

И. Л. КАГАНОВА и действительный член Академии медицинских наук СССР
В. Н. ОРЕХОВИЧ

О СИНТЕЗЕ ПЕПТИДОВ ХИМОТРИПСИНОМ

В ряде статей, опубликованных за последние несколько лет в различных журналах (¹⁻⁹), описаны результаты исследований, касающихся синтеза пептидных связей и удлинения цепей пептидов при помощи протеолитических ферментов разного происхождения (химотрипсин, папаин, катепсин селезенки). Упомянутые работы могут иметь существенное значение для расшифровки механизма синтеза белков и пептидов в организме.

Различными исследователями были синтезированы ферментативным путем пептиды и эфиры пептидов из эфиров ряда аминокислот. Мы в своей работе использовали в качестве субстрата хлоргидрат этилового эфира тирозина, а в качестве фермента — химотрипсин. Акцепторами тирозина в наших опытах были различные аминокислоты и нерасщепляющиеся химотрипсином амиды, пептиды и эфиры аминокислот.

Опыты проводились в следующих условиях. Смесь, подвергавшаяся инкубации, состояла из 6% водного раствора эфира тирозина и 2—6% растворов других добавляемых веществ (амидов, пептидов и т. д.) и 1—1,5 мг кристаллического химотрипсина. Общий объем пробы 0,25—0,5 мл, pH среды от 6,8 до 9,5. Пробы инкубировались в термостате при температуре 25—37° от 10 мин. до 2 час. По истечении указанного времени химотрипсин в пробах инактивировался. О синтезе пептидов мы судили по появлению новых пятен на хроматограммах и на основании данных о составе вновь появившихся соединений. В качестве растворителей при хроматографировании нами были использованы 80% раствор изопропилового спирта и смесь бутанола, уксусной кислоты и воды (75 : 7 : 18).

В первой серии опытов мы инкубировали эфир тирозина с химотрипсином без каких-либо добавок. Уже через 10 мин. после начала инкубации на хроматограмме было обнаружено новое пятно (см. рис. 1, пятно 3). Это пятно становилось все более интенсивным по мере удлинения времени инкубации указанной выше пробы. Вместе с тем пятно, образованное эфиром тирозина (пятно 2), постепенно уменьшалось и на хроматограмме пробы, подвергшейся 4-часовой инкубации, было еле заметным. В процессе инкубации увеличивалось и количество свободного тирозина в пробе, что можно было наблюдать по увеличению интенсивности пятна 1.

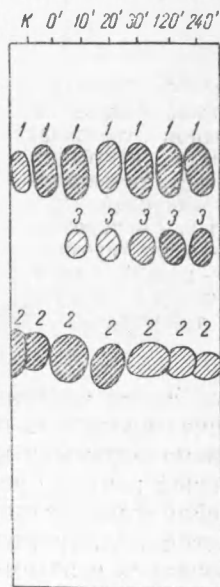


Рис. 1. Хроматограмма опыта с эфиром тирозина. Время инкубации разное, температура инкубации 24°, pH 7,3. 1 — тирозин; 2 — эфир тирозина; 3 — пептид тирозина (1)

Описанные выше опыты проводились при рН среды 7—7,3. В тех случаях, когда среда была более щелочной (рН 8—9,5), в пробах образовывалось еще одно новое соединение, которое на хроматограммах проявилось в виде второго нового пятна (см. рис. 2, пятно 4). В контрольных пробах, в которых содержался эфир тирозина без химотрипсина или с инактивированным химотрипсином, никаких новых пятен на хроматограммах не появлялось. Не появлялось новых пятен на хроматограммах и при инкубации с химотрипсином свободного тирозина. Вновь синтезированные соединения, о которых мы писали выше, экстрагировались из бумаги и гидролизировались соляной кислотой (6 *N*) в течение 24 час.



Рис. 2. Хроматограмма опыта с эфиром тирозина. Время инкубации 4 часа, температура инкубации 25°, рН 9. 1 — тирозин; 2 — эфир тирозина; 3 — пептид тирозина (1); 4 — пептид тирозина (2)

В гидролизатах был обнаружен тирозин. Можно предполагать, что соединения, образующиеся в результате инкубации эфира тирозина с химотрипсином, представляют собой дипептид и трипептид тирозина или эфиры этих пептидов.

В ряде других опытов в качестве акцепторов тирозина были испытаны следующие вещества: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин, лейцин, аспарагин, глутамин, лейцилглицин, лейцилглицилглицин, глицилглицин, глицилтирозин, глицилтриптофан, этиловый эфир глицина, изопропиловый эфир норлейцина.

В процессе инкубации эфира тирозина с аспарагином в присутствии химотрипсина образовалось новое соединение, что можно было установить по появлению нового пятна на хроматограммах. После гидролиза этого соединения, экстрагированного из бумаги, в гидролизате были обнаружены тирозин и аспарагиновая кислота. Синтез нового пептида при инкубации эфира тирозина с глутамином идет гораздо хуже, так как вновь появляющееся пятно пептида очень слабое. При инкубации смесей химотрипсина, эфира тирозина, глутаминовой и аспарагиновой кислот синтез пептидов не наблюдался.

Очень быстро осуществлялся синтез новых пептидов в тех случаях, когда в качестве акцепторов были использованы лейцилглицин, лейцилглицилглицин, а также изопропиловый эфир норлейцина. При инкуба-

ции смеси указанных выше пептидов с эфиром тирозина и химотрипсином синтезировались пептиды, о чем можно было судить по появлению на хроматограммах новых пятен (см. рис. 3). В опытах с лейцилглицином новый пептид проявился в виде пятна 18 на хроматограмме; в пробе с лейцилглицилглицином — пятна 16 и в пробе с эфиром норлейцина — пятна 20. Эти пептиды после хроматографирования на бумаге экстрагировались и затем подвергались гидролизу. В пробах, в которых в качестве акцептора тирозина был использован лейцилглицин, вновь синтезированный пептид состоял из тирозина, глицина и лейцина. Те же аминокислоты были обнаружены в пептиде, полученном при инкубации эфира тирозина с лейцилглицилглицином. В пептиде, синтезированном при участии эфира норлейцина, были обнаружены тирозин и норлейцин.

В пептиде, который был синтезирован в опытах с лейцилглицилглицином в качестве акцептора тирозина, определялась концевая аминокислота аминного конца пептида при помощи фтординитробензола по методу Сангера (10). Оказалось, что концевой аминокислотой является аминокислота тирозина. Так как лейцилглицилглицин химотрипсином не расщепляется, то из наших данных следует, что новый пептид является тетрапептидом — тирозиллейцилглицилглицином. Надо думать, что другие два новых пептида являются тирозиллейцилглицином и эфиром ди-

пептида тирозилнорлейцина. В отсутствие химотрипсина синтез указанных выше пептидов не наблюдался. Не наблюдался синтез пептидов и в тех случаях, когда к смеси химотрипсина и эфира тирозина добавлялись не пептиды лейцина, а свободный лейцин.

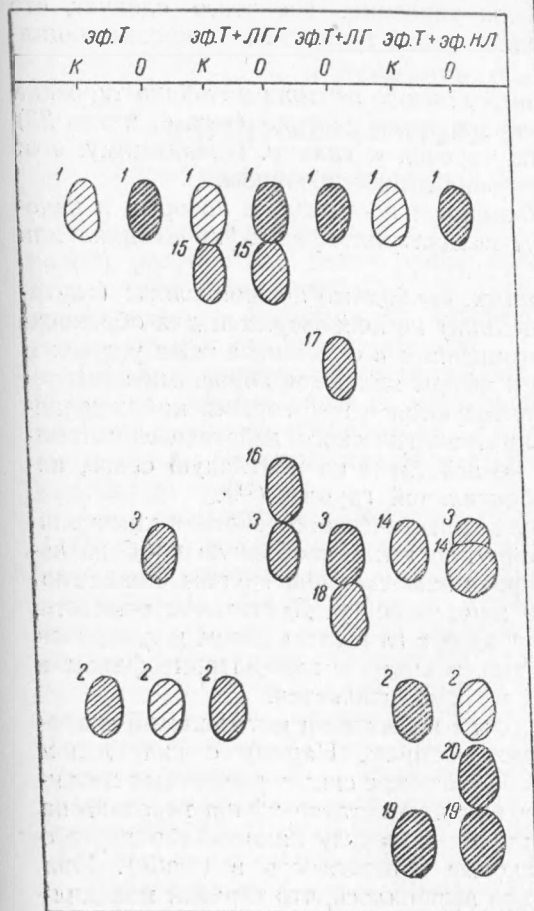


Рис. 3. Хроматограмма опытов с эфиром тирозина и производными лейцина. В опыте с эфиром тирозина и лейцилглицилглицином время инкубации 2,5 часа, температура инкубации 28°, рН проб 9. В опытах с эфиром тирозина и лейцилглицином, а также с эфиром норлейцина время инкубации 2 часа, температура инкубации 32°, рН 9. 1—тирозин; 2—эфир тирозина; 3—пептид тирозина; 14—норлейцин; 15—лейцилглицилглицин; 16—тирозиллейцилглицилглицин; 17—лейцилглицин; 18—тирозиллейцилглицин; 19—эфир норлейцина; 20—эфир тирозилнорлейцина. К—пробы без фермента; О—пробы с ферментом; эф. Т—эфир тирозина; ЛГГ—лейцилглицилглицин; ЛГ—лейцилглицин; эф. НЛ—эфир норлейцина

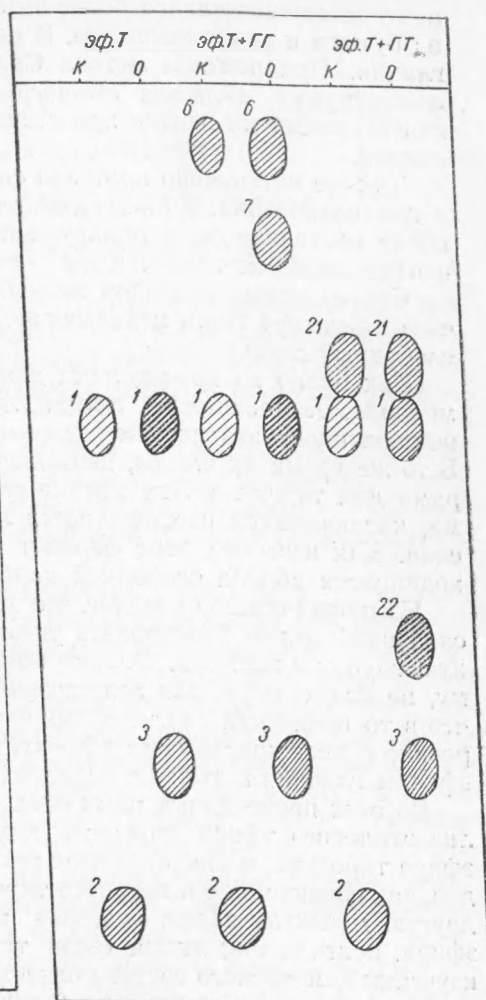


Рис. 4. Хроматограмма опытов с эфиром тирозина и пептидами глицина. В опыте с эфиром тирозина и глицилглицином время инкубации 2 часа, температура инкубации 27°, рН 9. В опыте с эфиром тирозина и глицилтирозином время инкубации 35°, рН 7,6. 1—тирозин; 2—эфир тирозина; 3—пептид тирозина; 6—глицилглицин; 7—тирозилглицилглицин; 21—глицилтирозин; 22—тирозилглицилтирозин. К—пробы без фермента; О—пробы с ферментом; эф. Т—эфир тирозина; ГГ—глицилглицин; ГТ—глицилтирозин

В одной из серий опытов в качестве акцептора тирозина были использованы глицилглицин и глицилтирозин. При инкубации химотрипсина с

эфиром тирозина и глицилглицином синтезировался пептид, образование которого в смеси можно было установить по появлению на хроматограмме нового пятна (см. рис. 4, пятно 7), расположенного между пятном глицилглицина (пятно 6) и пятном тирозина (пятно 1). При pH 9 синтез этого пептида осуществлялся более интенсивно. Новый пептид экстрагировался из бумаги и гидролизировался. В гидролизате были обнаружены тирозин и глицин. При помощи метода Сангера было установлено, что концевой аминокислотой является аминокислота тирозина. Из этого следует, что синтезированный пептид представляет собой трипептид — тирозилглицилглицин.

Так же интенсивно протекал синтез нового пептида из эфира тирозина и глицилтирозина. Во вновь синтезированном пептиде (рис. 4, пятно 22) после гидролиза были обнаружены тирозин и глицин. Повидимому, этот пептид является трипептидом — тирозилглицилтирозином.

Синтез новых пептидов не наблюдался в опытах, в которых в качестве акцептора были использованы глицилтриптофан, эфир глицина или свободный глицин.

Как видно из приведенных данных, свободные аминокислоты (глутаминовая, аспарагиновая, глицин, лейцин) не используются для образования пептидов, синтезируемых химотрипсином в описанных нами условиях. В то же время их амиды, пептиды и эфиры являются хорошими акцепторами для тирозина. Эти данные согласуются с некоторыми наблюдениями, касающимися специфичности протеолитического действия химотрипсина. Как известно, этот фермент не действует на пептидную связь, находящуюся вблизи свободной карбоксильной группы (¹¹).

Из наших опытов следует, что для синтетического действия химотрипсина необходимо блокировать упомянутую выше свободную карбоксильную группу акцептора. Однако природа замещающей группы, повидимому, не безразлична для активности химотрипсина. Достаточно отметить, что в то время как синтез новых пептидов с глицилглицином и глицилтирозином протекает весьма эффективно, реакция с глицилтриптофаном и эфиром глицина в этих же условиях не осуществляется.

Во всех проведенных нами опытах мы наблюдали интенсивный гидролиз этилового эфира тирозина химотрипсином. Наряду с гидролизом эфира тирозина, в инкубируемой пробе протекал синтез различных пептидов, заключающийся в переносе тирозилового остатка эфира тирозина на другую молекулу эфира тирозина или на молекулу какого-либо другого эфира, пептида или амида (если таковые содержались в пробе). При изучении химического состава пептидов выяснилось, что тирозин находился на аминном конце пептида («карбоксильный» перенос).

Быстрота, с которой протекал синтез различных пептидов, и участие в реакции разнообразных соединений дают некоторое основание говорить о существенном биологическом значении этой реакции.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
25 I 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. B. Johnston, Mary J. Mycek, J. S. Fruton, J. Biol. Chem., 185, 629 (1950). ² R. B. Johnston, Mary J. Mycek, J. S. Fruton, *ibid.*, 187, 205 (1950). ³ J. S. Fruton, R. B. Johnston, M. Fried, *ibid.*, 190, 39 (1951). ⁴ M. E. Jones, W. R. Hearn, *et al.*, *ibid.*, 195, 645 (1952). ⁵ J. S. Fruton, Symposium Biogen. Proteines, 1952, p. 5. ⁶ J. S. Fruton, W. R. Hearn, *et al.*, J. Biol. Chem., 201, 891 (1953). ⁷ M. Brenner, H. R. Müller, R. W. Pfister, *Helv. Chim. Acta*, 33, 568 (1950). ⁸ M. Brenner, E. Sailer, K. Rüfenacht, *ibid.*, 34, 2098 (1951). ⁹ H. Tauber, J. Am. Chem. Soc., 74, 847 (1952). ¹⁰ F. Sanger, *Biochem. J.*, 39, 507 (1945). ¹¹ H. Neurath, G. Schwert, *Chem. Rev.*, 46, 69 (1950).