 0,2–0,5 μMol.

Die Dinitrophenyl-Derivate der Aminosäuren eignen sich ferner vorzüglich zur quantitativen Bestimmung. Das Hydrolysat wird zu diesem Zwecke nach Entfernung der Salzsäure im Autotitrator in wäßriger Lösung bei p_H 9 und 40 °C mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt. Statt mit einem Autotitrator kann auch in einem gepufferten Lösungsmittel gearbeitet werden^{18, 19)}. Das überschüssige Dinitrophenol wird durch Sublimation oder chromatographisch entfernt, die Dinitrophenyl-Aminosäuren durch 2-dimensionale Papierchromatographie getrennt, die einzelnen Komponenten im UV bei 360 mμ bestimmt (300 γ Hydrolysat, Genauigkeit 3 bis 5 %).

Die Dinitrophenyl-Methode wurde von Zahn sinnvoll erweitert. Durch Darstellung von Difluor-polynitrophenyl-Verbindungen können räumlich benachbarte NH₂-Gruppen erfaßt werden, wobei man z. B. bei Seide wertvolle Aufschlüsse über die räumliche Lage der einzelnen Aminosäuren erhält²⁰⁾.

Ein recht originelles Verfahren zur Bestimmung des C-Restes wurde von Akabori angegeben^{21, 22, 23, 18, 83)}. Das Peptid, bzw. Protein wird mit wasserfreiem Hydrazin behandelt (8–12 h, 100 °C), wobei eine Umamidierung der Peptid-Bindungen stattfindet. Sämtliche Aminosäuren, mit Ausnahme der C-terminalen, liegen als Aminosäurehydrazide vor und werden nach Behandeln mit Benzaldehyd oder Nitrobenzaldehyd in die entsprechenden Schiffschen Basen übergeführt. Die freie C-terminale Aminosäure

¹²⁾ E. Abderhalden u. B. Blumberg, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 65, 318 [1910].

¹³⁾ A. L. Levy, Nature [London] 174, 126 [1954].

¹⁴⁾ A. L. Levy, u. D. Chung, J. Amer. chem. Soc. 77, 2899 [1955].

¹⁵⁾ S. Blackbourn, Biochem. J. 45, 579 [1949].

¹⁶⁾ J. C. Perrone, Nature [London] 167, 513 [1951].

¹⁷⁾ G. Braunitzer u. K. H. Reuther, Makromolekulare Chem. 18/19, 501 [1956].

¹⁸⁾ G. Braunitzer, Chem. Ber. 88, 2025 [1955].

¹⁹⁾ G. Koch u. W. Weidel, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 303, 213 [1956].

²⁰⁾ H. Zahn, diese Ztschr. 67, 561 [1955].

²¹⁾ S. Akabori, K. Ohno u. K. Narita, Bull. chem. Soc. Japan 25, 214 [1952].

²²⁾ S. Akabori, K. Ohno, T. Ikenaka, A. Nagata u. J. Haruna, Proc. Japan Acad. (Tokyo) 29, 561 [1953].

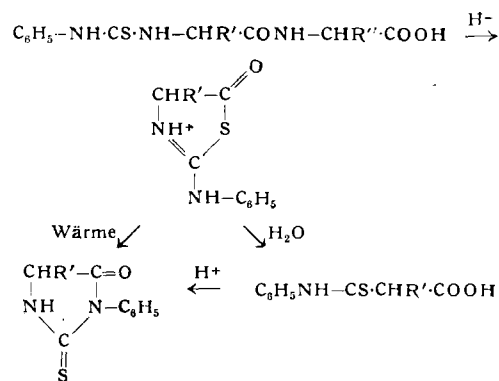
²³⁾ K. Ohno, J. Biochemistry [Tokyo] 40, 621 [1953].

$$\begin{array}{c}
 \text{NH}_2-\underset{\text{R}_1}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\underset{\text{R}_2}{\text{CH}}-\text{CO}\cdots\cdots\cdots\text{NH}-\underset{\text{R}_n}{\text{CH}}-\text{COOH} \\
 \downarrow \text{N}_8\text{H}_4 \\
 \text{NH}_2-\underset{\text{R}_1}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2 + \text{NH}_2-\underset{\text{R}_2}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2 + \cdots + \text{NH}_2-\underset{\text{R}_n}{\text{CH}}-\text{COOH} \\
 \downarrow \text{C}_6\text{H}_5\text{CHO} \\
 \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{N}-\underset{\text{R}_1}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{NH}-\text{N}=\text{CHC}_6\text{H}_5 + \cdots + \text{NH}_2-\underset{\text{R}_n}{\text{CH}}-\text{COOH}
 \end{array}$$

Weitere Verfahren zur Bestimmung eines Restes durch Blockierung: Bestimmung eines N-Restes mit Sulfosäurechloriden (Naphthalin-, Benzol-sulfochlorid²⁴), Mesylchlorid¹¹), Pypsilchlorid²⁵) durch Benzoylchlorid²⁷), durch reduktive Methylierung²⁶), mit Phenylisocyanat oder die Überführung einer Carbobenzoxy-Verbindung in das Aminohydantoin²⁸⁻³¹).

Der stufenweise Abbau wurde zuerst von *Abderhalden* und *Brockmann* vorgeschlagen³²⁾. Hierbei wird zunächst die endständige Aminosäure substituiert und in einem zweiten Schritt selektiv aus dem Peptid-Verband entfernt, wobei die restliche Peptid-Kette intakt bleiben soll. Die vorletzte Aminosäure liegt nun frei vor und die Reaktion kann prinzipiell weiter und bis zum anderen Ende der Peptid-Kette wiederholt werden. Meist wird die terminale Aminosäure als cyclisches Derivat abgespalten. Das wichtigste Verfahren dieser Gruppe ist der Abbau nach *Edman*^{33, 34)}.

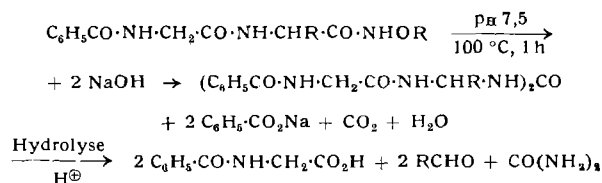
Der Mechanismus des Phenylthioisocyanat-Abbaues wurde erst kürzlich von *Edman* geklärt. Bei Abspaltung des Restes entsteht primär nicht das 3-Phenyl-2-thiohydantoin-Derivat der N-terminalen Aminosäure, sondern das isomere 2-Anilino-5-thiazolinon. Dieses geht unter Wasserausschuß durch intramolekulare Umlagerung oder in wäßriger Lösung nach rascher Hydrolyse zur Phenyl-thiocarbamylsäure durch Ringschluß in das Phenyl-thiocarbamyl-Derivat der Aminosäure über³⁴⁾.



Der schrittweise Abbau gelingt, wenn die NH_2 -Gruppe in α - oder β -Stellung (z. B. auch bei β -Alanin) zur Carboxyl-Gruppe steht. Bei γ -Peptid-Bindungen wie Glutathion findet zwar eine Cyclisierung, jedoch keine Abspaltung der N-terminalen Aminosäure statt.

Beim schrittweisen Abbau kann ferner durch entsprechende Substitution des Restes die benachbarte Peptid-Bindung labil werden, die endständige Aminosäure wird dann unter schonenden Versuchsbedingungen aus dem Peptid-Verband entfernt. Diese Verfahren wurden vorgeschlagen zum Abbau einer Peptid-Kette am C-Ende.

Ein Beispiel hierfür stellt der Abbau nach *Lossen* dar⁽⁴²⁾. Der Peptidester wird in die Hydroxamsäure übergeführt und nach Acylierung das Salz des Acyl-Restes abgespalten. Das entstandene Harnstoff-Derivat wird schließlich mit



Ähnliche Verfahren wurden von *Boissonas*⁴³⁾, *Curtius*⁴⁴⁾, *Bergmann*⁴⁵⁾ und *Bailey*⁴⁶⁾ vorgeschlagen.

⁴⁶⁾ L. Bailey, Biochem. J. 60, 170, 173 [1955].

Neben diesen chemischen Verfahren hat noch ein enzymatisches Bedeutung erlangt: Die Reihenfolge kann unter gewissen Bedingungen mit großem Erfolg mit Carboxypeptidase bestimmt werden⁴⁷⁾. Dieses Enzym spaltet die C-terminale Aminosäure der Peptid-Kette ab. Jedoch bleibt die Reaktion hierbei nicht stehen, vielmehr wird anschließend die vorletzte Aminosäure abgespalten usw. Man kann daher mit diesem Enzym nicht nur die C-terminale Aminosäure, sondern durch kinetische Messungen u. U. auch die benachbarten Aminosäuren ermitteln. Eine genaue Interpretation der Versuchsergebnisse setzt allerdings bereits eine gewisse Kenntnis über die Struktur des untersuchten Proteins bzw. Peptids voraus. Die Carboxypeptidase-Methode hat jedoch den Nachteil, daß verschiedene Aminosäuren durch dieses Enzym verschieden schnell abgespalten werden, Glykokoll und Lysin überhaupt nicht, sehr schnell hingegen die aromatischen Aminosäuren und Leucin, was oft eine klare Interpretation der Versuche erschwert. Die enzymatischen Methoden haben den Vorteil, daß man unter schonenden Bedingungen (H_2O , p_H 7,0, 25 °C) arbeiten kann.

Von den Methoden, die hier diskutiert wurden, haben im wesentlichen die Blockierungsmethoden und die des schrittweisen Abbaues zur Aufklärung der Protein-Struktur beigetragen. Es wurden fast ausschließlich verwendet: Die Dinitrophenyl-Methode, der Abbau mit Phenylsenföhl, Carboxypeptidase und jüngst — die Hydrazin-Methode.

4.) Bestimmung des Säureamids

Bei der vollständigen Aufklärung einer Peptid-Kette muß unterschieden werden, ob die sauren Aminosäuren als solche oder als Amid vorliegen. Die Gesamtzahl der Glutamin- und Asparagin-Reste wird durch die Bestimmung des Säureamid-N nach saurer Hydrolyse als NH_3 ermittelt. Zur Unterscheidung, ob eine bestimmte Aminosäure als Säure oder als Amid vorliegt, wurden im Falle des Insulins spezielle Methoden entwickelt. Sie sind jedoch sehr mühevoll. In Zukunft wird für die Konstitutionsaufklärung einer Peptid-Kette sehr wahrscheinlich weitgehend das *Edman*-sche Verfahren verwendet werden. Durch direkte Chromatographie der Thiohydantoine kann sehr leicht unterschieden werden, ob das Hydantoin als freie Säure oder als Säureamid vorliegt. Wahrscheinlich werden daher die am Insulin verwendeten Verfahren in Zukunft nur mehr in speziellen Fällen herangezogen.

5.) Bestimmung der —S—S—Brücken

Die klassische Konzeption der Protein-Struktur kennt neben der Peptid-Bindung nur noch die Disulfid-Brücke als weitere kovalente Bindung. Ihre Bestimmung ist von großer Bedeutung, da sie einerseits wesentlich zur Faltung der Peptid-Kette beiträgt (s. Insulin), und da andererseits bei vielen Proteinen ihre Spaltung bereits zu einem völligen Verlust der Aktivität führt. Das Protein wird entweder enzymatisch oder durch saure Hydrolyse gespalten und das gesamte Hydrolysat einer Hochspannungselektrophorese unterworfen. Dann werden mit geeigneten Reagentien die Banden der Cystinpeptide untersucht. Diese werden ausgeschnitten und mit Perameisensäure oxydiert. Bei anschließender Hochspannungselektrophorese im stark sauren p_H -Bereich können die Cysteinsäurepeptide in reiner Form gewonnen werden. Jedem Cystinpeptid entsprechen zwei Cysteinsäurepeptide. Durch Totalhydrolyse des entsprechenden Cysteinsäurepeptids wird die dem Cystin benachbarte Aminosäure ermittelt.

⁴⁷⁾ J. I. Harris, Symp. Peptide Chem., Chem. Soc. spec. Publ. 2, 71 [1954].

Durch Vergleich mit der Konstitution der beiden Peptid-Ketten kann die Lage der —S—S—Brücken ermittelt werden.

Die —S—S—Brücken müssen unter ganz bestimmten Versuchsbedingungen bestimmt werden: Es zeigt sich nämlich, daß sehr leicht eine Wanderung und Austausch der —S—S—Brücken untereinander stattfindet, was zu falschen Ergebnissen führt^{48, 49)}.

6.) Bestimmung der Sequenz bei längeren Peptiden

Mit den Methoden zur Bestimmung der Endgruppe und zum schrittweisen Abbau kann im allgemeinen nur die Sequenz kleiner Peptide vollständig ermittelt werden (2–5 Reste). Normale Proteine besitzen aber eine größere Anzahl von Resten (50–1200).

Zur Ermittlung der vollständigen Sequenz bei größeren Peptiden und besonders bei Proteinen müssen daher die Methoden weiter ergänzt werden. Diese werden im allgemeinen in kleinere Spaltprodukte zerlegt, diese anschließend voneinander getrennt und ihre vollständige Struktur mit den oben beschriebenen Methoden ermittelt. Anschließend wird aus der Konstitution der Spaltprodukte auf die Reihenfolge der Gesamtkette geschlossen.

Kleinere Peptide wurden früher meist durch eine unspezifische Hydrolyse (HCl , H_2SO_4 , KOH) in eine größere Anzahl kleinerer Spaltprodukte zerlegt. Heute hingegen wird eine spezifische Hydrolyse mit Enzymen vorgezogen: Hierbei wird die Peptid-Kette nur an bestimmten Stellen gespalten, man erhält daher eine diskrete Anzahl definierter Spaltprodukte.

An Enzymen wurden bis heute verwendet: Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Papain. Besonders geeignet ist Trypsin, dessen Wirkung sehr spezifisch ist, da es nur die Carboxyl-Bindung des Arginins und Lysins spaltet. Da die Anzahl der basischen Aminosäuren in den meisten Proteinen gering ist, läßt sich mit diesem Enzym eine überschaubare Zahl von Spaltprodukten erhalten. Trypsin spaltet nicht nur spezifisch, sondern auch quantitativ. Die Ausbeute an Peptiden beträgt 90–95%.

Die Methoden zur Auftrennung höherer Peptide sind noch in Entwicklung begriffen. Für viele Zwecke hat sich die Gegenstromverteilung bewährt⁵⁰⁾. Man kann hierbei mit relativ großen Substanzmengen arbeiten. Sie versagt jedoch, wenn die Mischung zu viele Komponenten enthält. Sehr oft wird die zweidimensionale Papierchromatographie verwandt⁵¹⁾. Die Methode ist besonders geeignet, komplexe Gemische kleinerer Peptide voneinander zu trennen. Für analytische Zwecke wird mit großem Erfolg ferner die von *Michl* eingeführte Methode der Hochspannungselektrophorese angewandt⁵²⁾. Mit diesem Verfahren können auch größere Peptide voneinander getrennt werden. Besonders bewährt hat sich die Elektrophorese in Pufferlösungen unter Zugabe von Harnstoff^{52, 53)}: Dieser ist selbst nicht leitend, erhöht jedoch die Löslichkeit höherer Peptide wesentlich, wodurch besonders scharfe Banden erzielt werden. Durch Elektrophorese bei verschiedenem p_H kann das Auflösungsvermögen noch weiter gesteigert werden.

Mit großem Erfolg wurden in jüngster Zeit die Peptide über Austauschersäulen aufgetrennt. Diese Verfahren scheinen an Bedeutung zu gewinnen, da man mit relativ geringem Arbeitsaufwand im halbpräparativen Maßstab

⁴⁸⁾ A. P. Ryle u. F. Sanger, Biochem. J. 60, 535 [1952].

⁴⁹⁾ Th. Wieland u. H. Schwahn, Chem. Ber. 89, 420 [1956].

⁵⁰⁾ H. P. Bell, J. Amer. chem. Soc. 76, 5565 [1954].

⁵¹⁾ H. Michl, Mh. Chem. 82, 489 [1952].

⁵²⁾ R. R. Reedfield u. C. B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 221, 385 [1956].

⁵³⁾ F. Turba, unveröffentlicht.

arbeiten kann (Säulendurchmesser 2 cm, Höhe 150 cm, 200–400 mg Peptid-Gemisch). Sehr bewährt haben sich Säulen mit Dowex 50 und einem Vernetzungsgrad von 2%. Bei der Auftrennung ist dem Austausch ein „Molekularsiebeffekt“ überlagert. Die Peptide werden daher sowohl hinsichtlich ihrer Ladung, wie auch hinsichtlich der Kettenlänge gesondert. *Hirs, Stein und Moore* gelang es⁵⁴⁾, durch doppelte Gradientenelution (kontinuierliche Erhöhung des p_H und der Ionenkonzentration) über Dowex 50 X2, die Peptide nach tryptischer, peptischer und chymotryptischer Verdauung von Ribonuclease aufzutrennen und hierdurch weitgehend die Konstitution dieses Enzyms aufzuklären. *E. Smith* konnte nach demselben Verfahren die tryptischen Peptide des Papains quantitativ trennen⁵⁵⁾. Da die Analyse über Dowex 50 vollautomatisch durchgeführt wird und unter neuen Versuchsbedingungen in 24 h eine quantitative Aminosäure-Analyse eines isolierten Peptids beendet ist⁵⁶⁾, scheint diese Methode das Verfahren der Zukunft zu sein.

III. Konstitution von Peptiden und Proteinen

1.) Allgemeine Struktur der Proteine

a) Länge und Zahl der Peptid-Ketten

Die Längen der Peptid-Ketten sind sehr verschieden. Bereits Di- und Tripeptide besitzen biologische Aktivität. Die „klassischen Proteine“ bestehen im allgemeinen aus 120–160 Aminosäuren-Resten. Aus Endgruppenanalysen muß ferner geschlossen werden, daß eine einzige Protein-Molekel aus 1200 Resten bestehen kann (γ -Globulin).

Ein Protein wird im allgemeinen durch sein Molekulargewicht charakterisiert. Nur selten besteht ein Eiweißstoff aus einer einzelnen Peptid-Kette. Meistens können durch Endgruppenanalysen mehr als 1 Mol Endgruppen nachgewiesen werden, d. h. das Protein besteht aus zwei oder mehreren Peptid-Ketten. In Tabelle 1 sind einige

	Mol.-Gew.	Zahl der Peptidketten	N-Rest	C-Rest
Ribonuclease	14 000	1	Lysin	Valin
Pepsin	34 000	1	Leucin	—
Myoglobin (Pferd.) ..	17 000	1	Glycin	—
Insulin	6 000	2	Alanin	Asparagin
			Glycin	Alanin
β -Lactoglobulin	40 000	3	3 Leucin	3 Isoleucin
Rinderglobin	68 000	4	2 Valin	—
			2 Methionin	
TMV	$40 \cdot 10^6$	2300	Prolin	Threonin

Tabelle 1
Übersicht über die Zahl der Ketten und die Endgruppen einiger Proteine

Beispiele zusammengefaßt: Daraus ist ersichtlich, daß u. U. ein biologisch aktives Protein aus einer großen Anzahl von Peptid-Ketten bestehen kann.

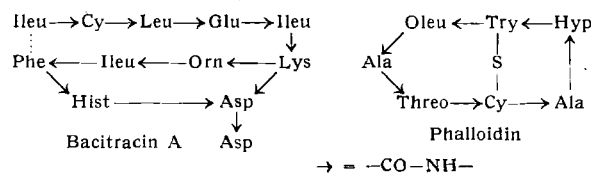
b) Form der Peptid-Kette

Das dominierende Prinzip beim Aufbau der Proteine ist die α -Peptid-Kette. Die klassische Theorie nach *Fischer-Hofmeister* postuliert für jede Peptid-Kette eine freie α -Carboxyl- und eine freie α -NH₂-Gruppe, d. h. die Anordnung der Aminosäuren ist linear. Die Endgruppenbestimmungen haben jedoch gezeigt, daß bei verschiedenen

Proteinen entweder die N- oder die C-terminale Aminosäure nicht nachweisbar ist, sie muß daher blockiert vorliegen.

Bei einigen Peptiden konnte weder eine α -NH₂- noch eine α -Carboxyl-Gruppe nachgewiesen werden (*Gramicidin, Phalloidin, Bacitracin*). Wir haben in diesen Verbindungen typische cyclische Peptide vorliegen. Bei Ovalbumin und im Tabakmosaik-Virus kann zwar eine α -Carboxyl-Gruppe nachgewiesen werden, jedoch keine α -NH₂-Gruppe. In diesem Falle muß die α -NH₂-Gruppe über eine β - oder γ -Carboxylgruppe der Asparagin- oder Glutaminsäure blockiert sein. Beim Tabakmosaik-Virus gelang eine spezifische Freilegung der Endgruppe mit Hydroxylamin. Die Peptid-Kette besitzt daher eine semicyclische Struktur. Der theoretisch mögliche Fall α -NH₂- und blockierte α -Carboxyl-Gruppe wurde noch nicht beschrieben.

Ergebnisse aus den letzten Jahren zeigten, daß bei Peptiden neben der α -Peptid-Bindung und —S—S—Brücken weitere Bindungsarten vorkommen. Bekannt ist die γ -Carboxyl-Verknüpfung der Glutaminsäure im Glutathion. Im Phalloidin konnte z. B. eine neuartige bicyclische C—S—C-Bindung des Cysteins nachgewiesen werden, ferner eine Oxyleucenin-Bindung. Eine besonders bizarre Struktur wurde auch für das Bacitracin vorgeschlagen.



Diese Ergebnisse besitzen für den Proteinchemiker Bedeutung, da es möglich erscheint, daß auch bei Proteinen weitere noch unbekannte Bindungsarten vorliegen.

In der Tat müssen z. B. in der Gelatine die Peptid-Ketten über ϵ -NH₂-Gruppen vernetzt sein, da mit Fluordinitrobenzol nur ein Teil der ϵ -Amino-Gruppen erfaßt wird. In Gelatine wurden ferner veresterte Carboxyl-Gruppen nachgewiesen. Bekannt ist die Veresterung der OH-Gruppen des Serins durch Phosphorsäure in Casein.

Wie schon früher bemerkt, hängt die biologische Aktivität eines Proteins auch von der Faltung der Peptid-Kette ab. Diese wird jedoch wesentlich durch Quervernetzung über eine reaktionsfähige Seitenkette beeinflusst. Für die Entwicklung der Eiweißchemie ist daher das Auffinden weiterer Methoden von Bedeutung, die es gestatten, die in der Seitenkette vorliegenden funktionellen Gruppen der Aminosäuren zu erfassen und zu entscheiden, ob sie frei oder blockiert vorliegen.

c) Gesetzmäßigkeiten der Reihenfolge der Aminosäuren

Es gibt keinen Zweifel, daß die früher viel diskutierte *Bergmann-Niemannsche* Regel nicht besteht. Es sind auch bis heute keine Gesetzmäßigkeiten für die Reihenfolge der Aminosäuren gefunden worden.

Vergleichende chemische Untersuchungen verschiedener Proteine haben jedoch ergeben, daß zwischen der chemischen Konstitution und der biologischen Aktivität eine eindeutige Beziehung bestehen muß. Es zeigt sich nämlich, daß ein und dasselbe Hormon, das von verschiedenen Tieren, jedoch mit derselben biologischen Aktivität ausgeschüttet wird, dieselbe oder zumindest sehr ähnliche Sequenzen besitzt. Die Unterschiede bei einzelnen Arten sind nur gering. Der Austausch findet fast stets an ein und derselben Stelle statt. So unterscheiden sich die ver-

⁵⁴⁾ C. W. Hirs, W. H. Stein u. S. Moore, J. biol. Chemistry 221, 151 [1956].

⁵⁵⁾ E. L. Smith u. J. R. Kimmel, diese Ztschr. 68, 220 [1956].

⁵⁶⁾ S. Moore, Privatmitteilg.

schiedenen Insuline nur geringfügig, die Phenylalanin-Kette ist stets identisch. In der Glycyl-Kette wurden lediglich die achte, neunte und zehnte Aminosäure ausgetauscht^{57, 58}). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Ähnliche Befunde werden auch am Cytochrom C verschiedener Arten gefunden⁵⁹).

	8	9	10
Rind	Ala · Ser · Val		
Schwein	Thr · Ser · Ileu		
Schaf	Ala · Gly · Val		
Pferd	Thr · Gly · Ileu		
Wal	Thr · Ser · Ileu		

Tabelle 2
Die Unterschiede der Reihenfolge der Aminosäuren bei verschiedenen Insulinen

Beziehungen zwischen Aktivität und Sequenz wurden bis heute infolge des geringen Tatsachenmaterials nicht aufgedeckt. Daher besitzen identische Sequenzen biologisch verschiedener Peptide größtes Interesse: Überraschend ähnlich ist die Konstitution zwischen Oxytocin und Vasopressin. Durch Austausch zweier Aminosäuren wird ein biologisch sehr verschieden wirksames Peptid erhalten (Tabelle 3). Dieses Beispiel wurde in jüngster Zeit um ein

Oxytocin	Cyst · Tyr · Ileu · GluNH ₂ · AspNH ₂ · Cyst · Pro · Leu · GlyNH ₂
Arg. Vasopressin .	Cyst · Try · Phe · GluNH ₂ · AspNH ₂ · Cyst · Pro · Arg · GlyNH ₂
Lys-Vasopressin .	Cyst · Tyr · Phe · GluNH ₂ · AspNH ₂ · Cyst · Pro · Lys · GlyNH ₂

Tabelle 3
Gegenüberstellung der Sequenzen des Oxytocins und des Arginyls wie Lysyl-Vasopressins

weiteres bereichert. Die Lage der siebten bis dreizehnten Aminosäure des Melanophoren-Peptids ist identisch mit der vierten bis zehnten Sequenz im Adrenocorticotropen Hormon (die identische Sequenz lautet: Meth · Glu · His · PheAla · Arg · Trypt · Gly)⁶⁰). Es ist bemerkenswert, daß die bisher gefundenen identischen Sequenzen der verschiedenen Peptide in ein und derselben Drüse aufgebaut werden. Durch weitere systematische Untersuchungen werden diesen Beispielen sicherlich noch weitere folgen und wesentlich zur Frage der Wirkungsweise biologisch aktiver Peptide beitragen.

2.) Beispiele

Im folgenden wird beschrieben, wie die Konstitution eines Peptids und Proteins ermittelt wird: Es konnte nur eine Auswahl getroffen werden. Die Konstitution des Gramicidins wurde bereits 1947 veröffentlicht. Es ist die erste Arbeit bei der mit modernen Methoden eine vollständige Sequenz ermittelt wurde. In den Arbeiten über Insulin sind bereits die wesentlichen Züge enthalten, die zur vollständigen Konstitutionsaufklärung größerer Peptide bzw. Proteine angewandt werden. Analoge Untersuchungen wurden z. B. am Adrenocorticotropen Hormon

ausgeführt. Die jüngst veröffentlichten Arbeiten über Ribonuclease sind hier nicht berücksichtigt, da sie in diesem Rahmen nicht entsprechend behandelt werden können^{52, 54}). Die Untersuchungen über das Protein des Tabakmosaik-Virus wurden gewählt, weil sie zeigen, wie die oben geschilderten Methoden auch für andere Arbeitsgebiete, wie Virusforschung, von Bedeutung sind.

a) Die Konstitution des Gramicidin-S

Die totale Hydrolyse ergab im 2-dimensionalen Chromatogramm folgende Aminosäuren-Zusammensetzung: Valin, Ornithin, Leucin, Phenylalanin, Prolin. Sämtliche Aminosäuren liegen im molaren Verhältnis 1:1 vor. Zur Bestimmung der optischen Konfiguration wurde das Papierchromatogramm mit D-Aminosäureoxydase behandelt. Die Flecken der Aminosäuren Ornithin, Leucin, Prolin und Valin zeigten nach der Behandlung eine positive Ninhydrin-Reaktion. Lediglich Phenylalanin wurde desaminiert und muß daher in der unnatürlichen D-Form vorliegen. Mit Fluordinitrobenzol konnte im Gramicidin keine freie α-NH₂-Gruppe nachgewiesen werden. Man erhielt lediglich das δ-Dinitrophenyl-Ornithin. Hieraus folgt, daß das Peptid eine cyclische Struktur besitzen muß. Um die Verknüpfung der Aminosäure-Reste zu bestimmen, wurde das Peptid unter verschiedenen Bedingungen hydrolysiert und die Spaltprodukte durch zweidimensionale Papierchromatographie getrennt, wobei vier Dipeptide und drei Tripeptide isoliert wurden. Die Konstitution der Peptide wurde durch Umsetzung mit Fluordinitrobenzol ermittelt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen wiedergegeben. Die gefundenen Peptide wurden synthetisiert und hinsichtlich der R_f-Werte mit denen von Gramicidin verglichen und identisch gefunden. An Modellversuchen wurde bewiesen, daß unter den Hydrolysen-Bedingungen keine Umpeptidierung stattfinden konnte, d. h. daß die gefundenen Sequenzen schon im Gramicidin vorlagen. Aus diesen Versuchen ergab sich, daß die Aminosäuren im Gramicidin mit der Sequenz Val · Orn · Leu · Phenal · Pro vorliegen. Aus chemischen

					Phenylalanin	Prolin		
				Leucin	Phenylalanin			
			Ornithin	Leucin				
		Valin	Ornithin					
Phenylalanin	Prolin	Valin	Ornithin	Leucin	Phenylalanin	Prolin	Valin	Ornithin
	Prolin	Valin	Ornithin					
		Valin	Ornithin	Leucin				
					Phenylalanin	Prolin	Valin	

Tabelle 4
Mitte: Die Reihenfolge der Aminosäuren im Gramicidin, wie sie aus der Konstitution der isolierten Di- (oben) und Tripeptide (unten) ermittelt wurde

Untersuchungen ist es aber nicht möglich zu entscheiden, ob diese penta-Sequenz im Gramicidin ein oder mehrmals vorkommt. Durch Bestimmung des Mol.-Gew. konnte jedoch festgestellt werden, daß die penta-Sequenz zweimal identisch in der Molekel vorliegen muß, d. h. daß das Gramicidin ein deka-Peptid darstellt⁶¹). Für die Gesamtuntersuchungen wurden 10 mg Substanz benötigt. Die Struktur des Gramicidins wurde jüngstens durch Totalsynthese bewiesen⁶²).

⁵⁷) H. Brown, F. Sanger u. R. Kitair, Biochem. J. 60, 556 [1955].
⁵⁸) J. I. Harris, F. Sanger u. M. Naughton, unveröffentl.
⁵⁹) H. Tuppy, Mh. Chem. 85, 1024 [1954].
⁶⁰) J. I. Harris, Nature [London] 178, 90 [1956].

⁶¹) R. Consden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge, Biochem. J. 41, 596 [1947].
⁶²) R. Swyzer u. P. Sieber, diese Ztschr. 68, 518 [1956].

Zur Lösung der Frage der stereochemischen Anordnung der Aminosäuren wurde von *Lindley*⁶⁸⁾ ein sinnvoller Vorschlag gemacht: Schwierigkeiten bildet hierbei die Verknüpfung der beiden —S—S—Brücken der Glycin-Kette (Bild 1).

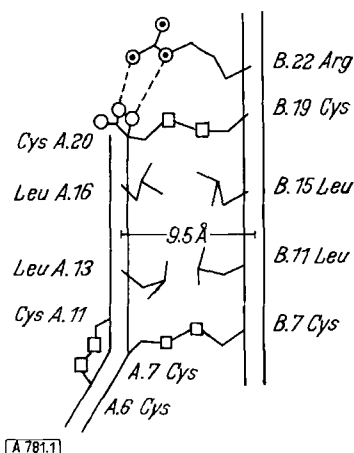


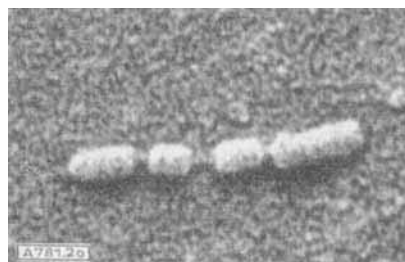
Bild 1. Stereochemische Anordnung des Insulins (nach *Lindley*)

c) Die Konstitution des Proteins des Tabakmosaik-Virus

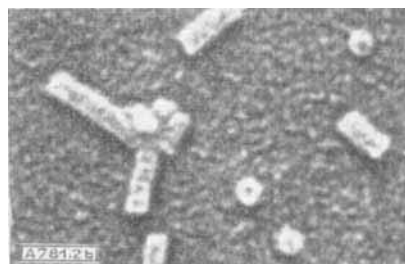
Ein überraschendes Ergebnis haben die Untersuchungen der chemischen Struktur des Proteins des Tabakmosaik-Virus gebracht. Das Virus wurde 1935 in Form parakristalliner Nadeln isoliert (*M. W. Stanley*). Das native Virus besitzt ein Mol.-Gew. von $40 \cdot 10^6$ und besteht zu 6% aus Nucleinsäure und zu 94% aus Protein. Die Infektiosität bleibt bei schrittweiser Entfernung des Proteins erhalten, die Nucleinsäure selbst ist noch biologisch aktiv^{69, 70)}.

Im alkalischen p_H -Bereich zerfällt das Virusprotein in kleinere Untereinheiten. Das kleinste beobachtete Partikel besitzt ein Mol.-Gew. von 90000. Es entsteht die Frage, welches die kleinste chemische Einheit des Proteins darstellt. Sie ist identisch mit der Frage nach der Anzahl der Peptid-Ketten des Virusproteins. Die Zahl der Peptid-Ketten ist identisch mit der Zahl der Endgruppen. Durch Carboxypeptidase werden vom nativen Virus 2300 Mol Threonin je Mol Virus freigelegt^{71–73)}. Wird das Virus mit Hydrazin behandelt, so werden ebenfalls 2300 Mol Threonin nachgewiesen⁷⁴⁾. Aus diesen Ergebnissen, insbesondere aber aus der Hydrazin-Spaltung geht hervor, daß das Virusprotein aus 2300 Peptid-Ketten besteht, die alle mit derselben Aminosäure, Threonin, enden. Durch partielle Spaltung mit Hydrazin konnte gezeigt werden, daß sämtliche Peptid-Ketten dieselbe C-terminale Sequenz $\text{Pro} \cdot \text{Ala} \cdot \text{Threo}$ besitzen^{75, 76)}. Dieses Ergebnis konnte durch Hydrazin-Behandlung nach Abspaltung der C-terminalen Aminosäure mit Carboxypeptidase bestätigt werden^{76–78)}.

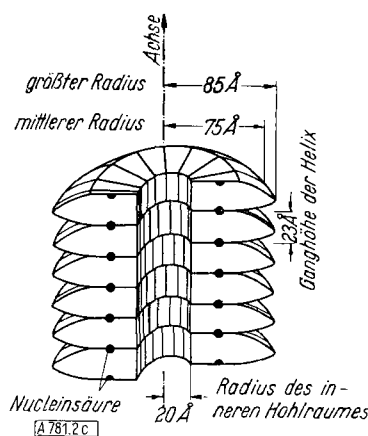
Die N-terminale Aminosäure ist im nativen Virus blockiert und kann erst nach Behandlung mit schwachen Säuren nachgewiesen werden⁷⁹⁾. Als einzige N-terminale Aminosäure wird Prolin gefunden. Die Ausbeute an End-



a



b



c

Bild 2

- a) Tabakmosaik-Virus-Stäbchen mit Proteinlücken und zentralem Nucleinsäurestrang (elektronenmikr. Aufn. 1:150000);
b) Proteinfragmente des Tabakmosaik-Virus, Scheiben mit zentralem Loch. Die Dicke der Proteinscheiben beträgt 70 Å, entspricht also drei Windungen im Röntgenmodell (elektronenmikr. Aufn. 1:150000)*);
c) Strukturmodell des Tabakmosaik-Virus nach *R. Franklin*. Die Peptid-Untereinheiten vom Molgew. rund 17000 sind schraubenförmig um den zentralen Hohlzylinder angeordnet. Die Ganghöhe beträgt 23 Å. Auf drei Windungen kommen 49 Peptid-Untereinheiten, jede Windung umfaßt also rund 16 Peptid-Einheiten, die als Segmente gezeichnet sind. In die Protein-Hülle ist die Nucleinsäure eingelagert, und zwar derart, daß die Massenschwerpunkte sich im Abstand von 40 Å von der Teilchenachse befinden**)

gruppen beträgt, wie am Carboxyl-Ende wiederum 2300 Mol je Viruspartikel. Durch partielle Hydrolyse konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Peptid-Ketten hinsichtlich der Reihenfolge der N-terminalen Aminosäuren identisch sind ($\text{Pro} \cdot \text{Ileu} \cdot \text{Glut}$)⁷⁵⁾. Hierdurch wurde es sehr wahrscheinlich, daß die Peptide in der Reihenfolge sämtlicher Aminosäuren identisch sind, d. h. das Protein des nativen Virus vom Mol.-Gew. annähernd $36 \cdot 10^6$ besteht aus 2300 gleichen Peptid-Ketten vom Mol.-Gew. 17000. Dies konnte weitgehend durch Spaltung mit Trypsin bestätigt werden⁸⁰⁾. Wird die Bausteinsanalyse auf das Mol.-

⁶⁸⁾ *H. Lindley*, *Biochim. biophysica Acta* 18, 194 [1955].

⁶⁹⁾ *A. Gierer u. G. Schramm*, *Nature* [London] 177, 702 [1956].

⁷⁰⁾ *A. Gierer u. G. Schramm*, *Z. Naturforsch.* 11b, 138 [1956].

⁷¹⁾ *J. I. Harris u. C. A. Knight*, *Nature* [London] 170, 613 [1952].

⁷²⁾ *J. I. Harris u. C. A. Knight*, *J. biol. Chemistry* 214, 215 [1955].

⁷³⁾ *G. Schramm, G. Braunitzer u. J. W. Schneider*, *Z. Naturforsch.* 9b, 298 [1954].

⁷⁴⁾ *G. Braunitzer*, ebenda 9b, 371 [1954].

⁷⁵⁾ *G. Braunitzer*, *Naturwissenschaften* 42, 371 [1955].

⁷⁶⁾ *G. Braunitzer*, *Chem. Ber.* 88, 2025 [1955].

⁷⁷⁾ *C. J. Niu u. H. Fraenkel-Conrat*, *Biochim. biophysica Acta* 16, 597 [1955].

⁷⁸⁾ *C. J. Niu u. H. Fraenkel-Conrat*, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 5882 [1955].

⁷⁹⁾ *G. Schramm u. G. Braunitzer*, *Z. Naturforsch.* 8b, 61 [1953].

*) Prof. Dr. G. Schramm, Dir. am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, danke ich für die freundliche Überlassung der Aufnahmen.

**) Aus Ciba-Conference: The Biophysics and Biochemistry of Viruses 1956. Frl. *Rosalind Franklin*, Kirckbeck-Institut London, danke ich für die freundliche Überlassung des Röntgenmodells, dem Verlag Churchill Ltd. London für die Publikationsgenehmigung.

⁸⁰⁾ *G. Schramm, G. Braunitzer u. J. W. Schneider*, *Nature* [London] 176, 456 [1955].

Gew. 17000 bezogen, so ergibt sich, daß eine solche Peptid-Kette 9 Arginyl- und 2 Lysyl-Reste enthält. Tatsächlich werden nach der Behandlung mit dem Enzym 11 neue Endgruppen — je 2300 Mol — freigelegt, d. h. jede der basischen Aminosäuren muß in sämtlichen Peptiden jeweils an die gleiche Aminosäure gebunden sein.

Die Blockierung des N-terminalen Prolins konnte geklärt werden: Durch Einwirkung von Hydroxylamin (p_H 7,0, 60 °C, 24 h) wird Prolin ebenfalls als N-terminaler Rest in Freiheit gesetzt. Diese Reaktion muß als Transpeptidierung gedeutet werden, Prolin ist sehr wahrscheinlich in der Seitenkette durch β - oder γ -Carboxyl-Gruppen⁸¹⁾ blockiert.

Bei weiteren Untersuchungen der Konstitution des Proteins konnte aus Dinitrophenyl-Protein mit Trypsin ein kristallisiertes, N-terminales Peptid mit 21 Aminosäuren isoliert werden⁸²⁾. Durch Behandlung mit Chymo-

trypsin und Umsatz mit Dinitrofluorbenzol konnte das C-terminale Hexapeptid isoliert und in der Struktur aufgeklärt werden. Die Sequenz lautet: Threo · Ser · Gly · Pro · Ala · Threo⁸³⁾.

Es besteht kein Zweifel, daß das Tabakmosaik-Virus-Protein aus ca. 2300 identischen Peptid-Ketten besteht. Die Einheitskette enthält ca. 140–150 Aminosäuren. Durch die vollständige Aufklärung der Struktur der Peptid-Kette wäre eine wertvolle Grundlage für die Erkennung der Biosynthese der Eiweißstoffe und der Viren gegeben. Der Aufbau des Proteins wird durch die Nucleinsäure gesteuert. Im Falle des Tabakmosaik-Virus ist diese selbst und ihr Produkt, die Peptid-Kette, zugänglich. Durch Vergleich der Aminosäure-Sequenz im Peptid mit der Nucleotid-Sequenz werden sich wertvolle Rückschlüsse auf den Mechanismus der identischen Reproduktion ergeben.

Eingegangen am 24. September 1956 [A 781]

⁸¹⁾ G. Braunitzer, *Biochim. biophysica Acta* 19, 576 [1956].

⁸²⁾ G. Schramm u. F. Anderer, *Naturwissenschaften* 42, 4274 [1955].

⁸³⁾ C. J. Niu u. H. Fraenkel-Conrat, *Arch. Biochem. Biophysics* 59, 538 [1955].

Zur Morphologie der Gefriertrocknung

Von Prof. Dr. F. PATAT und Dipl. Chem. J. HARTMANN

Institut für chemische Technologie der T. H. München

Bei der Gefriertrocknung von Lösungen fadenförmiger und kugelförmiger Hochpolymerer, niedermolekularer Zucker und sogar anorganischer Salze wurden Gerüststrukturen von teilweise bemerkenswerter Festigkeit erhalten. Das makroskopische Bild der Trockensubstanzen wird bei allen Stoffgruppen durch die Textur des ausfrierenden Lösungsmittels bestimmt.

Im Rahmen von Untersuchungen über das anomale Fließverhalten von Lösungen extrem hochmolekularer Dextrane¹⁾ griffen wir zurück auf das Verfahren der Gefriertrocknung. Wir beabsichtigten damit, in Anlehnung an die Versuche zum Nachweis der Gerüststruktur in thixotrop erstarrten Tongelen von U. Hofmann und Mitarbeitern²⁾ das Vorliegen analog isolierbarer räumlicher Strukturen aus Fadenmolekeln als Ursache der Fließanomalien unserer hochverdünnten Lösungen zu prüfen.

Wir erhielten nun zwar durch Absublimieren des Lösungsmittels aus eingefrorenen hochpolymeren Dextran-Lösungen raumerfüllende Strukturen, die außerordentlich ähnlich den von Hofmann isolierten Tongerüsten waren, aber es ließen sich ausnahmslos auch aus verdünnten Lösungen der verschiedenartigsten Testsubstanzen (Hochpolymere ohne rheologische Besonderheiten, niedermolekulare Stoffe) makroskopisch gleichartige Trocknungsprodukte isolieren.

Da unseres Wissens vergleichende Untersuchungen über die morphologische Beschaffenheit gefriergetrockneter Substanzen bislang nicht vorliegen, seien unsere bisherigen Beobachtungen und Ergebnisse mitgeteilt.

In einseitig geschlossenen zylindrischen Glasröhrchen (Füllhöhe ca. 2,5 cm) wurden die Lösungen sorgfältig eingefroren und die Lösungsmittel anschließend im Vakuum vollständig heraussublimiert. Die Trocknungssubstanzen waren:

- 1.) gering verzweigte, fadenförmige Hochpolymere (native Dextrane, Polyvinylalkohol, Polyvinylacetat),
- 2.) stark verzweigte, Hochpolymere mit Kugelgestalt (Ovalbumin, Glykogen),
- 3.) niedermolekulare Zucker (Saccharose, Maltose, Glucose) und
- 4.) anorganische Salze (KCl).

¹⁾ F. Patat u. J. Hartmann, *Makromolekulare Chemie* 78, 422 [1956].

²⁾ R. Fahn, A. Weiss u. U. Hofmann, *Naturwissenschaften* 39, 35 [1952]; *Ber. dtsh. keram. Ges.* 30, 21 [1953].

Bis auf das in Benzol gelöste Polyvinylacetat wurden die Stoffe in Wasser gelöst. Während in der Praxis aus Gründen der Wirtschaftlichkeit meist hohe Ausgangskonzentrationen gefordert werden, trockneten wir auch recht verdünnte Systeme.

Zunächst seien die Ergebnisse der Trocknung der 1. Stoffklasse besprochen. Man erhält (bei Verwendung der Röhrchen) je nach Ausgangskonzentration mehr oder weniger dichte pflanzenmarkähnliche Substanzpfropfen, die — abgesehen von einer geringfügigen substanzabhängigen Schrumpfung — das vorherige Volumen der Lösung erfüllen, eine — wiederum stoffabhängige — Elastizität zeigen und die ihre Form auch nach Absprengen der Glasummantelung beibehalten. Beim Zusammendrücken zerrieseln sie nicht, sondern die faserige bis schwammartige Struktur verklebt sich unter Dichteerhöhung.

Bild 1 zeigt getrocknetes Dextran.

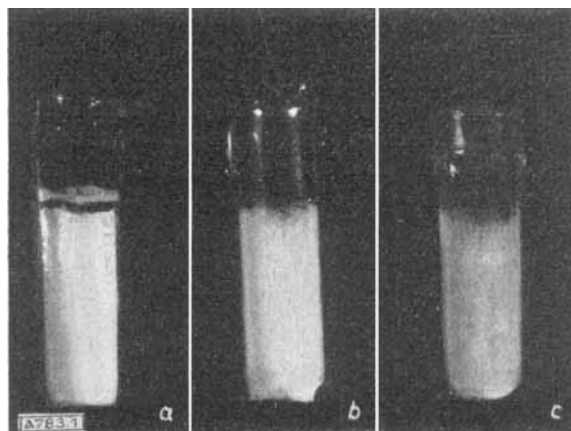


Bild 1
Gefriergetrocknete Dextranlösungen. a) 20 mg/ml, b) 10 mg/ml, c) 1 mg/ml