

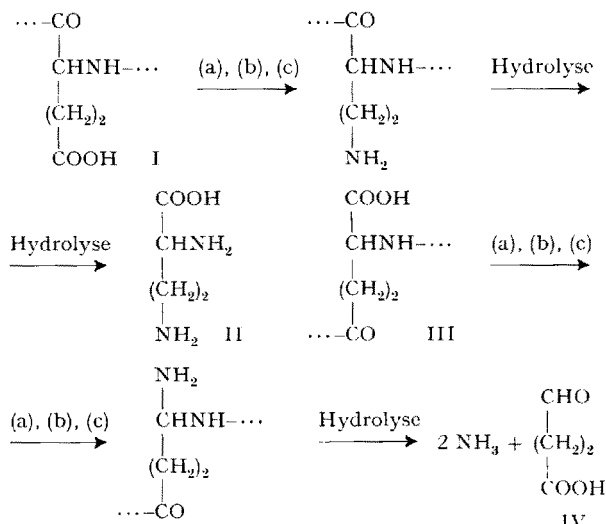
Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Über die Bindungsart der Glutamyreste im *p*-Aminobenzoylpolypeptid aus Hefe

RATNER und Mitarbeiter¹ haben aus Hefe ein *N*-*p*-Aminobenzoyl-polypeptid isoliert und auf Grund analytischer Belege festgestellt, dass die Peptidkette dieser Verbindung aus 10–11 Glutaminsäureresten und einem Rest einer nicht identifizierten Aminodicarbonsäure aufgebaut ist.

Wir haben jetzt die Bindungsart der Glutamyreste an einem aus Hefe selbst isolierten Präparat, das auf analytischem Wege mit dem Ratnerschen Polypeptid identifiziert werden konnte, aufzuklären versucht, und zwar mit Hilfe einer papierchromatographischen Modifizierung der Methode, die zur Konstitutionsermittlung der nativen *D*-Polyglutaminsäure diente². Zu diesem Zwecke wurde aus dem Polypeptid (25 mg) sein Methylester bereitet³ (a), dieser in das Polyhydrazid übergeführt (b), das zuerst nach CURTIUS abgebaut (c) und danach der Säurehydrolyse unterworfen wurde. Es ist zu erwarten, dass durch diesen Abbau aus α -Glutamyresten (I) α,γ -Diaminobuttersäure (II), aus γ -Glutamyresten (III) hingegen β -Formylpropionsäure (IV) entsteht:



Ein Teil des salzsauren Hydrolysats wurde nach Entfernung der anorganischen Salze⁴ und entsprechender weiterer Vorbereitung papierchromatographisch auf Aminosäuren untersucht. (Abb. 1, Lösungsgemisch: Butanol-Eisessig-Wasser; Entwicklung mit Ninhy-

drin). Der andere Teil des Hydrolysats wurde mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt, dann mit Äther extrahiert, der Abdampfrückstand der Ätherlösung in absolutem Alkohol gelöst und der Papierchromatographie unterworfen (Abb. 2. - Lösungsgemisch: mit 3% wässrigem Ammoniak gesättigtes Butanol).



Abb. 1. 1. Hydrolysat des abgebauten Polypeptids. 2. α,γ -Diaminobuttersäure. 3. Glutaminsäure.

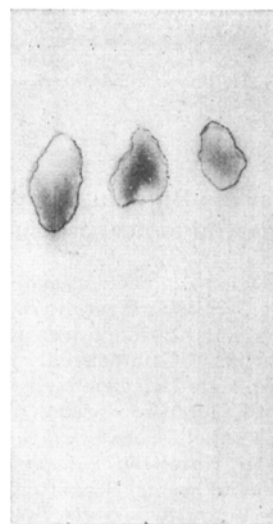


Abb. 2. 1. Dinitro-Phenylhydrazon aus dem abgebauten Polypeptid. 2. Synthetisches β -Formylpropionsäure-dinitrophenylhydrazon. 3. 1 + 2.

Es ist aus den Chromatogrammen ersichtlich, dass im Hydrolysat nur β -Formylpropionsäure und eine Spur von Glutaminsäure aufzufinden ist, jedoch keine α,γ -Diaminobuttersäure. Daraus kann man schliessen, dass in Polypeptid nur γ -Glutamybindungen enthalten sind. Das Erscheinen einer Spur von Glutaminsäure im Hydrolysat dürfte nicht auf eine Verzweigung der Peptidkette, sondern eher auf die unvollständige Umsetzung des Methylesters zum Polyhydrazid (das noch einen Methoxylgehalt von 0,6% aufwies) zurückgeführt werden.

Dass γ -Glutamybindungen für das Polypeptid kennzeichnend sind, steht mit seinen Eigenschaften in gutem Einklang: es zeigt keine Biuretreaktion und ist im Wasser sehr leicht löslich.

Aus enzymatischen Untersuchungen wurde bereits darauf geschlossen, dass in der Peptidkette des *p*-Aminobenzoyl-Polypeptids, CF-Konjugats und Vitamin-B₆-Konjugats eine weitgehende Ähnlichkeit der Konstitution bestehen dürfte¹. Eine Untersuchung dieser Na-

¹ S. RATNER, M. BLANCHARD, A. F. COBURN und D. E. GREEN, J. Biol. Chem. 155, 689 (1944). - S. RATNER, M. BLANCHARD und D. E. GREEN, J. Biol. Chem. 164, 691 (1946).

² J. KOVÁCS und V. BRÜCKNER, Research 5, 194 (1952); Chem. Soc. 1952, 4255. - J. KOVÁCS, V. BRÜCKNER und K. KOVÁCS, Chem. Soc. 1953, 145.

³ H. FRAENKEL-CONRAT, J. Biol. Chem. 161, 259 (1945).

⁴ E. CONSDEN, A. H. GORDON und A. J. P. MARTIN, Biochem. J. 41, 590 (1947).

¹ E. S. SIMS und J. R. TOTTER, Federation Proc. 6, 291 (1947). - B. L. HUTCHINGS und J. H. MONTS, Vitamines and Hormones, Bd. VI., S. 23 (New York, 1948). - W. M. DOCTOR und J. R. COTCH, J. Biol. Chem. 200, 227 (1953).

turstoffe nach der hier angegebenen Methode wäre nun um so mehr angezeigt, da in der Pteroyl-Triglutaminsäure, die mit diesen Verbindungen in mancher Beziehung nahe verwandt ist, die γ -Glutamylbindungen durch Synthese bereits bewiesen wurden¹.

Eine ausführliche Mitteilung erscheint in den Acta Chim. Hung.

I. KANDEL und M. KANDEL

Organisch-Chemisches Institut der Universität Budapest, den 6. Juli 1954.

Summary

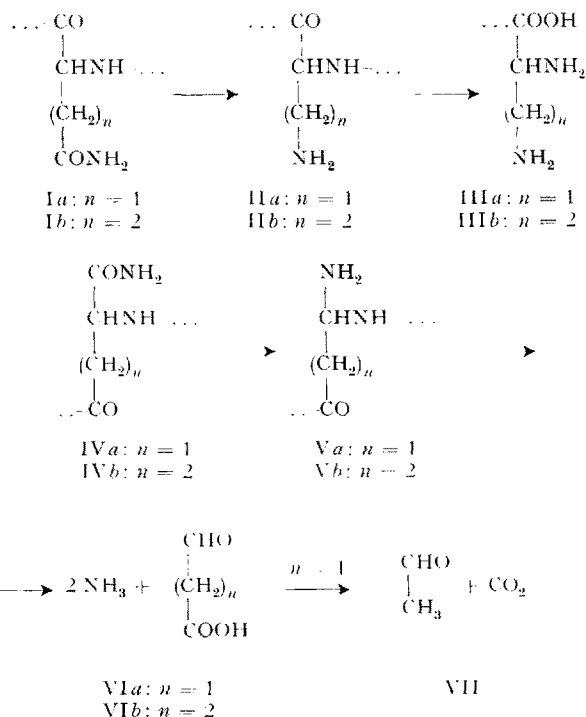
The method used previously for determination of the structure of native poly-D-glutamic acid was extended in modified form (paper chromatography) to the *p*-aminobenzoyl polypeptide of yeast. It was found that this polypeptide is built up of γ -glutamyl bonds.

¹ J. H. BOOTH und Mitarbeiter, Am. Soc. 70, 1098 (1948); 71, 2304 (1949).

Über die Bindungsart der amidierten Reste der β -Aminodicarbonsäuren in Eiweißstoffen

Es wird allgemein angenommen, dass in Eiweissen die nicht-C-endständigen Reste der α -Aminodicarbonsäuren durch α -Peptidbindungen eingebaut sind, während ihre ω -Carboxyl-Gruppen entweder frei oder amidiert vorliegen. Eine Untersuchung von HAUROWITZ und BURSA¹, deren Ergebnisse von diesen Forschern als ein Beweis der Anwesenheit sehr weniger γ -Glutamylbindungen in einigen Eiweissen betrachtet wurde, fand bisher anscheinend wenig Beachtung, denn es wird auch neuerdings betont², dass ein Beweis von ω -Peptidbindungen noch nicht geliefert wurde.

Wir haben jetzt über die Bindungsart der amidierten Reste der α -Aminodicarbonsäuren in Gliadin und Chymotrypsinogen Näheres zu erfahren versucht, und zwar mit Hilfe der Methode, die zur Konstitutionsermittlung der natürlichen D-Polyglutaminsäure³ und unlängst⁴ auch der sogenannten Polyasparthasäure⁵ mit Erfolg herangezogen wurde. Es wurden die kristallisierten Eiweißstoffe mit Natriumhypochloritlösung (Alkalität: In; Menge: ber. auf die Amidgruppen) zuerst bei Raumtemperatur dem Hofmannschen Abbau unterworfen, dann nach Verbrauch des Hypochlorits mit Salzsäure hydrolysiert. Gemäss der Reaktionsfolge I \rightarrow II \rightarrow III ist aus Asparaginy- bzw. Glutaminylresten (Ia bzw. Ib) die Entstehung von α, β -Diaminopropionsäure (IIIa) bzw. α, γ -Diaminobuttersäure (IIIb) zu erwarten, während Isoasparaginy- bzw. Isoglutaminylreste (IVa bzw. IVb) laut Reaktionsfolge IV \rightarrow V \rightarrow VI und Decarboxylierung von VIa-Acetaldehyd bzw. β -Formylpropionsäure (VIb) liefern sollten:



Bei der Hydrolyse wurde zum Abfangen der flüchtigen Aldehyde eine salzsaure Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin verwendet, die man dann mit Äther extrahierte, desgleichen auch das Hydrolysat, das vorher mit demselben Reagens versetzt wurde. Der Rückstand der abgedampften Ätherlösungen wurde in absolutem Alkohol oder Essigester gelöst und dann papierchromatographisch untersucht (Lösungsgemisch: mit 3%igem wässrigen Ammoniak gesättigtes *n*-Butanol). Das ausgeätherte salzsaure Hydrolysat wurde von den anorganischen Salzen befreit¹, dann die Diaminocarbonsäuren nach der Methode von BLOCK² abgesondert und papierchromatographisch untersucht.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst:

Gesuchtes Abbauprodukt	Gliadin	Chymotrypsinogen
Acetaldehyd	+	0
β -Formylpropionsäure . .	+	0
α, β -Diaminopropionsäure .	+	+
α, γ -Diaminobuttersäure .	+	+

Vor Auswertung der Versuchsbefunde muss beachtet werden, dass Natriumhypochlorit freie α -Aminosäuren zu den nächst niedrigeren Aldehyden abbaut³ und denselben Abbau dieses Reagens auch an N-endständigen Aminosäureresten, jedoch nicht an Zwischengliedern der Peptidkette, bewirken kann³. Kontrollversuche zeigten, dass nach derselben alkalischen Einwirkung, denen das Gliadin während des Hofmannschen Abbaues ausgesetzt

¹ F. HAUROWITZ und F. BURSA, Biochem. J. 44, 509 (1949).

² F. SANGER, *The Arrangement of Amino Acids in Proteins*, S. 54, in M. L. ANSON, K. BAILEY und J. T. EPSALL, *Advances in Protein Chemistry*, Bd. 7 (Academic Press, New York 1952). – P. DENSUELLE, *The General Chemistry of Amino Acids and Peptides*, S. 134, in H. NEURATH und K. BAILEY, *The Proteins*, Bd. I, Teil A (Academic Press, New York 1953).

³ V. BRUCKNER, J. KOVÁCS und H. NAGY, Chem. Soc. 1953, 148.

V. BRUCKNER, J. KOVÁCS und K. KOVÁCS, Chem. Soc. 1953, 1512.
V. BRUCKNER, J. KOVÁCS und I. KANDEL, Naturwiss. 40, 243 (1953).
– V. BRUCKNER, J. KOVÁCS und G. DÉNES, Nature 172, 508 (1953).

⁴ J. KOVÁCS und I. KÖNYVES, Naturwiss. 41, 333 (1954).

⁵ J. KOVÁCS, I. KÖNYVES und A. PUSZTAI, Exper. 9, 459 (1953).

¹ E. CONSDEN, A. H. GORDON und A. J. P. MARTIN, Biochem. J. 41, 590 (1947).

² R. J. BLOCK, Science 108, 609 (1948).

³ K. LANGHELD, Ber. 42, 2360 (1909). – W. SIDNEY, S. W. FOX und M. W. BULLOCK, Am. Soc. 73, 2754 (1951). – ST. GOLDSCHMIDT und CH. STEIGERWALD, Ber. 58, 1346 (1925). – ST. GOLDSCHMIDT, E. WIBERG, F. NAGEL und K. MARTIN, Ann. Chem. 456, 1 (1927).