

Näherung der Fall. Allerdings braucht man zur Berechnung der inneren Oberfläche noch den Volumanteil  $w$  der dispersen Phase bzw. den Volumanteil  $w'$  des Dispersionsmittels. Nachdem dieser Wert nicht genau bekannt ist, muß er im Ergebnis offen gelassen werden. Die innere Oberfläche ergab sich zu  $\frac{w'}{13} \text{ \AA}^{-1}$ . Dieser Wert steht mit der gefundenen Teilchengröße in vernünftiger Übereinstimmung, denn bei kreisförmigem Querschnitt erhält man den Durchmesser  $\frac{52}{w'} \text{ \AA}$ , bei quadratischem eine Kantenlänge von ebenfalls  $\frac{52}{w'} \text{ \AA}$ . Trotz der Unsicherheit bezüglich  $w$  zeigt die obige Betrachtung, daß die erhaltenen Resultate größenordnungsmäßig vernünftig sind. Die diesbezüglichen Versuche werden fortgesetzt.

Herrn cand. chem. *Paletta* sind wir für präparative Hilfe zu bestem Dank verpflichtet.

Die *Rockefeller Foundation* hat die vorliegende Untersuchung durch Bereitstellung apparativer Hilfsmittel in großzügiger Weise gefördert, wofür ihr auch an dieser Stelle unser besonderer Dank ausgesprochen sei.

### Cytochrom c.

### III. Zur Frage der Artspezifität von Säugetier-Cytochrom c.

(Kurze Mitteilung.)

Von

H. Tuppy und G. Bodo.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 14. September 1954.)

Wie in vorhergehenden Mitteilungen beschrieben worden ist, wurde Pferde-Cytochrom c sowohl hydrolytisch mit Mineralsäure<sup>1</sup> als auch proteolytisch mit Trypsin<sup>2</sup> abgebaut. Durch Untersuchung der im Gemisch der Bruchstücke enthaltenen Porphyrin-c-Peptide war es möglich, folgende Sequenz von 10 Aminosäureresten festzustellen:

...-Lys-CyS-Ala-Glu(NH<sub>2</sub>)-CyS-His-Thr-Val-Glu-Lys-...

Diese Aminosäurefolge ist dadurch ausgezeichnet, daß sie einen Teil der Proteinkomponente des Cytochroms c darstellt, welcher der prosthetischen Gruppe des Enzyms eng benachbart ist. In der Tat sind es die in der aufgeklärten Sequenz vorkommenden zwei Halbcystinreste (CyS), welche durch

<sup>1</sup> H. Tuppy und G. Bodo, Mh. Chem. 85, 807 (1954).

<sup>2</sup> H. Tuppy und G. Bodo, Mh. Chem. 85, 1024 (1954).

Ausbildung von Thioätherbrücken zu den Seitenketten 2 und 4 eines Eisenporphyrinmoleküls Eiweißanteil und Farbstoffkomponente des intakten Hämoproteids fest miteinander verbinden; auch ist es wahrscheinlich, daß der mit einem Halbcystinrest peptidisch verknüpfte Histidinrest (His) eine der zwei für die Hämochromnatur des Enzyms verantwortlichen und für seine katalytische Wirksamkeit mitentscheidenden „häm-gebundenen Gruppen“ darstellt.

Nachdem nun Methoden ausgearbeitet waren, die Aminosäuresequenz in unmittelbarer Nachbarschaft der prosthetischen Gruppe aufzuklären, lag es nahe, analoge Untersuchungen, wie sie mit *Pferde*-Cytochrom c angestellt worden waren, auch mit Cytochrom c anderer Tierarten auszuführen. Es war zu hoffen, auf diese Weise Aufschluß darüber zu gewinnen, bis zu welchem Grad die Struktur eines Proteins gleicher Funktion von einer Tierspezies zur anderen Abwandlungen zeigt. Wohl durften keine allzu großen Unterschiede zwischen Cytochrom c verschiedener *Säugetierarten* erwartet werden, hatten doch bereits *Theorell* und *Åkeson* gezeigt<sup>3</sup>, daß *Rinder*- und *Pferde*-Cytochrom c hinsichtlich ihres Molekulargewichtes und des Stickstoff- und Schwefelgehaltes übereinstimmten und auch im pH-Bereich 1,6 bis 11 identische Titrationskurven lieferten. Spätere serologische Untersuchungen<sup>4</sup> sprachen ebenfalls für eine nahe Verwandtschaft von *Pferde*-, *Rinder*- und *Schweine*-Cytochrom c. Andererseits hatte ein genauer Vergleich von Cytochrom c aus den letztgenannten drei Tierspezies *Tint* und *Reiss* zur Überzeugung gebracht, daß in ihren Präparaten wohl Identität der prosthetischen Gruppe, nicht jedoch des Proteinanteiles besteht<sup>5</sup>.

Die für unsere Abbauversuche verwendeten Cytochrom-c-Präparate aus *Rinder*- und *Schweineherzmuskel* waren (ebenso wie das früher untersuchte *Pferde*-Cytochrom c) nach *Keilin* und *Hartree* dargestellt<sup>6</sup>; nach Reinigung mit dem Ionenaustauscher Amberlite IRC-50 in der von *Margoliash* beschriebenen Weise<sup>7</sup> zeigten sie einen Eisengehalt von 0,39 bis 0,41% bzw. 0,43 bis 0,44%.

Partielle Hydrolyse mit 20%iger Schwefelsäure, nachfolgende Abtrennung der Porphyrin-c-Peptide, Spaltung der Thioätherbrücken mit Silbersulfat<sup>8</sup>, Oxydation der erhaltenen Cysteinpeptide mit Perameisensäure und Trennung der Cysteinsäurepeptide durch Ionophorese und Papierchromatographie erfolgten auf die gleiche Art wie früher beschrieben<sup>1</sup>. In Tabelle 1 sind die nach Säureabbau aus *Rinder*- und *Schweine*-Cytochrom c gewonnenen und identifizierten Peptide der Cysteinsäure zum Vergleich mit jenen, die zuvor aus *Pferde*-Cytochrom c erhalten worden waren<sup>1</sup>, zusammengestellt.

<sup>3</sup> *H. Theorell* und *Å. Åkeson*, *J. Amer. Chem. Soc.* **63**, 1804 (1941).

<sup>4</sup> *E. L. Becker* und *J. Munoz*, *J. Immunol.* **63**, 173 (1949).

<sup>5</sup> *H. Tint* und *W. Reiss*, *J. Biol. Chem.* **182**, 397 (1950).

<sup>6</sup> *D. Keilin* und *E. F. Hartree*, *Biochemic. J.* **39**, 289 (1945).

<sup>7</sup> *E. Margoliash*, *Nature* **170**, 1014 (1952).

<sup>8</sup> *K. G. Paul*, *Acta Chem. Scand.* **4**, 239 (1950).

Tabelle 1. Durch partielle Hydrolyse des Cytochroms c gewonnene Peptide der Cysteinsäure\*.

Aus Rinder-Cytochrom c	Aus Schweine-Cytochrom c	Aus Pferde-Cytochrom c
Lys-CySO <sub>3</sub> H	Lys-CySO <sub>3</sub> H	Lys-CySO <sub>3</sub> H
Lys-[CySO <sub>3</sub> H, Ala]		Lys-[CySO <sub>3</sub> H, Ala]
CySO <sub>3</sub> H-Ala	CySO <sub>3</sub> H-Ala	CySO <sub>3</sub> H-Ala
	CySO <sub>3</sub> H-[Ala, Glu]	CySO <sub>3</sub> H-[Ala, Glu]
		Glu-CySO <sub>3</sub> H
Glu-[CySO <sub>3</sub> H, His]	Glu-[CySO <sub>3</sub> H, His]	Glu-[CySO <sub>3</sub> H, His]
CySO <sub>3</sub> H-His	CySO <sub>3</sub> H-His	CySO <sub>3</sub> H-His
	Ala-CySO <sub>3</sub> H**	Ala-CySO <sub>3</sub> H**

\* Die Cysteinsäurereste (CySO<sub>3</sub>H) sind aus den in Cytochrom c vorliegenden 2 Halbcystinresten (CyS) bei der Aufarbeitung durch Oxydation mit Perameisensäure gebildet worden.

\*\* Durch Umlagerung entstanden<sup>1</sup>.

Verdauung von Rinder- und Schweine-Cytochrom c mit Trypsin und Reinigung der dabei entstehenden Ferriporphyrin-c-Peptide (tr-FePc-Peptide) ließ sich auf die gleiche Weise bewerkstelligen<sup>2</sup> wie im Falle des Pferde-Cytochroms c. Die den 3 Säugetierarten entstammenden tr-FePc-Peptide zeigten alle die gleiche Aminosäurezusammensetzung: sie enthalten, abgesehen von den an die prosthetische Gruppe gebundenen Halbcystinresten, Glutaminsäure, Threonin, Alanin, Valin, Lysin und Histidin. Spaltung der die Farbstoffkomponente mit dem Peptidanteil verknüpfenden Thioätherbrücken mit Silbersulfat<sup>3</sup> und Oxydation der freigewordenen Sulphydrylgruppen zu Sulfosäuregruppen mit Hilfe von Perameisensäure ließ aus den tr-FePc-Peptiden je ein cysteinsäurehaltiges, farbstoff-freies Peptid — kurz „Enneapeptid“ genannt<sup>2</sup> — entstehen. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die durch partielle Hydrolyse der 3 „Enneapeptide“ mit Salzsäure gewonnenen und mit Hilfe von Ionophorese und Papierchromatographie getrennten Bruchstücke.

Tabelle 2. Durch partielle Hydrolyse der „Enneapeptide“ gewonnene niedrigere Peptide.

Aus Rinder-Cytochrom c	Aus Schweine-Cytochrom c	Aus Pferde-Cytochrom c
CySO <sub>3</sub> H-Ala	CySO <sub>3</sub> H-Ala	CySO <sub>3</sub> H-Ala
CySO <sub>3</sub> H-[Ala, Glu]	CySO <sub>3</sub> H-[Ala, Glu]	CySO <sub>3</sub> H-[Ala, Glu]
	CySO <sub>3</sub> H-[Ala, Glu, CySO <sub>3</sub> H]	
Ala-Glu	Ala-Glu	Ala-Glu
Glu-CySO <sub>3</sub> H	[Glu-CySO <sub>3</sub> H]	Glu-CySO <sub>3</sub> H
Glu-[CySO <sub>3</sub> H, His]	Glu-[CySO <sub>3</sub> H, His]	Glu-[CySO <sub>3</sub> H, His]
CySO <sub>3</sub> H-His	[CySO <sub>3</sub> H, His]	CySO <sub>3</sub> H-His
	Thr-Val	
Thr-[Val, Glu]	Thr-[Val, Glu]	Thr-[Val, Glu]
Thr-[Val, Glu, Lys]	Thr-[Val, Glu, Lys]	Thr-[Val, Glu, Lys]
		[Val, Glu]
Glu-Lys	Glu-Lys	Glu-Lys

Im allgemeinen wurden die bei der partiellen Hydrolyse anfallenden Bruchstücke von Peptidnatur durch totale Hydrolyse und durch Bestimmung der aminoendständigen Aminosäurereste mit *Sangers* DNP-Methode<sup>9</sup> charakterisiert; die solcherart gewonnenen Ergebnisse wurden in die Tabellen 1 und 2 aufgenommen. Gelegentlich wurde jedoch auch — versuchsweise und im Mikromaßstab — die von *Akabori* und Mitarb.<sup>10</sup> zur Kennzeichnung der carboxylendständigen Reste vorgeschlagene Methode der Hydrazinolyse angewendet, bei der alle Aminosäuren mit peptidisch verknüpfter Carboxylgruppe Aminosäurehydrazide und nur die C-terminalen Reste freie Aminosäuren liefern sollen. Papierchromatographisch getrennte und vom Papier eluierte Peptide wurden in etwa 50  $\mu$ l wasserfreiem Hydrazin gelöst und in verschmolzenen Kapillaren aus Jenaer Glas 4 bis 5 Stdn. lang auf 105° erhitzt. Nach Eindunsten im evakuierten Exsikkator über Schwefelsäure wurden die Hydrazinolysate auf Papier eindimensional mit Phenol als Lösungsmittel chromatographiert, ohne daß zuvor eine Trennung der freien Aminosäuren von den Aminosäurehydraziden vorgenommen worden wäre. Eine Unterscheidung der 2 Verbindungsklassen ist dadurch möglich, daß Aminosäuren auf Papier bei vorsichtigem Erhitzen mit Ninhydrin rasch violette Flecken geben, indessen Aminosäurehydrazide sich anfangs nur schwach gelb und erst nach längerer Zeit violett färben. Es erwies sich, daß unter den angegebenen Bedingungen der Hydrazinolyse aus jenen Aminosäureresten, deren Carboxylgruppen in Peptidbindung standen, tatsächlich keine freien Aminosäuren hervorgingen, so daß die Identifizierung einer Aminosäure in einem Hydrazinolysat eindeutiger Nachweis für das Vorliegen und die Natur eines C-terminalen Aminosäurerestes war; hingegen kann auch der carboxylendständige Rest eines Peptids unter Umständen beträchtliche Mengen von Hydrazid bilden, worunter die Ausbeute an freier Aminosäure empfindlich leidet. Insbesondere Peptide mit C-terminalem Glutaminsäurerest ließen, wenn überhaupt, nur geringfügige Mengen freier Glutaminsäure entstehen. Immerhin war die Methode der Hydrazinolyse infolge ihrer bestechenden Einfachheit und der Möglichkeit, im Mikromaßstab ausgeführt zu werden, eine erwünschte Ergänzung der klareren DNP-Methode. Der Abbau einiger aus Schweine-Cytochrom c gewonnener und in der zweiten Spalte der Tabelle 2 angeführter Peptide mit Hydrazin ergab eindeutige Resultate, die teils Kenntnisse erhärteten, die bereits auf andere Weise erworben worden waren, teils auch neue vermittelten:  $\text{CySO}_3\text{H-Ala}$ ;  $[\text{CySO}_3\text{H}, \text{Ala}]\text{-Glu}$ ;  $\text{Glu-CySO}_3\text{H}$ ;  $\text{CySO}_3\text{H-His}$ ;  $\text{Thr-}[\text{Val}, \text{Glu}]\text{-Lys}$ .

Das „Enneapeptid“ aus Schweine-Cytochrom c wurde auch, ebenso wie schon zuvor jenes aus Pferde-Cytochrom c<sup>2</sup>, mit dem bakteriellen Enzym „Subtilisin“<sup>11</sup> weiter abgebaut; hierbei wurden vorwiegend 3 Peptide erhalten:  $\text{CySO}_3\text{H-}[\text{Ala}, \text{Glu}[\text{NH}_2]^*]$ ,  $\text{CySO}_3\text{H-His}$  und  $[\text{Thr}, \text{Val}, \text{Glu}, \text{Lys}]$ .

Die hier mitgeteilten Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß

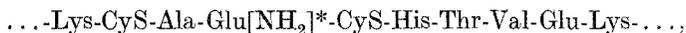
<sup>9</sup> *F. Sanger*, *Biochemic. J.* **39**, 507 (1945). — *F. Sanger* und *E. O. P. Thompson*, *ibid.* **53**, 353 (1953).

<sup>10</sup> *S. Akabori*, *K. Ohno* und *K. Narita*, *Bull. Chem. Soc. Japan* **25**, 214 (1952).

<sup>11</sup> *A. V. Güntelberg*, *C. r. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.* **29**, 27 (1954). — *A. V. Güntelberg* und *M. Ottesen*, *ibid.* **29**, 36 (1954).

\* Mit der Formulierung  $\text{Glu}[\text{NH}_2]^*$  wird angedeutet, daß dieser Glutaminsäurerest wahrscheinlich als Glutaminylrest,  $\text{Glu}(\text{NH}_2)$ , vorliegt.

die zuvor aufgeklärte Sequenz von 10 Aminosäureresten in Nachbarschaft der prosthetischen Gruppe des *Pferde*-Cytochroms c<sup>2</sup>,



auch in *Schweine*- und *Rinder*-Cytochrom c vorliegt.

Die Identität einer 10 Aminosäurereste umfassenden Peptidkette in Cytochrom c aus 3 verschiedenen Säugetierarten ist erstaunlich mit Hinblick auf die sowohl serologisch als auch chemisch wohlbegründete Ansicht, daß die allermeisten Proteine Artspesifität zeigen. Andererseits ist der Befund völliger Gleichheit der Dekapeptidsequenz bei Pferd, Rind und Schwein insofern befriedigend, als sich diese doch in unmittelbarer Nähe der prosthetischen Gruppe des Cytochroms c befindet, für die enzymatische Aktivität des Proteins mitentscheidend ist und somit die Möglichkeit besteht, daß sie sich ohne Verlust ihrer spezifischen Funktion nicht oder nur geringfügig abwandeln läßt. Es bleibt freilich abzuwarten, ob die Identität der Aminosäuresequenz in Säugetiercytochrom c sich auf die Nachbarschaft zum Ferriporphyrin beschränkt oder als weiterreichend erweisen wird.

Bei der Ausführung der vorliegenden Arbeit war die Hilfe, die uns der Vorstand unseres Institutes, Herr Prof. Dr. *F. Wessely*, durch stete Förderung, die Herren Prof. *K. Linderström-Lang* und *M. Ottesen* durch Überlassung kristallisierten Subtilisins und die Österreichische Akademie der Wissenschaften durch eine Zuwendung aus den Erträgen der *Seegen*-Stiftung angedeihen ließen, von größtem Wert. Hierfür sei herzlich gedankt.

## Zur Kenntnis des alkalischen Zuckerabbaues.

(IX., kurze Mitteilung.)

Von

**V. Prey, E. Waldmann, H. Berbalk und F. Sommer.**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien.

Mit 6 Abbildungen.

(Eingelangt am 22. Juli 1954.)

Nach den derzeit üblichen Anschauungen<sup>1, 2</sup> tritt bei der Behandlung der Kohlehydrate im alkalischen Milieu ein Abbau über C<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>- und C<sub>5</sub>-Bruchstücke ein, der letzten Endes zu Säuren führt.

<sup>1</sup> *W. Löb* und *G. Pulvermacher*, *Biochem. Z.* **23**, 10 (1909). — *W. L. Evans*, *R. H. Edgar* und *G. P. Hoff*, *J. Amer. Chem. Soc.* **48**, 2665 (1926). — *O. Schmidt*, *Chem. Rev.* **17**, 137 (1935). — *H. Fredenhagen* und *K. F. Bon-*