

- [17] *H. Iwamura*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 232.
 [18] *G. Yamamoto u. M. Ōki*, *Chem. Lett.* 1974, 67.
 [19] *G. Yamamoto u. M. Ōki*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1974, 713.
 [20] *F. Suzuki, M. Ōki u. H. Nakanishi*, *Bull. Chem. Soc. Japan* 46, 2858 (1973).
 [21] *M. Nakamura, M. Ōki u. H. Nakanishi*, *Tetrahedron* 30, 543 (1974).
 [22] *F. Suzuki, M. Ōki u. H. Nakanishi*, *Bull. Chem. Soc. Japan* 47, 3114 (1974).
 [23] *N. M. Sergeev, K. F. Abdulla u. V. R. Skvarchenko*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1972, 368.
 [24] *Y. K. Grishin, N. M. Sergeev, O. A. Subbotin u. Y. A. Ustynyuk*, *Mol. Phys.* 25, 297 (1973).
 [25] *F. Suzuki u. M. Ōki*, *Tetrahedron Lett.* 1974, 2845; *Bull. Chem. Soc. Japan* 48, 596 (1975).
 [26] *F. Suzuki*, Ph. D. Thesis, The University of Tokyo, 1975.
 [27] *K. D. Bartle, P. M. G. Davin, D. W. Jones u. R. L'Amie*, *Tetrahedron* 26, 911 (1970).
 [28] *V. Date u. E. W. Warnhoff*, *Can. J. Chem.* 50, 2470 (1972).
 [29] *H. Nakanishi, O. Yamamoto, M. Nakamura u. M. Ōki*, *Tetrahedron Lett.* 1973, 727.
 [30] *M. Nakamura, M. Ōki u. H. Nakanishi*, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7169 (1973); *M. Nakamura, M. Ōki, H. Nakanishi u. O. Yamamoto*, *Bull. Chem. Soc. Japan* 47, 2415 (1974).
 [31] *J. E. Anderson u. D. I. Rawson*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 830.
 [32] *E. A. Chandross u. C. F. Sheley, Jr.*, *J. Am. Chem. Soc.* 90, 4345 (1968).
 [33] *A. Rieker u. H. Kessler*, *Tetrahedron Lett.* 1969, 1227.
 [34] *T. H. Siddall, III u. W. E. Stewart*, *J. Org. Chem.* 34, 233 (1969).
 [35] *M. Nakamura u. M. Ōki*, *Tetrahedron Lett.* 1974, 505.
 [36] *M. Nakamura u. M. Ōki*, *Chem. Lett.* 1975, 671.
 [37] *H. Iwamura u. K. Yoshimura*, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 2652 (1974).
 [38] *W. T. Ford, T. B. Thompson, K. A. J. Snoble u. J. M. Timko*, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 95 (1975).
 [39] *H. Iwamura*, *Chem. Lett.* 1974, 1205.
 [40] *M. Nakamura u. M. Ōki*, *Bull. Chem. Soc. Japan* 48, 2106 (1975).
 [41] *M. Nakamura u. M. Ōki*, unveröffentlichte Arbeiten.

Sequenzanalyse von Polypeptiden und Proteinen mit der kombinierten Gaschromatographie-Massenspektrometrie^[**]

Von Heinz Nau^[*]

Bei einer neuen Methode zur Bestimmung der Aminosäure-Sequenz wird das Polypeptid zunächst durch Partialhydrolyse in ein komplexes Gemisch von Oligopeptiden zerlegt, das durch Derivatisierung flüchtiger gemacht und schließlich mit der kombinierten Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert wird. Aus den dabei identifizierten Oligopeptiden ermittelt ein Computer die Sequenz des Polypeptids. Bisher gelang auf diese Weise die Sequenzanalyse von Polypeptiden mit bis zu etwa 40 Aminosäuren. Die Vor- und Nachteile dieser neuen Methode gegenüber dem Edman-Abbau-Verfahren mit seinem stufenweisen Vorgehen werden abgewogen. Da beide Methoden von prinzipiell unterschiedlichen Voraussetzungen ausgehen, können sie sich ergänzen.

1. Einleitung

Proteine haben, je nach Herkunft und Funktion, unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften. Chemisch weitgehend inerten Formen von unlöslichen Proteinen, wie Keratin oder Elastin, stehen sehr empfindliche Strukturen vieler Hormone (z. B. Glucagon, Insulin) und Enzyme (z. B. Ribonuclease A, Chymotrypsin) gegenüber, die eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren und den Stoffwechsel der Lebewesen regulieren. Außerdem variiert das Molekulargewicht innerhalb dieser Klasse von Naturstoffen (z. B. Insulin: 51 Amino-

säuren^[1]^[**]; eine Polypeptidkette eines Immunoglobins: 576 Aminosäuren^[2]), was ebenfalls dazu beiträgt, daß in bezug auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften kaum ein Protein dem anderen gleicht, obwohl der chemische Bau im Prinzip bei allen Proteinen übereinstimmt. Schließlich legt die variationsreiche Chemie der zwanzig Aminosäuren, aus denen die Proteine bestehen, einer Routine-Analysenmethode Schwierigkeiten in den Weg. Die Kenntnis der Struktur ist aber Voraussetzung für die Aufklärung der Wirkungsweise dieser Moleküle.

Die erfolgreiche Entschlüsselung der Primärstruktur größerer Proteine (Sequenzanalyse) ist auch heute noch – 25 Jahre nach der Einführung des Edman-Abbaus^[3] – ein schwieriges Unternehmen, obwohl automatische „Protein-Sequenatoren“^[4] den Bedarf an Zeit und Substanz verringert haben. Zur vollständigen Analyse eines Proteins unbekannter Struktur mit z. B. 200 Aminosäuren werden gewöhnlich mehrere Jahre benötigt. Das Ergebnis, die „Sequenz“, kann zunächst nur dadurch überprüft werden, daß die Analyse wiederholt wird. Liegt ein systemeigener Fehler vor, wird die Sequenz notwendigerweise wieder falsch. Der klassische „Strukturbeweis“ durch Totalsynthese erweist sich in diesem Zusammenhang als illusorisch: die Synthesen von Polypeptiden und Proteinen sind noch unzulänglicher als ihre Analytik.

[*] Dr. H. Nau
Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung
3301 Stöckheim bei Braunschweig, Mascheroder Weg 1

[**] An Abkürzungen für Aminosäuren wurden verwendet: Gly: Glycin; Ala: Alanin; Val: Valin; Leu: Leucin; Ile: Isoleucin; Pro: Prolin; Phe: Phenylalanin; Tyr: Tyrosin; His: Histidin; Trp: Tryptophan; Ser: Serin; Thr: Threonin; Asp: Asparaginsäure; Asn: Asparagin; Asx: entweder Asp oder Asn; Glu: Glutaminsäure; Gln: Glutamin; <Glu: 5-Oxo-2-pyrrolidincarbonäure; Glx: entweder Glu, Gln oder <Glu; Lys: Lysin; Arg: Arginin; Cys: Cystein; Met: Methionin. Sonstige Abkürzungen: GC-MS: Gaschromatographie-Massenspektrometrie; N-TFA: N-Trifluoracetyl; N-PFP: N-Pentafluorpropionyl; N-HFB: N-Heptafluorbutyryl; –OTMS: Trimethylsilylather; S₁, S₂, ...: Sequenz-Ionen in den N-TFA-, N-PFP- und N-HFB-Peptid-methylestern; A₁, A₂, ... und Z₁, Z₂, ...: Sequenz-Ionen in den Polyaminoalkoholen; M: Molekülion; I: Retentionsindex; CPI: ein Carboxypeptidase-Inhibitor aus Kartoffeln; DAP I: Dipeptidylaminopeptidase I; ng: Nanogramm (10^{-9} g); pg: Pikogramm (10^{-12} g); OV-17: polymeres Methyl(50%)-phenyl(50%)-siliconöl; Dexsil: Polycarbonan-methylsilicon.

[***] Um Raum zu sparen, werden oft nur zusammenfassende Artikel zitiert.

Ein besserer Weg als die Totalsynthese ist die Entwicklung eines zweiten, unabhängigen Analysenverfahrens, dessen Ergebnisse mit den Resultaten des automatischen Edman-Abbau-Verfahrens verglichen werden könnten. Dieser Aufsatz beschreibt eine Methode der Sequenzanalyse, die sich einer Kombination aus drei Techniken bedient: der Gaschromatographie (GC), der Massenspektrometrie (MS) und der Computertechnik. Wir glauben, daß diese analytische Methode eine ideale Ergänzung des Edman-Abbau-Verfahrens ist. So erfordert das Edman-Verfahren eine freie Aminogruppe am N-Terminus eines Peptids; gerade diese blockierten Peptide jedoch können mit den massenspektrometrischen Methoden vorteilhaft analysiert werden. Auch freie Aminosäuren, die unter den Bedingungen des Edman-Abbaus oft zerstört werden (z. B. Ser, Tyr oder Trp), hier keine Schwierigkeiten. Die massenspektrometrischen Techniken führen darüber hinaus zur vollständigen Sequenz eines untersuchten Polypeptids, während das Edman-Verfahren oft nur die Bestimmung einer Partialsequenz ermöglicht.

Den wichtigen Beitrag des neuen Verfahrens sehen wir darin, daß es eine vom Edman-Abbau chemisch und apparativ-methodisch unabhängige Analyse gestattet.

In diesem Aufsatz werden zunächst die allgemeinen Probleme der Sequenzanalyse vorgestellt; darauf werden die Prinzipien der beiden Verfahren verglichen und die jeweiligen Vorteile und Nachteile abgewogen. Nach der Besprechung der Voraussetzungen und des modernen Standes der massenspektrometrischen Sequenzanalyse wird ihre Anwendung zur Lösung einiger Probleme der Proteinchemie diskutiert.

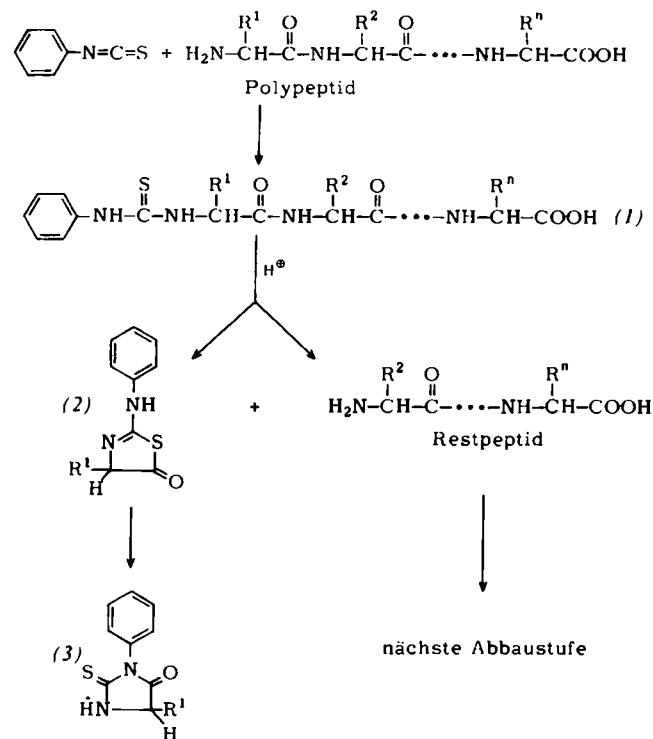
2. Probleme und Möglichkeiten der Sequenzanalyse

2.1. Edman-Abbau-Verfahren

Polypeptide und Proteine sind kettenförmige Moleküle, in denen α -Aminosäuren über α -Amino- und α -Carboxylgruppen miteinander verknüpft sind. Dabei bleibt eine Aminogruppe an einem Ende der Kette (N-Terminus) sowie eine Carboxylgruppe am anderen Ende der Kette frei (C-Terminus). Da die Analyse der Gesamtstruktur solcher Makromoleküle bislang auf unüberwindliche Schwierigkeiten stößt – die Röntgenbeugung an Proteinkristallen kommt diesem Ideal noch am nächsten – sind indirekte Methoden der Sequenzanalyse entwickelt worden.

Eines dieser Verfahren besteht darin, daß – von einem Ende der Kette ausgehend – eine Aminosäure nach der anderen abgespalten, isoliert und identifiziert wird. Der Rest der Kette darf dabei nicht verändert werden, da sonst die Information über die Sequenz der zurückbleibenden Kette verloren ginge. Die schrittweise, vielfach wiederholte Abtrennung von jeweils einer Aminosäure aus langen Peptidketten gelang zuerst *Pehr Edman* nach vielen mühseligen Versuchen^[3-5].

Schema 1 zeigt das nunmehr klassische Verfahren des Edman-Abbaus. Zuerst wird die N-terminale Aminogruppe der Polypeptidkette mit Phenylisothiocyanat zum Thioharnstoff-Derivat (1) gekoppelt, das man im zweiten Schritt spaltet. Das resultierende 2-Anilino-5-thiazolinon (2) wird vom verkürzten Polypeptid (Restpeptid) abgetrennt und in das 3-Phenyl-2-thiohydantoin (3) umgewandelt, das identifiziert wird. Das Restpeptid kann seinerseits derselben Reaktionsfolge unterworfen werden, wobei die nächste Aminosäure abgespalten



Schema 1. Der Edman-Abbau.

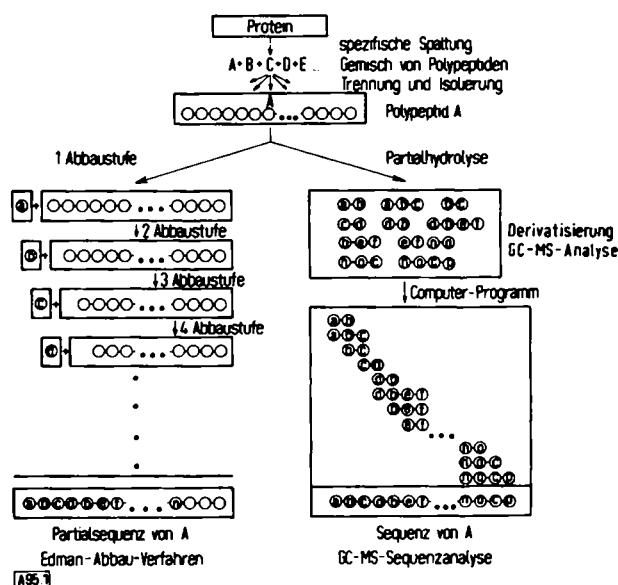
wird u.s.f. Die logische Einfachheit dieser Methode ist nicht zu überbieten, ihre Erfolge sind beachtlich. So wurde die überwiegende Mehrzahl der über 500 heute bekannten Polypeptid-Sequenzen^[6] mit Hilfe des Edman-Abbau-Verfahrens aufgeklärt.

Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung dieses Verfahrens ist jedoch eine freie Aminogruppe am N-Terminus. Ist diese blockiert, wie in N-acetylierten oder cyclischen Peptiden, so läßt sich das Peptid nicht abbauen. Außerdem werden einige Aminosäuren, z. B. Ser oder Trp, unter den Bedingungen des Edman-Abbaus zerstört; Gln kann dabei auch cyclisieren und damit den weiteren Abbau unterbinden. Auch ist die Identifizierung der abgespaltenen Aminosäure-Derivate (3) oft sehr schwierig; so gibt es keine Methode, die für alle Aminosäuren geeignet ist^[7, 8].

Mit dem von *Edman* und *Begg*^[4] entwickelten Protein-Sequenator, in dem der Abbau automatisch durchgeführt wird, ist es heute möglich, zwischen 20 und 40, in Ausnahmefällen sogar noch über 50 Aminosäuren zu identifizieren. Die Abbaureaktionen lassen sich jedoch nicht unbegrenzt weiterführen, da die einzelnen Reaktionen nicht quantitativ verlaufen (sonst nur zu etwa 96–98 %) und darüber hinaus auch interne Peptidbindungen gespalten werden. Außerdem wird in zunehmendem Maß die verkürzte Peptidkette – vor allem wenn hydrophobe Aminosäuren überwiegen – mit dem Thiazolinon-Derivat (2) extrahiert und geht verloren. Somit können meistens nur N-terminale Partialsequenzen, nicht aber die gesamten Strukturen von Polypeptiden aufgeklärt werden (siehe Abb. 1). Man hilft sich dann so, daß das Polypeptid durch Säuren oder Enzyme zu kleineren Bruchstücken hydrolysiert wird, die voneinander getrennt, isoliert und analysiert werden müssen und deren Strukturen nun auch Aufschluß über die restliche Sequenz (am C-Terminus) des Polypeptids geben.

Zur Sequenzanalyse eines Proteins müssen die Strukturen vieler Polypeptide aufgeklärt werden (A, B, C... in Abb. 1). Dabei ist die Trennung und Isolierung der Polypeptide oft

der schwierigste und aufwendigste Schritt. So erforderte die Sequenzanalyse von Thermolysin (316 Aminosäuren) die Untersuchung von 173 Fragmenten^[19] und die Sequenzanalyse einer Polypeptidkette aus IgM-Immunglobulin^[21] (576 Amino-



säuren – die längste Kette, die bisher aufgeklärt wurde) sogar die Untersuchung von fast 600 Peptiden. Eine Methode der Sequenzanalyse, die nicht nur zu Partialsequenzen, sondern zu vollständigen Sequenzen von Polypeptiden führt, ist daher höchst wünschenswert.

2.2. Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Der rechte Teil von Abbildung 1 soll das Prinzip des neuen Verfahrens deutlich machen. Das Polypeptid A wird nicht – wie im Edman-Verfahren – stufenweise verkürzt, sondern durch partielle Säurehydrolyse in möglichst viele Oligopeptide zerlegt. Alle diese Oligopeptide werden identifiziert und die so erhaltenen Partialsequenzen wie in einem Domino-Spiel zur Gesamtsequenz A zusammengesetzt. Das zentrale Problem dieses Verfahrens ist die vollständige Analyse des sehr komplexen Hydrolysegemisches, das oft über 50 Oligopeptide enthält. Bei der Strukturanalyse von Insulin hat Sanger^[11] solche Gemische noch chromatographisch trennen und die Oligopeptide isolieren und identifizieren müssen, was äußerst schwierig und zeitraubend war. Zur Analyse der Gemische haben wir die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) herangezogen, mit der die Trennung der Komponenten (im Gaschromatographen) sowie die Identifizierung (im Massenspektrometer) in einem einzigen Experiment möglich ist^[10-13]. Zur Erfassung und Auswertung des extrem hohen Datenanfalls einer solchen Anlage wird ein Computer verwendet (GC-MS-Computer-System).

Die Sequenzanalyse mit einem solchen GC-MS-Computer-System erfordert vier Schritte.

1. Das Polypeptid (A in Abb. 1) wird durch Partialhydrolyse in Oligopeptide zerlegt. Da möglichst alle Peptidbindungen in diesen Bruchstücken vertreten sein und da die Bruchstücke auch die richtige Größe haben sollen – etwa Di- bis Hexapeptide, die der GC-MS-Analyse zugänglich sind –, ist die optimale Ausführung dieses ersten Schrittes von entscheidender Bedeutung.

2. Das Gemisch der Oligopeptide wird (möglichst quantitativ) in das entsprechende Gemisch flüchtiger Derivate umgewandelt („Derivatisierung“); die notwendigen Reaktionen werden schon routinemäßig ausgeführt.

3. Das Gemisch der Oligopeptid-Derivate wird auf einer gaschromatographischen Säule in Fraktionen getrennt, wobei die Temperatur der Säule von 80 auf 330°C linear programmiert wird. Dadurch lassen sich Oligopeptid-Derivate mit sehr unterschiedlichen Molekulargewichten und Polaritäten analysieren. Das Trägergas wird vor dem Einlaß in die Ionenquelle entfernt. Die Derivate treten in das Massenspektrometer ein und werden dort ionisiert. Wir haben auch dieses Verfahren standardisiert und können dabei in einem Analysengang Derivate von Di- bis Tetrapeptiden, oft auch von Penta- und Hexapeptiden identifizieren. Ein Computer steuert das GC-MS-System und mißt die Massenspektren kontinuierlich (alle 5 Sekunden). Durch geeignete Programme werden vom Computer die gaschromatographischen und massenspektrometrischen Daten (siehe Abschnitt 3.3) berechnet und auf Magnetband und Mikrofilm gespeichert oder durch einen Plotter oder Zeilendrucker ausgegeben. Mit diesen Daten gelingt die Identifizierung aller im Gemisch vorhandenen Oligopeptid-Derivate.

4. Mit einem Computer-Programm werden nun die Oligopeptide nach dem „Domino-Prinzip“ zur Struktur des Polypeptids zusammengesetzt^[14] (vgl. Abb. 1).

Ein großer Vorteil der GC-MS-Sequenzanalyse im Vergleich zu den sequentiellen Abbaumethoden ist der, daß nicht nur eine N-terminale Teilsequenz, sondern die vollständige Sequenz eines Polypeptids resultiert (Abb. 1), wobei der C-terminale Teil des Makromoleküls mit derselben Sicherheit identifiziert wird wie der N-terminale Teil. Damit sollte sich auch die Anzahl der Polypeptide (A, B, C ... in Abb. 1) erniedrigen, deren Strukturen aufgeklärt werden müssen, um zur Primärstruktur eines Proteins zu gelangen.

Außerdem ist die Position einer jeden Aminosäure in der Sequenz nicht nur durch eine chromatographische Kenngröße belegt (z. B. durch den R_f -Wert eines farbigen oder fluoreszierenden Flecks auf einer Dünnschichtplatte), sondern vor allem auch durch Massenspektren eines oder mehrerer Derivate. So ist die Position der Aminosäure d in Abbildung 1 durch die Retentionskenngrößen und Massenspektren der Derivate von c-d, d-b und d-b-e-f sichergestellt. Diese Daten sind permanent auf Magnetband und zusätzlich auf Mikrofilm gespeichert und jederzeit verfügbar.

Die beschriebene GC-MS-Methode eignet sich auch zur Sequenzanalyse von Peptiden mit blockierten N-Termini (siehe Abschnitt 4.2). Diese Peptide können ohne Modifizierung analysiert werden; dabei wird zugleich die blockierende Gruppe identifiziert. Auch bereiten Aminosäuren, die beim Edman-Abbau oft zerstört werden – z. B. Ser, Thr oder Trp – hier keine Schwierigkeiten.

3. Voraussetzungen der Sequenzanalyse von Polypeptiden mit der GC-MS-Methode

3.1. Partialhydrolyse von Polypeptiden

Das wichtigste Verfahren zur teilweisen und reproduzierbaren Spaltung möglichst vieler Peptidbindungen eines Polypeptids ist die *partielle Säurehydrolyse* (vgl. auch^[11]). Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, daß sich praktisch alle Peptidbindungen durch Säure spalten lassen. Für jedes Polypeptid gibt es dabei unter definierten Bedingungen (z. B. 6 N HCl bei 110°C) eine optimale Hydrolysezeit, nach der die meisten Di- bis Tetrapeptide vorliegen. Längere Hydrolysezeiten führen zu beträchtlichen Mengen von Aminosäuren, kürzere Zeiten ergeben zu große Bruchstücke, deren Derivate wenig flüchtig sind und nicht mit der GC-MS-Methode identifiziert werden können.

Wir haben eine Methode entwickelt, die es erlaubt, diese optimale Hydrolysezeit vorauszubestimmen^[15]. Dabei werden kleine Proben des Polypeptids unter den verschiedensten Bedingungen hydrolysiert. Die entstehenden Gemische werden in die *N*-Perfluoracyl-peptid-methylester (siehe Abschnitt 3.2.1) umgewandelt und auf einer gaschromatographischen Säule getrennt. Die Menge der Oligopeptid-Derivate liegt dabei im Nanogrammbereich (10^{-9} g) oder darunter. Der Nachweis derart geringer Mengen der fluorhaltigen Derivate gelang mit dem sehr selektiven Elektroneneinsangendetektor; dabei lassen sich noch < 1 pg (10^{-12} g) pro Komponente nachweisen. Aus der Lage und relativen Größe der Peaks läßt sich die optimale Hydrolysezeit bestimmen.

Zwar werden alle Peptidbindungen durch Säure gespalten, doch ihre Hydrolysegeschwindigkeiten unterscheiden sich stark. So wird z. B. eine —Leu—Leu-Bindung wegen der sterischen Hinderung durch die beiden Isobutylgruppen nur sehr langsam geöffnet, während eine —Gly—Gly-Bindung äußerst labil ist. Demnach kann eine Peptidbindung schon quantitativ gespalten sein (z. B. —Gly—Gly—), während eine andere praktisch noch nicht angegriffen ist (z. B. —Leu—Leu—). Im entstandenen Oligopeptidgemisch werden daher oft nicht alle Peptidbindungen vertreten sein (z. B. kann eine —Gly—Gly-Bindung fehlen). Daher wird ein zweites Experiment notwendig, in dem das Polypeptid mit *Enzymen* abgebaut wird (mit einer oder mehreren Endoprotease(n) wie Thermolysin, Chymotrypsin, Elastase, Pepsin, Trypsin). Hierbei bilden sich meist gerade diejenigen Oligopeptide in guter Ausbeute, die im Säurehydrolysat fehlen. Die in beiden Experimenten identifizierten Oligopeptide haben bisher in allen Fällen ausgereicht, um die Strukturen der untersuchten Polypeptide zu ermitteln.

Bei einem weiteren, neuartigen Hydrolyseverfahren wird zunächst eine Probe des Polypeptids mit dem Enzym Dipeptidylaminopeptidase I (DAP I) abgebaut^[16]. Dieses Enzym spaltet — vom unblockierten N-Terminus eines Peptids ausgehend

schrittweise Dipeptide ab. Eine zweite Probe des Peptids wird dann durch Edman-Abbau um eine Aminosäure am N-Terminus verkürzt; das Restpeptid wird durch DAP I gespalten. Mit den in den beiden Gemischen identifizierten Dipeptiden wird dann versucht, die Struktur des Polypeptids zu erstellen. Zur Charakterisierung solcher Gemische ist die GC-MS besonders vorteilhaft, da Dipeptid-Derivate flüchtiger als Derivate höherer Oligopeptide sind.

Da jedoch nur Dipeptide als Fragmente zur Verfügung stehen, ist die daraus ermittelte Struktur bei längeren Polypep-

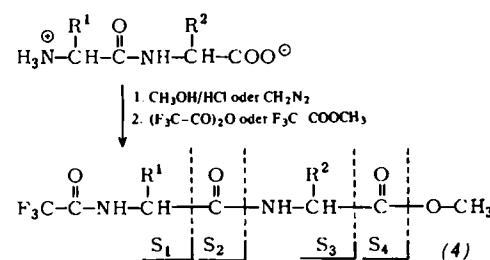
tiden oft nicht sicher^[17]. Es stehen dann mehrere isomere Sequenzen zur Auswahl, aus denen die richtige durch zusätzliche Experimente bestimmt werden muß. Weitere Schwierigkeiten ergeben sich, wenn die basischen Aminosäuren Arg und Lys die N-terminale Stellung besetzen oder wenn das Polypeptid Pro enthält, da beide Strukturmerkmale die Wirkung des Enzyms unterbinden. Deshalb haben wir uns darauf beschränkt, diese Techniken zur Strukturanalyse von kleineren tryptischen Peptiden zu verwenden^[18] sowie zur Bestätigung von Strukturen, die auf anderem Wege ermittelt wurden^[14]. Wie eine jüngst erschienene Arbeit^[18a] zeigt, kann die hemmende Wirkung der basischen Aminosäuren, nicht aber von Pro, durch Verwendung des Enzyms Dipeptidylaminopeptidase IV überwunden werden; der Anwendungsbereich dieser Hydrolysemethode sollte sich dadurch erheblich erweitern.

3.2. Darstellung und Eigenschaften flüchtiger Peptid-Derivate

Der eigentliche Analysenvorgang in der Gaschromatographie wie auch in der Massenspektrometrie geht in der Gasphase vor sich. Der Dampfdruck der Peptide ist wegen der hohen Polarität und des zwitterionischen Charakters jedoch zu gering für diese analytischen Verfahren. In den letzten 15 Jahren waren mehrere Forschungsgruppen damit beschäftigt, Peptid-Derivate zu entwickeln, die möglichst flüchtig sind und deren Massenspektren die Ableitung der Sequenz ermöglichen. Dabei sollten die „Sequenz-Ionen“ — das sind Ionen, die es gestatten, die Positionen der Aminosäuren in der Sequenz festzulegen — mit hoher Intensität auftreten und leicht erkennbar sein.

Weite Verbreitung haben die von Lederer et al.^[19–21] eingeführten permethylierten Peptid-Derivate gefunden, die durch basisch katalysierte Einwirkung von Methyljodid auf *N*-Acetyl-peptid-methylester hergestellt werden. Diese permethylierten Derivate haben zwar ausgezeichnete massenspektrometrische Eigenschaften, doch sind die meisten nicht flüchtig genug für die Gaschromatographie. Das gleiche gilt für eine Vielzahl anderer Peptid-Derivate^[22]: Sie sind nur dann nützlich, wenn reine Peptide oder sehr einfache Gemische vorliegen und nicht die Gaschromatographie als Trennmethode eingesetzt werden muß. Empfindlichkeit und Zeitbedarf sind allerdings kaum günstiger als beim klassischen Edman-Verfahren. Nur bei der Analyse von Peptiden mit blockierten N-Termini weisen die massenspektrometrischen Methoden entscheidende Vorteile auf^[23]. Komplexe Peptidgemische müssen zuerst in viele Fraktionen zerlegt werden, die dann identifiziert werden können^[24].

Drei Klassen von Peptid-Derivaten sind auch für die Gaschromatographie ausreichend flüchtig; über Darstellung, Eigenschaften und Anwendung wird im folgenden berichtet.



Schema 2. Synthese von *N*-Trifluoracetyl-peptid-methylestern (4).

3.2.1. *N*-Perfluoracyl-peptid-methylester

Weygand et al.^[25] gelang 1960 die erste gaschromatographische Trennung von Peptid-Derivaten, und zwar der *N*-Trifluor-

acetyl-(*N*-TFA)-peptid-methylester (4), die sich nach Schema 2 sehr einfach herstellen lassen.

Die Massenspektren dieser Derivate^[26-29] enthalten Sequenz-Ionen, die durch Spaltung der Peptidketten beiderseits

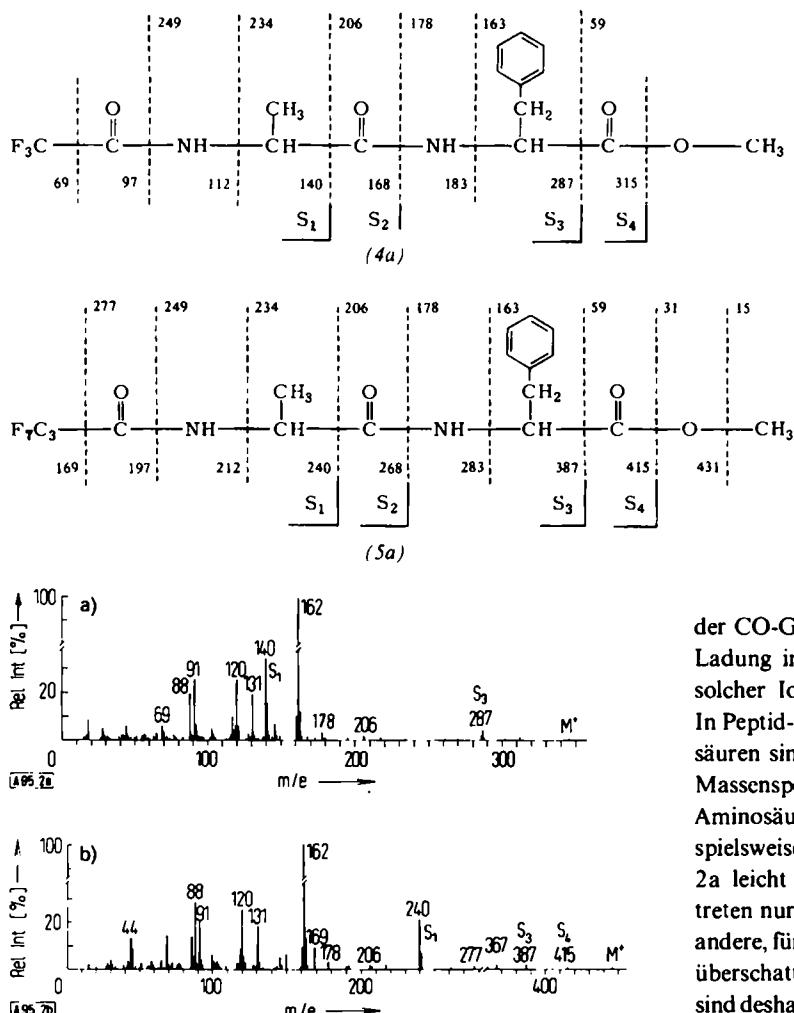


Abb. 2. Vergleich der Massenspektren einiger Ala-Phe-Derivate: a) *N*-TFA-Ala-Phe-OMe (4a) [27]; b) *N*-HFB-Ala-Phe-OMe (5a) [31]. Fragment-Ionen, die nicht in den Formeln (4a) und (5a) zu erkennen sind:

m/e	Ion
44	H ₂ N=CH-CH ₃
88	H ₂ N=CH-COOCH ₃
91	C ₆ H ₅ (Tropylium)
120	H ₂ N=CH-CH ₂ -C ₆ H ₅
131	C ₆ H ₅ -CH=CH-C=O
162	C ₆ H ₅ -CH=CH-COOCH ₃

der CO-Gruppen unter bevorzugter Erhaltung der positiven Ladung im N-terminalen Bruchstück gebildet werden (vier solcher Ionen, S₁ bis S₄, sind in Schema 2 eingezeichnet). In Peptid-Derivaten mit einfachen (z. B. aliphatischen) Aminosäuren sind diese Sequenz-Ionen auch gut zu erkennen. Die Massenspektren von Peptid-Derivaten mit trifunktionellen Aminosäuren lassen sich oft schwieriger interpretieren. Beispielsweise sind die Sequenz-Ionen S₁ und S₃ in Abbildung 2a leicht erkennbar, die Sequenz-Ionen S₂ und S₄ jedoch treten nur mit sehr geringer Intensität auf und werden durch andere, für die Ableitung der Sequenz nicht so wichtige Ionen überschattet (z. B. m/e = 162). Zur Bestätigung der Sequenz sind deshalb noch die Aufnahme hochauflöster Massenspektren sowie metastabiler Übergänge notwendig.

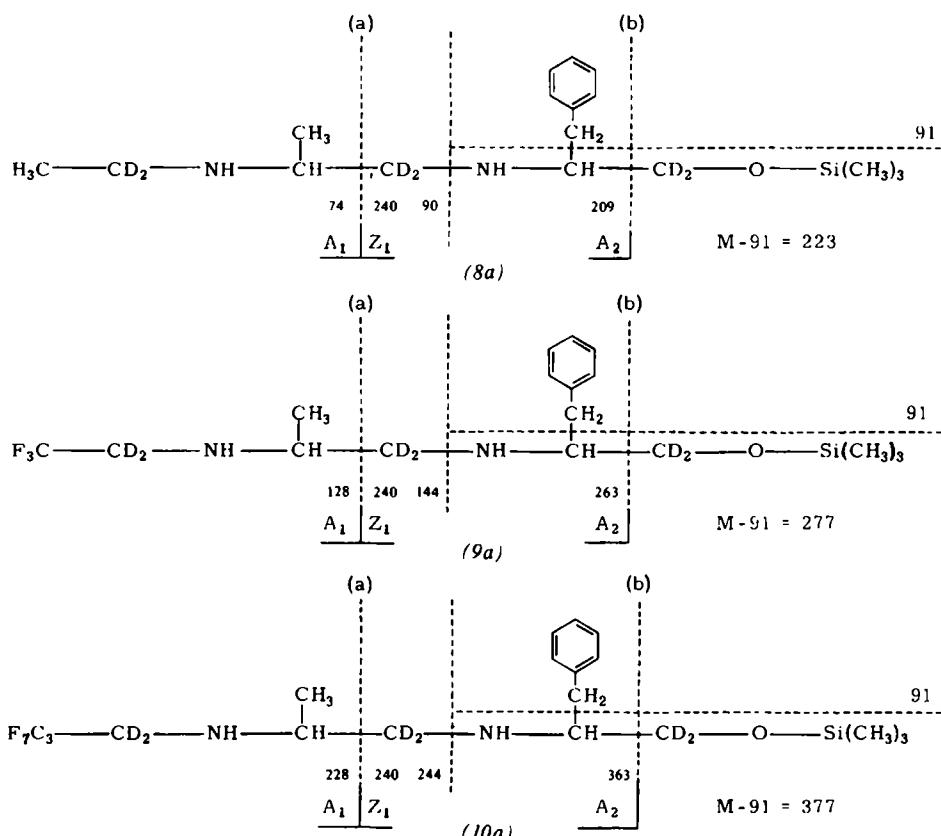
Die wichtigste Voraussetzung für eine sichere Identifizierung dieser Derivate ist jedoch das Auftreten und Erkennen der Molekülionen. Molekülionen lassen sich in den Massenspektren reiner Peptid-Derivate gut erkennen; bei unreinen Fraktionen gibt es zuweilen Schwierigkeiten. Schließlich mußte eine Reihe trifunktioneller Aminosäuren durch zusätzliche Reaktionen umgewandelt werden. So wurden die Aminosäuren

Tabelle 1. Gaschromatographische Retentionsindices (stationäre Phase: 1% OV-17 [a]) von Peptid-Derivaten [b]. Unter Retentionsindices versteht man gaschromatographische Parameter, die die Lage der Substanzpeaks im Gaschromatogramm relativ zu n-Alkanen festlegen; dabei ist der Retentionsindex von n-C₁₄H₃₀ gleich 1400, derjenige von C₂₂H₄₆ gleich 2200 usw. (siehe Abb. 7 und 8) [42] (siehe auch Abschnitt 3.3).

Peptid	(4) TFA...OMe	(5) HFB...OMe	(9) F ₃ C-CD ₂ ...OTMS	(10) F ₇ C ₃ -CD ₂ ...OTMS
Ala-Ile	1810	1802	1462	1437
Val-Leu	1853	1842	1538	1506
Leu-Met	2245	2190	1925	1867
Phe-Leu	2320	2271	2030	1965
Tyr-Ala	2548	2484	2185	2117
Met-Met	2575	2501	2273	2200
Phe-Phe	2785	2715	2517	2420
His-Phe	-	3305	2930	2822
Trp-Glu	-	-	3005	2887

[a] Auf weniger polaren stationären Phasen, z. B. Dexsil 300, erniedrigen sich die Retentionsindices um 100-300 Einheiten.

[b] Die Retentionsindices der *N*-PFP-Peptid-methylester liegen zwischen denjenigen der *N*-TFA- und *N*-HFB-Analoga.



mit einer OH-Gruppe in der Seitenkette *O*-trimethylsilyliert; S-haltige Aminosäuren (Cys, Met) wurden mit Raney-Nickel entschwefelt^[28]. *N*-Trifluoracetyl-Derivate (4) sind bisher vor allem zur Analyse cyclischer Peptide verwendet worden^[29]; diese enthielten glücklicherweise größtenteils hydrophobe Aminosäuren, die sich für die Gaschromatographie und Massenspektrometrie ideal eignen.

Die *N*-Pentafluorpropionyl- (*N*-PFP)-^[30] und die *N*-Heptafluorbutyryl- (*N*-HFB)-peptid-methylester (5)^[31], die sich durch Einwirkung der entsprechenden Anhydride auf Peptid-methylester herstellen lassen, zeigen Massenspektren, die jenen der *N*-TFA-Peptid-methylester sehr ähnlich sind (siehe Abb. 2b). Wegen der höheren Massen der Perfluoracylgruppen werden lediglich die Ionen der N-terminalen Molekülteile in einen höheren Massenbereich verschoben. Ein Vorteil dieser Verbindungen gegenüber den *N*-TFA-Derivaten ist ihre erhöhte Flüchtigkeit (Tabelle 1). Wir haben deshalb diese Derivate

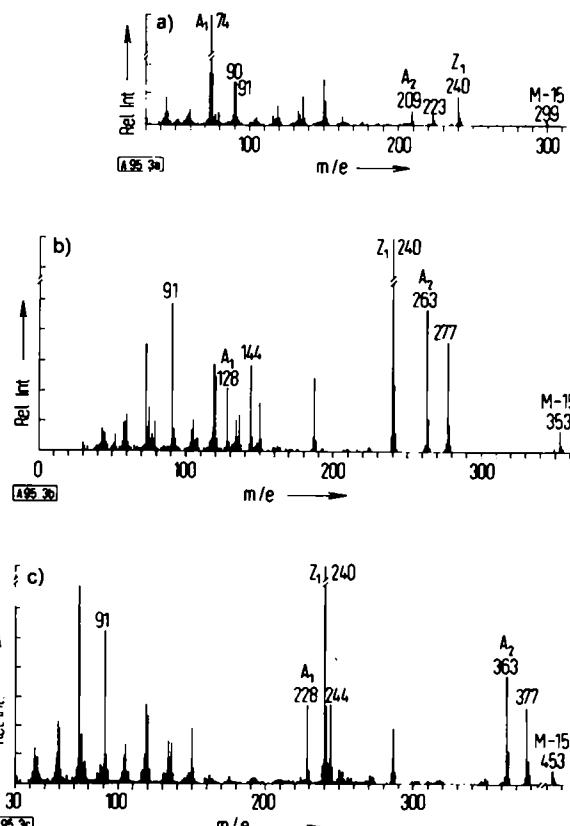
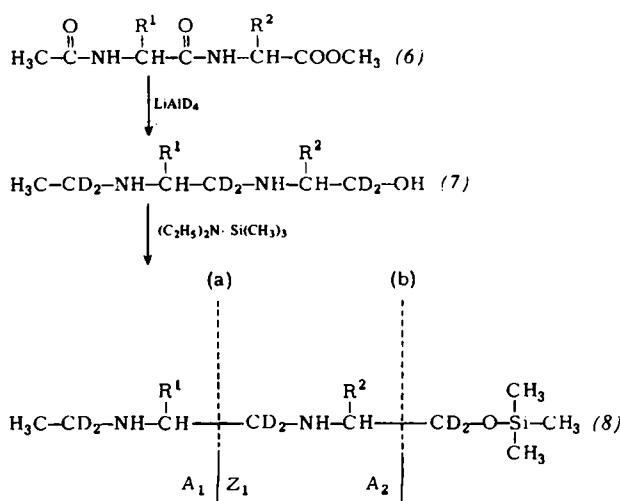


Abb. 3. Vergleich der Massenspektren einiger von Ala-Phe abgeleiteter Polyaminoalkohol-*O*-trimethylsilyl-Derivate: a) *N*-Dideuterioäthyl-Derivat (8a); b) Trifluorodideuterioäthyl-Derivat (9a); c) Heptafluorodideuterioäthyl-Derivat (10a).

bei der Strukturaufklärung eines natürlich vorkommenden Polypeptids erprobt^[32] (Abschnitt 4.2).

3.2.2. Polyaminoalkohol-*O*-trimethylsilyl-Derivate von Peptiden

Zur Erhöhung der Flüchtigkeit der Peptide haben Biemann et al.^[33, 34] eine sehr viel tiefgreifende Strukturänderung vorgeschlagen: alle Carbonylgruppen von *N*-Acetyl-peptid-methylestern (6) – also sowohl jene der Peptid- als auch der Esterfunktionen – werden dabei mit LiAlH₄ oder LiAlD₄ in –CH₂- bzw. –CD₂-Gruppen umgewandelt. Da die entstehenden Polyaminoalkohole (7) noch freie OH-Gruppen enthalten, konnte man vorerst nur recht einfache Peptide untersuchen. Werden diese polaren Zentren in Trimethylsilyläther überführt, so bilden sich die Derivate (8), die gute gaschromatographische Eigenschaften haben^[18].

Außerdem sind die Massenspektren dieser Derivate sehr einfach und zur Ableitung der Aminosäure-Sequenz hervorragend geeignet. Die Derivate (8) enthalten nämlich keine Carbonylgruppen mehr, wodurch eine Reihe von Fragmentierungsmechanismen entfallen, welche die Spektren der Derivate (4) und (5) erheblich komplizieren. Das Rückgrat dieser Verbindungen besteht aus Äthyldiamin-Bausteinen, deren C—C-Bindungen durch Elektronenstoß bevorzugt gespalten werden; die entstehenden Ionen sind leicht erkennbar und erlauben die Ableitung der Sequenz („Sequenz-Ionen“).

So führt die Spaltung der Bindung (a) in (8a) zur Bildung von zwei Ionen (Abb. 3a). Das intensive A_1 -Ion entspricht der N-terminalen Aminosäure, das weniger intensive Z_1 -Ion der C-terminalen Aminosäure. Da die Massen der A_1 -Ionen sowie der Z_1 -Ionen aller in Proteinen vorkommenden Aminosäuren mit Ausnahme von Leu und Ile verschieden sind, liegt

somit die Struktur dieses Dipeptid-Derivates schon vor. Zur Bestätigung des Ergebnisses kann noch das A_2 -Ion herangezogen werden, das durch Bruch der Bindung (b) in (8a) entsteht sowie das ($M - 15$)-Ion, das wie in allen silylierten Verbindungen auf das Molekülion schließen lässt.

Die Umwandlungsprodukte längerer Peptide, z. B. (8b) enthalten mehrere aneinandergereihte Äthylendiamin-Bausteine und somit auch mehrere C—C-Bindungen, die durch Elektronenstoß gespalten werden können (Abb. 4)^{18, 35}. Die Sequenz solcher Peptide kann auf sehr einfache Weise vom A₁-Ion der N-terminalen Aminosäuren ausgehend ($m/e = 176$ von Thr) über das A₂-Ion und die höheren A-Ionen aufgebaut werden. Diese Sequenz des Peptids wird überprüft, indem man beim Z₁-Ion der C-terminalen Aminosäure ($m/e = 251$ von Lys) beginnt und über das Z₂- und Z₃- zum Z₄-Ion fortschreitet. Auch das (M - 15)-Ion kann zur Kontrolle herangezogen werden. Aus den Massendifferenzen benachbarter Ionen der A- und Z-Serie ergeben sich so die Aminosäuren sowie deren Positionen in der Sequenz.

Der entscheidende Vorteil dieser Derivate ist also, daß die Sequenz der Peptide stufenweise aus den sehr intensiven und leicht erkennbaren Sequenz-Jonen aufgebaut werden kann. Die Ableitung der Sequenz der nicht-reduzierten Derivate (4) hingegen erfordert meist das sichere Erkennen der sehr schwachen Molekülionen (siehe Abschnitt 3.2.1).

Auch die Peptide mit trifunktionellen Aminosäuren (einschließlich Arg) können in Form der Derivate (8) identifiziert werden. Nachteilig ist jedoch, daß komplexe His-Peptide nicht oder nur als stark verbreiterte Banden von der gaschromatographischen Säule eluiert werden; diese Peptid-Derivate muß-

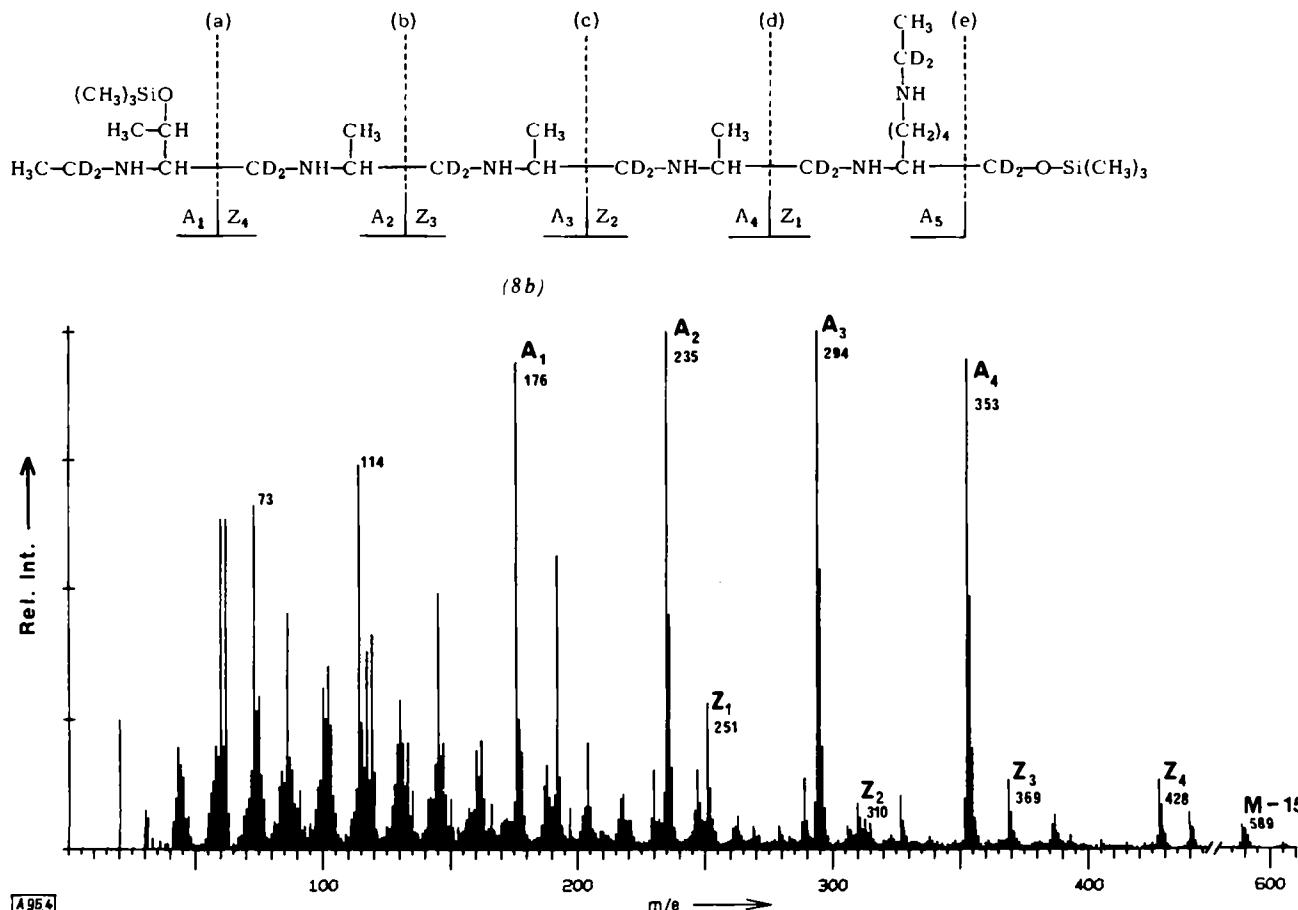


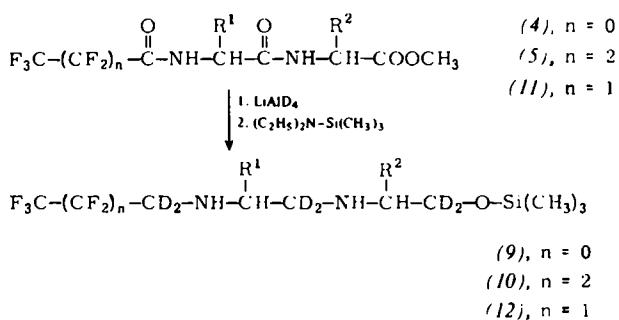
Abb. 4. Massenspektrum des von Thr-Ala-Ala-Ala-Lys abgeleiteten Dideuteroäthyl-polyaminoalkohol-O-trimethylsilyl-Derivats (8b) [35].

ten wir daher in einem zusätzlichen Experiment durch direktes Verdampfen der Probe in der Ionenquelle des Massenspektrometers identifizieren. Auch ließen sich Gln- und Asn-Peptide nur mit sehr geringer Ausbeute in die entsprechenden Derivate umwandeln. Ein weiterer Nachteil ist der Zeitbedarf der Derivatisierung. Dies gilt besonders für die Isolierung der Polyaminoalkohole (7) aus dem Reduktionsgemisch, die eine Abtrennung der Aluminiumsalze auf einer Anionenaustauscher-Säule erforderte^[36].

3.2.3. Perfluoralkyl-polyaminoalkohol-*O*-trimethylsilyl-Derivate von Peptiden

Wir haben Wege zu neuen Peptid-Derivaten mit besseren Eigenschaften gesucht. Diese Derivate sollten noch flüchtiger sein als die Derivate (8), um größere Peptide identifizieren zu können, und außerdem den Nachweis aller Aminosäuren – einschließlich Arg, Gln, Asn und His – mit der GC-MS-Methode gestatten. Auch sollten alle Derivatisierungsreaktionen möglichst einfach durchführbar sein, und die Produkte sollten sich, falls überhaupt nötig, durch Extraktion isolieren lassen.

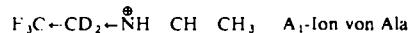
Da nun die Flüchtigkeit von *N*-Acyl-peptid-methylestern mit steigendem Fluorgehalt der Acylgruppe zunimmt (siehe Tabelle 1), lag der Gedanke nahe, die Flüchtigkeit der reduzierten Derivate (8), die selbst schon vor den entsprechenden Perfluoracyl-peptid-methylestern eluiert werden, durch den Einbau von Fluoratomen zu erhöhen. Statt der *N*-Acetyl-peptid-methylester (6) wurden daher deren *N*-TFA-(4), *N*-PFP-(11) und *N*-HFB-Analoga (5) mit LiAlD₄ reduziert. Die Produkte ließen sich sehr einfach und in guter Ausbeute aus dem Reaktionsgemisch extrahieren und zu (9), (12) bzw. (10) O-trimethylsilylieren (experimentelle Methoden siehe [37]).



In Tabelle 1 sind die Retentionsindizes einiger Dipeptid-Derivate vom Typ (9) und (10) aufgeführt. Diese reduzierten Derivate sind erheblich flüchtiger als die nicht-reduzierten Derivate (4) bzw. (5) (der Unterschied der Retentionsindizes beträgt 300 bis 400 Einheiten). Die Flüchtigkeit der Polyaminoalkohol-Derivate sowie der *N*-Acyl-peptid-methylester nimmt mit steigendem Fluorgehalt zu^[37]; die Derivate (10) sind die flüchtigsten heute bekannten Peptid-Derivate.

Mit der Flüchtigkeit erweitert sich nun auch der Bereich der Peptide, deren Derivate man noch durch GC-MS identifizieren kann. Die obere Grenze ist jedoch sowohl von der Anzahl der Aminosäuren (Länge des Peptids) als auch von deren Polarität abhängig; z. B. wird das Derivat von Hexaalanin um vieles früher (Retentionsindex 2640) als dasjenige des stark polaren Tetrapeptids Ala-CMCys-Trp-Asp (Retentionsindex 4210) eluiert (CM = Carboxymethyl). Die Retentionsindizes können für die Derivate aller Peptide vorausgesagt werden (siehe Abschnitt 3.3).

Die Massenspektren der neuen Derivate (9) und (10) zeigen sehr intensive und leicht erkennbare Sequenz-Ionen (Abb. 3b und 3c), die den Sequenz-Ionen der Derivate (8) analog sind. Vorteilhafterweise ist die Intensität der Sequenz-Ionen recht ausgeglichen, wie ein Vergleich der Massenspektren des unfluorierten Derivats (8a) (Abb. 3a) sowie der fluorierten Derivate (9a) und (10a) (Abb. 3b bzw. 3c) von Ala-Phe zeigt. Das Massenspektrum in Abbildung 3a wird vom A₁-Ion der N-terminalen Aminosäure beherrscht, während alle anderen Sequenz-Ionen viel weniger intensiv auftreten. Im Massenspektrum in Abbildung 3b ist das A₁-Ion wohl noch gut zu erkennen, ist jedoch bedeutend weniger intensiv, da die elektronenanziehenden Fluoratome die Basizität des Stickstoffs und damit die Stabilität des Immonium-Ions herabsetzen:



Demzufolge ist die Intensität aller anderen Sequenz-Ionen, die in Abbildung 3a mit geringer Intensität auftreten, stark erhöht. Dasselbe gilt für das Massenspektrum in Abbildung 3c mit dem einzigen Unterschied, daß die Ionen, die die N-terminale Aminosäure (und damit die Perfluorgruppe) enthalten, um 100 höhere Massenwerte haben. Die A-Ionen werden demnach in einen höheren Massenbereich verschoben, der von Ionen des Untergrunds oder von Silyl-Ionen weniger beeinflußt wird, und sind somit leicht erkennbar.

Ein Vergleich der Massenspektren der reduzierten Peptid-Derivate (8a), (9a) und (10a) (Abb. 3) mit denen der nicht-reduzierten Verbindungen (4a) und (5a) (Abb. 2) zeigt deutlich, wie sehr durch die Abwesenheit der Carbonylgruppen die Intensität der Sequenz-Ionen erhöht wird; die Massenspektren werden einfacher und lassen sich leichter interpretieren. Der Anteil der Sequenz-Ionen an der Gesamtionen-Ausbeute in den Massenspektren der Derivate vom Typ (9), (10) und (12) liegt gewöhnlich zwischen 30 und 60%^[38]. Das Massenspektrum des Tripeptids *N*-TFA-Val-Ile-Ala-OMe enthält dagegen nur etwa 9% Sequenz-Ionen^[39].

Der wichtigste Vorteil der neuen Derivate besteht jedoch darin, daß *alle* Aminosäuren nun der GC-MS-Methode zugänglich sind. Zwar lassen sich Arg-haltige Peptide nur mit geringer Ausbeute derivatisieren, doch haben wir auch diese Peptide im Hydrolysegemisch von natürlich vorkommenden Polypeptiden identifizieren können (Abschnitt 4.1 und 4.2). Die Arg-haltigen Peptide können auch vor der Derivatisierung in guter Ausbeute durch Hydrazinolyse modifiziert werden, wobei die stark polaren Guanidinogruppen in Aminogruppen überführt werden. Cys-haltige Peptide werden vor der Derivatisierung S-carboxymethyliert oder S-aminooäthyliert. Diese Derivate sind den S-Benzyl-Derivaten^[40] wegen ihrer höheren Flüchtigkeit vorzuziehen. Schließlich können auch His-haltige Peptide mit hohen Ausbeuten derivatisiert und durch GC-MS identifiziert werden (siehe Abschnitt 4.2).

Da sich die Massen der Seitenketten von Leu und Ile nicht unterscheiden, haben auch die Sequenz-Ionen dieser beiden Aminosäuren dieselben Massenzahlen. Zur Unterscheidung von Leu und Ile können die relativen Intensitäten der Sequenz-Ionen der reduzierten Derivate (9) usw. wie auch der nicht-reduzierten Derivate (4) dienen^[29], was zur Identifizierung von kleinen Peptiden ausreicht. Bei komplexen Peptiden müssen die Derivate mit authentischen Peptid-Derivaten verglichen werden.

3.3. Methoden der Identifizierung durch GC-MS

Die Massenspektren geeigneter Peptid-Derivate reichen zur Identifizierung reiner Fraktionen eines GC-MS-Experiments aus (siehe Abschnitt 3.2). Da durch Partialhydrolyse von Polypeptiden jedoch äußerst komplexe Gemische entstehen – diese enthalten oft 50 und mehr Bruchstücke – können nicht alle Komponenten solcher Gemische auf einer einzigen gaschromatographischen Säule getrennt werden. Am Ende der Säule resultieren deshalb oft Fraktionen aus mehreren nicht aufgetrennten Peptid-Derivaten. Die *Massenspektren* solcher Fraktionen setzen sich aus den Fragment-Ionen mehrerer Derivate zusammen, was die Interpretation sehr erschwert. Besonders die Identifizierung von Spurenbestandteilen in Gegenwart von Hauptbestandteilen ist oft nicht möglich.

Die Spurenbestandteile lassen sich durch *Massenchromatogramme*^[11] der Sequenz-Ionen identifizieren. Die Massenchromatogramme werden durch Auftragung der Intensitäten einzelner Ionen gegen die Zeit (oder die laufenden Nummern kontinuierlich aufgenommener Massenspektren) erhalten. Die Maxima in Massenchromatogrammen von Sequenz-Ionen zeigen so Peptide mit einer bestimmten Aminosäure in einer bestimmten Position in der Sequenz an; z. B. geben die Maxima im Massenchromatogramm des A₁-Ions von Thr diejenigen Peptide an, die Thr am N-Terminus enthalten.

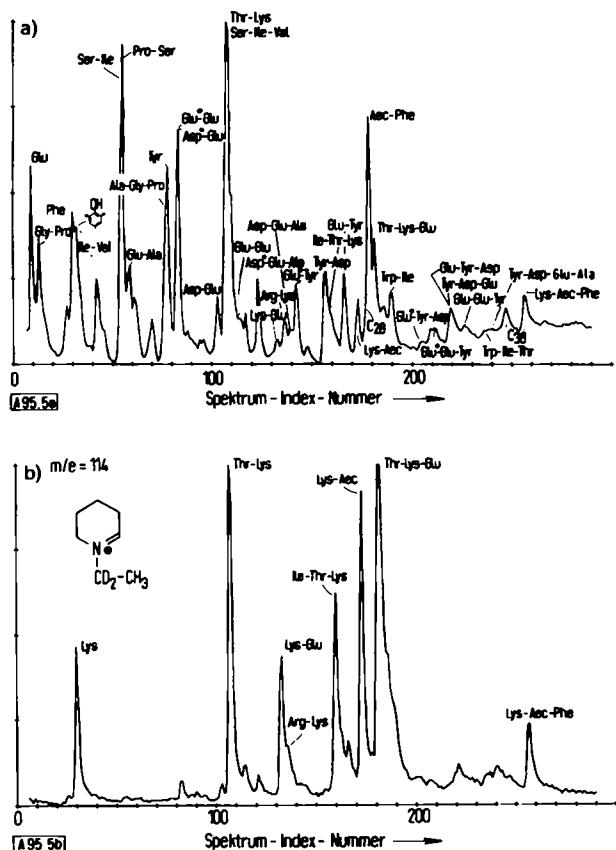


Abb. 5. a) Totalionen-Chromatogramm eines Gemisches von Dideuterioäthyl-polyaminoalkohol-O-trimethylsilyl-Derivaten vom Typ (8), hergestellt durch saure Partialhydrolyse des Eikosapeptids aus dem C-terminalen Teil von Actin [44]; *: nach Eliminierung von Trimethylsilanol identifiziert; b) Massenchromatogramm des Ions m/e = 114. Aec = Aminoäthylcystein.

In Abbildung 5a haben wir das Totalionen-Chromatogramm eines derivatisierten Polypeptid-Hydrolysats und in Abbildung 5b das Massenchromatogramm des Ions m/e = 114

aufgetragen. Dieses Fragment-Ion ist in den Massenspektren aller Lys-haltigen Peptid-Derivate sehr intensiv. Die Maxima in diesem Massenchromatogramm zeigen die Lys-Peptide an, die so trotz der Komplexität des Gemisches relativ einfach aus dem Gewirr der sich überlappenden Fraktionen herausgeschält werden können.

Aufgrund der kettenförmigen Struktur der Peptide und Peptid-Derivate lassen sich mit einiger Erfahrung nicht nur ihre Massenspektren voraussagen, sondern auch ihre gaschromatographischen Eigenschaften^[35, 41]. Als gaschromatographische Kenngrößen haben wir die *Retentionsindices*^[42] gewählt, die die Lage der Peaks im Gaschromatogramm in Relation zu den mit der Probe aufgegebenen n-Alkanen angeben. Diese Kenngrößen sind somit von den Bedingungen des Experiments weitgehend unabhängig und daher besonders charakteristisch.

Die Retentionsindices (I) aller Polyaminoalkohol-Derivate lassen sich durch einfaches Addieren von Beiträgen (Δ) der einzelnen Aminosäuren berechnen^[35]. Der Beitrag der N- und C-terminalen Gruppen Δ_0 , der mit steigendem Fluorgehalt (und damit zunehmender Flüchtigkeit der Polyaminoalkohol-Derivate) abnimmt, ist noch zu berücksichtigen:

$$I = \sum_1^n \Delta_i + \Delta_0$$

Als Beispiel für die Gültigkeit dieses Ausdrucks seien die Retentionsindices zweier Derivate von Typ (8) berechnet (Δ_0 beträgt 735):

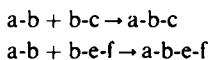
$$I(\text{Tyr-Asp}) = 1240 (\Delta \text{Tyr}) + 640 (\Delta \text{Asp}) + 735 = 2615 \\ I(\text{Ile-Thr-Lys}) = 460 (\Delta \text{Ile}) + 535 (\Delta \text{Thr}) + 910 (\Delta \text{Lys}) + 735 = 2640$$

Diese berechneten Werte stimmen mit den gemessenen Werten (2620 bzw. 2635) gut überein, was die Identifizierung der beiden Peptid-Derivate durch Massenspektren und Massenchromatogramme bestätigt. Zur Berechnung von Retentionsindices der fluorierten Polyaminoalkohol-Derivate von sehr kleinen und sehr großen Peptid-Derivaten war noch ein Korrekturfaktor nötig, der von der Größe der Derivate abhängt^[38]. Diese so berechneten Werte stimmten mit den gemessenen in dem weiten Bereich zwischen 1400 und 4200 gut überein.

3.4. Ermittlung der Polypeptid-Sequenz aus den Oligopeptiden

Der letzte Schritt der GC-MS-Methode zur Sequenzanalyse ist die Ermittlung der Sequenz des Polypeptids aus den hydrolytisch gebildeten und durch GC-MS identifizierten Oligopeptiden. Dabei geht man von den Oligopeptiden aus, die die N-terminale Aminosäure enthalten (a-b und a-b-c in Abb. 1). An diese werden weitere Oligopeptide angefügt; so lässt sich in dem in Abb. 1 dargestellten Schema die Sequenz a-b-c nun mit c-d zu a-b-c-d verlängern. An dieses Oligopeptid wird d-b-e-f angehängt, was die Sequenz a-b-c-d-b-e-f ergibt. Dieser Vorgang wird fortgesetzt, bis die gesamte Struktur des Polypeptids erstellt ist. Das Ergebnis kann durch Vergleich von Art und Zahl der Aminosäuren in dieser Sequenz mit dem Ergebnis der Aminosäure-Analyse des Peptids geprüft werden.

Oft lässt sich aber nicht nur ein einziges Oligopeptid, sondern es lassen sich mehrere an eine Partialsequenz anfügen. So können z. B. an das N-terminale Oligopeptid a-b (Abb. 1) sowohl b-c als auch b-e-f angeschlossen werden:



Es ergeben sich zwei Partialsequenzen, die weiter verfolgt werden müssen; auch kann sich jede dieser Sequenzen weiter verzweigen, was den Vorgang bei größeren Polypeptiden erheblich kompliziert. Daher haben wir ein Computer-Programm entwickelt, das diesen stufenweisen Aufbau automatisch durchführt^[14]. Ein eindeutiges Ergebnis ist jedoch nur zu erwarten, wenn neben den Dipeptiden auch ein erheblicher Anteil der möglichen Tripeptide und sogar Tetrapeptide vorliegt. Zumeist befinden sich aber unter den Oligopeptiden eines Hydrolysegemisches (z. B. eines Säurehydrolysats) nicht alle notwendigen Bruchstücke. Nicht eine, sondern mehrere isomere Sequenzen sind dann das Ergebnis. Daher wird ein zweites Experiment notwendig, in dem Enzyme zur Hydrolyse verwendet werden. Die Resultate der beiden Experimente erlauben gewöhnlich eine eindeutige Aussage.

4. Beispiele der Sequenzanalyse von Polypeptiden mit der GC-MS-Methode

Die Anwendung der nicht-reduzierten Derivate (4), (5) und (11) ist schon eingehend dargestellt worden^[29, 30, 40, 41, 43]. Im folgenden wird der Entwicklungsstand der GC-MS-Methoden an zwei Beispielen der Sequenzanalyse von recht komplexen Polypeptiden erläutert werden, wobei reduzierte Derivate vom Typ (8), (9), (10) und (12) verwendet wurden.

4.1. Das C-terminale Eikosapeptid von Actin

Dieses Peptid – das erste durch eine GC-MS-Sequenzanalyse aufgeklärte Fragment eines Proteins – wurde durch Cyanbromid-Spaltung von Actin gewonnen und enthält 20 Aminosäuren. Es besteht überwiegend aus trifunktionellen Aminosäuren, darunter auch Arg, His und Trp, welche die GC-MS-Analyse erschweren. Die Sequenzanalyse dieses Peptids war ein realistischer Test für die neuen GC-MS-Methoden; vor allem wollten wir die Vorteile der direkten GC-MS-Kombination – mit

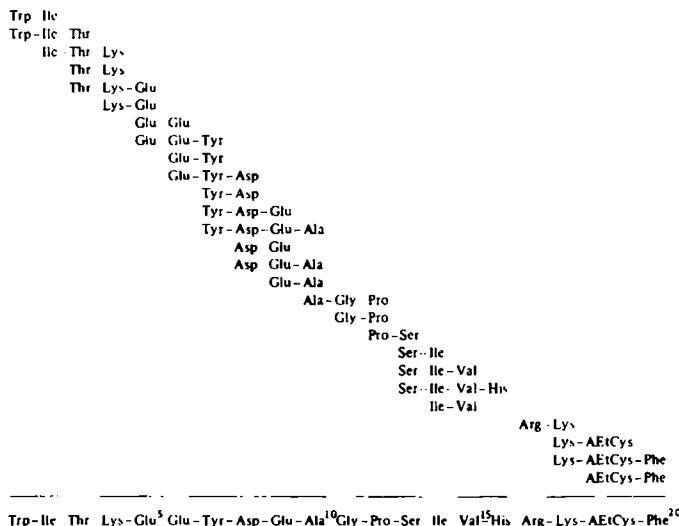


Abb. 6. Stufenweiser Aufbau der Sequenz des Eikosapeptids von Actin durch Überlappung der Oligopeptide, die durch GC-MS-Analyse eines derivatisierten sauren Partialhydrolysat (Abb. 5a) identifiziert worden waren [44]. AEt = Aminoäthyl

Unterstützung einer Rechenanlage – sowie die der damals gerade entwickelten Peptid-Derivate (8) ausnützen.

In einem partiellen Säurehydrolysat dieses Eikosapeptids konnten wir 27 Peptide identifizieren (Abb. 5a); aus diesen ließen sich durch ein Computer-Programm zwei Partialsequenzen aufbauen, die bereits alle 20 Aminosäuren enthielten (Abb. 6). Jetzt mußten die Partialsequenzen richtig verknüpft werden. Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure (Trp) mit konventionellen Methoden war die einfachste Lösung dieses Problems. Es verblieb noch, die Position des einzigen Gln-Restes festzulegen, der offenbar unter den Bedingungen der Säurehydrolyse quantitativ in Glu umgewandelt worden war. Auch diese Aufgabe haben wir konventionell gelöst – Gln nimmt Position 5 ein – und damit die Sequenzanalyse des Eikosapeptids abgeschlossen^[44].

Die GC-MS-Analyse eines einzigen Hydrolyse-Gemisches des Eikosapeptids, zwei einfache Tests zur Festlegung der N-terminalen Aminosäure sowie der Position des Gln-Restes reichten also zur Bestimmung der gesamten Struktur des Polypeptids aus.

4.2. Der Carboxypeptidase-Inhibitor aus Kartoffeln

Dieses Polypeptid ist mit 39 Aminosäuren – darunter auch allen „schwierigen“ Aminosäuren – das weitaus größte Polypeptid, das bisher mit der GC-MS-Methode untersucht wurde. Wir konnten dabei die Vorteile der jüngst entwickelten Derivate (9), (10) und (12) abwägen. Da dieses Peptid auch mit dem automatischen Edman-Verfahren untersucht wurde, bietet sich die Gelegenheit eines Vergleichs der beiden Methoden.

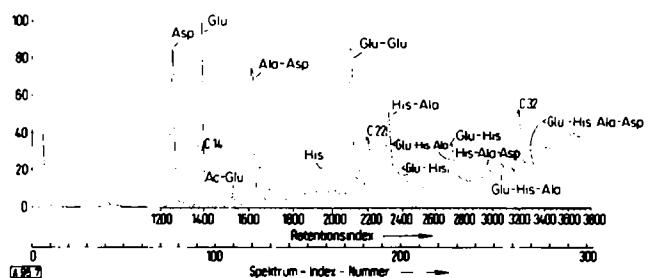


Abb. 7. Totalionen-Chromatogramm von Trifluorideuterioäthyl-polyaminoalkohol-*O*-trimethylsilyl-Derivaten vom Typ (9) aus dem sauren Partialhydrolysat des N-terminalen Teils des Carboxypeptidase-Inhibitors aus Kartoffel (CP1) [32].

Zu Beginn unserer Untersuchungen war bekannt, daß dieser Inhibitor (CPI) offenbar aus einem Gemisch zweier Polypeptidketten besteht, die beide einen blockierten N-Terminus aufweisen und sich in den N-terminalen Regionen unterscheiden. Wir analysierten zunächst das Gemisch von zwei Peptiden, die durch spezifische Spaltung einer Asp-Pro-Bindung vom N-terminalen Teil des Moleküls gewonnen wurden⁽³²⁾. Eine GC-MS-Analyse des derivatisierten Säurehydrolysats dieser beiden Peptide (Abb. 7) ergab eine Anzahl von Oligopeptiden, darunter auch solche, die <Glu (5-Oxo-2-pyrrolidincarbonäure) enthielten. Diese waren somit als blockierende Gruppen identifiziert worden. Die in Abbildung 7 angegebenen Peptide ergaben durch Überlappung die Sequenz <Glu-Glx-His-Ala-Asx für eines der beiden Peptide. Wie konventionelle Analysen zeigten, ist Position 2 von Gln besetzt, das unter den Bedingungen der Säurehydrolyse offenbar in Glu übergeht. Das andere Peptid konnte durch ein weiteres Experiment als <Glu-His-

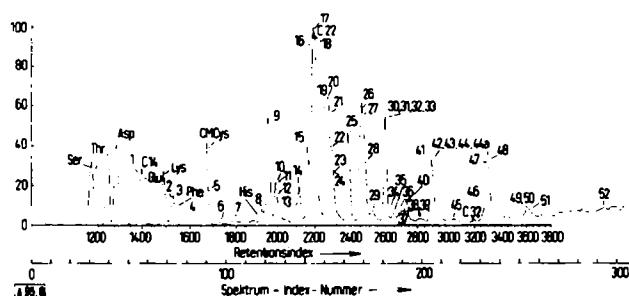


Abb. 8. Totalionen-Chromatogramm von Trifluorideuterioäthyl-polyaminoalkohol-O-trimethylsilyl-Derivaten (9) aus dem sauren Partialhydrolysat des S-carboxymethylierten Carboxypeptidase-Inhibitors [38]. Die identifizierten Peptide sind mit den entsprechenden Nummern in Abb. 9 aufgeführt. 18, 34 = Nebenprodukte der Derivatisierung von Ser-Ala-Arg bzw. Pro-Ile-Cys [38].

Ala-Asx identifiziert werden. Dazu wurde das Peptidgemisch sehr kurze Zeit mit Säure hydrolysiert; die entstandenen Peptide wurden als *N*-HFB-Peptid-methylester (5) durch GC-MS identifiziert.

Als nächstes untersuchten wir, ob die gesamte Struktur des Inhibitors, der aus einer Kette mit 39 Aminosäuren besteht, mit der GC-MS-Methode ermittelt werden kann. Wir hydrolysierten eine Probe dieses Polypeptids mit 6 N HCl und setzten das entstandene Peptidgemisch zu den Derivaten (9) um. Dabei entstand eine Vielzahl von Komponenten, die wir durch GC-MS identifizierten (diese Peptide sind in Abb. 8 durch Nummern gekennzeichnet und in Abb. 9 aufgeführt). Doch waren nicht alle Peptidbindungen in den identifizierten Peptiden vertreten, und zwar war je eine der sehr säurelabilen Peptidbindungen zu den Aminogruppen von Ser und Thr quantitativ gespalten worden. Deshalb hydrolysierten wir einen zweiten Teil der Polypeptid-Probe mit Enzymen, von denen wir erwarteten, daß sie wohl das Polypeptid stark abbauen, doch die wichtigen Peptidbindungen von Ser und Thr nicht vollständig spalten würden. Tatsächlich fanden wir im derivatisierten Gemisch Peptide mit diesen Bindungen.

Alle identifizierten Peptid-Fragmente wurden dann durch ein Computer-Programm zur Struktur des Polypeptids zusammengesetzt. Wie Abb. 10 zeigt, wurden zwei mögliche Sequenzen erstellt; diese unterscheiden sich nur in der Position des unterstrichenen Asp-Restes. Wir haben deshalb in den GC-MS-Daten der beiden Experimente nach einem Peptid gesucht, mit dessen Identifizierung eine der beiden Sequenzen ausgeschlossen werden könnte. Tatsächlich entdeckten wir ein Derivat des Asp-Asp-Cys, das offensichtlich durch Abspaltung von Trimethylsilanol von dem zu erwartenden Derivat gebildet wurde und so der Identifizierung entgangen war. Damit war die Sequenz A gesichert (Abb. 10).

Die neuen Peptid-Derivate (9) haben sich als entscheidend bei der Sequenzanalyse dieses Polypeptids herausgestellt, da nicht nur Trp- und Arg-Peptide, sondern auch His-Peptide der GC-MS-Analyse zugänglich geworden sind (Abb. 7 und 8). Diese His-Peptide hatten bei der Sequenzanalyse des Eikosapeptids von Actin noch in einem zusätzlichen Experiment

Glx-Glx-His-Ala-Asx-Pro-Ile-Cys-Asx-Lys¹⁰ Pro-Cys-Lys-...

14. Glu-Glu
 37. Glu-His
 45. Glu-His-Ala
 23. His-Ala
 43. His-Ala-Asp
 4. Ala-Asp
 Ala-Asp-Pro
 Ala-Asp-Pro-Ile
 5. S-Pro-Ile
 38. Pro-Ile-Cys
 15. Ile-Cys
 40. Ile-Cys-Asp
 22. Cys-Asp
 Cys-Asp-Lys
 13. Asp-Lys
 Asp-Lys-Pro
 9. Lys-Asp
 41. Lys-Pro-Cys
 19. Pro-Cys
 44a. Pro-Cys-Lys
 26. Cys-Lys
 10. Lys-Thr

...-Thr-His-Asx-Asx-Cys-Ser-Gly²⁰-Ala-Trp-Phe-Cys-Glx-Ala-Cys-...

10. Lys-Thr
 28. Thr-His
 30. His-Asp
 8. Asp-Asp
 Asp-Asp-Cys
 24. Asp-Cys
 17. Cys-Ser
 3. Ser-Gly
 Ser-Gly-Ala
 Gly-Ala
 42. Gly-Ala-Trp
 31. Ala-Trp
 50. Ala-Trp-Phe
 47. Trp-Phe
 32. Phe-Cys
 46. Phe-Cys-Glu
 51. Phe-Cys-Glu-Ala
 25. Cys-Glu
 36. Cys-Glu-Ala
 6. Glu-Ala
 39. Glu-Ala-Cys
 11. Ala-Cys
 49. Ala-Cys-Trp
 52. Ala-Cys-Trp-Asp
 48. Cys-Trp

...-Trp-Asx-Ser³⁰-Ala-Arg-Thr-Cys-Gly-Pro-Tyr-Val-Gly³⁹

49. Ala-Cys-Trp
 52. Ala-Cys-Trp-Asp
 48. Cys-Trp
 44. Trp-Asp
 Asp-Ser
 Asp-Ser-Ala
 2. Ser-Ala
 20. Ser-Ala-Arg
 7. Ala-Arg
 Arg-Thr
 16. Thr-Cys
 29. Thr-Cys-Gly
 12. Cys-Gly
 27. Cys-Gly-Pro
 35. Gly-Pro-Tyr
 21. Tyr-Val
 33. Tyr-Val-Gly
 1. Val-Gly

A 95.9

Abb. 9. Stufenweiser Aufbau der Sequenz des Carboxypeptidase-Inhibitors durch Überlappung der Oligopeptide, die im sauren Partialhydrolysat (Abb. 8, numerierte Oligopeptide) sowie in einem enzymatischen Hydrolysat (nichtnumerierte Oligopeptide) identifiziert wurden [38].

A Glu Glu-His-Ala-Asp Pro-Ile-Cys-Asp Lys-Pro-Cys-Lys-Thr-His-Asp-Asp-Cys-Ser-Gly-Ala Trp-Phe-Cys-Glu-Ala Cys-Trp Asp-Ser-Ala-Arg Thr-Cys-Gly-Pro-Tyr-Val-Gly

B: Glu Glu-His-Ala-Asp Pro-Ile-Cys-Asp Lys-Pro-Cys-Lys Thr-His-Asp-Cys Ser-Gly-Ala-Trp Phe-Cys-Glu-Ala Cys-Trp Asp-Ser-Ala-Arg Thr-Cys-Gly-Pro-Tyr-Val-Gly

Abb. 10. Ergebnis eines Computer-Programms [14] zum Aufbau von Polypeptid-Sequenzen durch Überlappung von Oligopeptiden. Als Eingabe dienten die Oligopeptide von Abb. 9 (ohne Asp-Asp-Cys).

identifiziert werden müssen. Welche Glu- und Asp-Reste als Gln bzw. Asn vorliegen, konnte auch bei CPI nicht mit der GC-MS-Methode bestimmt werden. Die Ursachen dieser Schwierigkeiten sind noch nicht bekannt. Obwohl die Gln- und Asn-haltigen Testpeptide mit der GC-MS-Methode nachgewiesen werden können, haben sich einige dieser Derivate nur in geringer Ausbeute herstellen lassen. Die eindeutige Zuordnung der Gln- und Asn-Reste bearbeiten wir derzeit intensiv[*].

Das Computer-Programm zum Überlappen der Oligopeptide hat sich sehr bewährt; das Ergebnis dieses Programms (zwei mögliche Sequenzen; Abb. 10) erforderte eine zusätzliche Interpretation der GC-MS-Befunde, die schließlich zur einzig möglichen Sequenz führte. Die Oligopeptide wurden durch GC-MS-Analysen von nur zwei Hydrolysegemischen des Inhibitors identifiziert.

Nun zur konventionellen Sequenzanalyse dieses Polypeptids^[32]. Obwohl dabei ein automatischer Sequenator eingesetzt wurde, stieß man auf erhebliche Schwierigkeiten. Der N-terminale Teil des Polypeptids konnte nicht identifiziert werden, da der N-Terminus blockiert ist (siehe Abschnitt 2.1). Doch auch die Sequenz des anderen Teils des Moleküls ließ sich nur mit erheblichem Arbeitsaufwand erstellen. Durch spezifische Spaltung wurde das Polypeptid in Bruchstücke zerlegt, die dann getrennt, isoliert und dem Edman-Abbau unterworfen wurden. Einige dieser kleineren Peptide wurden unter den Bedingungen des Abbaus zusammen mit den jeweils abgespaltenen Aminosäuren extrahiert und gingen verloren. Auch traten mehrmals „Löcher“ in der Sequenz auf, die z. B. auf der Zerstörung von Ser-Resten beruhten. Zur vollständigen Bestimmung der Sequenz war daher die mühsame Trennung, Isolierung und Strukturanalyse mehrerer Peptide notwendig.

5. Ausblick

Die Frage nach den optimalen Peptid-Derivaten, die ja die Grundvoraussetzung der Sequenzanalyse mit der GC-MS-Methode sind, ist immer wieder gestellt worden. Derzeit sind wohl die Derivate (9), (10) und (12) allen anderen vorzuziehen, da sie am flüchtigsten sind und auch leicht interpretierbare Massenspektren liefern. Nach unserer Meinung werden sich deshalb diese Derivate durchsetzen, obwohl ihre Darstellung etwas aufwendiger ist als die der nicht-reduzierten Derivate (4), (5) und (11).

Bei einem Vergleich mehrerer nicht-reduzierter Peptid-Derivate ergab sich, daß nicht einmal alle Dipeptide in Form

[*] Anmerkung bei der Korrektur (19. Dez. 1975): Zum einen wurden die Polypeptide vor der Partialhydrolyse mit Diboran behandelt (M. Z. Atassi u. A. F. Rosenthal, Biochem. J. 111, 593 (1969)) und dadurch die freien Carboxylgruppen von Asp, Glu und der C-terminalen Aminosäure zu $-\text{CH}_2-\text{OH}$ -Gruppen reduziert. Die primären Amidgruppen in den Seitenketten von Asn und Gln werden dabei nicht angegriffen, jedoch nach der Partialhydrolyse (die primären Amide liegen dann als Carboxylgruppen vor) mit LiAlD₄ zu $-\text{CD}_2-\text{OH}$ -Gruppen reduziert. Die Unterscheidung von Asp und Glu von Asn und Gln gelingt durch die Messung des Deuterium-Gehalts der entsprechenden Derivate. Zugleich wird auch die C-terminalen Aminosäure identifiziert.

Zum andern wurden neue Peptid-Derivate entwickelt, die durch Permethylierung von N-Acyl-oligopeptid-methylestern (4), (5), (6) und (11) mit anschließender LiAlD₄-Reduktion und O-Trimethylsilylierung hergestellt werden. Die primären Amidgruppen von Asn und Gln werden dabei in $-\text{CD}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -Gruppen umgewandelt, was zu vorteilhaften Eigenschaften der neuen Derivate führt.

der Derivate (4) und (11) sowie der permethylierten Derivate identifiziert werden können^[45]. Wir haben deshalb gerade jene Peptide untersucht, von denen sich keine flüchtigen nicht-reduzierten Derivate herstellen ließen (z. B. Trp-Trp), und fanden, daß diese Peptide ohne Schwierigkeiten in die reduzierten Derivate (9) umgewandelt werden konnten.

Nun zum Arbeitsaufwand. Die Darstellung der reduzierten Derivate ist langwieriger als diejenige der nicht-reduzierten Derivate, kann aber schon routinemäßig ausgeführt werden. Die Daten eines GC-MS-Experiments werden bereits automatisch durch die Rechenanlage registriert, müssen aber noch manuell ausgewertet werden. Da jedoch die Massenspektren sowie die gaschromatographischen Kennzahlen der Derivate (9), (10) und (12) vorausgesagt werden können und da alle diese Daten schon auf Magnetband gespeichert sind, sollten sich die Peptid-Derivate auch automatisch identifizieren lassen. Es wäre dann nur noch notwendig, die Probe des derivatisierten Polypeptid-Hydrolysats auf die Trennsäule des Gaschromatographen aufzugeben; die Registrierung der Daten, ihre Interpretation, die Überlappung der identifizierten Oligopeptide (mit Hilfe des bereits entwickelten Programms) und die Erstellung der Sequenz des Polypeptids könnten automatisch erfolgen.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Die heute bekannten Peptid-Derivate sowie die ausgearbeiteten GC-MS-Methoden erlauben die Bestimmung der Struktur von Polypeptiden, die bis zu 40 Aminosäuren enthalten (Abschnitt 4); in absehbarer Zeit wird man sicher noch größere Polypeptide analysieren können. Es fragt sich jedoch, ob die Struktur von Proteinen

besonders solchen mit mehr als 300 Aminosäuren – mit den beschriebenen GC-MS-Methoden ermittelt werden kann. Die entstehenden Gemische – diese könnten einige hundert Peptide enthalten – ließen sich wohl vollständig charakterisieren. Es ist jedoch kaum wahrscheinlich, daß durch Überlappung der identifizierten Oligopeptide nur eine einzige mögliche Sequenz resultiert.

Wie schon Eck^[46] in seiner theoretischen Abhandlung zeigte, sind zur Strukturbestimmung eines recht kleinen Proteins mit 157 Peptidbindungen mehr als 336 Peptide notwendig, darunter auch ein bedeutender Anteil der möglichen Tetra-, Penta- und Hexapeptide. Daher kommt der Entwicklung von Derivaten immer höheren Dampfdrucks zentrale Bedeutung zu.

Ein anderer Weg sollte hier jedoch weit einfacher zum Ziel führen. Dazu müßte das Protein durch spezifische Spaltung, z. B. mit Trypsin oder Cyanbromid, in einige wenige Polypeptide zerlegt werden (Abb. 1). Diese sollten dann voneinander getrennt und jeweils mit den besprochenen GC-MS-Methoden analysiert werden. Da sich die Sequenzen dieser Peptide jedoch nicht überlappen, muß eine Probe des Proteins durch eine zweite, selektive Spaltung zu einer Anzahl anderer Polypeptide hydrolysiert werden, die wiederum mit der GC-MS-Methode zu identifizieren sind. Mit Hilfe dieses zweiten Satzes der Polypeptide könnten dann die Polypeptide des ersten Satzes in der richtigen Reihenfolge zur Struktur des Proteins verknüpft werden. Diese verbindenden Peptide könnten auch eleganter durch direkte GC-MS-Analyse geeigneter Hydrolysegemische des gesamten Proteins identifiziert werden. Die Analyse könnte sich dabei auf die Suche nach Peptiden beschränken, deren Sequenzen schon im N-terminalen und im C-terminalen Teil der Polypeptide aus Satz 1 vorhanden waren. Diese direkte GC-MS-Analyse von Protein-Hydrolysaten

haben wir schon erfolgreich zur Identifizierung von modifizierten Aminosäuren in Enzymen angewendet^[47].

In den letzten Jahren ist auch vielfach versucht worden, Peptide direkt - also ohne vorherige Derivatisierung - massenspektrometrisch zu untersuchen. Besonders mit der chemischen^[48, 49] und der Photoionisation^[50] sind erste Erfolge erzielt worden; auch durch Felddesorption^[51] wurden schon Peptide - sogar Arg-haltige - analysiert. Bisher sind jedoch mit diesen Methoden nur reine Peptide untersucht worden. Erst wenn sich auch Peptidgemische analysieren lassen, wird man den Wert dieser Methoden erkennen. Vielleicht könnte die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit einer der genannten Methoden direkt kombiniert werden.

Mein besonderer Dank gilt meinem Lehrer und Förderer, Herrn Professor Klaus Biemann, M.I.T., Cambridge (USA). Ich möchte auch meinen ehemaligen Kollegen am M.I.T. - T. R. Smith, J. E. Biller, H.-J. Förster, J. A. Kelley und R. J. Anderegg - für Mitarbeit und viele anregende Diskussionen danken. Den Herren Doz. Dr. J.-H. Fuhrhop und Dr. E. Lustig danke ich für wertvolle Vorschläge bei der Abschlussfassung dieser Arbeit, die mit den Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie im Rahmen des Technologieprogramms gefördert wurde.

Eingegangen am 2. Juni 1975 [A 95]

- [1] F. Sanger, *Science* 129, 1340 (1959).
- [2] F. W. Putnam, G. Florent, C. Paul, T. Shinoda u. A. Shimizu, *Science* 182, 287 (1973).
- [3] P. Edman, *Acta Chem. Scand.* 4, 283 (1950).
- [4] P. Edman u. G. Begg, *Eur. J. Biochem.* 1, 80 (1967).
- [5] P. Edman in S. B. Neeleman: *Protein Sequence Determination*. Springer, Berlin 1970, S. 211ff.
- [6] M. O. Dayhoff: *Atlas of Protein Sequence and Structure*. Nat. Biomed. Res. Found., Silver Spring, Md., Vol. 5, 1972 und Suppl. I, 1973.
- [7] H. D. Niall, *Methods Enzymol.* 27, 942 (1973).
- [8] B. Wittmann-Liebold, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 354, 1415 (1973).
- [9] K. Titani, M. A. Hermodson, L. H. Ericsson, K. A. Walsh u. H. Neurath, *Nature New Biol.* 238, 35 (1972).
- [10] R. A. Hites u. K. Biemann, *Anal. Chem.* 40, 1217 (1968).
- [11] R. A. Hites u. K. Biemann, *Anal. Chem.* 42, 855 (1970).
- [12] H. Nau u. K. Biemann, *Anal. Chem.* 46, 426 (1974).
- [13] W. McFadden: *Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis*. Wiley, New York 1973.
- [14] H. Nau, J. A. Kelley, H.-J. Förster, J. E. Biller, T. R. Smith u. K. Biemann, 21st Annual Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco, Mai 1973, paper 0-7.
- [15] H. Nau, 3rd International Symposium on Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine, Alghero, Sardinien, Juni 1975; H. Nau in A. Frigerio: *Advances in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*. Spectrum Publ., New York 1975, im Druck.
- [16] P. X. Callahan, J. K. McDonald u. S. Ellis, *Fed. Proc.* 31, 1105 (1972).
- [17] R. J. Rowlands u. H. Lindley, *Biochem. J.* 126, 685 (1972).
- [18] H.-J. Förster, J. A. Kelley, H. Nau u. K. Biemann in J. Meienhofer: *Chemistry and Biology of Peptides*. Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1972, S. 679ff.; vgl. [13], dort S. 358ff.
- [18a] R. M. Caprioli u. W. E. Seifert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 295 (1975).
- [19] B. C. Das, S. D. Géro u. E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 211 (1967).
- [20] B. C. Das u. E. Lederer in A. Niederwieser u. G. Pataki: *New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis*. Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1971, S. 175ff.
- [21] K. Biemann in G. R. Waller: *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*. Wiley, New York 1972, S. 405ff.
- [22] M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov u. A. A. Kiryushkin in G. W. A. Milne: *Mass Spectrometry: Techniques and Applications*. Wiley, New York 1971, S. 289ff.
- [23] K. Okada, S. Nagai u. H. Kato, *Experientia* 30, 459 (1974).
- [24] H. R. Morris, D. H. Williams, G. G. Midwinter u. B. S. Hartley, *Biochem. J.* 141, 701 (1974).
- [25] F. Weygand, B. Kolb, A. Prox, M. A. Tilak u. I. Tomida, *Z. Anal. Chem.* 322, 38 (1960).
- [26] C.-O. Andersson, *Acta Chem. Scand.* 12, 1353 (1958).
- [27] E. Stenhammar, *Z. Anal. Chem.* 181, 462 (1961).
- [28] F. Weygand, A. Prox, H. H. Fessel u. K. K. Sun, *Z. Naturforsch.* 20b, 1169 (1965).
- [29] A. Prox u. F. Weygand in H. C. Beyermann, A. van de Linde u. M. van der Brink: *Peptides*. North Holland Publ. Co., Amsterdam 1967, S. 158ff.
- [30] R. M. Caprioli, W. E. Seifert u. D. E. Sutherland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 67 (1973).
- [31] B. A. Andersson, *Acta Chem. Scand.* 21, 2906 (1967).
- [32] G. M. Hass, H. Nau, K. Biemann, D. T. Grahn, L. H. Ericsson u. H. Neurath, *Biochemistry* 14, 1334 (1975).
- [33] K. Biemann, F. Gapp u. J. Seibl, *J. Am. Chem. Soc.* 81, 2274 (1959).
- [34] K. Biemann u. W. Vetter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2, 93 (1960).
- [35] H. Nau, J. A. Kelley, H.-J. Förster u. K. Biemann, *Biomed. Mass Spectrom.*, im Druck.
- [36] J. A. Kelley, Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, 1972.
- [37] H. Nau, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 1088 (1974).
- [38] H. Nau u. K. Biemann, 168. American Chemical Society National Meeting, 8.-13. Sept. 1974, Atlantic City, N. J., Abstracts ANAL 62.
- [39] A. Prox u. K. K. Sun, *Z. Naturforsch.* 21b, 1028 (1966).
- [40] E. Bayer u. W. König, *J. Chromatogr. Sci.* 7, 95 (1969).
- [41] B. Kolb in A. Niederwieser u. G. Pataki: *New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis*. Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor 1971, S. 129.
- [42] E. Kováts, *Helv. Chim. Acta* 41, 1915 (1958).
- [43] A. Prox, J. Schmid u. H. Ottenheyen, *Liebigs Ann. Chem.* 722, 179 (1969).
- [44] H. Nau, J. A. Kelley u. K. Biemann, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7162 (1973).
- [45] H. Lindley u. P. C. Davis, *J. Chromatogr.* 100, 117 (1974).
- [46] R. V. Eck, *Nature* 193, 241 (1962).
- [47] H. Nau u. J. F. Riordan, 168. American Chemical Society National Meeting, Atlantic City, N. J., Sept. 1974, Abstracts BIOL 56: *Biochemistry* 14, 5285 (1975).
- [48] M. A. Baldwin u. F. W. McLafferty, *Org. Mass Spectrom.* 7, 1353 (1973).
- [49] R. J. Beuhler, E. Flanigan, L. J. Greene u. L. Friedman, *J. Am. Chem. Soc.* 96, 3990 (1974).
- [50] V. M. Orlov, Ya. M. Varshavskij u. A. I. Miroshinov, *Org. Mass Spectrom.* 9, 811 (1974).
- [51] H. U. Winkler u. H. D. Becke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 391 (1972).