

108. N-Terminale Sequenzanalyse von Peptiden mittels EDMAN-Abbaus:

Kombinierte Anwendung der direkten und der subtraktiven Methode¹⁾

von György Pataki

(30. III. 1967)

Zum Nachweis der N-terminalen Aminosäuren von Proteinen und Peptiden hat EDMAN's Phenylisothiocyanat-Technik [2], in Verbindung mit der Dünnschichtchromatographie, grosse Verbreitung gefunden [3] [4]. Bei der sogenannten *direkten* EDMAN-Methode bestimmt man die abgespaltenen Aminosäuren als Phenylthiohydantoine (PTH-Aminosäuren) mit Hilfe verschiedener chromatographischer Verfahren [3] [5]. Gegebenenfalls können die PTH-Aminosäuren hydrolytisch gespalten und als freie Aminosäuren analysiert werden [6]. Bei der *subtraktiven* Technik wird die Aminosäurezusammensetzung *vor* und *nach* Abbau bestimmt [7]. Schliesslich sei die automatische Methode nach EDMAN [8], welche Abbau und Identifizierung von etwa 15 Aminosäureresten in 24 Stunden ermöglicht, erwähnt. Manche Autoren kombinieren die *direkte* und die *subtraktive* Technik [9]. Auch die Dimethylaminonaphthalinsulfonyl-(Dansyl)-Methode von HARTLEY [10] kann in Verbindung mit der EDMAN-Reaktion zum Nachweis der N-terminalen Aminosäure verwendet werden [10] [11] [12]. Unserer Meinung nach bietet die *gleichzeitige* Bestimmung der abgespaltenen Aminosäuren als ihre PTH- und Dansyl-Derivate einerseits, und die quantitative Analyse der Aminosäuren im Ausgangs- und Restpeptid andererseits, die höchstmögliche Sicherheit bei der Sequenzanalyse. Wir haben deshalb mehrere Peptide nach dem von SJÖQUIST [13] modifizierten Verfahren abgebaut und die N-terminalen Aminosäuren als PTH- und Dansyl-Derivate nachgewiesen. Zusätzlich benutzten wir verschiedene dünnschichtchromatographische Methoden zur quantitativen Aminosäureanalyse. In der vorliegenden Arbeit soll die Sequenzanalyse eines *Nonapeptids*, Ala-Tyr-Ile-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Ala-Pro-Leu-Gly-NH₂, beschrieben werden.

Die nach den einzelnen Abbauschritten entstandenen PTH-Aminosäuren zeigt die Figur. Man erkennt, dass die im *ersten*, *zweiten* und *dritten* Abbauschritt abgespaltenen Aminosäuren eindeutig identifiziert werden können. Die *subtraktive* Methode sowie die Dansyl-Technik bestätigen diese Resultate²⁾ (Tabelle). Nach dem *vierten* und *fünften* Abbauschritt konnten einerseits PTH-Glutamin und PTH-Glutaminsäure, andererseits PTH-Asparagin und PTH-Asparaginsäure nachgewiesen werden (vgl. Figur), d. h. Asparagin und Glutamin werden, wie wir schon früher beobachtet haben [15], teilweise hydrolysiert. Es ist besonders bemerkenswert, dass vom fünften Abbauschritt an die Erkennung der N-terminalen Aminosäure durch das Auftreten von

¹⁾ 7. Mitteilung über «Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie zur Sequenzanalyse von Peptiden». 6. Mitteilung vgl. [1].

²⁾ Der niedrige Wert für Tyrosin ist wohl einer partiellen Zersetzung während der HCl Hydrolyse (vgl. [14]) zuzuschreiben.

Aminosäureanalyse des Nonapeptids Ala-Tyr-Ile-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Ala-Pro-Leu-Gly-NH₂ vor und nach jedem Abbauschritt (Angaben in Mol)

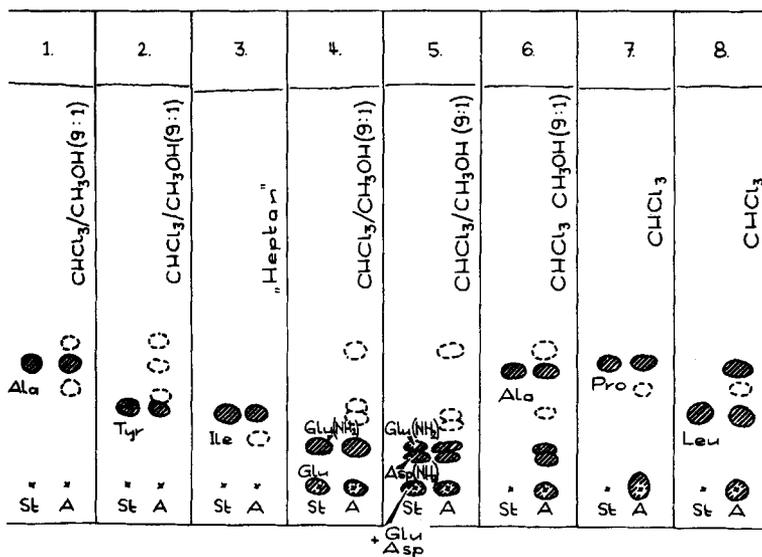
Aminosäure	Ausgangs-peptid ^{a)}	Abbauschritt							
		1 ^{a)}	2 ^{a)}	3 ^{a)}	4 ^{b)}	5 ^{b)}	6 ^{c)}	7 ^{c)}	8 ^{c)}
Alanin	1,8	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,1	0	0
Asparaginsäure	1,2	1,4	1,2	1,2	1,2	0,4	0,1	0	0
Glutaminsäure	0,9	0,9	0,9	0,9	0,2	0,1	Spuren	0	0
Glycin	0,7	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,7
Leucin + Isoleucin ^{d)}	1,6	1,4	1,4	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,1
Prolin	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,2	1,2	0,4	0,2
Tyrosin	0,5	0,6	0,1	0	0	0	0	0	0

a) Die qualitative Analyse mittels Dansylchlorids bestätigt das Abbauresultat (Rf-Werte der Dansyl-Derivate in drei Fließmitteln).

b) Dansyl-Glutaminsäure (4. Schritt) und Dansyl-Asparaginsäure + Dansyl-Glutaminsäure (5. Schritt) konnten mittels Dansylchlorids nachgewiesen werden (Rf-Werte der Dansyl-Derivate in 2 Fließmitteln).

c) Die erwartete N-endständige Aminosäure konnte als Dansyl-Derivat nachgewiesen werden (Rf-Werte in 2 Fließmitteln). Nach jedem Abbauschritt waren ferner zusätzliche Flecke erkennbar, welche den N-terminalen Aminosäuren von Peptiden aus den vorangehenden Abbauschritten entsprachen. In jedem Falle konnte die «richtige» N-endständige Aminosäure ermittelt werden, da die Intensität des zugehörigen Flecks am stärksten war.

d) Eine Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin erfolgte nach der Dinitrophenyl-Technik (vgl. [3]).



Trennung der nach EDMAN-Abbau entstandenen PTH-Aminosäuren auf Kieselgel-G.
Versuchsbedingungen nach [3]; die starken Flecke sind schraffiert

A = Analyse St = Standardsubstanz

Nebenflecken zwar erschwert, jedoch nicht verhindert wird. Eine eindeutige Zuordnung lässt sich in jedem Fall treffen, und zwar besonders dann, wenn die Ergebnisse der *direkten* Identifizierung als PTH- und als Dansyl-Derivat neben denjenigen der *subtraktiven* Methode (vgl. Tabelle) betrachtet werden. Es ist indessen zu bemerken, dass zur Unterscheidung der Leucine die Anwendung der Dinitrophenyl-Methode (nach [3]) notwendig war. Die zur Analyse erforderliche Substanzmenge beträgt etwa 10^{-2} bis 5×10^{-3} μ Mol pro Abbauschritt. Inwieweit die beschriebene Arbeitsweise bei höheren Peptiden anwendbar ist, und inwiefern die Kombination mit den neuerdings veröffentlichten «solid-phase» Verfahren [16] möglich ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen. In diesem Zusammenhang sei auch auf die neue, verbesserte Abbautechnik hingewiesen, mit welcher EDMAN [8] in Verbindung mit dem «Protein Sequenator» die Sequenzanalyse von 60 Aminosäureresten eines Proteins verwirklichen konnte³⁾.

Experimentelles. — *Abbau der Peptide.* Die Umsetzung des Nonapeptids und der Abbaupeptide mit Phenylisothiocyanat und die Isolierung der PTH-Aminosäuren erfolgten nach früheren Angaben [13] [17]. Aliquote Teile der Peptidlösung *vor* und *nach* Abbau wurden mit Dansylchlorid umgesetzt und die Dansyl-Derivate auf bekannte Weise [10] [11] gewonnen.

Nachweis der PTH-Aminosäuren. Zur Chromatographie dienten zinksilikathaltige Kieselgel-G-Schichten und die früher angewandten Fließmittel [3]. In der Regel fand die eindimensionale Technik Anwendung. Für weitere Angaben vgl. [3].

Nachweis der Dansyl-Aminosäuren. Die Dansyl-Derivate wurden auf Kieselgel-G-Schichten mit den Fließmitteln von SEILER & WIECHMANN [18], MORSE & HORECKER [11] und BUCHANAN *et al.* (vgl. [3]) chromatographiert. Für weitere Angaben vgl. [3].

Bestimmung der Aminosäuren. Aliquote Teile des Ausgangs- und Abbaupeptids wurden mit 6N HCl 16 Std. bei 110° hydrolysiert. Die Aminosäuren wurden bestimmt: a) durch Dünnschichtchromatographie, Ninhydrinfärbung und Photometrie nach Elution [3]; b) durch Dinitrophenylierung, Trennung der DNP-Derivate [3] und Photometrie nach Elution (vgl. [3]) oder Direktfluorometrie auf der Schicht [1]; c) durch Dansylierung, Trennung der Dansyl-Derivate [3] [11] [18] und Fluorometrie nach Elution [19] oder Direktfluorometrie auf der Schicht [1]. Eine ausführliche Mitteilung über die angewandten Verfahren wird in anderem Zusammenhang, an anderer Stelle erfolgen.

SUMMARY

A particularly reliable N-terminal sequence analysis of peptides can be achieved by the following combined application of EDMAN's phenylisothiocyanate technique, and thin-layer chromatography. The N-terminal amino acids split off are identified as phenylthiohydantoin- and dimethylaminonaphthalensulfonyl-derivatives; additionally, quantitative analysis of amino acids using thin-layer chromatography is carried out *before* and *after* each degradation step. The applicability of this combined procedure is demonstrated in the case of a nonapeptide.

Analytische Abteilung,
Chromatographisches Laboratorium,
ROBAPHARM AG, Basel

³⁾ Der Autor möchte Herrn Professor P. EDMAN für die freundliche Überlassung des Manuskriptes vor der Veröffentlichung bestens danken.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. PATAKI & ED. STRASKY, *Chimia* 20, 361 (1966).
 [2] P. EDMAN, *Acta chem. scand.* 4, 283 (1950).
 [3] G. PATAKI, «Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie», W. de Gruyter, Berlin 1966.
 [4] G. PATAKI, in M. LEDERER (Herausgeber), *Chromatographic Reviews* 9 (1967), im Druck.
 [5] J. L. BAILEY, «Techniques in Protein Chemistry», Elsevier, Amsterdam 1967.
 [6] H. O. VAN ORDEN & F. H. CARPENTER, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 14, 399 (1964).
 [7] C. H. W. HIRS, W. MOORE & W. H. STEIN, *J. biol. Chemistry* 235, 633 (1960); W. KONIGSBERG & R. J. HILL, *ibid.* 237, 2547 (1962).
 [8] P. EDMAN, *Thromb. Diath. Haemorrhag. (Stuttgart) Suppl.* 13, 17 (1963); P. EDMAN & G. BEGG, *Europ. J. Biochemistry*, im Druck.
 [9] C. NOLAN & E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* 237, 446 (1962); O. P. BAHLE & E. L. SMITH, *ibid.* 240, 3585 (1965); E. MARGOLIASH, *ibid.* 237, 2161 (1962); R. SARGES & B. WITKOP, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 1862 (1964), 87, 2011 (1965); B. KASSEL & M. LASKOWSKI, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 20, 463 (1965); D. T. GISH, *J. Amer. chem. Soc.* 83, 3303 (1961); TH. WIELAND & U. GEBERT, *Liebigs Ann. Chem.* 700, 157 (1966).
 [10] W. R. GRAY & B. S. HARTLEY, *Biochem. J.* 89, 59 P (1963); 89, 379 (1963).
 [11] D. MORSE & B. L. HORECKER, *Analyt. Biochemistry* 14, 429 (1966).
 [12] P. NEDKOV & N. GENOV, *Biochim. biophys. Acta* 127, 541 (1966); D. M. FAMBROUGH & J. BONNER, *Biochemistry* 5, 2563 (1966); O. MIKEŠ, H. G. MÜLLER, V. HOLEVŠOVSKÝ, V. TOMÁŠEK & F. ŠORM, *Coll. Czech. Chem. Comm.* 32, 620 (1967).
 [13] J. SJÖQUIST, *Arkiv Kemi* 14, 291 (1959).
 [14] C. H. W. HIRS, *J. biol. Chemistry* 235, 625 (1960); F. SANGER & E. O. P. THOMPSON, *Biochim. biophys. Acta* 71, 468 (1963).
 [15] G. PATAKI, *J. Chromatogr.* 21, 133 (1966).
 [16] R. A. LAURSEN, *J. Amer. chem. Soc.* 88, 5344 (1966); A. DIJKSTRA, H. A. BILLIET, A. H. VAN DONINCK, H. VAN VELTHUYZEN, L. MAAT & C. BEVERMANN, *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* 86, 65 (1967).
 [17] G. PATAKI, *Helv.* 47, 1763 (1964).
 [18] N. SEILER & H. WIECHMANN, *Experientia* 20, 559 (1964).
 [19] D. J. NEADLE & R. J. POLLIT, *Biochem. J.* 97, 607 (1965); N. SEILER & H. WIECHMANN, *Z. analyt. Chem.* 220, 109 (1966); G. SCHMER, *Z. physiol. Chem.* 348, 199 (1967).

109. Zur Struktur des γ -MnO₂

von R. Giovanoli, R. Maurer und W. Feitknecht

(23.III.67)

1. Einleitung. – γ -MnO₂ ist in zahlreichen, je nach Autor verschieden benannten Ausbildungsformen bekannt [1–4]. Die wichtigsten Unterschiede dürften solche des Ordnungsgrades und der Kristallitgrösse sein. Die Mehrzahl der Autoren betrachtet die Struktur des γ -MnO₂ als eine Abart des natürlich vorkommenden, im Diasporthyp kristallisierenden Ramsdellits. Elektrolytbraunstein gehört ebenso in die Gruppe der γ -MnO₂ [1] wie das nach dem Fundort Nsute (Ghana) bezeichnete Mineral *Nsutit* [3].

Im Rahmen von Versuchen zur Umkristallisation, Reduktion und Reoxydation von γ -MnO₂ erhielten wir verschiedene γ -MnO₂-Präparate, darunter ein verhältnismässig grobteiliges, nadeliges Produkt, welches sich zur näheren Untersuchung mittels RÖNTGEN-Strahlenbeugung, Elektronenmikroskopie und Elektronenbeugung eignete [5].