

# **Zur Bestimmung der Radiokohlenstoffverteilung in Proteinen (Versuche an Tabakmosaikvirus).**

Von  
**F. Passler und T. Schönfeld.**

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 2 Abbildungen.

(*Eingelangt am 10. Dezember 1954.*)

Zur Bestimmung der Radiokohlenstoffverteilung im Protein von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Tabakmosaikvirus (TMV) wurde diese Komponente des TMV abgetrennt und hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach der von *Moore* und *Stein* beschriebenen Elutionschromatographie an Kationenaustauschersäulen in die Aminosäuren aufgetrennt und deren Aktivitäten im Gas-*Geiger-Zählrohr* gemessen. Das in den Versuchen verwendete aktive TMV wurde gewonnen, indem ein mit TMV gesättigtes Blatt 24 Stdn. zur Assimilation von Radiokohlensäure veranlaßt wurde. Die Aminosäuren dieses TMV enthielten nur wenige Prozent des vom TMV aufgenommenen Radiokohlenstoffes, wobei praktisch nur Asparaginsäure, Serin, Glutaminsäure und Alanin Aktivität zeigten. Die chromatographisch ermittelte Zusammensetzung des Proteins stimmt mit den von *Knight* durch biologische Methoden erhaltenen Werten gut überein.

Voraussetzung für die Verwendung radioaktiver Indikatoren bei der Untersuchung von Stoffwechselvorgängen ist die Beherrschung von Methoden zur Abtrennung einzelner Stoffwechselprodukte. Für die Untersuchung von Vorgängen, bei denen Eiweißstoffe gebildet, abgebaut oder umgewandelt werden, ist die Zerlegung dieser Stoffe in die Aminosäurebausteine von großer Bedeutung. Dabei muß die Zerlegung so verlaufen, daß anschließend eine Messung der Aktivität der einzelnen Bausteine durchgeführt werden kann.

Da im hiesigen Laboratorium im Rahmen bereits laufender Arbeiten

über den Stoffwechsel von Tabakmosaikvirus<sup>1</sup> und von Gewebekulturen<sup>2, 3</sup> auch Untersuchungen des Eiweißstoffwechsels beabsichtigt sind, haben wir ein Verfahren zur Trennung und Aktivitätsmessung von Aminosäuren erprobt. Hier soll die Methode umrissen und über die an einer Probe von radioaktivem Tabakmosaikvirus erzielten Ergebnisse berichtet werden.

### 1. Methode zur Bestimmung der Radiokohlenstoffverteilung in Proteinen.

Für die Auftrennung von Eiweißhydrolysaten kommen von vornherein praktisch nur die hinsichtlich der Trennschärfe besonders leistungsfähigen chromatographischen Methoden in Frage. Ausgewählt wurde die von *Moore* und *Stein* beschriebene Methode der Chromatographie an Kationenaustauschersäulen durch Elution mit Pufferlösungen<sup>4</sup>.

Die Säulenchromatographie besitzt für die hier beabsichtigte Verwendung gewisse Vorteile gegenüber der für analytische Zwecke ebenfalls sehr leistungsfähigen Papierchromatographie. Die erforderliche Genauigkeit der Bestimmung der Mengen der einzelnen, durch Papierchromatographie getrennten Aminosäuren und die erforderliche Genauigkeit der Bestimmung ihrer Aktivität kann nämlich nur erzielt werden, indem man die Aminosäuren aus dem Papierchromatogramm eluiert. Hierzu muß aber zuerst die genaue Lage der einzelnen „Flecke“ im Papierchromatogramm festgestellt werden. Die für diese Lokalisierung geeigneten empfindlichen Farbreaktionen mit Ninhydrin oder mit Naphthochinonsulfosäure verlaufen aber unter Abspaltung von Kohlensäure aus den Aminosäuren; bei diesen Nachweisreaktionen kann es also zu unkontrollierbaren Verlusten an Radiokohlenstoff kommen. Andersseits sind die Aktivitäten in den interessierenden Fällen zu gering, um ein Abtasten mit dem Zählrohr zu gestatten. Demgegenüber kann man einen Teil jeder Fraktion des Eluats bei der Säulenchromatographie zur Bestimmung des Aminosäuregehaltes der Fraktion verwenden und dann am Rest die Aktivitätsmessung durchführen.

Die Vorzüge der Papierchromatographie, nämlich apparative Einfachheit und geringere erforderliche Substanzmenge, treten gegenüber diesen Vorteilen der Säulenchromatographie zurück.

Unter den Methoden der Säulenchromatographie empfiehlt sich die Elutionschromatographie, da sie schärfere Trennungen als die Verdrängungschromatographie ergibt. Als stationäre Phase für die Elutionschromatographie wurden bereits Stärke<sup>5</sup> und Ionenaustauscher<sup>4</sup> erprobt. Die Verwendung von Ionenaustauschern wird im allgemeinen vorgezogen, da sie

<sup>1</sup> H. Schönfellinger und E. Broda, Mh. Chem. 83, 837 (1952); 85, 33 (1954).

<sup>2</sup> O. Suschny, E. Broda, L. Sverak, H. Bilek, O. Feldstein, L. Stockinger und H. Madl, Mh. Chem. 83, 1091 (1952).

<sup>3</sup> L. Stockinger, H. Enzl, E. Broda, L. Sverak und O. Suschny, Mh. Chem. 85, 327 (1954).

<sup>4</sup> S. Moore und W. H. Stein, J. Biol. Chem. 192, 663 (1951).

<sup>5</sup> W. H. Stein und S. Moore, J. Biol. Chem. 176, 337 (1948); 178, 53 (1949).

durch die Anwesenheit von Salzen weniger gestört wird und da auch die Eluate weniger Verunreinigungen enthalten.

Der auf der genannten Methode von *Moore* und *Stein* beruhende Gang der chromatographischen Trennung sei hier kurz beschrieben. (Für ausführliche Angaben muß auf die Originalarbeit<sup>4</sup> und auf die Dissertation von *F. Passler*<sup>6</sup> verwiesen werden.)

*Trennung der basischen Aminosäuren.* Um bei dieser Trennung quantitative Ausbeuten zu erhalten, das heißt um Verluste an basischen Aminosäuren während der Elution durch unerwünschte Umsetzungen zu verhindern, muß die Trennung möglichst unter Vermeidung langzeitiger Einwirkung basischer Puffer durchgeführt werden. Hierzu bedient man sich einer „kurzen“ Säule (Länge der Austauscherschicht 150 mm, Durchmesser der Austauscherschicht 9 mm; Füllung mit Dowex 50 mit 8% Quervernetzungen in Perlen der Größe 0,04 bis 0,08 mm). Ein Aliquot des Eiweißhydrolysats wird in etwa 1 ml saurer Pufferlösung auf den Austauscher aufgegeben. Dann wird mit einem Pufferdurchsatz von ungefähr 4 ml pro Stunde eluiert. Das austretende Eluat wird in Fraktionen von 1 ml aufgefangen. Für den automatischen Vorlagenwechsel wurde ein geeigneter Fraktionskollektor entwickelt<sup>7</sup>. Abb. 1 läßt die nacheinander verwendeten Elutionspuffer und die Reihenfolge des Austrittes der Aminosäuren erkennen.

*Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren.* Diese Trennung erfolgt an einer „langen“ Austauschersäule (Dimension der Austauscherschicht 1000 × 9 mm, Austauscher wie in der kurzen Säule). Man beschickt die lange Säule am besten mit einem zweiten Aliquot des Eiweißhydrolysats. Reicht die vorhandene Substanzmenge aber nur zur direkten Beschickung einer Säule aus, so kann man die bei der Trennung an der kurzen Säule schnell durchwandernden sauren und neutralen Aminosäuren verwenden (vgl. Abb. 1). Allerdings beträgt das Volumen der Pufferlösung, in dem sich diese Aminosäuren nach Austritt aus der kurzen Säule befinden, etwa 30 ml, ist also zur unmittelbaren Beschickung der langen Säule zu groß. Man muß daher die Aminosäuren zuerst von den Puffersalzen befreien, was z. B. mit Hilfe stark basischer Anionenaustauscher gelingt<sup>8</sup>, und dann die entsalzte Lösung einengen. Die so gewonnene Lösung wird auf der langen Säule aufgegeben. Auch diese Säule wird mit einer Durchflußgeschwindigkeit von ungefähr 4 ml Puffer pro Stunde eluiert. Abb. 2 zeigt die Elutionsbedingungen (pH der nacheinander verwendeten Puffer und Temperatur) und die Reihenfolge des Austrittes der Aminosäuren.

Aus jeder 1-ml-Fraktion der Eluate der kurzen und langen Säule werden 0,5 ml herauspipettiert. An diesem Teil wird der Aminosäuregehalt kolorimetrisch mit Ninhydrin bestimmt<sup>9</sup>. Aus den Extinktionsmessungen ergibt sich durch Vergleich mit chemisch reinen Aminosäuren die Aminosäuremenge in den einzelnen Fraktionen. So entstehen Elutionskurven, wie sie Abb. 1 und 2 zeigen.

An den restlichen 0,5 ml der Fraktionen werden die Aktivitätsbestimmungen ausgeführt. Da bei den zu bearbeitenden Problemen

<sup>6</sup> *F. Passler*, Dissertation, Universität Wien (1954).

<sup>7</sup> *F. Hawliczek, F. Passler, O. Suschny und L. Sverak*, (unveröffentlicht).

<sup>8</sup> *A. Drèze und A. de Boeck*, Arch. Int. Physiol. **60**, 201 (1952); siehe Z. analyt. Chem. **138**, 188 (1953).

<sup>9</sup> *S. Moore und W. Stein*, J. Biol. Chem. **176**, 367 (1948).

meist nur kleine Aktivitäten zu erwarten sind, mußte von vornherein eine möglichst empfindliche Methode ausgewählt werden. Als geeignete Methode stand die von *Broda* und *Rohringer* ausgearbeitete Messung im Gas-*Geiger*-Zählrohr zur Verfügung<sup>10, 11</sup>.

Bei dieser Methode dient zusatzfreie Kohlensäure als Füllgas. Zur Überführung in Kohlensäure werden die Proben zuerst zur Trockene eingedampft, die Rückstände (eluierte Aminosäuren samt Puffersubstanzen) dann nach einer Modifikation der Naßverbrennung von *van Slyke* und *Folch* oxydiert<sup>12, 13</sup>, die entwickelte Kohlensäure in Lauge absorbiert und nach Abschluß der Verbrennung als Bariumkarbonat gefällt. Aus diesem wird dann in der Zählrohrfüllapparatur CO<sub>2</sub> durch Zugabe von Perchlorsäure freigesetzt.

## 2. Die Zusammensetzung der Proteinkomponente des Tabakmosaikvirus (TMV).

Bestimmungen der Zusammensetzung der Proteinkomponente des TMV sind schon nach verschiedenen Methoden durchgeführt worden: *Ross* isolierte einzelne Aminosäuren aus dem Hydrolysat durch fraktionierte Kristallisation verschiedener Salze der Aminosäuren<sup>14</sup>. Die Genauigkeit dieser Methode reicht aber keinesfalls an die chromatographischer Methoden heran. Zahlreiche Analysen — auch von Mutanten des TMV — wurden von *Knight* nach biologischen Methoden (Bakterienwachstum) durchgeführt<sup>15, 16</sup>. Schließlich wurde von *Schramm* eine Auf trennung der Aminosäuren des Hydrolysat s in einzelne Gruppen durch Adsorption an Aktivkohle und an Ionenaustauschern vorgenommen<sup>17</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun — unseres Wissens zum erstenmal — die Zusammensetzung der Proteinkomponente des TMV chromatographisch bestimmt. Dies geschah sowohl bei Vorversuchen mit inaktivem Virus als auch bei der Zerlegung des aktiven Virus für die Aktivitätsmessungen.

Das in unseren Analysen verwendete TMV wurde aus Tabakblättern nach der Methode der isoelektrischen Fällung gewonnen<sup>18, 19</sup>. Dann wurde die Nucleinsäurekomponente durch Erhitzen mit Trichloressigsäure abgetrennt<sup>20</sup>. Das Protein wurde dann der Hydrolyse mit Salzsäure unter-

<sup>10</sup> *G. Rohringer* und *E. Broda*, Z. Naturforsch. 8 b, 159 (1953).

<sup>11</sup> *E. Broda* und *G. Rohringer*, Z. Elektrochem. 58, 634 (1954).

<sup>12</sup> *D. D. van Slyke* und *J. Folch*, J. Biol. Chem. 136, 509 (1940).

<sup>13</sup> *J. A. Thorn* und *Ping-Shu*, Canad. J. Chem. 29, 558 (1951).

<sup>14</sup> *A. F. Ross*, J. Biol. Chem. 138, 741 (1942).

<sup>15</sup> *C. A. Knight*, J. Biol. Chem. 171, 297 (1949).

<sup>16</sup> *F. L. Black* und *C. A. Knight*, J. Biol. Chem. 202, 51 (1953).

<sup>17</sup> *G. Schramm* und *G. Braunitzer*, Z. Naturforsch. 5 b, 297 (1950).

<sup>18</sup> *C. H. Hills* und *H. H. McKinney*, Phytopathology 32, 509 (1942).

<sup>19</sup> *B. Commoner*, *F. L. Mercer*, *P. Merrill* und *A. Zimmer*, Arch. Biochemistry 27, 271 (1951).

<sup>20</sup> *G. Schramm* und *G. Braunitzer*, Z. Naturforsch. 5 b, 297 (1950); 8 b, 159 (1953).

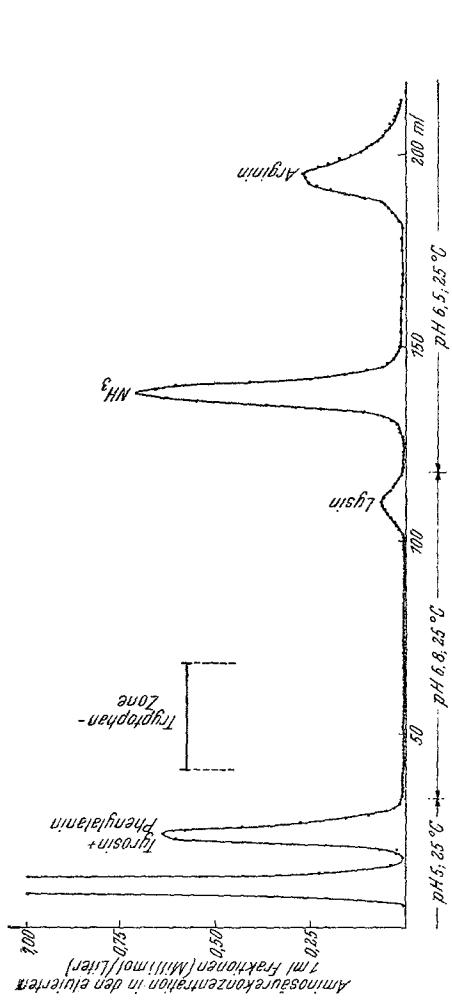


Abb. 1. Eluat eines Hydrolysats von TMV-Protein aus der „kurzen“ Säule.

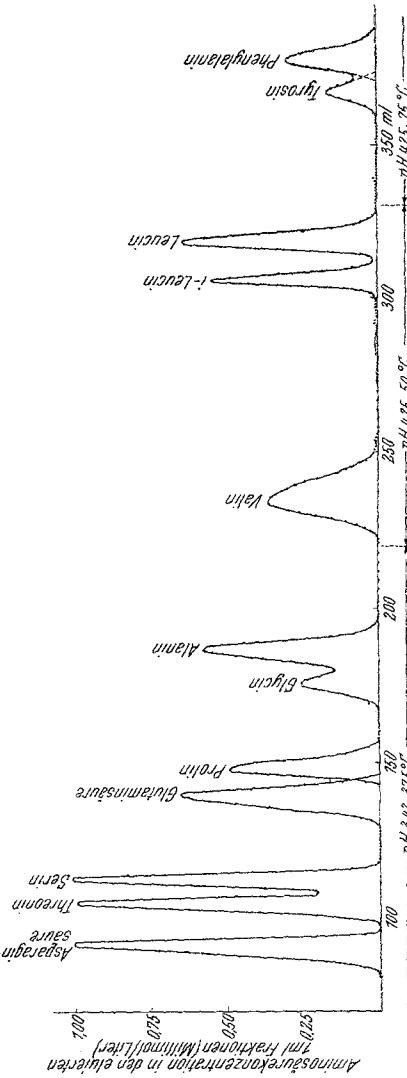


Abb. 2. Eluat eines Hydrolysats von TMV-Protein aus der „langen“ Säule.

worfen (in 6 n HCl, 16 Stdn. im abgeschmolzenen Gefäß auf 112 bis 115° erhitzt). Aus dem Hydrolysat wurde die Salzsäure durch Abdampfen im Vak. entfernt, der Eindampfrückstand in Puffer von pH 2,5 aufgenommen und diese Pufferlösung zur Beschickung der Ionenaustauschersäulen verwendet. Für jedes Chromatogramm wurde ein 3 bis 5 mg Protein entsprechendes Volumen der Pufferlösung eingesetzt.

An Säure-Hydrolysaten wurden insgesamt fünf chromatographische Trennungen an der „langen“ Säule und zwei Trennungen an der „kurzen“ Säule durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Chromatogramme

stimmen gut überein. Die Mittelwerte aus den zwei Bestimmungen mit den größten eingesetzten Mengen sind in Tabelle 1 angeführt. Diese Tabelle enthält auch die Werte von *Knight*. Man erkennt, daß Chromatographie und biologische Methode befriedigend übereinstimmende Werte liefern. Auch mit den Ergebnissen von *Schramm* besteht Übereinstimmung (siehe Tabelle 2).

Tabelle 1. Zusammensetzung des TMV-Proteins.

Stickstoffhaltige Komponente	Gehalt in Prozent des Gesamtstickstoffs		
	eigene Werte	<i>Knight</i> 1947	<i>Knight</i> 1953
Alanin . . . . .	6,6	5,5	7,8
Amidstickstoff . . .	8,8	—	—
Arginin . . . . .	21,1	21,5	21,3
Asparaginsäure . . .	8,7	9,7	8,5
Cystein . . . . .	—	0,54	0,56
Glutaminsäure . . .	7,5	7,4	7,1
Glycin . . . . .	3,0	2,4	3,2
i-Leucin . . . . .	4,0	4,8	4,3
Leucin . . . . .	6,1	6,8	5,8
Lysin . . . . .	1,7	1,9	1,8
Phenylalanin . . . .	3,6	4,9	4,7
Prolin . . . . .	4,9	4,8	4,6
Serin . . . . .	7,1	6,5	8,3
Threonin . . . . .	7,4	7,9	9,5
Tryptophan . . . .	2,5	2,0	2,1
Tyrosin . . . . .	1,7	2,0	1,9
Valin . . . . .	7,9	7,5	8,9
Summe . . . . .	103,1*	104,9**	109,2**

\* 0,5% für Cystein mit eingerechnet.

\*\* 8,8% für Amidstickstoff mit eingerechnet.

Tabelle 2. Zusammensetzung von TMV-Protein nach Gruppen von Aminosäuren.

Stickstoffhaltige Komponenten (AS = Aminosäuren)	Gehalt in Prozent des Gesamtstickstoffs			
	eigene Werte	<i>Schramm</i>	<i>Knight</i> 1947	<i>Knight</i> 1953
Amidstickstoff . . . . .	8,8	8,4	—	—
Aromatische AS . . . . .	7,8	8,6	8,9	8,7
Saure AS . . . . .	16,2	15,4	17,0	15,6
Basische AS . . . . .	22,8	20,8	23,4	23,1
$\beta$ -substituierte AS und Glycin . . .	17,5	16,9	16,8	21,0
Übrige aliphatische AS . . . . .	29,5	31,2	29,4	31,4

Bei der sauren Hydrolyse werden Tryptophan und Cystein zur Gänze zersetzt. Ihre Bestimmung muß daher gesondert durchgeführt werden. Tryptophan bestimmt man durch Chromatographie nach alkalischer Hydrolyse. Das Tryptophan tritt dabei etwa in dem in Abb. 1 bezeichneten Teil des Eluats der kurzen Säule auf. Eine allerdings nicht sehr genaue Bestimmung dieser Art nach Hydrolyse mit Barytlauge ergab 2,5% Tryptophan (bezogen auf den Stickstoffgehalt).

Cystein wird hingegen auch bei der alkalischen Hydrolyse zersetzt. Die Bestimmung gelingt jedoch, wenn man das Protein vor der Hydrolyse mit Perameisensäure behandelt und das Cystein dadurch — sozusagen *in situ* — zur hydrolysebeständigen Cysteinsäure oxydiert<sup>21</sup>. Diese wird dann nach der Hydrolyse chromatographisch abgetrennt und bestimmt<sup>4</sup>. Eine derartige Cysteinbestimmung an TMV ist von uns vorläufig noch nicht durchgeführt worden.

Da es bei sehr kleinen Stoffmengen — es handelte sich um 20 bis 30 mg Protein — nur schwer gelingt, die Aminosäuren des Proteins quantitativ in die Pufferlösung zu überführen, wurden die Prozentgehalte auf Grund des Stickstoffgehaltes der Pufferlösungen berechnet. Durch einen Korrekturfaktor von 1,03 wurde hierbei berücksichtigt, daß Tryptophan und Cystein bei der Hydrolyse überwiegend in die Humine eingebaut werden.

### 3. Die Verteilung des Radiokohlenstoffes in markiertem TMV.

#### A. Gewinnung des markierten TMV.

Hierfür wurde im wesentlichen die von Schönfellinger<sup>1, 22</sup> beschriebene Methode verwendet. Sechzig Tage nach der Infektion einer im Freien wachsenden Tabakpflanze wurde ein Blatt 36 Std. lichtdicht abgedeckt, dann abgetrennt und in einer 500 ml großen Photosynthesekammer 24 Std. unter Lichteinwirkung einer radiokohlensäurehaltigen Atmosphäre (Gesamtgehalt 79 mg CO<sub>2</sub>, Gesamtaktivität 2,3 Millieurie) ausgesetzt. Dabei wurde die Kohlensäure praktisch vollkommen assimiliert. Aus dem abgetöteten Blatt (flüssige Luft) wurde das aktive TMV mit Puffer extrahiert und durch mehrfache isoelektrische Fällung von anderen Stoffen abgetrennt. Schließlich wurden 10 ml einer Pufferlösung des TMV erhalten (150 γ Virus/ml, 4,1 × 10<sup>5</sup> Zerfälle/Min. ml).

#### B. Aktivität der Aminosäuren des Proteinhydrolysats.

Zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung wurden Aliquote der Stammlösung des aktiven TMV mit inaktivem TMV verdünnt. Dies war notwendig, um zu gut verarbeitbaren Mengen zu gelangen. Das Verdünnungsverhältnis betrug 100 bis 150. Abtrennung der Nucleinsäurekomponente und Hydrolyse wurden wie beim inaktiven Virus

<sup>21</sup> E. Schram, S. Moore und E. J. Bigwood, Biochemic. J. 57, 33 (1954).

<sup>22</sup> H. Schönfellinger, Dissertation, Universität Wien (1952).

durchgeführt. Es wurden zwei Säurehydrolysate hergestellt und an diesen insgesamt drei Trennungen an der langen Säule und zwei Trennungen an der kurzen Säule durchgeführt.

Die Aktivitätsmessungen wurden in folgender Weise vorgenommen: Aus den kolorimetrisch ermittelten Elutionskurven, die für jede Trennung aufgenommen wurden (vgl. Abb. 1 und 2), waren die Fraktionen ersichtlich, in denen eine bestimmte Aminosäure aufscheint. Die nicht zur Aminosäurebestimmung verwendeten Hälften aller zu einer Elutionszone gehörigen Eluatfraktionen — z. B. die Fraktionen 85 bis 94 des in Abb. 2 wiedergegebenen Chromatogramms (Asparaginsäurezone) — wurden dann vereinigt und aliquote Teile der so erhaltenen Gemische zur Aktivitätsbestimmung verwendet. Als Kontrolle wurden zusätzliche Bestimmungen an Fraktionen ausgeführt, die zwischen den Aminosäurezonen lagen.

Tabelle 3 gibt die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen an einem Eluat aus der langen Säule wieder (die Aminosäureanalyse dieses Eluats zeigt Abb. 2). Die bedeutende Größe der Meßfehler wird durch die Höhe des Leerwertes der verwendeten Zählrohre ( $\sim 55$  Stöße/Minute) bedingt. Mit Hilfe einer seither im hiesigen Institut gebauten Antikoinzidenz-Zählapparatur kann der Leerwert auf etwa 5 Stöße pro Minute gesenkt werden<sup>23</sup> und weitere Analysen werden daher bei gleichen Aktivitäten und Meßzeiten eine bedeutend größere Genauigkeit aufweisen. Fraktionen, bei denen die Meßwerte bloß vier oder weniger Stöße über dem Leerwert betragen, sind in Tabelle 3 als inaktiv bezeichnet.

In den Zonen der Eluate an der kurzen Säule, in denen die basischen Aminosäuren auftraten, wurden keine merklichen Aktivitäten festgestellt. Ebenfalls als inaktiv erwies sich Tryptophan, das nach alkalischer Hydrolyse des aktiven TMV abgetrennt wurde.

Parallelbestimmungen der Aktivitätsverteilung stimmten bedeutend schlechter überein als Parallelbestimmungen der Protein Zusammensetzung. Der berechnete statistische Fehler reicht nicht aus, um dieses Schwanken der Werte zu erklären. Es wäre denkbar, daß Schwankungen der Aktivität durch das Auftreten geringer Verunreinigungen hoher spezifischer Aktivität verursacht werden. Diese Annahme wird auch durch das Auftreten von Aktivitäten in Fraktionen gestützt, die keine nachweisbaren Mengen von Aminosäuren enthielten.

Die Versuchsergebnisse zeigen jedoch ganz eindeutig, daß im untersuchten TMV-Protein vor allem Asparaginsäure und Serin Radiokohlenstoff enthalten, und zwar ungefähr je 1% der Gesamtaktivität des TMV. Glutaminsäure und Alanin sind in geringerem Maß radioaktiv. Praktisch

<sup>23</sup> G. Rohringer, L. Sverak, E. Broda und K. Liebscher, Mh. Chem. 86, 117 (1955).

inaktiv sind Threonin, Prolin, Valin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Lysin, Arginin und Tryptophan. Keine eindeutige Aussage ist vorläufig über Glycin und Tyrosin möglich. Cystein wurde nicht untersucht.

Tabelle 3. Aktivität eines Eluats der langen Säule.  
(Eingesetzte Lösung wurde aus Virus der Aktivität  
164,000 Stöße/Min. gewonnen.)

Nummer der Fraktionen	Aminosäure	Durchschnittliche Aktivität der bezeichneten Fraktionen (Stöße/Min. ml)	Berechneter mittlerer Meßfehler
81, 82		0	—
85—94	Asparaginsäure .	114	± 11
96, 97		36	± 18
98—107	Threonin .....	0	—
108, 109		70	± 14
110—117	Serin .....	132	± 12
122, 123		32	± 14
133—142	Glutaminsäure ..	75	± 10
147—151	Prolin .....	39	± 14
156, 157		39	± 14
169—178	Glycin .....	30	± 10
180		38	± 21
183—192	Alanin .....	55	± 10
207, 208		0	—
226—235	Valin .....	0	—
256, 257		18	± 14
302—309	Isoleucin .....	0	—
312, 313		0	—
314—323	Leucin .....	0	—
334, 335		0	—
361—370	Tyrosin .....	27	± 10
374—382	Phenylalanin ...	0	—

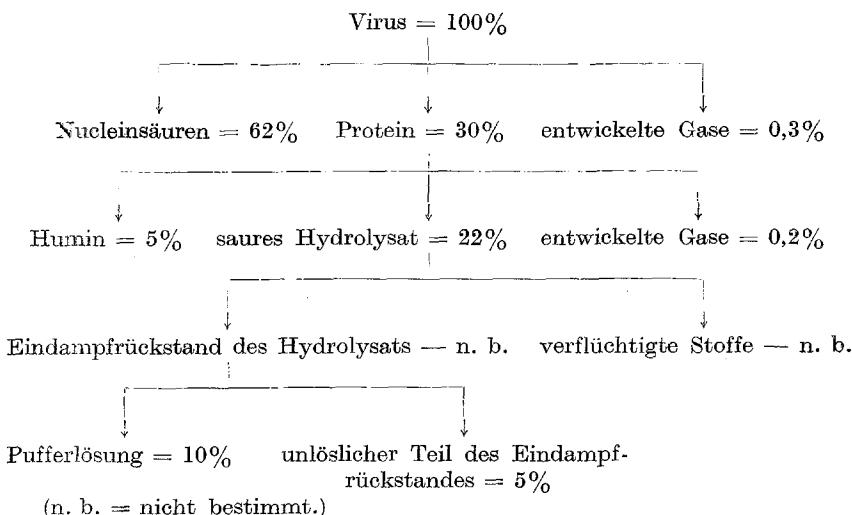
Auffallend an den Versuchsergebnissen ist auch, daß nur ungefähr 4% der gesamten Aktivität des Virus in den Aminosäuren gefunden wurden. Da die Proteinkomponente des TMV mit 95% den weitaus größten Teil des Gewichtes des TMV ausmacht, müssen die anderen Komponenten wesentlich höhere spezifische Aktivitäten aufweisen — im Durchschnitt etwa 500mal die mittlere spezifische Aktivität der Aminosäuren. Unter den hier angewendeten Bedingungen der Gewinnung des aktiven TMV erfolgt also der Einbau von photosynthetisch assimiliertem Radiokohlenstoff vor allem in die Nichteiweiß-Komponenten.

#### C. Aktivität anderer Komponenten des TMV.

Um festzustellen, wie sich der Hauptteil des Radiokohlenstoffs im TMV verteilt, wurden verschiedene chemische Trennungen und Aktivitätsmessungen vorgenommen (siehe Tabelle 4). Der Großteil des

Radiokohlenstoffes liegt ganz eindeutig in den Nucleinsäuren vor. Die Aktivität des abgeschiedenen Proteins dürfte überwiegend auf Verunreinigungen zurückzuführen sein, oder auf Komponenten des Proteins, die keine Aminosäuren sind und die wegen ihrer geringen Menge nach chemischen Methoden bisher nicht nachgewiesen wurden. Nur eine solche Annahme kann die geringe Aktivität, die in den Aminosäuren gefunden wurde, erklären. Diese Annahme wird auch durch die beträchtliche Aktivität der Humine bestätigt, die nur in kaum wägbarer Menge gebildet werden und daher sehr große spezifische Aktivität aufweisen. Auch der Rückstand, den man beim Abdampfen der zur Hydrolyse

Tabelle 4. Aktivität verschiedener Fraktionen bei der Auftrennung von aktivem TMV.



zugegebenen Salzsäure erhält, ist überraschend stark aktiv. Die Aktivität dieses Rückstandes läßt sich zwangslässig durch die Annahme deuten, daß bei der Hydrolyse nicht nur unlösliche, sondern auch lösliche Humine gebildet werden, die erst beim Eindampfen zum Teil in unlösliche Formen übergehen, zum Teil aber auch wieder vom Puffer aufgelöst werden. Dadurch würde sich auch erklären, wieso die Pufferlösung des Eiweißhydrolysats 10% der Aktivität des TMV enthält, während nur 4% in den einzelnen Aminosäuren festgestellt werden konnten.

Dem Vorstand unseres Institutes, Herrn Prof. Dr. L. Ebert, danken wir für die Förderung unserer Arbeit, Herrn Prof. Dr. E. Broda für die Anregung zu dieser Arbeit und für zahlreiche Diskussionen, Herrn Dr. H. W. Schönfellinger für Hilfe bei der Gewinnung von Viruspräparaten und der Österreichischen Stickstoffwerke A. G., Linz, für die Mittel zum Bau des Fraktionskollektors.