

occurring bases. The unusual behaviour of such compounds, for example on basic ion-exchange columns, could lead to their being overlooked, and a search for such compounds should take this into account, especially as they will generally have similar paper chromatographic properties to the related zeatin derivatives. Preliminary tests indicate that the quaternary derivative (VIII) has marked cytokinin activity²⁵.

Zusammenfassung. Zeatin-ribosid-5'-phosphat wurde einerseits durch Umsetzung von 6-Chlorpurin-ribotid mit trans-4-Amino-2-methylbuten-(2)-ol-(1) und andererseits durch Behandlung von Isopropyliden-zeatin-ribosid mit

Pyrophosphorylchlorid hergestellt. Die Phosphorylierung des Isopropylidenderivats in Pyridin ergab ein Allylpyridiniumderivat, dessen Struktur spektroskopisch und durch Abbau bewiesen wurde.

G. SHAW, B. M. SMALLWOOD
and D. V. WILSON

*School of Chemistry, University of Bradford,
Bradford 7 (England), 6th January 1967.*

²⁵ Professor F. C. STEWARD, private communication.

Studies on the Structure of Collagen IV¹. A C-Terminal Sequence from the Pronase Treated Collagen

In a previous paper² the results of a study on the N- and C-terminals of the tropocollagen molecule were reported. From this study it became clear that glycine (gly), arginine (arg), lysine (lys) and alanine (ala) are present as C-terminals in native collagen in the ratio 3:1:1:1 whereas gly, lys and phe were found in pronase treated collagen in a ratio 5:12:1. Pronase treatment was performed according to DRAKE et al.³. The increase in the total number of C-terminals and the appearance of phe together with the change in the proportion of individual amino acids indicated a limited action of pronase on the C-end of the tropocollagen molecule. Our further search was directed towards elucidation of the amino acid sequence around the sites where the pronase action is terminated.

Using the technique of partial hydrazinolysis⁴, it was possible to separate from both pronase treated soluble and insoluble collagen one peptide (I) (Rf value 0.75 in butanol-pyridine-acetic acid-water 30:20:6:24 - solvent system A) which did not react with the silver nitrate solution suggesting that it had a free carboxyl group and was apparently a C-terminal peptide.

The amino acids present in the peptide (I) (identified by chromatography on amino acids analyzer and as 5-dimethylamino-1-naftalen-sulfonyl- and 2,4-dinitrophenyl-derivatives) were gly, pro, hypro in a ratio 2:1:1. Keeping in mind the possible splitting of some peptide-hydrazides we looked very carefully for the peptide (I) in the mixture obtained after the hydrazinolysis of native soluble collagen. Though the mixtures of peptide hydrazides from pronase-treated and untreated tropocollagen tailed badly in solvent system A and most other solvents, the yellow spot in question is easy to distinguish as only one other spot has a higher Rf value. Following this yellow spot there is a free zone of about the same size as the spot, and then the bulk amount of hydrazides appear. Rechromatography in propanol-water 60:40 resulted in a spot with the Rf value 0.65 with almost no background.

Our search for the same peptide in tropocollagen failed. We conclude that this peptide is a C-terminal peptide of the pronase-treated collagen.

Further work was directed toward elucidating the sequence of peptide (I). It was found that this peptide

does not yield the phenylthiohydantoin after reaction with phenylisothiocyanates suggesting the presence of either proline or hydroxyproline on the N-end of the molecule. Repeated and prolonged (14 h) hydrazinolysis showed C-terminal glycine in an amount 0.32 mol/mol. Thus one of the following formulae could be assigned to the studied peptide:

- (a) (pro.hypro).gly.gly
- (b) pro.gly.hypro.gly
- (c) hypro.gly.pro.gly

Of the sequence possibilities mentioned the pro.hypro.gly.gly seem most probable considering the frequency of the gly.pro.hypro (gly.pro.X) sequence in the collagen molecule.

The sequence of peptide (I) indicates that pronase attacks at the C-end of the tropocollagen molecule. Moreover it suggests that the action of pronase is terminated by a typically collagenous sequence gly.pro.X. If one takes into account the structure of peptides isolated from the pronase digest of collagen⁵, one can see that either these peptides are completely of non-collagenous character or have a collagenous sequence at their N-end. The non-

Examples of peptides and/or combined sequences of these peptides isolated by ROSMUS et al.⁵ from pronase digest of insoluble calf skin collagen

Gly.Pro.Ala.Gly.Ileu
Gly.Ala.Arg.Gly.Arg
Gly.Pro.Ala.Val.Tyr
Gly.Pro.Ala.(Gly,Leu,Ileu).(Gly,Phe)

¹ J. ROSMUS and Z. DEYL, *Experientia*, in press.

² Z. DEYL, J. ROSMUS and S. BUMP, *Biochim. biophys. Acta*, in press.

³ M. P. DRAKE, P. F. DAVISON, S. BUMP and F. O. SCHMITT, *Biochemistry*, N.Y. 5, 303 (1966).

⁴ K. OHNO, *J. Biochem.*, Tokyo 42, 615 (1955).

⁵ J. ROSMUS, Z. DEYL and M. P. DRAKE, *Biochim. biophys. Acta*, in press.

collagenous sequence appears on the C-end of these peptides (see Table)⁶.

Zusammenfassung. Einige proteolytische Fermente (wie Pronase, Pepsin und Trypsin) beweisen eine beschränkte Wirkung auf das Kollagenmolekül. Die Wirkung dieser Fermente wurde durch die Aminosäuresequenz, die für den Hauptteil des Kollagenmoleküls typisch ist (das

heisst Gly.Pro.X), beschränkt. Dieser Typ der Sequenz wurde als C-Endsequenz im Restkollagen nach der Pro-nasewirkung bestimmt.

S. BUMP, Z. DEYL⁷ and J. ROSMUS⁸

Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge (Massachusetts, USA), 16th February 1967.

⁶ This research was supported by Grant No. NB 00024 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness, Department of Health, Education and Welfare, U.S. Public Health Service and by a grant from The Medical Foundation of Boston.

⁷ Present address: Laboratory of Gerontology, Physiological Institute, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague-Krč (Czechoslovakia).

⁸ Present address: Central Research Institute of Food Industry, Prague-Smíchov (Czechoslovakia).

Autoradiographischer Nachweis von Huminsäuren mit ⁵⁹Fe

Für Nachweis und Charakterisierung von Huminsäuren (HS) werden u.a. herangezogen: Alkalilöslichkeit, Absorptionsspektren, Bindung von Schwermetallen¹⁻³; Redoxverhalten^{3,4}; Wanderung im elektrischen Feld⁵⁻⁸; Gehalt an stabilen freien Radikalen^{9,10}; Molekulargewichtsverteilung¹¹⁻¹³ und die nach hydrolytischem, reduktivem oder oxydativem Abbau erhaltenen phenolischen Spaltprodukte¹⁴⁻¹⁶. Mit keiner dieser Methoden allein ist ein spezifischer HS-Nachweis möglich.

Es ist bekannt (Übersicht über die älteren Arbeiten bei¹), dass HS mit einer grossen Anzahl von Metallen reagieren. Für einige der Metall-HS-Verbindungen wurde das Vorliegen von Chelatstrukturen wahrscheinlich gemacht¹⁷⁻²¹.

Bei der Papierelektrophorese wandern chelatgebundene Metallionen mit den HS zur Anode, was durch Zugabe

von ⁵⁹Fe zur HS-Lösung gezeigt werden kann (Figur 1). Bei 100 µg HS/ml lässt sich 1 µg HS durch Markierung mit ⁵⁹Fe autoradiographisch noch nachweisen (Figur 2). In der Autoradiographie verfügt man über einen empfindlichen HS-Nachweis, der in Kombination mit der Papierelektrophorese spezifisch für HS gestaltet werden kann. Störende chelatbildende Nichthuminstoffe geben sich im Autoradiogramm durch zusätzliche Schwärzungsbanden zu erkennen. In diesem Fall müssen die Chelatoren vor der Elektrophorese abgetrennt (z.B. durch Gelfiltration an Sephadex) oder mit inaktivem Metall abgesättigt werden.

Methodik. (1) *HS-Präparate:* Die HS werden aus dem Wasser eines HS-reichen Küstenhochmoores mit Blei (II)-nitrat gefällt. Das HS-gebundene Pb²⁺ wird mit

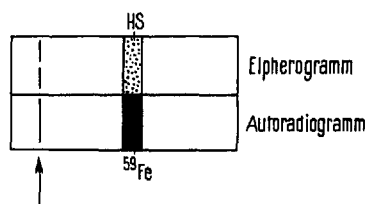


Fig. 1. Nachweis der Bindung von ⁵⁹Fe an HS durch Kombination von Papierelektrophorese und Autoradiographie. Auf die Startlinie (↑) wurden 100 µg Moorwasser-HS + 0,02 µCi ⁵⁹Fe aufgetragen.

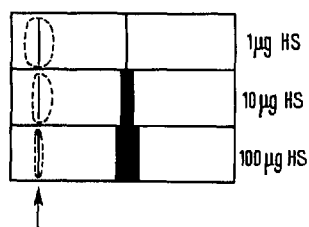


Fig. 2. Autoradiogramme ⁵⁹Fe-markierter HS bei unterschiedlicher HS-Konzentration. Schwärzungsbanden: Position der HS; gestrichelte Linien: Menge des am Start zurückgebliebenen ⁵⁹Fe.

¹ S. ODÉN, Kolloidchem. Beih. 11, H. 3-9 (1919).

² M. M. KONONOVA, *Die Humusstoffe des Bodens* (VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1958).

³ F. SCHEFFER und B. ULRICH, *Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde* (F. Enke-Verlag Stuttgart, 1960), Vol. 1, Teil 3.

⁴ T. BERÉS und I. KIRALY, *Agrokém Talajt.* 7, 281 (1958).

⁵ H. BEUTELSPACHER, *Z. PflErnähr. Düng. Bodenk.* 57, 57 (1952).

⁶ F. SCHEFFER, W. ZIECHMANN und H. SCHLÜTER, *Z. PflErnähr. Düng. Bodenk.* 70, 260 (1955).

⁷ F. SCHEFFER, W. ZIECHMANN und H. SCHLÜTER, *Z. PflErnähr. Düng. Bodenk.* 85, 32 (1959).

⁸ D. MÜCKE, R. NOACK und R. OBENAU, *Acta biol. med. germ.* 4, 413 (1960).

⁹ C. STEELINK und G. TOLLIN, *Biochim. biophys. Acta* 59, 25 (1962).

¹⁰ H. KLEIST und D. MÜCKE, *Experientia* 22, 136 (1966).

¹¹ N. C. MEHTA, P. DUBACH und H. DEUEL, *Z. PflErnähr. Düng. Bodenk.* 102, 128 (1963).

¹² E. T. GJESSING, *Nature* 208, 1091 (1965).

¹³ R. KLÖCKING, R. HOFMANN und D. MÜCKE, *Z. Lebensmittel-unters. u. -Forsch. im Druck*.

¹⁴ G. GREENE und C. J. STEELINK, *J. org. Chem.* 27, 170 (1962).

¹⁵ T. JAKAB, P. DUBACH, N. C. MEHTA und H. DEUEL, *Z. PflErnähr. Düng. Bodenk.* 102, 8 (1963).

¹⁶ N. A. BURGESS, H. M. HURST und B. WALKDEN, *Geochim. cosmochim. Acta* 28, 1547 (1964).

¹⁷ F. L. HIMES und S. A. BARBER, *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* 21, 368 (1957).

¹⁸ M. M. KONONOVA und N. A. TITOVA, *Bodenk. (UdSSR)* 11, 88 (1961).

¹⁹ H. KLEIST, *Acta biol. med. germ.* 11, 156 (1963).

²⁰ H. KLEIST, *Acta biol. med. germ.* 13, 949 (1964).

²¹ D. MÜCKE und H. KLEIST, *Thaer Arch.* 9, 327 (1965).