

Eine mit dem gelben Sulfhydrylreagens N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)-maleinimid untersuchte Aminosäuresequenz im Protein des Tabakmosaikvirus

Von

H. Tuppy

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 7. August 1961)

N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)-maleinimid wurde an die Sulfhydrylgruppe des Tabakmosaikvirus-Proteins während dessen Spaltung mit Pepsin addiert. Drei durch das gelbe Reagens markierte Cysteinylopeptide wurden aus dem Hydrolysat isoliert und näher untersucht. Die ermittelte Aminosäuresequenz, CysSH-Thr-Asp(NH₂)-Ala-Leu-Gly-Asp(NH₂)-Glu(NH₂), stimmt mit jener überein, die kürzlich von *A. Tsugita* u. a.⁴ für die Aminosäurereste 27 bis 34 der Polypeptidkette des Tabakmosaikvirus-Proteins angegeben worden ist.

Wie in einer früheren Arbeit¹ gezeigt worden ist, vereinigt sich N-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)-maleinimid (*DDPM*) in neutraler oder saurer Lösung mit der Sulfhydrylgruppe sowohl freien als auch peptidgebundenen Cysteins. Bei der enzymatischen Hydrolyse cysteinhaltiger, mit *DDPM* behandelter Proteine bleibt das gelbe Reagens mit den Sulfhydrylgruppen verbunden; es erleichtert durch diese Markierung die Auffindung, Reinigung und Charakterisierung cysteinhaltiger Spaltprodukte. Als erstes Beispiel einer Anwendung des *DDPM* ist die Isolierung und Untersuchung eines aus Serumalbumin gewonnenen cysteinhaltigen Nonapeptids beschrieben worden¹.

Für eine weitere Erprobung des Reagens erschien das Protein des Tabakmosaikvirus (*TMV*) aus zwei Gründen interessant. Erstens ist der in jeder Untereinheit der Proteinkomponente des Virus vorkommende

¹ *A. Witter* und *H. Tuppy*, *Biochem. Biophys. Acta* **45**, 429 (1960).

Cysteinrest durch eine „maskierte“ Sulfhydrylgruppe ausgezeichnet; diese ist im nativen Protein den meisten Reagentien (z. B. Nitroprussid, Jodacetat, p-Chlormercuribenzoat, Sauerstoff) unzugänglich und geht bei der Denaturierung durch Autoxydation rasch verloren². Zweitens ist die Aminosäuresequenz des *TMV*-Proteins von zwei Arbeitsgruppen wohl bereits genau untersucht und in großen Zügen übereinstimmend formuliert worden^{3, 4}, doch unterscheiden sich deren Ergebnisse in einigen Einzelheiten, unter anderem auch hinsichtlich der Bausteinanordnung in unmittelbarer Nachbarschaft des Cysteinrestes.

Experimenteller Teil

DDPM wurde auf die früher beschriebene Weise¹ synthetisiert; bei der Umkristallisation bewährte sich die Verwendung von Eisessig als Lösungsmittel⁵ besser als die verdünnten Äthanol.

TMV wurde uns in freundlicher Weise von Herrn Dr. *H. G. Wittmann* zur Verfügung gestellt. Zur Darstellung der nucleinsäurefreien Proteinkomponente diente die von *H. Fraenkel-Conrat*⁶ eingeführte Spaltung mit 67proz. Essigsäure.

Pepsin war ein krist. Präparat der Worthington Biochemical Corp., Freehold, N. J. *Carboxypeptidase* stammte von der Firma Light & Co., Ltd., Colnbrook (Bucks) England. *Bacillus-subtilis-Proteinase*⁷ (Nagase & Co., Ltd., Osaka, Japan) war ein Geschenk von Herrn Prof. *K. Okunuki*.

Talcum wurde durch 2stdg. Erwärmen mit einer Mischung gleicher Teile von 2 n HCl und Äthanol und durch gründliches Waschen mit Wasser gereinigt.

Verdauung des TMV-Proteins mit Pepsin in Gegenwart von DDPM

80 ml einer durch Zugabe von HCl auf pH 1,8 gebrachten 1proz. Lösung von *TMV*-Protein wurden mit 40 mg *DDPM* (in 4 ml Methylcellosolve gelöst) und mit 8 mg Pepsin (in 4 ml 0,01 m HCl gelöst) versetzt. Während der 24stdg. Inkubation bei 37° wurde der pH-Wert mehrmals mit 1 n HCl auf 1,8 nachgestellt. Nachdem die gelbe Lösung von nicht umgesetztem Reagens durch 4maliges Ausschütteln mit Äther befreit worden war, wurde sie bei Zimmertemp. im Vak. zur Trockene gebracht und der Rückstand in Wasser gelöst. Beim Filtrieren dieser Lösung durch eine mit *Talcum* beschickte Chromatographiersäule ($d = 1$ cm, $h = 15$ cm) blieb der größte

² *H. Fraenkel-Conrat*, in „Sulfur in Proteins“, Academic Press 1959, p. 339.

³ *F. A. Anderer, H. Uhlig, E. Weber* und *G. Schramm*, Nature [London] **186**, 922 (1960); *F. A. Anderer, E. Weber* und *H. Uhlig*, Z. Naturforsch. **15b**, 79 (1960).

⁴ *A. Tsugita, D. T. Gish, J. Young, H. Fraenkel-Conrat, C. A. Knight* und *W. M. Stanley*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **46**, 1463 (1960).

⁵ *R. W. Burley* und *T. Haylett*, Chemistry & Industry **1959**, 1285.

⁶ *H. Fraenkel-Conrat*, Virology **4**, 1 (1957).

⁷ *K. Okunuki, H. Matsubara, S. Nishimura* und *B. Hagihara*, J. Biochem. [Japan] **43**, 857 (1956).

Teil der gelben Anteile am Talcum haften und konnte anschließend mit 50proz. Äthanol, das 2% Eisessig enthielt, eluiert werden. Der durch Eindampfen des Eluats erhaltene Rückstand wog 45 mg.

Fraktionierung und Charakterisierung *S*-substituierter Cysteinylpeptide

Für eine papierelektrophoretische Auftrennung der im Eluat enthaltenen Peptide wurde jeweils 1/10 der zur Verfügung stehenden Menge eingesetzt. Bei mehrstündigem Lauf auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043a bei pH 2 trennten sich voneinander drei annähernd gleich kräftig gelb gefärbte Banden (Abb. 1), von denen zwei, *I* und *II*, eine positive Ninhydrinreaktion gaben, *III* hingegen nicht. *I* war durch ein gleich schnell wanderndes farbloses, ninhydrin-positives Peptid verunreinigt, von dem es vor weiteren Untersuchungen, am besten durch Papierelektrophorese bei pH 4,7, befreit werden mußte.

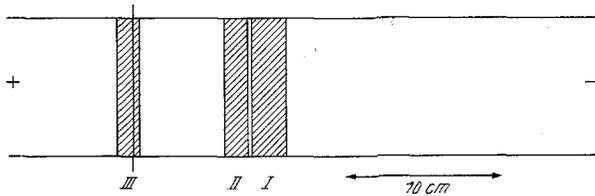


Abb. 1. Papierelektrophoretische Trennung gelb markierter Cysteinylpeptide, die aus *TMV*-Protein bei dem Abbau mit Pepsin in Gegenwart von *DDPM* erhalten worden sind (Essigsäure-Ammonium-Puffer, pH 2, 4 Stdn., 12 V/cm, 8 mA)

Bei 15stg. Hydrolyse mit 6 n HCl, der 1% Thioglykolsäure zugesetzt war, lieferten die drei gelben Peptide die gleichen Bausteine: Leucin, Alanin, Threonin, Glykokoll, Glutaminsäure, Asparaginsäure und 2-Amino-2-carboxy-äthyl-mercaptobornsteinsäure; die letztgenannte, bei saurer Hydrolyse von Cystein, an dessen SH-Gruppe *DDPM* addiert worden ist, entstehende Aminotricarbonsäure¹ läßt sich durch Papierelektrophorese bei pH 4,7 leicht von Glutamin- und Asparaginsäure trennen und identifizieren, da sie hierbei 1,2mal rascher zur Anode wandert als Asparaginsäure. Die Peptide *I*, *II* und *III* unterscheiden sich voneinander nicht durch verschiedene Zusammensetzung oder Struktur ihrer Polypeptidkette, sondern hinsichtlich der Natur des gelben Substituenten. Wurde *I* bei pH 7,5 gehalten, so wandelte es sich in *II* und *III* um; daraus läßt sich auf das Verhältnis, in dem die Peptide chemisch zueinander stehen, rückschließen.

Während aus *III* durch Behandlung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und anschließende Hydrolyse keine Dinitrophenyl-(*DNP*-)Aminosäure gewonnen werden konnte, lieferten sowohl *I* als auch *II* eine ätherlösliche gelbe Verbindung, die, bei pH 4,7 elektrophoretisch untersucht, rascher zur Anode wanderte als *DNP*-Asparaginsäure und der die Struktur einer 2-(*DNP*-Amino)-2-carboxyäthyl-mercaptobornsteinsäure zugeschrieben wurde. Bei Inkubation von *III* mit 30 µg *DFP*-vorbehandelter Carboxypeptidase in 0,3 ml 0,15 m Ammonacetatlösung bei pH 8 wurden Glutamin und Asparagin (neben geringeren Mengen von Glykokoll, Alanin und Leucin) in Freiheit gesetzt.

Nach Spaltung von *II* mit 0,3 mg *B. subtilis*-Proteinase (in 0,1 n Ammonacetatlösung, pH 8, 15 Std., 37°) und anschließender elektrophoretischer

Auftrennung des Hydrolysats bei pH 2 (Abb. 2) traten hauptsächlich drei Spaltprodukte auf. *1 A* war gelb gefärbt, reagierte mit Ninhydrin unter Violettfärbung und gab bei saurer Hydrolyse 2-Amino-2-carboxyäthylmercaptobensteinsäure, Threonin und Asparaginsäure. Dinitrophenylierung mit nachfolgender Hydrolyse lieferte das gleiche *DNP*-Derivat, das auch aus *II* erhalten worden war. Carboxypeptidase löste vom C-terminalen Ende

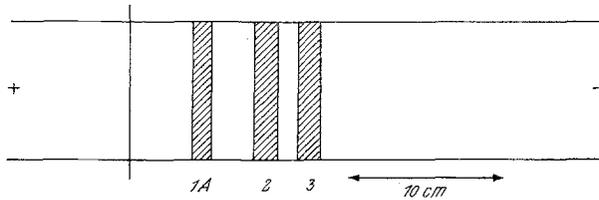


Abb. 2. Papier-Elektrophorese der Peptidmischung, die bei der Verdauung des gelb markierten Cysteinylpeptids II mit *B.subtilis*-Proteinase entstanden ist (Essigsäure-Ameisensäure-Puffer, pH 2, 3 Std., 12 V/cm, 8 mA)

des Peptids *1 A* Asparagin ab. Bei partiellem hydrolytischen Abbau (konz. HCl, 42 Std., 37°) entstand eine beträchtliche Menge des Dipeptids Thr-Asp, dessen N-terminaler Aminosäurerest mit Hilfe der *DNP*-Methode identifiziert wurde. Das Peptid *2* gab mit Ninhydrin eine gelbe, in Violett umschlagende Färbung. Es wanderte bei neutralem pH im elektrischen Felde nicht. Saure Hydrolyse lieferte Glykokoll, Asparagin- und Glutamin-

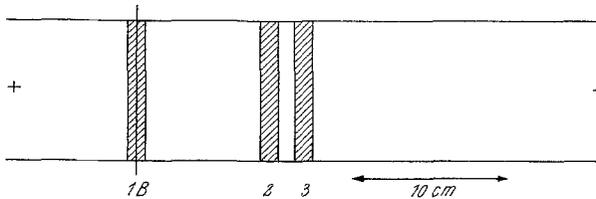


Abb. 3. Papier-Elektrophorese der Peptidmischung, die bei der Verdauung des gelb markierten Cysteinylpeptids III mit *B.subtilis*-Proteinase entstanden ist (vgl. Abb. 2)

säure. Die N-terminale Stellung von Glykokoll wurde mit der *DNP*-Methode, die C-terminale von Glutamin durch Behandlung von *2* mit Carboxypeptidase ermittelt, wobei freies Glutamin und das Dipeptid Gly-Asp(NH₂) entstanden. Das Peptid *3* schließlich erwies sich als ein einfaches Dipeptid, Ala-Leu.

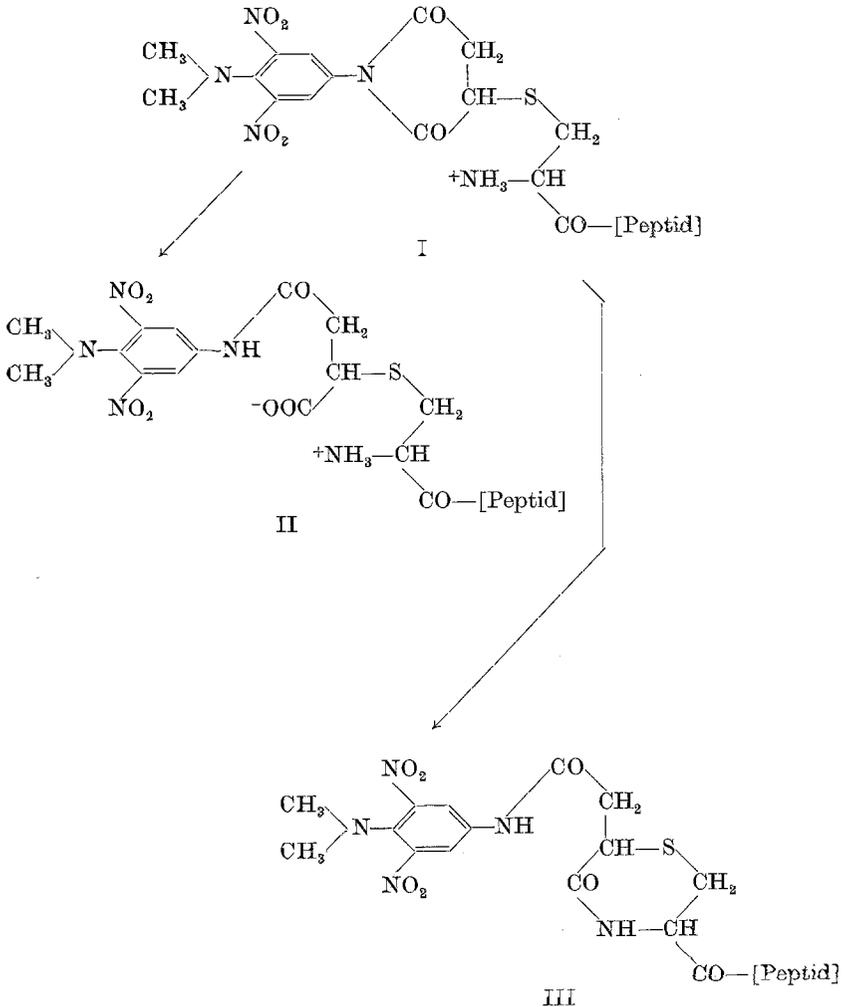
Bei Behandlung des gelb-markierten Peptids *III* mit der *B.subtilis*-Proteinase entstanden ebenfalls drei Spaltprodukte (Abb. 3), von denen zwei mit *2* und *3* identisch waren; das dritte, *1 B*, unterschied sich von *1 A* dadurch, daß es keine freie α -Aminogruppe besaß und aus diesem Grunde im elektrischen Felde bei pH 2 nicht wanderte. Spaltung von *1* mit der bakteriellen Proteinase lieferte vier Peptide: *1 A*, *1 B*, *2* und *3*.

Ergebnisse und Diskussion

DDPM zeichnet sich vor anderen Sulfhydryl-Reagentien dadurch aus, daß es auch in saurer Lösung mit Thiolgruppen reagiert^{1, 5}. Da es überdies die proteolytische Aktivität von Pepsin nicht beeinträchtigt, konnte es an

die „maskierte“ SH-Gruppe des *TMV*-Proteins² während dessen bei pH 1,8 vorgenommener Verdauung mit Pepsin addiert werden.

Aus der Verdauungsmischung ließen sich drei gelbe Peptide isolieren (Abb. 1), die hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz sich voneinander nicht



unterschieden. Ihr Auftreten ist dadurch zu erklären, daß das zunächst durch Addition von *DDPM* an die SH-Gruppe eines Cysteinpeptids entstehende Anlagerungsprodukt *I* einerseits durch hydrolytische Aufspaltung des Succinimidringes in ein Succinamidsäurederivat *II*, anderer-

seits durch intramolekulare Transacylierung^{1, 8} in ein Thiazanderivat *III* übergehen kann. Mit dieser Erklärung steht im Einklang, daß *II* und *III* sauerere Eigenschaften besitzen als *I* und daß *III* im Gegensatz zu *I* und *II* einer freien α -Aminogruppe entbehrt.

Die geringe Stabilität des Succinimid-Ringsystems, die zum Auftreten mehrerer gelber Derivate eines und desselben Cysteinylpeptids führt, ist ein ernster Nachteil und stellt eine breitere Anwendung des *DDPM* für strukturelle Untersuchungen an SH-Proteinen in Frage.

Bei der Spaltung der gelben Peptide *I*, *II* und *III* mit *B. subtilis*-Proteinase (Abb. 2 und 3) entstanden gelbe Derivate des Tripeptids CySH-Thr-Asp-(NH₂) (*IA* und *IB*), ferner das Dipeptid Ala-Leu (*3*) und das Tripeptid Gly-Asp(NH₂)-Glu(NH₂) (*2*). Da in den gelben Peptiden Cystein, wie mit Hilfe der *DNP*-Technik ermittelt wurde, den N-terminalen Aminosäurerest stellt und da Carboxypeptidase vom C-terminalen Ende Glutamin und Asparagin abspaltete, lassen sich die drei Bruchstücke zur Okta-peptid-Sequenz



zusammensetzen. Dieses Ergebnis bestätigt die Richtigkeit der von *Tsugita* u. a.⁴ für die Aminosäurereste 27 bis 34 der Polypeptidkette des *TMV*-Proteins angegebenen Anordnung; die ein wenig abweichende Formulierung *Anderers* u. a.³, -[CySH, Thr]-Asp-Leu-Ala-Leu-Gly-Asp(NH₂)-Glu(NH₂)-, bedarf offenbar einer geringfügigen Korrektur.

Herrn Dr. *H. G. Wittmann* dankt der Verfasser für die Überlassung von Tabakmosaikvirus, Herrn Prof. *K. Okunuki* für Proben kristallisierter *Bacillus-subtilis*-Proteinase. Besonderer Dank gilt der *Rockefeller* Foundation für ihre wertvolle Unterstützung.

⁸ *D. G. Smyth, A. Nagamatsu und J. S. Fruton, J. Amer. Chem. Soc. 82, 4600 (1960).*