

Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Sequenzanalyse von Peptiden

4. Mitt. Untersuchungen über den Abbau von Peptiden mit Phenylisothiocyanat*

3-Phenyl-2-thiohydantoine (PTH-Aminosäuren) entstehen, wenn man Aminosäuren, Peptide oder Proteine mit Phenylisothiocyanat (PITC) umsetzt und das Reaktionsprodukt in geeigneter Weise behandelt. Diese Reaktion wurde von EDMAN¹ beschrieben und in zahlreichen Laboratorien zum Abbau von Proteinen und von Peptiden verwendet (für Zusammenfassung vgl. z.B. Lit. 2, 3). Mit der Dünnschichtchromatographie der PTH-Aminosäuren** haben sich mehrere Gruppen²⁻⁹ beschäftigt. CHERBULIEZ *et al.*^{5, 10}, WIELAND UND GEBERT¹¹, SARGES UND WITKOP¹² benutzten die Dünnschichtchromatographie zum Nachweis der N-endständigen Aminosäuren in Peptiden und in deren Abbauprodukten. Wir haben niedermolekulare Peptide nach dem von SJÖQUIST¹³ modifizierten Verfahren abgebaut und die Abbauprodukte dünnschichtchromatographisch identifiziert¹⁴. Um die Leistungsfähigkeit der Methode zu prüfen, und auch die Anzahl der möglichen Abbauschritte zu erkennen, haben wir ein Nonapeptid (H-Ala-Tyr-Ile-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Ala-Pro-Leu-Gly-NH₂) abgebaut und die Reaktionsprodukte auf Kieselgel-G-Schichten getrennt. Über unsere Ergebnisse soll in der vorliegenden Arbeit berichtet werden.

Experimentelles

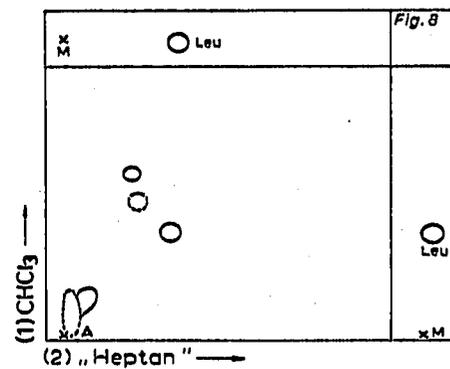
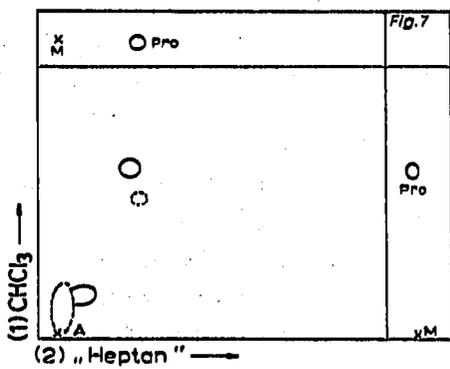
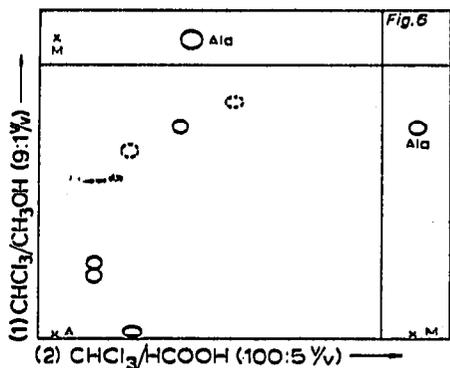
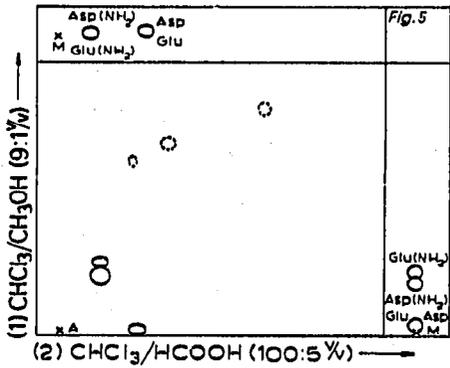
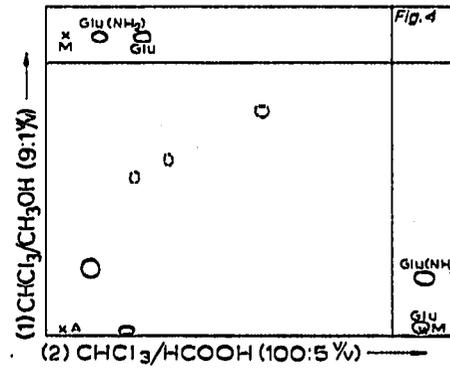
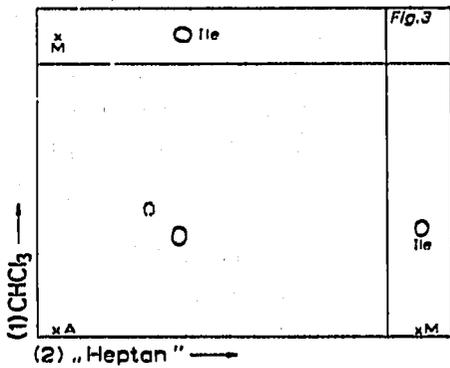
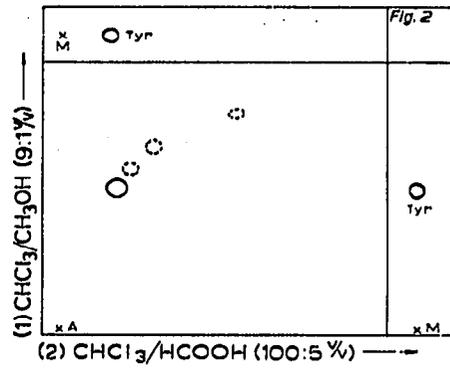
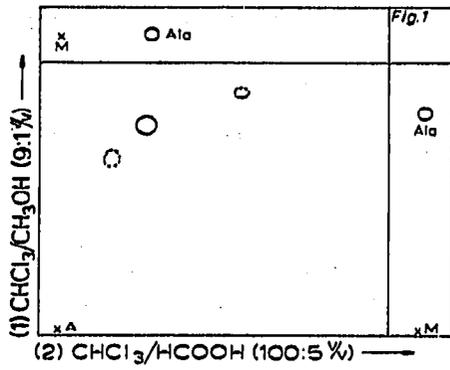
Die Umsetzung des Nonapeptids und der Abbaupeptide mit PITC, sowie die Abspaltung und Isolierung der PTH-Aminosäuren, erfolgte nach den Angaben von SJÖQUIST¹³, unter dünnschichtchromatographischer Kontrolle¹⁵. Gegebenenfalls wurde die PITC-Umsetzung wiederholt^{13, 15}. Zur Chromatographie dienten zinksilikathaltige Kieselgel-G-Schichten³ und die früher³ angegebene Technik.

Ergebnisse

Wie aus den Figuren 1, 2 und 3 zu erkennen ist, konnten nach dem ersten, zweiten und dem dritten Abbauschritt die erwarteten N-endständigen Aminosäuren nachgewiesen werden. In Fig. 4 wird der vierte, in Fig. 5 der fünfte Abbauschritt dargestellt; ausser PTH-Glutamin (4. Schritt) und PTH-Asparagin (5. Schritt) erkennt man auch die PTH-Derivate der entsprechenden Säuren. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von ANDERER¹⁶, wonach die Amidgruppen während der Reaktion teilweise hydrolytisch gespalten werden. Da im vorliegenden Fall sowohl Amid als auch freie Säure nachgewiesen werden konnten, bereitet die Identifizierung keine Schwierigkeiten. Die Abspaltung von Glutamin ist offenbar nicht quantitativ; in Chromatogrammen nach Fig. 5 kann man auch PTH-Glutamin erkennen. Nach weiteren Abbaureaktionen wird die Interpretation der Chromatogramme schwieriger (vgl. Fig. 6-8). Die Identifizierung dürfte bei grösseren Peptiden schon erhebliche Probleme bereiten.

* 3. Mitt.: G. PATAKI, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 541.

** Für Zusammenfassung vgl. Lit. 3.



Figs. 1-8. Nachweis der Abbauprodukte von H-Ala-Tyr-Ile-Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-Ala-Pro-Leu-Gly-NH₂. A = Abbauprodukt; M = Modellverbindung.
 Fig. 1. = 1. Schritt; Fig. 2 = 2. Schritt; Fig. 3 = 3. Schritt; Fig. 4 = 4. Schritt; Fig. 5 = 5. Schritt; Fig. 6 = 6. Schritt; Fig. 7 = 7. Schritt; Fig. 8 = 8. Schritt.

Der Autor möchte Herrn K. PODUSKA C.Sc. (Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften, Prag) für die Überlassung des Nonapeptids auch an dieser Stelle herzlich danken.

Laboratorium* der Universitäts-Frauenklinik**,
Basel (Schweiz)

GYÖRGY PATAKI***

- 1 P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 283.
- 2 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1962;
M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, in E. STAHL (Herausgeber), *Thin-Layer Chromatography*, Springer Verlag, Berlin and Academic Press, London, 1965.
- 3 G. PATAKI, *Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure und Peptidchemie*, W. de Gruyter, Berlin, 1965.
- 4 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, *Experientia*, 17 (1961) 145.
- 5 E. CHERBULIEZ, B. BAEHLER, J. MARSZALEK, A. R. SUSSMANN UND J. RABINOWITZ, *Helv. Chim. Acta*, 46 (1963) 2446.
- 6 E. CHERBULIEZ, B. BAEHLER UND J. RABINOWITZ, *Helv. Chim. Acta*, 47 (1964) 1350.
- 7 G. PATAKI, *Dissertation*, Universität Basel, 1962.
- 8 G. PATAKI, *Chimia (Aarau)*, 18 (1964) 23.
- 9 S. FITTKAU, H. HANSEN, I. MARQUARD, H. DIESNER UND U. KETTMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 338 (1964) 180.
- 10 E. CHERBULIEZ, B. BAEHLER UND J. RABINOWITZ, *Helv. Chim. Acta*, 43 (1960) 187.
- 11 TH. WIELAND UND U. GEBERT, *Anal. Biochem.*, 6 (1964) 201.
- 12 R. SARGES UND B. WITKOP, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 1682.
- 13 J. SJÖQUIST, *Arkiv Kemi*, 14 (1959) 291.
- 14 G. PATAKI, unveröffentlicht.
- 15 G. PATAKI, *Helv. Chim. Acta*, 47 (1964) 1763.
- 16 F. A. ANDERER, Privatmitteilung.

Eingegangen den 8. Juli 1965

* Leiter: Dr. M. KELLER.

** Direktor: Prof. Dr. TH. KOLLER.

*** Neue Adresse: ROBAPHARM A.G., Basel.

J. Chromatog., 21 (1966) 133-135

Differentiation of dimethylaminonaphthalenesulphonic derivatives (DNS) of valine, leucine and isoleucine by chromatography on a thin layer of silica gel

Lately, dimethylaminonaphthalenesulphonic derivatives (DNS) of amino acids according to GRAY AND HARTLEY¹ have been used more and more for the determination of N-terminal amino acids in studies on protein structure. In this method, the identification of the DNS-amino acids by means of thin-layer chromatography proved to be very advantageous, the strong fluorescence of the DNS-amino acids in U.V. light (at 365 m μ)² being used for identification. The sensitivity of this method is greater by 2-3 orders than that of the more usual dinitrophenylation method³.

The three solvent systems for thin-layer chromatography² hitherto described differentiate almost all of the DNS-amino acids. Only the differentiation of DNS-

J. Chromatog., 21 (1966) 135-137