

Über die beim tryptischen Abbau von Pferde-Cytochrom *c* entstehenden Peptide

Von

H. Tuppy und G. Kreil

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 24. Mai 1962)

Die bei tryptischer Spaltung von Pferde-Cytochrom *c* entstehenden Peptide wurden mit Hilfe papierelektrophoretischer und papierchromatographischer Methoden isoliert und ihre Aminosäuresequenz bestimmt. Damit wurde eine wichtige Voraussetzung für die Ermittlung der gesamten Struktur des Cytochroms *c* erfüllt⁴⁰. Besonders interessant war der Befund, daß eines der tryptischen Peptide, das offenbar vom Aminoende der Polypeptidkette des Cytochrom-*c*-Apoproteins stammt, einen acetylierten N-terminalen Aminosäurerest enthält.

Cytochrom *c* ist unter den katalytisch wirksamen Proteinen infolge seiner leichten Isolierbarkeit und seines relativ geringen Molekulargewichts von ca. 12 000 ein besonders geeignetes Objekt für Untersuchungen über die Proteinstruktur und ihre Beziehung zur physiologischen Funktion.

In den letzten Jahren sind von verschiedenen Autoren Aminosäureanalysen des Pferde-Cytochroms *c* publiziert worden, aus denen sich folgende Bruttoformel ergibt¹⁻⁵:

Ala 6, Arg 2, Asp 7—8, Cys 2, Glu 11—14, Gly 11—12, His 3—4, Ileu 5—6, Leu 5—6, Lys 17—19, Met 2, Phe 3—4, Pro 3—5, Ser 0—2, Thr 9—10, Try 1, Tyr 4, Val 2—3.

¹ R. Nunnikhoven, *Biochim. Biophys. Acta* **28**, 108 (1958).

² G. Leaf, N. E. Gillies und R. Pirrie, *Biochem. J.* **69**, 605 (1958).

³ J. W. Holeman und G. Biserte, *Bull. soc. chim. biol.* **41**, 975 (1959).

⁴ E. Margoliash, *Feder. Proceed.* **19**, 217 (1960).

⁵ M. L. Coval, T. Horio und M. D. Kamen, *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 246 (1961).

Material und Methoden

Cytochrom c wurde nach der Vorschrift von *Keilin* und *Hartree*¹⁵ isoliert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Chromatographie an Amberlite IRC 50¹⁶. Die verwendeten Präparate enthielten 0,42—0,43% Eisen; der Quotient der Extinktionskoeffizienten bei 550 und 280 m μ betrug 1,08—1,15.

Trypsin, *Chymotrypsin* und *Pepsin* waren käufliche Produkte der Firma Worthington. Das verwendete *Subtilisin* stammte von der Firma Nagarse & Co. (Osaka, Japan)¹⁷ und wurde uns freundlicherweise von Prof. *Okunuki* zur Verfügung gestellt. Zum Abbau von Peptiden mit *Oxytocinase* wurde eine 4000fach gereinigte Enzymlösung eingesetzt; die Anreicherung aus Retroplacentars Serum erfolgte nach *Tuppy* und *Wintersberger*¹⁸.

Formylglycin wurde aus Glycin und wasserfreier Ameisensäure¹⁹, *Acetyl-glycin* durch Umsetzung von Glycin mit Essigsäureanhydrid in Eisessig²⁰ dargestellt. Die Synthese von *Propionylglycin* erfolgte analog der des Acetyl-derivates unter Verwendung von Propionsäureanhydrid und wasserfreier Propionsäure. *Lactylglycin* wurde aus Glycin und α -Brompropionylechlorid durch Inkubation des entstehenden α -Brompropionylglycins mit frisch gefälltem Silbercarbonat dargestellt²¹. Die Darstellung von *Glycyl-L-Asparaginsäure* erfolgte nach *E. Fischer* aus Chloracetylasparaginsäure und Ammoniak²². Die Acetylierung und Propionylierung der *Glycylasparaginsäure* wurde analog der des Glycins vorgenommen; die entstehenden Öle konnten nicht zur Kristallisation gebracht werden, waren jedoch chromatographisch einheitlich.

Spaltung von Cytochrom c mit Trypsin

a) 100 mg *Cytochrom c* wurden in 10 ml Wasser gelöst und 5 mg *Trypsin* zugesetzt. Die Lösung wurde mit verd. NH_3 oder mit verd. Essigsäure auf pH 8,0 gebracht und 20 Stdn. bei 37° inkubiert. Der pH-Wert wurde von Zeit zu Zeit mit Hilfe des pH-Meters kontrolliert und durch Zusatz von verd. NH_3 konstant gehalten. Am Ende der Inkubation wurde das Enzym durch kurzes Erhitzen denaturiert, abzentrifugiert und die überstehende Lösung lyophilisiert.

b) Da das verwendete *Trypsin* Spuren von *Chymotrypsin* enthielt, mußten die Hydrolysebedingungen modifiziert werden, wenn eine eindeutige, nur auf tryptische Aktivität zurückgehende Spaltung erwünscht war. Das *Trypsin* wurde zunächst mit 1/16n HCl 24 Stdn. bei 37° inkubiert. Dabei wird ein Großteil des begleitenden *Chymotrypsins* infolge seiner Säurelabilität irreversibel denaturiert²³. Nach Dialyse und Gefriertrocknung erhält man so ein Enzympräparat, das kaum mehr chymotryptische Aktivität zeigt. Die Inkubation mit diesem „vorbehandelten“ *Trypsin* erfolgte wie unter a); der Verlauf der enzymatischen Spaltung wurde mit Hilfe eines pH-Stats (Radiometer, Kopenhagen) kontrolliert. Der Laugenverbrauch ist

¹⁵ *D. Keilin* und *E. F. Hartree*, *Biochem. J.* **39**, 289 (1945).

¹⁶ *E. Margoliash*, *Biochem. Prepar.* **5**, 33.

¹⁷ *B. Hagihara*, *H. Matsubara*, *M. Nakai* und *K. Okunuki*, *J. Biochem. [Tokyo]* **45**, 185 (1958).

¹⁸ *H. Tuppy* und *E. Wintersberger*, *Mh. Chem.* **91**, 1001 (1960).

¹⁹ *E. Fischer* und *O. Warburg*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **38**, 3997 (1905).

²⁰ *H. D. Dakin*, *J. Biol. Chem.* **82**, 443 (1929).

²¹ *E. Fischer*, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **40**, 507 (1906).

²² *E. Fischer*, *Ann. Chem.* **340**, 123 (1905).

²³ *R. P. Redfield* und *C. B. Anfinsen*, *J. biol. Chem.* **221**, 385 (1956).

unmittelbar nach der Enzymzugabe am größten und fällt nach 90—120 Min. stark ab. Die Verdauung wurde abgebrochen, nachdem ca. 6,5 Mol Lauge/Mol Cytochrom c verbraucht waren.

Trennung der Peptide

Das entstandene Peptidgemisch wurde auf Filterpapierbögen (Whatman 3 MM Papier) durch „finger-printing“^{24, 25} aufgetrennt. Dabei wird das Hydrolysat zunächst in einer Richtung elektrophoretisch und anschließend senkrecht dazu chromatographisch aufgeteilt. Die Elektrophorese erfolgte bei pH 4,7 in Pyridin—Essigsäure-Puffer (10 ml Pyridin, 10 ml Essigsäure, 1 l Wasser) bei 1500 V, die Chromatographie in Butanol—Eisessig—Wasser (4:1:5). Je Papierbogen konnten 3—4 mg Hydrolysat eingesetzt werden. Manche Peptide ließen sich auf diese Weise nur schlecht trennen. Sie wurden dann gemeinsam eluiert und einer weiteren Papierelektrophorese bei pH 2,0 (40 ml Ameisensäure, 200 ml Essigsäure, ad 1500 mit Wasser) oder bei pH 6,4 (10 ml Pyridin, 0,4 ml Eisessig, 90 ml Wasser) unterworfen.

Zur Sequenzbestimmung wurde entweder das Material mehrerer „finger-prints“ gesammelt oder die Auftrennung einer größeren Menge der Peptidmischung in zwei Stufen durchgeführt. Im letzteren Fall wurden zunächst je 8 mg des Gemisches elektrophoretisch vorfraktioniert, die entsprechenden Fraktionen mehrerer Elektrophoresen gesammelt und jede für sich sodann chromatographisch weiter aufgetrennt. Fraktionen, die methioninhaltige Peptide enthielten, wurden vor der Chromatographie 20 Stdn. mit 0,02m Thioglykolsäure bei 50° inkubiert²⁶. Unterläßt man dies, so geben solche Peptide infolge teilweiser Bildung von Methioninsulfoxyd breite Zonen oder Doppelflecken.

Isolierung und Charakterisierung der Peptide

Die getrockneten Bogen wurden 10 Min. auf 110° erhitzt, wonach die Peptide unter der UV-Lampe als schwach bläuliche Flecken sichtbar waren. Sie wurden eluiert, zur Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung mit 6N HCl 15 Stdn. bei 105° hydrolysiert und die Hydrolysate chromatographiert.

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren erfolgte nach *Sanger* durch Umsetzung mit FDNB²⁷, die der C-terminalen Aminosäuren wurde durch Hydrazinolyse²⁸. Zur Chromatographie der DNP-Aminosäuren wurde das System tert. Amylalkohol-0,2m Phthalatpuffer (pH 6,0) verwendet²⁹. Größere Peptide wurden durch partielle Hydrolyse mit konz. HCl (37°, 24 bis 72 Stdn.) oder mit proteolytischen Enzymen weiter abgebaut. Die Methodik entspricht weitgehend jener, die von *Sanger* und Mitarb. bei der Aufklärung des Insulins verwendet wurde³⁰.

Die elektrophoretische Wanderungstrecke von sauren und basischen Bruchstücken wurde auf die von freiem Lysin bzw. auf die von freier Asparaginsäure oder Glutaminsäure bezogen. Die so erhaltenen Quotienten (*R*-

²⁴ *V. M. Ingram*, Biochim. Biophys. Acta **28**, 539 (1958).

²⁵ *C. B. Anfinsen*, *S. E. G. Aquist*, *J. P. Cooke* und *B. Jönsson*, J. biol. Chem. **234**, 1118 (1959).

²⁶ *J. I. Harris* und *P. Roos*, Biochem. J. **71**, 434 (1959).

²⁷ *F. Sanger*, Biochem. J. **39**, 507 (1945).

²⁸ *S. Akabori*, *K. Ohno* und *K. Narita*, Bull. Chem. Soc. Japan **25**, 214 (1952).

²⁹ *S. Blackburn* und *A. Lowther*, Biochem. J. **48**, 126 (1951).

³⁰ *F. Sanger* und *H. Tuppy*, Biochem. J. **49**, 463 und 481 (1951).

Werte, R_{Lys} , R_{Asp} und R_{Glu}) sind gut reproduzierbar und erlauben bei bekannter Nettoladung der Peptide Rückschlüsse auf deren Größe, bei bekannter Größe Rückschlüsse auf die Nettoladung. Dies war in einigen Fällen für die Interpretation der Ergebnisse von großem Wert.

Die R_f -Werte bei der Chromatographie sind nur schlecht reproduzierbar. Es ist günstiger, die Wanderungstrecke eines Peptids auf die von Leucin bzw. von Neutralrot, das gleich rasch wie Leucin läuft, zu beziehen (R_{Leu}).

Methoden zur Untersuchung des Peptids T 20

Bei der Spaltung mit Pepsin entsteht ein Acetyl-dipeptid (T 20 P 2), das mit Ninhydrin nicht anfärbbar ist. Die Lokalisation erfolgte entweder nach

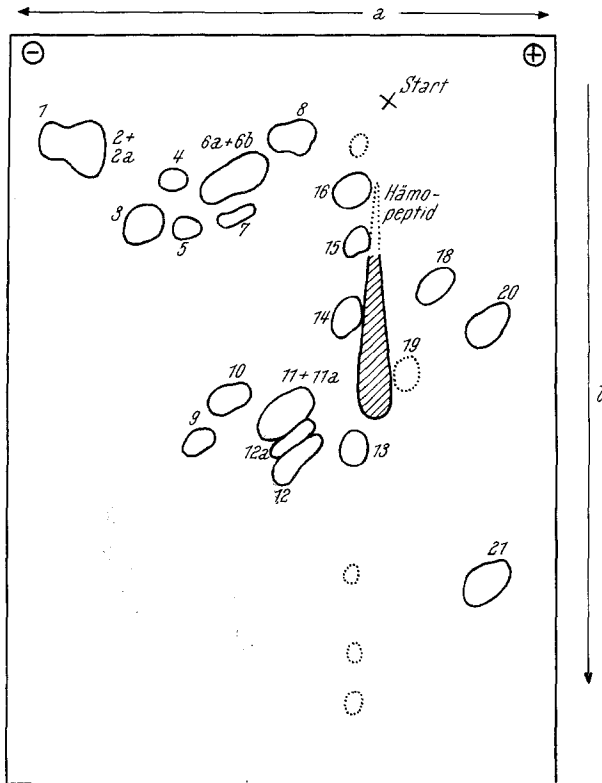


Abb. 1. Tryptisches Hydrolysat des Pferde-Cytochroms c
 a Elektrophorese in Pyridin—Essigsäure-Puffer (pH 4,7)
 b Chromatographie in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

Rydon und Smith durch Chlorierung und nachfolgende Behandlung mit KJ-Stärke-Lösung³¹ oder durch Besprühen mit Glucose—Anilin (1 g Anilin und 1 g Glucose in 25 ml Butanol—Alkohol—Wasser 3:1:1) und nachfolgendes Erhitzen auf 140°³². Das zuletzt genannte Sprühreagens bewährte sich

³¹ H. N. Rydon und P. W. G. Smith, Nature [London] **169**, 922 (1952).

³² H. Michl und G. Högenauer, J. Chromatogr. **2**, 380 (1959).

auch für Acylaminosäuren. Das bei der Hydrazinolyse von T 20 P 2 entstehende Acetylhydrazid konnte durch Chromatographie in Pyridin—Anilin—Wasser (9:1:4) identifiziert werden³³. Die Anfärbung von Hydraziden kann durch Besprühen mit ammoniakal. AgNO₃-Lösung erfolgen (0,1n AgNO₃—5n NH₃, 1:1).

Ergebnisse

Das nach der Auftrennung mittels „finger-printing“ erhaltene Peptidmuster ist abhängig sowohl von der Dauer der Inkubation des Cytochroms c mit Enzym als auch davon, ob das verwendete Trypsin durch Vor-

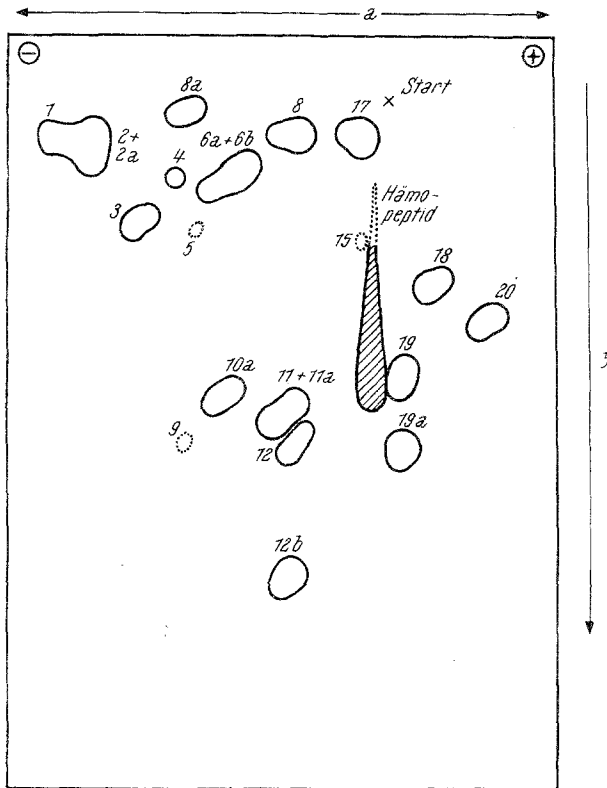


Abb. 2. Tryptisches Hydrolysat von Pferde-Cytochrom c. Das verwendete Trypsin war durch Säurebehandlung von Chymotrypsin befreit worden. Elektrophorese und Chromatographie wie bei Abb. 1

behandlung mit verd. Salzsäure weitgehend von Chymotrypsin befreit worden war oder nicht (Abb. 1 und 2).

Die qualitative Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Peptide ist in Tab. 1 zusammengestellt.

³³ K. Narita, Biochim. Biophys. Acta **28**, 185 (1958).

Im folgenden werden kurz die zur Ermittlung der Aminosäuresequenz der Peptide durchgeführten Versuche beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Die qualitative Aminosäurezusammensetzung der Peptide

T1	Lys
T2	Gly, Lys
T2a	His, Lys
T3	Lys
T4	Gly, Lys
T5	Arg, Gly
T6a	Gly, Lys
T6b	Asp, Lys
T7	Glu, Lys, Val
T8	Arg, Glu, Lys, Thr
T8a	Arg, Glu, Lys, Thr
T9	Leu, Lys
T10	Ala, Gly, Ileu, Lys
T10a	Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro, Thr
T11	Gly, Ileu, Lys, Pro, Thr, Tyr
T11a	Gly, Ileu, Lys, Thr, Try
T12	Glu, Ileu, Lys, Phe, Val
T12a	Asp, His, Gly, Leu, Phe, Pro, Thr
T12b	Ala, Gly, Ileu, Lys, Met, Phe
T13	Ala, Glu, Gly, Phe, Pro, Thr, Tyr
T14	Asp, Glu, Leu, Lys, Pro
T15	Arg, Glu, Thr
T16	Ala, Asp, Lys, Thr
T17	Ala, Asp, Glu, Gly, Lys, Phe, Pro, Thr, Tyr
T18	Ala, Asp, Glu, Thr
T19	Asp, Glu, Leu, Lys, Met, Pro, Thr, Tyr
T19a	Ala, Asp, Glu, Ileu, Leu, Lys, Tyr
T20	Asp, Glu, Gly, Lys, Val
T21	Ala, Asp, Glu, Ileu, Leu, Tyr

Tabelle 2. Die Aminosäuresequenz der Peptide

T1	Lys-Lys
T2	Gly-Lys-Lys
T2a	His-Lys
T3	Lys
T4	Gly-Lys
T5	Gly-Arg
T6a	Gly-Gly-Lys
T6b	AspN-Lys
T7	[GluN, Val]-Lys
T8	Lys-Thr-Glu-Arg
T8a	Lys-Lys-Thr-Glu-Arg
T9	Leu-Lys
T10	Ala-Gly-Ileu-Lys
T10a	Thr-Gly-Pro-AspN-Leu-His-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg
T11	Tyr-Ileu-[Pro, Gly]-Thr-Lys

- T11a Gly-Ileu-Thr-Try-Lys
 T12 Ileu-Phe-Val-GluN-Lys
 T14 Leu-Glu-AspN-Pro-Lys
 T15 Thr-Glu-Arg
 T16 Thr-[Ala, Asp]-Lys
 T17 Thr-[Ala, GluN, Gly, Pro]-Phe-Thr-Tyr-Thr-[Ala, Asp]-Lys
 T18 Ala-Thr-AspN-Glu
 T19 Glu-[Glu, Leu, Thr]-[Met, Glu]-Tyr-Leu-Glu-AspN-Pro-Lys
 T19a Glu-Asp-Leu-Ileu-Ala-Tyr-Leu-Lys
 T20 Acetyl-Gly-Asp-Val-Glu-Lys
 T21 Glu-Asp-Leu-Ileu-Ala-Tyr

T1: Dieses Peptid wandert bei pH 4,7 ebenso wie T2 und T2a elektrophoretisch rascher als freies Lysin; es muß demnach doppelt positiv geladen sein. T1 enthält nur Lys, bei der Dinitrophenylierung entstand Di-DNP-Lys und ϵ -DNP-Lys.

Struktur: *Lys-Lys*.

T2: Die Peptide T2 und T2a wurden gemeinsam eluiert und durch Elektrophorese bei pH 6,4 getrennt, wobei T2a deutlich langsamer wandert. T2 enthält Gly und Lys, Gly ist N-terminal. Bei tryptischer Weiterspaltung entsteht Gly-Lys (T4) und freies Lysin.

Struktur: *Gly-Lys-Lys*.

T2a: Enthält His und Lys; His ist N-terminal.

Struktur: *His-Lys*.

T3: Freies Lysin.

T4: Entsteht nur in kleiner Menge aus T2. Enthält Gly und Lys, Gly ist N-terminal.

Struktur: *Gly-Lys*.

T5: Enthält Gly und Arg; Gly ist N-terminal. Entsteht durch chymotryptische Weiterspaltung von T10a.

Struktur: *Gly-Arg*.

T6a: Dieses Peptid wurde gemeinsam mit T6b isoliert und von diesem durch Elektrophorese bei pH 2 getrennt. T6a enthält Gly und Lys. Dinitrophenylierung und anschließende Hydrolyse ergaben DNP-Gly, freies Gly und ϵ -DNP-Lys.

Struktur: *Gly-Gly-Lys*.

T6b: Enthält Asp und Lys; Asp ist N-terminal. Aus der Ladung wurde geschlossen, daß die Asparaginsäure als Amid vorliegt.

Struktur: *AspN-Lys*.

T7: Enthält Val, Glu und Lys. Dieses Peptid entsteht durch chymotryptische Spaltung von T12 (Sequenzermittlung siehe dort).

T8: Enthält Thr, Glu, Arg und Lys; Lys ist N-terminal. Bei tryptischer Weiterspaltung entstehen freies Lys und Thr-Glu-Arg (T15, neutral).

Struktur: *Lys-Thr-Glu-Arg*.

T8a: Enthält die gleichen Aminosäuren wie T8, wandert jedoch rascher zur Kathode als dieses. Bei der Dinitrophenylierung entstehen Di-DNP-Lys und ϵ -DNP-Lys. Bei tryptischer Spaltung entstehen Lys-Lys (T1), Thr-Glu-Arg (T15), Lys und [Lys, Thr, Glu, Arg] (T8).

Struktur: *Lys-Lys-Thr-Glu-Arg*.

T9: Enthält Leu und Lys; Leu ist N-terminal. Dieses Peptid entsteht in geringer Menge aus T19a.

Struktur: *Leu-Lys*.

T10: Enthält Ala, Gly, Ileu und Lys; Ala ist N-terminal. Bei partieller Hydrolyse (60 Stdn.) entstehen neben freien Aminosäuren das Peptid [Ileu, Lys] und eine geringe Menge [Gly, Ileu, Lys]. T10 bildet sich bei chymotryptischer Spaltung von T12b.

Struktur: *Ala-Gly-Ileu-Lys*.

T10a: Enthält Arg, Asp, Gly, His, Leu, Phe, Pro und Thr; Thr ist N-terminal. Bei chymotryptischer Spaltung entstehen Gly-Arg (T5, $R_{Lys} = 0,76$) und [Thr, Gly, Pro, AspN, Leu, His]-Phe (T12a, $R_{Lys} = 0,26$). Letzteres wurde mit Pepsin weiter abgebaut, wobei die Bruchstücke [Thr, Gly, Pro, AspN, Leu] (T12aP1, neutral) und [His, Gly, Leu]-Phe (T12aP2, $R_{Lys} = 0,32$) gebildet wurden.

T12aP1 wurde partiell hydrolysiert (42 Stdn.) und elektrophoretisch in drei Fraktionen getrennt: a) [Asp, Leu] ($R_{Asp} = 0,60$); b) [Thr, Gly, Pro, Asp, Leu]; c) neutrale Fraktion, die chromatographisch in 4 Peptide aufgeteilt werden konnte: [Thr, Gly] ($R_{Leu} = 0,29$); [Gly, Pro, AspN] ($R_{Leu} = 0,36$); [Gly, Pro, AspN, Leu] ($R_{Leu} = 0,88$); [Pro, AspN, Leu] ($R_{Leu} = 1,00$).

T12aP2 wurde ebenfalls partiell hydrolysiert und die entstehenden Bruchstücke chromatographisch getrennt: [His, Gly] ($R_{Leu} = 0,23$) und [Leu, Phe] ($R_{Leu} = 1,36$).

Die bei der Subtilisinspaltung von T10a entstehenden Peptide wurden elektrophoretisch getrennt. T10aS1: Gly-Arg ($R_{Lys} = 0,76$); T10aS2: Leu-His ($R_{Lys} = 0,65$); T10aS3: neutrale Fraktion, die chromatographiert wurde. T10aS3a: Thr-[Gly, Pro, AspN] ($R_f = 0,26$); T10aS3b: Phe ($R_f = 0,58$); T10aS3c: Gly-Leu ($R_f = 0,65$); T10aS3d: [Gly, Leu, Phe] ($R_f = 0,79$).

Struktur von T10a: *Thr-Gly-Pro-AspN-Leu-His-Gly-Leu-Phe-Gly-Arg*.

T11: T11 und T11a trennten sich auf den „finger-prints“ nur in besonders günstigen Fällen. Sie wurden zunächst gemeinsam eluiert. T11a konnte sodann durch kurze Inkubation mit Chymotrypsin (30 Min.) und nachfolgende Elektrophorese leicht abgetrennt werden. Dabei wird T11a in ein neutrales Peptid und freies Lysin gespalten, während T11 intakt bleibt.

T11 enthält Gly, Thr, Pro, Tyr, Ileu und Lys; Tyr ist N-terminal. Chymotrypsin und Pepsin spalten das Peptid nicht. Beim Abbau mit Subtilisin entstehen T11S1: Thr-Lys ($R_{Lys} = 0,72$), T11S2: [Ileu, Pro, Gly, Thr]-Lys ($R_{Lys} = 0,42$) und T11S3: neutrale Fraktion. T11S3 wurde chromatographisch in zwei Komponenten aufgetrennt: [Ileu, Pro, Gly, Thr] ($R_f = 0,64$) und [Ileu, Pro, Gly] ($R_f = 0,71$).

Bei der partiellen Hydrolyse von T11 werden neben freiem Lys und dem Dipeptid Thr-Lys die Bruchstücke [Ileu, Pro, Gly] und [Tyr, Ileu, Pro, Gly] gebildet.

Durch Oxytocinase werden vom N-terminalen Ende des Peptids T11 Tyr und Ileu abgespalten. Die Dinitrophenylierung des verbleibenden Tetrapeptids ergab nur Spuren von DNP-Pro neben Gly, Thr und ϵ -DNP-Lys. Der Versuch war jedoch nicht eindeutig genug, um die Reihenfolge -Pro-Gly- sicherzustellen.

Struktur: *Tyr-Ileu-[Pro, Gly]-Thr-Lys*.

T11a: Enthält Gly, Ileu, Thr, Try und Lys; Gly ist N-terminal. Chymotrypsin spaltet in freies Lys und Gly-[Ileu, Thr]-Try. Bei partieller Hydrolyse des Peptids (24 Stdn.) wurde neben freien Aminosäuren das Dipeptid Gly-Ileu in guter Ausbeute gefunden.

Struktur: *Gly-Ileu-Thr-Try-Lys*.

T12: Enthält Glu, Ileu, Val, Phe und Lys; Ileu ist N-terminal. Chymotrypsin, Pepsin und Subtilisin spalten alle in die Bruchstücke Val-GluN-Lys ($R_{Lys} = 0,56$) und [Ileu, Phe]. Bei partieller Hydrolyse (60 Stdn.) wurde vor allem [Ileu, Phe, Val] gebildet.

Struktur: *Ileu-Phe-Val-GluN-Lys*.

T12a: Enthält Gly, Asp, His, Leu, Phe und Thr. Dieses Peptid entsteht beim chymotryptischen Abbau von T10a (siehe dort).

T12b: Enthält Ala, Gly, Ileu, Met, Phe und Lys; Met ist N-terminal. Bei chymotryptischer Spaltung entstehen zwei Bruchstücke: T12bC1: Ala-Gly-Ileu-Lys (T10, $R_{Lys} = 0,56$) und T12bC2: [Met, Ileu]-Phe (neutral).

Struktur: *Met-Ileu-Phe-Ala-Gly-Ileu-Lys*.

T13: Enthält Ala, Glu, Gly, Pro, Phe, Thr und Tyr; Thr ist N-terminal. Dieses Peptid ist ein Teil von T17. Es entsteht nur in geringen Mengen und wurde nicht näher untersucht.

T14: Enthält Asp, Glu, Leu, Pro und Lys; Leu ist N-terminal. T14 entsteht durch chymotryptische Spaltung von T19. Bei partieller Hydrolyse von T14 entstehen [Pro, Lys] und [Leu, Glu] in guter Ausbeute. Dieses Peptid wandert bei pH 4,7 etwas zur Kathode ($R_{Lys} = 0,15$). Daraus kann geschlossen werden, daß die Glutaminsäure in freier Form vorliegt, die Asparaginsäure hingegen als Amid; im umgekehrten Fall müßte das Peptid neutral sein, da die stärker saure β -Carboxylgruppe der Asparaginsäure bei diesem pH vollkommen als Anion vorliegt.

Struktur: *Leu-Glu-AspN-Pro-Lys*.

T15: Enthält Glu, Thr und Arg; Thr ist N-terminal. Dieses Peptid entsteht bei kurzer tryptischer Spaltung nur in geringer Menge aus T8 und T8a.

Struktur: *Thr-Glu-Arg*.

T16: Enthält Ala, Asp, Thr und Lys; Thr ist N-terminal. Dieses Peptid entsteht bei chymotryptischer Spaltung von T17.

Struktur: *Thr-[Asp, Ala]-Lys*.

T17: Enthält Ala, Asp, Glu, Gly, Phe, Pro, Thr, Tyr und Lys; Thr ist N-terminal. Bei chymotryptischer Spaltung entstehen drei neutrale Peptide, die chromatographisch getrennt wurden. T17C1: [Thr, Ala, Asp]-Lys (T16, $R_f = 0,09$); T17C2: [Thr, Gly, GluN, Ala, Pro]-Phe ($R_f = 0,19$); T17C3: Thr-Tyr ($R_f = 0,26$). T17 wurde auch mit Pepsin gespalten, es konnten jedoch nur zwei Peptide charakterisiert werden: [Thr, Asp, Ala]-Lys (T16, $R_f = 0,09$) und [Tyr, Thr, Asp, Ala]-Lys ($R_f = 0,15$). Diese Ergebnisse erlauben die Aufstellung einer Teilsequenz, wobei es möglich ist, daß einige der in Klammer stehenden Aminosäuren mehrmals vorkommen.

Struktur: *Thr-[Gly, GluN, Ala, Pro]-Phe-Thr-Tyr-Thr-[Ala, Asp]-Lys*.

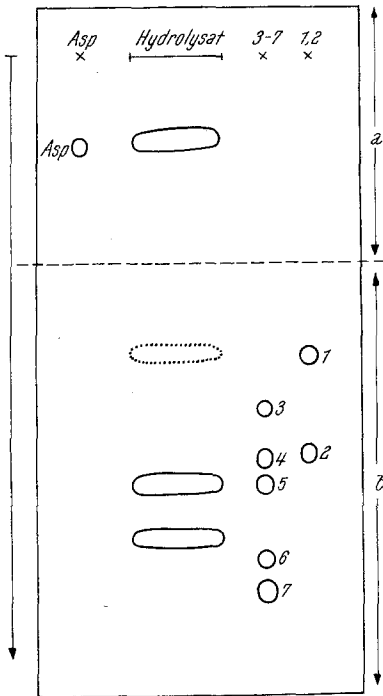
T18: Enthält Ala, Asp, Glu und Thr; Endgruppen: Ala (N-terminal) und Glu (C-terminal). Bei der Spaltung mit Subtilisin entstehen die beiden Bruchstücke T18S1: [Asp, Glu] ($R_{Glu} = 0,54$) und T18S2: Ala-Thr. Aus der elektrophoretischen Beweglichkeit von T18S1 konnte geschlossen werden, daß die Asparaginsäure als Amid und die Glutaminsäure in freier Form vorliegt. Dies steht in Einklang mit dem Ergebnis der Hydrazinolyse, bei der

freie Glutaminsäure gefunden wurde. Durch Oxytocinase wurden von T18 Ala und Thr abgespalten.

Struktur: *Ala-Thr-AspN-Glu*.

T19: Enthält Asp, Glu, Leu, Met, Pro, Thr, Tyr und Lys; Glu ist N-terminal. Chymotrypsin spaltet in zwei Bruchstücke. T19C1: Leu-[Glu, AspN, Pro]-Lys ($R_{Lys} = 0,15$); T19C2: Glu-[Glu, Thr, Leu, Met]-Tyr ($R_{Glu} = 0,68$).

Bei der Spaltung mit Pepsin entstehen fünf Peptide, die elektrophoretisch (pH 4,7) getrennt werden konnten. T19P1: [Glu, AspN, Pro]-Lys ($R_{Lys} = 0,15$); T19P2: [Tyr, Leu] (neutral); T19P3: [Met, Glu, Tyr, Leu] ($R_{Glu} = 0,29$); T19P4: [Met, Glu] ($R_{Glu} = 0,49$); T19P5: [Glu₂, Thr, Leu] ($R_{Glu} = 0,77$). Diese Resultate ergeben folgende Teilstruktur: *Glu-[Glu, Thr, Leu]-[Met, Glu]-Tyr-Leu-Glu-AspN-Pro-Lys*.



T19a: Enthält Ala, Asp, Glu, Leu, Ileu, Tyr und Lys; Glu ist N-terminal. Bei chymotryptischer Spaltung entstehen T19aC1: Leu-Lys ($T9, R_{Lys} = 0,67$) und T19aC2: [Glu, Asp, Leu, Ileu, Ala]-Tyr ($T21, R_{Glu} = 0,66$). T19aC2 wurde mit Pepsin weiter abgebaut, wobei zwei Tripeptide, Glu-Asp-Leu ($R_{Glu} = 1,00$) und Ileu-Ala-Tyr, entstanden.

Struktur: *Glu-Asp-Leu-Ileu-Ala-Tyr-Leu-Lys*.

T20: Enthält Asp, Glu, Gly, Val und Lys. Aminoendgruppe konnte keine gefunden werden. Bei peptischer Spaltung entstanden T20P1: Val-Glu-Lys ($R_{Lys} = 0,20$) und T20P2: [Gly,

Abb. 3. Chromatographie der bei Hydrolyse von T20 P2 in 0,01 n HCl entstandenen Bruchstücke a) Anfärbung mit Ninhydrin b) Anfärbung mit Glucose-Anilin

Zur Identifizierung wurden folgende synthetisch hergestellte Vergleichssubstanzen verwendet: 1) Acetyl-Gly-Asp ($R_{Leu} = 0,82$); 2) Propionyl-Gly-Asp ($R_{Leu} = 1,05$); 3) Formyl-Gly ($R_{Leu} = 0,97$); 4) Lactyl-Gly ($R_{Leu} = 1,08$); 5) Acetyl-Gly ($R_{Leu} = 1,15$); 6) Propionyl-Gly ($R_{Leu} = 1,34$); 7) Benzoyl-Gly ($R_{Leu} = 1,42$)

Asp] ($R_{Asp} = 1,16$). Letzteres gibt keine Ninhydrinfärbung, enthält also keine freie α -Aminogruppe und konnte nur mit besonderen Methoden angefärbt werden (siehe exper. Teil).

Untersuchung von T20P2

1. T20P2 wurde mit wasserfreiem Hydrazin gespalten und die Reaktionsmischung elektrophoretisch getrennt. T20P2H1: ($R_{Lys} = 1,52$) Glycinhydrazid. Gelbe Ninhydrinfarbe, Hydrazinreaktion positiv; bei der Hydrolyse entsteht Glycin. T20P2H2 (neutral): schwache Ninhydrinfarbe, Hydrazinreaktion stark positiv. Chromatographie in Pyridin—Anilin—Wasser (9:1:4) gab einen Doppelfleck ($R_f = 0,68$ und 0,72). Synthetisches

Acetylhydrazid hat in diesem Gemisch einen R_f -Wert von 0,74. T20P2H3: freie Asparaginsäure.

2. Partielle Hydrolyse in 2n HCl: Das Peptid wurde in 2n HCl 40 Min. bei 105° hydrolysiert. Dann wurde in Butanol—Eisessig—Wasser (4:1:5) chromatographiert und die obere Hälfte des Chromatogramms mit Ninhydrin, die untere mit Glucose—Anilin angefärbt. Mit Ninhydrin wurde eine starke Zone gefunden, die elektrophoretisch (pH 4,7) in Gly, Gly-Asp und Asp aufgetrennt werden konnte. Im unteren Teil des Chromatogramms wurde eine Spur Acetylglycin gefunden.

3. Partielle Hydrolyse bei pH 2: Das Peptid wurde in 0,01n HCl (pH 2,0) 90 Min. bei 105° hydrolysiert und das Hydrolysat wie beim vorigen Versuch getrennt. Neben etwas unverändertem Peptid und Spuren von Gly und Gly-Asp wurden unter diesen Bedingungen hauptsächlich Asparaginsäure und Acetylglycin gebildet. Um das Acetylglycin eindeutig identifizieren zu können, wurden eine Reihe von N-Acylverbindungen des Glycins synthetisiert, die jedoch alle einen von dem des Acetylglycins deutlich verschiedenen R_f -Wert aufwiesen (Abb. 3). Neben Acetylglycin wurde immer noch eine zweite, nicht identifizierte, mit Glucose—Anilin anfärbbare Substanz gefunden, bei deren Hydrolyse jedoch keine Aminosäure in nennenswerter Menge gebildet wurde.

Struktur von T20: *Acetyl-Gly-Asp-Val-Glu-Lys*.

T21: Enthält Ala, Asp, Glu, Ileu, Leu und Tyr. Endgruppen: Glu (N-terminal) und Tyr (C-terminal). Dieses Peptid entsteht bei chymotryptischer Spaltung von T19a (s. dort).

Diskussion

Aus tryptischen Hydrolysaten von Cytochrom *c* aus Pferdeherzmuskel konnten 29 Peptide isoliert und charakterisiert werden. Auf Grund des Lysin- und Arginingehaltes von Cytochrom *c* waren in solchen Hydrolysaten nur 20—22 Bruchstücke zu erwarten. Die erhöhte Zahl erklärt sich durch die Tatsache, daß nach Ablauf der gewählten Hydrolysenzeit die Bindungen zwischen aufeinanderfolgenden Lysin- und Argininresten noch nicht quantitativ gespalten waren. So wurden beispielsweise im Hydrolysat nebeneinander die Peptide *Lys-Lys-Thr-Glu-Arg* (T8a), *Lys-Thr-Glu-Arg* (T8) und *Thr-Glu-Arg* (T15) gefunden, die vom gleichen Abschnitt der Peptidkette des Cytochroms *c* stammen. Außerdem enthielt das verwendete Trypsinpräparat Spuren von Chymotrypsin, das einzelne tryptische Peptide weiter abbaute. Wenn man die Aminosäurereste zusammenzählt, die in den längsten tryptischen Spaltprodukten gefunden wurden — also in jenen, die bei kurzzeitiger Hydrolyse in der Hauptmenge vorliegen und nicht erst durch tryptische oder chymotryptische Weiterspaltung größerer Bruchstücke entstanden sind — so findet man gute Übereinstimmung mit der Bruttoformel des Cytochroms *c*. Dies zeigt, daß im Hydrolysat keine wesentlichen Bruchstücke übersehen wurden. Nur bei der Zahl der Lysinreste ergab sich eine Unklarheit, da nach tryptischer Spaltung immer eine beträchtliche Menge

freies Lysin gefunden wurde, das aus *Lys-Lys* bzw. *Arg-Lys*-Sequenzen stammt.

Die Trennung und Isolierung der Peptide und die Bestimmung ihrer Aminosäuresequenz erfolgte ausschließlich durch papierelektrophoretische und papierchromatographische Methoden. Daher standen nur sehr geringe Substanzmengen zur Verfügung und die Untersuchung jedes einzelnen Bruchstückes erforderte eine sorgfältige Auswahl der günstigsten Analysenbedingungen. Dies ist heute auf Grund der Erfahrungen, die bei der Sequenzanalyse von Ribonuclease, Insulin, ACTH usw. gewonnen worden sind, schon recht gut möglich.

Als N-terminaler Aminosäurerest im Cytochrom *c* waren von anderen Autoren sowohl Histidin⁶ als auch Arginin⁷ angegeben worden. Sämtlich Versuche, einen dieser Befunde zu verifizieren, verliefen negativ^{3, 8}. Arginin konnte als N-terminale Aminosäure auch indirekt ausgeschlossen werden, da die beiden im Cytochrom *c* vorkommenden Argininreste am C-terminalen Ende zweier tryptischer Peptide gefunden wurden (T8a und T10a). Auch zwei der drei Histidinreste befinden sich in den von uns untersuchten Peptiden nicht in terminaler Position. In einem der tryptischen Peptide (T20) wurde, so wie im intakten Cytochrom *c*, kein Aminosäurerest mit freier α -Aminogruppe gefunden. Aus T20 konnte jedoch ein Acylderivat des Glycins isoliert werden, das durch chromatographischen Vergleich als Acetylglycin identifiziert wurde. Man muß annehmen, daß dieses Peptid vom N-terminalen Ende des Cytochroms *c* stammt. Die Hypothese, daß eventuell die α -Aminogruppe eines N-terminalen Aminosäurerestes koordinativ an das Häm-Eisen gebunden sei, wird dadurch gegenstandslos. Man kennt heute schon eine Reihe von Proteinen und Polypeptiden, die keine freie α -Aminogruppe besitzen, sondern bei denen eine Acylaminosäure das eine Ende der Polypeptidkette bildet. Zu diesen gehören beispielsweise die Proteine einiger Pflanzenviren (Tabakmosaikvirus³³, cucumber virus³⁴, turnip yellow mosaic virus³⁵), Rinderfibrinogen³⁶ und Ovalbumin³⁷. Dabei hat sich die endständige Aminosäure als von Fall zu Fall verschieden erwiesen, während der Acylrest in allen bisher bekannten Fällen eine Acetylgruppe war. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist auch Cytochrom *c* zu den „Acetyl-Proteinen“ zu zählen.

Wie wir vor kurzem durch eine persönliche Mitteilung erfuhren, gelang es *Titani et al.*³⁸, aus einem durch Spaltung mit Pronase (*Streptomyces griseus* Protease) erhaltenen Cytochrom-Hydrolysat ein Acetyl-

³⁴ K. Narita, *Biochim. Biophys. Acta* **31**, 372 (1959).

³⁵ J. I. Harris und A. Hindley, *J. Molec. Biol.* **3**, 117 (1961).

³⁶ J. E. Folk und J. A. Gladner, *Biochim. Biophys. Acta* **44**, 383 (1960).

³⁷ K. Narita, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **5**, 160 (1961).

³⁸ K. Titani, K. Narita und K. Okunuki, persönl. Mitt.

Im Verlauf der hier beschriebenen Untersuchungen wurde uns bekannt, daß Prof. *Smith* und Dr. *Margoliash* in Salt Lake City (Utah) an der Trennung und Strukturermittlung der chymotryptischen Bruchstücke arbeiteten³⁹. Als Ergebnis eines Austausches und einer Kombination der in Salt Lake City und Wien erhaltenen Resultate konnte die Formel der gesamten Primärstruktur des Pferde-Cytochroms *c* aufgestellt werden⁴⁰ (Formel I). Dieser Formel I zufolge enthält Cytochrom *c* 104 Aminosäuren, die alle in einer einzigen Polypeptidkette angeordnet sind. Die beiden Cysteinreste, an die das Häminmolekül gebunden ist, befinden sich nahe dem N-terminalen Ende (Aminosäurereste 14 und 17). Alle drei Histidinreste, von denen zwei mit großer Wahrscheinlichkeit koordinativ an das Eisen gebunden sind, sind im ersten Drittel der Peptidkette lokalisiert (Aminosäurereste 18, 26 und 33). Auffällig ist die stellenweise Häufung basischer und saurer Aminosäurereste (z. B. 2—8, 25—27, 60—62, 86—93). Es gibt gute Hinweise dafür, daß die Gruppierungen basischer Aminosäuren für die Ausbildung der in vivo bedeutsamen Cytochrom-*c*-Phospholipid-Komplexe essentiell sind⁴¹.

Der Rockefeller Foundation danken wir für Unterstützung, die dieser Arbeit zugute gekommen ist.

³⁹ *E. Margoliash* und *E. L. Smith*, Nature [London] **192**, 1121 (1961).

⁴⁰ *E. Margoliash*, *E. L. Smith*, *G. Kreil* und *H. Tuppy*, Nature [London] **192**, 1126 (1961).

⁴¹ *M. L. Das*, *J. M. Machinist* und *F. L. Crane*, Feder. Proceed. **21**, 154 (1962).