

Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus

Aminosäuresequenzen des Proteins des Tabakmosaikvirusstammes *dahlemense*

Teil II (Position 1—41 und 135—158)

VON B. WITTMANN-LIEBOLD UND H. G. WITTMANN

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen

(Z. Naturforsch. **18 b**, 1032—1049 [1963]; eingegangen am 25. Juli 1963)

The amino acid sequence of *dahlemense*, a naturally occurring strain of tobacco mosaic virus, has been determined and compared with that of the strain *vulgare* (Fig. 7). In this communication the experimental details are given for the elucidation of the amino acid sequences within two tryptic peptides with 65 amino acids.

Verzeichnis der Abkürzungen: Für die Aminosäuren wurden die von BRAND und EDSALL (Ann. Rev. Biochem. **16**, 224 [1947]) angegebenen Abkürzungen verwendet.

TMV: Tabakmosaikvirus, DNP: 2,4-Dinitrophenyl, Tris: 2-Amino-2-oxymethylpropanol-(1.3), Pyr: Pyridin, Pic: α -Picolin, Lut: Lutidin, Col: sym. Collidin, AcOH: Eisessig, BEW: Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1), Pyr-System A: Pyridin/*i*-Amylalkohol/Wasser/Ameisensäure, 50:40:40:0,6. Fermente: Chy Chymotrypsin, Sub Subtilisin, C-case Carboxypeptidase.

Folgende Symbole wurden zur Charakterisierung der Peptide verwendet: V vulgare Protein, D dahlemense-Protein, T tryptisches Peptid, C chymotryptisches Partialpeptid, S Subtilisin-Partialpeptid.

Die römischen Zahlen geben die Reihenfolge der tryptischen Peptide in der TMV-Kette, beginnend am N-terminalen Peptidende, an.

Die arabischen Zahlen entsprechen der Reihenfolge der Partialpeptide bei ihrer Elution von der Austauschersäule. Die in Klammern gesetzten Zahlen, die jedem Peptid angefügt sind, bedeuten die Positionsnummern des betreffenden Peptides in der Polypeptidkette des ungespaltenen Virusproteins.

In der ersten Mitteilung¹ dieser Reihe wurde die Sequenzanalyse von acht tryptischen Peptiden im Proteinanteil des Tabakmosaikvirus-Stammes *dahlemense* beschrieben. Aus dem Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenzen der beiden TMV-Stämme *vulgare* und *dahlemense* lassen sich, wie im Teil III im einzelnen diskutiert wird, Rückschlüsse auf die Struktur der Proteinuntereinheiten im TMV-Stäbchen und auf Probleme des genetischen Codes ziehen.

In der vorliegenden Arbeit ist die Sequenzanalyse der restlichen zwei tryptischen Peptide DT_I (Position 1—41) und DT_(XI+XII) (Position 135—158) beschrieben.

Material und Methoden

Die Methoden zur Vermehrung und Reinigung des TMV-Stamms *dahlemense*², die Darstellung seines Proteins und dessen tryptische Hydrolyse wurden bereits ausführlich in Teil I beschrieben. Desgleichen kann an dieser Stelle auf die eingehende Schilderung der Fraktionierung der tryptischen *dahlemense*-Peptide nach der Methode von RUDLOFF und BRAUNITZER³, ihre Reinigung und Charakterisierung verzichtet werden, da sie in der vorausgegangenen Mitteilung beschrieben wurden.

Das unlösliche Peptid DT_I (1—41) wurde durch Ansäuern des tryptischen Hydrolysats ausgefällt, also in ähnlicher Weise isoliert, wie dies für das homologe *vulgare*-Peptid VT_I (1—41) beschrieben wurde⁴. Wegen des etwas verschiedenen isoelektrischen Punktes beider Peptide erfolgte die Fällung bei p_H 4,2 statt bei p_H 4,7. Die weitere Reinigung dieses Peptides über Sephadex G 25 wird nachfolgend bei der Beschreibung der Sequenzanalyse erläutert.

Zur Ermittlung der Sequenz der hier zu beschreibenden Peptide wurden im allgemeinen ähnliche Methoden wie bei den bereits beschriebenen Sequenzstudien der übrigen tryptischen Peptide verwendet. So wurden beide Peptide zunächst fermentativ in Partialpeptide zerlegt, die über Dowex 1×2 fraktioniert wurden, und die nach Reinigung durch EDMAN-Abbau^{5a} und DNP-Methode^{5b} oder durch Kombination beider Methoden in ihrer N-terminalen Aminosäurefolge festgelegt wurden. Die C-terminalen Sequenzen wurden schrittweise mit Carboxypeptidase abgespalten. Größere Partialpeptide wurden mit Subtilisin weiter zerlegt. Die verwendeten Enzympräparate und die Durchführung der Versuche zur Sequenzanalyse wurden ebenfalls in Teil I beschrieben.

¹ B. WITTMANN-LIEBOLD u. H. G. WITTMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.

² G. MELCHERS, Biol. Zbl. **60**, 527 [1940].

³ V. RUDLOFF u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **323**, 129 [1961].

⁴ D. T. GISH, L. K. RAMACHANDRAN u. W. M. STANLEY, Arch. Biochem. Biophysics **78**, 433 [1958].

^{5a} u. ^{5b} Näheres siehe Teil I.

Die Ermittlung der Aminosäurefolge des Peptides DT_I wurde nach gleichem Prinzip vorgenommen wie dies bei der Sequenzanalyse zahlreicher Mutanten des TMV⁶ zur Anwendung kam, deren Unterschiede in der Aminosäure-Zusammensetzung im Vergleich zu *vulgare* im homologen Peptid lokalisiert worden ist⁷. Zur Zerlegung des betreffenden Peptides (1–41) dieser Mutanten in Teilbereiche, deren Aminosäurefolge nach den üblichen Analysemethoden ermittelt werden konnte, mußten folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden: 1. Es standen nur sehr begrenzte Mengen jeder Mutante zur Verfügung; zudem mußte das ausgefällte Rohpeptid noch einer zusätzlichen Reinigung unterworfen werden, wodurch erhebliche Ausbeuteverluste auftraten. Deshalb sollten die aus diesem Peptid dargestellten Partialpeptide alle nach einem Verfahren in einem Arbeitsgang mit möglichst vergleichbaren Ausbeuten isoliert werden. 2. Wegen der Größe des Peptides durfte keine Spaltung in viele unterschiedliche Teilbereiche erfolgen, um deren Reindarstellung nicht unnötig zu erschweren. Die Zahl der Nebenspaltstellen sollte möglichst gering gehalten werden. 3. An den isolierten Partialpeptiden mußte zugleich eine Bestimmung der Säureamidverteilung möglich sein.

Die vielfach angewendete Methode, cysteininhaltige Peptide nach Oxydation mit Perameisensäure⁸ in ihrer Sequenz aufzuklären, konnte wegen des im Peptid DT_I enthaltenen Tryptophanrestes nicht angewendet werden, da Tryptophan hierbei ganz oder teilweise zerstört wird. Die Spaltung des Peptides mit ungeschütztem Sulfhydrylrest macht die Isolierung der cysteinhaltigen Partialpeptide sehr schwierig, wie aus den Untersuchungen am entsprechenden *vulgare*-Peptid⁹ hervorgeht; auch war man gezwungen, das Peptid zur enzymatischen Hydrolyse zunächst in Ameisensäure zu lösen. Der Abbau mit Bromsuccinimid¹⁰ war beim TMV nicht erfolgreich⁹.

Das gereinigte Peptid sowohl der TMV-Mutanten als auch des *dahlemense*-Proteins wurde daher zunächst nach der Methode von ANFENSEN und HABER¹¹ mit Jodacetamid in sein S-Carbamidomethyl-Derivat überführt. Das alkylierte Peptid wurde dann gegen p_H 4,7 dialysiert, wobei es ausfiel. Nach Zentrifugation wurde es mit Wasser aufgenommen, bei p_H 7,8 gelöst und mit Chymotrypsin bei diesem p_H -Wert gespalten. Anschließend wurden die Partialpeptide säulenchromatographisch über Dowex 1×2 fraktioniert, da bei Verwendung von Dowex 50 wegen der Isoleucin-, Phenylalanin- und Tryptophanreste im Peptid die Isolierung aller Partialpeptide nach unserer Erfahrung nicht zu erwarten war. Wegen der anschließenden Fraktionierung über Dowex 1 wurde die Umsetzung des Cystein-Restes mit Jodacetamid der mit Jodessigsäure vorgezogen, um so die Einführung einer zusätzlichen sauren Gruppe zu vermeiden.

Bei dieser Darstellung der chymotryptischen Partialpeptide aus dem Peptid (1–41) wurden bei den verschiedenen untersuchten Mutanten meistens die gleichen Teilbereiche erhalten: (Hauptspaltstellen: Position 2/3; 10/11; 13/14; 17/18; 23/24; 27/28; 31/32; 35/36; 38/39.) Das entsprechende *dahlemense*-Peptid wurde ebenfalls in diese Teilbereiche zerlegt. Wegen der unterschiedlichen Sequenz erfolgte die Spaltung der Peptidbindung jedoch nicht zwischen Position 23 und 24, sondern zwischen 24/25. Die Reindarstellung von DT_I bereitete wegen der im Vergleich zum *vulgare* ungünstigeren Sequenz mit drei weiteren Serin-Resten bei *dahlemense* mehr Schwierigkeiten als bei den meisten untersuchten Mutanten. Dasselbe gilt für die Reindarstellung der Partialpeptide. Zudem konnte das Auftreten von Nebenspaltstellen bei dem *dahlemense*-Peptid (1–41) nicht völlig vermieden werden, wodurch die Zahl der zu trennenden Partialpeptide sich vergrößerte. Als optimale Zeit für die enzymatische Spaltung mit Chymotrypsin (verwendete Präparate: 1. α -Chymotrypsin CDC nach Ionenaustausch-Chromatographie, der Fa. Worthington, Freehold, New Jersey, 2. α -Chymotrypsin CDJ, 3-mal krist., der Fa. Worthington) wurden 4 Stdn. ermittelt, da nach kürzeren Zeiten zu große Spaltprodukte auftraten, die schlecht an Austauschern zu isolieren waren, und längere Zeiten die Zahl der Nebenprodukte vergrößerte. Mit Chymotrypsin-Präparat 1 (CDC) wurde DT_I im wesentlichen nur an den Hauptspaltstellen hydrolysiert, so daß bei den Wiederholungen der Spaltung dieses Enzympräparat bevorzugt wurde.

Die Zuordnung der erhaltenen Partialpeptide zu dem tryptischen Gesamtpeptid erfolgte im Falle des Peptides DT_(XI+XII) durch Vergleich der Chymotrypsin-Peptide mit den nach Subtilisin-Spaltung erhaltenen Partialpeptiden. Im Falle des Peptides DT_I genügte ein Vergleich der mit den verschiedenen Chymotrypsin-Präparaten isolierten Chymotrypsin-Peptide.

Ergebnisse

Sequenzanalyse von DT_I (1–41)

Darstellung von DT_I: Das Rohpeptid (aus 3 bis 4 g Virus) wurde durch Titration des tryptischen Hydrolysats (in etwa 1,5-proz. Lösung) auf p_H 4,2 ausgefällt und dreimal umgefällt. Anschließend wurde es sofort bei p_H 7,8 mit Wasser in Lösung gebracht und über Sephadex G-25 gereinigt (vgl. Abb. 1). Dazu wurde die Gesamtmenge in 12 bis 15 Tln. à 5 ml auf eine mit 1% Pyridin–1% Colloidin–Essigsäure (p_H 7,5) äquilibrierte Säule

⁶ H. G. WITTMANN, Z. f. Vererbungslehre **93**, 490 [1962].

⁷ B. WITTMANN-LIEBOLD, in Vorbereitung.

⁸ C. H. W. HIRS, J. biol. Chemistry **219**, 611 [1956].

⁹ F. A. ANDERER, E. WEBER u. H. UHLIG, Z. Naturforschg. **15b**, 79 [1960].

¹⁰ L. K. RAMACHANDRAN u. B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. **81**, 4028 [1959].

¹¹ C. B. ANFENSEN u. E. HABER, J. biol. Chemistry **236**, 1361 [1961].

(1,5 cm · 150 cm) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit der gleichen Pufferlösung, wobei Fraktionen zu 8 ml aufgefangen wurden. Nach alkalischer Ninhydrinreaktion wurden die dem ersten Gipfel entsprechenden Fraktionen (die Fraktionen der abfallenden Schulter des Hauptgipfels wurden verworfen) aus allen Läufen vereinigt. Das auf diese Weise weitgehend gereinigte Peptid DT_I wurde mehrere Male mit Wasser im Rotationsverdampfer eingengt, bei p_H 7,5 gelöst und in zwei Portionen eingefroren aufbewahrt. Jede Portion wurde für sich alkylisiert und mit Chymotrypsin gespalten.

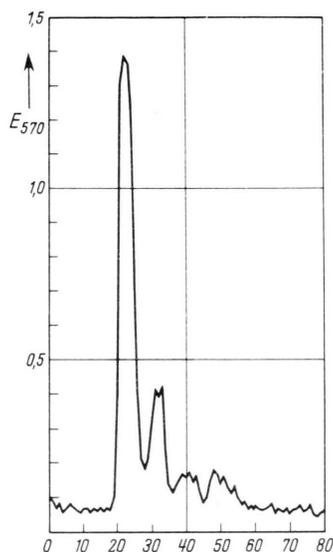


Abb. 1. Reinigung des Rohpeptids DT_I über Sephadex G-25. Darstellung des Peptides vgl. Text. Säule 1,5 cm · 150 cm, Zimmertemperatur. Pufferlösung: 1% Pyr-1% Col-Acetat, p_H 7,5. Durchflußgeschwindigkeit: 4 Fraktionen à 8 ml/Stde., Extinktion bei 570 $m\mu$ nach alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion (0,5 ml je Fraktion).

Stabilisierung der Cystein-SH-Gruppe: Um die während der Gewinnung des Peptides möglicherweise entstandenen S-S-Bindungen zu reduzieren, wurde DT_I vor der Alkylierung mit Äthylmercaptan behandelt. Dazu wurde das der Hälfte der Gesamtmenge (s. o.) entsprechende Material nach der Sephadex-Reinigung in 3-m. Harnstoff bei p_H 8,6 gelöst und unter Stickstoff mit 0,25 ml Äthylmercaptan (3,4 mMol pro ~ 0,05 mMol Peptid) 4 Stdn. bei Zimmertemperatur behandelt. Der p_H -Wert der Lösung wurde durch Trimethylamin eingestellt und im Autotitrator konstant gehalten. Anschließend wurde die Reduktionsmischung mit 80 ml 0,5-m. Trispufferlösung (p_H 8,6) verdünnt und mit 1,8 g in 40 ml

Trispuffer gelöstem Jodacetamid (2,8-facher Überschuß bezogen auf Äthylmercaptan) versetzt (Endlösung: 3-m. Harnstoff). Nach 20 min wurde das restliche Reagenz mit 6 ml Äthylmercaptan (8,2-facher Überschuß bezogen auf Jodacetamid) umgesetzt und nach 15–20 min die alkylierte Peptidlösung gegen 0,02-m. Natriumacetatpuffer p_H 4,6 dialysiert (4-mal 5 l Dialysepuffer), wobei das Peptid ausfiel. Es wurde abzentrifugiert (45 min bei 1500 U/min) und anschließend sofort mit Wasser bei p_H 7,8 gelöst.

Chymotrypsinspaltung: Die erhaltene Lösung des alkylierten DT_I wurde auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht, mit 2,5 mg Chymotrypsin (Präparat 1) bei p_H 7,8 4 Stdn. bei 36 °C gespalten und das Hydrolysat abzentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals mit Chymotrypsin 4 Stdn. nachgespalten und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden eingengt und bei p_H 9,4 auf eine Dowex 1 × 2-Austauschersäule aufgetragen. Die chromatographische Fraktionierung der chymotryptischen Peptide ist in Abb. 2 wiedergegeben. Gipfel 1 wurde nochmals über Dowex 1 × 2 rechromatographiert (Pufferlösung: Gradient mit 1 l 1% Pyr-1% Col-Acetat, p_H 9 und 1% Pyr-1% Col-Acetat, p_H 8,4), wobei eine Auftrennung der beiden basischen Peptide C₁ und C₂ erreicht wurde. Diese und die übrigen Partialpeptide wurden papierchromatographisch (Pyr-System A) gereinigt und auf enthaltenes Arg, Try und Tyr durch Sprühaktion geprüft (exp. Durchführung vgl. Teil I). Die Reindarstellung der Partialpeptide C_{5-2a} und C_{5-2b} (25/26–35) (vgl. nachstehende Aufstellung) war schwierig, da sie papierchromatographisch nicht voneinander getrennt werden konnten. Eine Trennung dieser Peptide von C₆ (3–10) wurde säulenchromatographisch vorgenommen (Dowex 1 × 2, Säule 50 · 1,5 cm, Pufferlösungen: 1. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, p_H 7,5, 2. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, p_H 7,2, 3. Gradient mit 500 ml p_H 7,2-Puffer und 0,075-n. AcOH, 4. Gradient mit 0,3-n. AcOH). Auf diese Weise konnte zwar eine ausreichende Menge an reinem C₆ erhalten werden, doch war die Trennung der erwähnten cysteinhaltigen Peptide nicht zufriedenstellend. Daher wurde auf deren Reindarstellung verzichtet und statt dessen mit dem papierchromatographisch gereinigten Material eine Subtilisinnachspaltung vorgenommen (vgl. Aufstellung). Chymotrypsinpeptid C₁₂₋₂ (18–24) wurde ebenfalls säulenchromatographisch über Dowex 1 × 2 vom gleichzei-

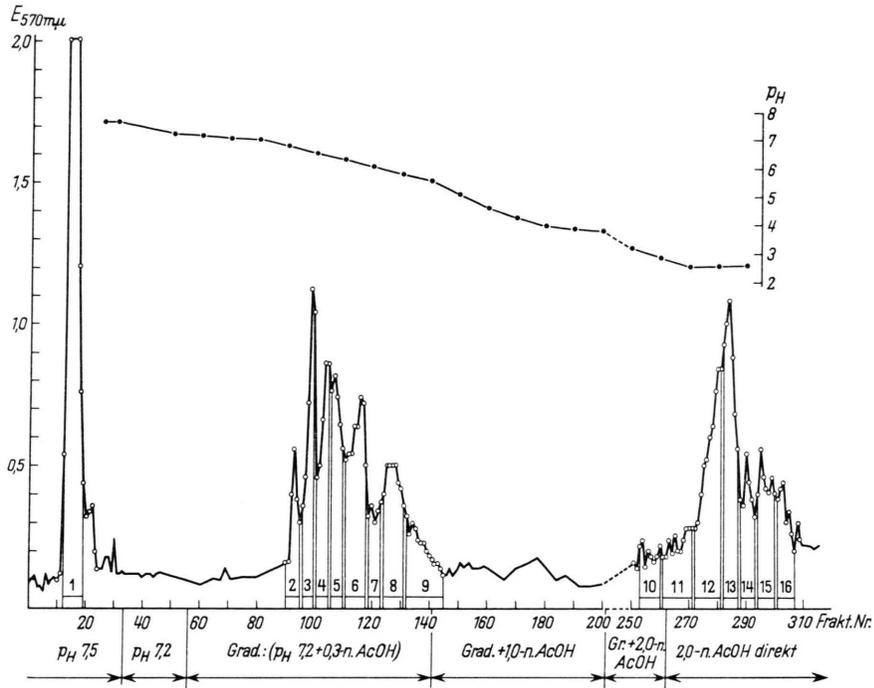


Abb. 2. Chromatographische Fraktionierung der chymotryptischen Partialpeptide aus DT_I (1–41) über Dowex 1 × 2. Darstellung: DT_I von 3 g *dahlemense*, 3-mal umgefällt; Reinigung über Sephadex G-25 (vgl. Text, 12 Chargen), Reduktion mit Mercaptoäthanol und Alkylierung mit Jodacetamid (in 2 Portionen) (vgl. Text). Chymotrypsinspaltung: Jede Portion mit 2,5 mg Chymotrypsin, bei pH 7,8 4 Std., 36 °C. Säule: 150 · 1,5 cm, Zimmertemperatur. Durchflußgeschwindigkeit: 4 Fraktionen à 8 ml/Stunde. Extinktion bei 570 m μ nach alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinfärbung (0,5 ml je Fraktion). 1. Pufferlösung: 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, pH 7,5, 2. Pufferlösung: 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, pH 7,2, 3. Pufferlösung: Gradient mit 1000 ml pH 7,2-Puffer und 0,3-n. AcOH, 4. Pufferlösung: Gradient mit 1,0-n. AcOH, 5. Pufferlösung: Gradient mit 2,0-n. AcOH, 6. Pufferlösung: 2,0-n. AcOH direkt.

Gipfel 1 enthielt Peptid C₁ (36–41) und C₂ (39–41); Gipfel 2 und 3 enthielten Peptid C₃ (36–38); Gipfel 4 enthielt Peptid C₃ und C₄₋₁ (32–35); Gipfel 5 enthielt Peptid C₄₋₁, C₄₋₂ (32–38), C₅₋₁ (25–27) und C_{5-2a}+C_{5-2b} (25/27–35); Gipfel 6 enthielt Peptid C_{5-2a} und C_{5-2b} und C₆ (3–10); Gipfel 7 enthielt Peptid C₆, C₇₋₁ (11–13) und C₇₋₂ (11–12); Gipfel 8 enthielt Peptid C_{8-1a} (28–35), C_{8-1b} (29/30–35), C_{8-1c} (30–35) und C₈₋₂ (28–31); Gipfel 9 enthielt Peptid C₉ (1–2); Gipfel 10, 11 und 12 enthielten Peptid C₁₂₋₁ (14–17) und C₁₂₋₂ (18–24); Gipfel 13 enthielt Peptid C₁₂₋₁, C₁₂₋₂, C₁₃₋₁ (18–19) und C₁₄₋₃ (11–17); Gipfel 14 enthielt Peptid C₁₂₋₁, C₁₄₋₂ (13–17) und C₁₄₋₃; Gipfel 15 enthielt Peptid C₁₅ (1–10).

tig in der Fraktion enthaltenen Peptid C₁₂₋₁ (14 bis 17) getrennt (Säule 40 · 1,2 cm, Zimmertemperatur, Durchflußgeschwindigkeit 4 Fraktionen à 6 ml/Stde., Extinktion bei 570 m μ nach alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion von 0,6 ml je Fraktion, Pufferlösungen: 1. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, pH 7,2, 2. Gradient mit 500 ml pH 7,2-Puffer und 2% Pic-1% Lut-Acetat, pH 4).

Die quantitative Analyse aller Partialpeptide erfolgte nach der Methode von Spackman, Stein und Moore wie in Teil I beschrieben. Die erhaltenen Analysenwerte der Chymotrypsinpeptide sind zusammen mit den Analysen der Restpeptide nach Edman-Abbau in Tab. 1 zusammengestellt. Da-

durch ergibt sich folgende Aufstellung, wobei die Säureamidverteilung unberücksichtigt bleibt, die erst am Ende zusammenfassend diskutiert wird. (Alle Partialpeptide wurden in 4 verschiedenen Säulen-chromatogrammen nach wiederholter Alkylierung und Chymotrypsinspaltung in gleicher Zusammensetzung isoliert; die in Tab. 1 angeführten Doppelanalysen entstammen verschiedenen Säulenläufen):

- C₁ Position 36–41: (Thr₁, Glu₃, Ala₁, Arg₁)
Edman-Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von 41% Glu (bzw. nach Rechromatographie des Restpeptids im Pyr-System A 91%).
2. Stufe: Abspaltung von 70% Thr.
Teilsequenz: Glu-Thr-(Glu₂, Ala₁)-Arg₁.

Position	Peptid- bezeichnung	pH ¹	Edman-Abbau Reinigung	Total- hydrolyse 6-n. HCl, 110 °C, 20 Stdn. μ Mol	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ileu	Leu	Tyr ³	Phe	Cys ²	Try ³	Arg ^{3,4}	
25-27	C ₅₋₁	6,6-6,4	—	0.12	0.88	—	—	—	—	—	—	1.00	—	—	—	—	0.58	—	—	
			1. Stufe u. R (Pyr A)	0.04	0.25	—	—	—	—	—	—	—	1.00	—	—	—	—	0.81	—	—
28-31	C ₈₋₂	6,4	—	0.05	—	0.71	2.06	—	—	—	—	—	—	1.00	—	—	—	—	—	
28-35	C _{8-1a}	6,4-6,2	—	0.03 0.22	1.10 1.00	0.41 0.55	2.00 1.92	1.05 0.96	—	1.09 1.04	—	—	—	0.94 1.00	—	0.89 0.95	—	—	—	
29/30-35	C _{8-1b}	6,4-6,2	—	0.10 0.12	1.04 1.00	— 1.41	1.32 1.03	1.02 1.03	—	0.81 0.97	—	—	—	1.00 0.99	—	0.88 0.98	—	—	—	
			1. Stufe	0.16	1.00	—	1.04	1.09	—	1.01	—	—	—	0.97	—	0.97	—	—	—	
30-35	C _{8-1c}	6,4-6,2	—	0.06	1.00	—	1.12	0.89	—	0.91	—	—	—	1.10	—	1.15	—	—	—	
32-35	C ₄₋₁	6,5	—	0.28	0.97	—	—	1.03	—	0.92	—	—	—	—	—	1.03	—	—	—	
			—	0.46	1.04	—	—	1.12	—	0.88	—	—	—	—	—	—	1.00	—	—	—
			1. Stufe 2. Stufe	0.41 0.51	0.98 0.65	— —	— —	0.91 1.12	— —	0.39 0.33	— —	— —	— —	— —	— —	— —	1.03 1.00	— —	— —	— —
25-35	C _{8-2a}	6,6-6,4	—	0.06 0.03	1.47 1.55 2	0.89 0.79 1	1.68 1.92 2	1.09 1.14 1	—	1.18 1.32 1	—	0.82 1.00 1	—	1.01 1.00 1	—	0.87 0.89 1	0.56 0.68 1	—	—	
26-35	C _{8-2b}	6,6-6,4	—	0.07	1.07 1	0.71 1	1.91 2	0.93 1	—	1.10 1	—	0.58 1	—	1.00 1	—	0.77 1	0.24 1	—	—	
18-35	C ₁₆₋₁	3,2-2,7	—	0.06	2.09 2-3	0.99 1	1.97 2	1.81 2	1.10 1	1.10 1	0.78 1	1.02 1	0.89 1	2.66 3	—	0.82 1	0.61 1	—	—	
14-35	C ₁₆₋₂	3,2-2,7	—	0.08 0.03 (40 Stdn.)	2.58 2.52 3	1.17 0.98 1	3.45 2.26 4	1.93 2.08 2	0.93 1.25 1	1.02 1.00 1	1.08 1.02 1	1.56 1.80 2	0.88 1.06 1	3.00 2.93 3	—	0.93 0.96 1	0.37 0.65 1	+	—	
36-38	C ₃	6,8-6,6	—	0.31	—	1.00	—	1.88	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
			R (Pyr A)	0.22	—	1.00	—	2.04	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
			1. Stufe 2. Stufe	0.31 0.07	— —	1.00 0.65	— —	1.41 1.66	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
32-38	C ₄₋₂	6,6	—	0.13	1.00	1.02	—	3.01	—	0.91	—	—	—	—	1.02	—	—	—		
39-41	C ₂	8,2	—	0.03	—	—	—	1 0.25	—	—	1 1.00	—	—	—	—	—	—	—	+	
36-41	C ₁	8,2	—	0.31 0.52	— —	1.00 0.97	— —	2.99 2.83	— —	— —	1.00 1.00	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	+
			R (Pyr A) u. 1. Stufe	0.04	—	0.86	—	2.58	—	—	1.00	—	—	—	—	—	—	—	—	+
			1. Stufe u. R	0.05	—	0.94	—	2.08	—	—	1.00	—	—	—	—	—	—	—	—	+
			R (Pyr A) u. 2. Stufe	0.07	—	0.28	—	2.09	—	—	1.00	—	—	—	—	—	—	—	—	+

Tab. 1 b. Tab. 1 a u. 1 b. Analysendaten der Chymotrypsin-Peptide aus DT₁ (1-41).

Zeichenerklärung: ¹ Angegeben ist der pH-Wert der Elutions-Pufferlösung, mit dem das betreffende Peptid bei den einzelnen Fraktionierungen an Dowex 1 isoliert wurde. ² Bestimmung als S-Carboxymethylcystein. ³ Die Anwesenheit (+) der Aminosäure oder ihr Fehlen (-) wurde durch Sprühreaktion des Peptides am Papier bewiesen. ⁴ Anwesenheit von Arginin wurde außerdem durch 1-D-Chromatographie von 1/10 des Totalhydrolysates in BEW (3:1:1) nachgewiesen. R Bedeutet Rechromatographie des Peptides am Papier in Pyridin-System A (vgl. Teil I) bzw. an der Säule (Dowex 1). Keine Rechromatographie (keine R): Kein in dieser Stufe zusätzlicher Reinigungsschritt. Die angegebenen Doppelanalysen entstammen einer wiederholten enzymatischen Hydrolyse und Fraktionierung.

- C₂ Position 39–41: (Glu₁, Ala₁, Arg₁)
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von 75% Glu.
Teilsequenz: Glu-Ala-Arg.
- C₃ Position 36–38: (Thr₁, Glu₂)
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von 53% Glu.
2. Stufe: (nach Rechromatographie des Restpeptids im Pyr-System A) Abspaltung von 35% Thr.
Teilsequenz: Glu-Thr-Glu.
- C₄₋₁ Position 32–35: (Asp₁, Glu₁, Gly₁, Phe₁)
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von 61% Gly.
2. Stufe: Abspaltung von 35% Asp.
C-ase-Behandlung: Mit 50 γ C-ase A wurden folgende Aminosäuren abgespalten (p_H 7,8, 1 Stde., 36°):
GluNH₂: 0,015 μ Mol, Phe 0,11 μ Mol.
Teilsequenz: Gly-Asp-Glu-Phe.
- C₄₋₂ Position 32–38: (Asp₁, Thr₁, Glu₃, Gly₁, Phe₁).
- C₅₋₁ Position 25–27: (Asp₁, Val₁, CAM·cys₁ *).
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe (nach Rechromatographie des Restpeptids in Pyr-System A): Abspaltung von 75% Asp.
Teilsequenz: Asp-(Val₁, CAM·cys₁).
- C_{5-2a} Position 25–35: (Asp₁₋₂, Thr₁, Ser₂, Glu₁, Gly₁, Val₁, Leu₁, Phe₁, CAM·cys₁).
- C_{5-2b} Position 26–35: (Asp₁, Thr₁, Ser₂, Glu₁, Gly₁, Val₁, Leu₁, Phe₁, CAM·cys₁).
- Subtilisinspaltung von C₅₋₂ und C₅₋₃:
3 Stdn. bei p_H 7,8 mit 800 γ Subtilisin „Novo“** und 36 °C. Fraktionierung der Partialpeptide über Dowex 1 \times 2 (Säule 30 \cdot 1,5 cm; Durchflußgeschwindigkeit 4 Fraktionen à 6 ml/Stde.; Extinktion bei 570 m μ nach alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion von 0,6 ml je Fraktion; Pufferlösungen:
1. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat p_H 7,5,
2. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat p_H 7,2,
3. Gradient mit 1000 ml p_H 7,2-Puffer und 0,075-n. AcOH.
Nach Papierchromatographie (Pyr-System A) wurden folgende Bruchstücke erhalten:
S₂ (32–35) Asp 0,98, Glu 1,08, Gly 0,85, Phe 1,00.
S₄ (30–31) Ser 1,02, Leu 1,00.
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von Ser.
S₅ (30–33) Asp 0,99, Ser 0,95, Gly 1,00, Leu 1,00.
E d m a n - Abbau:
1. Stufe: Abspaltung von Ser zu 63 Prozent.
S₇ (28–31) Thr 0,91, Ser 2,04, Leu 1,00.
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von 73% Thr.
- S₉ (34–35) Glu₁, Phe₁ (Analyse qualitativ durchgeführt).
- S₃ (25–27) (Analyse qualitativ durchgeführt).
- C₆ Position 3–10: (Thr₁, Ser₃, Glu₁, Pro₁, Ileu₁, Phe₁).
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode, zweifache Durchführung):
1. Stufe: (nach Rechromatographie des Restpeptids im Pyr-System A) Abspaltung eines Ser-Restes, Verminderung des Ileu-Wertes um 21 Prozent.
2. Stufe: Verminderung des Ileu um weitere 74% (bzw. 75%). Abnahme des Thr um 32 Prozent.
3. Stufe: (nach Rechromatographie des Restpeptids im Pyr-System A) Abspaltung von Thr um weitere 29% (bzw. 41%).
4. Stufe: Verminderung des Ser-Wertes um 27% (bzw. 33%).
5. Stufe: Abnahme des zweiten im Peptid enthaltenen Ser-Restes um insgesamt 42% (bzw. 32%); Abnahme des Pro um insgesamt 12% (bzw. 22%).
6. Weiteres Absinken des Pro-Wertes.
C-ase-Behandlung: Abspaltung mit 50 γ C-ase A (1 Stde., 36 °C, p_H 7,8) von Phe (qualitativer Test).
Teilsequenz: Ser-Ileu-Thr-Ser-Pro-(Ser₁, Glu₁)-Phe.
- C₁₅ Position 1–10: (Thr₁, Ser₄, Glu₁, Pro₁, Ileu₁, Tyr₁, Phe₁).
C-ase-Behandlung: Abspaltung mit 50 γ C-ase A + 69 γ C-ase B (p_H 7,8, 1 Stde., 36 °C) von folgenden Aminosäuren:
GluNH₂: 0,032 μ Mol,
Phe: 0,062 μ Mol.
Teilsequenz: Acetyl-Ser-Tyr-(Thr₁, Ser₃, Pro₁, Ileu₁)-GluNH₂-Phe.
- C₉ Position 1–2: (Ser₁, Tyr₁).
Teilsequenz: Ser-Tyr.
- C₇₋₁ Position 11–13: (Val₁, Leu₁, Phe₁).
- C₇₋₂ Position 11–12: (Val₁, Phe₁).
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von Val (Phe qualitativ nachgewiesen).
- C₁₂₋₁ Position 14–17: (Ser₂, Val₁, Try₁).
- C₁₄₋₂ Position 13–17: (Ser₂, Val₁, Leu₁, Try₁).
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von 67% Leu.
2. Stufe: Abspaltung von 24% Ser, Try teilweise zerstört.
Teilsequenz: Leu-Ser(Ser₁, Val₁, Try₁).
- C₁₄₋₃ Position 11–17: (Ser₂, Val₂, Leu₁, Phe₁, Try₁).
E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):

* CAM·cys bedeutet S-Carbamidomethyl-cystein (im Totalhydrolysat quantitativ nach der Methode von SPACKMAN, STEIN und MOORE bestimmt als S-Carboxymethyl-cystein).

** Herrn Dr. M. OTTESEN, Carlsberg Laboratorien, Kopenhagen, danken wir sehr für dieses Enzympräparat.

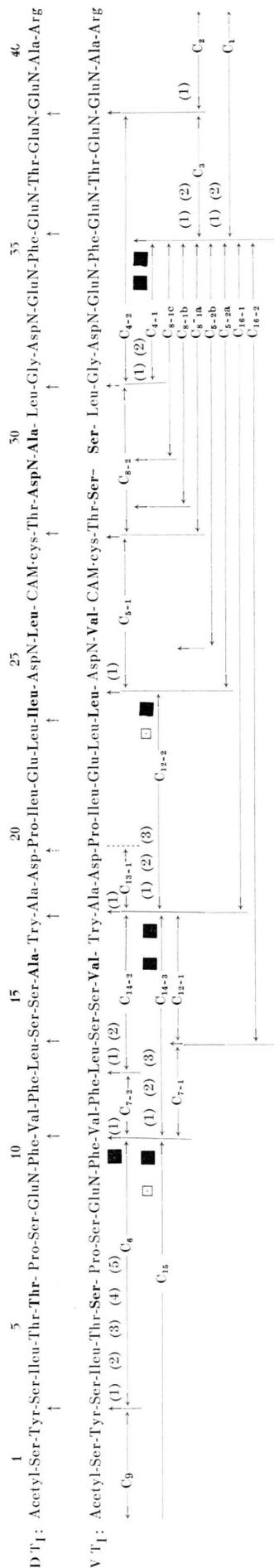
1. Stufe: Abspaltung eines der beiden *Val*-Reste, Verminderung des Phe-Wertes um 46 Prozent.
 2. Stufe: Abnahme des Phe-Wertes um insgesamt 55 Prozent.
 3. Stufe: Abspaltung von 40% Leu, Try teilweise zerstört.
- C-ase-Behandlung: Mit 50 γ C-ase A (36 °C, pH 7,8) wurde nach 15 min *Try* abgespalten (qualitativer Nachweis), nach 1 Stde. außerdem folgende Aminosäuren:
 Val 0,136 μ Mol, Leu 0,044 μ Mol, Ser 0,079 μ Mol.

- C_{8-1a}** Teilsequenz: Val-Phe-Leu-Ser-Ser-Val-Try.
 Position 28 – 35: (Asp₁, Thr₁, Ser₂, Glu₁, Gly₁, Leu₁, Phe₁).
 E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
 1. Stufe: Abspaltung von 39% Ser.
- C_{8-1b}** Position 29/30 – 35: (Asp₁, Ser₁₋₂, Glu₁, Gly₁, Leu₁, Phe₁).
 E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
 1. Stufe: Abnahme des Ser-Wertes auf 1 Rest/Mol.
- C_{8-1c}** Position 30 – 35: (Asp₁, Ser₁, Glu₁, Gly₁, Leu₁, Phe₁).
- C₈₋₂** Position 28 – 31: (Thr₁, Ser₂, Leu₁).
- C₁₃₋₁** Position 18 – 19: (Asp₁, Ala₁).
 E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
 1. Stufe: Abspaltung von Ala zu 53 Prozent.
- C₁₂₋₂** Position 18 – 24: (Asp₁, Glu₁, Pro₁, Ala₁, Ileu₁, Leu₂).
 E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):
 1. Stufe: Abspaltung von Ala zu 45 Prozent.
 2. Stufe: Abspaltung von Asp zu 19 Prozent.
 3. Stufe: Abspaltung von Pro zu 17,2 Prozent.
 C-ase Behandlung:
 C-ase A: Mit 75 γ C-ase A (3 Stdn. bei pH 7,8, 36 °C) wurde nur Leu abgespalten.
 C-ase A + B: Mit 75 γ C-ase A und 120 γ C-ase B (2 Stdn. bei pH 7,8, 36 °C) war ebenfalls nur Leu (0,072 μ Mol) nachweisbar.
 Teilsequenz: Ala-Asp-Pro-(Ileu-Glu)-Leu-Leu.

Zuordnung

Das C-terminale Peptidende von DT₁ (32 – 41)

DT₁ enthält nur einen basischen Aminosäurerest, nämlich Arginin. Dieser muß wegen der Spezifität von Trypsin daher die letzte Position im tryptischen Peptid einnehmen. Aufschluß über die übrigen C-terminalen Sequenzen von DT₁ geben die beiden Arginin-haltigen, chymotryptischen Partialpeptide C₂ (1 Glu, 1 Ala, 1 Arg), Position 39 – 41, und C₁ mit 6 Aminosäureresten (36 – 41). Peptid C₂ enthält die Teilsequenz Glu-Ala-Arg, wie durch E d m a n - Abbau bewiesen werden konnte. Im Chymotrypsinpeptid C₁ sind neben den Aminosäuren von C₂ noch



Zeichenerklärung: E d m a n - Abbau I. Stufe: (1), 2. Stufe: (2) etc. Carboxypeptidase-Behandlung: C-ase A: □, C-ase B: ■. CAM · cys bedeutet S-Carbamidomethyl-Cystein.
 Abb. 3. Vergleich von *vulgare* T₁ (1–41) und *dahlemense* T₁ (1–41): Chymotryptische Partialpeptide.

zwei weitere Glutaminsäure- und ein Threoninrest enthalten. Diesen Aminosäuren sind daher die Positionen 36–38 zuzuordnen. Da außer an dieser Stelle dieselben Aminosäuren im DT_I nicht benachbart vorkommen (vgl. die Übersicht, Abb. 3), entspricht Peptid C_3 (2 Glu, 1 Thr) diesen Positionen, was in Einklang mit der Aminosäureverteilung in C_1 steht. Die Sequenz Glu-Thr-Glu wurde durch zweimaligen Edman-Abbau sowohl an Peptid C_1 als auch an C_3 bewiesen.

Zur Festlegung der Aminosäureverteilung in den Positionen 32–35 war die Isolierung des glutaminsäurereichen, chymotryptischen Partialpeptides C_{4-2} wertvoll, das einmal bei den Fraktionierungen des chymotryptischen Partialpeptid-Gemisches gewonnen werden konnte. Es enthielt 7 Aminosäurereste, darunter dreimal Glutaminsäure. Da im tryptischen Gesamtpeptid DT_I außer den Glutaminsäureresten in den besprochenen Positionen 36, 38 und 39 nur noch drei weitere Glutaminsäurereste enthalten sind, die jedoch nicht in Nachbarschaft zueinander stehen (vgl. unten), kommen im Peptid C_{4-2} mindestens zwei Glutaminsäurereste den Positionen 36 und 38 zu. Der dritte Glutaminsäurerest könnte Position 39 entsprechen. Man kann sich jedoch Peptid C_{4-2} in zwei Teilbereiche zerlegt denken: Es setzt sich aus den Aminosäureresten von Chymotrypsinpeptid C_{4-1} (1 Asp, 1 Glu, 1 Gly, 1 Phe) und denjenigen von C_3 zusammen. Damit entsprechen den Positionen 32–35 die Aminosäuren von C_{4-1} . Die Teilfolge Gly-Asp-Glu-Phe in diesem Partialpeptid ergab sich einerseits durch zweimaligen Edman-Abbau, andererseits dadurch, daß Phenylalanin neben wenig Glutamin mit Carboxypeptidase A vom C-terminalen Peptidende abgespalten wurde.

Die Aminosäurefolge der Positionen 32–41 lautet daher zusammenfassend: *Gly-Asp-Glu-Phe-Glu-Thr-Glu-Glu-Ala-Arg*. (Säureamidverteilung vgl. Schluß.)

Die N-terminalen Sequenzen von DT_I (1–10)

Der Nachweis, daß das N-terminale Ende acetyliert ist, erfolgte nach der für das vulgare angegebene Methode¹² durch Chymotrypsinspaltung des Peptids DT_I , Chromatographie auf Dowex 50 und Analyse des im ersten Gipfel enthaltenen Partialpeptids (*N*-Acetyl-Ser-Tyr). — Da Tyrosin nur einmal

im Peptid DT_I enthalten ist, gibt das isolierte tyrosinhaltige Chymotrypsinpeptid C_{15} (mit 10 Aminosäuren) Aufschluß über die N-terminale Aminosäurefolge in DT_I . C_{15} (Position 1–10) gliedert sich in Teilabschnitt C_9 (1 Ser, 1 Tyr), Position 1 bis 2, und C_6 mit 8 Aminosäureresten, dem daher Position 3–10 zukommt. Durch Carboxypeptidase-Behandlung wurde sowohl an C_6 als auch an C_{15} C-terminales Phenylalanin festgestellt; den Platz davor nimmt Glutamin ein. An dem säulenchromatographisch gereinigten C_6 , das am Papier rechromatographiert worden war, wurden wiederholt mehrstufige Abbauschritte nach Edman ausgeführt, die übereinstimmend folgendes Ergebnis hatten: Zunächst wurde Serin vom N-terminalen Peptidende abgespalten, anschließend Isoleucin und Threonin. Im weiteren Verlauf der Edman-Stufen verminderte sich der Wert der restlichen zwei im Molekül enthaltenen Serinreste auf 1,58 (bzw. 1,68) Reste/Mol, wogegen der Wert des einen Prolinrestes im Peptid zur gleichen Zeit auf 0,88 (bzw. 0,78) Reste/Mol abgesunken war und sich erst beim nachfolgenden Abbauschritt verringerte.

Aus den durchgeführten Versuchen ergab sich folgende Sequenz in den Positionen 1–10: *Acetyl-Ser-Tyr-Ser-Ileu-Thr-Ser-Pro-Ser-GluNH₂-Phe*.

Die mittleren Teilsequenzen von DT_I (11–31)

Nach Ermittlung der Aminosäureverteilung in den Positionen 1–10 und 32–41 bleiben laut Bruttozusammensetzung für den mittleren Teilbereich (11–31) von DT_I noch 21 Aminosäurereste übrig (2 Asp, 1 Thr, 4 Ser, 1 Glu, 1 Pro, 1 Ala, 3 Val, 1 Ileu, 4 Leu, 1 Phe, 1 Cys, 1 Try). Diese sind zusammen in 4 chymotryptischen Partialpeptiden enthalten:

Peptid C_{14-3} (2 Ser, 2 Val, 1 Leu, 1 Phe, 1 Try),
 Peptid C_{12-2} (1 Asp, 1 Glu, 1 Pro, 1 Ala, 1 Ileu,
 2 Leu),
 Peptid C_{5-1} (1 Asp, 1 Val, 1 CAM·cys),
 Peptid C_{8-2} (1 Thr, 2 Ser, 1 Leu).

Sie stellen gemeinsam mit den oben erwähnten Peptiden C_9 , C_6 , C_{4-1} und C_1 die Hauptspaltprodukte bei der enzymatischen Hydrolyse mit Chymotrypsin (Präparat 1, CDC) dar. Ihre Zuordnung ergab sich durch Vergleich einiger größerer Peptidbruchstücke, die in geringerer Ausbeute bei den durchgeführten Säulenläufen anfielen. Hierbei waren besonders die isolierten Glycin-haltigen Brückenpeptide wertvoll, da Glycin nur einmal im trypti-

¹² K. NARITA, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **28**, 184; **30**, 352 [1958].

schen DT₁ in Position 32 enthalten ist. So setzen sich die nach der Chymotrypsinspaltung aus Gipfel 8 isolierten Partialpeptide aus dem Sequenzbereich 32 bis 35 und zwei bis vier Positionen davor zusammen:

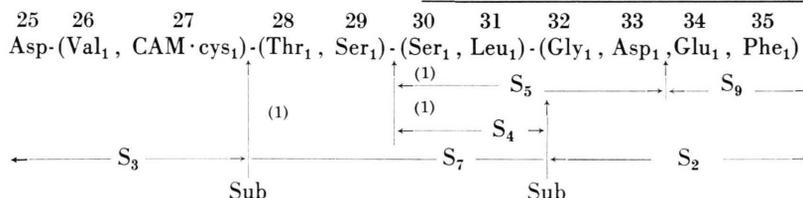
- C_{8-1c} = (Ser₁, Leu₁)-(Gly₁, Asp₁, Glu₁, Phe₁),
Position 30–35,
- C_{8-1a} = (Thr₁, Ser₂, Leu₁)-(Gly₁, Asp₁, Glu₁,
Phe₁), Position 28–35,
- C_{8-1b} = (Ser₁₋₂, Leu₁)-(Gly₁, Asp₁, Glu₁, Phe₁),
Position 29/30–35,
- C₈₋₂ (mit 1 Thr, 2 Ser und 1 Leu) ist daher Position
28–31 zuzuordnen.

Im Vergleich mit den Peptiden der C₈-Gruppe lassen sich die Brückenpeptide, die aus Gipfel 5 erhalten wurden, in folgende Teilbereiche gliedern:

- C_{5-2a} (11 Reste): (Asp₁, Val₁, CAM·cys₁)-(Thr₁,
Ser₂, Leu₁)-(Gly₁, Asp₁, Glu₁, Phe₁), Posi-
tion 25–35,
- C_{5-2b} (10 Reste): (Val₁, CAM·cys₁)-(Thr₁, Ser₂,
Leu₁)-(Gly₁, Asp₁, Glu₁, Phe₁), Position
26–35,

so daß Chymotrypsinpeptid C₅₋₁ (1 Asp, 1 Val, 1 CAM·cys), Position 25–27 entspricht.

Die Peptide der C₅₋₂-Bande wurden gemeinsam mit Subtilisin nachgespalten (vgl. vorigen Abschnitt); die dabei erhaltenen Partialpeptide lassen sich folgendermaßen zuordnen:



Subtilisinpeptid S₄ enthielt die Sequenz Ser-Leu und S₇ N-terminal Threonin, wie aus der Restpeptidanalyse nach E d m a n - Abbau dieser Partialpeptide hervorging. Das Ergebnis Thr-Ser-Ser-Leu für Position 28–31 steht im Einklang mit der Isolierung der C₈-Peptide und dem Absinken des Ser-Wertes nach E d m a n - Abbau von C_{8-1b}. Die Aminosäurefolge in Position 25–27 sollte N-terminal mit Asparaginsäure beginnen, wie aus dem Vergleich der Analysenwerte von C_{5-2a} und C_{5-2b} hervorgeht. E d m a n - Abbau von Peptid C₅₋₁ ergab entsprechend das Restdipeptid Val-S-carbamidomethylcys.

Die Folge der Aminosäuren für die Position 25 bis 31 ist dadurch festgelegt: Asp-Val-Cys-Thr-Ser-Ser-Leu.

Die Zuordnung der übrigen chymotryptischen Peptide ergab sich durch Analyse von zwei weiteren ebenfalls Glycin-haltigen Brückenpeptiden (vgl. Tab. 1):

1. C₁₆₋₁ enthielt Prolin und Isoleucin, jedoch nicht Tryptophan. Seine Bruttozusammensetzung ergibt sich durch Kombination der Aminosäuren von Position 25–35 mit C₁₂₋₂. Das letztgenannte Chymotrypsinpeptid enthält daher die Aminosäuren aus den Positionen 18–24.

2. C₁₆₋₂ unterschied sich von C₁₆₋₁ durch einen weiteren Valinrest, zwei weitere Serinreste und ein Tryptophan; diese Aminosäuren sind daher den

Positionen 14–17 zuzuordnen. Entsprechend dieser Verteilung muß Peptid C₁₄₋₃ (2 Ser, 2 Val, 1 Leu, 1 Phe, 1 Try) Position 11–17 entsprechen; seine Aminosäuren müssen daher folgendermaßen gruppiert sein: (Val₁, Leu₁, Phe₁)-(Ser₂, Val₁, Try₁). In Versuchen mit Carboxypeptidase A wurde von C₁₄₋₃ C-terminales Tryptophan abgespalten, außerdem Valin und in geringerem Maße Serin und Leucin. Stufenweiser E d m a n - Abbau ergab in C₁₄₋₃ N-terminal die Reihenfolge Val-Phe-Leu. Der Befund Leucin hinter Phenylalanin wurde gestützt durch die Isolierung der Peptidpaare C₇₋₂ (1 Val, 1 Phe) und C₁₄₋₂ (2 Ser, 1 Val, 1 Leu, 1 Try) bzw. C₇₋₁ (1 Val, 1 Phe, 1 Leu) und C₁₂₋₁ (2 Ser, 1 Val, 1 Try), wobei durch E d m a n - Abbau bewiesen wurde, daß in C₁₄₋₂ N-terminal Leucin steht, dem Serin folgt. Die Sequenz der Positionen 11–17 lautet daher: Val-Phe-Leu-Ser-Ser-Val-Try.

Die Ermittlung der Aminosäurefolge in Position 18–24 wurde an C₁₂₋₂ (1 Asp, 1 Glu, 1 Pro, 1 Ala, 1 Ileu, 2 Leu) durchgeführt. Durch E d m a n - Abbau wurde N-terminal Alanin abgespalten; im weiteren Verlauf der E d m a n - Stufen verminderte sich die Asparaginsäure und der Prolinwert bei der Restpeptidanalyse. Für die Sequenz Ala-Asp-Pro... spricht auch die Isolierung des vermutlich durch unspezifische Hydrolyse in geringem Maße gebildeten Dipeptids Ala-Asp (Peptid C₁₃₋₁), dessen Aminosäureverteilung durch E d m a n - Abbau ermittelt

wurde. Durch Carboxypeptidase A und B wurde von C_{12-2} nur Leucin abgespalten. Damit ist die Sequenz Ileu-Glu-Leu-Leu sehr wahrscheinlich gemacht, denn bei einer Reihenfolge Glu-Ileu-Leu-Leu oder Leu-Glu-Ileu-Leu bzw. Glu-Leu-Ileu-Leu müßte in jedem Fall Isoleucin von der Exopeptidase mitabgespalten worden sein. Der Austausch Leucin an Stelle von Isoleucin in Position 24 bei Gegenüberstellung von *vulgare* T_I und *dahlemense* T_I erklärt zudem, weshalb Chymotrypsin in DT_I die Peptidbindung in Position 24/25 hydrolysiert, während das gleiche Enzympräparat die homologe *vulgare*-Sequenz zwischen Position 23 und 24 spaltet trotz gleicher Besetzung der Position 25 mit Asparagin; eine Veränderung Leucin an Stelle von Isoleucin in Position 21 dagegen dürfte auf die chymotryptische Hydrolyse wegen der unmittelbaren Nachbarschaft des Prolin-Restes keinen Einfluß haben.

Die Aminosäuren in den Positionen 18–24 haben daher bzw. in Analogie zu *vulgare* folgende Reihenfolge: *Ala-Asp-Pro-Ileu-Glu-Leu-Leu*.

Säureamidverteilung

DT_I enthält in Position 9 einen Glutaminrest wie bei *vulgare*. Das diesen Rest enthaltende Partialpeptid $C_6(3-10)$ wurde stets als Neutralpeptid isoliert. Daß $C_{15}(1-10)$ in den sauren Peptidfraktionen enthalten ist, ist auf die Acetylierung des Serins, mit dem C_{15} beginnt, zurückzuführen. Das Peptid reagiert nicht mit Ninhydrinlösung, dagegen mit Chlorreagenz.

Durch Carboxypeptidase-Behandlung wurde aus C_{15} Glutamin in Freiheit gesetzt. Der Asparaginsäure-Rest in Position 19 ist ebenso wie bei *vulgare* nicht amidiert, denn die Peptide C_{12-2} (18 bis 24) und C_{13-1} (18–19) sind auf Grund ihres Verhaltens an Dowex 1 sauer. Der gleichzeitig in C_{12-2} enthaltene Glutaminsäure-Rest dürfte wie im *vulgare* in freier Form vorliegen, obwohl hierfür ein Beweis fehlt. Jedoch war es nicht möglich, zu dem in sehr geringer Ausbeute gebildeten Dipeptid C_{13-1} das passende Peptidbruchstück mit der Sequenz Pro-Ileu-Glu-Leu-Leu an Dowex 1 zu isolieren trotz Sichtbarmachung der Peptide nach der Fraktionierung mit Ninhydrin nach alkalischer Hydrolyse. Da das Teilpeptid nur in sehr geringer Ausbeute entstanden ist, kann es bei Vorliegen von freier Säure in Position 22 leicht durch starke Adsorp-

tion am Ionenaustauscher verlorengegangen sein. Position 25 enthält Asparagin, da sich das entsprechende Partialpeptid C_{5-1} (25–27) neutral verhielt. Auch der Asparaginsäure-Rest in Position 33 und die Glutaminsäure-Reste in Position 34, 36 und 38 liegen amidiert vor, da Peptid C_{4-1} (32–35) ebenso wie C_3 (36–38) und Peptid C_{4-2} (32–38), welches alle diese vier Reste enthält, als Neutralpeptide isoliert wurden. Die Glutaminsäure in Position 39 kann ebenso wie bei *vulgare* nicht in freier Form bei *dahlemense* enthalten sein; denn das entsprechende Partialpeptid C_2 (39–41) verhielt sich basisch, was durch gleichzeitig enthaltenes Arginin bedingt ist.

Die angegebene Säureamidverteilung steht in Einklang mit den übrigen isolierten chymotryptischen Partialpeptiden: dem basischen Peptid C_1 (36 bis 41), das ebenfalls Arginin enthielt; den neutralen Brückenpeptiden C_{5-2a} und C_{5-2b} (Position 25 bis 35) und den aus den sauren Fraktionen erhaltenen Brückenpeptiden C_{16-1} (18–35) und C_{16-2} (14–35), die beide neben den neutralen Aminosäure-Resten von C_{5-2a} noch die saure Teilsequenz (18–24) enthielten.

Zusammenfassung: Ein Vergleich der Bruttozusammensetzung der homologen tryptischen Peptide Nr. I von *vulgare*¹³ und *dahlemense* (vgl. Übersicht, Abb. 3) macht zunächst nur 5 Unterschiede sichtbar:



Demgegenüber wurde durch die Sequenzanalyse ersichtlich, daß die Veränderung von Leucin, das an Unterschieden in zwei Positionen (24 und 26) beteiligt ist, sich in der Bruttozusammensetzung kompensiert. Im Peptid I kommen also folgende Aminosäure-Unterschiede vor:

Thr	ist ersetzt durch Ser	in Position 6,
Ala	ist ersetzt durch Val	in Position 16,
Ileu	ist ersetzt durch Leu	in Position 24,
Leu	ist ersetzt durch Val	in Position 26,
AspNH ₂	ist ersetzt durch Ser	in Position 29,
Ala	ist ersetzt durch Ser	in Position 30.

Während in dem Bereich 24–30 mit 7 Aminosäuren 4 Unterschiede, 2 davon unmittelbar benachbart, vorkommen, ist der Bereich von Position 31 ab mit

¹³ F. A. ANDERER, H. UHLIG, E. WEBER u. G. SCHRAMM, *Nature* [London] **186**, 922 [1960]; A. TSUGITA, D. T. GISH, J. YOUNG, H. FRAENKEL-CONRAT, C. A. KNIGHT u. W. M. STANLEY, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **46**, 1436 [1960]; F. A. ANDERER, *Z. Naturforschg.* **17b**, 526 [1962]; C. A. KNIGHT, *Protoplasmatologia* **IV**, 59 [1963].

11 Aminosäuren bei *vulgare* und *dahlemense* völlig unverändert. Eine ähnliche Verteilung der Aminosäureaustausche über das Peptid I ergibt sich auch bei den bisher lokalisierten Austauschern der chemisch induzierten Mutanten. Die Säureamidverteilung der Asparaginsäure- und Glutaminsäurereste im Peptid I stimmt bei *vulgare* und *dahlemense* überein; der Unterschied in Position 29 (AspNH₂/Ser) ändert nichts an der Ladung des Peptides.

Sequenzanalyse von DT_(XI+XII)
(135–158)

Dieses tryptische *dahlemense*-Peptid entspricht in seiner Länge infolge des ausgetauschten Argininrestes in Position 141 den beiden tryptischen *vulgare*-Peptiden VT_{XI} (135–141) und VT_{XII} (142 bis 158). Die Ermittlung seiner Aminosäurefolge wurde an Hand der Chymotrypsin- und Subtilisin-Partialpeptide vorgenommen. Außerdem wurde der N-terminale Peptidbereich durch stufenweisen Edman-Abbau von DT_(XI+XII) und sein C-terminales Peptidende durch Versuche mit Carboxypeptidase am intakten Virus aufgeklärt.

Darstellung des Peptides: Das durch Chromatographie an Dowex 1 aus dem tryptischen Hydrolysat gewonnene Peptid (vgl. Teil I, Abb. 1) ist verunreinigt durch das *dahlemense*-Peptid DT_{VI}, da beide Peptide infolge der veränderten Sequenz schwieriger voneinander zu trennen sind als die entsprechenden *vulgare*-Peptide. Versuche, diese Peptide über Dowex 50, Se-Sephadex und Phosphozellulose zu tren-

nen, führten wegen der schlechten Löslichkeit dieser sauren Peptide im sauren p_H-Bereich nicht zum gewünschten Erfolg. Dagegen erhielt man bei Rechromatographie beider Peptide über Dowex 1×2 bei Anwendung von Elutionspufferlösungen mit Gradienten im p_H-Bereich von 5,5 bis 4 reine Produkte in guter Ausbeute [Rohpeptid, gesammelt aus 2 tryptischen Säulenläufen; Säule 30·2 cm, 35 °C; Durchflußgeschwindigkeit 4 Fr. à 10 ml/Stde.; Extinktion bei 570 m μ nach alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion von 0,5 ml je Fraktion; Pufferlösungen: 1. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, p_H 7,5; 2. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, p_H 7,2; 3. Gradient mit 500 ml p_H 7,2-Puffer und 2% Pyr-2% Pic-2% Lut-Acetat, p_H 5,5; 4. Gradient mit 3% Pyr-3% Pic-3% Lut-Acetat, p_H 4; 5. Gradient mit 2-n. AcOH; 6. 2-n. AcOH direkt].

Chymotrypsinspaltung

DT_(XI+XII) wurde nach wiederholtem Abdampfen der Elutionsmittel mit Wasser durch Titration der wäßrigen Suspension auf p_H 9–10 mit Natronlauge in Lösung gebracht und sofort auf p_H 7,8 zurücktitriert. Nach der chymotryptischen Spaltung (mit 2,5 mg Chymotrypsin, 3-mal krist., Präparat 2, vgl. S. 1033, bei p_H 7,8 4–5 Stdn. und 36 °C) wurde das Partialhydrolysat über Dowex 1×2 fraktioniert (vgl. Abb. 4). Durch Wiederholung von Spaltung und Säulenlauf wurden die isolierten Partialpeptide in gleicher Zusammensetzung wieder erhalten und außerdem noch ein größeres Bruchstück (C₄). Alle

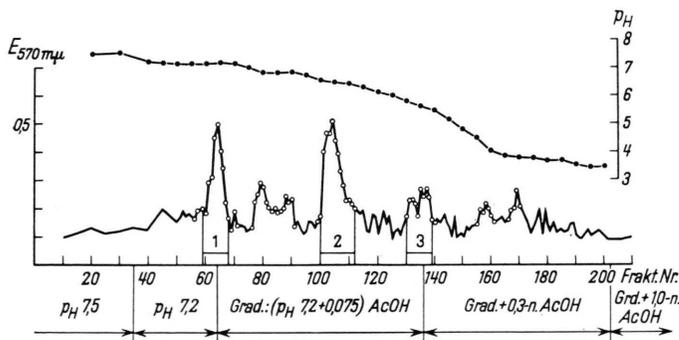


Abb. 4. Chromatographische Fraktionierung der chymotryptischen Peptide aus DT_(XI+XII) (135–158) über Dowex 1×2. Ausgangsmaterial: Das Peptid wurde aus 2 Säulenläufen des tryptischen Hydrolysats gesammelt (vgl. Teil I, Abb. 1). Chymotrypsinspaltung: 2,5 mg Chymotrypsin, 3-mal krist. (Präparat 2) 5 Stdn. bei p_H 7,8 und 36 °C. Säule: 30·1,2 cm, Zimmertemperatur. Durchflußgeschwindigkeit: 4 Fraktionen à 6 ml/Stde., Extinktion: bei 570 m μ nach alkalischer Hydro-

lyse und Ninhydrinreaktion (0,5 ml je Fraktion). Pufferlösungen: 1. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, p_H 7,5; 2. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, p_H 7,2; 3. Gradient mit 1 l p_H 7,2-Puffer und 0,075-n. AcOH; 4. Gradient mit 0,3-n. AcOH; 5. Gradient mit 1,0-n. AcOH. Gipfel 1 enthielt Peptid C₁ (153–158), Gipfel 2 enthielt Peptid C₂₋₁ (140–144) und C₂₋₃ (135–139), Gipfel 3 enthielt Peptid C₃₋₁ (145–150) und C₃₋₂ (151–152).

Position	Peptid- bezeichnung	pH ¹	Edman-Abbau, Reinigung;	Totalhydrolyse 6-n · HCl, 110° C, 20 Stdn., μMol	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met + Met O ₂	Leu	Tyr ³	Phe	Try ³	
135–139	C ₂₋₃	6,5–6,3	–	0.10 0.05	– –	0.98 1 1.01	– –	– –	– –	1.69 1.85 2	– –	– –	– –	1.00 1.00 1	0.72 + 1	– –	– –	
			1. Stufe 2. Stufe	0.09 (50 Stdn.) 0.08	– 0.18	– –	– –	– –	– –	– –	1.20 1.00	– –	– –	– –	1.00 1.00	0.42 0.86	– –	– –
140–144	C ₂₋₁	6,5–6,3	– R (Pyr A)	0.09 0.04	1.77 1.89	0.93 0.99	– –	1.00 1.02	– –	– –	– –	– –	– –	– –	– –	1.02 0.96	– –	
			R (Pyr A) und 1. Stufe 2. Stufe (keine R)	nicht analysiert 0.03 0.05	0.86 0.92	0.89 0.84	– –	0.56 0.65	– –	– –	– –	– –	– –	– –	– –	– –	1.00 1.00	– –
145–150	C ₃₋₁	5,5–4,6	–	0.04	–	–	1.75 0.74	– –	– –	1.05	–	–	+	0.93	–	–	–	
			1. Stufe	0.03	–	–	1.68	0.35	–	0.75	–	–	–	+	1.14	–	–	–
			2. Stufe	0.03 0.02	– –	– –	1.95 1.56	0.48 0.48	– –	1.16 1.00	– –	– –	– –	0.62 0.61	0.87 1.00	– –	– –	– –
151–152	C ₃₋₂	5,8–5,5	–	qualitativ	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	1	
			1. Stufe	qualitativ	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
145–152	C ₄	3,3–2,8	–	0.03	–	–	2.03 0.92	– –	– –	1.00	–	0.96 0.98 0.96	– – –	– – –	– – –	– – –	– – +	
153–158	C ₁	7,1	–	0.10	–	0.95 2.00	– –	1.20	– –	– –	2.00	– –	– –	– –	– –	– –	– –	
			1. Stufe	0.14	–	–	1.96	–	1.03	–	2.00	–	–	–	–	–	–	–
			2. Stufe	0.11	–	–	1.49	–	1.00	–	2.00	–	–	–	–	–	–	–
			2. Stufe und R, 3. Stufe	0.05	–	–	1.05	–	1.00	–	1.09	–	–	–	–	–	–	–

Tab. 2. Analysendaten der Chymotrypsin-Peptide aus DT_(XI+XII) (135–158).

Zeichenerklärung: ¹ Angegeben ist der pH-Wert der Elutions-Pufferlösung, mit dem das Peptid bei den einzelnen Fraktionierungen an Dowex 1 isoliert wurde.
² R bedeutet Rechromatographie des Peptides oder Restpeptides am Papier in Pyridin-System A (keine R: Bei dieser Stufe keine zusätzliche Rechromatographie).
³ Die Anwesenheit (+) der Aminosäure bzw. ihr Fehlen (–) wurde durch Sprühreaktion des Peptides am Papier nachgewiesen.

Partialpeptide wurden am Papier chromatographiert und quantitativ analysiert. Die Ergebnisse der Analysen, auch die der Restpeptide nach Edman-Abbau, wurden in Tab. 2 zusammengestellt. Die folgende Aufstellung zeigt die isolierten Partialpeptide und die an ihnen durchgeführten Sequenzanalysen (nicht berücksichtigt wurde die Säureamidverteilung, die am Schluß zusammenfassend behandelt wird).

- C₁** Position 153–158: (Thr₁, Ser₂, Pro₁, Ala₂).
Edman-Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von *Threonin*.
2. Stufe: Verminderung des *Serin*-Wertes auf 1,49 Reste/Mol.
3. Stufe: (Rechromatographie nach der 2. Stufe) Abspaltung eines der beiden *Alanin*-Reste.
Teilsequenz: Thr-Ser-Ala-(Ser₁, Pro₁, Ala₁).
- C₂₋₁** Position 140–144: (Asp₂, Thr₁, Glu₁, Phe₁).
DNP-Umsetzung: Nach Überführung von C₂₋₁ ins DNP-Derivat und Totalhydrolyse (12-n. HCl, 16 Stdn., 110 °C) wurde die N-terminale DNP-Aminosäure mit Äther extrahiert und die restlichen Aminosäuren quantitativ ermittelt:
Asp 1,62, *Thr* 1,01, *Glu* 1,03, *Phe* 0,96.
Edman-Abbau (Papierstreifenmethode): nach Rechromatographie (Pyr A) wurde die 1. Stufe durchgeführt (nicht vermessen).
2. Stufe: Der Wert für die zwei Asparaginsäurereste war auf 0,86 (bzw. 0,92) gesunken und *Glu* zu 44% (bzw. 35%) abgespalten.
Carboxypeptidase-Behandlung:
Mit 50 γ C-ase A und 68 γ C-ase B (4 Stdn., 36 °C, *p_H* 7,8) wurden 0,114 μ Mol Phenylalanin und 0,031 μ Mol Threonin abgespalten.
Teilsequenz: Asp-Glu-Asp-Thr-Phe.
- C₂₋₃** Position 135–139: (Thr₁, Gly₂, Leu₁, Tyr₁).
Edman-Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Abspaltung von insgesamt 80% des 1. *Glycin*-Restes, Verminderung des *Threonin*-Wertes.
2. Stufe: Verminderung des *Threonin*-Wertes um weitere 75 Prozent.
Carboxypeptidase-Behandlung:
Mit 50 γ C-ase A (*p_H* 7,8, 36 °C) wurden nach 10 min folgende Aminosäuren quantitativ ermittelt:
Tyr 0,052 μ Mol, *Leu* 0,006 μ Mol.
Nach 1 Stde. wurden folgende Werte erhalten:
Tyr 0,118 μ Mol, *Leu* 0,070 μ Mol.
Teilsequenz: Gly-Thr-Gly-Leu-Tyr.
- C₃₋₁** Position 145–150: (Ser₂, Glu₁, Gly₁, Met₁, Leu₁).
Edman-Abbau (Papierstreifenmethode):
1. Stufe: Verminderung des *Glutaminsäure*-wertes um insgesamt 65% (bzw. 52%).
2. Stufe: Abnahme der 2 *Serin*-Reste auf 1,56 Reste/Mol.

Position	Peptid-bezeichnung	Edman-Abbau	pH ¹	Totalhydrolyse 6-n · HCl, 110 °C, 20 Stdn. μ Mol	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Leu	Tyr ²	Phe	Try ²
135–139	S ₈₋₂	—	5,5–5,0	0,06	—	1,00	—	—	—	1,99	—	—	—	1,00	0,83	—	—
	S ₄₋₂	—	6,6	0,08	1,00	—	—	—	—	0,84	—	—	—	—	—	—	—
	S ₄₋₁	—	7,0–6,7	0,18	1,05	—	—	—	—	0,85	—	—	—	—	1,00	—	—
140–142	S _{8a}	—	6,6–6,5	0,05	1,72	—	—	1,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	S _{8ab}	—	6,4	0,03	1,78	—	—	1,05	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	S ₇₋₁	—	6,0–5,6	0,04	1,00	—	—	0,99	—	—	—	—	—	—	—	—	—
145–147	S ₈₋₁	—	5,4	0,13	—	—	0,95	1,00	—	—	—	—	0,75	—	—	—	—
148–150	S ₆	—	6,5–6,4	0,20	—	—	0,85	—	—	1,00	—	—	—	1,04	—	—	—
		1. Stufe 2. Stufe	—	0,12	—	—	0,97	—	—	1,00	—	—	—	0,97	—	—	—
151–158	S ₇	—	5,7–5,6	0,05	—	0,74	1,81	—	0,97	—	2,16	1,00	—	—	—	—	—
	S ₇	—	7,2–6,8	0,06	—	—	1,00	—	0,95	—	2,00	—	—	—	—	—	—
	S ₃	—	6,9–6,6	0,09	—	—	1,90	—	1,01	—	2,00	—	—	—	—	—	+

Tab. 3. Analysendaten der Subtilisin-Peptide aus DT(XI+XII) (135–158).

Zeichenerklärung: ¹ Angegeben ist der pH-Wert der Elutionspufferlösung, bei dem das Peptid bei den einzelnen Fraktionierungen an Dowex I isoliert wurde. ² Die Anwesenheit (+) der Aminosäure oder ihr Fehlen (–) wurde durch Sprühreaktion des Peptides am Papier nachgewiesen.

Carboxypeptidase-Behandlung:

Mit 50 γ C-case A und 68 γ C-case B (4 Stdn., 36 °C, p_H 7,8) wurde 0,05 μ Mol *Leucin* abgespalten.

Teilsequenz: Glu-Ser-(Ser₁, Gly₁, Met₁)-Leu.

C₃₋₂ Position 151–152: (Val₁, Try₁).

E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode):

1. Stufe: Abspaltung von *Val*. Anwesenheit von *Try* wurde nach Elution des Streifens und Chromatographie der Lösung in BEW 3:1:1 mit Sprühreagenz bewiesen; dagegen war mit Ninhydrin kein Valin nachweisbar.

Teilsequenz: Val-Try.

C₄ Position 145–152: (Ser₂, Glu₁, Gly₁, Val₁, Met₁, Leu₁, Try₁).

Subtilisinspaltung

Das säulenchromatographisch gereinigte Peptid DT_(XI+XII) wurde mehrere Male mit Wasser im Rotationsverdampfer eingengt, mit Wasser aufgenommen und bei p_H 7,8 in Lösung gebracht. Nach der Subtilisinspaltung (3 Stdn., 36 °C, bei p_H 7,8 mit 1 mg Subtilisin, „Novo“, Kopenhagen) wurde das Hydrolysat über Dowex 1 \times 2 fraktioniert (Durchführung vgl. Abb. 5). Nach Redchromatographie der erhaltenen Partialpeptide am Papier

wurde ihre Zusammensetzung quantitativ bestimmt. Tab. 3 enthält die gefundenen Analysenwerte sowie die Ergebnisse für die verschiedenen E d m a n - Abbaustufen.

Die isolierten Subtilisin-Peptide sind zusammen mit den an ihnen durchgeführten Sequenzversuchen in der nachfolgenden Aufstellung angegeben, wobei die Säureamidverteilung unberücksichtigt bleibt (vgl. Zusammenfassung):

S ₂	Position 155–158: (Ser ₁ , Pro ₁ , Ala ₂),
S ₃	Position 154–158: (Ser ₂ , Pro ₁ , Ala ₂),
S ₄₋₁	Position 137–138: (Gly ₁ , Leu ₁),
S ₄₋₂	Position 135–136: (Thr ₁ , Gly ₁),
S ₅	Position 135–138: (Thr ₁ , Gly ₂ , Leu ₁),
S _{6a}	Position 140–142: (Asp ₂ , Glu ₁),
S _{6b}	Position 140–143: (Asp ₂ , Glu ₁ , Thr ₁),
S ₆	Position 148–150: (Ser ₁ , Gly ₁ , Leu ₁), E d m a n - Abbau (Papierstreifenmethode): 1. Stufe: Abspaltung von 80% Serin,
S ₈₋₁	Position 145–147: (Ser ₁ , Glu ₁ , Met ₁),
S ₈₋₂	Position 135–139: (Thr ₁ , Gly ₂ , Leu ₁ , Tyr ₁),
S ₉	Position 151–158: (Thr ₁ , Ser ₂ , Pro ₁ , Ala ₂ , Val ₁ , Try ₁).

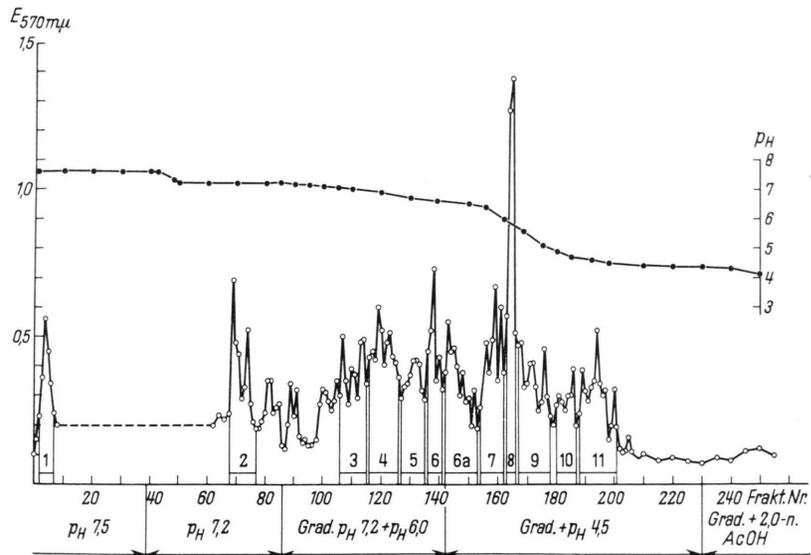


Abb. 5. Chromatographische Fraktionierung der Subtilisin-Peptide aus DT_(XI+XII) (135–158) über Dowex 1 \times 2. Subtilisinspaltung: 3 Stdn. bei p_H 7,8 und 36 °C mit 1 mg Subtilisin („Novo“, Kopenhagen). Säule: 30 \cdot 1,5 cm, Zimmertemperatur. Durchflußgeschwindigkeit: 4 Fraktionen à 8 ml/ Stunde. Extinktion: bei 570 $m\mu$ nach alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion (0,6 ml je Fraktion). Pufferlösungen: 1. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, p_H 7,5, 2. 1% Pyr-1% Pic-1% Lut-Acetat, p_H 7,2, 3. Gradient mit 500 ml p_H 7,2-Puffer

und 1% Pyr-1% Pic-1% Lut, p_H 6, 4. Gradient mit 2% Pyr-2% Pic-2% Lut, p_H 4,5, 5. Gradient mit 2,0-n. AcOH. Gipfel 2 enthielt Peptid S₂ (155–158), Gipfel 3 enthielt Peptid S₃ (154–158), Gipfel 4 enthielt Peptid S₅ (135–138), Gipfel 6a enthielt Peptid S_{6a} (140–142) und S_{6b} (140–143), Gipfel 6 enthielt Peptid S₆ (148–150), Gipfel 7 enthielt Peptid S₇₋₁ (141–142), Gipfel 8 enthielt Peptid S₈₋₁ (145–147), S₈₋₂ (135–139) und S₉, Gipfel 9 enthielt Peptid S₉ (151–158).

Edman-Abbau-	Totalhydrolyse 6-n · HCl, 110°C, 18 Stdn. µMol	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Leu	Tyr	Phe
—	0.06	2.29	2.98	3.80	2.14	0.82	2.80	2.17	1.18	0.81	2.23	0.86	1.05
1. Stufe	0.07	2.07	2.83	3.64	2.28	0.93	2.06	1.96	0.87	0.75	1.92	0.65	1.00
2. Stufe	0.04	2.13	2.60	3.75	2.07	+	2.16	1.86	0.81	0.95	1.94	0.64	0.93
3. Stufe	0.05	2.04	2.42	3.68	2.17	0.75	2.40	1.98	0.96	0.75	1.92	0.75	1.00

Tab. 4. Restpeptidanalysen nach E d m a n - Abbau von DT_(XI+XII) (135–158).

Stufenweiser E d m a n - Abbau von DT_(XI+XII)

Das säulenchromatographisch gereinigte tryptische Peptid wurde am Papier (Pyr-System A) rechromatographiert und mittels Papierstreifentechnik (vgl. Teil I) einem schrittweisen E d m a n - Abbau unterzogen. Die erhaltenen Analysenwerte nach 18-stdg. Hydrolysedauer vom Ausgangspeptid und den einzelnen Restpeptiden sind in Tab. 4 zusammengestellt.

1. Stufe: Abspaltung eines *Glycin*-Restes.
2. Stufe: Verminderung des *Threonin*-Wertes.

Carboxypeptidase-Behandlung des intakten Virus

Zum Vergleich wurde neben *dahlemense*-Virus auch *vulgare*-Virus mit Carboxypeptidase behandelt.

- vulgare*-Virus:
1. 0,25 µMol Virus wurde in 4 ml Wasser bei p_H 7,8 gelöst und mit 50 γ C-ase A, gelöst in 0,1 ml 10-proz. LiCl, 1 Stde. bei p_H 7,8 und 36 °C inkubiert. Der Fermentansatz wurde danach mit 3-m. Trichloressigsäure angesäuert, abzentrifugiert und der Überstand eingengt. Die quantitative Analyse ergab 0,044 µMol *Threonin*.

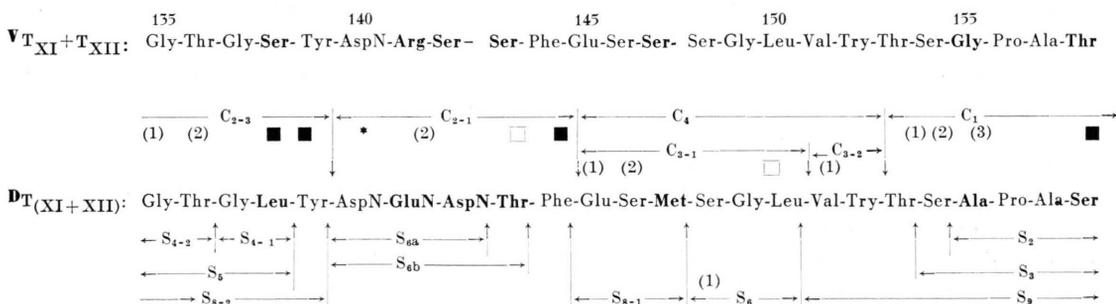
2. Der gleiche Ansatz wurde mit 50 γ C-ase A + 68 γ C-ase B 1 Stde. inkubiert, wobei 0,096 µMol *Threonin* entstanden.

dahlemense-Virus: 1,6 µMol Virus wurde in 6 ml Wasser bei p_H 7,8 gelöst und mit 50 γ C-ase A 1 Stde., bei p_H 7,8, 36 °C inkubiert. Der nach Ansäuern abzentrifugierte und eingengte Überstand wurde unter Zusatz von 0,025 µMol Aminosäureeichlösung quantitativ vermessen. Es wurden 0,28 µMol *Serin* abgespalten.

Zuordnung

Die C-terminale Aminosäurefolge (145–158)

Das *dahlemense*-Peptid DT_(XI+XII) ist das einzige tryptische Peptid ohne Arginin oder Lysin; demnach muß es die letzten Aminosäuren der Polypeptidkette enthalten (genau so wie das homologe tryptische Peptid T_{XII} aus *vulgare*). Die C-terminale Aminosäure der Polypeptidkette von inaktivem *vulgare*-Virus wurde durch Carboxypeptidase-Behand-



Zeichenerklärung: E d m a n - Abbau: 1. Stufe (1), 2. Stufe (2), 3. Stufe (3). DNP-Umsetzung: *, Carboxypeptidase-Behandlung: C-ase A: ■, C-ase B: □.

Abb. 6. Vergleich von *vulgare* T_{XI} (135–141) und T_{XII} (142–158) mit *dahlemense* T_(XI+XII) (135–158).

lung ermittelt¹⁴. Hierbei wurde wegen des Prolinrestes in Position 156 nur Threonin abgespalten. Die Behandlung mit Carboxypeptidase wurde von uns am *vulgare* wiederholt und unter den gleichen Bedingungen auch bei intaktem *dahlemense*-Virus vorgenommen. Wie im vorigen Abschnitt ausgeführt wurde, ist bei *dahlemense* Serin C-terminal enthalten. Auch bei diesem Virus konnte außer Serin keine weitere Aminosäure abgespalten werden (im Gegensatz zu einer Mutante, die an Stelle des Prolinrestes in Position 156 Leucin besitzt¹⁵). An dem isolierten Prolin-haltigen Chymotrypsin-Peptid C₁ (1 Thr, 2 Ser, 1 Pro, 2 Ala) wurde die C-terminale Sequenz von DT_(XI+XII) ermittelt. Durch stufenweisen E d m a n - Abbau wurde aus C₁ zunächst ein Threonin, bei der nächsten ein Serin und darauf ein Alanin abgespalten. Da dem 2. Serinrest die C-terminale Position zukommt, wie der Versuch am intakten Virus gezeigt hat, lautet die Sequenz von Position 153 – 158: *Thr-Ser-Ala-Pro-Ala-Ser*.

Für die Zuordnung der übrigen chymotryptischen Peptide war die Isolierung zweier Brückenpeptide wertvoll: 1. Subtilisin-Peptid S₉ (1 Thr, 2 Ser, 1 Pro, 2 Ala, 1 Val, 1 Try), welches sich aus den Aminosäuren von C₁ und denen des Peptids C₃₋₂ (1 Val, 1 Try) zusammensetzt (vgl. Abb. 6). Position 151 – 152 muß daher diese beiden Aminosäuren enthalten. Die Sequenz lautet *Val-Try*, wie durch E d m a n - Abbau bewiesen werden konnte.

2. Peptid C₄ (2 Ser, 1 Glu, 1 Gly, 1 Val, 1 Met, 1 Leu, 1 Try) umfaßt die Teilbereiche C₃₋₁ (enthielt alle Aminosäurereste wie C₄ mit Ausnahme von 1 Val und 1 Try) und C₃₋₂; Peptid C₃₋₁ ist daher den Positionen 145 – 150 zuzuordnen. Der Beginn von C₃₋₁ wurde durch E d m a n - Abbau als *Glu-Ser* . . . und sein C-terminales Ende durch Abspaltung von Leucin mit Carboxypeptidase ermittelt. Für die Bestimmung der mittleren Teilbereiche wurden die entsprechenden Subtilisin-Partialpeptide für Sequenzversuche herangezogen: S₈₋₁ (1 Ser, 1 Glu, 1 Met) und S₆ (1 Ser, 1 Gly, 1 Leu), die zusammen alle Aminosäurereste von C₃₋₁ enthielten. Durch Vergleich von S₈₋₁ mit der N-terminalen Sequenz in C₃₋₁ geht hervor, daß Met C-terminal in diesem Subtilisin-Peptid enthalten ist und Position 147 einnimmt. Durch E d m a n - Abbau wurde der Beginn von S₆ mit Serin (gefolgt von Glycin) ermittelt.

Aus den Versuchen folgt die Sequenz der Positionen 145 – 152: *Glu-Ser-Met-Ser-Gly-Leu-Val-Try* (Säureamidverteilung vgl. Schluß).

Die N-terminale Aminosäurefolge (135 – 144)

Durch stufenweisen E d m a n - Abbau des säulen-chromatographisch gereinigten und am Papier re-chromatographierten tryptischen Ausgangs-peptids wurde bewiesen, daß DT_(XI+XII) mit Glycin beginnt, dem Threonin folgt. Chymotrypsin-Peptid C₂₋₃ (1 Thr, 2 Gly, 1 Leu, 1 Tyr), das Glycin N-terminal enthält, ist daher Position 135 – 139 zuzuordnen. Seine N-terminalen Sequenzen ergaben sich durch schrittweisen E d m a n - Abbau ebenfalls als *Gly-Thr* . . . , während mit Carboxypeptidase A neben Tyrosin etwas Leucin abspaltbar war. Position 135 – 139 hat somit folgende Sequenz: *Gly-Thr-Gly-Leu-Tyr*.

Neben den Aminosäureresten der besprochenen Chymotrypsin-Peptide C₂₋₃, C₄ und C₁ sind laut Bruttozusammensetzung in DT_(XI+XII) noch zwei Asparaginsäurereste, 1 Glutaminsäure, 1 Threonin und 1 Phenylalanin vorhanden. Diese Aminosäuren sind im Partialpeptid C₂₋₁ enthalten, dem nach der Zuordnung der übrigen Chymotrypsinpeptide Position 140 – 144 zukommt. (Die Reihenfolge der Chymotrypsinpeptide in DT_(XI+XII) ist daher folgendermaßen: C₂₋₃ – C₂₋₁ – C₃₋₁ – C₃₋₂ – C₁.) Durch DNP-Umsetzung wurde als N-terminale Aminosäure in C₂₋₁ durch Restpeptidanalyse Asparaginsäure ermittelt (Säureamidverteilung vgl. Schluß). Als 2. Rest muß Glutaminsäure folgen, da bei zweimaligem E d m a n - Abbau von C₂₋₁ bei der Restpeptidanalyse der Wert für Glutaminsäure vermindert war, während für Asparaginsäure, Threonin und Phenylalanin etwa noch je 1 Rest pro Mol übrig geblieben war. Die weitere Reihenfolge der Aminosäuren für die Positionen 140 – 144 zeigte sich einerseits durch Carboxypeptidase-Behandlung von C₂₋₁, wobei neben Phenylalanin etwas Threonin vom C-terminalen Peptidende abgespalten wurde, andererseits durch Isolierung von Subtilisinpeptid S_{6a}, das 2 Asparaginsäurereste und 1 Glutaminsäurerest enthielt. (Vgl. auch die übrigen in geringer Ausbeute erhaltenen Subtilisin-Peptide dieses Bereichs in Übersicht, Abb. 6.) Dadurch kommt den Positionen 140 – 144 folgende Sequenz zu: *Asp-Glu-Asp-Thr-Phe*.

¹⁴ J. J. HARRIS u. C. A. KNIGHT, *Nature* [London] **170**, 613 [1952]; C. J. NIU u. H. FRAENKEL-CONRAT, *Arch. Biochem. Biophysics* **59**, 538 [1955].

¹⁵ H. FRAENKEL-CONRAT u. A. TSUGITA, *Proc. nat. Acad. Sci.* **46**, 636 [1960]; H. G. WITTMANN, *Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol.* 1963 (im Druck).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
V	Acetyl-Ser-Tyr-Ser-Ileu-Thr-Thr-Pro-Ser-GluN-Phe-Val-Phe-Leu-Ser-SerAla-Try-Ala-Asp-Pro-Ileu-Glu-																					
D	Acetyl-Ser-Tyr-Ser-Ileu-Thr-Ser-Pro-Ser-GluN-Phe-Val-Phe-Leu-Ser-SerVal-Try-Ala-Asp-Pro-Ileu-Glu-																					
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42		
V	Leu-Ileu-AspN-Leu-Cys-Thr-AspN-Ala-Leu-Gly-AspN-GluN-Phe-GluN-Thr-GluN-GluN-Ala Arg-Thr-																					
D	Leu-Leu-AspN-Val-Cys-Thr-Ser-Ser-Leu-Gly-AspN-GluN-Phe-GluN-Thr-GluN-GluN-Ala-Arg-Thr-																					
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	
V	Val-GluN-Val-Arg-GluN-Phe-SerGluN-Val-Try-Lys-Pro-Ser-Pro-GluN-Val-Thr-Val-Arg-Phe-Pro-																					
D	Thr-GluN-Val-GluN-GluN-Phe-Ser-Glu-Val-Try-Lys-Pro-Phe-Pro-GluN-Ser-Thr-Val-Arg-Phe-Pro-																					
	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
V	Asp-Ser-Asp-Phe-Lys-Val-Tyr-Arg-Tyr-AspN-Ala-Val-Leu-Asp-Pro-Leu-Val-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly-																					
D	Gly-Asp-Val-Tyr-Lys-Val-Tyr-Arg-Tyr-AspN-Ala-Val-Leu-Asp-Pro-Leu-Ileu-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly-																					
	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	
V	Ala-Phe-Asp-Thr-Arg-AspN-Arg-Ileu-Ileu-Glu-Val-Glu-AspN-GluN-Ala-AspN-Pro-Thr-Thr-Ala-Glu-																					
D	Thr-Phe-Asp-Thr-Arg-AspN-Arg-Ileu-Ileu-Glu-Val-Glu-AspN-GluN-GluN-Ser-Pro-Thr-Thr-Ala-Glu-																					
	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
V	Thr-Leu-Asp-Ala-Thr-Arg-Arg-Val-Asp-Asp-Ala-Thr-Val-Ala-Ileu-Arg-Ser-Ala-Asp-Ileu-AspN-Leu-																					
D	Thr-Leu-Asp-Ala-Thr-Arg-Arg-Val-Asp-Asp-Ala-Thr-Val-Ala-Ileu-Arg-Ser-Ala-AspN-Ileu-AspN-Leu-																					
	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147			
V	Ileu-Val-Glu-Leu-Ileu-Arg-Gly-Thr-Gly-Ser-Tyr-AspN-Arg-Ser-Ser-Phe-Glu-Ser-Ser-																					
D	Val-AspN-Glu-Leu-Val-Arg-Gly-Thr-Gly-Leu-Tyr-AspN-GluN-AspN-Thr-Phe-Glu-Ser-Met-																					
	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158											
V	Ser-Gly-Leu-Val-Try-Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Thr																					
D	Ser-Gly-Leu-Val-Try-Thr-Ser-Ala-Pro-Ala-Ser																					

Abb. 7. Vergleich der Aminosäuresequenzen der TMV-Stämme *vulgare*¹³ (V) und *dahlemense* (D).

Säureamidverteilung

Sowohl Peptid S_{6a} (Position 140 – 142) als auch Peptid C₂₋₁ (140 – 144) verhielten sich bei der Ionen-Austauschchromatographie an Dowex 1 neutral. Die in ihnen in Position 140, 141 und 142 enthaltenen Aminosäurereste sind daher amidiert. Dagegen liegt in 145 freie Glutaminsäure vor wie in entsprechender Position bei *vulgare*, da sich die Partialpeptide C₃₋₁ (145 – 150) und S₈₋₁ (145 – 147) sauer verhielten.

Zusammenfassung

Nach dem Vergleich der Bruttozusammensetzung von VT_{XI} und VT_{XII} mit DT_(XI+XII) sind fünf Unterschiede zu erwarten: 3 Ser + 1 Arg + 1 Gly → 1 Leu + 1 Glu + 1 Asp + 1 Met + 1 Ala. Die Sequenzanalyse ergibt demgegenüber insgesamt folgende sieben Unterschiede:

- In Position 138 ist Serin bei *vulgare* ersetzt durch Leucin bei *dahlemense*,
- in Position 141 ist Arginin bei *vulgare* ersetzt durch Glutamin bei *dahlemense*,

- in Position 142 ist Serin bei *vulgare* ersetzt durch Asparagin bei *dahlemense*,
- in Position 143 ist Serin bei *vulgare* ersetzt durch Threonin bei *dahlemense*,
- in Position 147 ist Serin bei *vulgare* ersetzt durch Methionin bei *dahlemense*,
- in Position 155 ist Glycin bei *vulgare* ersetzt durch Alanin bei *dahlemense*,
- in Position 158 ist Threonin bei *vulgare* ersetzt durch Serin bei *dahlemense*.

Es ist auffallend, daß an den Unterschieden zwischen *vulgare* und *dahlemense* vor allem Serin beteiligt ist.

Der Vergleich von *vulgare* und *dahlemense* wird zusammenfassend in einem gesonderten Abschnitt dieser Arbeit (Teil III) diskutiert¹⁶.

Wir danken Frl. A. KLEMKE und I. HINDENNACH für die gewissenhafte Mitarbeit bei der Sequenzanalyse und Frl. B. OSTERTAG für die selbständige Durchführung der Aminosäure-Analysen. Ferner danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Untersuchungen.

¹⁶ B. WITTMANN-LIEBOLD u. H. G. WITTMANN, Z. Vererbungslehre 94, 427 [1963].