

## Brèves communications - Kurze Mitteilungen

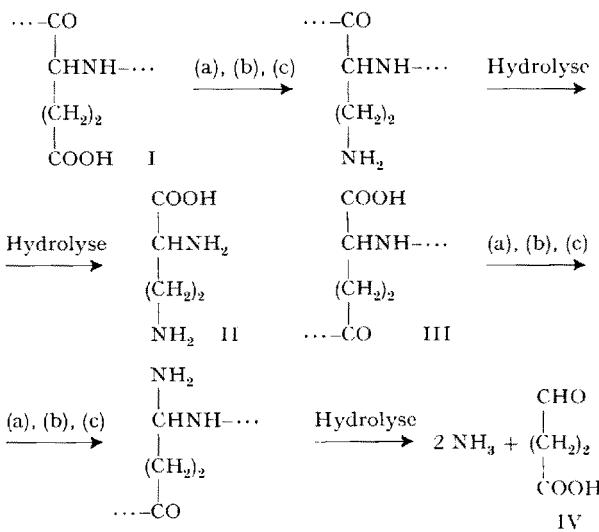
## Brevi comunicazioni - Brief Reports

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 Glutamylreste im *p*-Aminobenzoylpolypeptid aus Hefe

RATNER und Mitarbeiter<sup>1</sup> 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 Glutamylreste 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 diente<sup>2</sup>. Zu diesem Zwecke wurde aus dem Polypeptid (25 mg) sein Methylester bereitet<sup>3</sup> (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  $\alpha$ -Glutamylresten (I)  $\alpha, \gamma$ -Diaminobuttersäure (II), aus  $\gamma$ -Glutamylresten (III) hingegen  $\beta$ -Formylpropionsäure (IV) entsteht:



Ein Teil des salzauren Hydrolysats wurde nach Entfernung der anorganischen Salze<sup>4</sup> und entsprechender weiterer Vorbereitung papierchromatographisch auf Aminosäuren untersucht. (Abb. 1, Lösungsgemisch: Butanol-Eisessig-Wasser; Entwicklung mit Ninhydrin).

<sup>1</sup> 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).

<sup>2</sup> J. KOVÁCS und V. BRUCKNER, Research 5, 194 (1952); Chem. Soc. 1952, 4255. — J. KOVÁCS, V. BRUCKNER und K. KOVÁCS, Chem. Soc. 1953, 145.

<sup>3</sup> H. FRAENKEL-CONRAT, J. Biol. Chem. 161, 259 (1945).

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

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

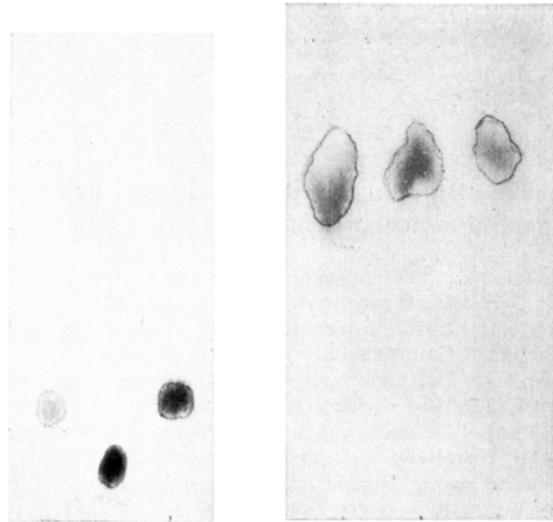


Abb. 1. 1. Hydrolysat des abgebauten Polypeptids. 2.  $\alpha, \gamma$ -Diaminobuttersäure. 3. Glutaminsäure.

Abb. 2. 1. Dinitro-Phenylhydrazone aus dem abgebauten Polypeptid. 2. Synthetisches  $\beta$ -Formylpropionsäure-dinitrophenylhydrazon. 3. 1 + 2.

Es ist aus den Chromatogrammen ersichtlich, dass im Hydrolysat nur  $\beta$ -Formylpropionsäure und eine Spur von Glutaminsäure aufzufinden ist, jedoch keine  $\alpha, \gamma$ -Diaminobuttersäure. Daraus kann man schliessen, dass in Polypeptid nur  $\gamma$ -Glutamylbindungen 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  $\gamma$ -Glutamylbindungen 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-B<sub>6</sub>-Konjugats eine weitgehende Ähnlichkeit der Konstitution bestehen dürfte<sup>1</sup>. Eine Untersuchung dieser Na-

<sup>1</sup> E. S. SIMS und J. R. TOTTER, Federation Proc. 6, 291 (1947). — B. J. HUTCHINGS und J. H. MONTS, *Vitamines and Hormones*, Bd. VI, S. 23 (New York, 1948). — W. M. DOCTOR und J. R. COUCH, 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  $\gamma$ -Glutamylbindungen durch Synthese bereits bewiesen wurden<sup>1</sup>.

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  $\beta$ -aminobenzoyl polypeptide of yeast. It was found that this polypeptide is built up of  $\gamma$ -glutamyl bonds.

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

### Über die Bindungsart der amidierten Reste der $\beta$ -Aminodicarbonsäuren in Eiweißstoffen

Es wird allgemein angenommen, dass in Eiweißen die nicht-C-endständigen Reste der  $\alpha$ -Aminodicarbonsäuren durch  $\alpha$ -Peptidbindungen eingebaut sind, während ihre  $\omega$ -Carboxyl-Gruppen entweder frei oder amidiert vorliegen. Eine Untersuchung von HAUROWITZ und BURSA<sup>1</sup>, deren Ergebnisse von diesen Forschern als ein Beweis der Anwesenheit sehr weniger  $\gamma$ -Glutamylbindungen in einigen Eiweißen betrachtet wurde, fand bisher anscheinend wenig Beachtung, denn es wird auch neuerdings betont<sup>2</sup>, dass ein Beweis von  $\omega$ -Peptidbindungen noch nicht geliefert wurde.

Wir haben jetzt über die Bindungsart der amidierten Reste der  $\alpha$ -Aminodicarbonsäuren in Gliadin und Chymotrypsinogen Näheres zu erfahren versucht, und zwar mit Hilfe der Methode, die zur Konstitutionsermittlung der natürlichen D-Polyglutaminsäure<sup>3</sup> und unlängst<sup>4</sup> auch der sogenannten Polyaspartsäure<sup>5</sup> 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 Asparaginyl- bzw. Glutaminylresten (Ia bzw. Ib) die Entstehung von  $\alpha$ , $\beta$ -Diaminopropionsäure (IIIa) bzw.  $\alpha$ , $\gamma$ -Diaminobuttersäure (IIIb) zu erwarten, während Isoasparaginyl- bzw. Isoglutaminylreste (IVa bzw. IVb) laut Reaktionsfolge IV  $\rightarrow$  V  $\rightarrow$  VI und Decarboxylierung von VIa-Acetaldehyd bzw.  $\beta$ -Formylpropionsäure (VIb) liefern sollten:

<sup>1</sup> F. HAUROWITZ und F. BURSA, Biochem. J. 44, 509 (1949).

<sup>2</sup> F. SANGER, *The Arrangement of Amino Acids in Proteins*, S.4, in M. L. ANSON, K. BAILEY und J. T. EDSELL, *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).

<sup>3</sup> V. BRUCKNER, J. KOVÁCS und H. NAGY, Chem. Soc. 1953, 148.

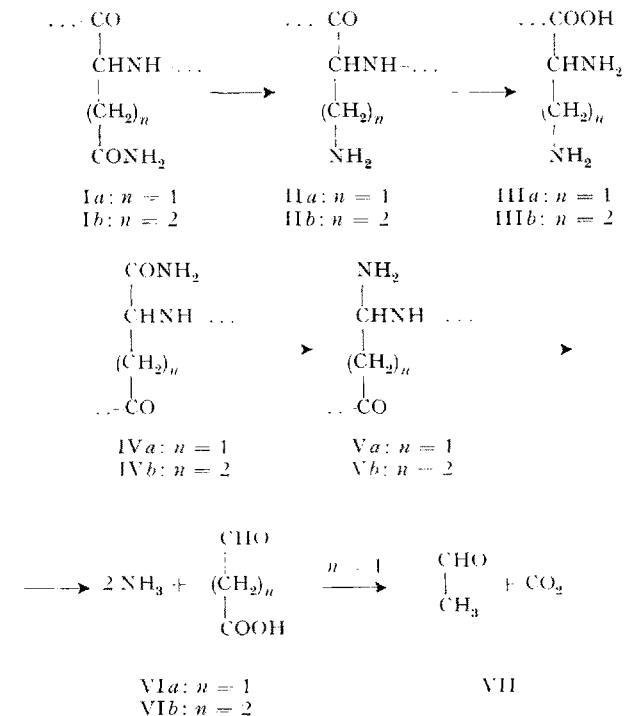
V. BRUCKNER, J. KOVÁCS und K. KOVÁCS, Chem. Soc. 1953, 1512.

V. BRUCKNER, J. KOVÁCS und I. KANDEL, Naturwiss. 40, 243 (1953).

- V. BRUCKNER, J. KOVÁCS und G. DÉNES, Nature 172, 508 (1953).

<sup>4</sup> J. KOVÁCS und I. KÖNYVES, Naturwiss. 41, 333 (1954).

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



Bei der Hydrolyse wurde zum Absingen 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 befreit<sup>1</sup>, dann die Diaminocarbonsäuren nach der Methode von BLOCK<sup>2</sup> abgesondert und papierchromatographisch untersucht.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst:

Gesuchtes Abbauprodukt	Gliadin	Chymotrypsinogen
Acetaldehyd . . . . .	+	0
$\beta$ -Formylpropionsäure . .	+	0
$\alpha$ , $\beta$ -Diaminopropionsäure .	+	+
$\alpha$ , $\gamma$ -Diaminobuttersäure . .	+	+

Vor Auswertung der Versuchsbefunde muss beachtet werden, dass Natriumhypochlorit freie  $\alpha$ -Aminosäuren zu den nächst niedrigeren Aldehyden abbaut<sup>3</sup> und denselben Abbau dieses Reagens auch an N-endständigen Aminosäureresten, jedoch nicht an Zwischengliedern der Peptidkette, bewirken kann<sup>3</sup>. Kontrollversuche zeigten, dass nach derselben alkalischen Einwirkung, denen das Gliadin während des Hofmannschen Abbaus ausgesetzt

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

<sup>2</sup> R. J. BLOCK, Science 108, 609 (1948).

<sup>3</sup> K. LANGFELD, 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).