

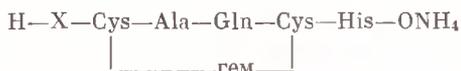
Г. А. ВАСИЛЬЕВА, А. Ф. МИРОНОВ, Р. П. ЕВСТИГНЕЕВА

МЕТОД УДЛИНЕНИЯ ПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ С N-КОНЦА В ГЕМПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТАХ ЦИТОХРОМА С

(Представлено академиком Ю. А. Овчинниковым 26 VII 1973)

Синтез гемпептидных комплексов — фрагментов цитохрома с и его аналогов является важным звеном в процессе изучения структуры и биокаталитической функции нативного белка. Известные в настоящее время методы получения гемпептидов (¹, ²) сопряжены со значительными трудностями. Наиболее сложным моментом в этих синтезах является создание простых тиоэфирных связей между молекулой гема и цистеинсодержащими пептидами. Поэтому значительный интерес представляет возможность получения различных гемпептидных комплексов на основе дигистеинилсодержащего гемпентапептида (I), аминокислотная последовательность которого является общей для большого числа природных цитохромов (³). Синтез этого гемпентапептида был осуществлен нами ранее (⁴).

Настоящая работа посвящена изучению способа создания гемпептидных комплексов путем последовательного наращивания аминокислотной цепи исходного гемпептида (I) с N-конца. Нами осуществлен синтез гемгекса-, гемгепта- и гемоктапептидов, соответствующих участкам 13—18, 12—18 и 11—18 белковой цепи цитохрома с млекопитающих (II—IV).



I—X=O; II—X=Lys; III—X=Cln—Lys; IV—X=Val—Gln—Lys.

При разработке данного метода синтеза необходимо было решить ряд вопросов, главный из которых связан с устойчивостью тиоэфирных связей гемпептидов в процессе наращивания пептидной цепи. Установлено, что эта связь устойчива в достаточно широком интервале pH (3—11) и не разрушается при обработке 1 N раствором хлористого водорода в диоксане. Поэтому для защиты α-аминофункции аминокислот была применена о-нитрофенилсульфенильная группа. Выбор защиты для ε-аминогруппы лизина обусловлен не только сохранением тиоэфирных связей гемпептида в процессе ее отщепления, но и устойчивостью самой защитной группировки при проведении пептидного синтеза. ε-Аминогруппа лизина блокировалась трифторацетильной защитой. Последняя избирательно вводится в ε-положение при действии на аминокислоту этилового эфира трифторуксусной кислоты и легко удаляется в мягких щелочных условиях.

Для создания пептидных связей был использован метод активированных эфиров. Среди преимуществ выбранного метода следует отметить существенное различие в растворимости образующихся при конденсации гемпептидов и вводимых в реакцию аминокислот, что дает возможность использовать большие избытки одного из компонентов и добиваться тем самым высокого выхода конечного продукта. Конденсация гемпентапептида (I) с *n*-нитрофениловым эфиром лизина проводилась в ДМФА при 20° в течение 96 час. при использовании 1,5-кратного избытка аминокислоты. При увеличении избытка до 3-кратного реакция длилась 4 часа. Активированный эфир аминокислоты отмывали абсолютным эфиром, а гемгексапеп-

тид после обработки 1 *N* раствором хлористого водорода в диоксане конденсировали с *N*-оксисукцинимидным эфиром *o*-нитрофенилсульфенил-*L*-глутамина в тех же условиях. Гемоктапептид (IV) получен при реакции гемпентапептида (III) с 3-кратным избытком *n*-нитрофенилового эфира *o*-нитрофенилсульфенил-*L*-валина в течение 96 час. при 20°. Контроль за ходом реакций осуществлялся хроматографически и спектрально по количеству образующегося *n*-нитрофенола. Последнее возможно при использо-

Таблица 1
Физико-химические свойства синтетических гемпептидных комплексов

Соединение	Электронные спектры λ_{max} , мμ	$[\alpha]_D^{20}$ в 25% NH ₄ OH	Хроматография на бумаге R_f , R_{f_2}
I	521, 522	+67° (с 0,18)	0,95 0,00
II	522, 552	+66,7° (с 0,09)	0,60 0,62
III	523, 552	+184,8° (с 0,032)	0,67 0,69
IV	522, 552	+246° (с 0,12)	0,80 0,74

вании небольших избытков активированных эфиров аминокислот. Выход на стадиях образования гемпептидных комплексов количественный.

Трифторацетильная защита *N*^ε-аминогруппы лизина удалялась обработкой 25% раствором аммиака при 28° в течение 1 часа. Суммар-

ный выход гемоктапептида (IV) составил 73%, считая на исходный гемпентапептид. Гомогенность синтезированных гемпептидов доказана хроматографически, а также электрофоретически в карбонатно-бикарбонатном (pH 9,2; 10,7) и ацетатном (pH 2,9) буферах. Аминокислотный состав гемпептидных комплексов подтвержден с помощью кислотного гидролиза и последующей хроматографией на бумаге, а конечный гемоктапептид (IV) охарактеризован количественным аминокислотным анализом (Glu 2,1, Ala 1,1, Val 0,9, His 0,99, Lys 1,0; цистеин в условиях гидролиза разрушается).

Гемпептидная структура полученных соединений установлена по электронным спектрам. Фрагменты природного цитохрома с в виде их гемохромогенов с пиридином характеризуются определенными полосами поглощения, λ_{max} 521, 551 мμ.

Физико-химические свойства синтезированных гемпептидов представлены в табл. 1.

Сравнение углов оптического вращения гемпептидных комплексов показывает постепенное увеличение их по мере удлинения пептидной цепи.

Хроматография на бумаге FN4 проводилась в системах:

этилацетат — пиридин — вода — уксусная кислота (5 : 5 : 3 : 1,25), (1)

хлороформ — метанол — вода — 25% раствор аммиака (4 : 2 : 1 : 2). (2)

Электронные спектры сняты на спектрофотометре фирмы «Хитачи» EPS-3T в водно-щелочном растворе (NaOH 0,0005 *M*) в присутствии пиридина (0,5 *M*); восстановитель — дитионит натрия. Углы оптического вращения измерены на спектрополяриметре А 1-СПУ МОИ.

Предложенный метод открывает возможность получения различных *N*-концевых фрагментов цитохрома с.

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Поступило
20 VII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Sano, M. Kurihara et al., Structure and Function of Cytochromes, Tokyo, 1968, p. 370. ² S. Ynouve, S. Sakakibara, S. Akabori, Bull. Chem. Soc. Japan, 37, 713 (1964). ³ R. E. Dickerson, T. Takano et al. J. Biol. Chem., 246, 1511 (1971). ⁴ Г. А. Васильева, А. Ф. Миронов, Р. П. Евстигнеева, ЖОХ, 42, 2002 (1972).