

# Chemische Analyse und Struktur des Poliovirus.

## I. Cystein/Cystin Gehalt, vollständige Aminosäureanalyse und Hydrophobizität von Poliovirus und seinen natürlichen leeren Kapsiden

Chemical Analysis and Structure of Poliovirus.

I. Cysteine/Cystine Content, Complete Amino Acid Analysis and Hydrophobicity of Poliovirus and Its Naturally Occurring Empty Capsids

Jochen Heukeshoven und Rudolf Dernick \*

Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg, Martinistraße 52, D-2000 Hamburg 20

Z. Naturforsch. **36 c**, 164–172 (1981); eingegangen am 21. August 1980

Poliovirus, Empty Capsids, Amino Acid Analysis, Extinction Coefficient, Hydrophobicity

The cysteine content of poliovirus particles and naturally occurring empty capsids was determined by two methods: (1) reaction with vinylpyridine and subsequent amino acid analyses and (2) treatment with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and measurement in the change of absorption. Both methods were performed under dissociating conditions in order to expose all sulfhydryl groups. Poliovirus, type 1, strain Mahoney, contains 10–11 cysteine/cystine residues per protomer, irrespective of the use of virus particles or empty capsids. Poliovirus, type 3, strain Saukett, contains 12–13 cysteine/cystine residues per protomer. Poliovirus particles are completely free of disulfide bridges, whereas empty capsids contain 2–4 cystine residues/protomer. No sulfhydryl groups are present on the surface of the virus particle, because of lack of reaction with DTNB.

The tryptophan content was determined to be  $13 \pm 1$  residues/protomer. By amino acid analysis under controlled hydrolyzing conditions 12 residues/protomer were found, whereas formylation in hydrochloric acid/formic acid revealed 14 residues/protomer; 13 tryptophan residues were calculated from the tyrosine-tryptophan relation and the optical density at 293.5 nm and 280 nm.

The following parameters of poliovirus particles were calculated from the improved and complete amino acid analysis and the cysteine and tryptophan content:

1. The molecular weight of a protomer to be  $92\,700 \pm 900$  Dalton and of the poliovirus particle, type 1, strain Mahoney, to be  $7.97 \times 10^6$  Dalton.

2. The relative hydrophobicity of the poliovirus polypeptide to be 1.18.

3. The extinction coefficients of poliovirus  $E_{280}^{1\%} = 74$  and of empty capsids  $E_{280}^{1\%} = 16.2 \pm 0.2$ .

### Einleitung

Struktur und biologische Aktivität von Proteinen werden häufig durch Cystin- und Cysteingruppierungen entscheidend beeinflusst. Einerseits sind diese Gruppen bei vielen Enzymen an der Katalyse, an allosterischen Regulationen, sowie an Tertiär- und Quartärstrukturen beteiligt. Andererseits sind gerade Disulfidbrücken wichtige Bauelemente von Sekundär- und Tertiärstruktur auch nichtenzymatisch wirksamer Proteine, der Strukturproteine.

In Proteinen oder in Mischungen von verschiedenen Proteinen, die sowohl Thiol- als auch Disulfidgruppen enthalten, können inter- und intramoleku-

lare Redoxprozesse besonders leicht ablaufen. Dadurch können sich die physikalischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Proteine erheblich verändern. Reduktion der Disulfidbrücken mit anschließender Blockierung der Thiofunktion durch geeignete Schutzgruppen oder aber die Oxidation des Schwefels dieser Gruppen zur Sulfonsäure sind daher Verfahren zur Unterdrückung solcher Interaktionen.

Für unsere Untersuchungen über die Struktur des Poliovirus und seiner Hüllproteine sowie für Fragen der Dissoziation und Reassoziatio[n] [1–3] des Virus ist es wichtig, mehr Information über den Gehalt an Cystin und Cystein in den Viruspolypeptiden zu erhalten. Weiterhin scheinen uns vergleichende Peptidanalysen nach spezifischer Spaltung der Polypeptidketten an den Cysteinresten aussichtsreich zu sein [4].

\* R. Drzeniek changed his name to DERNICK in October 1980.

Sonderdruckerfordernungen an Dr. J. Heukeshoven.

0341-0382/81/0100-0164 \$ 01.00/0



In den Aminosäureanalysen, die bisher veröffentlicht wurden [5–8] sind entweder keine Angaben über den Gehalt an Cystin und Cystein enthalten, oder es ist keine Differenzierung dieser Aminosäuren vorgenommen worden. Außerdem findet man bei einem Vergleich der angegebenen Analysenwerte erhebliche Differenzen, was uns veranlaßte, die Aminosäurezusammensetzung der Polioviruspolypeptide mit der heute zur Verfügung stehenden, verbesserten Analysetechnik neu zu bestimmen. Hinweise auf Cysteinreste im Poliovirus brachten Alkylierungsexperimente mit [ $^{14}\text{C}$ ]Jodacetamid [8]. Es konnte gezeigt werden, daß beim nativen Virus (Polio Typ 2) keine Cysteinreste auf der Oberfläche markiert werden können, während nach Dissoziation mit SDS eine Markierung der Polypeptide VP 1–3 erfolgt. VP 4 ist nicht markiert und enthält daher wahrscheinlich keine Cysteinreste. In Übereinstimmung damit findet man beim Poliovirus Typ 1, das in [ $^3\text{H}$ ]cystinhaltigem Medium vermehrt wurde, nur Spuren von  $^3\text{H}$ -Aktivität im VP 4 [9]. Zu dem gleichen Ergebnis kommen Wetz *et al.* [10], die kürzlich durch Markierung von Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, mit [ $^{35}\text{S}$ ]Cystein zeigen konnten, daß das Verhältnis von Cystein in den Polypeptiden VP 1:VP 2:VP 3:VP 4 = 1,4:5:3,6:0 ist.

Der Vergleich mit anderen Picornaviren (ME-Virus [11, 12], Mengovirus [13]) zeigt, daß auch bei diesen im kleinsten Polypeptid Delta (entspricht VP 4) keine Cysteinreste gefunden werden, während die Polypeptide  $\alpha$ – $\gamma$  (VP 1–3) insgesamt 10 Cystein- oder Cystinreste enthalten (aus Markierungsversuchen mit [ $^{35}\text{S}$ ]Cystein).

Die Aminosäureanalyse sollte ferner bei geeigneter Probenvorbereitung erstmals Aussagen über den Tryptophangehalt liefern, über den bei den Polypeptiden des Poliovirus bisher keinerlei Angaben vorliegen. Für ME-Virus [14] und Mengovirus [13, 15] werden etwa 20 bzw. 16 Tryptophanreste für ein Protomer angegeben. Das Tryptophan ist besonders interessant, weil es den größten Beitrag zum Extinktionskoeffizienten der Proteine im Bereich von 280 nm liefert [16], und weil es als stark hydrophobe Aminosäure mit großem Molvolumen der Seitenkette die Gesamthydrophobizität der Peptidkette beeinflusst [17, 18]. Ferner ist Tryptophan als Angriffspunkt für eine sehr spezifische chemische Spaltung der Peptidkette geeignet [19–21]. Die Aminosäureanalyse ist zwar eine aufwendige aber auch die genaueste Proteinbestimmungsmethode, die zusam-

men mit dem UV-Spektrum zum Extinktionskoeffizienten führt. Dieser kann auch aus den Gehalten an Tryptophan, Tyrosin und Cystein theoretisch annähernd berechnet werden [16]. Weitere wichtige Daten, wie das Molekulargewicht [22] und die hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften [17, 18] lassen sich aus der vollständigen Aminosäureanalyse herleiten.

## Material und Methoden

### Chemikalien

4-Vinylpyridin und Thioglykolsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) wurden vor Gebrauch unter  $\text{N}_2$  destilliert. S- $\beta$ -(4-Pyridylethyl)cystein wurde nach Cavins *et al.* [23] dargestellt. 5,5'-Dithiobis-(2-nitro-N-2'-hydroxyethyl-benzamid) erhielten wir nach der Methode von Legler [24]. Die Aminosäurekalibrationsmischung war von Beckman (München). Tryptophan, Norleucin und die Testproteine Lysozym und Ovalbumin (von Serva, Heidelberg) waren bei 70 °C im Hochvakuum ( $2 \times 10^{-3}$  mbar) über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet. Alle anderen Chemikalien waren p. a. Reagentien von Merck (Darmstadt). Für die Aminosäureanalyse und Hydrolyse wurde die 6N HCl einmal über  $\text{CrO}_3$  destilliert.

### Virus-, Kapsid- und RNA-Präparate

Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, und Typ 3, Stamm Saukett, wurden nach den früher beschriebenen Verfahren erhalten, gereinigt und charakterisiert [25, 26]. Die verwendeten Präparate der natürlich vorkommenden leeren Kapside wurden aus den leichten Banden [26] von 8–10 Viruspräparationen gewonnen. Das Präparat Nr. 1 wurde anschließend durch zweimalige CsCl-Gradientenzentrifugation gereinigt. Das Präparat Nr. 2 wurde zusätzlich in einem Glyceringradienten (15 bis 30% in 0,9% NaCl) 4 h bei 35 000 rpm bei 6 °C zentrifugiert (SW 40, Beckman). Die Fraktionen der leeren Kapside wurden gegen 0,9% NaCl dialysiert. RNA von Poliovirus Typ 1 wurde durch Phenolextraktion gewonnen [27].

### Bestimmung von Cystein/Cystin

Die Bestimmung des Gehalts an Cystein und Cystin im Poliovirus Typ 1 und Typ 3 sowie in den natürlichen leeren Kapsiden von Typ 1 wurden nach einem in einigen Punkten modifizierten Verfahren von Inglis u. a. [28] durchgeführt. Die experimentellen Bedingungen mußten vor allem auf

eine Mikromethode umgestellt werden. Bei den geringen Mengen an Protein, die eingesetzt werden sollten, mußte auf einen Dialyseschritt verzichtet werden, um Verluste zu vermeiden. Als Puffersysteme und Reagentien zur Dissoziation und Denaturierung des Virus oder der Proteine wurden solche gewählt, die im Vakuum flüchtig sind (z. B. Formamid, N-Äthylmorpholinacetat) oder die Aminosäureanalyse auf keinen Fall stören (z. B. SDS). Wir haben zur Blockierung der Cysteinreste die Umsetzung mit 4-Vinylpyridin benutzt [29], weil diese Methode gegenüber anderen folgende Vorteile aufweist: 1. Die Reaktion ist einfach und schnell, 2. das Alkylierungsprodukt S- $\beta$ -(4-Pyridylethyl)-cystein ist absolut hydrolysebeständig [23] und läßt sich bequem nach dem Verfahren der Aminosäureanalyse an Ionenaustauschern [30] bestimmen. Die Elutionsposition ist leicht zu variieren, so daß eine Überlappung mit anderen Aminosäuren nicht auftritt, 3. die Reaktion ist bereits bei einem geringen Überschuß an 4-Vinylpyridin quantitativ und völlig spezifisch. Erst bei einem hohen Überangebot reagieren  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins [31]. Bei längerem Einwirken von Luftsauerstoff können S-Oxide gebildet werden [32]. Unter Hydrolysebedingungen reagiert Vinylpyridin mit Methionin, doch läßt sich diese Reaktion dadurch unterdrücken, daß man den Überschuß an Vinylpyridin mit Mercaptoethanol abfängt [33].

Cystingruppen werden dadurch bestimmt, daß sie zunächst reduziert (am besten mit Dithioerythrit) und dann mit 4-Vinylpyridin alkyliert werden. Der Cystingehalt ergibt sich durch Differenzbildung aus zwei Parallelanalysen, die mit und ohne Reduktionsschritt durchgeführt wurden.

Die Bestimmung wird nach folgendem Reaktionsmuster durchgeführt: Alle Reaktionen werden unter  $N_2$  in 1 ml konischen Mikro-Vials (Zinsser) oder Reacti Vials (Pierce) mit teflangedichtetem Schraubverschluß durchgeführt. Zu 20  $\mu$ l Viruslösung (ca. 1 mg/ml) werden 20  $\mu$ l Norleucin (1  $\mu$ mol/ml) als innerer Standard, 30  $\mu$ l Puffer (0,1 M N-Ethylmorpholinacetat, pH 7,5, 5 mM EDTA), 70  $\mu$ l frisch destilliertes Formamid und, wenn unter reduktiven Bedingungen gearbeitet werden soll, 10  $\mu$ l Dithioerythritlösung (0,5 mmol/ml im gleichen Puffer) gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 40 °C werden 10  $\mu$ l einer 10-prozentigen Lösung von Vinylpyridin in i-Propylalkohol zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Der Überschuß an Vinylpyridin wird mit 5  $\mu$ l Mercaptoäthanol abgefangen (2 h bei

40 °C). Die Reaktionsansätze werden in der Trockenpistole bei 30 °C im Vakuum über  $P_2O_5$  und KOH eingetrocknet (Endvakuum mind. 0,05 mbar). Der Rückstand wird in 200  $\mu$ l 6 N HCl/4% Thioglykolsäure bei 105 °C hydrolysiert. Anstelle von Formamid kann auch eine 1%ige SDS-Lösung zur Denaturierung (2 min bei 100 °C) benutzt werden.

#### *Hydrolyse und Aminosäureanalyse*

Um eine Zersetzung des Tryptophans während der sauren Hydrolyse zu vermeiden, wird diese entweder in 3 N Methansulfonsäure mit einem 0,2-prozentigem Zusatz von Tryptamin [28, 34–36] oder mit 6 N Salzsäure mit 4-prozentigem Zusatz von Thioglykolsäure [37, 38] durchgeführt. Für Mikroverfahren ist die Hydrolysemethode mit HCl/Thioglykolsäure besser geeignet, da hierbei die Säure im Vakuum vollständig entfernt werden kann. Eine zu starke Verdünnung der Probe durch Neutralisation, was im Falle der Methansulfonsäure notwendig ist, wird dabei vermieden.

Zur Hydrolyse werden 200–300  $\mu$ l Säure verwendet. Die Reaktionsgefäße werden mit  $N_2$  gespült und so verschlossen, daß ein Druckausgleich beim Erwärmen auf 80–90 °C möglich ist; erst danach werden die Gefäße fest verschlossen und in einem Heizblock für 24, 48 und 72 h auf 105 °C erwärmt. Anschließend wird die Säure in der Trockenpistole über KOH entfernt, der Rückstand in 200  $\mu$ l 0,1 N Lithium-Citratpuffer, pH 2,0, aufgenommen und ein Aliquot von 50  $\mu$ l für eine Analyse verwendet.

Die Aminosäureanalysen wurden mit einem automatischen Gerät für Mikrobestimmungen (Multichrom M, Beckman, München, mit automatischem Probengeber) nach einem Einsäulen Verfahren mit einem Fünf-Puffer-Lithium-Citrat-System [39, 40] durchgeführt. Alle Aminosäuren wurden fast vollständig aufgetrennt. Tryptophan und Pyridylethylcystein werden zwischen Histidin und Arginin als einzelne Peaks eluiert. Die quantitative Auswertung der Analysen erfolgte mit dem Datensystem SP 4000 (Spectra Physics, Darmstadt).

#### *Bestimmung von Tryptophan*

Neben der Bestimmung des Tryptophangehalts nach saurer Hydrolyse haben wir zur Überprüfung und Absicherung der Ergebnisse zwei spektroskopische Methoden verwendet. 1. Aus dem UV-Spektrum des in 0,1 N NaOH gelösten Proteins läßt sich aus den optischen Dichten bei 293,5 nm und 280 nm



das molare Verhältnis von Tyrosin und Tryptophan errechnen [41]. 2. Freies oder proteingebundenes Tryptophan wird in 100%iger Ameisensäure, die mit HCl-Gas gesättigt ist, am Indolstickstoff quantitativ formyliert und zeigt dann eine charakteristische Absorption bei 298 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 4880 [42]. Die Formylierungsreaktion kann spektroskopisch verfolgt werden.

Alle spektroskopischen Messungen wurden in einer Mikrodurchflußküvette ( $s = 1$  cm) an einem Spectralphotometer Acta M VI (Beckman) durchgeführt. Vorteilhaft dabei ist, daß nur 150–200 µl Probenlösung benötigt werden und daß die Küvette gut verschleißbar ist. Zur Bestimmung des Tryptophans werden 20–50 µl der Kapsidlösung in einem Mikro Vial (Zinsser) vorsichtig gefriergetrocknet. Der Rückstand wird in 100 µl HCl-gesättigter Ameisensäure aufgenommen, nach einer Stunde mit 100 µl Ameisensäure verdünnt und mit einer Kapillare in die Küvette überführt. Das Spektrum zwischen 350 und 250 nm wurde in halbstündigem Abstand wiederholt gemessen, bis keine Veränderung mehr eintrat (nach etwa 2 h Gesamtreaktionszeit).

#### SH-Gruppenbestimmung mit DTNB

Die schnell und einfach durchzuführende Bestimmung von Sulfhydrylgruppen mit DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) ist seit der Einführung von Ellman [43] eine häufig benutzte Methode der Proteinchemie. Wir haben dieses Reagenz verwendet, um Thiolgruppen auf der Oberfläche des intakten Virus oder solche SH-Gruppen, die während der Dissoziationsreaktion freigesetzt werden, zu bestimmen. Das bei der Reaktion entstehende 4-Nitro-3-carboxythiophenolation ist über längere Zeit nur dann stabil, wenn die metallionenkatalysierte Oxydation durch Zusatz von EDTA unterdrückt wird [44]. Alle verwendeten Lösungen enthalten daher 2–4 mM EDTA. Zur Messung werden 20 µl Virus oder der leeren Kapside, 10 µl 0,1-prozentige DTNB-Lösung in Trispuffer pH 7,5 und 200 µl Puffer oder Dissoziationslösung (9 M Harnstoff oder Formamid, oder 7 M Guanidin-HCl) in einem Mikro Vial gemischt und möglichst schnell in die Küvette überführt. Wie die Überprüfung unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen ergab, kann zur Berechnung des SH-Gehalts der Extinktionskoeffizient mit 13600 Liter  $\cdot$  mol $^{-1} \cdot$  cm $^{-1}$  bei 412 nm eingesetzt werden [43, 45].

#### Ergebnisse und Diskussion

Um die beschriebenen Mikromethoden zu überprüfen, haben wir zwei Testproteine, Lysozym (Huhn) und Ovalbumin, unter den gleichen Konzentrationsbedingungen wie die Virus- und Kapsidpräparate analysiert. Die Bestimmungen des Cystin/Cysteingehalts ergab, daß zu  $98 \pm 3\%$  die Literaturwerte [46, 47] gefunden wurden. Bei der Tryptophanbestimmung nach saurer Hydrolyse fanden wir beim Lysozym  $95 \pm 2\%$  wieder [46], während beim Ovalbumin ein höherer Wert erhalten wurde (3,8 statt 3,0 mol Trp/mol Ovalbumin [47]). Dieser Wert wurde aber durch die Bestimmung nach Previero [42] bestätigt (3,88 mol Trp/mol Ovalbumin).

In Tab. I sind in den Spalten 2–5 die Daten der Aminosäureanalysen der Polioviruspräparate vom Typ 1 und 3 sowie der Kapsidpräparate zusammengefaßt. Jeder Wert stellt den Mittelwert aus 6 Einzelanalysen dar (zwei Parallelhydrolysen dreimal analysiert), wobei die Werte für Serin und Threonin, sowie für Glycin (besonders beim Gesamtvirus) auf den Zeitpunkt Null der Hydrolyse extrapoliert sind. Die Virus- und Kapsidpräparate enthalten keine freien Aminosäuren. Die Standardabweichungen liegen bei maximal  $\pm 2\%$ . Nur bei Tryptophan,

Tab. I. Aminosäureanalyse von Poliovirus und leeren Kapsiden.

Aminosäure	Virus Typ 1	Virus Typ 3	Kapsid- präparat Nr. 1	Kapsid- präparat Nr. 2	Protomer für Polio- virus Typ 1 <sup>a</sup>
	[mol/100 mol]				
Asparagins. <sup>b</sup>	11,11	11,3	11,87	12,01	94
Threonin	8,90	8,10	8,82	8,95	74
Serin	7,73	8,50	7,59	7,59	64
Glutamins. <sup>b</sup>	7,67	8,41	7,64	7,76	64
Prolin	6,91	6,85	6,88	6,73	58
Glycin	6,73	6,81	6,56	6,64	56
Alanin	7,56	7,62	7,41	7,46	63
Cystein	1,20	1,51	1,30	1,30	10
Valin	6,49	6,51	6,31	6,51	55
Methionin	2,81	2,21	2,90	2,67	23
Isoleucin	4,80	4,70	4,41	4,47	40
Leucin	8,14	8,10	8,12	8,04	68
Tyrosin	4,39	4,85	4,43	4,49	37
Phenylalanin	4,14	3,84	4,01	3,91	34
Lysin	3,79	4,39	3,82	3,75	32
Histidin	2,18	1,81	2,22	2,11	18
Tryptophan	—	—	0,91	1,42	13 <sup>c</sup>
Arginin	4,45	4,20	4,36	4,19	36

<sup>a</sup> Graphisch ermittelte molare Zusammensetzung.

<sup>b</sup> Nach vorläufigen Messungen liegen etwa 53% als Asn und 45% als Gln vor.

<sup>c</sup> Spektroskopisch ermittelte 14 Tryptophan/Protomer.



das nur in den Kapsidpräparaten bestimmt wurde, und bei Pyridylethylcystein muß mit größeren Abweichungen gerechnet werden, da aufgrund der im Vergleich zu den anderen Aminosäuren geringen Mengen die Peakflächen dieser Aminosäuren mit geringerer Genauigkeit auswertbar sind. Aufgrund der kleinen Standardabweichungen können signifikante Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung von Poliovirus Typ 1 und Typ 3 erkannt werden. In beiden Typen werden gleiche Mengen an neutralen Aminosäuren mit aliphatischer Seitenkette gefunden (Pro, Gly, Ala, Val, Ile, Leu). Geringe Unterschiede, die aber deutlich sind, liegen bei Tyrosin und Phenylalanin vor, doch ist die Summe der aromatischen Aminosäuren bei beiden Virustypen fast gleich. Ähnliche Verhältnisse findet man bei den Aminosäuren mit Hydroxylgruppen in der Seitenkette, Threonin und Serin, sowie bei der Gruppe der basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin. Da ein Austausch von Aminosäuren offensichtlich nur innerhalb bestimmter Gruppen (aromatische, hydroxylhaltige oder basische Aminosäuren) stattgefunden hat, ist keine größere Änderung in den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Polypeptide zu erwarten (z. B. isoelektrische Punkte, Aggregationsfähigkeit, Löslichkeit) [48].

Die Unterschiede in der RNA der Poliovirustypen 1 und 3, die durch Hybridisierungsexperimente [49, 50] und kürzlich durch Fingerprints nach RNaseT<sub>1</sub>-Spaltung [51] aufgezeigt wurden, haben somit eine direkte Korrelation zu den differierenden Aminosäurezusammensetzungen der Kapsidpolypeptide dieser beiden Poliotypen, wenn man auch berücksichtigen muß, daß nur etwa 40% der gesamten RNA für diese Polypeptide kodieren.

Der Vergleich der Spalten 2, 4 und 5 aus Tab. I zeigt, daß sich die beiden Kapsidpräparate in der Aminosäurezusammensetzung auch bei unterschiedlicher Reinigungsprozedur (das Präparat Nr. 2 wurde nach zwei CsCl-Zentrifugationen zusätzlich noch über eine Glyceringradienten-Zentrifugation gereinigt) weder untereinander noch vom intakten Viruspartikel gleichen Typs unterscheiden. Auch die nicht ganz einheitliche Zusammensetzung [52] der Kapsidpräparate aus 90S und 77S Partikeln macht sich in der Aminosäureanalyse nicht bemerkbar. Beide Kapsidpräparate zeigen identische UV-Spektren mit gleichem Verhältnis von  $E_{280}/E_{260}$  und gleichen Extinktionskoeffizienten. Da zwischen Virus und den natürlichen leeren Kapsiden keine Unter-

schiede in der Aminosäurezusammensetzung gefunden werden, kann man den Schluß ziehen, daß bei der Spaltung von VP0 in VP2 und VP4 [53] kein oder nur ein sehr kleines Stück der Peptidkette verloren geht.

Aus der experimentell bestimmten Aminosäurezusammensetzung des Poliovirus Typ 1 wurde nach dem graphischen Verfahren von Mikeš [54, 22] die wahrscheinlichste molare (ganzzahlige) Aminosäurezusammensetzung und damit das Molekulargewicht für ein Protomer (Summe von VP1–4) ermittelt.

In Tab. I sind in Spalte 6 die mittels der graphischen Darstellung erhaltenen Werte für das ganzzahlige molare Verhältnis der Aminosäuren in einem Protomer angegeben. Aus dieser allein auf der Aminosäureanalyse basierenden Methode errechnet sich, daß ein Protomer aus 840 Aminosäuren (Mengovirus 845, ME-Virus 899 Aminosäureeinheiten [54]) mit einem Molekulargewicht von insgesamt 92 700 Dalton besteht (die Fehlerbreite liegt bei etwa  $\pm 1\%$ , d. h.  $\pm 8$  Aminosäureeinheiten oder  $MG \pm 900$  Dalton). Dieser Wert für das Molekulargewicht eines Protomers ist wesentlich genauer als die in der Literatur angegebenen Werte [9, 55–58]. Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmten Molekulargewichte schwanken zwischen 88 000 [56] und 110 000 Dalton [55], ihre Fehlerbreite ist  $\pm 10\%$ . Aus dem chemisch bestimmten Molekulargewicht der RNA von  $2,41 \pm 0,01 \times 10^6$  [59] und dem aus 60 Untereinheiten zu je 92 700 Dalton bestehenden Kapsid berechnet sich für das Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney, ein Molekulargewicht von  $7,97 \times 10^6$  Dalton.

Aus der vollständigen Aminosäureanalyse lassen sich Aussagen über die Hydrophobizität bzw. über die Hydrophilität der Proteine gewinnen. Diese Parameter beeinflussen wesentlich die Tertiär- und Quartär-Struktur und die Löslichkeitseigenschaften der Proteine. Die verschiedenen in der Literatur angegebenen Verfahren zur Berechnung der Hydrophobizität von Proteinen [17, 18, 60–65] führen zu Ergebnissen, die qualitativ die Hydrophobizitäten richtig wiedergeben, aber quantitativ nicht immer miteinander korrelierbar sind, was darauf zurückzuführen ist, daß über das Maß der Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren und über ihre Zuordnung zu der Gruppe der polaren oder unpolaren Aminosäuren in einigen Fällen Uneinigkeit herrscht. Die vollständigste und beste Skala der Hydrophobizitäten der Aminosäuren stammt von Bull *et al.*

[18]. Als Hydrophobizitätsmaß wird die Änderung der Freien Energie beim Transfer ( $\Delta F_{\text{trans}}$ ) einer Aminosäure aus der Wasserphase an die Oberfläche einer unpolaren Phase benutzt.

Nach der Gleichung

$$\frac{\sum N_{i_{\text{unpol.}}} \cdot \Delta F_{\text{trans. } i}}{\sum N_{i_{\text{pol.}}} \cdot \Delta F_{\text{trans. } i}} = \text{rel. Hydrophobizität}$$

haben wir die relative Hydrophobizität einiger Proteine aus Daten ihrer Aminosäurezusammensetzung berechnet. ( $N_i$  = Anzahl der  $i$ -ten unpolaren bzw. polaren Aminosäure im Protein,  $\Delta F_{\text{trans. } i}$  = Hydrophobizität der  $i$ -ten Aminosäure).

Wie aus Tab. II hervorgeht, findet man nur wenige Proteine, die die hohe relative Hydrophobizität der Kapsidpolypeptide der Picornaviren aufweisen. Dabei muß man noch berücksichtigen, daß diese Werte nur eine mittlere Hydrophobizität des gesamten Proteins wiedergeben. Es wird sicher Bereiche im Protein geben, die eine noch wesentlich höhere Hydrophobizität haben. Damit wird deutlich, daß die Kapsidpolypeptide dazu neigen, sich an Oberflächen geringerer Polarität als Wasser anzulagern und im wäßrigem Milieu zu aggregieren.

Unser besonderes Interesse galt dem Gehalt an Cystein/Cystin in den Polioviruspolypeptiden. Die Cysteinylreste, die natürlich im Virus bzw. im Kapsid vorliegen und die, die durch Reduktion entstanden sind, wurden als S- $\beta$ -(4-Pyridylethyl)cystein (PEC) bestimmt. Aus der Differenz der Mengen an PEC vor und nach Reduktion ergibt sich die Anzahl der Disulfidbrücken. Wir konnten in keinem Fall signifikante Unterschiede im PEC-Gehalt vor und nach reduktiver Behandlung des dissoziierten Poliovirus feststellen. Danach liegen in den Polypeptiden keine Disulfidbrücken vor. Dieser Befund gilt für beide untersuchten Virustypen, wobei im Poliovirus Typ 3 aber ein deutlich höherer Cysteingehalt gefunden wird. Aus den Analysedaten und dem experimentellen oder berechneten Molekulargewicht folgt, daß in einem Protomer des Poliovirus Typ 1, 10–11 Cysteinreste und im Poliovirus Typ 3, 12–13 Cysteinreste enthalten sind (wenn das Molekulargewicht gleich ist).

In den beiden Kapsidpräparaten wurden dagegen unterschiedliche Mengen an Cystein gefunden. Im Präparat Nr. 1 konnten ohne Reduktionsschritt 4 Cysteinreste mit 4-Vinylpyridin nicht erfaßt werden, beim Präparat Nr. 2 waren es dagegen nur 2 (berechnet für ein Protomer). Diese nicht alkylierbaren

Tab. II. Relative Hydrophobizität nach Bull *et al.* [18] berechnet aus den Sequenzdaten [66] bzw. Aminosäureanalysen [67].

Protein	Relative Hydrophobizität	Literatur
RNase A	0,59	[66]
Cytochrom C (Pferd)	0,73	[66]
Rinderserumalbumin	0,91	[66]
Papain	1,04	[66]
Myoglobin (Pferd)	1,11	[66]
Tryptophansynthetase A	1,17	[66]
Insulin (Rind)	1,23	[66]
Bacteriophage Q $\beta$	0,91	[66]
Bacteriophage F2	1,05	[66]
Tabakmosaikvirus, Stamm vulgare	1,03	[66]
Mengo-Virus	1,13	[67]
ME-Virus	1,20	[67]
Poliovirus Typ 1, Stamm Mahoney	1,18	

Reste liegen wahrscheinlich in Disulfidbrücken gebunden vor, da unter reduzierenden Bedingungen bei beiden Kapsidpräparaten insgesamt 11 Cysteine/Protomer ermittelt werden (wie beim kompletten Virus).

Die Bestimmung der Sulfhydrylgruppen (nur diese werden erfaßt) mit DTNB (Ellmann-Reagenz) [43] bestätigt die mit der Vinylpyridinmethode erhaltenen Ergebnisse, die in Tab. III zusammengefaßt sind.

Wenn nicht unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet wird, werden mit DTNB nur solche SH-Gruppen erreicht, die an der Oberfläche des Proteins bzw. des intakten Virus oder des Kapsids liegen. Die kompletten Viruspartikel reagieren aber nicht mit DTNB, daher befinden sich auf der Oberfläche oder in unmittelbarer Nähe der Virusoberfläche keine Cysteingruppen. Wir haben die Möglichkeit einer Unterdrückung der Reaktion zwischen DTNB und den an der Oberfläche gelegenen SH-Gruppen aufgrund von elektrostatischer Abstoßung (beide negativ geladen) dadurch ausgeschlossen, daß wir ein neutrales Analogon des DTNB, das 5.5'-Dithiobis-(2-nitro-N-2'-hydroxyethylbenzamid) [24], synthetisiert und eingesetzt haben. Auch mit diesem Reagenz finden wir nach zweistündiger Reaktionszeit keine SH-Gruppen auf der Virusoberfläche. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Wetz *et al.* [10] überein, denen eine Markierung der Virusoberfläche mit radioaktiven SH-Reagentien nicht gelang. Im Gegensatz dazu reagieren bei den

Tab. III. Cysteingehalt berechnet für ein Protomer.

	Vinylpyridinmethode Cysteingehalt		DTNB-Methode Cysteingehalt	
	vor Reduktion	nach Reduktion	vor Dissoziation	nach Dissoziation
Poliovirus Typ 1	10–11	10–11	0	11 <sup>a</sup>
Poliovirus Typ 3	12–13	12–13	—	—
Kapsidpräparat Nr. 1	7	11	3–4	7
Kapsidpräparat Nr. 2	9	11	4–5	9

<sup>a</sup> In 4 verschiedenen Präparaten wurde der SH-Gehalt bestimmt.

Kapsiden etwa 3 Cysteinreste sofort und dann in einer langsamen Reaktion 1–2 weitere Gruppen. Bei der Dissoziation in 6 M Guanidin HCl oder in 1% SDS werden alle im Kapsid vorhandenen SH-Gruppen sofort freigesetzt (Heukeshoven und Dernick, in Vorbereitung).

Bei der Berechnung der Viruskonzentration für die Cysteinbestimmung mit DTNB haben wir zunächst den von Charney *et al.* [68] angegebenen Wert für den Extinktionskoeffizienten des Poliovirus von  $E_{260}^{1\%} = 81,6$  benutzt. Dabei fiel der für ein Protomer berechnete Cysteingehalt im Vergleich zur Aminosäureanalyse zu hoch aus (11,5–11,8 Cys/Protomer). Weiterhin haben wir mit der auf der vollständigen Aminosäureanalyse basierenden Proteinbestimmungsmethode den Proteinanteil in unseren Polioviruspräparaten bestimmt und gefunden, daß der so ermittelte experimentelle Wert um 7–8% niedriger liegt als der aus Extinktionskoeffizient und RNA-Gehalt (29–30%) [69, 70] berechnete Proteingehalt. Da die Aminosäureanalyse sehr zuverlässige Werte liefert, wie wir an Testproteinen erfahren haben, nehmen wir an, daß der Extinktionskoeffizient von 81,6 zu hoch liegt. Für andere Picornaviren werden ebenfalls niedrigere Werte angegeben (um 76) [67]. Unsere Annahme wird weiterhin durch eine Abschätzung des Extinktionskoeffizienten des kompletten Virus aus den Koeffizienten für RNA und Proteinanteil (bei 260 nm) gestützt. Wir haben den Wert für die mit Phenol extrahierte Poliovirus-RNA nach der Methode von Burness [71] zu  $E_{260}^{1\%} = 219 \pm 1$  bestimmt (bei pH 7,0). Dieser Wert stimmt mit dem anderer Picornaviren gut überein [71–73]. Danach wäre der von Bishop und Koch [74] angegebene Wert von  $E = 233$  zu hoch. Der Beitrag, den die RNA zum Extinktionskoeffizienten des Virus liefert, dürfte danach maximal

$220 \times 0,3 = 66$  Extinktionseinheiten betragen, da die RNA im Virus eher einen niedrigeren Koeffizienten als im freien Zustand aufweist. Aus dem Proteingehalt des Virus resultiert ein Beitrag zur Gesamtextinktion von etwa 8 Extinktionseinheiten, wenn der Koeffizient der Kapside (siehe unten) zugrunde gelegt wird. Insgesamt wird durch diese Abschätzung ein Extinktionskoeffizient von maximal  $E_{260}^{1\%} = 74$  für das Poliovirus erhalten. Mit diesem Wert sind die experimentellen Ergebnisse der Cystein- und Proteinbestimmung in Einklang zu bringen.

Für die Abschätzung des Extinktionskoeffizienten waren genaue Daten über den Proteinanteil des Virus erforderlich. Diese lassen sich an besten aus der Untersuchung der natürlichen leeren Kapside erhalten. Aus dem UV-Spektrum der durch zweimalige CsCl-Zentrifugation gereinigten Kapside erhielten wir für das Verhältnis der optischen Dichten bei 280 und 260 nm  $E_{280}/E_{260} = 1,42$ . Dieser Wert lag wesentlich höher als die in der Literatur angegebenen Werte von 1,00–1,20 [69, 52]. Weitere Reinigungsschritte (Glyceringradienten-Zentrifugation), die wir mit unseren Präparaten durchgeführt haben, brachten keine Änderung im UV-Spektrum und in der Aminosäureanalyse. Wir müssen daher davon ausgehen, daß unser Wert richtig ist, und daß in den früher zur Messung verwendeten Präparaten noch RNA oder Virus enthalten war, die bei 260 nm stärker als bei 280 nm absorbieren und somit das Verhältnis  $E_{280}/E_{260}$  herabsetzen. Aus den Aminosäureanalysen und den UV-Spektren der beiden untersuchten Kapsidpräparate, konnten wir den Extinktionskoeffizienten zu  $E_{280}^{1\%} = 16,2 \pm 0,2$  bestimmen. Der von Drees [52] angegebene Wert liegt bei 14,2.

Wir haben diesen experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten mit einem nach Wetlaufer [16] theoretisch berechenbaren Wert verglichen, der



von der genauen Bestimmung des Tryptophan abhängt, und gefunden, daß der von uns gefundene höhere Wert wahrscheinlicher ist.

Die Tryptophanbestimmung aus der Aminosäureanalyse, die leicht zu niedrig ausfällt, ergab 12 Trp/Protomer. Aus dem UV-Spektrum der in 0,1 N NaOH gelösten Kapside erhielten wir nach der von Beaven *et al.* [41] angegebenen Gleichung für das molare Verhältnis von Tyrosin (Y) und Tryptophan (W)  $Y/W = 2,7-2,8$ . Bei 36–37 Tyrosin/Protomer errechnen sich danach 13 Tryptophan/Protomer. Dieser Wert könnte auch etwas höher liegen, weil nach den Ausführungen von Beaven die Rechnung das Tyrosin begünstigt, während die Tryptophan-

werte zu niedrig ausfallen können. Aus der Tryptophanbestimmung nach Previero [42] resultieren etwa 14 Tryptophan/Protomer.

#### Danksagungen

Wir danken Frau M. Hilbrig für die Darstellung und Reinigung der Virus- und Kapsidpräparate. Die Arbeit wurde finanziell unterstützt vom Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn (BCT 90). Das Heinrich-Pette-Institut wird finanziell unterstützt von der Freien und Hansestadt Hamburg und dem Bundesministerium für Jugend, Familie und Gesundheit, Bonn.

- [1] R. Drzeniek u. P. Bilello, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **46**, 719 (1972).
- [2] R. Drzeniek u. P. Bilello, *Nature New Biol.* **240**, 118 (1972).
- [3] R. Drzeniek, *Z. Naturforsch.* **30 c**, 523 (1975).
- [4] Y. Degani u. A. Patchornik, *Biochemistry* **13**, 1 (1974).
- [5] L. Levintow u. J. E. Darnell, *J. Biol. Chem.* **235**, 70 (1960).
- [6] W. Munyon u. N. P. Salzman, *Virology* **18**, 95 (1962).
- [7] P. D. Cooper u. D. J. Bennett, *J. Gen. Virol.* **20**, 151 (1973).
- [8] K. Lonberg-Holm u. B. E. Butterworth, *Virology* **71**, 207 (1976).
- [9] M. Wouters u. J. Vandekerckhove, *J. Gen. Virol.* **33**, 529 (1976).
- [10] K. Wetz u. K. O. Habermehl, *J. Gen. Virol.* **44**, 525 (1979).
- [11] R. R. Rueckert, A. K. Dunker u. C. M. Stoltzfus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **62**, 912 (1969).
- [12] C. M. Stoltzfus u. R. R. Rueckert, *J. Virol.* **10**, 347 (1972).
- [13] B. R. Ziola u. D. G. Scraba, *Virology* **64**, 228 (1975).
- [14] R. R. Rueckert, *Virology* **26**, 345 (1965).
- [15] D. G. Scraba, P. Hostvedt u. J. S. Colter, *Can. J. Biochem.* **47**, 165 (1969).
- [16] D. B. Wetlaufer, *Adv. Protein Chem.* **Vol. 17**, 303 (1962), (C. B. Anfinsen, M. L. Aunon, K. Baileg, J. T. Edsoll eds., Academic Press).
- [17] Y. Nozaki u. C. Tanford, *J. Biol. Chem.* **246**, 2211 (1971).
- [18] H. B. Bull u. K. Breese, *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 665 (1974).
- [19] Y. Skechter, A. Patchornik u. Y. Burstein, *Biochemistry* **15**, 5071 (1976).
- [20] W. E. Savage u. A. Fontana, *Methods in Enzymology* (C. W. A. Hirs, S. N. Timasheff, eds.) **Vol. 47**, 459 (1977), Academic Press.
- [21] E. Wachter u. R. Werhahn, *Anal. Biochem.* **97**, 56 (1979).
- [22] O. Mikeš, *Int. J. Peptide Protein Res.* **11**, 282 (1978).
- [23] J. F. Cavins u. M. Friedman, *Anal. Biochem.* **35**, 489 (1970).
- [24] G. Legler, *Biochem. Biophys. Acta* **405**, 136 (1975).
- [25] R. Drzeniek u. P. Bilello, *J. Gen. Virol.* **25**, 125 (1974).
- [26] U. Yamaguchi-Koll, K. J. Wiegers u. R. Drzeniek, *J. Gen. Virol.* **26**, 307 (1975).
- [27] J. M. Bishop and G. Koch, *Fundamental Techniques in Virology*, pp. 131 (K. Habel and N. P. Salzman, eds.), New York and London, Academic Press, 1969.
- [28] A. S. Inglis, D. T. W. McMahon, C. W. Roxburgh u. H. Takayanagi, *Anal. Biochem.* **72**, 86 (1976).
- [29] M. Friedman, L. H. Krull u. J. F. Cavins, *J. Biol. Chem.* **245**, 3868 (1970).
- [30] D. H. Spackman, W. H. Stein u. S. Moore, *Anal. Chem.* **30**, 1190 (1958).
- [31] M. Friedman u. J. F. Cavins, *Biochemistry* **6**, 3766 (1967).
- [32] M. Friedman u. A. T. Noma, *Textile Res. J.* **40**, 1073 (1970).
- [33] J. Heukeshoven, *Anal. Biochem.* **108** (1980).
- [34] T.-Y. Liu u. Y. H. Chang, *J. Biol. Chem.* **246**, 2842 (1971).
- [35] S. Moore, *Chemistry and Biology of Peptides* (L. J. Meienhofer, ed.) 629 (1972), Ann. Harbor Science Publishers, Michigan.
- [36] R. J. Simpson, M. R. Neuberger u. T.-Y. Liu, *J. Biol. Chem.* **251**, 1936 (1976).
- [37] H. Matsubara u. E. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **241**, 2732 (1963).
- [38] C. W. Gehrke u. H. Takeda, *J. Chromatogr.* **76**, 63 (1973).
- [39] P. B. Hamilton u. R. A. Anderson, *Anal. Chem.* **31**, 1504 (1959).
- [40] H. Stegemann, Hoppe Seylers *Z. Physiol. Chem.* **319**, 87 (1960).
- [41] G. H. Beaven u. E. R. Holyday, *Adv. Protein Chem.* **7**, 319 (1952).
- [42] A. Previero, M. A. Coletti-Previero u. J.-C. Cavadore, *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 453 (1967).
- [43] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70 (1959).
- [44] R. C. Benedit u. R. L. Stedman, *Analyst* **95**, 296 (1970).
- [45] P. D. J. Weitzman, *Biochem. J.* **149**, 281 (1975).
- [46] R. E. Canfield, *J. Biol. Chem.* **240**, 1997 (1965).
- [47] G. R. Tristram, *The Proteins* (H. Neurath u. K. Bailey, eds.) **Vol. 1A**, p. 181, Academic Press, N. Y. 1953.
- [48] A. Hamann, C. Reichel, K. J. Wiegers u. R. Drzeniek, *J. Gen. Virol.* **38**, 567 (1978).
- [49] N. A. Young, *Virology* **56**, 400 (1973).

- [50] H.-D. Klenk u. R. Rott, *J. Virol.* **11**, 823 (1973).
- [51] Y. F. Lee, W. Kitamura, A. Nomoto u. E. Wimmer, *J. Gen. Virol.* **44**, 311 (1979).
- [52] O. Drees, *Arch. ges. Virusforsch.* **19**, 253 (1966).
- [53] B. Korant, *J. Virol.* **10**, 751 (1972).
- [54] R. R. Rueckert, *Comprehensive Virology* **6**, (H. Fraenkel-Conrat, R. R. Wagner, eds.) 131 (1976).
- [55] G. Abraham u. P. D. Cooper, *J. Gen. Virol.* **29**, 199 (1975).
- [56] G. Abraham u. P. D. Cooper, *Anal. Biochem.* **73**, 439 (1976).
- [57] J. V. Maizel u. D. F. Summers, *Virology* **36**, 48 (1968).
- [58] M. F. Jacobson, J. Asso u. D. Baltimore, *J. Mol. Biol.* **49**, 657 (1970).
- [59] E. Wimmer, persönliche Mitteilung.
- [60] D. F. Waugh, *Adv. Protein Chem.* **9**, 326 (1954).
- [61] H. F. Fisher, *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **51**, 1285 (1964).
- [62] C. Tanford, *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 4240 (1962).
- [63] C. C. Bigelow, *J. Theoret. Biol.* **16**, 187 (1967).
- [64] C. Chothia, *Nature* **248**, 338 (1974).
- [65] R. F. Rekker, *The Hydrophobic Fragmental Constant*, *Pharmacochimistry Library Vol. 1*, eds. W. Th. Nauta u. R. F. Rekker, Elsevier Scient. Publ. Co., Amsterdam, 1977.
- [66] L. R. Croft, *Handbook of Protein Sequences* (1973), Joynson-Bruvvers Ltd., Oxford.
- [67] R. R. Rueckert, *Comparative Virology* (K. Maramorosch, E. Kurstak, eds.) pp. 255, Academic Press, New York 1971.
- [68] J. Charney, R. G. Machlowitz, A. A. Tytell, J. F. Sagin u. D. S. Spicer, *Virology* **15**, 269 (1961).
- [69] F. L. Schaffer u. C. E. Schwerdt, *Adv. Virus Res.* **6**, 159 (1959).
- [70] F. L. Schaffer u. L. H. Frommhagen, *Virology* **25**, 662 (1965).
- [71] A. T. H. Burness, *J. Gen. Virol.* **6**, 373 (1970).
- [72] R. R. Rueckert u. W. Schäfer, *Virology* **26**, 333 (1965).
- [73] H. L. Bachrach, R. Trautmann u. S. S. Breese, *Amer. J. Vet. Res.* **25**, 333 (1964).
- [74] M. Bishop u. G. Koch, *Virology* **37**, 521 (1969).