

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

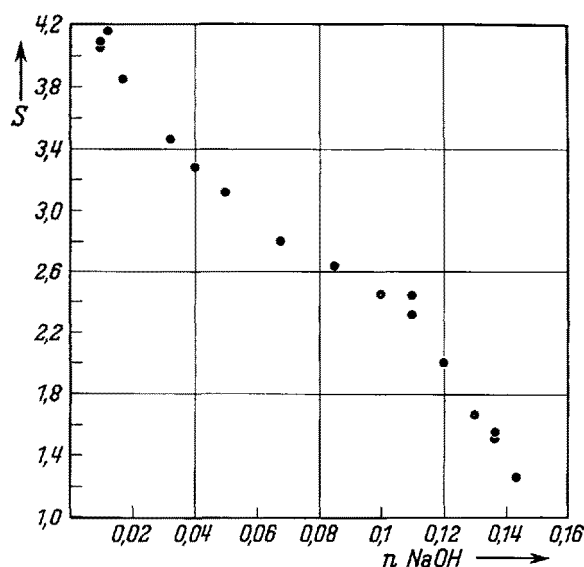
Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Darstellung und physikochemische Charakterisierung der Peptidketten des Tabakmosaikvirus

Endgruppen- und Röntgenstrukturanalysen haben ergeben, dass der Proteinmantel des Tabakmosaikvirus ($M \approx 40 \cdot 10^6$) aus ca. 2300 Peptidketten besteht. Es ist bisher jedoch noch nicht gelungen, das Virus bis zu den einzelnen Peptidketten zu spalten und deren Grösse mit physikochemischen Methoden zu bestimmen. Es gibt meines Wissens nur zwei Literaturangaben^{1,2} über den Versuch einer Virusspaltung, welche die Grösse des sogenannten A-Proteins ($M \approx 90-100 \cdot 10^3$) unterschreitet. Dabei sind die Zentrifugierungen in sehr ionenarmen Lösungen durchgeführt und daher mit dem durch den primären Ladungseffekt bedingten Fehler behaftet; Diffusionsmessungen fehlen gänzlich. Bisher nicht veröffentlichten Versuchen³ zufolge kann man nach Phenolspaltung des Virus und Lösen in verdünnter Natronlauge unter Ausschluss der Luftkohensäure ein Protein mit $M \approx 18800$ erhalten. - Für den Vergleich zwischen elektrophoretischen und biochemischen Untersuchungen an unseren TMV-Stämmen⁴⁻⁶ erwies es sich als notwendig, das Virusprotein bis zu den Peptidketten abzubauen. Es werden im folgenden Methoden für die Spaltung des TMV beschrieben. Über einen Teil der Experimente wurde bereits auf dem IV. Internationalen Biochemie-Kongress in Wien berichtet⁶. - Die Grösse der Spaltprodukte wurde durch Sedimentations- und Diffusionsmessungen bestimmt; die Zentrifugierungen erfolgten mit der Meyerhoffischen Unterschichtungszone in einer luftgetriebenen analytischen Phywe-Ultrazentrifuge bei 51000 U/min und 20°C. Alle angegebenen Werte sind hinsichtlich Viskosität, Dichte, Temperatur und ggf. Druck auf Wasser und 20° korrigiert, wobei die Korrekturwerte entweder experimentell bestimmt oder Tabellen entnommen sind. - Der Virusabbau erfolgte im einzelnen nach folgenden Methoden:

1. In m/50 Phosphatpuffer pH 7 befindliches TMV wurde bei 4°C 12-15 min lang mit wassergesättigtem Phenol⁷ geschüttelt, nach Zentrifugation die Phenolphase mit etwas mit Natriumacetat gesättigtem Methanol versetzt, das Protein mit Methanol gefällt und je 2mal mit Methanol bzw. Äther gewaschen. Das getrocknete Proteinpulver (0,2%) wurde in 0,12% Natriumdodekylsulfat (NDS) enthaltendem Veronalpuffer (pH 8, m/50) gelöst (3 min; 70°C). Unter Berücksichtigung der Veränderung des partiellen spezifischen Volumens durch die Bindung von NDS an das Protein ergibt sich: $s_{20,w} = 1,9$ S und $D_{20,w} = 8,6 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec. Wird NaCl ($I = 0,1$) zu der obigen Lösung nach dem Erkalten hinzugefügt und dialysiert, so betragen $s_{20,w} = 2,1$ S und $D_{20,w} = 7,5 \cdot 10^{-7}$ cm²/

sec. Ähnliche Werte erhält man, wenn TMV bei pH 8 in m/50 Veronalpuffer, dem 0,05% NDS zugesetzt wurde, für 5 min auf 80-85°C erhitzt und nach dem Abkühlen der Lösung NaCl zugegeben wird.



$s_{20,w}$ -Werte nach 10-15stündiger Dialyse des unter Nr. 2 beschriebenen TMV-Proteins (0,5%) gegen verschiedene NaOH-Konzentrationen; Ionenstärke durch NaCl-Zusatz konstant erhalten.

2. TMV wurde mit Phenol gespalten und das Proteinpulver in n/10 NaOH durch kurzes Erwärmen auf 40° gelöst. Nach 10-15stündiger Dialyse bei 20° in einem geschlossenen Erlenmeyer gegen 0,01 bis 0,15 n Natronlauge, der zur Vermeidung des primären Ladungseffektes NaCl bis zur Gesamtionenstärke $I = 0,15$ zugefügt wurde, trat bei der Zentrifugierung immer nur ein einheitlicher Gradient auf; in der Abbildung ist $s_{20,w}$ in Abhängigkeit von der NaOH-Konzentration aufgetragen. Zusatz von NaCl über $I = 0,1$ hinaus verändert den $s_{20,w}$ -Wert nicht, während bei niedrigen Ionenstärken ein deutlicher Einfluss des zugesetzten NaCl auf $s_{20,w}$ vorhanden ist, wie in mehreren Versuchsreihen bei konstanter NaOH-Konzentration und variierendem Na-Cl-Zusatz bei gleich langer Dialyse gezeigt werden konnte. Aus Viskositäts- und Diffusionsmessungen geht hervor, dass die aus der Abbildung ersichtliche Abhängigkeit des S-Wertes von der angewendeten NaOH-Konzentration nicht auf eine Entfaltung, sondern eher auf eine partielle Hydrolyse des Proteins zurückzuführen ist, dabei können sekundäre Bindungen zwischen den Peptidketten vorhanden sein. Diese Folgerung wird dadurch gestützt, dass mit zunehmender Dialyse-Zeit (über mehrere Tage verfolgt) $s_{20,w}$ einer bestimmten Proteinlösung abnimmt, und zwar um so schneller, je höher die NaOH-Konzentration ist. Als weiterer Beweis für die Spaltung lässt sich anführen: Dialyse gegen n/10 NaOH für 10 h ergibt 2,4 S, nach weiterer 10stündiger Dialyse dieser Lösung gegen n/50 NaOH erhöht sich der Wert nicht auf 3,5 S, den eine 20 h gegen n/50 NaOH dialysierte Lösung ergibt, sondern er beträgt nur noch 2,3 S. Die Verringerung des S-Wertes

¹ R. T. Hersh und H. K. Schachman, zitiert bei: H. Fraenkel-Conrat und B. Singer, J. Amer. chem. Soc. 76, 180 (1954).

² P. Newmark und R. W. Myers, Fed. Proc. 16, 226 (1957).

³ A. Anderer, persönl. Mitteilung, Dez. 1958.

⁴ E. Kramer und H. G. Wittmann, Z. Naturforsch. 13b, 30 (1958).

⁵ H. G. Aach, Z. Naturforsch. 13b, 425 (1958).

⁶ H. G. Wittmann und E. Kramer, Proc. IV. Intern. Bioch. Kongr. Wien (1958), im Druck.

⁷ H. Schuster, G. Schramm und W. Zillig, Z. Naturf. 11b, 339 (1956).

ist demnach ein irreversibler Prozess. Folgendes Ergebnis weist in dieselbe Richtung: Erwärmung des in $n/10$ NaOH gelösten Proteins für 10 min auf Temperaturen zwischen $40-100^\circ$ und anschließende Dialyse (10 h; $n/10$ NaOH; 20°) ergibt einen deutlichen Abfall von 2,4 auf 0,9 S. – Wird die Proteinsubstanz direkt in NaOH der gewünschten Stärke gelöst und nach NaCl-Zugabe ($I' = 0,15$) sofort zentrifugiert, so erhält man in $n/50$ bis $n/7$ NaOH Werte um 2,8 S; das heisst, dieser Sedimentationskoeffizient ist höher, als für Peptidketten mit $M \approx 16000-18000$ erwartet werden muss. – Man kann aus den genannten Messungen in verdünnter NaOH nicht eindeutig auf ein bestimmtes M-Gewicht schliessen, da unter diesen Bedingungen mit dem Ablauf sekundärer Prozesse zu rechnen ist.

3. 60 Volumenteile bis kurz über dem Erstarrungspunkt gekühlter 99prozentiger *Essigsäure* wurden mit 30 Teilen Viruslösung (in H_2O) bei 4° gemischt⁸ und 15 min unter leichtem Schütteln stehen gelassen, die ausgefallene RNS abzentrifugiert und zu dem Überstand 10 Volumenteile 2,5 m NaCl zugesetzt. Auf $c = 0$ extrapoliert, betragen s_{20} , $w = 1,25$ S und D_{20} , $w = 7,9 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec, woraus sich $M = 17800$ errechnet.

4. TMV wurde 24 h bei 4° gegen $m/10$ Glykokollpuffer pH 10,5 dialysiert, das Protein zweimal mit $(NH_4)_2SO_4$ gefällt und gegen $m/50$ Veronalpuffer pH 8,0 dialysiert. UV-Absorptionsmessungen in Phosphatpuffer pH 7 gaben über die Reinheit des Proteinpräparates Aufschluss. Um die bei der Denaturierung durch die folgende *Pyridin*-Behandlung freiwerdende SH-Gruppe des Proteins zu blockieren und dadurch eventuelle sekundäre SH-Reaktionen zu verhindern, wurde p-Chloromercuribenzoat (pCMB) in einer Endkonzentration von $m/1000$ zugegeben. 70 Volumenteile der Proteinlösung (in Veronalpuffer + pCMB) wurden mit 30 Volumenteilen Pyridin gemischt und vor der Zentrifugierung mit 10 Teilen $m/1$ NaCl versetzt. Als Ergebnis wurde s_{20} , $w = 1,35$ S und D_{20} , $w = 7,2 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec, beide auf $c = 0$ extrapoliert, sowie $M = 17300$ erhalten. – Zu ähnlichen Resultaten kommt man, wenn Virus tropfenweise zu der pCMB enthaltenden Pyridin-Wasserlösung unter Schütteln hinzugegeben und anschliessend NaCl ($I' = 0,1$) zugesetzt wird. Die Virusstäbchen zerfallen in der Pyridinlösung unter Denaturierung sofort in die Untereinheiten.

Fraülein INGRID HINDENNACH und KARIN SANDELIN danke ich für die wertvolle Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

H. G. WITTMANN

Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, 22. Dezember 1958.

Summary

Highly purified tobacco mosaic virus was split by different methods, the ribonucleic acid removed and the size of the protein sub-unit determined by sedimentation and diffusion. The value for the molecular weight of a polypeptide chain of the tobacco mosaic virus was calculated to be 17–18000.

⁸ H. FRAENKEL-CONRAT, *Virol.* 4, 1 (1957).

Über die Entstehung von Orientierungen in Nylon 6 durch Kontakt mit der Spaltfläche von KCl

An dem Beispiel der orientierten Aufwachsung von Polyäthylen auf NaCl haben J. WILLEMS und I. WILLEMS¹ erstmalig gezeigt, dass auch hochmolekulare organische Stoffe orientiert zu verwachsen vermögen. Diese Verwachsung wurde auf lichtmikroskopischem Wege gefunden. Das Verwachsungsgesetz und die kristallographische Natur der orientiert aufgewachsenen Teilchen des Polyäthylens wurden von FISCHER² mit Hilfe des Elektronenmikroskops aufgeklärt.

Bei weiteren systematischen Aufwachsungsversuchen mit organischen hochmolekularen Stoffen der verschiedensten Art unter Verwendung mannigfaltiger Trägerkristalle wurden keine mit dem Lichtmikroskop erkennbaren orientierten Teilchen der hochmolekularen Stoffe gefunden. Es wurde deshalb eine Methode ausgearbeitet, die Orientierungserscheinungen an hochmolekularen Stoffen an Grenzflächen auf lichtmikroskopischem Wege auch dann erkennen lässt, wenn die orientierten Teilchen an sich unter der Sichtbarkeitsgrenze des Lichtmikroskops liegen. Diese Methode besteht darin, dass der hochmolekulare Stoff als dünner Film auf die Trägerfläche in Lösung oder in der Schmelze aufgebracht und nach dem Ablösen des Trägers durch Aufwachsungsversuche mit geeigneten Gastsubstanzen auf der Filmfläche des hochmolekularen Stoffes festgestellt wird, ob eine Orientierung und gegebenenfalls welcher Art eingetreten ist. Nähere Einzelheiten über dieses «Abdruckverfahren», bei dem die Trägerfläche sozusagen als Matrice wirkt, werden an anderer Stelle veröffentlicht werden.

Nach diesem Abdruckverfahren gelang es, durch Aufbringen einer Lösung von Nylon 6 (Polyamid der ϵ -Aminocapronsäure) in Kresol auf (100) von KCl bei $195^\circ C$, einen Film zu erhalten, auf dessen Oberfläche nach dem Ablösen des KCl-Kristalls mit Wasser die nadelförmigen Kriställchen von aufgedampftem Pentachlorphenol sich in 4 Stellungen ausgezeichnet orientieren. Diese 4 Stellungen sind um 45° gegeneinander gedreht.

Elektronenmikroskopisch wird die weitere Aufklärung dieser Orientierung fortgeführt.

J. WILLEMS

Krefeld, Tiergartenstrasse 21, 1. Oktober 1958.

Summary

Oriented overgrowth of pentachlorophenol was obtained on a thin film of Nylon 6 produced in contact with (100) of KCl.

¹ J. WILLEMS und I. WILLEMS, *Exper.* 13, 465 (1957).

² E. W. FISCHER, *Faraday Soc. Discuss.* 1958 (im Druck).

A System in the Mammalian Skin Sensitive to X Irradiation and Insensitive to the Oxygen Effect

Molecular oxygen increases the effects of X or γ -irradiation. It has been questioned whether or not the substances which protect living organisms against X-irradiation act by reducing the oxygen pressure in the tissues,