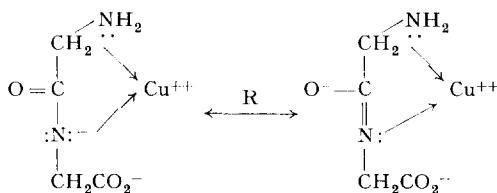


It is probable that complex II undergoes rearrangement to produce the structure:



This rearrangement, which might well occur simultaneously with the displacement of the peptide hydrogen, would be consistent with the marked change in absorption spectrum on ionisation of the complex⁵.

These results have considerable bearing on the mode of action of the metal peptidases and lend some support to the theory of KLOTZ AND MING⁸. It has been suggested (see for example ref. ²) that the role of the cobaltous ion activator in the activity of glycylglycine dipeptidase is to mediate the binding of the substrate to the enzyme. The failure of the enzyme to hydrolyse glycylsarcosine has been ascribed to the reluctance of this substance to form complexes with cobaltous ions. The results in Table I show this explanation to be false: glycylsarcosine is, in fact, a more powerful complexing agent than glycylglycine.

Grateful acknowledgement is made to Dr. E. M. CROOK for invaluable advice and encouragement. One of the authors (B.R.R.) is indebted to the Medical Research Council for a personal grant.

Department of Biochemistry, University College London (England)

S. P. DATTA
B. R. RABIN

¹ M. J. JOHNSON AND J. BERGER, *Advances in Enzymology*, 2 (1942) 69.

² E. L. SMITH, in J. T. EDSALL (Ed.), *Enzymes and Enzyme Systems*, Harvard University Press, Cambridge, Mass. (1951), p. 47.

³ E. M. CROOK, *J. Soc. Leather Trades' Chemists*, 35 (1951) 257.

⁴ B. R. RABIN AND E. M. CROOK, *Biochim. Biophys. Acta* (in the press).

⁵ H. DOBBIE AND W. O. KERMACK, *Biochem. J.*, 59 (1955) 246.

⁶ H. DOBBIE AND W. O. KERMACK, *Biochem. J.*, 59 (1955) 257.

⁷ D. N. SEN, S. MIZUSHIMA, C. CURRAN AND J. V. QUAGLIANO, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 211.

⁸ I. M. KLOTZ AND W. C. L. MING, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 805.

⁹ W. P. EVANS AND C. B. MONK, *Trans. Faraday Soc.*, 51 (1955) 1244.

Received December 23rd, 1955

Zur Konstitution des Proteins des Tabakmosaikvirus

In früheren Arbeiten war festgestellt worden, dass die Aminoendgruppen im Protein des Tabakmosaikvirus (TMV) erst dann nachweisbar werden, wenn man das Virus mit schwachen Säuren (5%ige Trichloressigsäure) vorbehandelt. Nach der Säurebehandlung tritt Prolin als einzige N-terminale Gruppe in Ausbeuten von 1 Mol je 17,000 g Protein auf^{1,2,3}. In der Peptidkette folgen auf das Prolin, Isoleucin und Glutaminsäure⁴.

Wir versuchten die Endgruppe Prolin nach einem weiteren Verfahren freizulegen und ferner die Art der Blockierung festzustellen. Es ist bekannt, dass Amide des γ -Carboxyls der Glutaminsäure oder des β -Carboxyls der Asparaginsäure durch Säuren sehr viel leichter gespalten werden als α -Peptidbindungen. Wir untersuchten daher, ob die Blockierung auf einer derartigen γ - bzw. β -Peptidbindung der Seitenkette beruht.

WILLIAMS^{5,6} konnte zeigen, dass durch Einwirkung von Hydroxylamin unter Transpeptidierung eine Spaltung der γ -Glutamylbindung unter gleichzeitiger Bildung der entsprechenden Hydroxamsäuren stattfindet. Diese Reaktion wurde näher untersucht und in Modellversuchen festgestellt, dass bereits unter schonenden Bedingungen durch Hydroxylamin Glutamin und Asparagin in die entsprechenden Hydroxamsäuren übergeführt werden. Hingegen reagieren α -Peptidbindungen unter den gegebenen Bedingungen nicht.

TMV wurde mit 3N Hydroxylaminlösung bei pH 6.5–7.5 24 Std. bei 60° im Brutschrank oder bei pH 7.0 1 Std. im Wasserbad bei 100° behandelt. In letzterem Fall wurde, um eine Ausflockung des Proteins zu verhindern, Dimethylharnstoff in einer Menge von ca. 50% hinzugegeben. In der Tat liess sich hiernach Prolin als Aminoendgruppe in einer Ausbeute von 50–80% der

theoretischen nachweisen, ohne dass eine Spaltung von α -Peptidbindungen erfolgt wäre. Der Nachweis der Endgruppe erfolgte sowohl nach der DNP-Methode von SANGER⁷, als auch mit Phenylisothiocyanat nach EDMAN⁸. Die Beständigkeit der α -Peptidbindungen wurde auch noch dadurch gesichert, dass bei verlängerter Einwirkung (5 Tage 60°) sich lediglich die Menge an Prolinendgruppen erhöht, jedoch keine neuen Endgruppen daneben auftraten. Auch bei Modellversuchen an Humanalbumin, Pferde- und Rinderglobin liessen sich nach Behandlung mit Hydroxylamin unter den gleichen Bedingungen keine zusätzlichen Endgruppen und insbesondere kein Prolin nachweisen. Aus diesen Versuchen muss geschlossen werden, dass die Blockierung auf eine β - bzw. γ -Peptidbindung beruht.

Wir versuchten weiterhin zu unterscheiden, welche von diesen beiden Möglichkeiten vorliegt. Ein besonderes geeigneter Weg hierzu wäre der LOSSEN-Abbau (in der Modifizierung nach ROTERMUND) der entstandenen Hydroxamsäuren gewesen^{9,10,11}, der in einem Fall zu Diaminobutterim anderen zu Diaminopropionsäure führen müsste. Trotz zahlreicher Versuche liessen sich jedoch keine Bedingungen finden, unter denen nicht auch die übrigen in der Peptidkette vorhandenen β - oder γ -Amidbindungen reagiert hätten. Aus Untersuchungen von WESSELY¹¹ und anderen ist bekannt, dass γ -Glutamylbindungen besonders leicht und bereits beim Kochen mit heissem Wasser gespalten werden. Wurde das Virus bei pH 7 oder 5 in Gegenwart von Dimethylharnstoff 24 Std. auf 100° erhitzt, so wurde die Endgruppe nicht frei. Demnach erscheint eine Asparagylbindung wahrscheinlicher. Um diese Annahme weiter zu stützen, wurde eine enzymatische Spaltung des nativen TMV durchgeführt, mit einem *Aspergillus oryzae* gewonnenen Gemisch verschiedener Proteinasen und Peptidasen¹². Es bestand hier die Hoffnung, dass durch dieses Enzymgemisch alle α -Peptidbindungen gelöst, die vermutete β -Bindung hingegen nicht oder nur wenig angetastet wird. Es gelang, aus dem Hydrolysengemisch nach Umsatz mit Dinitrofluorbenzol ein DNP-Dipeptid zu fassen, das Prolin- und Asparaginsäure enthält. Dieses Peptid wurde durch blosses Behandeln mit Trichloressigsäure in die Komponenten gespalten. Wahrscheinlich handelt es sich hier um das gesuchte β -Peptid.

Zusammenfassend können wir aus diesen Versuchen den Schluss ziehen, dass Prolin am Ende der α -Peptidkette steht¹⁴. Das Auffinden der *Transpeptidierung* mit Hydroxylamin macht das Vorliegen einer β - bzw. γ -Peptidbindung sehr wahrscheinlich, wobei weitere Versuche mehr für die erste Möglichkeit sprechen. Vermutlich handelt es sich um eine innermolekulare Ringbindung, denn die Endgruppe bleibt auch dann blockiert, wenn man das native Virus durch Dodecylsulfat in die einzelnen Peptiduntereinheiten mit dem Mol. Gew. 17,000 aufspaltet¹⁵. Über die Grösse des Ringes kann vorläufig nichts ausgesagt werden.

Für das Interesse bei der Durchführung der Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. SCHRAMM sehr zu Dank verpflichtet.

GERHARD BRAUNITZER

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen (Deutschland)

¹ G. SCHRAMM UND G. BRAUNITZER, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 61.

² G. SCHRAMM, G. BRAUNITZER UND J. W. SCHNEIDER, *Z. Naturforsch.*, 9b (1954) 298.

³ G. SCHRAMM, G. BRAUNITZER UND J. W. SCHNEIDER, *Nature*, 176 (1955) 456.

⁴ G. BRAUNITZER, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 371.

⁵ W. J. WILLIAMS UND C. B. THORNE, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 203.

⁶ W. J. WILLIAMS UND C. B. THORNE, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 631.

⁷ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.

⁸ B. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 283.

⁹ A. LOSSEN, *Ann.*, 175 (1875) 313.

¹⁰ E. ROTERMUND, *Ann.*, 175 (1875) 257.

¹¹ TH. WIELAND UND H. FRITZ, *Ber.*, 86 (1953) 1186.

¹² F. WESSELY, K. SCHLÖGL UND E. WAWERSICH, *Monatsh.*, 84 (1953) 263.

¹³ K. WALLENFELS, *Angew. Chemie*, 64 (1952) 28.

¹⁴ Eine Blockierung des N-terminalen Restes durch β - bzw. γ -Carboxylgruppe wurde bereits von FRAENKEL-CONRAT, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1953) 180 vermutet, jedoch die N-terminale Position des Prolins bestritten.

¹⁵ H. K. SCHACHMANN UND HERSH, unveröffentlicht, zitiert bei 14.

Eingegangen den 24. Dezember 1955