

М. Г. КРИЦМАН, С. А. МОРЕНКОВА, А. С. КОНИКОВА

## УЧАСТИЕ ПЕПТИДОВ В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ИНСУЛИНА

(Представлено академиком В. В. Париным 8 IV 1970)

При изучении механизма биосинтеза инсулина с помощью меченых аминокислот Ваган и Анфинсеном в срезах поджелудочной железы (<sup>1</sup>), а нами в опытах на целостном организме обнаружены различные величины радиоактивности в одноименных аминокислотных остатках А- и В-полипептидных цепей инсулина (<sup>2-4</sup>).

Эти данные могут быть интерпретированы в аспекте ступенчатого пути синтеза белка при участии пептидов как промежуточных этапов в процессе биосинтеза А- и В-цепей молекулы инсулина. Исходя из этого, мы исследовали утилизацию отдельных пептидов при биосинтезе этого гормона. В качестве исходных предшественников нами были использованы несколько дипептидов и гептапептид.

В работе был применен метод «балластирования». К инсулинсинтезирующей системе, которой являлись срезы поджелудочной железы, предварительно промеченные одной из нижеперечисленных радиоактивных аминокислот (С<sup>14</sup>-серином, С<sup>14</sup>-глицином, С<sup>14</sup>-лейцином или С<sup>14</sup>-тирозином), добавляли избыток соответствующего «балластного» дипептида: глицил-серин, лейцил-валин, аланил-лейцин, аргинил-лейцин или гептапептида гли-фен-фен-тир-тре-про-лиз. Эти пептиды идентичны по своему строению фрагментам В-цепи (В<sub>8-9</sub>, В<sub>11-12</sub>, В<sub>14-15</sub>, В<sub>22-23</sub>, В<sub>23-29</sub>) и отсутствуют в А-цепи. В то же время использованная меченая аминокислота, соответствовавшая одному из аминокислотных остатков «балластного» пептида, входила в состав А-цепи и одного из указанных фрагментов В-цепи инсулина.

**Методика.** В работе были использованы синтетические дипептиды: аргинил-глицин, лейцил-валин, аланил-лейцин и глицил-серин фирмы «Reanal», гептапептид, который нами был выделен из кристаллического инсулина, а также инсулин (активность 25 ед/мг производства московского завода «Эндокринные препараты»). Гептапептид получали из В-цепи инсулина, выделенной по Санджеру (<sup>5</sup>) посредством ее трипсинолиза (<sup>6</sup>) с последующим разделением продуктов перевара на колонке с Дауэксом (<sup>7</sup>).

50 мг окисленной В-цепи (13,9 ммоль) растворяли в 14 мл 0,12 М боратного буфера рН 9,4, добавляли 0,75 мл раствора трипсина, соответствующего 3,6 мг (0,144 ммоль), и инкубировали 4 часа при 25°. Реакцию останавливали добавлением 1 N HCl при рН 1,8 (<sup>8</sup>). Инкубационную смесь концентрировали до 2 мл в вакуумном эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Триптический перевар В-цепи хроматографировали на колонке (0,9 × 50 см) (<sup>7</sup>). В качестве элюирующих растворов служили: 180 мл 0,2 М пиридин-уксусная кислота рН 3,1 и затем 180 мл 2,0 М пиридин-уксусная кислота рН 6,2. Фракции собирали по 3 мл при скорости 18 мл/час, 0,2 мл каждой фракции использовали для реакции с нингидрином (<sup>9</sup>).

Для идентификации полученных пептидных фракций аликвотные количества каждой фракции подвергали полному кислотному гидролизу и затем гидролизаты хроматографировали на ватмане № 1, используя в качестве растворителя *n*-бутанол-уксусную кислоту-воду (4 : 1 : 5).

Фракция, соответствующая гептапептиду, содержала полный набор аминокислот, входящих в состав этого фрагмента.

Эксперимент с дипептидами. Пробы, содержащие по 3 г измельченной ткани поджелудочной железы крысы и 0,25—0,30 мС одной из  $C^{14}$ -аминокислот (1- $C^{14}$ -глицин, 1- $C^{14}$ -лейцин, 1- $C^{14}$ -серин с удельными активностями 130, 430, 540 мС/г соответственно), преинкубировали в 15 мл бикарбонатного буфера Рингера — Кребса pH 7,4 в течение 1 часа при 37°.

По окончании инкубации пробы трижды отмывали от свободной радиоактивной аминокислоты большим количеством охлажденного буфера, содержащего избыток соответствующей немеченой аминокислоты, и дважды — буфером без аминокислоты. К пробам, преинкубированным с 1- $C^{14}$ -глицином, добавляли дипептид арг-гли, с 1- $C^{14}$ -лейцином — дипептиды лей-вал или ала-лей, с 1- $C^{14}$ -серином — гли-сер и инкубировали еще 1 час в 15 мл буфера при 37°. Дипептиды добавляли в 7-кратном избытке по отношению к использованной меченой аминокислоте. Часть проб, к которым дипептиды не добавляли и инкубировали в идентичных условиях, служила контролем. После инкубации буфер удаляли центрифугированием, ткань поджелудочной железы замораживали сухим льдом и из нее выделяли инсулин экстракцией спиртом, подкисленным до pH 2 конц.  $H_2SO_4$ , как описано в (9). К выделенному «грубому» экстракту добавляли в качестве носителя кристаллический инсулин в отношении 1:1 из расчета на белок и затем многократно переосаждали при изоэлектрической точке этого белка (1). Инсулин окисляли надмуравьиной кислотой и разделяли электрофоретически на А- и В-цепи (10, 11). Цепи элюировали 0,01 N HCl. В элюатах отсчитывали радиоактивность на 4л-газопроточном счетчике и в тех же пробах определяли количественное содержание каждой цепи по методу Лоури (12). Величины радиоактивности выражали в импульсах в минуту на 1 мг цепи.

В другой серии опытов для предварительного промечивания инсулина *in vivo* крысам-самцам весом 150—200 г вводили 1- $C^{14}$ -тирозин с удельной активностью 80 мС/г из расчета 0,25 мС/100 г веса животного. Через 18—20 час., за которые свободная, не включившаяся в белки меченая аминокислота в основном выделялась из организма, животных забивали декапитацией. К измельченной ткани поджелудочной железы добавляли 10 мг «балластного» гептапептида и инкубировали одновременно с контрольной пробой (без намеченого — «балластного» гептапептида) при условиях, описанных выше.

По окончании инкубации из ткани поджелудочной железы выделяли инсулин, как описано выше в опытах с дипептидами. Выделенный инсулин подвергали трипсинизации и с помощью ионообменной хроматографии на колонке (1 × 26 см) с Дауэксом 50 × 2 отделяли гептапептид. Дезоктаинсулин окисляли надмуравьиной кислотой и разделяли на А-цепь и дезокта-В-цепь высоковольтным бумажным электрофорезом в веронал-мединаловом буфере pH 8,6.

Радиоактивность А-цепи, дезокта-В-цепи и гептапептида отсчитывали на газопроточном счетчике, а количественное содержание пептидов определяли по методу Фолина (13). Величины радиоактивности выражали в импульсах в минуту на 1 миллимоль тирозинового остатка.

Мы считали, что если произойдет переход немеченого пептида в состав молекулы инсулина в процессе ее биосинтеза без предварительного распада пептида до свободных аминокислот, то радиоактивность снизится только в В-цепи и не изменится в А-цепи. Если же пептид будет распадаться до свободных аминокислот, то последние будут снижать уровень радиоактивности в обеих цепях молекулы инсулина.

Результаты и обсуждение. Как видно из данных табл. 1, добавление к предварительно промеченной 1- $C^{14}$ -серином ткани поджелудочной железы дипептида гли-сер значительно снизило радиоактивность в цепи В инсулина и сравнительно мало отразилось на величине

радиоактивности цепи А. При введении в систему, синтезирующую инсулин в присутствии 1-С<sup>14</sup>-глицина, дипептида арг-гли величина радиоактивности резко падала (на 50%) в цепи В, в то время как в цепи А падения радиоактивности не наблюдалось.

В табл. 1 приведены данные по влиянию дипептидов лей-вал и ала-лей на величины радиоактивностей А- и В-цепей инсулина после включения

Таблица 1

Влияние «балластных» дипептидов на уровень радиоактивности А- и В-цепей инсулина, синтезировавшихся в присутствии С<sup>14</sup>-аминокислот

Использованная аминокислота	Использованный «балластный» дипептид	Цепи инсулина	Имп/мин на 1 мг цепи		Изменение в (%)
			контроль (без дипептида)	опыт (с дипептидом)	
С <sup>14</sup> -серин	гли — сер	А	1600	1350	-15,6
		В	752	427	-43,2
С <sup>14</sup> -глицин	арг — гли	А	2003	2026	+1,1
		В	6166	3093	-50,1
С <sup>14</sup> -лейцин	лей — вал	А	3027	3087	+2,0
		В	5000	2005	-59,9
С <sup>14</sup> -лейцин	ала — лей	А	3027	2316	-23,5
		В	5000	3450	-31,0

в них 1-С<sup>14</sup>-лейцина. Как видно из этих данных, введение «балластного» лей-вал снизило величину радиоактивности в цепи В и практически не изменило ее в цепи А.

Другой лейцин — содержащий дипептид ала-лей, приводил к снижению величины радиоактивности не только в В-цепи, но и в А-цепи, в от-

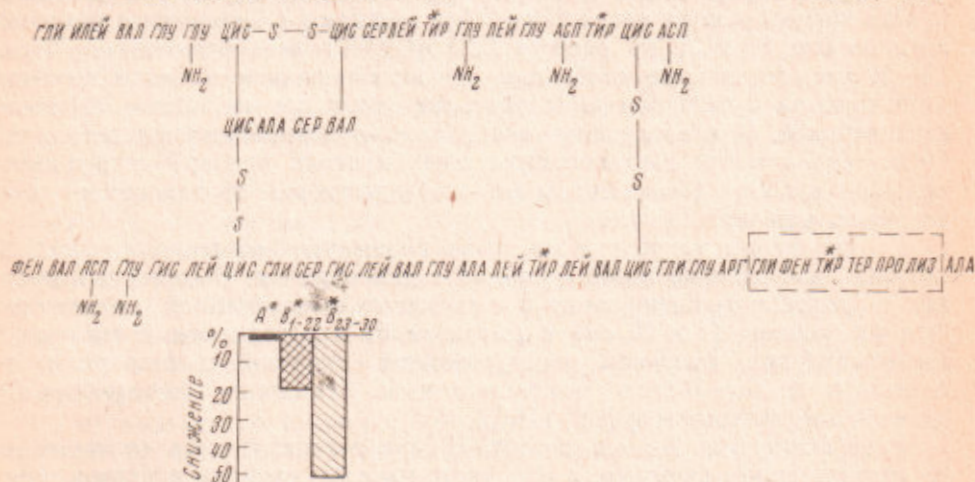


Рис. 1. Влияние «балластного» гептапептида на уровень радиоактивности в А- и В-цепях инсулина (B<sub>1-22</sub> и B<sub>23-29</sub>). Звездочкой отмечен тирозин-С<sup>14</sup>

личие от того, что наблюдалось при введении в инкубационную среду дипептидов арг-гли и лей-вал. Однако радиоактивность А-цепи под влиянием ала-лей снижалась на заметно меньшую величину, чем в цепи В.

Полученные данные с использованием дипептидов арг-гли, лей-вал и гли-сер указывают на возможность включения этих дипептидов как таковых в полипептидную цепь В инсулина. Однако из экспериментальных данных следует также, что вводимый в систему дипептид ала-лей, отсутствующий в А-цепи, снижает уровень ее радиоактивности по срав-

нению с контролем. Последнее обстоятельство указывает на частичный распад этого дипептида до свободных аминокислот.

На рис. 1 представлены данные по «балластированию» инсулинсинтезирующей системы гептапептидом гли-фен-фен-тир-тре-про-лиз. Как видно из этих данных, снижение величины радиоактивности происходило главным образом во фрагменте В-цепи, соответствующем гептапептиду. Незначительное разведение метки имело место также во фрагменте В-цепи, соответствующем дезоктапептиду, что обусловлено, по-видимому, частичной примесью к нему гептапептида. В то же время радиоактивность тирозиновых остатков А-цепи не менялась.

Преимущественное снижение радиоактивности в участке В-цепи, соответствующем гептапептиду, под влиянием «балластного» гептапептида свидетельствует об участии последнего как такового в синтезе В-цепи молекулы инсулина.

Таким образом, отдельные пептиды, сходные по аминокислотному составу с фрагментами В-цепи, могут являться предшественниками молекулы инсулина, непосредственно участвующими в ее построении.

Институт кардиологии им. А. Л. Мясникова  
Институт хирургии им. А. В. Вишневского  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
2 IV 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> M. Vaughan, C. B. Anfinsen, J. Biol. Chem., 211, 367 (1954). <sup>2</sup> A. S. Konikova, S. A. Morenkova, M. G. Kritzman, Nature, 206, 1005 (1965). <sup>3</sup> С. А. Моренкова, А. С. Коникова, М. Г. Крицман, ДАН, 163, 503 (1965). <sup>4</sup> A. S. Konikova, S. A. Morenkova, M. G. Kritzman, Biochim. et biophys. acta, 168, 252 (1968). <sup>5</sup> F. Sanger, Biochem. J., 44, 126 (1949). <sup>6</sup> V. Kostka, F. H. Carpenter, J. Biol. Chem., 239, 1799 (1964). <sup>7</sup> W. Groskopf, B. Hsieh et al., Biochim. et biophys. acta, 168, 376 (1968). <sup>8</sup> S. Moore, W. Stein, J. Biol. Chem., 211, 907 (1954). <sup>9</sup> C. W. Pettinga, Biochem. Prep., 6, 28 (1958). <sup>10</sup> I. Volker, E. Schumann, V. Holt, Biochem. Zs., 395, 382 (1962). <sup>11</sup> H. Brown, F. Sanger, P. Kitai, Biochem. J., 556, 60 (1955). <sup>12</sup> O. H. Lowry, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951). <sup>13</sup> O. Folin, V. Ciaccalten, J. Biol. Chem., 73, 627 (1927).