

## Strukturanalyse von Polypeptidketten

Von M. BRENNER

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

Die Vorstellung, welche man sich über den Bau von Eiweißverbindungen macht, geht davon aus, daß  $\alpha$ -Aminosäuren die Fähigkeit besitzen, durch Polykondensation unter Austritt von Wasser Ketten zu bilden. Solche Ketten – man nennt sie gewöhnlich Polypeptide – stellen ihrerseits offensichtlich die Bauelemente dar, aus denen durch Ausbildung von Querverbindungen, Faltung und Assoziation Eiweißmoleküle entste-

hen<sup>1</sup>. Die letzteren sind hochorganisierte, mehr oder weniger starre<sup>2</sup> Gebilde; es ist also jedem Atom im Molekül eine weitgehend bestimmte räumliche Lage zugeordnet.

<sup>1</sup> Mit diesem Schema soll nur der Bauplan, nicht aber die in ihren Grundzügen immer noch unbekannte Entstehungsweise (biologische Synthese) der Proteine gezeichnet werden.

<sup>2</sup> Vgl. z. B. J. T. EDSALL, Disc. Faraday Soc. 13, 19 (1953).

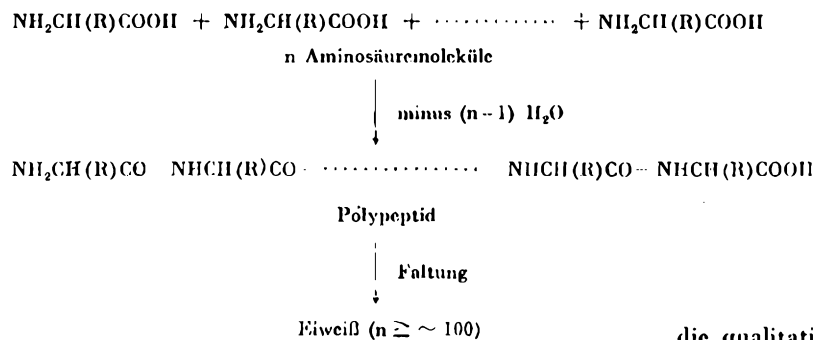


Abb. 1

Die Erforschung der Eiweißstruktur steht somit vor einem stofflichen und einem räumlichen Problem. Sie muß sich einerseits mit der chemischen Struktur (Konstitution) der Peptidketten und mit allfällig vorhandenen Querverbindungen (Brücken) zwischen den Ketten beschäftigen. Auf der anderen Seite sind die Prinzipien aufzufinden, welche die Gestalt (Konstellation) der Ketten, gegebenenfalls ihre gegenseitige Lage, und damit die Lage der Einzelatome, bedingen. Es darf indessen bei dieser sehr praktischen und einleuchtenden Zweiteilung nicht übersehen werden, daß sie sich aus rein methodischen Gründen ergeben hat: in Wirklichkeit beruht natürlich auch der räumliche Bau der Proteine auf stofflichen Gegebenheiten.

In jüngster Zeit sind nun sowohl von der strukturellen wie von der stereochemischen Seite her gewichtige Fortschritte erzielt worden. Das vorliegende Referat beschränkt sich auf eine Darstellung des strukturellen Problems. Zur Frage der Konstellation von Peptidketten sei auf die ausgezeichnete Diskussion von M. F. PERUTZ verwiesen, die neulich in den «Annual Reports on the Progress of Chemistry» erschienen ist<sup>3</sup>; es ist vor allem L. PAULING, dem wir wichtigste und schönste Ergebnisse auf jenem schwierigen Gebiet verdanken.

#### Bausteinanalyse:

##### qualitative und quantitative Bestimmung der Aminosäuren in Eiweißhydrolysaten

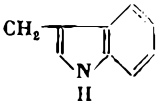
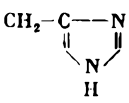
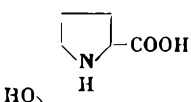
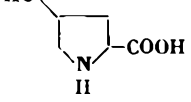
Die Zahl der in einem Eiweißmolekül vorhandenen Aminosäurereste ist sehr groß. Sie beträgt schon bei einem Molekulargewicht von 10000, d. h. also bei kleinen Molekülen, bereits ungefähr 100. Es werden somit bei der totalen Hydrolyse von einem Mol Eiweiß mindestens 100 Mol Aminosäure in Freiheit gesetzt. Diese 100 oder mehr Mol können sich in einem praktisch beliebigen Verhältnis auf rund zwanzig verschiedene Molekülsorten (die bekannten  $\alpha$ -Aminosäuren, vgl. Tab. 1) verteilen.

Es folgt daraus, daß jedes Eiweißhydrolysat ein reichlich komplexes Gemisch darstellt. Da sich die verschiedenen Aminosäuren in ihren physikalischen Eigenschaften

ten nur wenig voneinander unterscheiden, ist es nicht weiter erstaunlich, daß die qualitative und quantitative Analyse von Eiweißhydrolysaten lange Zeit mit den größten Schwierigkeiten verbunden war. Eine allgemeine Lösung des Problems ist in der Tat erst mit der Einführung neuer chromatographischer Methoden gefunden worden. So steht uns heute für

die qualitative Erfassung der Aminosäuren die Papierchromatographie<sup>4</sup> und für ihre quantitative Bestimmung das Verfahren von W. H. STEIN und S. MOORE<sup>5</sup>

Tab. 1. Name, abgekürzter Name und Strukturformel der wichtigsten  $\alpha$ -Aminosäuren

| Name                    | Abgekürzter Name <sup>6</sup> | R in $\text{NH}_2\text{CH(R)COOH}$                                                                  |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Glycin . . . . .        | Gly                           | H                                                                                                   |
| Alanin . . . . .        | Ala                           | $\text{CH}_3$                                                                                       |
| Valin . . . . .         | Val                           | $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$                                                                          |
| Leucin . . . . .        | Leu                           | $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$                                                               |
| Isoleucin . . . . .     | Ileu                          | $\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)$                                                      |
| Methionin . . . . .     | Met                           | $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$                                                                |
| Cystein . . . . .       | CySH                          | $\text{CH}_2\text{SH}$                                                                              |
| Serin . . . . .         | Ser                           | $\text{CH}_2\text{OH}$                                                                              |
| Threonin . . . . .      | Thr                           | $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$                                                                   |
| Phenylalanin . . . . .  | Phe                           | $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$                                                                   |
| Tyrosin . . . . .       | Tyr                           | $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$                                                          |
| Tryptophan . . . . .    | Try                           | $\text{CH}_2$  |
| Lysin* . . . . .        | Lys                           | $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$                                           |
| Arginin* . . . . .      | Arg                           | $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{NH})(\text{NH}_2)$                              |
| Histidin* . . . . .     | His                           | $\text{CH}_2$  |
| Asparaginsäure**        | Asp                           | $\text{CH}_2\text{COOH}$                                                                            |
| Glutaminsäure**         | Glu                           | $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$                                                                 |
|                         |                               | Strukturformel                                                                                      |
| Prolin . . . . .        | Pro                           |                |
| Hydroxyprolin . . . . . | Hypro                         |                |

\* basische Aminosäure \*\* saure Aminosäure

<sup>4</sup> Vgl. das Referat von P. v. TAVEL, *Chimia* 5, 256 (1951).

<sup>5</sup> Zusammenfassung in Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology 14, 179 (1950); vgl. auch die kurze Darstellung von R. SIGNER in *Chimia* 5, 247 (1951).

<sup>6</sup> E. BRAND und J. T. EDSALL, *Annu. Rev. Biochem.* 16, 224 (1947).

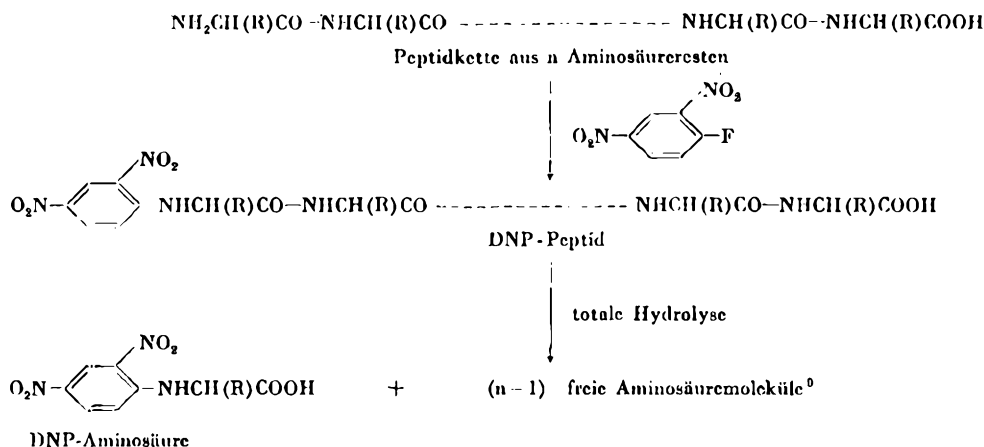
<sup>3</sup> *Annu. Rep. Progr. Chem.* 48, 362 (1951).

(Chromatographie an Ionenaustauschern) zur Verfügung. Über die früher angewandten quantitativen Methoden, deren Verwendung auch heute noch da und dort angezeigt ist, orientiert eine zusammenfassende Darstellung in den «Annals of the New York Academy of Sciences»<sup>7</sup>.

#### Nachweis und Bestimmung der endständigen Aminosäuren in Polypeptiden und Eiweißmolekülen

Betrachtet man eine Polypeptidkette von beliebiger Länge und Gestalt (Abb. 1), so fällt sofort auf, daß sie zwei Stellen aufweist, die sich vom Rest der Kette unterscheiden. Diese Stellen sind die Enden der Kette. Das

weiter unten beschriebenen Untersuchung von kleinen Peptiden zu eignen. Eine Ausnahme macht die SANGERsche DNP-Technik<sup>8</sup>: Fluor-dinitro-benzol reagiert in bicarbonatalkalischer Lösung mit den freien Aminogruppen von Peptiden und Proteinen unter Bildung von Dinitrophenyl-Derivaten (DNP-Peptide, DNP-Proteine). Werden diese einer totalen Hydrolyse unterworfen, so erhält man ein Gemisch von N-Dinitrophenyl-Aminosäuren und freien Aminosäuren. Erstere stammen von den Amino-Enden, letztere vom Rest der ursprünglich vorhandenen Peptidketten ab. Das nachstehende Formelschema soll dies verdeutlichen.



eine Ende trägt eine  $\alpha$ -Aminogruppe. Man spricht deshalb vom *Amino-Ende* der Kette und bezeichnet den zugehörigen Aminosäurerest  $\text{NH}_2\text{CH(R)CO}-$  als den N-endständigen Aminosäurerest. Am anderen Ende der Kette befindet sich eine  $\alpha$ -Carboxygruppe; man spricht vom *Carboxyl-Ende* und nennt den entsprechenden Aminosäurerest  $-\text{NHCH(R)COOH}$  den C-endständigen Aminosäurerest. Da sich innerhalb einer unverzweigten Kette – es fehlen bisher schlüssige Hinweise auf ein verbreitetes Vorkommen verzweigter Peptidketten – keine weiteren Reste mit  $\alpha$ -Amino- oder  $\alpha$ -Carboxygruppen befinden, war es naheliegend, Methoden zur Identifizierung der durch ihre besondere Reaktionsfähigkeit ausgezeichneten endständigen Kettenglieder zu entwickeln. Sofern die Faltung beim Übergang einer Kette ins Eiweißmolekül keine Abschirmung der Enden zur Folge hatte (Abb. 1), durfte man erwarten, daß solche Methoden sich auch zur Untersuchung von Eiweißstoffen eignen würden.

#### Nachweis des N-endständigen Aminosäurerestes

Es sind verschiedene Verfahren zum Nachweis von N-endständigen Aminosäureresten entwickelt worden. Die meisten unter ihnen scheinen sich aber eher zu der

Die DNP-Aminosäuren können durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln von den freien Aminosäuren abgetrennt werden. Liegt ein Gemisch von verschiedenen DNP-Aminosäuren vor, was z. B. vorkommt, wenn ein Eiweißmolekül aus mehreren verschiedenen Peptidketten besteht, so wird zur Trennung und Identifizierung chromatographiert<sup>10</sup>. Die gelbe Farbe der DNP-Aminosäuren gestattet schließlich eine colorimetrische Ermittlung der Ausbeute, so daß die Methode auch zur quantitativen Bestimmung der N-endständigen Aminosäuren dient; die erreichbare Genauigkeit von 10–15 % genügt meistens zur Entscheidung, ob ein bestimmter Aminosäurerest in einem Mol des analysierten Proteins ein-, zwei- oder mehrmals als Kettenende auftritt. Man kann also mit der SANGERSchen Methode nicht nur die N-endständigen Aminosäuren feststellen, sondern auch einen Hinweis auf die Zahl der in einem Eiweiß vorhandenen Peptidketten gewinnen (vgl. Tab. 2).

<sup>8</sup> F. SANGER, Biochem. J. 39, 507 (1945).

<sup>9</sup> Nicht-N-endständiges Lysin, Tyrosin und Histidin werden an der  $\epsilon$ -Aminogruppe, am phenolischen Sauerstoff und im Imidazolring durch die DNP-Gruppe substituiert. Diese DNP-Derivate kann man schematisch zu den freien Aminosäuren zählen, da sie immer noch die maßgebende zwitterionische Gruppierung  $^+\text{NH}_3\text{CHCOO}^-$  enthalten.

<sup>7</sup> Ann. Acad. Sci. (New York) XLVII, 57–239 (1946); zur Pepsyl-Methode vgl. A. S. KESTON et al., Amer. Chem. Soc. 68, 1390 (1946), 69, 3151 (1947), 71, 249 (1949), 72, 748 (1950); Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology 14, 92 (1949).

<sup>10</sup> Literatur bei F. SANGER, Adv. Prot. Chem. 7, 6 (1952); vgl. ferner S. BLACKBURN und A. G. LOVTHUEN, Biochem. J. 48, 126 (1951); G. BISERTE und R. OSTEALUX, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 50 (1951).

Tab. 2. N-endständige Aminosäurereste einiger Proteine<sup>11</sup>

| Protein                                | Mol-<br>gewicht | N-endständiger<br>Aminosäurerest | N-endständige<br>Reste pro<br>Mol Protein | Bemerkungen                                               |
|----------------------------------------|-----------------|----------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Edestin . . . . .                      | 300 000         | Glycin                           | 6                                         |                                                           |
| γ-Globulin<br>(Kaninchen) . . . . .    | 160 000         | Alanin                           | 1                                         |                                                           |
| Ovalbumin . . . . .                    | 40 000          | —                                | —                                         | Eine oder meh-<br>rere zyklische<br>Ketten? <sup>12</sup> |
| Hämoglobin<br>(Pferd, Esel) . . . . .  | 66 000          | Valin                            | 6                                         | Beachte den<br>Unterschied!                               |
| Hämoglobin<br>(Ochse, Schaf) . . . . . | 66 000          | Valin                            | 2                                         |                                                           |
| Insulin                                |                 | Methionin                        | 2                                         |                                                           |
| (Ochse, Schwein, Schaf) .              | 12 000*         | Phenylalanin                     | 2                                         |                                                           |
|                                        |                 | Glycin                           | 2                                         |                                                           |

\* Nach neuesten Ergebnissen ist der Wert 6000 als richtiger zu betrachten<sup>13</sup>. Es wären dann im Mol nur zwei Ketten mit Phenyl-alanin und Glycin als N-endständigen Resten enthalten. Die Unsicherheit hängt mit Assoziationserscheinungen zusammen<sup>14</sup>.

Nachweis des C-endständigen Aminosäurerestes

Auch hier ist zwischen Methoden zu unterscheiden, welche sich eher zur später zu besprechenden Analyse von kleinen Peptiden eignen, und solchen, die sich auch bei der Untersuchung von Makromolekülen bewährt haben.

Ein erster Erfolg wurde auf fermentativem Weg erzielt. Man kennt ein proteolytisches Ferment, die Carboxypeptidase, welche nur Peptidbindungen in unmittelbarer Nachbarschaft einer freien Carboxylgruppe angreift.



Als Folge des Angriffs wird der C-endständige Aminosäurerest hydrolytisch abgespalten. Die Geschwindigkeit, mit der diese Reaktion erfolgt, hängt von der Natur des betreffenden Restes und von der molaren Konzentration des anzugreifenden Peptides ab. Hier ist die Konzentrationsabhängigkeit der entscheidende Faktor: Indem das (n)-Peptid (= Peptid aus n Aminosäuren) in das (n-1)-Peptid und die C-endständige Aminosäure übergeht, wird sukzessive eine neue Molekülart, das (n-1)-Peptid, erzeugt, die ihrerseits wiederum durch Carboxypeptidase unter Bildung des (n-2)-Peptids angegriffen werden kann. Bis aber das (n-1)-Peptid, das (n-2)-Peptid usw. mit nennenswerter Geschwindigkeit abgebaut werden und dadurch das Bild stören, wird unter günstigen Umständen aus dem (n)-Peptid genügend C-endständige Aminosäure entstehen, um die papierchromatographische Identifizierung zu ermögli-

chen. Im Falle des Insulins konnte auf diese Weise festgestellt werden, daß Alanin am Carboxylende einer Kette steht<sup>15</sup>.

Zwei weitere Verfahren verwandeln den C-endständigen Aminosäurerest auf reduktivem Weg in den Rest eines Aminoalkohols<sup>16</sup>. Nachfolgende Hydrolyse setzt den Aminoalkohol in Freiheit. Er kann leicht aus dem Hydrolysat abgetrennt und papierchromatographisch identifiziert werden. Behandlung mit Perjodat zerlegt die Aminoalkohole in Formaldehyd, Ammoniak und Aldehyde, die sich ihrerseits wiederum identifizieren lassen; die Bestimmung des entstandenen Ammoniaks und Formaldehyds ermöglicht eine quantitative Auswertung der Methode.

Auf die Vorschläge von S. A. WATSON und J. WALEY<sup>17</sup>, J. TIBBS<sup>18</sup>, H. A. KHORANA<sup>19</sup>, S. AKABORI und K. OHNO<sup>20</sup> soll an dieser Stelle lediglich hingewiesen werden (vgl. aber Seite 204).

<sup>11</sup> Nach einer Zusammenstellung von F. SANGER, Adv. Prot. Chem. 7, 7 (1952).  
<sup>12</sup> Vgl. dazu D. STEINBERG, Amer. Chem. Soc. 74, 4217 (1952).  
<sup>13</sup> E. J. HARFENIST und L. C. CRAIG, Amer. Chem. Soc. 74, 3087 (1952).  
<sup>14</sup> Vgl. z. B. H. NEURATH, Disc. Faraday Soc. 13, 93 (1953).  
<sup>15</sup> J. LENS, Biochim. Biophys. Acta 3, 367 (1949). Vgl. ferner: A. R. THOMPSON, Nature 169, 495 (1952); Leucin am Carboxylende von Lysozym; J. I. HARRIS, Amer. Chem. Soc. 74, 2944 (1952); Asparagin am Carboxylende der zweiten Kette im Insulin.  
<sup>16</sup> C. FROMAGEOT, M. JUTISZ, D. MEYER und L. PENASSE, Biochim. Biophys. Acta 6, 283 (1950); A. C. CHIDNALL und M. W. REES, Biochem. J. 48, XI.VII (1951).  
<sup>17</sup> J. Chem. Soc. 1951, 2394.  
<sup>18</sup> Nature 168, 910 (1951).  
<sup>19</sup> J. Chem. Soc. 1952, 2081.  
<sup>20</sup> 11<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, Paris 1952.

### Reihenfolge der Aminosäuren im Inneren einer Peptidkette

Nachdem einmal Wege gefunden waren, die es gestatteten, die endständigen Kettenglieder zu identifizieren, stellte sich die Frage nach einem Vordringen in das Innere der Kette.

Es gibt drei verschiedene Möglichkeiten, die im Prinzip einen Erfolg erwarten lassen:

- a) Schrittweiser Abbau von einem Kettenende her, z. B. nach dem Carboxypeptidase-Schema.
- b) Entzweibrechen der Kette, Trennen der Bruchstücke, Bestimmung der Bruchstücks-Endgruppen, weiteres Entzweibrechen, Trennen usw. bis hinab zur Stufe der Aminosäuren. Rekonstruktion der Kette anhand des Abbauschemas.
- c) Direkte partielle Hydrolyse bis zur Stufe von kleinen und mittleren Bruchstücken, Isolierung und Identifizierung einer möglichst großen Anzahl individueller Peptide und Rekonstruktion der Kette durch Kombination der Resultate.

Aus praktischen Gründen fallen *a* und *b* vorläufig außer Betracht. Das Ergebnis eines schrittweisen Abbaues nach *a* unter der Einwirkung eines Fermentes wird bei fortschreitender Reaktion immer schwieriger zu interpretieren; chemische Methoden für einen schrittweisen Abbau am Kettenende existieren zwar ebenfalls (vgl. unten), funktionieren aber nicht so exakt, wie es eine oftmalige Wiederholung des Prozesses erheischen würde. Methode *b* ist vorläufig undurchführbar, weil die Reagenzien fehlen, welche einen spezifischen Angriff auf eine einzige Peptidbindung in einer gegebenen Kette gestatten; ein weiteres Problem von nicht zu unterschätzender Schwierigkeit bietet die saubere Trennung der Spaltprodukte, und zwar insbesondere die Reindarstellung der höheren Peptide.

Es bleibt also bis auf weiteres nur die auf den ersten Blick am kompliziertesten erscheinende Methode *c* übrig. Die Voraussetzungen für ihre Anwendung (Variationsmöglichkeit im Hydrolysiervorgang zur Erzielung möglichst verschiedenartiger Partialhydrolysate, brauchbare Technik zur Isolierung und zuverlässige Technik zur Identifizierung der Peptide) sind weitgehend erfüllt.

#### Partielle Hydrolyse: Verfahren und Ergebnisse

Peptidbindungen lassen sich unter dem katalytischen Einfluß von Säuren, Basen oder Fermenten hydrolytisch öffnen. Die saure und die alkalische Hydrolyse sind nicht ganz, aber doch weitgehend unspezifisch. Bei der Verwendung eines Fermentes dagegen werden gewisse Stellen in der Kette spezifisch, d. h. deutlich bevorzugt angegriffen. Der fermentative Prozeß liefert deshalb bei gleichem Spaltungsgrad (Verhältnis der Anzahl gespaltenener Peptidbindungen zur Anzahl der Peptidbindungen vor der Spaltung) ein weniger komplexes Hydrolysegemisch als der saure oder alkalische Abbau (vgl. dazu die untenstehende Diskussion über die unspezifische saure Hydrolyse). Diesem Vorteil steht der Nachteil

gegenüber, daß die Wirkung von Fermenten sich nicht unbedingt auf die Hydrolyse beschränkt. Man weiß, daß Fermente manchmal einen Umbau von Spaltstücken herbeiführen, indem das Öffnen einer bestehenden Bindung vom Schließen einer neuen Bindung begleitet sein kann (enzymatische Synthese). Die Bildung solcher Kunstprodukte ist, selbst wenn ihre Auswirkung nicht überschätzt werden darf, unerwünscht<sup>21</sup>. Um Unsicherheiten auszuschließen, wird deshalb das Ergebnis eines fermentativen Abbaues am besten mit den Resultaten anderer Hydrolysiervorgänge verglichen. Der Vergleich zwischen den Ergebnissen verschiedener Hydrolystechniken (z. B. alkalische, saure, enzymatische Hydrolyse) ist auch sonst sehr nützlich: Bindungen, die in einem System gespalten werden, können in einem anderen intakt bleiben. Es wird dadurch eventuell möglich, Beziehungen zwischen Bruchstücken aufzufinden, die bei Betrachtung eines einzigen Systems nicht erkennbar sind.

Auch die Verwendung von Alkali weist gewisse Nachteile auf. Man muß damit rechnen, daß gewisse Aminosäurereste, wie etwa jene der Oxyaminosäuren, selbst unter milden Bedingungen zerstört werden. Abgesehen davon kann die in alkalischem Milieu innerhalb der Peptidketten auftretende Racemisierung zu Komplikationen führen.

Der Abbau in saurer Lösung zeigt weniger Nebenerscheinungen, ist aber wie gesagt relativ unspezifisch. Es sind zwar Gruppierungen gefunden worden, die verhältnismäßig labil sind. Daneben kennt man andere, die sich durch gewisse Stabilität auszeichnen. Interessant ist auch, daß die Angriffsweise der Salzsäure von der Konzentration abhängt. All dies sind Anzeichen einer gewissen Spezifität. Ihre Berücksichtigung ist aber so schwierig, daß man sich bei rein statistischer Betrachtung des Hydrolyseprozesses ohne Zweifel ein zuverlässigeres Bild über die Verhältnisse im Reaktionsgemisch machen kann. Da nun eine gewisse Vorstellung über den Verlauf der Hydrolyse die Grundlage für das Verständnis der Methode *c* (vgl. oben) bildet, soll im folgenden kurz darauf eingetreten werden.

Ein Peptid wird bei gegebener Säurekonzentration und ohne Berücksichtigung irgendwelcher Spezifität durch ein Wassermolekül um so schneller angegriffen und aufgespalten, je größer seine molare Konzentration und je größer die Zahl der im Molekül vorhandenen angreifbaren Stellen (Peptidbindungen) ist; außerdem kann der Angriff – wenn wir die Spezifität wiederum vernachlässigen – an jeder einzelnen Peptidbindung mit der gleichen Wahrscheinlichkeit erfolgen. Daraus folgt, daß der größte Teil eines Polypeptids im ersten Stadium der Hydrolyse sehr rasch in alle möglichen primären Spaltstücke zerfällt und daß diese Spaltstücke, die zunächst in vergleichbaren Konzentrationen

<sup>21</sup> Gewisse Umlagerungen sind auch bei saurer Hydrolyse nicht absolut ausgeschlossen. Vgl. z. B. F. SANGER und E. O. P. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta* 9, 225 (1952).

vorliegen, um so schneller weitergespalten werden, je größer sie sind. In kürzester Zeit wird ein Zustand erreicht, der dadurch gekennzeichnet ist, daß sämtliche Produkte, die sich überhaupt aus dem Polypeptid bilden können, in größtenteils sehr kleinen, aber doch endlichen Konzentrationen nebeneinander vorhanden sind. Bestand das ursprünglich der Hydrolyse unterworfen Polypeptid aus  $n$  Aminosäureresten, so enthält das Reaktionsgemisch nunmehr  $n$  Aminosäure-Sorten (jede «Sorte» entspricht hier einer Stellung in der Kette) +  $(n-1)$  Dipeptid-Sorten +  $(n-2)$  Tripeptid-Sorten +  $(n-3)$  Tetrapeptid-Sorten usw. (total  $n$  Aminosäure-Sorten +  $\frac{n}{2}(n+1)$  Peptid-Sorten). Auch wenn einige Sorten unter sich identisch sind, was um so eher zutrifft, je einfacher die Sorte ist (die Einfachheit nimmt in der Reihenfolge Aminosäure, Dipeptid, Tripeptid usw. ab), ergibt sich immer noch eine sehr große Zahl gleichzeitig anwesender individueller Molekülarten. Dieses Gemisch kann bei fortschreitender Hydrolyse nicht mehr komplizierter, sondern nur noch einfacher werden, indem zuerst die Konzentrationen der höheren, dann diejenigen der mittleren und zuletzt jene der kleinen Peptide die analytische Erfassungsgrenze unterschreiten. Was am Schluß zurückbleibt, ist ein Aminosäuregemisch (totale Hydrolyse). In bezug auf jedes auftretende Peptid ist zu sagen, daß seine Konzentration im Laufe der Hydrolyse von Null auf ein Maximum ansteigen und nachher wieder auf Null absinken wird. Die größere Beständigkeit der kleinen Peptide läßt nun zweierlei erwarten: 1. Das erreichbare Konzentrationsmaximum liegt bei den kleinen Peptiden höher als bei den großen Peptiden. 2. Die kleinen Peptide erreichen ihr Konzentrationsmaximum später als die großen Peptide. Da schließlich die Isolierung eines Stoffes um so leichter fällt, je höher seine Konzentration und je kleiner die Zahl der Begleitsubstanzen ist, ergibt es sich, daß die Aufarbeitung der Di-, Tri-, Tetra- und Penta-Peptide am meisten Erfolgsaussichten bietet, und die Hydrolyse so lange fortgesetzt werden muß, bis diese Gruppe ungefähr ihr Konzentrationsmaximum erreicht hat.

#### *Aufarbeitung von Partialhydrolysaten: Auftrennung der kleinen Peptide*

Es bedürfte eines Spezialreferates, um die Technik der Peptidtrennung im einzelnen zu beschreiben. Im vorliegenden Rahmen können nur einige Andeutungen gemacht werden. Genau wie es saure, neutrale und basische Aminosäuren (Tab. 1) gibt, so gibt es auch, nach Maßgabe der im Molekül vorhandenen Carboxyl-, Amino-, Imino-, Imidazol- und Guanidinogruppen, saure, neutrale und basische Peptide. Die drei Gruppen unterscheiden sich je nach dem pH-Wert mehr oder weniger durch ihre elektrische Ladung. Dies ermöglicht eine Gruppentrennung durch Elektrophorese (auf diesem Anwendungsgebiet manchmal Ionophorese genannt) oder Adsorption an Ionenaustauschern. Die Trennung

innerhalb der Gruppen erfolgt durch Gegenstromverteilung, Adsorption (Kohle), Verteilungschromatographie (Cellulose, Ionenaustauscher) oder, im analytischen Maßstab, durch Papierchromatographie. Nach einer Angabe von SANGER kann man damit rechnen, daß Gemische von ungefähr 100 Peptiden mit diesen Verfahren gerade noch einigermaßen trennbar sind. Diese Beschränkung zeigt deutlich, wie wichtig es ist, durch genügenden oder spezifischen Abbau das Arbeiten mit allzu komplexen Hydrolysaten zu vermeiden.

#### *Identifizierung der kleinen Peptide*

Bei der großen Mannigfaltigkeit der vorkommenden Hydrolyseprodukte und den geringen verfügbaren Substanzmengen ist es im allgemeinen nicht möglich, ein isoliertes Peptid durch direkten Vergleich mit synthetischem Material zu identifizieren. Man ist hier darauf angewiesen, die Zahl und Reihenfolge der Aminosäuren durch Abbau festzulegen.

Totale Hydrolyse eines isolierten Produktes und anschließende Papierchromatographie orientiert über die Zahl und die Art der vorhandenen Aminosäuren. Zusätzliche Bestimmung der N- und C-endständigen Aminosäurereste gibt bei Di- und Tripeptiden sofort die vollständige Konstitution. Tetra- und höhere Peptide werden entweder schrittweise abgebaut (vgl. unten) oder nach Bestimmung der Endgruppen partiell verseift, die resultierenden Di- und Tripeptide abgetrennt und ihrerseits weiter analysiert. Die Konstitution des ursprünglichen Peptids kann dann gewöhnlich anhand einer Betrachtung der Spaltstücke rekonstruiert werden. Gibt z. B. die Papierchromatographie eines Totalhydrolysats das Vorliegen von zwei Molekülen der Aminosäure A und je einem Molekül der Aminosäuren B, C und D, die Endgruppenbestimmung am intakten Peptid für das Amino-Ende den Rest A und für das Carboxyl-Ende den Rest D, und werden außerdem im Partialhydrolysat u. a. die Peptide ABC, CA und AD gefunden, so muß ursprünglich ein Pentapeptid der Konstitution ABCAD vorgelegen haben. Das gleiche Verfahren dient auch zur Rekonstruktion größerer Ketten (vgl. unten). Das Problem kann eventuell erleichtert werden, indem nicht das freie Peptid, sondern sein DNP-Derivat einer partiellen Hydrolyse unterworfen wird; man trachtet dann danach, nicht nur die DNP-Aminosäure, sondern womöglich auch DNP-Peptide zu isolieren und so etwas mehr über das Amino-Ende der Kette zu erfahren.

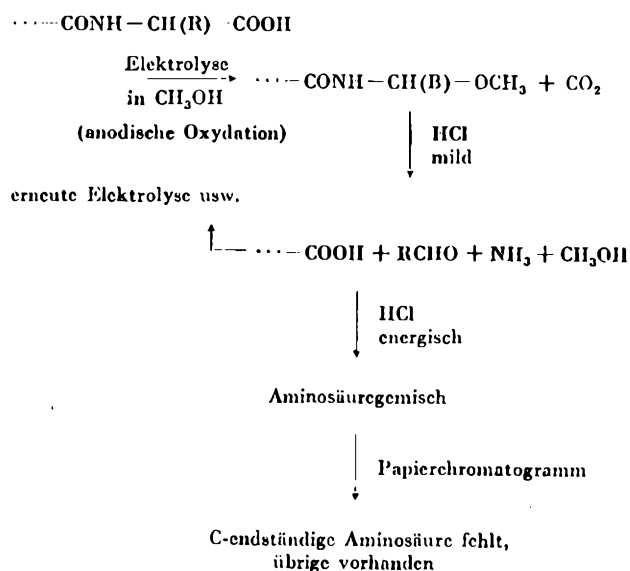
Außer der DNP-Technik sind hier noch zwei weitere Möglichkeiten zur Bestimmung des N-endständigen Aminosäurerestes zu erwähnen: die NOCl-Methode von R. CONSDEN, A. H. GORDON und A. J. P. MARTIN<sup>22</sup> und das Verfahren von R. E. BOWMAN<sup>23</sup> bzw. V. M. INGRAM<sup>24</sup>. Beide sind als Mikroverfahren ausgestaltet worden. Sie beruhen auf folgenden Umsetzungen:

<sup>22</sup> Biochem. J. 41, 590 (1947).

<sup>23</sup> J. Chem. Soc. 1950, 1349.

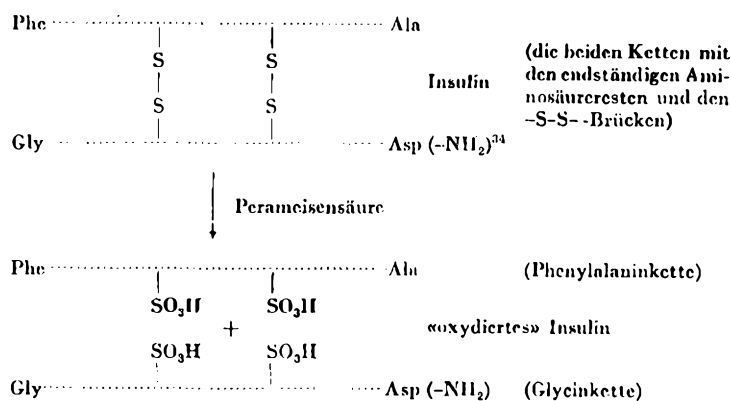
<sup>24</sup> Nature 166, 1038 (1950).



7. Verfahren von R. A. BOISSONAS<sup>32</sup>:

## Die SANGERSche Analyse des Insulins

F. SANGER hat unter Beiziehing der diskutierten Methodik als erster den Versuch unternommen, die Aminosäurereihenfolge in einem Eiweißkörper aufzuklären. Er wählte hierzu das Insulin, das in seiner Eigenschaft als Hormon ein besonderes Interesse bietet und sich durch ein verhältnismäßig niedriges Molekulargewicht (12000 bzw. 6000<sup>33</sup>) auszeichnet. Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, enthält das Molekül, wenn als Molgewicht der Wert 6000 angenommen wird, zwei N-endständige Aminosäurereste und damit offenbar zwei verschieden gebaute Polypeptidketten. Nun ist im vorhergehenden überall vorausgesetzt worden, daß nur eine einzige, in reiner Form vorliegende Kette zu analysieren sei. Man muß sich absolute Rechenschaft darüber geben, daß die Möglichkeit einer Konstitutionsermittlung mit dieser Konzeption steht und fällt. In einem Fall, wie er beim Insulin gegeben ist, hängt somit alles davon ab, ob das Molekül in seine beiden Grundketten aufgetrennt werden kann. Dies ist SANGER tatsächlich gelungen. Die Disulfidbrücken, welche die zwei Ketten des Insulins miteinander verbinden, sind oxydativ sprengbar, und die Spaltstücke können in verhältnismäßig reiner Form gefaßt werden. Der chemische Vorgang ist nachstehend schematisch dargestellt:



Der Schwefel der Disulfidbrücken gehört zu Cystinhallbresten<sup>35</sup>, die in den Ketten stehen. Nach der Perameisensäure-Oxydation liegen diese sämtlich in Form von Cysteinsäureresten vor. Dies ist nicht etwa ein Nachteil, sondern ein Vorteil für die weitere Verarbeitung: Cysteinsäure (Symbol  $\text{CySO}_3\text{H}$ ) ist zunächst einmal viel weniger empfindlich als Cystein. Außerdem bewirkt ihr stark saurer Charakter, daß Peptide, welche den Cysteinsäurerest enthalten, besonders leicht zu erkennen und aus Partialhydrolysaten abzutrennen sind.

Tab. 3, die einer Übersichtsarbeit von F. SANGER<sup>36</sup> entnommen ist, zeigt, was für Peptide aus Partialhydrolysaten der Phenylalaninkette isoliert worden sind und wie daraus der Bau dieser Kette rekonstruiert werden konnte.

Für die Reihenfolge in der Glycinkette geben F. SANGER und E. O. P. THOMPSON<sup>37</sup> folgende Formel an: Gly. Ileu. Val. Glu. (CyS-). Ala. Ser. Val. (CyS-). Ser. Leu. Tyr. Glu. Leu. Glu. Asp. Tyr. (CyS-). Asp. (-NH<sub>2</sub>).

Was noch fehlt, ist eine exakte Angabe über die Stellung von fünf Amidgruppen, die außer derjenigen am C-endständigen Asparaginsäurerest nachweisbar sind; nach A. C. CHIBNALL und M. W. REES<sup>38</sup> verteilen sie sich auf drei Glutamyl- und zwei Asparagylreste. Unbekannt ist ferner, welche Cystinhallbreste an den Brückenbindungen beteiligt sind. Verglichen mit dem Erreichten, sind dies indessen Kleinigkeiten. Eine Vorstellung über die Bedeutung des erzielten Fortschrittes kann man sich am besten machen, wenn man bedenkt, daß Arbeiten über die Konstitution von Eiweißverbindungen noch vor wenigen Jahren als undurchführbar betrachtet wurden.

Die SANGERSchen Arbeiten und Schlußfolgerungen sind natürlich auch einer gewissen Kritik begegnet. So schafft namentlich die Möglichkeit der Bildung von Kunstprodukten, die bei partiellen Hydrolysen nie ganz ausgeschlossen ist, da und dort ein gewisses Unbehagen. SANGER begegnet solchen Einwänden damit, daß Kunstprodukte unter den isolierten Substanzen eine wider-

<sup>32</sup> Beachte bei den Verfahren 1 bis 5 das stets wiederkehrende, gleichbleibende Prinzip: Einführung eines geeigneten Substituenten, dann Angriff auf die benachbarte Peptidbindung durch Ausnützung der Bildungstendenz von 5- und 6-Ringen.

<sup>33</sup> Acta Chem. Scand. 4, 283 (1950).

<sup>34</sup> J. Chem. Soc. 1952, 2076.

<sup>35</sup> Vgl. S. J. LEONIS, Bull. Soc. Chim. Belgique 61, 524, 595 (1952).

<sup>36</sup> Amer. Chem. Soc. 74, 1110 (1952).

<sup>37</sup> loc. cit.

<sup>38</sup> Biochem. J. 52, iv (1952).

<sup>39</sup> Helv. Chim. Acta 35, 2226 (1952).

<sup>40</sup> Vgl. Fußnote in Tab. 2.

<sup>31</sup> Das Symbol Asp. (-NH<sub>2</sub>) bezeichnet den Rest des Asparagins (= β-Amid der Asparaginsäure).

<sup>32</sup> Die Sulfhydrylverbindung Cystein wird schon durch Luftsauerstoff zum Disulfid Cystin dehydriert. Symbol des Cysteinrestes  $\text{CySH}$ , des Cystinrestes  $(\text{CyS})_2$ , des Cystinhallbrestes  $(\text{CyS})$ .

<sup>33</sup> Adv. Prot. Chem. 7, 56 (1952).

<sup>34</sup> Biochem. J. 52, iii (1952), 53, 353, 366 (1953).

<sup>35</sup> Biochem. J. 52, iii (1952).

Tab. 3. Phenylalaninkette des Insulins: Identifizierte Spaltprodukte und Rekonstruktion der Kette

|                                                                               |                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dipeptide aus sauren und alkalischen Hydrolysaten                             | Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Thr. Pro. Lys. Ala |
| Tripeptide aus sauren und alkalischen Hydrolysaten                            | Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Thr. Pro. Lys. Ala |
| Höhere Peptide aus sauren und alkalischen Hydrolysaten                        | Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Thr. Pro. Lys. Ala |
| Auf obigen Resultaten basierende Teilrekonstruktion                           | Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Thr. Pro. Lys. Ala |
| Peptide aus peptischem Hydrolysat                                             | Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Thr. Pro. Lys. Ala |
| Peptide aus chymotryptischem Hydrolysat                                       | Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Thr. Pro. Lys. Ala |
| Peptide aus tryptischem Hydrolysat                                            | Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. CySO <sub>3</sub> H. Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Thr. Pro. Lys. Ala |
| Auf dem Gesamtergebnis basierende Gesamtreakonstruktion der Phenylalaninkette | Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. (CyS—). Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. (CyS—). Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Thr. Pro. Lys. Ala                           |

spruchslose Einordnung aller Resultate wahrscheinlich verunmöglicht hätten. Die in Tab. 3 dargestellte Anordnung ist nun aber nicht nur frei von Widersprüchen, sondern überdies die einzige, die überhaupt möglich ist. SANGER glaubt daher, daß seine rekonstruierten Ketten tatsächlich dem Bauplan des Insulins entsprechen. Erst die Zukunft wird in dieser Hinsicht völlige Klarheit schaffen können.

Es hat mancherorts enttäuscht, daß sich die biologische Aktivität des Insulins in dem jetzt vorliegenden Bauplan überhaupt nicht «bemerkbar» macht. Man hätte gern wenigstens die Andeutung einer Periodizität oder etwas Ähnliches gesehen, hat aber nichts Derartiges erkennen können. So kommt hier erstmals greifbar zum Ausdruck, daß die Eigenschaften eines Proteinmoleküls – ähnlich den Eigenschaften eines Kristalles – wohl erst durch den räumlichen Verband zustande kommen, in dem die Einzelteilchen stehen.

### Schlußbemerkung

Das vorliegende Referat soll einen Überblick über den gegenwärtigen Stand der Analyse von Eiweißverbindungen vermitteln. Es ist der Versuch gemacht worden, die ungeheuren Fortschritte der letzten Jahre aufzuzeigen. Diese Fortschritte dürfen aber nicht darüber hinwegtäuschen, daß wir immer noch tief in den Anfängen stecken. Was beim Insulin möglich war, ist nicht nur der Geschicklichkeit und dem Fleiß der Chemiker, sondern auch dem Umstand zu verdanken, daß Insulin mit seinen beiden trennbaren Ketten von «nur» 30 und 21 Resten ein besonders einfaches Molekül besitzt. Andere Proteine mit 300 und mehr Aminosäureresten lassen größere Schwierigkeiten erwarten. Es braucht voraussichtlich eine weitere Verbesserung der Technik, um auch sie zu überwinden. Der Anfang ist jedoch gemacht, und das ist hier die Hauptsache.