

PTH-Aminosäuren

(Bearbeitet von G. PATAKI)

Die Lösungsmittelsysteme, welche zur papierchromatographischen Trennung der PTH-Aminosäuren verwendet werden^{15–17, 20}, sind auf dem von uns benützten Kieselgel G unbrauchbar. Befriedigende Trenneffekte haben wir hingegen mit den in Tabelle IV angegebenen Mischungen erzielt; in geeigneter Kombination ermöglichen die Systeme Nr. 6–9 die direkte Identifizierung von 14 der insgesamt 19 angeführten PTH-Derivate der Tabelle IV.

PTH-Val, PTH-Phe, PTH-Met einerseits, sowie PTH-Leu und PTH-Ileu anderseits, wandern ausnahmslos gemeinsam. Sie müssen deshalb im allgemeinen Fall nach vorgängiger Hydrolyse in Form der freien Aminosäuren identifiziert werden; liegt PTH-Met allein vor, so ist es nach Behandlung mit H_2O_2 ohne Hydrolyse direkt erkennbar. Oft wird aber schon die Bestimmung der Bruttozusammensetzung eines Peptids (Totalhydrolyse) genügend Information liefern, um eine Abkürzung des Identifizierungsverfahrens von Val und Phe bzw. Leu und Ileu zu gestatten.

Lösungsmittelsysteme, Farbreaktionen der PTH-Aminosäuren und Rf-Werte

Qualität der Lösungsmittel. Chloroform: stabilisiert mit 1,5% Äthanol («Fluka»³¹), Ameisensäure: wasserfrei («Fluka»³¹), Eisessig, Methanol und Methyläthylketon: handelsübliche Qualitäten durch kurze Kolonne destillieren, Pyridin: 24 h über Bariumoxyd kochen und durch kurze Kolonne destillieren.

Die nachstehenden Angaben über die Mischungsverhältnisse der Systeme Nr. 6–10 beziehen sich auf Volumina bei ca. 20°C.

Lösungsmittelsysteme. Nr. 6: Chloroform. Nr. 7: Chloroform-Methanol(9:1). Nr. 8: Chloroform-Ameisensäure (100:5). Nr. 9: Chloroform-Methanol-Ameisensäure (70:30:2). Nr. 10: Methyläthylketon-Pyridin-Wasser-Eisessig (70:15:15:2).

Farbreaktionen. Das von EDMAN und SJÖQUIST²⁰ und neuerdings von CHERBULIEZ²⁵ zum Sichtbarmachen verwendete Jodazid ist nach unserer Erfahrung kein ideales Reagens für die PTH-Aminosäuren. Wir erhalten bei unseren Kieselgel G-Schichten weisse Flecken auf hellblauem Hintergrund, die man schlecht sieht und die schnell wieder verschwinden. Grote-Reagens¹⁸ wäre besser, ist aber in der Anwendung umständlich und zeitraubend. Sehr gute Dienste leistet der Chlor-Tolidin-Test. Man lässt nach dem Chlorieren³⁷, vor Luftzug geschützt, 3–5 min stehen. Bei sehr vorsichtigem Besprühen erhält man augenblicklich fast punktförmige Flecken; besprüht man weiter, so werden sie alsbald grösser und können sich dann unter Umständen mit benachbarten Flecken überdecken (vgl. zum Beispiel Flecken 10 und 11 in Fig. 4). PTH-

Tab. IV. Rf-Werte der PTH-Aminosäuren in den Lösungsmittelsystemen Nr. 6–9 bei eindimensionaler aufsteigender Chromatographie. Versuchstechnik vgl.²⁴

PTH	Nr. 6 CHCl ₃	Nr. 7 CHCl ₃ – CH ₃ OH (9:1 v/v)	Nr. 8 CHCl ₃ – HCOOH (100:5 v/v)	Nr. 9 CHCl ₃ –CH ₃ OH– HCOOH (70:30:2 v/v)
Ala	0,16	0,68	0,39	~1
Arg	0	0,01	0	0,24
Asp	0	0,01	0,13	0,70
Asp(NH ₂)	0	0,23	0,07	~1
Glu	0,01	0,04	0,17	0,75
Glu(NH ₂)	0,01	0,28	0,08	~1
Gly	0,10	0,56	0,33	0,90
His	0,01	0,29	0	~1
Ileu	0,40	0,77	0,57	~1
Leu	0,40	0,77	0,60	~1
Lys	0,12	0,71	0,34	~1
Met	0,33	0,75	0,51	~1
Met-Sulfoxyd	0,01	0,40	0,12	~1
Phe	0,28	0,74	0,50	~1
Pro	0,60	0,82	0,65	~1
Thr	0,04	0,45	0,15	~1
Try	0,13	0,62	0,39	~1
Tyr	0,03	0,47	0,21	~1
Val	0,32	0,74	0,55	~1

Gly gibt als einzige PTH-Aminosäure eine charakteristische Fleckenform, an der man es sofort erkennen kann (Fig. 4).

Fleckengrösse und Rf-Werte. Bei PTH-Pro haben wir in System Nr. 7 die Abhängigkeit der Fleckengrösse von der Substanzmenge geprüft. Wenn die Verbindung jedesmal in 0,5 µl Methanol aufgetragen wird, so ist die Fleckenfläche bei Beladungen zwischen 0,05 und 72 µg ungefähr dem \log der Substanzmenge proportional. Der Rf-Wert bleibt praktisch konstant.

Tabelle IV orientiert über die Rf-Werte, welche man beobachtet, wenn die angegebenen Substanzen einzeln aufgetragen (0,5 µg in 0,5 µl Methanol) und chromatographiert werden. Beim Vorliegen von Mischungen, die in einem Totalvolumen von ebenfalls 0,5 µl aufgetragen werden, können Abweichungen der Rf-Werte auftreten. Man verlässt sich deshalb bei Identifizierungen wie im Fall der DNP-Aminosäuren besser auf einen direkten Vergleich mit Kontrollsubstanzen oder auf das Fleckenmuster eines zweidimensionalen Chromatogramms (Beladung wie im eindimensionalen Chromatogramm).

Identifizierung von PTH-Aminosäuren

A) Einzelne PTH-Aminosäuren oder einfache Gemische. Die erwähnte Unsicherheit in bezug auf die Rf-Werte lässt es ratsam erscheinen, eine unbekannte PTH-Aminosäure zunächst zweidimensional in den Systemen Nr. 7 und 8 zu chromatographieren und auf

³⁷ F. REINDEL und W. HOPPE, Chem. Ber. 87, 1103 (1954). Modifizierung siehe M. BRENNER et al., Helv. chim. Acta 40, 1497 (1957). Die Chlorbehandlung ist hier auf 25 min auszudehnen!

Grund des Fleckenmusters in Figur 4 eine vorläufige Zuordnung zu treffen. Diese wird in einem zweiten Versuch, in welchem einige im Fleckenmuster benachbarte PTH-Aminosäuren mitchromatographiert werden, bestätigt³⁸. 11 Substanzen sind so direkt identifizierbar.

Spezialfälle. Asp, Glu: Das Auftreten eines Fleckens an der Stelle 2 (Fig. 4) kann auf PTH-Asp oder PTH-Glu oder beide zurückzuführen sein. Zur Unterscheidung chromatographiert man eindimensional im System Nr. 9; die Zuordnung bietet keine Schwierigkeiten, wenn man die beiden Substanzen als Kontrollen mitlaufen lässt (vgl. Fig. 5).

Pro: Liegt die Unbekannte rechts oben im Gebiet des grossen Fleckens 13, so chromatographiert man eindimensional im System Nr. 6 und lässt gleichzeitig als Vergleichssubstanzen die PTH-Derivate von Val, Met, Phe, Ileu, Leu und Pro mitlaufen (vgl. Fig. 6). Der Versuch gestattet innerst $\frac{1}{2}$ h eine Entscheidung zwischen PTH-Pro oder [PTH-Ileu + PTH-Leu] oder [PTH-Val + PTH-Met + PTH-Phe].

Met: Handelt es sich um die letztere dieser drei Möglichkeiten, so kann die Anwesenheit von PTH-Met durch ein weiteres eindimensionales Chromatogramm im selben System festgestellt werden, wenn die Probe vorher mit H_2O_2 behandelt wird. Das Ausmass der Oxydation hängt vom Verhältnis H_2O_2 zu PTH-Aminosäure ab. Deshalb belädt man eine neue Platte viermal (A, B, C, D) mit der gleichen Menge der Unbekannten, lässt 60 sec trocknen (Lösungsmittel Methanol) und setzt dann jedesmal $0,5 \mu\text{l} H_2O_2$ zu: bei A 30/4-, bei B 30/8-, bei C 30/16-, bei D 30/32-proz. H_2O_2 . Schon nach 2 min kann man chromatographieren. Figur 7 zeigt die resultierende Substanzverteilung in Abhängigkeit von der Oxydationswirkung. Man wertet dort aus, wo die Oxydation am wenigsten Nebenprodukte liefert (zum Beispiel bei C in Fig. 7). Tritt nur ein Fleck am Startpunkt auf und höchstens ein undeutlicher Nebenfleck weiter oben, so ist die Anwesenheit von PTH-Met erwiesen. Falls auch oberhalb des Startpunktes deutliche Flecken auftreten, so liegt nicht nur PTH-Met, sondern auch PTH-Val oder PTH-Phe oder ein Gemisch der beiden vor. Kein Flecken am Startpunkt bedeutet Abwesenheit von PTH-Met; wie bei allen Beweisführungen auf negativer Basis ist indessen bei dieser Folgerung Vorsicht geboten.

Leu, Ileu, Phe, Val (und Met): Sind auf Grund der Chromatogramme nach Figur 4 und 6 eine oder mehrere Aminosäuren aus dieser Gruppe anwesend, so hydrolysiert man etwa $1 \mu\text{g}$ der Probe 12 h mit $6n HCl$ bei 120° im Rohr, verdampft zur Trockne, nimmt in Wasser auf und chromatographiert eindimensional in $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (60:20:20) bzw. Phenol- $H_2\text{O}$ (75:25): Phe, Val und Met lassen sich sowohl unter sich als auch von den Leucinen unterscheiden²⁴. Zur Unterscheidung der Leucine dient bei Abwesenheit von Phe, Val und Met ein Durchlaufchromatogramm nach

Fig. 4. Zweidimensionales Chromatogramm einer Mischung von je $0,5 \mu\text{g}$ PTH-Aminosäure in den Systemen Nr. 7 und 8. (Met.O = Methioninsulfoxid.) Original $10 \times 10 \text{ cm}$.

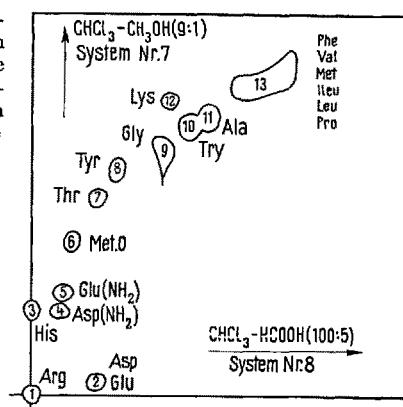


Fig. 5. Eindimensionales Chromatogramm im System Nr. 9 zum Nachweis von PTH-Asp und PTH-Glu. Kontrollen: je $0,5 \mu\text{g}$ PTH-Arg in der Probe tritt nur im Spezialfall komplexer Gemische auf (vgl. Text). Laufstrecke 11 cm.

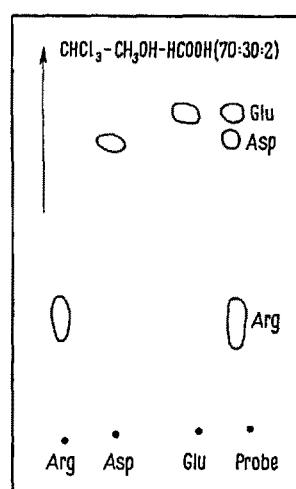
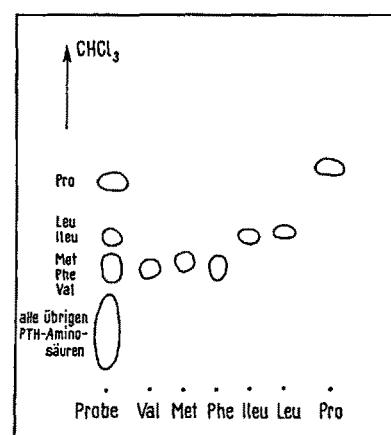


Fig. 6. Eindimensionales Chromatogramm im System Nr. 6 zum Nachweis von PTH-Pro, PTH-Leu + PTH-Ileu und PTH-Met + PTH-Phe + PTH-Val. Kontrollen: je $0,5 \mu\text{g}$. Laufstrecke 10 cm.



³⁸ Der direkte Vergleich mit einer Standard-Mischung (vgl. DNP-Aminosäuren) ist wegen der beschränkten Haltbarkeit (72 h) von methanolischen PTH-Aminosäure-Lösungen kostspielig.

Figur 8 im System Nr. 10³³. – Dieses Verfahren zur Trennung der Leucine ist auch anwendbar, wenn das PTH-Leucin-Gemisch erst durch eindimensionale Chromatographie nach Figur 6 von anderen PTH-Aminosäuren abgetrennt werden muss (vgl. B: Komplexe Gemische). Man eluiert in diesem Fall den Leucin-Fleck vom eindimensionalen Chromatogramm mit Methanol³⁴, hydrolysiert und chromatographiert nach der Durchlauf-Methode³³. Zur sicheren Identifizierung ist es erforderlich, dass die auf das eindimensionale Chromatogramm gebrachte Probe mindestens 1 µg PTH-Leu und/oder 1 µg PTH-Ileu enthält.

Bemerkung. Wenn man nicht hydrolysieren muss, erfordern alle oben beschriebenen Experimente insgesamt höchstens 1 µg Material pro PTH-Aminosäure. Man wird es deshalb oft vorziehen, auf Kosten von etwas Substanz Zeit zu sparen und die verschiedenen Chromatogramme nicht hintereinander, sondern nebeneinander laufen zu lassen. Der Zeitbedarf der einzelnen Operationen beträgt: Auftragen: 5 min; Laufzeit/10 cm: 30 min; Trocknen: 5 min; Chlorieren: 25 min; Tolidin: 2 min; H₂O₂: 12 min.

B) *Komplexe Gemische.* Weist das zweidimensionale Chromatogramm (Fig. 4) zahlreiche Flecken auf, so wird eventuell eine Elution notwendig. Man bereitet ein neues Chromatogramm, verzichtet auf die Chlor-Tolidin-Behandlung und streift das Gebiet der Flecken 1 und 2 einerseits und 13 andererseits von der Platte ab. Zum Eluieren wird das Kieselgel G in etwa 1 ml Methanol suspendiert. Man hält 2 min auf 40–50°, filtriert, wäscht dreimal mit heißem Methanol nach und verdampft zur Trockne.

Das vereinigte Material aus Flecken 1 und 2 wird nach Figur 5 eindimensional im System Nr. 9 mit PTH-Arg, PTH-Asp und PTH-Glu als Kontrolle chromatographiert.

Mit dem Eluat aus Flecken 13 verfährt man nach den Angaben über Pro; Met; Leu, Ileu, Phe, Val (und Met) im voranstehenden Abschnitt A.

Schlussfolgerung

DNP-Aminosäuren. Ausser DNP-Hypro, das nicht untersucht wurde, lassen sich die DNP-Derivate aller Eiweiss-Aminosäuren (Tab. I und II) durch drei gleichzeitige Chromatogramme in verschiedenen Systemen (Tab. I, Fig. 2 und 3) auf einfachste Weise voneinander trennen. Der Zeitbedarf pro Dimension beträgt nur 1–3 h. Zum sicheren Nachweis einer DNP-Aminosäure mittels UV-Photokopie genügen noch $2 \cdot 10^{-3} \mu M$, bei eindimensionaler Chromatographie sogar $10^{-4} \mu M$, das heißt zum Beispiel 0,02 µg DNP-Ser. Bei hohen Beladungen (ca. 100 µg) gelingt es deshalb häufig, noch 0,05% (!) einer beigemengten fremden DNP-Aminosäure einwandfrei zu erfassen.

PTH-Aminosäuren. Ein zweidimensionales (Fig. 4) und zwei eindimensionale (Fig. 5 und 6) Chromatogramme, die man ohne langwierige Äquilibrierung und

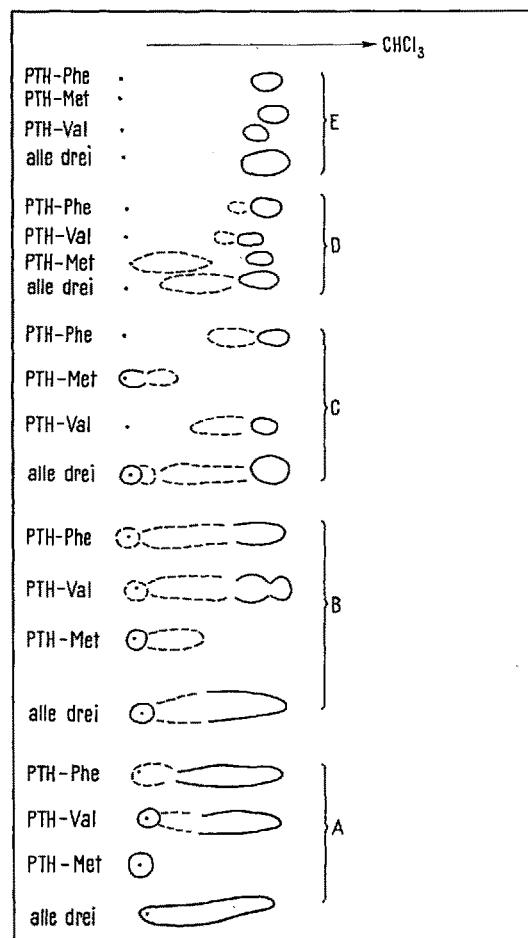


Fig. 7. Oxydation der PTH-Aminosäuren (je 1 µg) der «Methionin-gruppe» durch zunehmende Mengen H₂O₂ für sich allein und in Mischungen (vgl. Text). E = Vergleich ohne H₂O₂. Laufstrecke 10 cm.

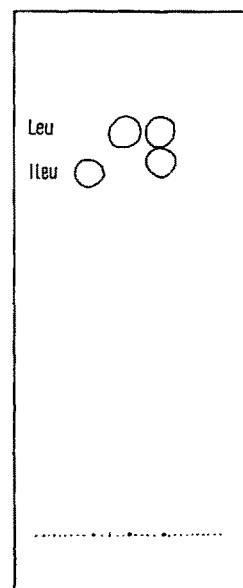


Fig. 8. Durchlauf-Chromatogramm im System Nr. 10 zur Trennung von Leu und Ileu (5 h, je 1 µg Leu und Ileu). Laufstrecke von Leu 10 cm.

gleichzeitig laufen lassen kann, trennen 14 von den 19 PTH-Aminosäuren der Tabelle IV. Mit Hilfe einer einfachen Oxydationstechnik (Fig. 7) und durch saure Hydrolyse mit anschliessender dünnenschichtchromatographischer Identifizierung der freigesetzten Aminosäure, die hier in jedem Fall hydrolysebeständig ist, werden die noch fehlenden 5 Substanzen mit wenig zusätzlichem Aufwand ebenfalls nachweisbar (Fig. 8 und 24). Zum Sichtbarmachen der PTH-Aminosäuren be-

währt sich ein modifizierter Chlor-Tolidin-Test; die Erfassungsgrenze liegt bei etwa $3 \cdot 10^{-4} \mu M$, das heisst zum Beispiel bei $0,05 \mu g$ PTH-Pro (!).

Summary. Methods for the identification of DNP- and PTH-amino acids are improved by application of thin-layer chromatography using Kieselgel G. The advantages over paperchromatography are better resolution, increased sensitivity and time-saving.

Cell Metabolism and Virus¹

By E. KovÁcs²

Viral infection is a cellular phenomenon. The virus, as a particle of macromolecular organization – or one part of it, the nucleic acid moiety – adsorbed on the external barrier of the cell, penetrates into it, takes over command of various physiological functions and determines or provokes its own reproduction by the host-cell. Thus, one might assume *a priori* a profound alteration, almost a metamorphosis of the cellular metabolism as the consequence of infection *with* and biosynthesis *of* the virus. As a matter of fact, experimental data accumulated up-to-date support the rightness of such ideas^{3,4}, in spite of many difficulties for the technical approach. For instance, up to about the last one and half decades, living experimental animals were almost exclusively used, which fact means a heterogeneous cell population regarding morphology and function, or viral sensitivity. With the use of chorio-allantoic membranes (CAM) of embryonated eggs⁵, and later the tissue cultures of mammalian cells, for virus research⁶, it became possible to study the sequence of events at the cellular level, also in viral diseases of animals. By this way, our actual concept of Virology was born: a biochemical and molecular one, quite different from the orthodox, bacteriological, and microbiological ideology. Thus the virus disease is a novel chapter of the Cell Physiology and Cell Pathology; 'a chemical infection' caused by invading *macromolecules*.

After this preamble, we want to limit this broad subject almost exclusively to the discussion of data regarding the metabolism of mammalian cells. Especially findings obtained in cultivated cells will be reviewed for the characteristic alterations caused by various viruses. Two great categories will be excluded from the beginning, namely that of the bacteriophage and plant viruses. These limitations allow us to list in this relation pertinent findings with the animal viruses, including human ones. However, this domain

is so extremely rich, that only the most important experimental facts can be presented and discussed.

Cell respiration and virus. From the historical angle, we quote experiments intended to demonstrate, without success, changes in O_2 consumption of brain slices derived from animals infected with poliomyelitis virus⁷. On the other hand, a slight increase of respiration was described in western equine encephalitis virus infected tissue cultures⁸. However, brain homogenates of mice paralyzed with human or murine poliomyelitis did not differ from the normal controls regarding respiration^{9,10}. Later PARODI¹¹ and others¹²⁻¹⁴ observed, with more refined special techniques, an increase, respectively the decrease of oxygen consump-

¹ On the basis of a relation presented at the Symposium. *The Effect of Corticosteroids on Viral Infection*. Symp. Soc. Ital. Stud. Malatt. infett. parazit., Sta. Margherita Ligure, June 11/12, 1960. G. Malatt. infett. parazit. (in italiano), in press.

² Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max-Planck-Institut), Abteilung für Serologie und Mikrobiologie, München (Germany).

³ C. HANNOUN, in J. A. THOMAS, *Exposés actuels de biologie cellulaire: Mécanismes d'autoreproduction* (Masson & Cie, Edit., Paris 1957), p. 363.

⁴ R. KOPPELMANN and E. A. EVANS, JR., Progr. Med. Virol. 2, 73 (1959).

⁵ G. J. BUDDINGH, in T. M. RIVERS and F. L. HORSFALL, *Viral and Rickettsial Infections of Man*, 3rd Edition (Lippincott Co., Philadelphia 1959), p. 199.

⁶ J. D. ROSS and J. T. SYVERTON, Ann. Rev. Microbiol. 11, 439 (1957).

⁷ M. BRODIE and S. B. WORTIS, Arch. Neurol. Psychiat. 32, 1159 (1934).

⁸ H. ZINSSER and E. B. SCHOENBACH, J. exp. Med. 66, 207 (1937).

⁹ E. RACKER and H. KABAT, J. exp. Med. 76, 579 (1942).

¹⁰ A. E. PEARSON and R. J. WINZLER, J. biol. Chem. 181, 577 (1949).

¹¹ A. S. PARODI, J. Immunol. 58, 109 (1948).

¹² W. F. MACLIMANS, R. A. SIEM, B. C. MARK, and E. PINSKA, J. Immunol. 64, 475 (1950).

¹³ R. A. SIEM, B. C. SMITH, and W. F. MACLIMANS, Science 112, 505 (1950).

¹⁴ E. KUN and M. H. D. SMITH, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 73, 628 (1950).