

## Cytochrom c.

### I. Über die der prosthetischen Gruppe benachbarten Aminosäurereste\*.

Von

**H. Tuppy und G. Bodo.**

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 12. April 1954.)

In Cytochrom c sind Apoferment und prosthetische Gruppe miteinander durch zwei Cysteinreste verknüpft, die mittels ihrer Amino- und Carboxylgruppen peptidisch in die Eiweißkomponente eingebaut sind, während ihre Sulfhydrylgruppen an die Doppelbindungen in den Seitenketten 2 und 4 eines Protohämatinmoleküls unter Ausbildung von Thioätherbrücken angelagert sind. Es wird gezeigt, daß die mit dem Hämatin verknüpften Cysteinreste im Apoferment eingefügt in die Aminosäuresequenzen

... Lys-CyS-Ala-Glu ... und ... Glu-CyS-His ...\*\*

vorliegen. Die Imidazolgruppe des in der Sequenz Glu-CyS-His vorkommenden Histidinrestes stellt vermutlich eine der beiden „häm-gebundenen“ und für die Hämochromogennatur des Cytochroms c verantwortlichen Gruppen dar.

Während in anderen Hämoproteiden, in Katalase und Peroxydase, in Hämoglobin und Myoglobin, zwischen prosthetischer Gruppe und Eiweißkomponente eine verhältnismäßig lockere Verknüpfung besteht, sind diese in Cytochrom c in stabiler Weise durch zwei Thioätherbrücken

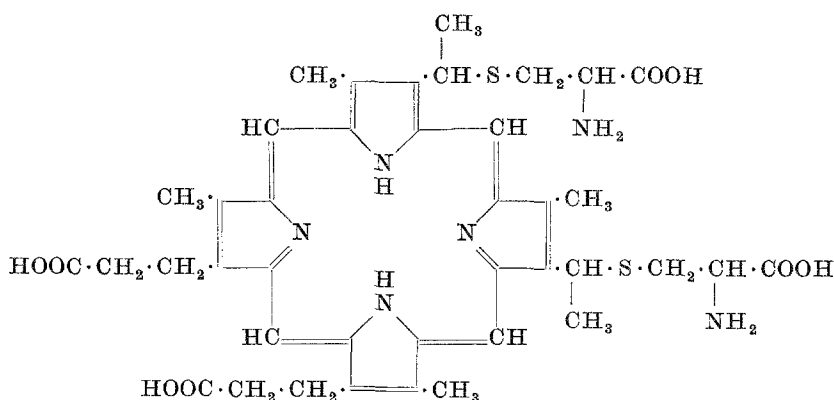
---

\* Herrn Prof. Dr. L. Ebert zum 60. Geburtstag gewidmet.

\*\* Zur Bezeichnung der Aminosäurereste bedienen wir uns hier und im folgenden der von Brand und Edsall<sup>1</sup> vorgeschlagenen Abkürzungen. (CyS)<sub>2</sub> bedeutet Cystin-, CySH Cystein-, CyS Halbcystin- und CySO<sub>3</sub>H Cysteinsäure- (β-Sulfoalanin-) Reste.

<sup>1</sup> E. Brand und J. T. Edsall, Ann. Rev. Biochem. 16, 224 (1947).

verbunden. Deren Ausbildung ist nach *Theorell*<sup>2, 3</sup> und *Zeile*<sup>4, 5</sup> darauf zurückzuführen, daß die Sulfhydrylgruppen zweier Cysteinreste der Eiweißkomponente an die zwei ungesättigten Seitenketten 2 und 4 eines Ferriporphyrinmoleküls angelagert sind. Die aus einem Porphyrin- und zwei Cysteinmolekülen zusammengesetzte und als „Porphyrin c“ bezeichnete Verbindung konnte von *Theorell*<sup>2</sup> und von *Zeile*<sup>4</sup> aus Hydrolysaten des Cytochroms c isoliert werden. Die von ihnen aufgestellte Strukturformel<sup>3, 4</sup> wurde kürzlich von *Paul*<sup>6</sup> in einer neuerlichen Untersuchung als richtig befunden.



Porphyrin c.

Abgesehen von den Thioätherbindungen zwischen Hämatin und Apoenzym, ist in Cytochrom c eine Verknüpfung des Eisenatoms der prosthetischen Gruppe mit zwei wahrscheinlich stickstoffhaltigen Gruppen der Eiweißkomponente anzunehmen. Die Natur dieser beiden „hängenden Gruppen“ wurde vor allem von *Theorell* und seinen Mitarbeitern eingehend bearbeitet und diskutiert<sup>6-10</sup>. Diese Autoren kamen auf Grund der Ergebnisse spektrophotometrischer, titrimetrischer und magnetochemischer Untersuchungen sowie gewisser Analogien zu den

<sup>2</sup> *H. Theorell*, Biochem. Z. **298**, 242 (1938).

<sup>3</sup> *H. Theorell*, Enzymologia **6**, 88 (1939).

<sup>4</sup> *K. Zeile* und *H. Meyer*, Z. physiol. Chem. **262**, 178 (1939).

<sup>5</sup> *K. Zeile* und *H. Meyer*, Naturwiss. **27**, 596 (1939).

<sup>6</sup> *K. G. Paul*, Acta Chem. Scand. **5**, 379, 389 (1951).

<sup>7</sup> *H. Theorell* und *Å. Åkeson*, J. Amer. Chem. Soc. **63**, 1804, 1812, 1818, 1820 (1941).

<sup>8</sup> *H. Theorell*, Adv. Enzymol. **7**, 265 (1947).

<sup>9</sup> *E. Boeri*, *A. Ehrenberg*, *K. G. Paul* und *H. Theorell*, Biochim. Biophys. Acta **12**, 273 (1953).

<sup>10</sup> *K. G. Paul*, Acta Chem. Scand. **3**, 1178 (1949).

Verhältnissen beim Hämoglobin zur Überzeugung, daß mindestens eine der zwei häm-gebundenen Gruppen, vermutlich jedoch beide, Imidazolgruppen von Histidinresten sind.

Die in der vorliegenden Mitteilung beschriebenen Versuche hatten zum Ziel, die Natur jener Aminosäurereste zu bestimmen, die in Cytochrom c den beiden an das Porphyrin gebundenen Cysteinresten benachbart sind. Besonderes Interesse galt der Frage, ob sich unter ihnen etwa auch Histidinreste befinden, deren Imidazolgruppen der prosthetischen Gruppe genügend nahe wären, um für eine Bindung an das Hämatin-Eisen in Frage zu kommen.

Pferde-Cytochrom c wurde mit Säure partiell hydrolysiert. Porphyrin c und Peptide des Porphyrins c ließen sich von den im Hydrolysat in großer Menge vorkommenden freien Aminosäuren und porphyrinfreien Peptiden durch Adsorption an Talk abtrennen. Mit Hilfe der Silbersalzmethode, die *Paul* erfolgreich zur Spaltung des intakten Cytochroms c in Ferrihämatorporphyrin einerseits und freies Apoprotein andererseits angewendet hatte<sup>10, 11</sup>, wurden hierauf aus Porphyrin c und seinen Peptiden unter Sprengung der Thioätherbrücken Cystein und Cysteinpeptide in Freiheit gesetzt. Oxydation mit Perameisensäure verwandelte diese in Cysteinsäure und Cysteinsäurepeptide. Das Peptidgemisch wurde nun der Ionophorese unterworfen, die dabei erhaltenen Fraktionen papierchromatographisch in ihre einzelnen Komponenten aufgetrennt. Es erwies sich, daß von den hierbei gefundenen und näher charakterisierten Peptiden der Cysteinsäure 4 Dipeptide und 3 Tripeptide ihren Ursprung in 2 Aminosäuresequenzen, ...Lys-CyS-Ala-Glu... und ...Glu-CyS-His..., hatten. Nur ein fünftes gefundenes Dipeptid, Ala-CySO<sub>3</sub>H, ließ sich aus keiner der beiden Sequenzen herleiten. Es konnte jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit gezeigt werden, daß dieses Peptid seine Entstehung einer unvorhergesehenen Umlagerung verdankt: Denn die für diesen Zweck synthetisch dargestellten Peptide L-Cystinyl-di-L-alanin und L-β-Sulfoalanyl-L-alanin (CySO<sub>3</sub>H-Ala) erfahren, wenn sie den für die partielle Hydrolyse des Cytochroms c gewählten Bedingungen unterworfen werden, zum Teil eine Umwandlung in L-Alanyl-L-cysteinsäure bzw. Di-L-alanyl-L-cystin.

### Material und Methoden.

*Cytochrom c.* Für die Darstellung von Cytochrom c mit einem Eisen-gehalt von 0,34% aus Pferdeherzmuskel hielten wir uns an die Angaben von *Keilin* und *Hartree*<sup>12, 13</sup>, fanden allerdings häufig einen etwas niedrigeren

<sup>11</sup> *K. G. Paul*, Acta Chem. Scand. 4, 239 (1950).

<sup>12</sup> *D. Keilin* und *E. F. Hartree*, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, 122, 298 (1937).

<sup>13</sup> *D. Keilin* und *E. F. Hartree*, Biochemic. J. 39, 289 (1945).

Eisenwert. Dieses Cytochrompräparat wurde für die ersten Versuche verwendet und ergab die gleichen Ergebnisse wie das später ausschließlich eingesetzte Produkt höheren Reinheitsgrades. Die weitere Reinigung erfolgte nach *Margoliash*<sup>14</sup> mit Hilfe des Ionenaustauschers Amberlite IRC-50. Auf diese Weise wurde regelmäßig, auch wenn das der Reinigung zugeführte Cytochrom c einen niedrigeren Eisengehalt als 0,34% hatte, ein Endprodukt mit 0,42 bis 0,44% Fe gewonnen. Die durch Eluieren des Ionenaustauschers erhaltene ammoniakalische Cytochrom c-Lösung wurde nach Filtration im gefrorenen Zustand getrocknet.

Die Bestimmung des Eisengehaltes erfolgte durch Messung der Extinktion des in 0,02 m sek.-Natriumphosphatlösung mit Natriumdithionit reduzierten Cytochroms c im *Beckman*-Spektrophotometer bei 550  $m\mu$  und einer Spaltbreite von 0,015 mm. Bei der Berechnung fand der von *Theorell* und *Akeson*<sup>7</sup> angegebene Extinktionskoeffizient ( $\epsilon = 2,84 \cdot 10^4$ ) Verwendung; das Trockengewicht des Cytochroms c wurde bei 105° bestimmt.

*Partielle Hydrolyse des Cytochroms c.* 500 mg Cytochrom c wurden in 10 ccm Wasser gelöst und mit 80 ccm ausgekochter 20%iger Schwefelsäure versetzt. Die Mischung wurde, in einem evakuierten Bombenrohr eingeschmolzen, 4 Stdn. lang auf 100° erhitzt. Für die Hydrolyse bedienten wir uns verd. Schwefelsäure, weil bei deren Verwendung (wie schon von *Zeile* und *Meyer*<sup>4</sup> beschrieben worden ist, die mit ihrer Hilfe Cytochrom c erfolgreich zu Porphyrin c abgebaut haben) die Farbstoffkomponente des Cytochroms c in geringerem Maße Zersetzung erleidet als unter der Einwirkung von konz. Salzsäure bei 37°. Die schwefelsaure Lösung, deren Farbe im Verlaufe der 4stünd. Hydrolyse von braunrot nach violettrot umgeschlagen war, wurde nach Erkalten mit konz. Natronlauge auf ein pH von 3 bis 4 gebracht; dabei flockte ein bräunlichroter Niederschlag aus. Allenfalls auskristallisierendes Natriumsulfat brachten wir durch Wasserzusatz wieder in Lösung. Nun wurden 10 g Talk, der zuvor mit 1 n Ammoniak, dann mit Wasser, hierauf mit 1 n Salzsäure und zuletzt wieder sorgfältig mit Wasser gewaschen worden war, in ein Chromatographierohr von 3 cm Durchmesser eingeschlämmt. Das schwach saure Hydrolysat des Cytochroms c mit dem ausgeflockten Niederschlag wurde unter Verwendung eines geringen Unterdruckes durch die etwa 2 cm hohe Talksäule gesaugt, wobei die gefärbten Bestandteile, Derivate des Porphyrins c, teils durch Filtration, teils durch Adsorption quantitativ am Talk zurückgehalten wurden. Von der mit 50 cm 0,001 n HCl und anschließend mit 150 ccm Wasser salzfrei gewaschenen Säule wurden die Porphyrinderivate mit etwa 10 ccm wäbr.-alkohol. Ammoniaks (2 ccm konz.  $NH_3$  in 100 ccm 50%igem Äthanol) eluiert. Das dunkelrote Eluat wurde im Exsikkator über konz. Schwefelsäure zur Trockene gebracht.

*Spaltung der Thioätherbindungen.* Das die Porphyrin c-Peptide enthaltende trockene Produkt wurde in 4 ccm Wasser gelöst, mit 8 ccm Eisessig versetzt und nach Zusatz einer Lösung von 200 mg Silbersulfat in 25 ccm Wasser 9 Stdn. lang unter Lichtausschluß auf 50° erhitzt. Dabei fiel allmählich eine geringe Menge eines braunen Niederschlages aus.

*Reinigung und Oxydation der Cysteinpeptide.* Die Aufarbeitung der vom Porphyrin losgelösten Cysteinpeptide ließ sich auf zweierlei Art bewerkstelligen:

*A. Ursprüngliches Verfahren.* Die dunkelrote silbersalzhaltige Lösung wurde mit 175 ccm 20%iger Essigsäure, welcher 5% Phenol zugesetzt worden

<sup>14</sup> *E. Margoliash, Nature* **170**, 1014 (1952).

war, verdünnt und auf zirka 50° erwärmt. In die Mischung wurde nun in langsamem Strom Schwefelwasserstoff eingeleitet. Der Zusatz von Essigsäure und Phenol vor der Abscheidung des Silbers erwies sich als unbedingt erforderlich, weil in deren Abwesenheit die Cysteinpeptide am ausfallenden Sulfid adsorbiert werden. (Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit *Hamoirs* Beobachtung<sup>15</sup>, daß Cystein von Silbersulfid bevorzugt festgehalten wird. Phenol und Essigsäure waren schon von *Tiselius, Drake* und *Hagdahl*<sup>16</sup> zum Eluieren von Aminosäuren und von *Sanger* und *Tuppy*<sup>17</sup> zum Ablösen von Peptiden von Tierkohle verwendet worden.) Die Ausfällung des Silbersulfids in der phenolhaltigen Lösung ging träge vonstatten und die anschließende Filtration bereitete meistens Schwierigkeiten. Das rötlich gefärbte Filtrat wurde im Vak. bei einer Badtemp. von höchstens 40° auf etwa 7 ccm eingedampft und dadurch vom Großteil der Essigsäure befreit. Der Rückstand wurde hierauf mit 40 ccm Wasser aufgenommen und die rotbraune Lösung zur Entfernung des Phenols und eines Teiles des Farbstoffes mit 15 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Anschließend mußte der wäßr. Lösung noch die aus dem Silbersulfat stammende Schwefelsäure durch 3maliges Ausschütteln mit je 0,25 ccm Tri-n-octylamin in 15 ccm Chloroform entzogen werden<sup>18</sup>. Die nunmehr gegen Kongorot neutral reagierende Flüssigkeit wurde noch 2mal mit je 10 ccm Chloroform und einmal mit 15 ccm Äther ausgeschüttelt und dann zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 4 ccm 87%iger Ameisensäure gelöst und zur Oxydation der Peptide des Cysteins zu solchen der Cysteinsäure<sup>19</sup> mit 0,4 ccm Perhydrol versetzt. Die Reaktionsmischung blieb 20 Min. bei Zimmertemp. stehen, wurde dann mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und im Vak. zur Trockene gebracht.

Zur Entfernung restlichen Farbstoffes wurde das erhaltene Produkt in 2,5 ccm 5%iger Essigsäure aufgenommen, durch eine zuvor mit 1 n HCl und mit Wasser gewaschene Talksäule (1 cm Durchmesser, 3 cm Höhe) filtriert und mit 10 ccm 5%iger Essigsäure nachgewaschen. Das Porphyrin blieb am Talk adsorbiert. Das Eluat, welches nur ganz schwach bräunlich-gelb gefärbt war, wurde im Vak. zur Trockene verdampft, mit 20 ccm Wasser aufgenommen und tropfenweise mit 1 n NH<sub>3</sub> bis zum Umschlagspunkt von Methylrot versetzt.

*B. Modifiziertes Verfahren* (Oxydation der Cysteinpeptide vor der Ausfällung des Silbers). Die bei der Silbersulfatspaltung erhaltene Lösung wurde im Vak. zur Trockene verdampft. Der Rückstand ließ sich mit Ausnahme eines Teiles des Silbersulfats in 5 ccm 87%iger Ameisensäure lösen. Diese Lösung wurde nach Zusatz von 0,5 ccm Perhydrol 20 Min. lang stehen gelassen, hierauf mit Wasser verdünnt, im Vak. eingetrocknet, nochmals mit wenig Wasser versetzt und wieder zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde hierauf mit 65 ccm Wasser von zirka 60° sorgfältig digeriert und das pH der Flüssigkeit durch Zusatz von 2 bis 3 Tropfen 20%iger Schwefelsäure auf ungefähr 3 gebracht. Der Großteil des Porphyrins blieb bei dieser Behandlung als brauner Niederschlag ungelöst; er wurde nach Einleiten von H<sub>2</sub>S in die Suspension gemeinsam mit dem gefällten Silbersulfid abfiltriert.

<sup>15</sup> *G. Hamoir*, C. r. soc. biol. **137**, 734 (1943); Chem. Abstr. **39**, 3561f.

<sup>16</sup> *A. Tiselius, B. Drake* und *L. Hagdahl*, Exper. **3**, 21 (1947).

<sup>17</sup> *F. Sanger* und *H. Tuppy*, Biochemic. J. **49**, 463 (1951).

<sup>18</sup> *D. E. Hughes* und *D. H. Williamson*, Biochemic. J. **48**, 487 (1951).

<sup>19</sup> *F. Sanger*, Biochemic. J. **44**, 126 (1949).

Da bei diesem Verfahren ein Zusatz von Essigsäure und Phenol nicht erforderlich ist, scheidet sich das Silbersulfid rasch und in leicht filtrierbarer Form ab. Dem stark sauren, manchmal noch etwas gelblichrot gefärbten Filtrat wurde (wie unter A beschrieben) mit Hilfe von Trioctylamin die Schwefelsäure und, wenn nötig, mittels Filtration durch Talk restlicher Farbstoff entzogen. Für die nun folgende Ionophorese wurde die Peptidlösung mit 1 n  $\text{NH}_3$  neutralisiert (Umschlag von Methylrot).

*Ionophoretische Trennung.* Die nahezu salzfreie und weitgehend entfärbte Lösung wurde in der von Sanger und Tuppy<sup>17</sup> beschriebenen Weise in einer aus vier Kammern zusammengesetzten Apparatur der Ionophorese unterworfen. Dabei erfährt die Peptidmischung eine Aufspaltung in je eine saure, neutrale und basische Fraktion. Die ionophoretische Trennung dauert durchschnittlich 45 Min., mitunter allerdings auch länger. Nach ihrem Ende wurde der Inhalt der Kammer mit den neutralen Peptiden sowie auch die basische Peptidfraktion ohne weitere Vorbehandlung im Vak. zur Trockene verdampft und zweidimensional auf Filtrierpapier chromatographiert. Aus der sauren Peptidfraktion mußten jedoch meistens erst geringe Mengen Schwefelsäure, die in sie aus dem benachbarten „Anodenabteil“ hineingeraten waren, entfernt werden. Zu diesem Zwecke wurde die saure Peptidlösung zunächst bei möglichst tiefer Temp. weitgehend eingengt; war der Großteil der Essigsäure entfernt, wurde der ölige Rückstand mit Wasser verdünnt, die Lösung mit Tri-n-octylamin ausgeschüttelt und dann erst zur Trockene gebracht.

*Papierchromatographie.* Die angewendete Methodik entspricht im wesentlichen der von Sanger und Tuppy<sup>17</sup> beschriebenen. Die beim Eindampfen der drei Peptidfraktionen erhaltenen Rückstände wurden in je zwei gleiche Teile geteilt. Die beiden Hälften jeder Fraktion wurden gleichzeitig unter genau identischen Bedingungen auf Whatman Nr. 4-Filtrierpapier zweidimensional absteigend verteilt. In der ersten Richtung (längere Seite des Papierbogens) wurde als Lösungsmittel stets Phenol, in der zweiten Richtung (kürzere Seite des Bogens) bald n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5), bald eine wassergesättigte Mischung aus gleichen Teilen Kollidin und Lutidin verwendet. Die Entwicklung in der ersten Richtung wurde abgebrochen, sobald das Lösungsmittel am unteren Rande des Bogens angelangt war; in der zweiten Richtung ließen wir die Entwicklung 16 bis 18 Stdn. lang vor sich gehen, unbeschadet dessen, daß das Lösungsmittel nach Erreichen des Papierrandes von diesem abtropfte. Die getrockneten Filtrierpapierbögen wurden zur Lokalisierung der Peptide nach 15 min. Erhitzen auf 105° unter der UV-Lampe betrachtet: Dabei gaben sich gewöhnlich die meisten Aminosäuren und Peptide, allerdings auch manche ninhydrinnegative, verunreinigende Substanzen durch Fluoreszenz zu erkennen<sup>20</sup>. Das eine der beiden paarweise entwickelten Chromatogramme wurde anschließend mit einer 0,025%igen alkohol. Ninhydrinlösung besprengt und vorsichtig erwärmt. Die Kombination von Fluoreszenz und Ninhydrinfärbung ermöglicht es, aus beiden Papierchromatogrammen die Stellen, an denen die Peptide lokalisiert sind, korrekt auszuscheiden. Die aus dem mit Ninhydrin behandelten Bogen eluierten Peptide wurden mit 5,7 n HCl (15 Stdn. bei 105°) total hydrolysiert, die dabei freigesetzten Aminosäuren durch eindimensionale Papierchromatographie identifiziert. In den aus dem zweiten Chromatogramm eluierten Peptiden wurden die N-terminalen Aminosäurereste mit der

<sup>20</sup> D. M. P. Phillips, Nature 161, 53 (1948).

Dinitrofluorbenzol-Methode<sup>21</sup> (unter Verwendung von Triäthylamin<sup>22</sup> an Stelle des früher üblichen Bikarbonats) bestimmt. In Peptiden, die in größerer Menge vorlagen, konnten die amino-endständigen Aminosäurereste auch dann noch festgestellt werden, wenn das Chromatogramm, von dem jene stammten, vorher mit 0,025%iger Ninhydrinlösung besprengt worden war. Für die Hydrolyse der Dinitrophenyl- (DNP-) Peptide erwies sich im allgemeinen ein 5stünd. Erhitzen mit 5,7 n HCl auf 105° als zureichend. (Die zu Zwecken der Hydrolyse verwendete Salzsäure war vorteilhaft zuvor 2mal über SnCl<sub>2</sub> destilliert worden.) Die ätherlöslichen DNP-Aminosäuren wurden durch Chromatographie auf Papierstreifen, die mit Phthalatpuffer imprägniert worden waren, mit tert.-Amylalkohol als Verteilungsmittel identifiziert<sup>23</sup>. Die ätherunlöslichen DNP-Derivate (DNP-Cysteinsäure, im-DNP-Histidin, ε-DNP-Lysin usw.) konnten durch gewöhnliche Papierchromatographie mit n-Butanol-Eisessig-Wasser<sup>17</sup>, Butanol-Pyridin-Wasser (3 : 2 : 3) oder Phenol als Lösungsmittel voneinander getrennt und unterschieden werden. Es erwies sich übrigens, daß der für die DNP-Methode gebrauchte Äther unbedingt peroxydfrei sein muß.

*Synthese von L-Cystinyl-di-L-alanin und L-β-Sulfoalanyl-L-alanin (CySO<sub>3</sub>H-Ala).* Zur Darstellung des Cystinyl-di-alanins fand die Methode der Peptidsynthese von *Boissonnas*<sup>24</sup>, *Wieland*<sup>25</sup> und *Vaughan*<sup>26</sup> Anwendung. Die Oxydation des Cystinpeptids zum Peptid der Cysteinsäure erfolgte nach *Toennies* und *Homüller* mit Perameisensäure<sup>19, 27</sup>.

*Di-carbobenzoxy-L-cystinyl-di-L-alaninäthylester.* 4,94 g (0,01 Mol) Di-carbobenzoxy-L-cystin<sup>28</sup>, gelöst in 10 ccm absol. Tetrahydrofuran, wurden nach Zusatz von 2,86 g (0,02 Mol) Tri-n-propylamin mit einer Eis-Kochsalz-Mischung auf -12° gekühlt. Dann wurden tropfenweise 2,16 g (1,9 ccm; 0,02 Mol) Chlorkohlensäureäthylester und nach weiteren 10 Min. bei -12° langsam 2,6 g (0,022 Mol) L-Alaninäthylester<sup>29</sup> zugegeben. Die Mischung wurde hierauf noch einige Min. in der Kälte und dann 16 Stdn. lang bei Zimmertemp. stehengelassen, wobei sie allmählich infolge Abscheidung langer weißer Kristallnadeln erstarrte. Bei Erhitzen der Reaktionsmischung mit 200 ccm Essigester ging die Kristallmasse in Lösung. Die noch etwas warme Lösung wurde mit 50 ccm 5%iger Sodalösung ausgeschüttelt. Beim anschließenden Waschen der Essigesterlösung mit Wasser fiel ein großer Teil des Carbobenzoxy-cystinyl-di-alaninesters in kristallisierter Form aus; er wurde abgesaugt und nacheinander mit 95%igem Äthanol, mit Wasser und nochmals mit Alkohol gewaschen. Um den Rest des Reaktionsproduktes zu gewinnen, wurde die durch Absaugen von der auskristallisierten Substanz befreite Essigesterlösung mit Wasser, 1 n HCl und wieder mit Wasser gewaschen, mit CaCl<sub>2</sub> getrocknet und im Vak. zur Trockene verdampft. Der 3mal mit je 20 ccm kaltem Alkohol digerierte Rückstand wurde mit dem

<sup>21</sup> *F. Sanger*, *Biochemic. J.* **39**, 507 (1945).

<sup>22</sup> *F. Sanger* und *E. O. P. Thompson*, *Biochemic. J.* **53**, 353 (1953).

<sup>23</sup> *S. Blackburn* und *A. G. Louther*, *Biochemic. J.* **48**, 126 (1951).

<sup>24</sup> *R. A. Boissonnas*, *Helv. Chim. Acta* **34**, 874 (1951).

<sup>25</sup> *Th. Wieland* und *H. Bernhard*, *Ann. Chem.* **572**, 190 (1951).

<sup>26</sup> *J. R. Vaughan*, *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 3547 (1951). — *J. R. Vaughan* und *R. L. Osato*, *ibid.* **74**, 676 (1952).

<sup>27</sup> *G. Toennies* und *R. P. Homüller*, *J. Amer. Chem. Soc.* **64**, 3054 (1942).

<sup>28</sup> *M. Bergmann* und *L. Zervas*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **65**, 1192 (1932).

<sup>29</sup> *E. Fischer*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **34**, 442 (1901).

zuvor abgesaugten Produkt vereinigt und aus 60 ccm 95%igem Alkohol umkristallisiert. Nach längerem Stehen im Eisschrank wurde die aus weißen Nadeln bestehende Kristallmasse abgesaugt. Ausbeute 4,95 g (70% d. Th.). Schmp. (im Kofler-Mikroschmp.-Apparat) 164 bis 170°. Nach Umkristallisieren aus Essigester, dann aus absol. Methanol und Trocknen bei 100° im Vak. schmolzen die Kristallnadeln bei 168,5 bis 170,5°.

$C_{32}H_{42}O_{10}N_4S_2$ . Ber. S 9,07. Gef. S 8,78.

*Di-carbobenzoxy-L-cystinyl-di-L-alanin*. 4,4 g des Esters wurden in 70 ccm warmem Dioxan gelöst. Zu der auf Zimmertemp. abgekühlten Lösung, aus der sich ein Teil des Esters wieder abgeschieden hatte, wurden langsam unter Schütteln 13,9 ccm 1 n NaOH (10% Überschuß) hinzugefügt. Im Verlauf von zirka 15 Min. ging der ungelöste Teil des Esters in Lösung und es trat leichte Gelbfärbung ein. Als nach 30 Min. eine Probe der Lösung nach Wasserzusatz fast keine Ausscheidung unverseiften Esters mehr zeigte, wurde das pH durch Zugabe von 10 ccm 1 n HCl auf 6 gebracht und die Lösung im Vak. auf 20 ccm eingengt. Das dabei ausgeschiedene weiße Produkt ging bei Zusatz von 50 ccm gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung bis auf einen kleinen Rest, der abfiltriert wurde, in Lösung. Das bikarbonat-alkalische Filtrat wurde mit Essigester 3mal ausgeschüttelt, nochmals filtriert und nach Vertreiben des in ihr gelösten Essigesters durch kurzes Aufkochen mit Salzsäure (1:1) auf pH 1 gebracht. Dabei fiel ein weißer gallertiger Niederschlag aus. Dieser wurde nach 12stünd. Stehen im Eisschrank abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 2,25 g (56% d. Th.). Ein kleiner Teil dieses Produktes wurde zur weiteren Reinigung mit siedendem Alkohol behandelt; nach Abfiltrieren von ein wenig Ungelöstem wurde das klare Filtrat mit einem gleichen Volumen Wasser versetzt. Beim Abkühlen schieden sich lange weiße Nadeln, die nach Trocknen bei 100° (im Vak.), bei 190 bis 194° (Kofler) schmolzen.

$C_{28}H_{34}O_{10}N_4S_2$ . Ber. S 9,85. Gef. S 9,54.

*L-Cystinyl-di-L-alanin*. Die Abspaltung der Carbobenzoxy-Gruppen erfolgte nach Loring und du Vigneaud<sup>30</sup> mit Natrium in flüss.  $NH_3$ . In eine mit Trockeneis-Aceton-Mischung gekühlte Lösung von 1,8 g Di-carbobenzoxy-cystinyl-di-alanin in 25 ccm flüss.  $NH_3$  wurden allmählich kleine Stücke Natriummetall unter Umschütteln eingetragen. Dabei schied sich nach und nach ein weißer Niederschlag ab. Das Ende der Reaktion gab sich dadurch zu erkennen, daß die durch gelöstes Natrium hervorgerufene Blaufärbung der Reaktionsmischung einige Min. lang anhielt. Die zugesetzte Menge Natrium betrug etwa 0,45 g. Nun wurde der flüss.  $NH_3$  abgedampft. Letzte Reste Ammoniaks ließen sich durch Evakuieren, Aufnehmen des Rückstandes in wenig Eiswasser und nochmaliges Evakuieren entfernen. Dann wurde das Reaktionsprodukt unter Eiskühlung in wenigen ccm Wasser gelöst und mit konstant siedender Jodwasserstoffsäure (zirka 3 ccm) auf pH 3 gebracht. Die nach Eindampfen der Lösung im Vak. zurückbleibende Masse wurde mit 50 ccm absol. Äthanol sorgfältig digeriert, das ungelöste Produkt durch Zentrifugieren abgetrennt und nochmals mit 20 ccm absol. Alkohol gewaschen. Der so erhaltene feste weiße Körper wurde mit 5 ccm Wasser aufgenommen. Er ging hierbei zum größten Teil in Lösung. Nun wurde zur Oxydation der Sulphydryl- zu Disulfidgruppen Luft durchperlen gelassen, bis die Farbreaktion auf Thiole mit Natriumnitroprussid negativ

<sup>30</sup> H. S. Loring und V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. 111, 385 (1935).



war. Während der Oxydation nahm der anfangs nur geringe weiße Niederschlag von L-Cystinyl-di-L-alanin an Menge bedeutend zu. Nach Zusatz von weiteren 5 ccm Wasser wurde zum Sieden erhitzt und das Cystinyl-di-alanin nach 16stünd. Stehen im Eisschrank abgesaugt, 3mal mit etwas Wasser und einmal mit Alkohol gewaschen. Ausbeute 0,27 g (26% d. Th.). Wurde die Mutterlösung zur Trockene verdampft, erhielten wir weitere 0,17 g eines weniger reinen Produktes. Zur weiteren Reinigung wurden 0,27 g des umkristallisierten Peptids in 6 ccm Wasser unter Zusatz von 3 Tropfen konz. HCl gelöst; nach Entfernung unlöslicher Verunreinigungen durch Zentrifugieren wurde die klare Flüssigkeit mit Hilfe von 1 n NH<sub>3</sub> wieder auf ein pH von 5 bis 6 gebracht. Die Kristalle, die sich langsam ausschieden, wurden nach 2tägigem Stehen im Eisschrank abgesaugt, mit wenig Wasser und mit Alkohol gewaschen und bei 100° im Vak. getrocknet. Ausbeute 0,20 g.

C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub>. Ber. S 16,76. Gef. S 16,48.

$[\alpha]_D^{20} = -137^\circ$  (5%ige Lösung in 1 n HCl).

*L-β-Sulfoalanyl-L-alanin (L-CySO<sub>3</sub>H-L-Ala)*. 50 mg L-Cystinyl-di-L-alanin wurden mit einer Mischung von 0,1 ccm Perhydrol und 0,9 ccm 87%iger Ameisensäure versetzt. Das Peptid löste sich rasch unter Erwärmung des Reaktionsgemisches auf. Nach 15 Min. Stehen bei Zimmertemp. wurde die Lösung mit 0,5 ccm Wasser versetzt und in einem Exsikkator zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde nochmals mit etwas Wasser aufgenommen und wieder eingetrocknet. Das Cysteinsäurepeptid bildete eine farblose, kristallisierbare, jedoch äußerst hygroskopische Masse. Es war papierchromatographisch einheitlich (Fleck Nr. 3 in Abb. 3).

*Versuche zur Umlagerung von L-β-Sulfoalanyl-L-alanin (CySO<sub>3</sub>H-Ala) und L-Cystinyl-di-L-alanin*. Jedes der beiden Peptide wurde sowohl mit 20%iger Schwefelsäure als auch mit stark verd. Schwefelsäure behandelt. Es wurden jeweils 250 μg Peptid in 0,1 bis 0,15 ccm schwefelsaurer Lösung, in eine Glaskapillare eingeschmolzen, 4 Stdn. lang auf 105° erhitzt. Dann wurden die Lösungen aus den Kapillaren herausgeblasen, mit Wasser auf zirka 1 ccm verdünnt, zur Entfernung der Schwefelsäure mit einer Lösung von Tri-n-octylamin in Chloroform ausgeschüttelt und schließlich zur Trockene verdampft. Bei den Umlagerungsversuchen mit Cystinyl-di-alanin schloß sich hieran noch eine Oxydation des trockenen Rückstandes mit einer Mischung von 10 μl Perhydrol und 100 μl 87%iger Ameisensäure (20 Min. bei Zimmertemp.).

Zuletzt wurde mit Hilfe der zweidimensionalen Papierchromatographie festgestellt, ob und in welchen Mengen in den Reaktionsprodukten das dem unveränderten Peptid entsprechende L-CySO<sub>3</sub>H-L-Ala, das durch Umlagerung entstehende Dipeptid L-Ala-L-CySO<sub>3</sub>H sowie die durch Hydrolyse gebildeten freien Aminosäuren CySO<sub>3</sub>H und Ala vorhanden waren. Diese vier Substanzen ließen sich auf halben Bögen Whatman Nr. 4-Filtrierpapier mit Phenol-0,3% NH<sub>3</sub>-HCN und n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5) als Lösungsmittel klar voneinander trennen (Abb. 3).

### Ergebnisse.

Aus den in Cytochrom c durch Thioätherbindungen mit der prosthetischen Gruppe verknüpften Cysteinresten entstehen durch die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene längere Prozedur Cysteinsäure und

Tabelle I. Saure Peptidfraktion.

Elektr. Nr. (Abb. 1)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nach- gewiesene Aminosäuren	Nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene		Struktur
			DNP-Aminosäuren	Aminosäuren	
A 1*	violett	CySO <sub>3</sub> H (××××)	DNP-CySO <sub>3</sub> H (××××)		CySO <sub>3</sub> H
A 2*	violett	CySO <sub>3</sub> H (××) Glu (××)	DNP-Glu (×)	CySO <sub>3</sub> H (××)	Glu-CySO <sub>3</sub> H
A 3	gelb → violett	CySO <sub>3</sub> H (×) Glu (×) Ala (×)	DNP-CySO <sub>3</sub> H (?)	Glu (×) Ala (?)	CySO <sub>3</sub> H-[Ala, Glu]
A 4	gelb → violett	CySO <sub>3</sub> H (××××) Ala (××××)	DNP-CySO <sub>3</sub> H (×××)	Ala (××××)	CySO <sub>3</sub> H-Ala
A 5	violett	CySO <sub>3</sub> H (×) Ala (××)	DNP-Ala (×)	CySO <sub>3</sub> H (××)	Ala-CySO <sub>3</sub> H
A 6	violett	CySO <sub>3</sub> H (××) Glu (×××) His (×××)	DNP-Glu (××) im-DNP-His (×××)	CySO <sub>3</sub> H (×××)	Glu-[CySO <sub>3</sub> H, His]
A 7	violett	Glu (?)			Glu

\* CySO<sub>3</sub>H und Glu-CySO<sub>3</sub>H (A 1 und A 2) waren nicht immer voneinander scharf getrennt.

Tabelle 2. Neutrale Peptidfraktion.

Fleck Nr. (Abb. 2)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nach- gewiesene Aminosäuren	Nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren		Struktur
			DNP-Aminosäuren	Aminosäuren	
M 1	violett	CySO <sub>3</sub> H (×××××) Lys (×××××)	di-DNP-Lys (?)	CySO <sub>3</sub> H (××)	Lys-CySO <sub>3</sub> H
M 2	violett	CySO <sub>3</sub> H (××) Lys (××) Ala (××)		CySO <sub>3</sub> H (×) Ala (×)	Lys-[CySO <sub>3</sub> H, Ala]
M 3	gelb → violett	His (×××××) CySO <sub>3</sub> H (×××××)	im-DNP-His (×××××) DNP-CySO <sub>3</sub> H (×××××)		CySO <sub>3</sub> H-His
M 4	grauviolett	Gly (××)			Gly
M 5	violett	Ser (?)			Ser
M 6	violett	CySO <sub>3</sub> H (×) Glu (×) His (×)	DNP-Glu (?) im-DNP-His (?)	CySO <sub>3</sub> H (?)	Glu-[CySO <sub>3</sub> H, His]
M 7	violett	Glu (×) Lys (×)			?
M 8*	violett	Glu (×××) Ala (××) CySO <sub>3</sub> H (×××) His (××)	DNP-Ala (××) im-DNP-His (××)	Glu (××) CySO <sub>3</sub> H (××)	Ala-[Glu, CySO <sub>3</sub> H, His]*

\* M 8 wurde ein einziges Mal gefunden, als Cytochrom c mit verd. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nur 2 Stdn. lang (statt 4 Stdn.) hydrolysiert worden war.

Cysteinsäurepeptide. Nach der Ionophorese ihres Gemisches finden sich Peptide der Cysteinsäure teils in der sauren, teils in der neutralen Fraktion. Die basische Fraktion, in der Cysteinsäure nur dann vorkommen könnte,

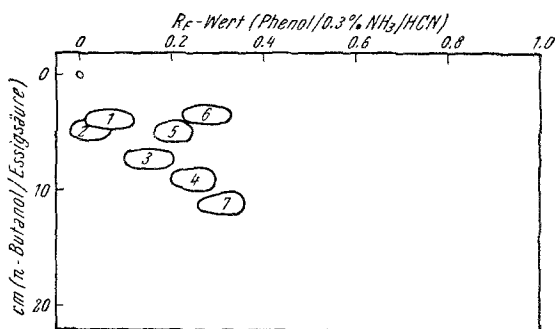


Abb. 1. Chromatogramm der sauren Peptidfraktion A. Vgl. Tabelle 1.

wenn sie mit zwei basischen Aminosäuren in einem Peptid verbunden wäre, war hingegen cysteinsäurefrei. Die Abb. 1 und 2 stellen Papierchromatogramme der sauren und neutralen Fraktion dar. Die bei der näheren Untersuchung ihrer Komponenten erhaltenen Resultate sind in den Tabellen 1 und 2 wiedergegeben.

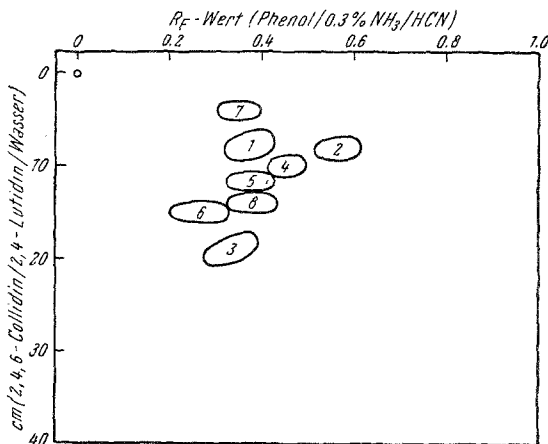


Abb. 2. Chromatogramm der neutralen Peptidfraktion M. Vgl. Tabelle 2.

Die in den Tabellen übersichtlich zusammengestellten Ergebnisse stammen nicht von einem einzigen Versuch, sondern sind im Verlaufe wiederholter Bemühungen erarbeitet worden. In den Tabellen dient die Zahl der Kreuze (×) neben Aminosäuren oder DNP-Aminosäuren als approximative Angabe der Menge, in der diese chromatographisch gefunden worden sind. Eine geringe Quantität ist durch ein Fragezeichen (?) gekennzeichnet.

Wie aus den Tabellen 1 und 2 hervorgeht, bestehen die saure Peptidfraktion (A) und die neutrale Fraktion (M) fast ausschließlich aus cysteinsäurehaltigen Komponenten; neben diesen wurden bloß noch kleinere Mengen freier Aminosäuren (so z. B. A 7, M 4, M 5) und eines Dipeptids (M 7) als Verunreinigungen gefunden.

Die in den beiden Fraktionen untersuchten und näher charakterisierten Peptide Lys-CySO<sub>3</sub>H (M 1), Lys-[CySO<sub>3</sub>H, Ala] (M 2), CySO<sub>3</sub>H-Ala (A 4), CySO<sub>3</sub>H-[Ala, Glu] (A 3) einerseits und Glu-CySO<sub>3</sub>H (A 2), CySO<sub>3</sub>H-His (M 3), Glu-[CySO<sub>3</sub>H, His] (A 6, M 6) andererseits lassen sich zu zwei Aminosäuresequenzen, Lys-CySO<sub>3</sub>H-Ala-Glu und Glu-CySO<sub>3</sub>H-His, zusammensetzen.

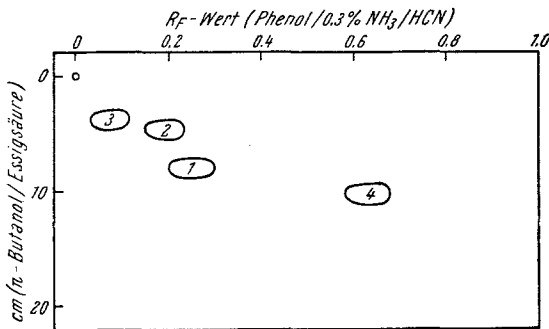
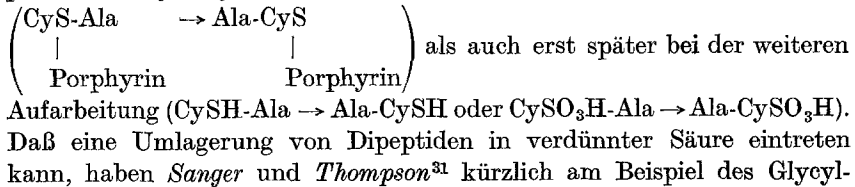


Abb. 3. Chromatographische Trennung von CySO<sub>3</sub>H-Ala, Ala-CySO<sub>3</sub>H, CySO<sub>3</sub>H und Ala. Vgl. Tabelle 3.

Zusätzlich zu den vier Dipeptiden M 1, A 4, A 2 und M 3, welche eben zur Aufstellung der zwei Aminosäurefolgen verwendet worden sind, wurde jedoch — entgegen allen Erwartungen und theoretischen Überlegungen — auch noch ein fünftes, Ala-CySO<sub>3</sub>H (A 5) gefunden, welches sich in die zwei Sequenzen nicht einordnen läßt. Ala-CySO<sub>3</sub>H erschien in der sauren Fraktion in wechselnder, meist geringer Menge. Dies und die Tatsache, daß Ala-CySO<sub>3</sub>H im Peptidgemisch als Begleiter des Isomeren, CySO<sub>3</sub>H-Ala (A 4), auftrat, legte die Vermutung nahe, daß es ein durch Umlagerung entstandenes Artefakt ist. Eine Umlagerung wäre denkbar sowohl bereits bei der anfänglichen partiellen Hydrolyse des Cytochroms c mit 20%iger Schwefelsäure



<sup>31</sup> F. Sanger und E. O. P. Thompson, Biochim. Biophys. Acta 9, 225 (1952).

valins demonstriert. Diketopiperazine, die bei solchen Inversionen als Zwischenprodukte fungieren dürften, scheinen sich verhältnismäßig leicht in heißer schwefelsaurer Lösung zu bilden<sup>32, 33</sup>.

Um die Möglichkeit der Entstehung von Ala-CySO<sub>3</sub>H durch eine Peptidumlagerung zu prüfen, erhitzen wir die für diesen Zweck synthetisierten Verbindungen L-Cystinyl-di-L-alanin und CySO<sub>3</sub>H-Ala in verdünnter Schwefelsäure, unter Bedingungen, welche die bei der Hydrolyse des Cytochroms c und bei der Aufarbeitung der Peptide herrschenden Verhältnisse nachahmen sollten; in der Tat trat bei allen angestellten Versuchen in beträchtlichem Maße Peptidumlagerung ein (Abb. 3 und Tabelle 3).

Tabelle 3. Versuche zur Peptidumlagerung in schwefelsaurer Lösung.

Ausgangsprodukt	Versuchsbedingungen	Aufarbeitung	Endprodukte (vgl. Abb. 3)			
			CySO <sub>3</sub> H Fleck 1	Ala 2	CySO <sub>3</sub> H-Ala 3*	Ala-CySO <sub>3</sub> H 4**
CyS-Ala   CyS-Ala	20%ige H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4 Std., 105°	Oxydation mit HCOOOH	× × × ×	× × × ×	×	× ×
CyS-Ala   CyS-Ala	verd. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 1,5, 4 Std., 105°	Oxydation mit HCOOOH	Spur	Spur	×	× × ×
CySO <sub>3</sub> H-Ala	20%ige H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 4 Std., 105°		× × ×	× × ×	×	× ×
CySO <sub>3</sub> H-Ala	verd. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 2,5, 4 Std., 105°		Spur	Spur	×	× × ×

Dieser Befund stellt zwar noch keinen absoluten Beweis, wohl aber eine kräftige Stütze für die Annahme dar, daß das Dipeptid Ala-CySO<sub>3</sub>H, welches sich in die Aminosäuresequenzen Lys-CySO<sub>3</sub>H-Ala-Glu und Glu-CySO<sub>3</sub>H-His nicht einfügen ließ, ein durch Umlagerung entstandenes

<sup>32</sup> E. Abderhalden und E. Komm, Z. physiol. Chem. **139**, 147 (1924).

<sup>33</sup> R. Hirohata, Y. Kanda, M. Nakamura, N. Izumiya, A. Nagamatsu, T. Ono, S. Fujii und M. Kimitsuki, Z. physiol. Chem. **295**, 368 (1953).

\* Gab mit Ninhydrin eine gelbe und erst nach längerem Erhitzen violette Färbung; nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse wurden DNP-CySO<sub>3</sub>H und freies Ala gefunden.

\*\* Gab mit Ninhydrin eine schwache violette Färbung; nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse wurden DNP-Ala und freie CySO<sub>3</sub>H gefunden.

Artefakt ist. Die immer noch bestehende Unsicherheit konnte schließlich in weiteren Untersuchungen über die Struktur des Cytochroms c, über die später berichtet werden wird<sup>34</sup>, beseitigt werden: Unter Abbaubedingungen, die keine Möglichkeit zu Peptidumlagerungen boten, wurde das Peptid Ala-CySO<sub>3</sub>H nicht mehr gefunden und die Richtigkeit der hier angegebenen Aminosäurefolgen bestätigt.

Es ist somit der sichere Schluß zulässig, daß in jener Region der Eiweißkomponente des Cytochroms c, die sich in unmittelbarer Nähe der prosthetischen Gruppe befindet, Aminosäurereste zu den Sequenzen Lys-CyS-Ala-Glu und Glu-CyS-His zusammengefügt vorliegen, wobei die in ihnen enthaltenen Halbcystinreste jene sind, deren Schwefelatome durch Ausbildung von Thioätherbrücken die Verknüpfung von Proteinanteil und prosthetischer Gruppe bewerkstelligen. Es kann allerdings derzeit nicht entschieden werden, welche der beiden Aminosäuresequenzen mit der Seitenkette 2 und welche mit der Seitenkette 4 des Ferriporphyrins der prosthetischen Gruppe verbunden ist.

Einer gesonderten Beachtung wert ist die Tatsache, daß einer der Histidinreste des Cytochroms c, deren es nach *Theorell* und *Åkeson*<sup>7</sup> insgesamt drei gibt, in direkter Verbindung mit einem der beiden hämatingebundenen Halbcystinreste und somit in unmittelbarer Nachbarschaft zur prosthetischen Gruppe selbst steht. Dies läßt vermuten, daß es sich bei der Imidazolgruppe dieses Histidinrestes um eine der beiden mit dem Eisenatom der prosthetischen Gruppe verknüpften und für das Hämochromogenspektrum des Ferments verantwortlichen Gruppen des Proteins handelt.

Die Mikro-S-Analysen wurden von Dr. *G. Kainz* im Mikroanalytischen Laboratorium des II. Chemischen Instituts ausgeführt.

Für sein förderndes Interesse an dieser Arbeit sind wir dem Vorstand unseres Institutes, Herrn Prof. Dr. *F. Wessely*, zu großem Dank verpflichtet.

Einer von uns (*H. T.*) dankt für die Hilfe, die ihm von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften aus den Mitteln der *Seegen*-Stiftung gewährt worden ist.

<sup>34</sup> *H. Tuppy* und *G. Bodo*, Mh. Chem. 85 (1954), im Druck.