

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

82. JAHRGANG 1970

HEFT 8

SEITE 299–330

Zur automatischen Analyse von Aminosäuresequenzen in Proteinen und Peptiden^[1]

Von Manfred von Wilm^[*]

Die Entwicklung der manuellen Sequenzanalyse von Proteinen und Peptiden nach Edman zur heute bereits vielfach praktizierten automatischen Methode gelang durch Modifizierung der Arbeitsweise und durch Anwendung eines physikalisch neuartigen Prinzips. Sämtliche Reaktions-, Zentrifugations-, Extraktions- und Trocknungsvorgänge werden in einem rotierenden Gefäß durchgeführt. Bei minimalem Zeit- und Substanzbedarf ließen sich z. B. aus einer einzigen Myoglobin-Probe 60 Aminosäuren nacheinander abspalten.

1. Einleitung

1950 publizierte der schwedische Mediziner und Biochemiker *Edman* seine erste Arbeit über die heute allgemein als Edman-Abbau bekannte Methode der Sequenzanalyse^[2, 3]. Man versteht darunter die Aufklärung der Primärstruktur eines Proteins oder Peptids durch sukzessiven, kontrollierten, chemischen Abbau der Peptidkette vom Aminoende her und anschließende Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren.

1967 beschrieben *Edman* und *Begg*^[4, 5] einen Protein-Sequenator, d. h. ein Gerät, das eine weitgehend automatische Analyse der Aminosäuresequenzen in Proteinen und Peptiden gestattet. Dieses automatische Verfahren wurde zunächst am Myoglobin des Buckelwals (humpback whale), des sauerstoffübertragenden Proteins des Skelettmuskels, erprobt, dessen Molekulargewicht 17200 beträgt. Hierbei konnte die Sequenz der ersten 60 N-terminalen Aminosäuren dieses Proteins in einem Arbeitsgang ermittelt werden. Ein Vergleich mit der bekannten Aminosäuresequenz des Myoglobins des Pottwals (sperm whale)^[6] ergab eine

gute Übereinstimmung bis auf 6 Positionen, bei welchen andere Aminosäuren erscheinen.

In 24 Stunden konnten mit dem Sequenator automatisch 15 Abbauschritte durchgeführt werden. Der Substanzbedarf lag bei 5.0 mg; das entspricht etwa 0.30 µmol Protein. Nach der manuellen Methode waren maximal etwa 15 Abbauschritte möglich, wobei jeder Schritt etwa zwei Tage dauerte. *Edman* erreichte die beschriebene Perfektionierung und Automatisierung der Methode 1. durch Anwendung eines neuen Prinzips bei der Umsetzung der Aminoendgruppe des Proteins mit dem abbauenden Reagens und 2. durch eine aufgrund reaktionskinetischer Untersuchungen möglich gewordene Optimierung der Reaktionsbedingungen.

Vor kurzem gelang *Edman* der automatische Abbau einer Sequenz von 22 Aminosäuren eines Antikörpers^[7].

2. Der manuelle Edman-Abbau

Die dem manuellen Abbau zugrundeliegende Reaktion umfaßt die Kupplung des Peptids mit Phenylisothiocyanat zum Phenylthiocarbamoyl-(PTC-)Derivat (1), dessen cyclisierende Spaltung zum 2-Anilino-5-thiazolinon-Derivat (2) und die Umlagerung von (2) zum 3-Phenyl-2-thioxo-imidazolidin-4-on-(3-Phenyl-2-thiohydantoin-, PTH-)Derivat (3).

Die Umsetzung des Phenylisothiocyanats mit der α -Aminendgruppe des Peptids geschieht gemäß Gl. (a) in Pyridin-Wasser, wobei der pH-Wert durch verdünnte Natronlauge

[*] Dr. M. v. Wilm
Spinco-Abteilung der Fa. Beckman Instruments GmbH
8 München 45, Frankfurter Ring 115

[1] M. v. Wilm, Vortrag auf dem Seminar für instrumentelle Analytik in Würzburg (21. Januar 1969).

[2] P. Edman, Acta chem. scand. 4, 283 (1950).

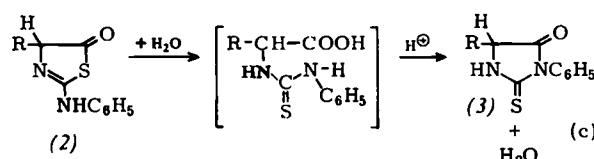
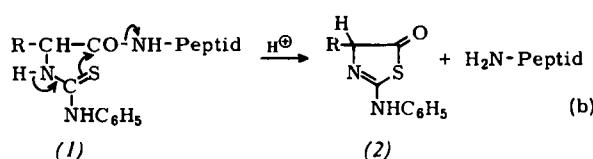
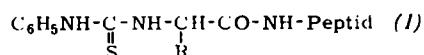
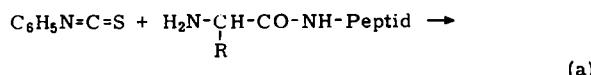
[3] P. Edman, Acta chem. scand. 10, 761 (1956).

[4] P. Edman u. G. Begg, European J. Biochem. 1, 80 (1967).

[5] P. Edman in F. Koller u. E. Beck: Fibrinogen and Fibrin Turnover of Clotting Factors. Schattauer-Verlag, Stuttgart 1963.

[6] A. B. Edmundson, Nature (London) 205, 883 (1965).

[7] P. Edman u. A. G. Cooper, FEBS Letters 2, 33 (1968).



auf 8.5 bis 9.0 gebracht wird. Anschließend werden Pyridin sowie überschüssiges Isothiocyanat mit Benzol extrahiert. Nach Lyophilisierung der das Phenylthiocarbamoyl-Derivat (1) des Peptids enthaltenden wäßrigen Phase erfolgen Spaltung und Umlagerung in einem Zug. Die Abspaltung des Restpeptids sowie die Umlagerung des instabilen (2) in (3) entsprechen einer cyclisierenden Umamidierung.

Die Reaktionen (b) und (c) werden in Eisessig-HCl bei 40 °C oder aber zur Vermeidung hydrolytischer Spaltungen der Peptidkette vorzugsweise in wasserfreiem Medium, z.B. in Nitromethan-HCl [2, 3], bei ca. 25 °C durchgeführt. Seit einiger Zeit hat sich wasserfreie Trifluoressigsäure als spaltendes Agens durchgesetzt [8, 9]. Die abgespaltene, gelöste PTH-Aminosäure (3) wird vom ausgefallenen Restpeptid abzentrifugiert und nach Abdestillieren des Lösungsmittels dünnenschichtchromatographisch identifiziert. Das um eine Aminosäure verkürzte Peptid kann schließlich erneut mit

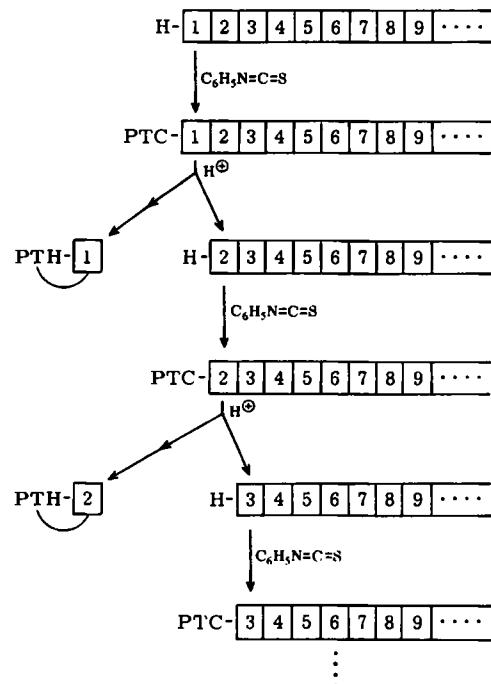


Abb. 1. Schematische Darstellung des Edman-Abbaus.

[8] D. T. Elmore u. P. A. Toseland, J. chem. Soc. (London) 1956, 188.

[9] P. Edman, Proc. Roy. Austral. chem. Inst. 1957, 434.

Phenylisothiocyanat umgesetzt werden (s. Abb. 1). (Verbesserungen dieser Methode siehe [10, 11].)

Die beschriebene Arbeitsweise in flüssiger Phase eignet sich nur für Proteine, deren PTC-Derivate in dem zur Spaltung erforderlichen sauren Medium löslich sind. Leider ist dies bei den meisten Proteinen nicht der Fall. Nach Fraenkel-Conrat [12] lassen sich aber auch derartige Proteine durch Arbeiten auf Papierstreifen abbauen. Nach dieser Methode konnten an 1–2 mg Insulin 14 Abbauschritte durchgeführt werden. Die Nachweisempfindlichkeit liegt bei etwa 0.01 μmol pro PTH-Aminosäure.

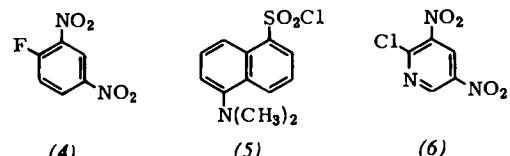
3. Methoden zur Aufklärung der Primärstruktur von Proteinen und Peptiden

3.1. Methoden zur Endgruppenbestimmung

Bei den ersten Versuchen zur Aufklärung der Struktur von Peptiden ging es vor allem darum, die α-Amino- oder die α-Carboxylgruppe einer am Ende des Peptidverbandes vorliegenden Aminosäure mit einem Reagens so zu kennzeichnen, daß sie nach der Totalhydrolyse des Peptids qualitativ (und möglichst auch quantitativ) nachgewiesen werden kann.

Voraussetzung ist, daß das Protein oder Peptid unter möglichst schonenden Bedingungen umgesetzt wird, damit hydrolytische Spaltungen der Peptidkette, die zur Bildung neuer Endgruppen führen würden, vermieden werden. Darüberhinaus muß die Bindung zwischen Reagens und Aminoendgruppe gegen energetische Hydrolyse resistent sein.

Tabelle 1. Methoden zur Endgruppenbestimmung.



Reagens, Methode	Nachweis	Lit.
N-terminal:		
(4), DNP-Methode	Papier-, Dünnschicht-, Säulen-chromatographie	[13]
(5), Dansyl-Methode	Dünnschichtchromatographie (Fluoreszenz im UV)	[14]
(6)	Dünnschichtchromatographie	[15]
C-terminal:		
$\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$	Aminosäureanalyse	[16]

[10] P. Edman, Ann. New York Acad. Sci. 88, 602 (1960).

[11] B. Blombäck, M. Blombäck, P. Edman u. B. Hessel, Biochim. biophysica Acta 115, 371 (1966).

[12] H. Fraenkel-Conrat, J. Amer. chem. Soc. 76, 3606 (1954).

[13] F. Sanger, Biochem. J. 39, 507 (1945).

[14] G. Weber, Biochem. J. 51, 155 (1952).

[15] A. Signor, A. Previero u. M. Terbojevich, Nature (London) 205, 596 (1965).

[16] S. Akabori, K. Ohno u. K. Narita, Bull. chem. Soc. Japan 25, 214 (1952).

Für diese Endgruppenbestimmung, die nach wie vor bei der Aufklärung der Primärstruktur – vor allem zur Bestimmung der Kettenlänge und der Anzahl der Ketten unterschiedlicher Sequenz – eine wichtige Rolle spielt, wurden zahlreiche Reagentien vorgeschlagen. Eine Auswahl der wichtigsten Methoden ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Außerordentliche Bedeutung hat die von *Sanger*^[13] mit großem Erfolg bei der Aufklärung der Insulinstruktur angewendete Dinitrophenylierung (DNP-Methode) erlangt, die mit der Papier- und später der Dünnschichtchromatographie kombiniert zu einer perfekten Methode ausgebaut werden konnte.

Als modernstes Verfahren ist die 1952 von *Weber*^[14] eingeführte und später von *Gray* und *Hartley*^[17, 18] modifizierte Dansyl-Methode zu nennen, nach welcher noch 0.5 nmol an Aminoendgruppen qualitativ nachweisbar sind. Damit ist dieses Verfahren etwa um den Faktor 100 empfindlicher als die DNP-Methode. Seit der Einführung spezieller Polyamidplatten zur raschen Dünnschichtchromatographie^[19] dieser Verbindungen findet die Methode immer größere Verbreitung.

Zum Nachweis der C-terminalen Aminosäuren hat sich die Methode von *Akabori*^[16] bewährt, bei der nach Hydrazinolyse aller Peptidbindungen ausschließlich die C-terminale Aminosäure nicht als Hydrazid vorliegt. Durch Umsetzung mit Benzaldehyd werden die Hydrazide als Schiffsche Basen ausgefällt, während die in Lösung verbleibende C-terminale Aminosäure chromatographisch identifiziert wird.

3.2. Methoden zur Sequenzanalyse

Auf die Dauer konnte man sich mit der Möglichkeit, nur die N- oder C-terminale Aminosäure bestimmen zu können, nicht begnügen. Man begann daher nach Reaktionen zu suchen, die eine mehrfache Wiederholung des Abbauvorganges gestatten. Um hierfür geeignet zu sein, muß ein Reagens folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Die Kupplungsreaktion muß unter möglichst milde Bedingungen vor sich gehen, da bei hydrolytischen Spaltungen der Peptidkette auch mittelständige Aminosäuren reagieren würden.
2. Das zur Substitution der terminalen Aminosäure verwendete Reagens muß die erste Peptidbindung innerhalb der Kette schwächen, so daß eine Abspaltung des Restpeptids unter schonenden Bedingungen gelingt.
3. Das Derivat der Aminosäure muß leicht chromatographisch identifizierbar sein.
4. Die Nachweisempfindlichkeit für dieses Derivat sollte möglichst groß sein.

[17] *W. R. Gray*, Methods in Enzymol. *II*, 139 (1967).

[18] *W. R. Gray* u. *B. S. Hartley*, Biochem. J. *89*, 59 (1963).

[19] *K. R. Woods* u. *K. T. Wang*, Biochim. biophysica Acta *133*, 369 (1967).

Als erste Verbindung dieser Art, die jedoch die Anforderungen noch nicht befriedigend erfüllte, schlug *Bergmann*^[20] das Phenylisocyanat vor. Der Abbau mit diesem Reagens, den *Brockmann* und *Abderhalden*^[21] durch Erarbeitung wesentlich schonenderer Reaktionsbedingungen für die cyclisierende Spaltung beträchtlich verbesserten und zum ersten Male an einem Tripeptid erprobten, gilt als Vorläufer der Edman-Reaktion. Anstelle des Phenylisocyanats verwendete *Edman* das rascher reagierende Phenylisothiocyanat. Er konnte zeigen, daß die cyclisierende Spaltung dabei unter noch beträchtlich schonenderen Bedingungen möglich war.

Tabelle 2. Methoden zur Sequenzanalyse.

Reagens	Nachweis	Lit.
<i>N</i> -terminal:		
$C_6H_5N=C=O$	Fp	[20, 21]
$C_6H_5N=C=S$	Papier-, Dünnschicht-, Säulenchromatographie; Aminosäureanalyse nach Rückspaltung; Subtraktionsmethode	[2, 3]
$S=C=S$	Papierchromatographie	[22]
$N=C=O^\ominus$	Aminosäureanalyse nach Rückspaltung	[23]
Leucin-Aminopeptidase	Aminosäureanalyse	[24]
<i>C</i> -terminal:		
$N=C=S^\ominus + (CH_3CO)_2O$	Subtraktionsmethode	[25, 26]
Carboxypeptidase A und B	Aminosäureanalyse	[27]

In Tabelle 2 sind die wichtigsten der zur Sequenzanalyse vorgeschlagenen Verbindungen zusammengefaßt. Neben dem Edman-Abbau konnten sich die übrigen Methoden jedoch nicht allgemein durchsetzen.

Die einzige zum stufenweisen Abbau vom C-Terminus her geeignete, 1926 von *Schlack* und *Kumpf*^[25] eingeführte Methode wurde neuerdings von *Stark*^[26] beträchtlich verbessert.

In vielen Fällen wird von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, durch Einwirkung von Peptidasen Aufschlüsse über die N- oder C-terminalen Sequenzen von Peptiden zu erhalten. Hierbei werden vor allem Leucin-Aminopeptidase^[24] sowie Carboxypeptidase A und B^[27] verwendet.

[20] *M. Bergmann*, *E. Kann* u. *A. Miekeley*, Liebigs Ann. Chem. *458*, 56 (1927).

[21] *E. Abderhalden* u. *H. Brockmann*, Biochem. Z. *225*, 386 (1930).

[22] *A. L. Levy*, J. chem. Soc. (London) *1950*, 404.

[23] *G. R. Stark* u. *D. G. Smyth*, J. biol. Chemistry *238*, 214 (1963).

[24] *R. E. Canfield*, J. biol. Chemistry *238*, 2699 (1963).

[25] *P. Schlack* u. *W. Kumpf*, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. *154*, 125 (1926).

[26] *G. R. Stark*, Biochemistry *7*, 17969 (1968).

[27] *G. Guidotti*, *R. J. Hill* u. *W. Konigsberg*, J. biol. Chemistry *237*, 2184 (1962).

4. Abbau der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine

4.1. Veränderung der funktionellen Gruppen und Spaltung in Einzelketten

Bei der Aufklärung der Primärstruktur von Proteinen ist die Sequenzanalyse der letzte Schritt, dem neben der Isolierung und Reinigung des Proteins viele – zum Teil sehr komplizierte und langwierige – kontrollierte Abbauvorgänge vorausgehen müssen. Durch systematischen Abbau der Tertiär- und Sekundärstruktur werden die Peptidketten nach Spaltung in überschaubare Fragmente für die Sequenzanalyse vorbereitet. Unter „Ketten“ sollen hier Molekülteile verstanden werden, die nicht durch Wasserstoff- und/oder Disulfidbrücken verbunden sind. Durch die in Sche-

ma 1 gezeigten Etappen des Abbaus müssen vor allem vier Fragen beantwortet werden:

1. Aus wieviel Ketten besteht ein Molekül?
2. Wie groß ist das Molekulargewicht jeder Kette?
3. Aus welchen Aminosäuren und in welchen Anteilen sind die Ketten zusammengesetzt?
4. Welche Sequenz haben die Aminosäuren in den einzelnen Ketten?

Die für den Erfolg der Sequenzanalyse entscheidenden Schritte sind:

1. Die Veränderung der funktionellen Gruppen in den Aminosäure-Seitenketten des Proteinmoleküls.
2. Die Spaltung in Einzelketten durch Sprengen der Wasserstoffbrücken (Denaturierung) sowie durch Öffnen der Disulfidbrücken.
3. Die anschließende enzymatische oder chemische Spaltung in Peptiduntereinheiten.

Harnstoff oder Wärme spaltet die nicht kovalenten inter- und intramolekularen Bindungen, vor allem die in den Helixbereichen vorliegenden Wasserstoffbrücken.

Mehrere Reaktionen dienen der Öffnung inter- sowie intramolekularer Disulfidbrücken zur Spaltung des Proteinmoleküls in Einzelketten:

Durch Reduktion der Disulfidbrücken mit Thioglykolat^[28] oder Mercaptoäthanol^[29] entstehen Thiolgruppen, die sich mit Jodacetamid^[30-32] carboxymethylieren lassen. Eine gleichzeitige Alkylierung der ϵ -Aminogruppen des Lysins läßt sich hierbei durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen umgehen.

Eine zweite Möglichkeit besteht in der Oxidation der Disulfidbrücken durch Perameisensäure^[33], wobei Cystin in Cysteinsäure und Methionin in sein Sulfon übergeführt wird. Hierbei muß allerdings eine quantitative Zerstörung von eventuell in der Kette enthaltinem Tryptophan in Kauf genommen werden.

Die Einführung zusätzlicher Carboxylgruppen in hydrophobe, vor allem Cystin enthaltende Bereiche der Peptidketten durch Carboxymethylierung oder auch durch Succinylierung der ϵ -Aminogruppen des Lysins bewirkt, daß die nach anschließender Enzymspaltung entstehenden Peptide in wässrigen Medien leichter löslich sind.

4.2. Selektive enzymatische und chemische Spaltung

Zum enzymatischen Abbau werden vor allem die Enzyme Trypsin und Pepsin, in einigen Fällen auch Chymotrypsin und Papain angewendet, wobei man

[28] E. Katchalski, G. S. Benjamin u. V. Gross, J. Amer. chem. Soc. 79, 4069 (1957).

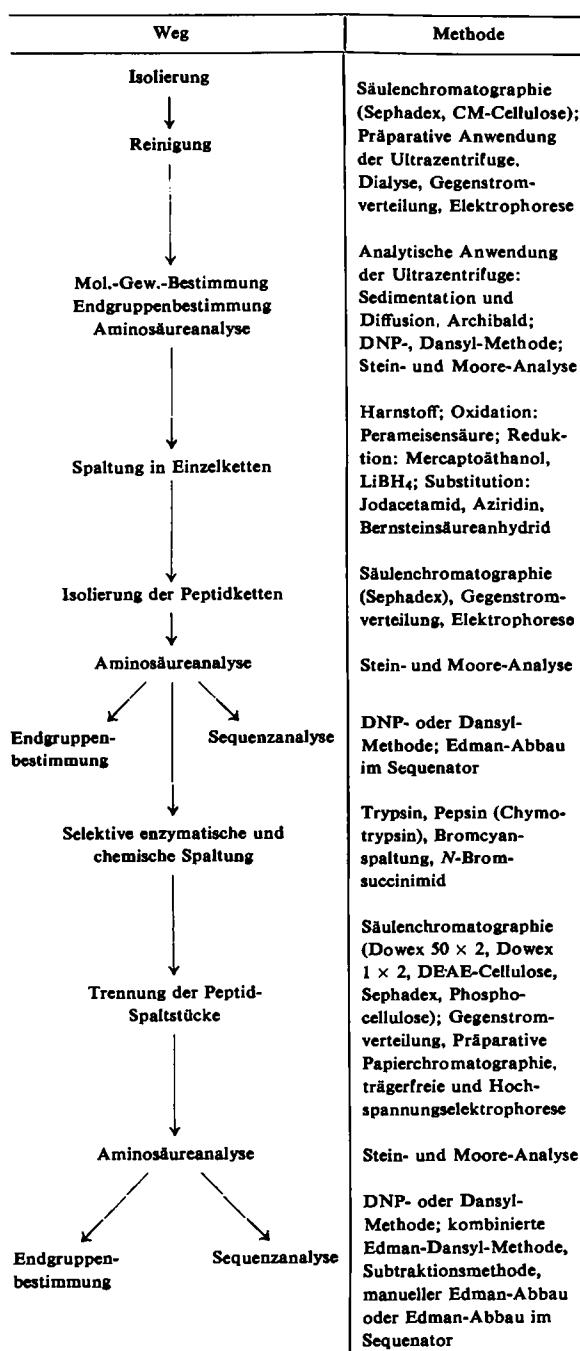
[29] E. O. P. Thompson u. I. J. O'Donnell, Biochim. biophysica Acta 53, 447 (1961).

[30] H. G. Gundlach, S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry 234, 1754a (1959).

[31] H. G. Gundlach, S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry 234, 1754b (1959).

[32] S. Moore, R. D. Cole, H. G. Gundlach u. W. H. Stein, Protein-Symposium, IV. Int. Congr. Biochem., Wien 1958.

[33] G. Toennies u. R. P. Homiller, J. Amer. chem. Soc. 64, 3054 (1942).



Schema 1. Schematische Darstellung des systematischen, kontrollierten Abbaus zur Aufklärung der Primärstruktur von Proteinen.

meist zuerst mit dem sehr spezifischen Trypsin vorspaltet und anschließend mit Pepsin oder anderen Proteasen nachspaltet. An den chromatographisch getrennten und isolierten Peptiden werden die Endgruppen bestimmt, und aus den so ermittelten, überlappenden Sequenzen kann meist bereits die Struktur des Peptids angegeben werden.

Die enzymatische Spaltung wird sehr stark von Veränderungen an den funktionellen Gruppen des Moleküls beeinflußt. So ermöglicht z. B. die Aminoäthylierung^[34] der aus den vernetzenden Disulfidbindungen nach Reduktion entstehenden Thiolgruppen – wobei Cystein in *S*-Aminoäthylcystein übergeführt wird – die Spaltung der Peptidkette durch Trypsin an dieser Stelle; im übrigen spaltet Trypsin ausschließlich Peptidbindungen der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, und zwar carboxylseitig. In einigen Fällen lassen sich Schwierigkeiten bei der Strukturaufklärung, die sich durch das Auftreten trypsinresistenter „Core“-Bereiche ergeben, auf diese Weise umgehen.

Auch chemisch kann die Peptidkette selektiv zerlegt werden. So spaltet z. B. Bromcyan^[35] die Kette nach Methionin, während *N*-Bromsuccinimid^[36] nach Tryptophan spaltet. Ein wesentlicher Nachteil bei chemischen Spaltungen liegt jedoch darin, daß sich hierbei keine Überlappungen ergeben, wodurch die Zuordnung der Spaltstücke erschwert wird.

5. Ergebnisse der Sequenzanalyse

Der erste große Erfolg für die Sequenzanalyse war die Aufklärung der Primärstruktur des Insulins. Die Sequenz der Polypeptidketten A und B dieses blutzuckersenkenden Pankreas hormons mit insgesamt 51 Aminosäuren ermittelte Sanger^[13] 1945 bis 1954 mit der DNP-Methode. Damals standen weder die automatische, säulenchromatographische Aminosäureanalyse noch eine ausgereifte Methode für den Edman-Abbau zur Verfügung.

1956 bis 1960 publizierten Hirs, Stein und Moore^[37] sowie Anfinsen^[38] die Aminosäuresequenz der Ribonuclease, einer Kette von 124 Aminosäuren. In diesem Fall trug die 1958 veröffentlichte Methode der automatischen Aminosäureanalyse^[39,40] sowie der inzwischen bekannt gewordene Edman-Abbau wesentlich zum Gelingen bei.

[34] M. A. Raftery u. R. D. Cole, Biochem. biophysic. Res. Commun. 10, 467 (1963).

[35] E. Gross u. B. Witkop, J. biol. Chemistry 237, 1856 (1962).

[36] A. Patchornik, W. B. Lawson u. B. Witkop, J. Amer. chem. Soc. 80, 4748 (1958).

[37] C. H. W. Hirs, S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry 235, 633 (1960).

[38] R. R. Redfield u. C. B. Anfinsen, J. biol. Chemistry 221, 385 (1956).

[39] S. Moore, D. H. Spackman u. W. H. Stein, Analytic. Chem. 30, 1185 (1958).

[40] S. Moore, D. H. Spackman u. W. H. Stein, Analytic. Chem. 30, 1190 (1958).

Nun erschienen in rascher Folge weitere bedeutende sequenzanalytische Arbeiten: 1960/1961 berichteten Tsugita^[41] sowie Schramm et al.^[42] über die Aufklärung des Proteins des Tabakmosaikvirus mit insgesamt 158 Aminosäuren; 1961 konnten Braunitzer et al.^[43] die Sequenz des Humanhämoglobins A, bestehend aus zwei α - und zwei β -Ketten mit insgesamt 574 Aminosäuren, aufklären.

Heute sind auch die Sequenzen des Lysozyms, Chymotrypsinogens, Trypsinogens, des Cytochroms c, der Katalase, des Myoglobins sowie des Corticotropins und vieler anderer Peptidhormone und Enzyme zum Teil oder vollständig bekannt. Ketten von 500 und mehr Aminosäureresten können heute nach der Edman-Methode ohne größere Schwierigkeiten aufgeklärt werden. Zur Zeit sind etwa 12000 Primärstrukturen publiziert.

6. Der Protein-Sequenator nach Edman und Begg

6.1. Der verbesserte Edman-Abbau

Durch spektroskopische Untersuchung des Reaktionsablaufs beim Abbau gelang es Edman^[3,4], optimale Bedingungen für die automatische Sequenzanalyse zu ermitteln. Er fand, daß die cyclisierende Spaltung [Gl. (b)] und damit die Bildung des instabilen und deshalb zum Nachweis ungeeigneten Thiazolinons (2) in Gegenwart wasserfreier Säuren unter milden Bedingungen sehr rasch, die Umlagerung (c) dagegen relativ langsam verläuft. Es lag daher nahe, beide Reaktionen – entgegen der Arbeitsweise beim manuellen Abbau – voneinander zu trennen. Dabei wird das Thiazolinon (2) extrahiert und später außerhalb des neu entwickelten Gerätes von Hand in das stabile Phenylthiohydantoin (3) umgewandelt. Durch die Abtrennung des Thiazolinons vom jeweils um eine Aminosäure verkürzten Protein und die separate Umlagerung wird das Restprotein der Einwirkung starker Säure in wäßrigem Medium entzogen, so daß man die Gefahr hydrolytischer Spaltungen der Peptidkette umgeht.

Schließlich fand Edman, daß die Phenylthiocarbamoylgruppierung durch Sauerstoff sehr leicht entschwefelt wird. Dadurch kommt der Abbau zum Stillstand. Beim Arbeiten unter Stickstoff konnte diese Nebenreaktion vermieden werden.

Ausschlaggebend dafür, wieviel aufeinanderfolgende Abbauschritte an einem Peptid oder Protein möglich sind, ist die maximal erreichbare Ausbeute jedes Schrittes. Geht man nach Edman davon aus, daß die Gesamtausbeute nach n Abbaucyclen auf 30% gefallen ist und ein weiterer Abbau wegen der zuneh-

[41] A. Tsugita, D. T. Gish, J. Young, H. Fraenkel-Conrat, C. A. Knight u. W. M. Stanley, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 1463 (1960).

[42] F. A. Anderer, H. Uhlig, E. Weber u. G. Schramm, Nature (London) 186, 922 (1960).

[43] G. Braunitzer, R. Gehring-Müller, N. Hilschmann, K. Hilse, G. Hobom, V. Rudloff u. B. Wittmann-Liebold, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 325, 283 (1961).

menden Unübersichtlichkeit der Ergebnisse nicht sinnvoll erscheint, so ergibt sich, daß bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 97, 98 oder 99% pro Abbauschritt insgesamt 40, 60 bzw. 120 Abbaucyclen möglich sind. Aufgrund der beschriebenen Verbesserungen der Reaktionsbedingungen sowie der Automatisierung des Prozesses mit dem „Sequenator“ erreichte *Edman* am Myoglobin eine durchschnittliche Ausbeute von 98% pro Abbaucyclus und damit insgesamt 60 Abbauschritte.

6.2. Ein neuartiges Prinzip zur Umsetzung des Proteins

Das von *Edman* erstmals verwendete physikalisch neuartige Prinzip zur Durchführung aller für einen vollständigen Abbaucyclus erforderlichen Reaktions-, Zentrifugations-, Extraktions- und Trocknungsvorgänge besteht in der Verwendung eines unter einer evakuierbaren Glasglocke rotierenden, zylindrischen Glasgefäßes (s. Abb. 2), auf dessen Innenwand sich das Protein nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum als hauchdünner Film niederschlägt.



Abb. 2. Rotierender Reaktionsbecher des Protein-Sequenators nach *Edman* und *Begg* bei abgenommener Glasglocke. Die Abbildung zeigt die Teflonschlauch-Zuführung für Reagentien und Lösungsmittel sowie die tangential in einer Rille am Becherrand ansetzende, über ein Dreieckig mit dem Fraktions- oder Ablaufsampler verbundene Absaugleitung. Auf der heizbaren Basisplatte sind die Ein- und Austrittsöffnungen für die zirkulierende Warmluft sichtbar (50 °C. Temperaturkonstanz ± 0.2 °C). Durchmesser der Basisplatte 18 cm.

(Werkfoto der Fa. Beckman Instruments GmbH, München.)

Auf diesem Proteinfilm wird nun die Kupplungsreaktion [Gl. (a)] unter Stickstoff vorgenommen, indem man Reagens und Puffer durch einen Kapillarschlauch in das Gefäß eintropfen läßt. Durch die Zentrifugalkraft steigen die Reagenzien in dünner Schicht langsam an der Becherwand nach oben, bis das Protein vollständig bedeckt ist. Nach der Reaktion wird die Glasglocke zur Entfernung des Lösungsmittels und der Hauptmenge an überschüssigem Reagens aus dem Reaktionsgefäß erneut evakuiert.

Zur anschließenden Extraktion des Puffers sowie des restlichen Phenylisothiocyanats dient ein dünner Lösungsmittelfilm, der über die Proteinschicht hinweggleitet und schließlich aus einer im oberen Drittel des Reaktionsgefäßes befindlichen Kerbe durch einen tangential ansetzenden Teflonschlauch abgesaugt wird. Die auf die Extraktion folgende Trocknung im Vakuum wird durch die große Oberfläche und die stabilisierende Zentrifugalkraft wesentlich erleichtert. Schließlich wird auch die Spaltung [Gl. (b)] mit wasserfreier n-Heptafluorbuttersäure unter Stickstoff nach dem gleichen Prinzip vorgenommen. Nach Entfernung der Säure im Vakuum wird das gebildete Thiazolinon (2) wie beschrieben

mit 1-Chlorbutan extrahiert und in einem Fraktionssammler aufgefangen.

Die Reinheit der Reagentien und Lösungsmittel ist bei der automatischen *Edman*-Methode von außerordentlicher Bedeutung. So müssen vor allem auch kleinste Mengen Aldehyde vollständig entfernt werden, da diese mit den Aminogruppen Schiffsche Basen bilden und die Ausbeuten rasch herabsetzen.

6.3. Identifizierung der Abbauprodukte

Die Umlagerung der gesammelten, instabilen Thiazolinon-Aminosäuren (2) in die PTH-Aminosäuren (3) gemäß Gl. (c) erfolgt außerhalb des Gerätes von Hand in 1 N HCl bei 80 °C innerhalb von 10 min. Zur Identifizierung der PTH-Aminosäuren wurden zahlreiche Methoden ausgearbeitet, von denen die früher als Methode der Wahl bezeichnete Dünnschichtchromatographie inzwischen durch die von *Pisano* et al. [43a] beträchtlich verbesserte gaschromatographische Bestimmung freier oder silylierter PTH-Aminosäuren verdrängt wurde. Die Vorteile der Gaschromatographie liegen – abgesehen von der raschen Durchführbarkeit und der großen Empfindlichkeit – vor allem darin, daß eine exakte quantitative Verfolgung des gesamten Abbauvorganges, die sich bei den ersten Arbeiten mit dem Sequenator sehr bald als notwendig erwiesen hat, möglich ist.

Zur Identifizierung der PTH-Aminosäuren können folgende Methoden dienen:

1. Papierchromatographie [44–46];
2. Adsorptions-Säulenchromatographie [47];
3. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel [48, 49] und Polyamidplatten [50];
4. Gaschromatographie [51–55]. Hierbei zersetzen sich die PTH-Derivate von Ser, Thr, Asn und Gln sowie der basischen Aminosäuren jedoch zum Teil;
5. verbesserte Gaschromatographie [43a];
6. Massenspektrometrie [56, 57];

[43a] *J. J. Pisano* u. *T. J. Bronzert*, *J. biol. Chemistry* 244, 5597 (1969).

[44] *J. Sjöquist*, *Acta chem. scand.* 7, 447 (1953).

[45] *W. A. Landmann*, *M. P. Drake* u. *J. Dillaha*, *J. Amer. chem. Soc.* 75, 3638 (1953).

[46] *J. Sjöquist*, *Biochim. biophysica Acta* 41, 20 (1960).

[47] *J. Sjöquist*, *Ark. Kemi* 11, 151 (1957).

[48] *J. O. Jeppsson* u. *J. Sjöquist*, *Analyt. Biochem.* 18, 264 (1967).

[49] *G. Pataki*, *Experientia* 17, 145 (1961).

[50] *K. T. Wang*, *I. S. Y. Wang*, *A. L. Lin* u. *C. S. Wang*, *J. Chromatogr.* 26, 323 (1967).

[51] *J. J. Pisano*, *W. J. A. Vanden Heuvel* u. *E. C. Horning*, *Biochim. biophysica. Res. Commun.* 7, 82 (1962).

[52] *R. A. Harman*, *J. L. Patterson*, *W. J. A. Vanden Heuvel*, *Analyt. Biochem.* 25, 452 (1968).

[53] *J. J. Pisano*, *T. J. Bronzert*, *Federat. Proc.* 28, 661 (1969).

[54] *H. D. Niall*, *H. Penhasi*, *P. Gilbert*, *R. C. Myers*, *F. Williams* u. *J. T. Potts jr.*, *Federat. Proc.* 28, 661 (1969).

[55] *H. Bober* u. *M. v. Wilm*, unveröffentlichte Arbeiten.

[56] *F. Weygand*, Vortrag, The Chemical Society Anniversary Meetings, Exeter, 1967.

[57] *A. Dijkstra*, *H. A. Billiet*, *A. H. Van Doninck*, *H. Van Velthuizen*, *L. Maat* u. *H. C. Beyerman*, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* 86, 65 (1967).

7. Rückspaltung durch alkalische oder saure Hydrolyse^[58] und anschließende Identifizierung nach *Stein* und *Moore*. Hierbei ergeben sich Schwierigkeiten beim Nachweis von Asn und Gln, die der Amidspaltung unterliegen. Ferner werden PTH-Ser sowie PTH-Thr zu Gly und PTH-Arg zu Orn abgebaut. Die Ausbeuten sind hierbei durchweg schlecht;

8. Dünnschichtelektrophorese für PTH-Arg und PTH-His^[4, 59].

In diesem Zusammenhang sind zwei indirekte Nachweismethoden zu erwähnen, die vor allem bei der Konstitutionsermittlung kurzkettiger Peptide Bedeutung erlangt haben:

Bei der Subtraktionsmethode^[60] wird auf die Umlagerung und Identifizierung der abgespaltenen Thiazolinon-Aminosäuren (2) verzichtet. Stattdessen wird nach jedem Abbauschritt vom Restpeptid ein aliquoter Teil entnommen, in dem die Aminosäure-Komponenten nach Hydrolyse säulenchromatographisch identifiziert werden. Aus der jeweils fehlenden Aminosäure ergibt sich die Sequenz. Beim kombinierten Edman-Dansyl-Versfahren^[61, 62] bestimmt man vor jedem Abbauschritt an einem aliquoten Teil des Peptids die Endgruppe nach der Dansyl-Methode. Nach Totalhydrolyse wird die endständige Aminosäure dünnenschichtchromatographisch identifiziert. Anschließend spaltet man die nächste, nun bereits bekannte Aminosäure ab. Auf diese Weise kann der Edman-Abbau durch die Endgruppenbestimmung fortlaufend kontrolliert werden.

Ein wesentlicher Nachteil beider Methoden ist der relativ große Materialbedarf.

7. Grenzen der Methode

Leider sind der universellen Anwendbarkeit des automatischen Edman-Abbaus im Sequenator Grenzen gesetzt:

1. Die progressive Verminderung der Ausbeuten aufgrund unspezifischer hydrolytischer Spaltungen während des Abbaus sowie Überlappungen aufeinanderfolgender Stufen bei Unvollständigkeit der Reaktionen (a) und (b) führen an eine Grenze, von der an die Ergebnisse nicht mehr interpretierbar sind.

2. Bei sehr langen, vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren aufgebauten Ketten treten trotz Einführung zusätzlicher hydrophiler Gruppen Löslichkeitsprobleme auf.

3. Der Abbau läßt sich nicht bis zum Carboxylende fortsetzen, da die Löslichkeitsunterschiede zwischen kurzkettigen Peptiden und den Thiazolinon-Amino-

[58] B. Africa u. F. H. Carpenter, Biochem. biophysic. Res. Commun. 24, 113 (1966).

[59] C. G. Honegger, Helv. chim. Acta 44, 173 (1961).

[60] C. H. W. Hirs, Ann. New York Acad. Sci. 88, 611 (1960).

[61] L. B. Smillie u. B. S. Hartley, Biochem. J. 101, 232 (1966).

[62] W. R. Gray, Methods in Enzymol. 11, 469 (1967).

säuren so gering sind, daß diese Verbindungen nicht mehr quantitativ extrahiert werden können. Aus den gleichen Gründen kann die Methode auch noch nicht auf kurzkettige Peptide angewendet werden (vorläufige Versuche s. [54]).

4. PTH-Asn und PTH-Gln hydrolysieren zum Teil zu PTH-Asp und PTH-Glu. PTH-Ser sowie PTH-Try werden teilweise durch die zur cyclisierenden Spaltung verwendete wasserfreie Säure zerstört.

8. Schlußbetrachtung

Die beschriebene Methodik der automatischen Sequenzanalyse eröffnet eine Reihe neuer Aspekte und Möglichkeiten:

1. Der systematische Abbau der Primärstruktur durch enzymatische und chemische Spaltung wird einfacher und weniger zeitraubend werden, in vielen Fällen möglicherweise ganz entfallen, da wesentlich längere Ketten als bisher sequenziert werden können.

2. Aufgrund der guten Ausbeuten im Sequenator und der gesteigerten Nachweisempfindlichkeit für Aminosäuren wird sich der Substanzbedarf bei der Sequenzanalyse beträchtlich verringern.

3. Der Zeitaufwand für die eigentliche Sequenzanalyse ist bereits drastisch reduziert worden: 15 Abbauschritte sind in 24 Stunden möglich. (An der Sequenzermittlung des Insulins nach der DNP-Methode haben *Sanger* und drei Mitarbeiter zehn Jahre, an der des Hämoglobins hat *Braunitzer*, bei wesentlich verbesserter Methodik, mit fünf Mitarbeitern sechs Jahre gearbeitet. Die Ermittlung der Sequenz einer Kette von 150 Aminosäuren dauert nach der klassischen, manuellen Edman-Methode bei zwei Personen etwa zwei Jahre.)

4. Möglicherweise läßt sich das Edmansche Prinzip des automatischen Abbaus auch auf andere makromolekulare Substanzen, z. B. Nucleinsäuren, übertragen, falls es gelingt, auch für diese Verbindungen wiederholbare Abbaureaktionen bei guten Ausbeuten zu entwickeln.

5. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß sich eine der Reaktionen, die den kontrollierten, sukzessiven Abbau vom C-Terminus her gestatten, so verbessern läßt, daß auch diese Abbaureaktion^[26] im Sequenator vorgenommen werden kann. Auf diese Weise könnte die Sequenzanalyse von beiden Kettenenden aus vorgenommen werden. Eine Überlappung in der Mitte der Kette würde die Zuordnung beträchtlich erleichtern.

6. Möglicherweise kann das Problem der ähnlichen Löslichkeit kurzkettiger Peptide und der Thiazolinon-Aminosäuren durch Modifizierung der Peptide oder durch geeignete Lösungsmittel umgangen werden. Den letztgenannten Weg beschritten *Niall* et al.^[54] bei Untersuchungen am Thyreocalcitonin des Schweines, einem aus 32 Aminosäuren aufgebauten, ausgesprochen hydrophoben Peptidhormon bereits mit Erfolg.

7. Auch an die Fixierung des Carboxylen des Peptids an einen polymeren Träger durch kovalente Bindung [57, 63, 64], die unter schonenden Bedingungen wieder gelöst werden kann, muß gedacht werden. Bei der automatischen Edman-Methode ist der Träger das Restmolekül selbst, das gegen Ende extrahiert wird.

[63] R. A. Laursen, J. Amer. chem. Soc. 88, 5344 (1966).

[64] G. R. Stark, Federat. Proc. 24, 225 (1965).

[65] W. R. Gray, Nature (London) 220, 1300 (1968).

8. Einen neuen interessanten Beitrag zur Strategie der Sequenzanalyse bildet die von Gray [65] vorgeschlagene Simultananalyse von Peptidgemischen. Nach dieser Methode wäre die gleichzeitige automatische Analyse eines aus zehn oder mehr Peptiden unterschiedlicher Sequenz bestehenden Gemisches möglich, wodurch sich der Zeitaufwand bei der Aufklärung von Primärstrukturen erneut drastisch reduzieren ließe.

Eingegangen am 13. Mai 1969, ergänzt am 17. Februar 1970 [A 751]

Die differentialkalorimetrische Untersuchung der Reaktivität instabiler Verbindungen

Von Erhard Koch^[*]

Der Nachweis instabiler Zwischenprodukte bei chemischen, photo- und strahlenchemischen Lösungsreaktionen kann durch Anwendung thermoanalytischer Methoden stark erleichtert werden. Besondere Vorteile bietet die Differential-Thermoanalyse (DTA), weil sie eine schnelle und einfache Untersuchung, gegebenenfalls ab ca. -150°C über einen großen Temperaturbereich gestattet. Dadurch werden unter Normalbedingungen unmeßbar schnell aufeinanderfolgende Prozesse wegen ihrer verschiedenen Temperaturabhängigkeit voneinander getrennt. Die hohe Empfindlichkeit der Methode erlaubt auch das Arbeiten in stark verdünnten Lösungen und damit die Beschränkung auf monomolekulare Prozesse. – Am Beispiel der photochemisch zugänglichen instabilen ozonidartigen Epidioxydihydrofurane wird die Eignung der Methode zur Bestimmung energetischer und kinetischer Daten gezeigt.

1. Einleitung

Chemische Reaktionen in Lösung sind meist aus mehreren Einzelprozessen zusammengesetzt, die teils parallel, teils nacheinander ablaufen. Für die grundsätzliche Richtigkeit eines angenommenen Reaktionsmechanismus ist der Nachweis eines erwarteten Zwischenproduktes der stärkste Hinweis, jedoch ist die präparative Isolierung intermediär auftretender Substanzen meist schwierig. Dies gilt vor allem für strahlen- und photochemische Reaktionen, bei denen sich die unmittelbar an die elektronische Anregung anschließenden Prozesse wegen ihrer großen Geschwindigkeit der direkten Untersuchung entziehen.

Durch Arbeiten bei tiefen Temperaturen können auch in diesen Fällen instabile Zwischenprodukte zugänglich werden, wenn ihre Weiterreaktion wesentlich höhere Aktivierungsenergien als ihre Bildung erfordert. Auch bei photochemischen Prozessen, deren erste Propagationsschritte nur minimale Aktivierungsenergien aufweisen^[1-3], gelingt es oft – gegebenen-

falls bei extrem tiefen Temperaturen – Zwischenverbindungen abzufangen^[4-7].

In der Praxis wird der Versuch, instabile Substanzen bei tiefen Temperaturen zu isolieren und zu identifizieren, aber noch zusätzlich erschwert: Einerseits verursacht jede Anreicherung reaktiver Substanzen eine Zunahme bimolekularer Prozesse, bei denen sich die Substanzen weiter verändern, andererseits ist aber ein Nachweis bereits in der Lösung häufig problematisch, weil die gängigen Methoden, z. B. NMR-, IR- und UV-Spektroskopie, nicht immer selektiv genug sind und auch Lösungsmittel, Katalysatoren, Sensibilisatoren und Ausgangsprodukte erfassen.

Diese Schwierigkeiten entfallen, wenn man zunächst nicht die Zwischenprodukte selbst, sondern ihre Reaktionen in Lösung untersucht. Da praktisch jede Reaktion Wärme abgibt oder verbraucht, läßt sich die Temperaturänderung als allgemeines meßtechnisches Kriterium verwenden. Wird also die Lösung eines instabilen Zwischenproduktes stetig erwärmt, so überlagern sich Temperaturänderungen, die für die Reaktionen des Zwischenproduktes charakteristisch sind. Umgekehrt deutet das Ausbleiben thermischer Effekte bei dieser Untersuchung darauf hin, daß kein instabiles Produkt vorhanden war.

- [4] G. O. Schenck u. D. E. Dunlap, Angew. Chem. 68, 248 (1956).
[5] E. Koch u. G. O. Schenck, Chem. Ber. 99, 1984 (1966).
[6] E. Koch, Chemie-Ing.-Techn. 41, 916 (1969).
[7] G. O. Schenck u. R. Steinmetz, Chem. Ber. 96, 520 (1963).

[*] Dr. E. Koch
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung,
Abt. Strahlenchemie
433 Mülheim/Ruhr, Stiftstraße 34-36

[1] J. G. Calvert u. J. N. Pitts jr.: Photochemistry. Wiley, New York 1966, S. 645ff.

[2] E. Koch, Tetrahedron 24, 6295 (1968).

[3] E. Koch, Tetrahedron 23, 1747 (1967).