



УДК 547.963.4

УЛУЧШЕННЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ГЕМПЕПТИДНЫХ
КОМПЛЕКСОВ — ФРАГМЕНТОВ ЦИТОХРОМА С

*Васильева Г. А., Сидорова Т. А., Аларкон Н. Л.,
Мирунов А. Ф., Евстигнеева Р. П.*

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

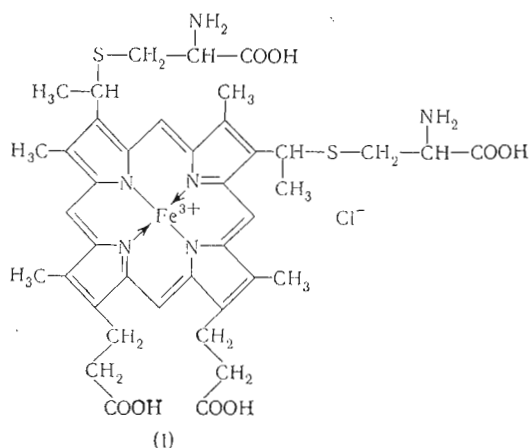
Исследована реакция между цистеином, цистином, цистеинсодержащими пептидами и геминном в среде жидкого аммиака в присутствии металлического натрия. Показано, что для образования гемпептидных комплексов необходимы восстановление порфиринового ядра и наличие связи S—Na на цистеинсодержащем пептиде. Применение сульфата закисного железа при реакции гемина с пептидами в описанных условиях позволило значительно увеличить выход целевых соединений. По усовершенствованному методу синтеза и очистки получены гемпептиды — фрагменты цитохрома с с выходом 53—90%.

Гемпептидные комплексы — фрагменты и аналоги цитохрома с получают при реакции протопорфирина IX или его железного комплекса с цистеинсодержащими пептидами. Взаимодействие последних с геминном обычно осуществляют в жидком аммиаке, содержащем металлический натрий [1], реакцию с протопорфирином IX проводят в водной среде с использованием амальгамы натрия [2]. Первый способ [1] более удобен в препаративном отношении, так как позволяет проводить деблокирование функциональных групп пептидов и последующую гемпептидную конденсацию в одном реакционном сосуде. Используя этот метод, мы осуществили синтез ряда гемпептидных комплексов — фрагментов цитохромов с млекопитающих и человека [3, 4].

Настоящая работа посвящена дальнейшему усовершенствованию этого метода. В качестве объекта исследования выбран 2,4- α, α' -ди-S-L-цистеинил-мезогемин IX (I). Он образуется при конденсации гемина с цистином в среде жидкого аммиака в присутствии металлического натрия. При восстановительном расщеплении цистина в описанных условиях образуется связь S—Na. Конденсация аминокислоты с геминном проходит с 30%-ным выходом, что согласуется с результатами, полученными нами ранее [3].

В отличие от этого цистеин плохо реагирует с натрием в жидком аммиаке, что обусловлено, вероятно, большей энергией диссоциации SH-связи (81,1 ккал/моль) по сравнению с S-S-связью (50,9 ккал/моль). Выход гема с (I) при реакции с хлоргидратом цистеина не превышал 18%.

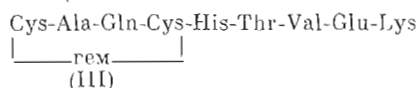
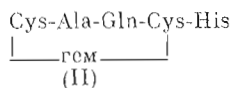
Необходимым условием для образования тиоэфирных связей является восстановление порфиринового цикла. Присоединение аминокислоты или пептида к гему происходит в процессе его аутоокисления [2, 3]. Можно предположить, что окислительно-восстановительные превращения гема и порфириновой системы с участием железа инициируют присоединение



цистеинсодержащих пептидов к винильным группам гема. В этом случае увеличение концентрации Fe^{2+} в реакционной смеси должно привести к повышению выхода целевого соединения. Действительно, при добавлении сульфата закисного железа выход гема с составил 57%.

При получении гемпептидных комплексов большое значение имеют методы их выделения и очистки. Ранее для очистки использовали диализ и хроматографию на колонках с сефадексом G-10 [3, 4]. Обработка реакционной смеси конц. HCl в течение 20 мин. при 20° после удаления аммиака позволяет освободиться от непрореагировавшего пептида и значительного количества солей. Показано, что при выделении гема с такая обработка даже в течение 12 ч не приводит к заметному разрушению тиоэфирных связей. Однако следует отметить, что по окончании конденсации в реакционную смесь необходимо добавлять окислитель, например $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, для предотвращения удаления железа (Fe^{2+}) из гемпептидных комплексов при действии конц. HCl . После удаления HCl остаток растворяли в минимальном объеме 25% NH_4OH и очищали на колошке с сефадексом G-15.

В дальнейшем по усовершенствованному методу синтеза и очистки были получены гемпептид (II) и гемнонапептид (III), входящие в состав цитохрома с млекопитающих.



Выход гемпептидов по предлагаемой методике составил 53-90%. Строение их подтверждено сравнением с аналитическими образцами [3, 4]. Гем с после удаления железа и обработки диазометаном охарактеризован также в виде тетраметилового эфира порфирина с [5].

Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Аминокислота (пептид), вводимая в реакцию с геминном	Количество FeSO_4 , эквиваленты	Выход, %
Цистенин	—	18
Цистин	—	31
Цистин	1	32
Цистин	4	57
Пептапептид	2	90
Нонапептид	2	53

Таким образом, осуществление реакции гемина с цистеинсодержащими пептидами в присутствии сульфата закисного железа позволяет значительно увеличить выход целевых соединений.

Проведенные исследования показали, что использование защищенных пептидов в качестве исходных веществ для получения гемпептидных комплексов не только удобно, но и необходимо. Именно в этом случае при обработке натрием в жидком аммиаке на цистеинсодержащем пептиде образуется связь S—Na, наличие которой является необходимым условием для образования тиоэфирных мостиков.

Экспериментальная часть

Чистоту полученных соединений проверяли хроматографически: на силикагеле (пластинки «Silufol» UV₂₅₄, Чехословакия) в смеси метанол — пиридин — вода, 4 : 1 : 4 (А), на бумаге FN-4 в смесях: этилацетат — пиридин — вода — уксусная кислота, 5 : 5 : 3 : 1,25 (Б), хлороформ — метанол — вода — 25% NH₄OH, 4 : 2 : 1 : 2 (В). Электронные спектры сняты на спектрофотометре фирмы «Hitachi» EPS-3T (Япония) в воднощелочном растворе (NaOH 0,0005 М) в присутствии пиридина (0,5 М), восстановитель — дитионит натрия.

2,4-α,α'-Ди-(S-L-цистеинил-мезогемин IX (I). К раствору 0,116 ммоль L-цистина в 30 мл перегнанного аммиака при перемешивании прибавляли 0,421 ммоль металлического натрия. При —33° к бесцветному раствору добавляли 0,420 ммоль мелкоизмельченного сульфата закисного железа, перемешивали 10 мин. Затем прибавляли 0,945 ммоль натрия и 0,105 ммоль гемина. Перемешивали 1—1,5 ч. После испарения аммиака сухой остаток обрабатывали 10 мг конц. HCl 20 мин. при 20°. Центрифугировали, осадок промывали водой, растворяли в 25% NH₄OH и очищали на колонке с сефадексом G-15. Колонку предварительно уравнивали верхней фазой системы хлороформ — метанол — 25% NH₄OH, 4 : 1 : 4. Элюцию проводили дистиллированной водой. Выход лиофильно высушенного препарата 57%, R_f 0,69 (А); электронные спектры, λ_{макс}: 521, 552 нм [5].

2,4-α,α'-Ди-(S-L-цистеинил-L-аланил-L-глутаминил-S-L-цистеинил-L-гистидил)-мезогематин IX (II). К раствору 100 мг Z-L-Cys(Bzl)-L-Ala-L-Gln-L-Cys(Bzl)-L-His(Bzl)-OBzl [3] в 100 мл жидкого аммиака (—33°) при перемешивании прибавляли небольшими порциями металлический натрий до тех пор, пока раствор сохранял синюю окраску в течение 10 мин. На это требовалось 35—45 мин. К бесцветному раствору добавляли 30 мг мелкоизмельченного сульфата закисного железа и перемешивали 10 мин. Затем при —33° прибавляли 19,2 мг натрия и 59,7 мг гемина. Перемешивали 1 ч, всыпали 15 мг сульфата окисного железа. После испарения аммиака сухой остаток обрабатывали 15 мл конц. HCl в течение 20 мин. Центрифугировали, осадок промывали водой и очищали на колонке с сефадексом G-15, как описано выше. Выход лиофильно высушенного вещества 98,5 мг (90%), R_f 0,95 (Б). Электронные спектры, λ_{макс}: 521, 551 нм.

2,4-α,α'-Ди-(S-L-цистеинил-L-аланил-L-глутаминил-S-L-цистеинил-L-гистидил-L-треонил-L-валил-L-глутамил-L-лизил)-мезогематин IX (III) получен в аналогичных условиях при реакции защищенного пептида Z-L-Cys(Bzl)-L-Ala-L-Gln-L-Cys(Bzl)-L-His(Bzl)-L-Thr-L-Val-L-Glu(γ-Bzl)-L-Lys(Z)-OBzl [4] с выходом 53%, R_f 0,75 (Б), R_f 0,83 (В). Электронные спектры, λ_{макс}: 520, 551 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Inoue S., Sakakibara S., Akabōri S. (1964) Bull. Chem. Soc. Jap., 37, 713—718.
2. Sano S., Nanzyo N., Rimington C. (1964) Biochem. J., 93, 270—280.
3. Васильева Г. А., Миронов А. Ф., Евстигнеева Р. П. (1972) ЖР. общ. химии, 42, 1402—1404.

4. Васильева Г. А., Миронов А. Ф., Гурьшев В. Н., Медникова Т. А., Маркова Л. Ф., Евстигнеева Р. П. (1973) Ж. общ. химии, 43, 1849—1851.
5. Gnichtel H., Lautsch W. (1965) Chem. Ber., 98, 1647—1654.

Поступила в редакцию *
19.XI.1974

MODIFIED SYNTHESIS OF HEMOPEPTIDE FRAGMENTS OF CYTOCHROME *c*

VASILIEVA A. F., SIDOROVA T. A., ALARCKON N. L.,
MIRONOV A. F., EVSTIGNEEVA R. P.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

A study was made of the reaction between cysteine-containing peptides and heme in the presence of metallic sodium in liquid ammonia. Apart from the reduction of porphyrin moiety, the peptide S-Na bond is essential for the formation of hemopeptide complexes. These compounds which represent the fragments of mammalian cytochrome *c* were obtained in 53-90% yield utilizing ferrous sulfate.

* Статья из портфеля редакции «Журнал общей химии»; дата поступления — 2.VII.1974 г.