

β -1-[2.4.6-Trimethyl-benzoyl]-D-galaktose (β -1-Mesitoyl-D-galaktose): Die Verseifung erfolgte wie bei der entsprechenden D-Glucose-Verbindung beschrieben. Die β -1-Mesitoyl-D-galaktose kristallisiert aus warmem Alkohol ohne Zusatz von Äther und Petroläther. Ausb. aus 15 g Tetraacetyl- β -1-mesitoyl-D-galaktose 9.2 g β -1-Mesitoyl-D-galaktose (93% d. Th.). Schmp. 153°; $[\alpha]_D^{25} : +28.7^\circ$ (Wasser, $c = 0.8$).
 $C_{16}H_{22}O_7$ (326.3) Ber. C 58.88 H 6.80 Gef. C 58.64 H 6.73

Anhydrisierung der β -1-Mesitoyl-D-galaktose: Die Anhydrisierung wurde, wie bei der Glucoseverbindung beschrieben, durchgeführt. Aus 3.22 g Mesitoyl-D-galaktose in 500 ccm Wasser (ca. $m/50$ Lösung) wurden 700 ccm Lösung von $[\alpha]_D : -6.5^\circ$ erhalten, entspr. ca. 1 g D-Galaktosan.

Die Aufarbeitung ergab 1.19 g (74.5% d. Th.) krist. D-Galaktosan <1.5> <1.6>. $[\alpha]_D^{25} : -19.9^\circ$ (Wasser, $c = 1.1$).

Umkristallisiert aus Äthanol, Platten vom Schmp. 226°. $[\alpha]_D^{25} : -21.5^\circ$ (Wasser, $c = 1.2$).

Der Misch-Schmp. mit authentischem D-Galaktosan zeigte keine Depression.

Mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert und wie üblich aufgearbeitet, wird D-Galaktosan-triacetat vom Schmp. 74° und $[\alpha]_D^{25} : -5.6^\circ$ (Chlf., $c = 1.4$) erhalten.

Behandlung von β -1-Benzoyl-D-glucose mit Alkali: β -1-Benzoyl-D-glucose wurde nach Zervas¹⁰⁾ dargestellt. Schmp. 196°, $[\alpha]_D^{25} : -26.7^\circ$ (Wasser, $c = 0.9$).

Die Substanz erfährt, in Wasser gelöst, bei Zimmertemperatur im Laufe von 24 Stdn. keine Drehwertsänderung. In $n/10$ NaOH erfolgt augenblicklich starke Verschiebung nach rechts und später langsamer Abfall bis auf 0° in 24 Stdn. (s. Tafel). Bei 100° geht der Drehwert in wenigen Minuten auf 0° zurück.

Durch eine wie oben mit Austauscher beschickte heizbare Säule, Inhalt 10 ccm Amberlite IRA 400, läßt man bei 50° 100 ccm Wasser, in dem 0.2780 g β -1-Benzoyl-D-glucose gelöst sind, mit einer Geschwindigkeit von rd. 1 ccm/Min. hindurchfließen. Die ablaufende Lösung wird, wie oben beschrieben, gesammelt und der Drehwert bestimmt. Es treten neben Fraktionen ohne opt. Drehung nur positiv drehende Fraktionen auf. Sie werden gesammelt, i. Vak. konzentriert und das erhaltene Produkt papierchromatographisch untersucht. Es konnten lediglich Glucose und daneben etwas Mannose und Fructose chromatographisch nachgewiesen werden.

294. Gerhard Braunitzer: Bestimmung der Reihenfolge der Aminosäuren am Carboxylende des Tabakmosaikvirus durch Hydrazinspaltung

[Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen]

(Eingegangen am 24. September 1955)

Die Methode zur Bestimmung des C-terminalen Restes einer Peptidkette nach Akabori wurde untersucht; die besten Durchführungsbedingungen werden angegeben. Modellversuche ergaben eine gute Beständigkeit der Aminosäuren gegenüber Hydrazin. Arginin wird zu Ornithin abgebaut. Die Bestimmung der C-terminalen Sequenz durch kurzzeitige Einwirkung von Hydrazin auf das native TMV ergab, daß sämtliche Peptidketten dieselbe C-terminale Sequenz: Prolin-Alanin-Threonin besitzen. Dieses Ergebnis wurde nach Einwirkung von Carboxypeptidase auf das native Virus durch totale und partielle Spaltung mit Hydrazin bestätigt.

Von Akabori und Mitarbb.¹⁾ wurde eine Methode zur Bestimmung der Carboxylenendgruppen in Peptidketten durch Umsetzung mit wasserfreiem Hydrazin ausgearbeitet. Hierbei werden alle in Peptidbindung vorliegenden

¹⁾ S. Akabori, K. Ohno u. K. Narita, Bull. chem. Soc. Japan 45, 214 [1952]; K. Ohno, J. Biochemistry [Tokyo] 40, 621 [1953]; 41, 345 [1954].

Carboxylgruppen in Hydrazide übergeführt, nicht jedoch die letzte freie (*C*-terminale) Carboxylgruppe. Mit Hilfe dieser Methode konnte bewiesen werden, daß Threonin die *C*-terminale Gruppe im Protein des TMV ist²⁾. Je Mol. TMV*) wurden 2300 Moll. Threonin gefunden.

In Fortsetzung dieser Versuche wurde die Methodik der Hydrazinspaltung weiter verbessert und der Nachweis aller in Eiweißstoffen vorkommenden Aminosäuren sichergestellt. Darüber hinaus gelang es, durch kurzzeitige Einwirkung von Hydrazin auf das TMV neben der endständigen Aminosäure auch ein terminales Dipeptid und ein Tripeptid zu fassen und hieraus die Reihenfolge der Aminosäuren am Carboxylende zu erschließen³⁾. Wie bereits kurz mitgeteilt wurde, sind ähnliche Ergebnisse inzwischen auch von Fraenkel-Conrat und Mitarbb.⁴⁾ veröffentlicht worden.

1. Die Bestimmung der *C*-terminalen Endgruppen

Für die Spaltung wurden meist 50–100 mg Protein mit der 3–10fachen Menge Hydrazin versetzt. Die Proteine – untersucht wurden außer TMV, Ovalbumin, Hämoglobin, Lysozym und Humanalbumin – lösen sich meist schon bei Zimmertemperatur. Für die Versuche muß wasser- und ammoniakfreies Hydrazin verwendet werden, da sich sonst die Ausbeute an *C*-terminalen Resten stark verringert und die Menge an störenden Nebenprodukten zunimmt. Die höchsten Ausbeuten erhielten wir beim TMV nach 8–9 stdg. Behandlung bei 100° (s. Abbild. 1). Da aber Threonin besonders schnell abgespalten wird, dürfte die optimale Hydrolysenzeit im allgemeinen bei 10 Std.

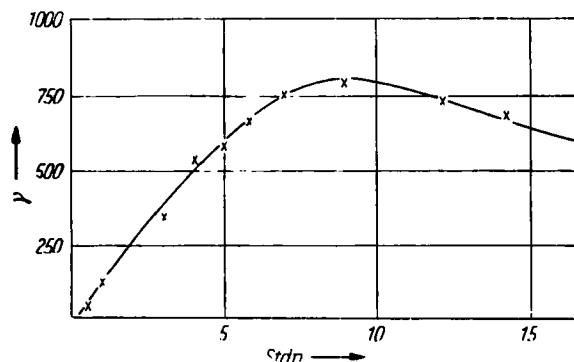


Abbildung 1. Ausbeuten an DNP-Threonin in Abhängigkeit von der Zeit. Reaktionstemperatur 100° (ohne Korrektur für die Zersetzung bei der Hydrazinolyse und ohne Korrektur für die DNP-Umsetzung); Ordinate γ DNP-Threonin/100 mg TMV

liegen. Nach der Spaltung ist darauf zu achten, daß das Hydrazin schnell entfernt wird und daß der Rückstand sofort weiter verarbeitet wird, da einige Hydrazide unbeständig sind und zu freien Aminosäuren zerfallen können und

²⁾ G. Braunitzer, Z. Naturforsch. 9 b, 675 [1954].

³⁾ Abkürzungen: TMV = Tabakmosaikvirus; FDNB = 1-Fluor-2,4-dinitro-benzol; DNP = 2,4-Dinitrophenylderivate; DNPOH = 2,4-Dinitro-phenol; AS = Aminosäure; ASH = Aminosäurehydrazide. ³⁾ G. Braunitzer, Naturwissenschaften 42, 371 [1955].

⁴⁾ C. I. Niu u. H. Fraenkel-Conrat, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 16, 597 [1955].

so Endgruppen vortäuschen. Dies scheint besonders bei Serin, Glykokoll und Threonin der Fall zu sein. Die Hydrazide werden anschließend nach der bereits von *Akabori* angegebenen Methode mit Benzaldehyd in die schwerlöslichen Benzylidenverbindungen übergeführt, die dann abfiltriert werden. Nach unseren Erfahrungen scheint hierfür jedoch *p*-Nitrobenzaldehyd besser geeignet, da sich hier besonders schwerlösliche Verbindungen bilden.

Die qualitative Bestimmung des C-terminalen Restes geschieht durch zweidimensionale papierchromatographische Analyse eines aliquoten Teils der wäßrigen Lösungen. Es empfiehlt sich, zunächst die Chromatographie im System Phenol-Wasser oder Kresol-Wasser durchzuführen, da in diesem System die in geringen Mengen vorhandenen ninhydrin-positiven Nebenprodukte der Hydrazinolyse mit der Front wandern, wodurch eine Verwechslung mit Aminosäuren vermieden wird. In der zweiten Dimension kann eines der vielen gebräuchlichen Systeme benutzt werden.

Zur quantitativen Bestimmung der Endgruppen werden nach Entfernung der Hydrazide die AS in die DNP-Derivate übergeführt, diese zweidimensional chromatographiert, die Flecken ausgeschnitten und die Extinktion im UV gemessen. Unter Umständen kann auf die Entfernung der Hydrazide verzichtet werden, indem man das Reaktionsgemisch direkt mit Fluordinitrobenzol umsetzt. Allerdings werden hierbei die DNP-Derivate der endständigen AS durch die DNP-Derivate des Glutaminsäure- und Asparaginsäurehydrazids verunreinigt, da bei dem gewählten Aufarbeitungsgang zwischen den DNP-Derivaten mit freier α - und β - oder γ -Carboxylgruppe nicht unterschieden werden kann. Zur Trennung der DNP-Aminosäuren benützten wir eine Modifikation der von A. L. Levy⁵⁾ entwickelten Methode zur zweidimensionalen Papierchromatographie. Es handelt sich hierbei in der ersten Dimension um eine Verteilungschromatographie, in der zweiten hingegen um eine Aussalz-chromatographie. Hierdurch wird eine besonders gleichmäßige Verteilung der Komponenten über die Lauffläche erzielt. Die Methode von Levy wurde in zweierlei Hinsicht vereinfacht. Die Umsetzung mit Fluordinitrobenzol wurde in alkoholfreier Lösung durchgeführt, wobei das p_H durch Anwendung eines Puffers konstant gehalten wurde. Die Verwendung eines Autotitrators zur Konstanthaltung des p_H wird dadurch entbehrlich. Wesentlich war die Beobachtung, daß DNP-Arginin und DNP-Histidin, die mit Äther nicht extrahierbar sind, durch Butanol quantitativ aus der wäßrigen Phase extrahiert und so von den bei der anschließenden Chromatographie störenden Salzen befreit werden können. Quantitative Versuche zeigten, daß der Umsatz nicht schlechter ist als bei Verwendung eines Autotitrators. Ferner zeigte sich, daß das von Levy verwendete, komplizierte System Toluol-Chloräthanol-Pyridin-0.8 n NH₃ durch das wesentlich einfachere System Butanol-Ammoniak oder Propanol-Ammoniak ersetzt werden kann. Dieses System eignet sich besonders für absteigende Chromatographie, besitzt ein hinreichendes Auflösungsvermögen, ist leichter zu handhaben, und der Geruch ist weniger lästig. Es lassen sich mit diesem Verfahren gute Ergebnisse erzielen. Die Reproduzierbarkeit beträgt $\pm 5\%$ (vergl. Tafel I, S. 2035).

⁵⁾ Nature [London] 174, 126 [1954].

Da die Ausbeuten an den einzelnen AS je nach den Versuchsbedingungen etwas schwanken, ist es notwendig, parallel zum Hauptversuch Kontrollen mit bekannten Mengen an AS durchzuführen. Untersuchungen über die Beständigkeit der einzelnen AS unter den Bedingungen der Hydrazinspaltung ergaben, daß die AS mit einfacher Seitenkette, wie Leucin und Phenylalanin, relativ gute Ausbeuten (bis zu 85 %) liefern. Auch Methionin, Lysin, Histidin, Glykoll, Prolin, Tyrosin und Tryptophan werden nicht allzu sehr angegriffen. Glutaminsäure und Asparaginsäure werden hingegen nur zu 20–30 % wieder-gewonnen, Cystein und Arginin werden sogar völlig zerstört. Bei der Behandlung des Cysteins mit Hydrazin tritt ein intensiver Geruch nach Schwefelwasserstoff auf, ein spezifisches Zersetzungprodukt konnte nicht aufgefunden werden. Falls Cystein endständig ist, empfiehlt es sich, eine Oxydation mit Perameisensäure vorzunehmen, worauf die Endgruppen erfaßt werden können. Es wurde gefunden, daß Arginin bei der Behandlung mit Hydrazin in guter Ausbeute in Ornithin umgewandelt wird. Wir identifizierten das Zersetzungprodukt papierchromatographisch, ferner bestimmten wir den Schmelzpunkt des DNP-Derivats und den Misch-Schmelzpunkt mit synthet. Bis-DNP-Ornithin (156°) (Tafel 2, S. 2036).

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß alle in den Proteinen vorkommenden AS bei der Endgruppenbestimmung nach Akabori erfaßt werden. Wegen des relativ großen Verlustfaktors ist allerdings die quantitative Bestimmung bei den sauren AS unsicher. Ferner kann nicht zwischen Ornithin und Arginin unterschieden werden.

2. Die Bestimmung der Reihenfolge der endständigen Aminosäuren im Tabakmosaikvirus

Zur Bestimmung der Reihenfolge wurden zwei Versuchsserien durchgeführt. Bei der ersten Serie gingen wir von dem Virus selbst aus, bei der zweiten entfernten wir zunächst das endständige Threonin durch Behandlung mit Carboxypeptidase und unterwarfen dann die verkürzte Peptidkette der totalen und partiellen Hydrazinspaltung. Die Hydrolysedauer beim nativen TMV wurde zwischen 3 und 6 Std. variiert, die Temperatur betrug 100°. Die Versuchsdauer ist also gegenüber der totalen Spaltung etwa auf die Hälfte herabgesetzt.

Wir erhielten beim nativen Virus nur ein Tri- und nur ein Dipeptid. Das Dipeptid, das als DNP-Derivat isoliert wurde, hatte die Konstitution DNP-Alanyl-threonin, das Tripeptid DNP-Prolyl-alanyl-threonin. Da die Summe Threonin + Di- + Tripeptid 2500 Moll. je Mol. TMV betrug, müssen sämtliche Peptidketten dieselbe C-terminale Sequenz Prolyl-alanyl-threonin besitzen. Nach 3–4 Std. betrug die Ausbeute je Mol. TMV 1000–1100 Moll. Threonin, 100 Moll. Dipeptid und 250 Moll. Tripeptid. Nach 6 stdg. Hydrazinolyse erhielten wir annähernd 2000 Moll. Threonin und 150 Moll. Peptide. Die Ursache für die geringe Ausbeute an Peptiden dürfte in der Unbeständigkeit der Threoninbindung liegen; die Tatsache, daß stets mehr Tri- als Dipeptid erhalten wird, legt die Vermutung nahe, daß die Prolyl-alanyl-Bindung stabiler ist als die Bindung Alanyl-threonin.

Wurde das native Virus mit Carboxypeptidase behandelt, und somit das C-terminale Threonin abgespalten, so erhielten wir nach totaler Hydrolyse mit Hydrazin wieder nur eine C-terminale Aminosäure, Alanin, die wir direkt als AS im 2-D-Chromatogramm identifiziert haben, ein Ergebnis, das die partielle Hydrolyse mit Hydrazin am nativen TMV bestätigt. Zur quantitativen Bestimmung wurde in mehreren Ansätzen das Alanin als DNP-Derivat nach chromatographischer Reinigung eluiert und die Extinktion in 1-proz. Hydrogencarbonatlösung im UV bei $360 \text{ m}\mu$ gemessen. Die Ausbeuten an DNP-Alanin betrugen in sämtlichen Versuchen zwischen 55–76 %. Als Mittelwert ergaben sich aus 5 Messungen 2300–2500 Reste Alanin. Bei partieller Hydrolyse erhielten wir in sehr guten Ausbeuten neben C-terminalem Alanin ein einziges DNP-Derivat, das wir als DNP-Prolyl-alanin identifizieren konnten. Hierdurch steht ohne Zweifel fest, daß sämtliche Peptidketten des TMV hinsichtlich der C-terminalen AS identisch sein müssen. Die Reihenfolge lautet: Pro, Ala, Threo.

Da durch andere Versuche nachgewiesen wurde³⁾, daß die Peptidketten im TMV auch in der Reihenfolge der 3 letzten AS am Aminoende übereinstimmen, liegt der Schluß sehr nahe, daß sie vollständig identisch sind.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für ihre Unterstützung, Hrn. Prof. Dr. Gerhard Schramm für das fördernde Interesse bei der Durchführung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet. Hrn. Ing. chem. Karl-Heinz Reuther danke ich für die wertvolle Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Beschreibung der Versuche

Darstellung von wasserfreiem Hydrazin

In einem Fraktionierkolben erhitzt man 100 g Hydrazinhydrat (80-proz. BASF) und 100 g Natriumhydroxyd nach Anschluß des Kühlers auf dem Ölbad. Die Temperatur wird im Lauf von 2 Stdn. auf 113° (Siedepunkt des Hydrazins) gesteigert, wobei sich das Natriumhydroxyd völlig auflöst. Nun steigert man die Badtemperatur etwas schneller auf 150°, wobei das Hydrazin überdestilliert. Ein geringer Vorlauf wird verworfen. Die Destillation wird unterbrochen, wenn keine Flüssigkeit mehr übergeht. Die Hauptfraktion wird sofort in einem abgewogenen Kolben aufgefangen und nach Zugabe von 10 Gew.-Tln. Natriumhydroxyd mit einer Vakuumdestillationsapparatur verbunden. Die Kapillare ist an eine Stickstoffbombe angeschlossen. Das Hydrazin wird am Ölbad langsam erwärmt, die Destillation beginnt bei ca. 95° Badtemperatur bei 15 Torr. Dieses Präparat verwenden wir zur Endgruppenbestimmung. Soll es längere Zeit aufbewahrt werden, so wird dieses eingeschmolzen und in der Kühltruhe eingefroren.

Bei guten Präparaten und bei richtiger Durchführung der ersten Destillation darf das Calciumchlorid-Rohr am freien Ende der Apparatur einen angehaltenen Lackmusstreifen nicht bläuen (NH_3). Ist dies der Fall, so war entweder bereits das Ausgangsprodukt mit NH_3 verunreinigt oder die Destillation wurde unsachgemäß durchgeführt.

Umsetzung mit Fluordinitrobenzol

Die Peptide werden in 6nHCl 8–16 Stdn. bei 115° in zugeschmolzenem Glasrohr hydrolysiert. Die Entfernung der Salzsäure geschieht entweder im Exsiccator über Kaliumhydroxyd oder durch Abblasen mit Kohlendioxyd am Wasserbad. Das Hydrolysat wird in 0.5–2 ccm Wasser aufgenommen, wenn nötig neutralisiert und hierauf 0.25–1 ccm Hydrogencarbonatpuffer (dargestellt durch Mischen von 1 Tl. $n\text{NaHCO}_3$, 9 Tln. 1n K_2CO_3 , jeweils vor Gebrauch neu gemischt) und 0.01 ccm Fluordinitrobenzol hinzugegeben. Man erhitzt unter Rühren in einem Schliffkolben (80 Min.)

auf 40°, bringt das Gemisch in einen kleinen Schütteltrichter und spült mit 2×2 ccm Wasser nach. Das überschüss. Fluordinitrobenzol wird mit Äther extrahiert, der Äther mit Wasser zurückgewaschen, die wäßrigen Auszüge werden hierauf mit 1 ccm 6nHCl angesäuert und die DNP-AS mit 3×2 ccm Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterauszüge werden 1–2 mal mit je 2 ccm Wasser gewaschen, das Waschwasser zur Aminosäuremischung hinzugegeben und dieses nochmals mit 2 ccm Essigester extrahiert. Sollte die wäßrige Phase noch DNP-AS enthalten (Arginin-Histidin), so wird mit sek.-Butanol extrahiert; die Extrakte werden sinngemäß wie bei Essigester gereinigt und gesondert chromatographiert.

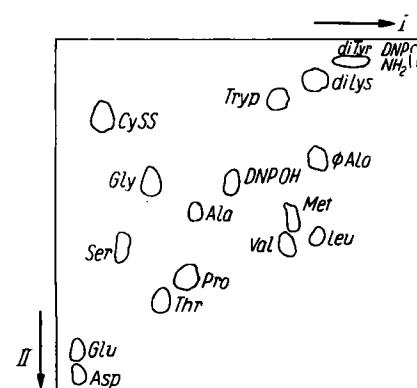
Bei der Umsetzung mit FDNB entsteht als Nebenprodukt DNP-OH; da dessen Menge stark variiert, empfiehlt es sich, dieses zur Sicherheit vor der anschließenden Chromatographie zu entfernen, am besten nach der Methode von G. L. Mills⁶⁾. DNP-OH wird nach Einengen des Essigesterextraktes i. Vak. durch Sublimation bei 70°/1 Torr über 3–5 Min. (oder bei 100°/15 Torr 3–5 Min.) von den DNP-AS abgetrennt⁷⁾. Diese werden anschließend in 2 ccm Äthanol gelöst.

Die chromatographische Trennung der DNP-Aminosäuren

Das DNP-Gemisch oder ein äquivalenter Teil werden nach kurzem Einengen auf Papier Schleicher & Schüll 2043 a oder b aufgetragen. Zur Erzielung einer möglichst gleichmäßigen Bande am Papier werden die DNP-AS am besten sofort in das Salz übergeführt, indem der gelbe Startfleck an der oberen und unteren Seite des Papiers über eine offene NH₃-Flasche gezogen wird. Die Entwicklung des Chromatogramms geschieht in der ersten Richtung im System Butanol-Ammoniak (dargestellt durch Schütteln von annähernd gleichen Teilen Butanol und 0.1-proz. Ammoniak, stationäre Phase 0.1-proz. NH₃). An Stelle dieses Systems kann auch Propanol 0.2-proz. Ammoniak (80:20) verwendet werden. Die R_F-Werte dieser Systeme unterscheiden sich nur wenig. Die Chromatogramme werden 2 Std. äquilibriert und in einem der beiden Systeme absteigend entwickelt (12 bis

36 Std.), im Luftstrom bei 40–50° getrocknet und hierauf in der zweiten Richtung mit 1.5 m Phosphatpuffer nach Levy⁵⁾ entwickelt. Wie aus Abbild. 2 hervorgeht, sind sämtliche AS gut voneinander getrennt. DNP-OH kann sehr leicht als Bezugspunkt dienen. Es ist meist in kleinen Spuren nach der Sublimation vorhanden und läßt sich sehr leicht identifizieren, da es im Gegensatz zu den DNP-AS bei Betupfen mit einem kleinen Tropfen verd. Salzsäure an der Berührungsstelle sofort die Farbe verliert.

Zur quantitativen Bestimmung werden die Komponenten ausgeschnitten und in einem Reagenzglas mit 1-proz. Hydrogencarbonatlösung eluiert. Anschließend wird die Extinktion im UV bei 360 m μ gemessen. Als Kontrolle dienen gleich große Papierflecken, deren Extinktion als Blindwert benutzt wird. Es sei auf die bekannte Tatsache hingewiesen, daß die DNP-AS vom Licht zerstört werden (insbesondere bei DNP-Prolin), grelles Licht ist zu vermeiden. Die chromatographische Trennung muß unbedingt im temperaturkonstanten Raum durchgeführt werden.



Abbild. 2. Die Lage der DNP-Aminosäuren im zweidimensionalen Chromatogramm. Richtung I. Butanol: Ammoniak, Richtung II. Phosphatpuffer nach A. L. Levy

chromatographische Trennung muß unbedingt im temperaturkonstanten Raum durchgeführt werden.

⁶⁾ Biochem. J. 50, 707 [1952].

⁷⁾ Zur chromatographischen Abtrennung von DNP-OH vergl. F. Turba u. G. Gundlach, Biochem. Z. 326, 322 [1955].

Die Bestimmung der C-terminalen Endgruppe mit Hydrazin

a) Direkte Bestimmung als freie Aminosäure: 10–25 mg Protein werden in einem Röhrchen eingewogen und mit der 3–10fachen Menge Hydrazin versetzt. Das Röhrchen wird unter Evakuierung abgeschmolzen und in einem mit 2 Siedesteinchen versehenen Kolben, der halb mit dest. Wasser gefüllt ist, unter Anschluß eines Rückflußkühlers 8–10 Stunden erhitzt. Als dann wird das Röhrchen abgekühlt, geöffnet und schnell in ein Gefäß mit breitem Boden gekippt, mit einem Tropfen Hydrazin nachgewaschen und in einen Exsiccator mit konz. Schwefelsäure gelegt. Der Exsiccator wird sofort evakuiert (1 Torr). Bereits nach $\frac{1}{2}$ –1 Stde. ist das Gemisch, das die ASH und die freien C-terminalen AS enthält, getrocknet. Der Rückstand wird in Portionen von 0,25–0,5 ccm Wasser angerührt und in einen Erlenmeyerkolben übergeführt. Die ASH lösen sich gut. Die Lösung wird sofort mit frisch destilliertem Benzaldehyd versetzt (im Durchschnitt $\frac{1}{3}$ des Vol. der währ. Lösung) oder mit demselben Vol. Essigester, gesättigt mit *p*-Nitrobenzaldehyd. Durch $\frac{1}{2}$ bis 1stdg. Schütteln auf der Maschine bilden sich die in Wasser sehr schwer löslichen Schiffsschen Basen, von denen die Derivate des *p*-Nitrobenzaldehyds tiefgelb und praktisch unlöslich sind. Das Reaktionsgemisch wird filtriert, mit wenig Wasser gewaschen, mehrfach mit Äther oder Essigester geschüttelt und direkt chromatographiert. Die Trocknung der Startflecke darf nur mit kaltem Luftstrom beschleunigt werden. Soll die restliche Lösung aufbewahrt werden, so wird sie bei -15° eingefroren. Sie ist längere Zeit haltbar. Zur Chromatographie wird stets Phenol:Wasser oder Kresol:Wasser verwandt. Wir arbeiten fast ausnahmslos absteigend und führen bei jeder Bestimmung auch ein Mischchromatogramm mit der zu erwartenden AS als zusätzliche Kontrolle durch.

Zur Unterscheidung, ob es sich bei einem Chromatogramm um eine AS oder ASH handelt, wird in einem gesonderten Chromatogramm das Duplikat mit ammoniakalischer Silbernitratlösung besprühnt, wobei die ASH die Silbernitratlösung reduziert.

b) Bestimmung des C-terminalen Restes als DNP-Derivat: Es wird wie oben verfahren, die ASH jedoch in einem Phosphatpuffer von p_H 7,0 aufgenommen (Volumen meist 5–10 ccm), mit Benzaldehyd analog verfahren, ausgeäthert und hierauf die gepufferte Lösung mit Fluordinitrobenzol umgesetzt. Das Reaktionsgemisch ist ausnahmslos dunkelbraun gefärbt. Die Lösung wird mit 1-proz. Hydrogencarbonatlösung verdünnt, zweimal ausgeäthert, die Hydrogencarbonatlösung angesäuert und die DNP-AS in Essigester übergeführt, die Essigesterfraktion zweimal mit gleichen Portionen 1*n*HCl gewaschen. Die in einem Schütteltrichter vereinigten Essigesterextrakte werden bis zum Braunwerden mit konz. NaHCO₃-Lösung versetzt und hierauf mit 1-proz. Hydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt, die nun fast rein gelb gefärbt ist. Die währigen Fraktionen werden vereinigt, noch einmal mit Essigester gewaschen und angesäuert: Die DNP-AS werden in Essigester übergeführt, nach zweimaligem Reinigen in 1*n*HCl eingedampft und nach Entfernung von DNP-OH chromatographiert.

c) Direkte Bestimmung der C-terminalen Aminosäure als DNP-Derivat: Die Spaltung mit Hydrazin geschieht wie oben. Es empfiehlt sich jedoch, das Hydrazin so gut wie möglich zu entfernen. Wir belassen daher das Reaktionsgemisch im Durchschnitt 2 Stdn. im Exsiccator bei 2 Torr, worauf eine feine glasige Haut zurückbleibt. Das gut getrocknete Gemisch der ASH wird in kleinen Portionen Wasser aufgenommen, mit festem NaHCO₃ oder einer entsprechenden Menge Carbonat-Hydrogencarbonatpuffer versetzt und mit Fluordinitrobenzol umgesetzt. Das Reaktionsprodukt ist durchweg tiefbraun gefärbt. Das Reaktionsgemisch wird 3 mal mit Äther extrahiert, die alkalische währige Phase angesäuert und 3 mal mit Essigester ausgeschüttelt. Die weitere Aufarbeitung geschieht wie oben. Da die α -Hydrazide der Glutamin- bzw. Asparaginsäure nach diesem Verfahren nicht entfernt werden, ist bei der Chromatographie in Butanol:Ammoniak in der Nähe des Glykokolls die Bande der entsprechenden Hydrazide sichtbar (dunkelbraun). Sie wandern in Puffern nur sehr langsam.

Bestimmung der C-terminalen Sequenz im nativen Virus

Natives, durch 2fache Ultrazentrifugation gereinigtes Virus wurde gefriergetrocknet und in der Trockenpistole die noch evtl. vorhandenen Wasserspuren entfernt (100° , $\frac{1}{2}$ Stde.).

In insgesamt 12 Ansätzen wurden je 100–300 mg getrocknetes TMV in Abständen von 3–6 Std. mit der 10fachen Hydrazinmenge bei 100° behandelt. Die Hydrolysate wurden sofort i. Vak. eingeengt, die eingetrocknete, feste Haut in 10 ccm Phosphatpuffer 7.0 aufgenommen und mit 2.5 ccm frisch dest. Benzaldehyd 1 Stde. geschüttelt.

Die besten Ausbeuten an Peptiden erhielten wir nach 3–4 stdg. Reaktionszeit.

Das Chromatogramm der DNP-Derivate zeigte meist geringe Mengen einer braunen mit der Front wandernden Bande und wurde vernachlässigt, da selbst DNP-Anilin nur mit einem R_F -Wert von 0.7 wandert. In sämtlichen Chromatogrammen war noch restliches DNP-OH vorhanden, jedoch wanderte vor dieser Bande kein DNP-Derivat, lediglich kurz dahinter die DNP-Threoninbande. Wurde das Chromatogramm in der zweiten Richtung mit Phosphatpuffer entwickelt, so erhielten wir nur einen unsymmetrischen Threoninfleck. Wurde jedoch die Chromatographie in der ersten Richtung (absteigend) 48 Std. oder noch länger entwickelt, so daß die DNP-OH-Bande ca. 40 cm gelaufen war, und hierauf in der zweiten Dimension entwickelt, so wurde die unsymmetrische Threoninbande in 3 Komponenten aufgespalten (Abbildung 3) (die Komponenten 2A und B liegen im Originalchromatogramm enger beieinander).

Abbildung 3. Das Chromatogramm der DNP-Derivate des nativen TMV nach 3–4 stdg. Spaltung mit Hydrazin (100°). I. Butanol: Ammoniak, II. Phosphatpuffer. 2A: Das DNP-Tripeptid DNP-Pro-Ala-Threo, 2B: Das Dipeptid DNP-Ala-Threo.
 Δ = Referenzen

Es traten die zusätzlichen Banden 2A und 2B auf, von denen die Bande 2A das abnormale Maximum im UV bei 380 m μ besitzt.

1. Die Analyse der Bande 2B: Die Bande 2B ist das Dipeptid DNP-Alanyl-threonin. Die Konstitution wurde folgendermaßen ermittelt. Nach 8 stdg. Hydrolyse mit 6 n HCl bei 115° wurde die DNP-AS ausgeschüttelt und in folgenden Systemen identifiziert.

		DNP-Alanin
Butanol: 0.1 Ammoniak	0.42	0.42
Phenol: IA ^{a)}	0.40	0.42
Butanol: Pyridin	0.63	0.61

Im zweidimensionalen Chromatogramm wandert die DNP-AS mit äquimolaren Mengen von DNP-Alanin als eine einzige Bande, womit die N-terminale Position des Alanins und die Einheitlichkeit des Dipeptids bewiesen ist.

In der wässrigen Lösung konnte eine AS nachgewiesen werden. Sie zeigte folgende R_F -Werte:

		Threonin
Butanol: Essigsäure	0.14	0.13
Phenol: Wasser	0.64	0.64

^{a)} Phenol: IA und Butanol: Pyridin, dargestellt nach G. Biserte u. R. Osteux, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 50 [1951].

Die AS zeigte nach Umsetzung mit FDNB:

		DNP-Threonin
Butanol:Ammoniak	0.31	0.31
Phenol:IA	0.33	0.34
Phosphatpuffer	18.3 cm	18.5 cm ^{a)}

Die quantitative Analyse der Bande 2B nach totaler Hydrolyse ergab ein Mol.-Verhältnis der beiden Komponenten von 1:1, womit die angegebene Konstitution erwiesen ist.

2. Die Analyse der Bande 2A: Die Bande 2A hat die Konstitution DNP-Prolyl-alanyl-threonin, die Totalhydrolyse ergab nach Extraktion in Essigester 2 DNP-Komponenten. Die eine Bande, mit dem Maximum bei 380 mμ, läuft in:

		DNP-Prolin
Butanol:Ammoniak	0.36	0.36
Phenol:IA	0.55	0.53
Phosphatpuffer	21.9 cm	21.5 cm

Die zweite Komponente wandert:

		DNP-OH
Butanol:Ammoniak	0.46	0.47
Phenol:IA	0.23	0.23
Phosphatpuffer	13.6 cm	13.4 cm

Sie zeigt ferner die typische Eigenschaft, beim Betüpfeln mit 0.1*n*HCl farblos zu werden. Hierdurch ist die zweite Komponente eindeutig als DNP-OH identifiziert. Schon früher konnten wir zeigen¹⁰⁾, daß DNP-Prolin als einzige DNP-AS bei der sauren Hydrolyse unter Rückbildung von Prolin in Dinitrophenol zerfällt. Wird das Peptid nach Isherwood¹¹⁾ aufgeschlossen, so ist der Zerfall des DNP-Promins weitgehend zurückgedrängt. Man findet fast ausschließlich DNP-Prolin und nur geringe Mengen (10%) DNP-OH. Hiermit ist erwiesen, daß die Bande 2A hinsichtlich der N-terminalen Gruppe einheitlich ist und Prolin enthält. Zur weiteren Ermittlung der Konstitution wurde die wässrige Lösung qualitativ untersucht. Wir erhielten zwei mit Ninhydrin reagierende Komponenten neben geringen Spuren Prolin, die, wie oben schon bemerkt, von DNP-Prolin stammen.

	Threonin		Alanin	
Butanol:Essigsäure	0.13	0.12	0.24	0.23
Phenol:Wasser	0.61	0.63	0.52	0.54

Nach Umsetzung des wässrigen Extraktes mit FDNB ergaben die beiden Komponenten als DNP-AS folgende *R*_F-Werte:

	DNP-Threonin		DNP-Alanin	
Butanol:Ammoniak	0.34	0.34	0.44	0.42
Phenol:IA	0.35	0.36	0.50	0.49
Butanol:Pyridin	0.53	0.52	0.62	0.61

^{a)} Die Laufweiten im Phosphatpuffer werden in cm angegeben.

¹⁰⁾ G. Schramm u. G. Braunitzer, Z. Naturforsch. 8b, 61 [1953].

¹¹⁾ C. S. Hanes, F. J. R. Hird u. F. A. Isherwood, Biochem. J. 51, 25 [1952].

Die quantitative Analyse des Peptides ergab nach chromatographischer Reinigung eine molare Extinktion der DNP-Spaltstücke 1:1:1. Hieraus folgt, daß das Tripeptid die Konstitution DNP-Prolyl-(alanyl-threonin) besitzt. Die endgültige Konstitution wurde durch Spaltung mit Hydrazin bewiesen. 40 γ des Peptides wurden 3 Stdn. mit 2 Tropfen Hydrazin behandelt. Wir erhielten als einzige Endgruppe Threonin. Damit ist die oben angegebene Konstitution des Tripeptids erwiesen.

3. Quantitative Bestimmung der Endgruppe: Abbild. 1 zeigt die direkt gemessenen Mengen DNP-Threonin, die durch Behandlung mit Hydrazin aus 100 mg TMV gewonnen werden. Zur quantitativen Auswertung müssen diese Werte noch mit einem Faktor für die Zersetzung während der Behandlung mit Hydrazin und für die Umsetzung mit Fluordinitrobenzol multipliziert werden. Der Faktor wurde dermaßen ermittelt, daß jeweils eine abgewogene Menge Threonin in genau derselben Weise mit Hydrazin, Aldehyd und Fluordinitrobenzol wie das TMV behandelt und die Ausbeute an zurückgewonnenem DNP-Threonin bestimmt wurde. Für die Peptide verwendeten wir denselben Korrekturfaktor. Wir erhielten in verschiedenen Ansätzen Ausbeuten von 46–68% Threonin.

Bestimmung der C-terminalen Sequenz nach vorheriger Behandlung mit Carboxypeptidase

Das C-terminale Threonin wurde durch Carboxypeptidase abgespalten. Die Versuchsbedingungen waren dieselben wie früher beschrieben¹²⁾. Lediglich die Reaktionsdauer wurde auf 1½ Stdn. verlängert. Das Reaktionsgemisch wurde mit warmer 20-proz. Trichloressigsäure gefällt, das so gewonnene Protein durch sorgfältiges Waschen mit 5-proz. Trichloressigsäure, Wasser, Methanol und Äther gereinigt. Das Präparat wurde i. Vak. bei 68° 2 Stdn. getrocknet.

1. Die totale Hydrolyse mit Hydrazin: 4–15 mg des so dargestellten Proteins wurden 9 Stdn. mit 0.1 bis 0.2 ccm Hydrazin bei 100° behandelt. Das Hydrazin wurde i. Vak. entfernt, das Produkt in Wasser gelöst, die Hydrazide, wie oben beschrieben, entfernt. Die wäßrige Lösung wurde chromatographiert.

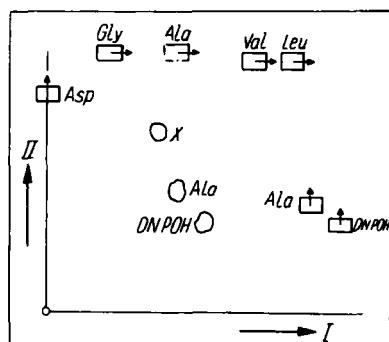


Abbildung 4. Das Chromatogramm der DNP-Derivate des TMV nach Abspaltung des C-terminalen Threonins mit Carboxypeptidase und 5stdg. Behandlung mit Hydrazin. I. Butanol: Ammoniak, II. Phosphatpuffer. x: Das Dipeptid DNP-Pro-Ala.
^ = Referenzen

		Alanin
Phenol: H ₂ O . . .	0.54	0.53
m-Kresol: H ₂ O . . .	0.24	0.24

In einem zweidimensionalen Chromatogramm wurden zur Endgruppe äquimolare Mengen Alanin hinzugegeben, nach Entwicklung mit Phenol (I. Richtung) und Butanol: Essigsäure waren nach der Ninhydrinbehandlung ebenfalls nur eine AS, nämlich Alanin, sichtbar. Die quantitative Bestimmung des C-endständigen Alanins wurde mit 50–100 mg Protein durchgeführt (Reaktionsdauer 9 Stdn.). Nach Entfernung des Hydrazins wurde entweder mit Aldehyd vorgereinigt, in einigen Versuchen jedoch direkt mit FDNB umgesetzt. Die Ausbeute variierte in verschiedenen Versuchen zwischen 55 und 76%. Wir erhielten wieder nur eine Endgruppe, die ebenfalls als DNP-Derivat, als

¹²⁾ G. Schramm, G. Braunitzer u. J. W. Schneider, Z. Naturforsch. 9 b, 298 [1954]; J. J. Harris u. G. A. Knight, Nature [London] 170, 613 [1952].

Alanin, direkt wie im Mischchromatogramm identifiziert wurde. Wir erhielten wieder 2300–2500 Moll. Alanin (5 Messungen).

2. Die partielle Hydrazinolyse: Die partielle Hydrazinolyse wurde in mehreren Versuchen in 50–150 mg Protein durchgeführt. Abbild. 4 zeigt das Chromatogramm nach 5 stdg. Behandlung bei 100°. Die Komponente x adsorbiert im UV bei 375 m μ und hat die Konstitution DNP-Proyl-alanin. Die Totalhydrolyse (mit 6 n HCl) ergab nach Extraktion in Essigester 2 DNP-Komponenten. Die eine Bande hat im UV das Maximum bei 380 m μ und läuft:

		DNP-Prolin
Butanol:Ammoniak	0.39	0.38
Phenol:IA	0.52	0.50
Phosphatpuffer	17.2 cm	17.4 cm

Die zweite Komponente wandert:

		DNP-OH
Butanol:Ammoniak	0.41	0.42
Phenol:IA	0.21	0.20
Phosphatpuffer	14.9 cm	14.7 cm

Sie zeigt ferner die typische Eigenschaft, beim Betupfeln mit 0.1 n HCl farlos zu werden. Bei der Hydrolyse des Peptids nach Isherwood¹¹⁾ verschwindet das DNP-OH fast vollständig. Hiermit ist erwiesen, daß die Bande x hinsichtlich der N-terminalen Endgruppe einheitlich ist und Prolin enthält.

Zur Ermittlung der Konstitution des Peptids wurde die wässrige Lösung qualitativ untersucht:

		Alanin
Butanol:Essigsäure	0.13	0.13
Phenol:Wasser	0.53	0.53

Nach Umsetzung mit FDNB erhielten wir eine einzige Bande:

		DNP-Alanin
Butanol:Ammoniak	0.39	0.41
Phenol:IA	0.40	0.38
Butanol:Pyridin	0.67	0.65

Die quantitative Untersuchung nach totaler Hydrolyse als DNP-Derivat ergab die molare Extinktion der Spaltstücke 1:1, womit die oben angegebene Konstitution erwiesen ist.

Tafel 1. R_F-Werte der DNP-Aminosäuren in Butanol: 0.1-proz. NH₃

Arginin	0.30	Leucin	0.55	Bis-DNP-Tyrosin ..	0.55
Asparaginsäure ...	0.04	Glykokoll	0.25	Phenol	0.41
Glutaminsäure	0.065	Methionin	0.51	Dinitroanilin	0.70
Threonin	0.29	Bis-DNP-Cystein....	0.47	Prolin	0.37
Serin	0.22	Tryptophan	0.48	Bis-DNP-Lysin	0.49
Valin	0.495	Phenylalanin	0.50	ϵ -Lysin	0.27
Alanin	0.35	Mono-N-DNP-Tyrosin	0.44	Bis-DNP-Histidin ..	0.38

Tafel 2. Papierchromatographischer Vergleich des Bis-DNP-Ornithins mit dem DNP-Zersetzungprodukt des Arginins nach 8stdg. Einwirkung von Hydrazin bei 100°. Die R_F -Werte des DNP-Leucins und des DNP-Valins desselben Chromatogramms sind als Bezugspunkte beigegeben

	DNP- Leucin	DNP- Valin	Bis-DNP- Ornithin	DNP- Arginin-Zers.- Produkt
Butanol:0.1-proz. Ammoniak	0.43	0.37	0.34	0.33
Butanol:Pyridin	0.78	0.67	0.75	0.75
Phenol:Isoamylalkohol.....	0.60	0.50	0.54	0.55

© 1955 by Verlag Chemie, GmbH.

Verantwortlich für den Inhalt: Prof. Dr. Rudolf Criegee, Karlsruhe. Redaktion: Dr. Wilhelm Merz, Tübingen.
Verantwortlich für den Anzeigenteil: W. Thiel, Verlag Chemie, GmbH. (Geschäftsführer Eduard Kreuzhage)
Weinheim/Bergstr.; Druck: Druckerei Winter, Heidelberg.

Printed in Germany. Alle Rechte vorbehalten, insbesondere die der Übersetzung. Kein Teil dieser Zeitschrift darf in irgendeiner Form — durch Photokopie, Mikrofilm oder irgendein anderes Verfahren — ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert werden. — All rights reserved (including those of translations into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form, by photoprint, microfilm, or any other means, without written permission from the publishers. — Preis jährlich DM 100.—; Einzelheft DM 8.50. Abbestellungen nur bis spätestens 6 Wochen vor Ablauf eines Halbjahres. Gerichtsstand und Erfüllungsort Weinheim/Bergstr. Lieferung erfolgt auf Rechnung und Gefahr des Empfängers.