

Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus

Teil V: Aminosäuresequenz (1-61) des Proteins des Tabakmosaikvirus-Stammes Holmes rib grass

Sequence of Amino Acids (1-61) within the Protein of the Strain Holmes Rib Grass of Tobacco Mosaic Virus

J. JAUREGUI-ADELL *, I. HINDENNACH und H. G. WITTMANN

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem
und Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen(Z. Naturforsch., **24 b**, 870—877 [1969]; eingegangen am 9. Dezember 1968)

The sequence of amino acids within the coat protein of the strain Holmes rib grass of tobacco mosaic virus (TMV) has been determined. In this communication the amino acid compositions of the coat protein and of all tryptic peptides are reported. Furthermore the experimental details are given for the elucidation of the amino acid sequences within the first three tryptic peptides, containing 61 amino acids.

It has been found that the strain Holmes rib grass differs very extensively in the primary structure from the other TMV strains whose sequences are known. It differs from each of the other strains in more than 50% of the amino acid positions and it contains two amino acids less per protein subunit than the other TMV strains.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine einer größeren Zahl von Tabakmosaikvirus-Stämmen ist für eine Reihe von bisher ungeklärten Problemen wichtig, z. B. für Fragen, die die räumliche Struktur der TMV-Proteinkette¹ betreffen, für den Vergleich der Nucleinsäuren verschiedener TMV-Stämme², für die Erklärung des Zustandekommens bzw. des Fehlens von geordneten Aggregaten zwischen Proteinketten verschiedener TMV-Stämme³ sowie für Fragen der biochemischen Evolution, insbesondere der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen den TMV-Stämmen. Außerdem erleichtert die Kenntnis der Proteinstruktur von TMV-Stämmen das Verständnis zahlreicher Befunde, die

mit TMV-Stämmen erhalten wurden, vor allem bei elektrophoretischen⁴ und serologischen^{4a, 5} Untersuchungen, Virustitrationen⁶ und UV-Inaktivierungen⁷.

In mehreren früheren Publikationen⁸ wurde über die Ermittlung der Primärstruktur der TMV-Stämme dahlemense und U2 im Vergleich zu der des Wildstammes vulgare⁹ berichtet. In dieser und einer folgenden Publikation wird die Aminosäuresequenz von Holmes rib grass mitgeteilt, eines TMV-Stammes, der sich sehr stark von den bisher untersuchten Stämmen, u. a. auch in der Zahl der Aminosäuren pro Proteinkette, unterscheidet. Die Zusammensetzung der tryptischen Peptide¹⁰ sowie die

* Jetzige Adresse: Laboratoire Chimie Biologique, Faculté Sciences, Montpellier/Frankreich.

¹ D. L. D. CASPAR and K. C. HOLMES, J. molecular Biol., im Druck.

² K. W. MUNDY, Molec. Gen. Genetics **100**, 383 [1967].

^{3a} S. SARKAR, Z. Naturforschg. **15 b**, 778 [1960].

^{3b} L. RENTSCHLER, Molec. Gen. Genetics **100**, 96 [1967].

^{4a} H. FRIEDRICH-FREKSA, G. MELCHERS u. G. SCHRAMM, Biol. Zbl. **65**, 187 [1946].

^{4b} W. N. TAKAHASHI, Virology **4**, 393 [1955].

^{4c} E. KRAMER u. H. G. WITTMANN, Z. Naturforschg. **13 b**, 30 [1958].

^{5a} A. SIEGEL and S. G. WILDMAN, Photopathology **44**, 277 [1954].

^{5b} W. C. PRICE, Trans. New York Acad. Sci., Ser. II, **16**, 196 [1954].

^{5c} H. G. AACH, Z. Naturforschg. **12 b**, 614 [1954].

^{5d} P. VON SENGBUSCH, Z. Vererbungslehre **96**, 364 [1965].

⁶ G. OEHLER, Molec. Gen. Genetics **99**, 372 [1967].

⁷ A. SIEGEL and S. G. WILDMAN, Virology **2**, 69 [1956].

^{8a} B. WITTMANN-LIEBOLD u. H. G. WITTMANN, Z. Vererbungslehre **94**, 427 [1963].

^{8b} H. G. WITTMANN, Z. Naturforschg. **20 b**, 1213 [1965].

^{8c} L. RENTSCHLER, Molec. Gen. Genetics **100**, 84 [1967].

^{9a} F. A. ANDERER, H. UHLIG, E. WEBER, and G. SCHRAMM, Nature [London] **186**, 922 [1960].

^{9b} A. TSUGITA, D. T. GISH, J. YOUNG, H. FRAENKEL-CONRAT, C. A. KNIGHT, and M. M. STANLEY, Proc. nat. Acad. Sci. USA **46**, 1463 [1960].

^{9c} G. FUNATSU, A. TSUGITA, and H. FRAENKEL-CONRAT, Arch. Biochem. Biophysics **105**, 25 [1964].

^{9d} F. A. ANDERER, B. WITTMANN-LIEBOLD, and H. G. WITTMANN, Z. Naturforschg. **20 b**, 1203 [1965].

¹⁰ G. FUNATSU and M. FUNATSU, Agric. biol. Chem. [Tokyo] **31**, 48 [1967].

komplette Aminosäuresequenz¹¹ des Proteins des Stammes Holmes rib grass wurden bereits als Kurzmittlung im Vergleich mit der Sequenz von anderen TMV-Stämmen publiziert.

Material und Methoden

Das Impfmateriel für den TMV-Stamm Holmes rib grass¹² wurde uns 1957 von Dr. W. N. TAKAHASHI, Department of Plant Pathology, University of California, Berkeley, Cal., zur Verfügung gestellt, und das Virus wurde in den Jahren danach mehrmals über Nekrosen auf *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c. übertragen. Für die Virusvermehrung wurde eine Einzelnekrose auf eine Pflanze von *Nic. tabacum* var. Samsun inokuliert. Blätter dieser Pflanze dienten als Ausgangsmateriel für alle folgenden Massenvirusvermehrungen, die unter den gleichen Gewächshausbedingungen, wie früher für den TMV-Stamm U2 mitgeteilt^{8b}, erfolgten.

Die Virusaufarbeitung sowie die Methoden für die Isolierung der Peptide und für die Ermittlung deren Aminosäuresequenzen sind bereits bei anderen TMV-Stämmen im einzelnen beschrieben¹³. Neu verwendet wurde die Amino-peptidase nach PFLEIDERER et al.¹⁴, die von der Fa. Röhm und Hass, Darmstadt, hergestellt wird sowie die Citrus-Carboxypeptidase¹⁵, die uns freundlicherweise von Herrn Dr. H. ZUBER, Laboratorium für Molekularbiologie der ETH, Zürich, zur Verfügung gestellt wurde, und die in den Tabellen als Carboxypeptidase C (C-ase C) bezeichnet wird.

Umsetzung mit Äthylenimin¹⁶: Das Virusprotein wurde in 8-m. Harnstofflösung in Anwesenheit von β -Mercaptoäthanol (20 μ Mol pro 1 μ Mol Protein) und EDTA (0,01-m.) 1 Stde. bei 20 °C und pH 8,6 inkubiert. Dann wurde Äthylenimin (10 μ Mol pro 1 μ Mol β -Mercaptoäthanol) und 1-Amino-2-methyl-1,3-propanediol (5 μ Mol pro 1 μ Mol β -Mercaptoäthanol) bei pH 8,6 zugegeben. Nach 16 h bei 20 °C wurde gegen dest. Wasser, das Thiodiglykol (1 ml pro l) und EDTA (0,01-m.) enthielt, erschöpfend dialysiert.

Chymotryptische Spaltung von T1 in Harnstoff: Das Peptid wurde in 0,3-proz. Lösung in Wasser (+ NaOH $\rightarrow$ pH 8,8) suspendiert, fester Harnstoff ($\rightarrow$ 8-m.) und NaOH ($\rightarrow$ pH 10) zugefügt, auf 2-m. Harnstoff verdünnt und nach Chymotrypsin-Zugabe (Enzym: Substrat = 1 : 50) auf pH 8,8 gebracht. Nach 2 1/2 Stdn. wurde nochmals Chymotrypsin dazugegeben und 18 h bei pH 7,8 im Autotitrator gehalten.

Amidbestimmungen: Ob es sich um Asp oder Asn bzw. Glu oder Gln handelte, wurde bestimmt: a) durch Freisetzen der Aminosäuren nach Carboxypeptidase- bzw. Amino-peptidase-Behandlung und deren chromatographischer Identifizierung bzw. b) durch die Ladung der betreffenden Partialpeptide (in der Papierelektrophorese bzw. durch den pH-Wert der Elution im Dowex-1-Lauf ermittelt). Die Spaltung des Proteins mit BrCN¹⁷ und die Isolierung von Acetylserin¹⁸ wurden nach den publizierten Methoden durchgeführt.

Abkürzungen: TMV: Tabakmosaikvirus; C-ase (in Tabellen) bzw. C (in Abbildungen): Carboxypeptidase; AM-ase bzw. A: Amino-peptidase; E = Edman.

Ergebnisse

Gewinnung der tryptischen Peptide

Das von der RNS getrennte Virusprotein wurde zunächst in der in „Material und Methoden“ beschriebenen Weise mit Äthylenimin umgesetzt, um das erste tryptische Peptid mit 41 Aminosäuren durch die Umwandlung des Cysteins (Position 27) in S- β -aminoäthylcystein und durch die anschließende Trypsinbehandlung in zwei kleinere Peptide zu zerlegen: Peptid T1 (Position 1–27) und T3 (Position 28–41).

Bei der tryptischen Spaltung des mit Äthylenimin umgesetzten Proteins wurde die Lösung nach 10 bis 20 Min. leicht trübe. Das Sediment bestand vor allem aus dem Peptid T1. Es wurde durch zweimalige Präzipitation bei pH 4,7 weiter gereinigt. Der Überstand mit den restlichen tryptischen Peptiden wurde auf eine Dowex 1 x 2-Säule aufgetragen und in der in Abb. 1 angegebenen Weise chromatographiert. Die Peptide wurden in der früher beschriebenen Weise isoliert und analysiert.

Die Zusammensetzung der tryptischen Peptide ist in Tab. 1 zusammengefaßt. Die Summe der Aminosäuren in den Peptiden stimmt mit der in Tab. 2 wiedergegebenen Bruttoamino-säuren-Zusammensetzung des Virusproteins innerhalb der Fehlergrenzen gut überein.

^{11a} B. WITTMANN-LIEBOLD and H. G. WITTMANN, *Molec. Gen. Genetics* **100**, 358 [1967].

^{11b} G. FUNATSU and M. FUNATSU, *Proc. Sympos. „Plant Biochemical Regulation in viral and other diseases or injury“*, Tokyo 1967.

¹² F. O. HOLMES, *Phytopathology* **31**, 1089 [1941].

^{13a} B. WITTMANN-LIEBOLD u. H. G. WITTMANN, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **3**, 69 [1964].

^{13b} B. WITTMANN-LIEBOLD u. H. G. WITTMANN, *Z. Naturforsch.* **18 b**, 1032 [1963].

¹⁴ G. PFLEIDERER, P. G. CELLIER, M. STANULOVIC, E. D. WACHSMUTH, H. DETERMANN u. G. BRAUNITZER, *Biochem. Z.* **340**, 552 [1964].

¹⁵ H. ZUBER, *Nature [London]* **201**, 613 [1964].

^{16a} M. A. RAFTERY and R. D. COLE, *Biochim. biophys. Res. Commun.* **10**, 467 [1963].

^{16b} R. T. JONES, *Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol.* **29**, 297 [1964].

¹⁷ E. GROSS and B. WITKOP, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1510 [1961].

¹⁸ K. NARITA, *Biochim. biophysica Acta [Amsterdam]* **30**, 352 [1958].

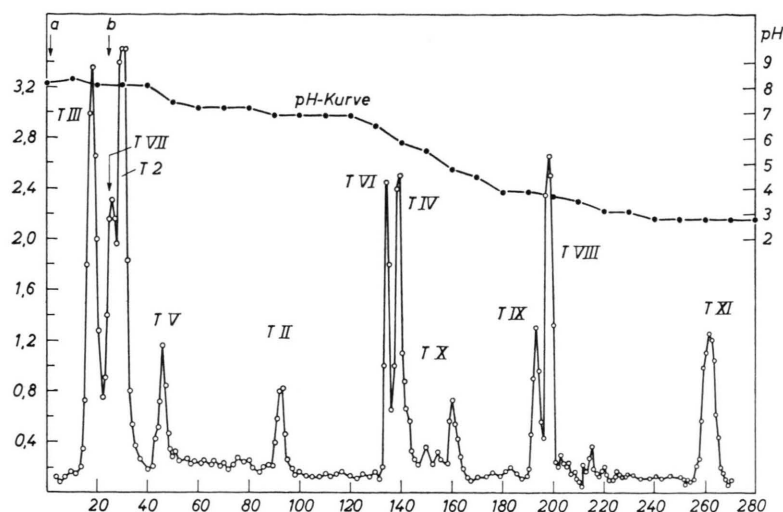


Abb. 1. Trennung der tryptischen Peptide auf Dowex 1 x 2 nach Ausfällung des Peptids T I. Ordinate: Extinktion bei 570 m μ nach alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion von je 0,3 ml. Abszisse: Zahl der Fraktionen à 10 ml. Säule 200 x 1,5 cm; 35 °C; 40 ml/h. Elutionspuffer: a) 1% Pyridin + 1% 2.4.6-Collidin + Essigsäure → pH 8,4. b) Gradient mit Varigrad ¹⁹.

¹⁹ G. FUNATSU, Biochemistry **3**, 1351 [1964].

Peptid	I		II		III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	Summe
Position	1-27	28-41	42-45	46-61	62-85	69-85	86-90	91-92	93-113	114-122	123-141	142-156		
Asp	4		1	2	1	1	1	1	1	2	3			17
Thr	2	1	1	1	1		1	1	2	1			3	13
Ser	2	3		1		1	1		3		2			13
Glu	4	3		3		1			6		3		2	22
Pro	2			1	1	1			1				2	8
Gly		1			1						2			4
Ala	3	2		2		2			3	2			4	18
Val	1	1	1	1		3			1	2				10
Met	1					1					1			3
Ile	1			1		1			2	1	1		1	8
Leu	1	1		2		2					4		1	11
Tyr	3	1				2					1			7
Phe	1			1	2		1						1	6
Lys						2								2
His											1			1
Arg		1	1	1	1		1	1	2	1	1			10
Cys	1													1
Trp	1												1	2
	27	14	4	16	7	17	5	2	21	9	19		15	156

Tab. 1. Aminosäuren-Zusammensetzung der tryptischen Peptide.

Tryptisches Peptid T I (Pos. 1 – 41)

Das in der oben beschriebenen Weise isolierte Peptid T I (Pos. 1 – 27) wurde wegen seiner relativ schweren Löslichkeit in der im Teil „Material und Methoden“ angegebenen Weise mit Chymotrypsin in 2-m. Harnstofflösung gespalten. Die Trennung der chymotryptischen Peptide erfolgte mit beschriebenen Methoden¹³ durch Chromatographie auf Dowex 1 x 2 und durch anschließende Papierchromatographie.

Im Gegensatz zu T I befand sich T III (Pos. 28 – 41) zusammen mit den anderen tryptischen Peptiden im

Überstand nach der tryptischen Spaltung und wurde in dem Dowex 1-Lauf aus dem in Abb. 1 versehentlich mit T II angegebenen Gipfel gewonnen.

Die Sequenz der Aminosäuren im tryptischen Peptid T II ergibt sich aus den Ergebnissen, die an den Partialpeptiden gewonnen wurden und in Abb. 2 und Tab. 3 wiedergegeben sind.

Tryptisches Peptid T II (Pos. 42 – 45)

Die Elution von T II aus der Dowex 1-Säule erfolgte an der in Abb. 1 angegebenen Stelle. Es wurde papierchromatographisch gereinigt, einem

	20 h	72 h	Sequenzen
Asp	16,4	17,1	17
Thr	12,9	13,4	13
Ser	12,9	12,1	13
Glu	21,8	22,1	22
Pro	8,4	7,9	8
Gly	4,2	4,1	4
Ala	18,0	18,0	18
Val	9,5	9,7	10
Met	2,6	2,1	3
Ile	6,4	7,6	8
Leu	10,8	10,8	11
Tyr	6,9	6,8	7
Phe	6,1	5,8	6
Lys	2,1	2,2	2
His	1,0	1,0	1
Arg	10,0	10,0	10
Cys	0,9	0,7	1
Trp			2
Summe:			156

Tab. 2. Aminosäuren-Zusammensetzung des Virusproteins. Sowohl bei 20 h als auch bei 72 h sind die angegebenen Werte das Mittel aus jeweils vier Analysen. Der Verlust an Threonin und Serin während der Hydrolyse wurde durch Faktoren korrigiert, die an TMV vulgare ermittelt worden sind. Wir danken Herrn B. HENNIG für die Analysen. Die in der Spalte „Sequenz“ angegebenen Werte sind die Summe a) der Aminosäuren in allen tryptischen Peptiden bzw. b) der bei der Sequenzermittlung (s. diese und eine folgende Arbeit) bestimmten Aminosäuren.

zweistufigen E d m a n - Abbau unterworfen und mit Carboxypeptidase B behandelt. Das Peptid ist nach dem Verhalten in der Hochspannungselektrophorese neutral, so daß Asparaginsäure und nicht das Amid vorliegt.

1. E d m a n : Asp = 0,14, Thr = 1,00,

Val = 0,91, Arg⁺

2. E d m a n : Asp = 0,12, Thr = 0,51,

Val = 1,00, Arg⁺

C-ase B: Arg⁺

42 43 44 45

Sequenz von TII: Asp-Thr-Val-Arg

Tryptisches Peptid III (Pos. 46 – 61)

TIII wurde als erstes Peptid aus der Dowex 1-Säule eluiert (Abb. 1). Da es beim Aufbewahren in Lösung relativ schnell schwer löslich wird, muß es möglichst bald enzymatisch gespalten werden. Die nach Behandlung mit Chymotrypsin bzw. Subtilisin erhaltenen Partialpeptide und die daran durchgeführten Abbauschritte sind in Abb. 3 und Tab. 4 wiedergegeben. Daraus ergibt sich die in Abb. 3 angegebene Sequenz der Aminosäuren 46 bis 61.

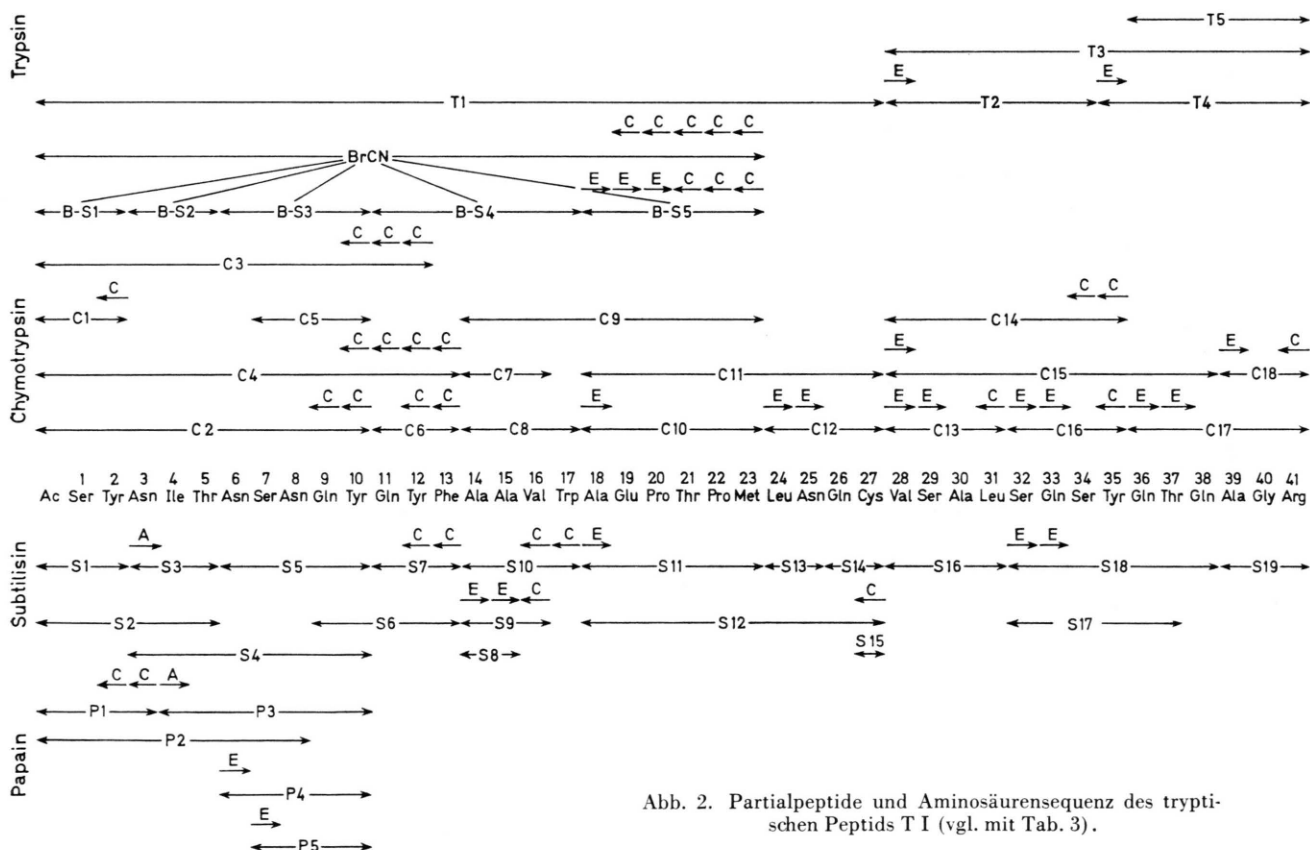


Abb. 2. Partialpeptide und Aminosäuresequenz des tryptischen Peptids T I (vgl. mit Tab. 3).

Peptid	Position	Behandlung	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met ^c	Ile	Leu	Tyr	Phe	Arg	Cys ^{a/d}	Trp ^b	Asn	Gln
T 1	1—27		3,72	1,93	2,24	3,52	2,19		3,00	1,05	0,48	1,00	0,95	2,60	1,13		1	1		
T 2	28—34				2,46	1,02			1,00	1,00			0,94							
		EDMAN			2,63	0,85			1,00				0,80							
T 3	28—41			1,08	2,89	3,13		1,06	2,00	0,85			0,95	0,91		1,15				
T 4	35—41			0,97		1,93		1,07	1,00					0,48		+ ^b				
		EDMAN		0,81		1,67		1,33	1,00							+ ^b				
T 5	36—41			1,00		1,48		0,58	1,00							+ ^b				
BrCN	1—23		2,97	1,78	1,90	2,83	2,05		3,00	0,97	0,67	0,92		2,57	1,08			+		
			2,88	1,95	1,82	3,15	2,12		3,00	0,83	0,84	1,01		2,83	0,96			+		
			3,17	1,82	1,84	3,04	2,08		3,00	0,95	0,86	0,87		2,68	1,02			+		
		C-ase C: 5'		0,47			0,64				1,00									
		C-ase C: 1 h		0,73			0,88				1,00									
		C-ase C: 3 h		0,81		0,23	1,36				1,00									
		C-ase C: 6 h		0,94		0,66	1,74				1,00									
B-S ₁	1—2				1,00									0,89						
B-S ₂	3—5		1,00	0,92								0,97								
B-S ₃	6—10		2,00		0,93	1,05								0,78						
B-S ₄	11—17					0,83			2,00	1,03				0,92	1,02			+		
B-S ₅	18—23			1,02		1,08	2,15		1,00		0,93									
		1. EDMAN		1,00		0,93	2,08		0,21											
		2. EDMAN		1,00		0,52	2,13		0,10											
		3. EDMAN		1,00		0,30	1,65													
		C-ase C: 15'		0,34			0,46				1,00									
		C-ase C: 1 h		0,60			0,71				1,00									
		C-ase C: 3 h		0,87			1,12				1,00									
C 1	1—2				1,00									0,97						
														+ ^b						
		C-ase A: 24 h			1,00															
C 2	1—10	Restpeptid	3,00	1,00	1,92	1,03						1,03		1,37						0,89
		C-ase A: 15'												1,00						1,04
		C-ase A: 2 h												1,00						1,14
		C-ase A: 24 h												1,00						
C 3	1—12		3,00	0,83	2,40	1,88						1,07		2,04						0,81
		C-ase A: 6 h												1,00						
C 4	1—13		3,00	0,79	1,97	2,00						0,95		2,48	1,01					0,25
		C-ase A: 15'												1,56	1,00					0,39
		C-ase: 2 h												1,26	1,00					
C 5	7—10		0,84		0,95	1,00								+ ^b						
C 6	11—13					1,00								0,89	1,19					
		C-ase A: 15'												0,18	1,00					
		C-ase: 10 h												0,31	1,00					
C 7	14—16								2,00	1,15										
C 8	14—17								2,00	0,87										
C 9	14—23			1,03		1,09	2,20		3,00	0,96	0,96									
C 10	18—23			0,97		1,11	1,95		1,00		1,19									
C 11	18—27		1,40	1,12		2,00	1,57		1,16		+		1,00				0,89			
C 12	24—27		0,94			1,00							0,80				0,77			
		1. EDMAN		1,02		1,00							0,20				+			
		2. EDMAN		0,41		1,00							0,15				+			
C 13	28—31				0,95				1,00	0,91			0,91							
		1. EDMAN			0,94				1,00				1,00							
		2. EDMAN			0,41				1,00				1,14							
		C-ase A: 30'											+							

Peptid	Position	Behandlung	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Met ^c	Ile	Leu	Tyr	Phe	Arg	Cys ^{a/d}	Trp ^b	Asn	Gln
C 14	28—35	C-ase A: 18h Restpeptid			2,55	1,03			0,95	0,66			1,05	0,35						
					+									+						
C 15	28—38	EDMAN		1,00	2,03	1,02			1,00	0,88			1,05							
				0,91	2,94	2,66			1,00	0,97			1,06	0,31						
C 16	32—35	1. EDMAN 2. EDMAN C-ase A: 16h Restpeptid			2,52	2,80			1,00				1,05	0,73						
					2,00	1,00								0,72						
					1,10	1,00								0,61						
					0,90	0,64								0,60						
														+ ^d						
C 17	36—41	1. EDMAN 2. EDMAN		1,00	1,71	1,00			1,02	1,10						+ ^b				
				0,90		1,94		1,02	1,10							+ ^d				
C 18	39—41	C-ase B: 6h EDMAN		0,69		1,12		0,97	1,00							+ ^d				
						1,08		1,07	0,93							+ ^d				
								1,15	1,00							+ ^d				
S 1	1—2							1,00	0,41					0,54						
S 2	1—5		1,00	0,96	1,15									0,70						
S 3	3—5	AP-ase: 24h	1,00	0,80									0,94							
													0,85						+ ^d	
S 4	3—10		2,40	0,97	1,28	1,00						0,99		0,49						
S 5	6—10		2,00		1,28	1,00								0,77						
S 6	9—13					1,75								0,55	1,00					
S 7	11—13	C-ase A: 15'				0,82								+ ^b	1,00					
														0,22	1,00					
S 8	14—15							2,00												
S 9	14—16	2. EDMAN C-ase A: 24h						2,00		1,14										
								0,77	1,00											
									0,57											
S 10	14—17	C-ase A: 24h						2,00	0,82									+		
									0,27									+		
S 11	18—23	AP-ase: 24h		0,88		1,00	2,36		0,76			0,81								
									0,54											
S 12	18—27	C-ase B: 24h	1,22	1,17		1,94	2,00		1,00		+		0,95				+			
																	0,80			
S 13	24—25		0,77										1,00							
S 14	26—27					1,00											+			
S 15	27																1,00			
S 16	28—31				0,93				1,00	0,79			0,98							
S 17	32—37			0,76	1,71	2,00								0,47						
S 18	32—38	1. EDMAN 2. EDMAN		1,05	1,83	3,00								0,52						
				1,00	1,00	2,57								0,89						
				1,00	1,00	2,50								0,80						
S 19	39—41							1,07	1,00							+ ^d				
P 1	1—3	C-ase A: 24h	1,00		0,92									0,58						
														+ ^d					+ ^d	
P 2	1—8		2,52	0,86	1,69								1,00	0,98						
P 3	4—10	AP-ase: 2h	1,40	0,92	0,86	0,36							1,00	+ ^b						
												0,55								
P 4	6—10	EDMAN	1,64		1,00	1,00								+ ^b						
			1,09		0,88	1,00								0,59						
P 5	7—10	EDMAN	0,99		0,80	1,00								0,42						
			0,83		0,31	1,00								0,70						

Tab. 3. Partialpeptide des tryptischen Peptids T I (vgl. mit Abb. 2). a) Nachweis als *S*- β -Aminoäthylcystein, b) Sprühtest auf Papier, c) Summe von Methionin und -derivate, d) Identifizierung durch Chromatographie im BEW-System. Werte unter 0,10 sind nicht aufgeführt.

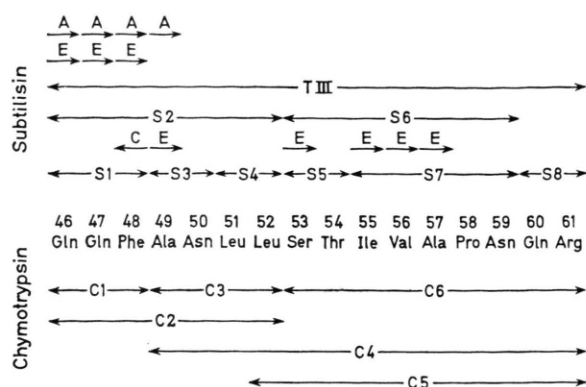


Abb. 3. Partialpeptide und Aminosäuresequenz des tryptischen Peptids T III (vgl. mit Tab. 4).

Reihenfolge der drei ersten tryptischen Peptide

Das Virusprotein wurde in 8-m. Harnstofflösung einer BrCN-Behandlung¹⁷ (37°, 18 h) unterworfen und das interessierende Stück zwischen den Methioninen in den Positionen 23 und 84 durch Gelfiltration auf Sephadex G 50 in 20-proz. Pyridin isoliert. Nach Chymotrypsin-Behandlung und Chromatographie auf Dowex 1 x 2 wurden zwei „Brückenpeptide“ isoliert: Pos. 41 – 43 und Pos. 36 – 49. Dar-

aus ergibt sich folgende Reihenfolge der tryptischen Peptide: TI – TII – TIII.

Diskussion

Die Ermittlung der Sequenz der Aminosäuren im Hüllprotein des TMV-Stammes Holmes rib grass (HRG) ist u. a. deshalb von besonderem Interesse, weil HRG derjenige TMV-Stamm ist, von dem zu erwarten war, daß er in seiner primären Proteinstruktur gegenüber dem TMV-Wildstamm vulgare am meisten von allen bisher untersuchten Stämmen abweicht.

Diese Erwartung wurde nicht nur dadurch bestätigt, daß der Anteil der Positionen mit unterschiedlichen Aminosäuren zwischen vulgare und HRG mit rund 56% ein bisher unerreichtes Maximum ausmacht (18% zwischen vulgare und dahlense bzw. 26% zwischen vulgare und U2), sondern auch dadurch, daß HRG der erste TMV-Stamm ist, von dem gefunden wurde, daß er in der Zahl der Aminosäuren pro Proteinkette von allen anderen TMV-Stämmen abweicht, deren Sequenz untersucht wurde. Gegenüber 158 Aminosäuren bei den TMV-Stämmen

Peptid	Position	Behandlung	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Arg	Gln
T III	46–61		1,94	0,96	0,89	2,74	1,07	2,00	0,92	0,88	2,04	1,03	0,94	
		1. Edman	2,05	1,02	0,97	2,23	1,02	2,00	0,96	0,84	1,91	1,08	+	
		2. Edman	1,89	0,88	0,86	1,87	1,09	2,00	0,86	0,92	1,85	0,97	+	
		3. Edman	1,99	0,94	0,91	1,33	0,93	2,00	0,98	0,90	2,01	0,74	+	
		AP-ase: 30'										0,18		1,00
		AP-ase: 60'										0,24		1,00
		AP-ase: 120'										0,35		1,00
C ₁	46–48					1,76						1,00		
C ₂	46–52		1,03			1,87		1,00			1,93	0,96		
C ₃	49–52		0,94					1,00			2,02			
		Edman	1,00					0,21			2,10			
C ₄	49–61		2,05	0,93	0,91	0,99	1,02	2,00	0,87	0,92	1,86		+	
C ₅	52–61			0,97	0,94	1,00	1,10		0,90	0,88	0,73		+	
C ₆	53–61			0,96	0,91	1,00	1,03		0,93	0,90			+	
		Edman		0,98	0,18	1,00	0,97		0,97	0,92			+	
S ₁	46–48					1,87						1,00		
		C-ase A				0,62						1,00		
S ₂	46–52		0,98			1,86		1,00			1,86	1,02		
S ₃	49–50		0,86					1,00						
		Edman	1,00					0,34						
S ₄	51–52										1,00			
S ₅	53–54			1,00	0,97									
		Edman		1,00	0,38									
S ₆	53–59		1,05	0,96	0,90		1,07	1,00	0,87	0,85				
S ₇			0,92	0,98	0,92		1,02	1,00	0,97	0,90				
		1. Edman	1,02	0,94	0,31		1,06	1,00	0,83	0,95				
		2. Edman	1,06	0,42	0,17		0,98	1,00	0,94	0,91				
		3. Edman	0,94	0,30	0,11		0,93	1,00	0,92	0,52				
S ₈	60–61					0,81							1,00	

Tab. 4. Partialpeptide des tryptischen Peptids T III (vgl. mit Abb. 3).

vulgare, dahlmense und U2 sind in der Proteinkette von HRG nur 156 Aminosäuren vorhanden.

Dies geht aus der Tab. 1 hervor, in der die Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide des HRG-Proteins zusammengestellt ist. Addiert man die Aminosäuren in den tryptischen Peptiden, so erhält man die gleiche Summe, die auch die Aminosäureanalysen des HRG-Proteins (Tab. 2)

²⁰ H. G. WITTMANN, I. HINDENNACH u. B. WITTMANN-LIEBOLD, Z. Naturforsch. **24b**, 877 [1969].

ergeben. Dies schließt aus, daß ein tryptisches Peptid während der Isolierung und Reinigung verloren gegangen ist. In einer folgenden Mitteilung²⁰ über die Aminosäuresequenzen in den Positionen 62 bis 156 des HRG-Proteins wird gezeigt, daß die zwei Aminosäuren innerhalb des C-terminalen tryptischen Peptids fehlen. In dieser Mitteilung werden auch weitere Schlußfolgerungen aus dem Vergleich der Primärstrukturen der vier bisher untersuchten TMV-Stämme diskutiert.

Die primäre Proteinstruktur von Stämmen des Tabakmosaikvirus

Teil VI: Aminosäuresequenz (Positionen 62-156) des Proteins des Tabakmosaikvirusstammes Holmes rib grass

H. G. WITTMANN, I. HINDENNACH und B. WITTMANN-LIEBOLD

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem, und
Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen

(Z. Naturforsch. **24b**, 877—885 [1969]; eingegangen am 29. Januar 1969)

Experimental data for determining a) the amino acid sequences of eight tryptic peptides containing 95 amino acids and b) the order of the tryptic peptides are given. Combining the data of this and of a previous paper the complete amino acid sequence of the coat protein of the TMV strain Holmes rib grass (HRG) is established (Fig. 5). It is compared with three other TMV strains the sequences of which have been determined before (Fig. 6).

Differences and similarities between the sequences of the four TMV strains are discussed. HRG has a deletion of two amino acids and it is the most distantly related of the four TMV strains. When the sequence of HRG is compared to that of any of the other strains it turns out that in each case more than 50% of the 156 positions contain different amino acids (Fig. 7).

The number of positions with the same amino acid in all strains and mutants so far studied is 30 per cent. These positions are not randomly distributed but clustered mainly in two regions. This finding probably reflects the restriction of amino acid exchanges by the spatial structure of the viral rod.

In einer vorhergehenden Publikation¹ wurde über die Ermittlung der Aminosäuresequenz in den Positionen 1—61 des Hüllproteins des Tabakmosaikvirus-Stammes Holmes rib grass (HRG) berichtet. Die vorliegende Mitteilung enthält die Ergebnisse, durch die die Aufstellung der Aminosäuresequenz in den restlichen Positionen (62 bis 156) des genannten Virusstammes ermöglicht wurde. Außerdem wird die Sequenz des HRG-Stammes mit der der drei anderen TMV-Stämme, deren Aminosäuresequenzen bereits früher ermittelt wurde, verglichen.

Material und Methoden

Sie sind in der vorhergehenden Veröffentlichung¹ entweder beschrieben oder zitiert worden.

¹ J. JAUREGUI-ADELL, I. HINDENNACH u. H. G. WITTMANN, Z. Naturforsch. **24b**, 870 [1969].

Ergebnisse

Im folgenden werden die an den tryptischen Peptiden durchgeführten Untersuchungen sowie deren Ergebnisse in Tabellen und Abbildungsübersichten aufgeführt. Die tryptischen Peptide wurden, wie bereits beschrieben¹, isoliert. Nach enzymatischer Spaltung der Peptide TV, TVIII, TX und TXI mit Chymotrypsin bzw. Subtilisin wurden die Partialpeptide durch Säulenchromatographie auf Dowex 1 x 2 und anschließender Papierchromatographie in der von uns früher ausführlich beschriebenen Weise isoliert und gereinigt.

Tryptisches Peptid TIV (Positionen 62—68)

Die Aminosäuresequenz dieses Peptids wurde durch mehrstufigen E d m a n - Abbau und durch an-