



УДК 547.962.04+547.962.02

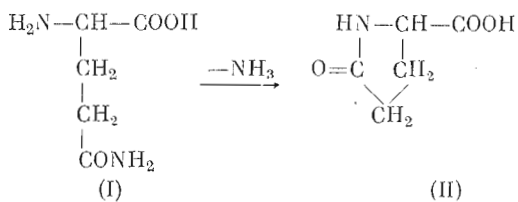
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТИЛАМИНА ДЛЯ РАСКРЫТИЯ
ПИРРОЛИДОНОВОГО КОЛЬЦА N-КОНЦЕВОГО ПИРОГЛУТАМИЛА
В ПЕПТИДАХ

Муранова Т. А., Муранов А. В.

Институт белка Академии наук СССР, Пущино, Московская обл.

Раскрытие пирролидинового кольца N-концевого пироглутамила в пептидах происходит при обработке последних 17% раствором метиламина при 37°C в течение 14 ч. При этом остаток пироглутаминовой кислоты превращается в остаток γ -метилглутамина. Разрыва пептидных связей в описанных условиях не наблюдалось.

Известно, что глутамин (I) легко дезамидируется в относительно мягких условиях. Дезамидирование в слабокислой или слабощелочной и даже в нейтральной среде часто сопровождается образованием соответствующего лактама (пирролидонкарбоновой или пироглутаминовой кислоты (II)) [1].



Было показано, что возможность замыкания пирролидинового кольца зависит от pH. При pH 6,5 равновесие сдвинуто почти полностью в сторону образования пирролидонкарбоновой кислоты. Пептиды, содержащие глутамин на N-конце, при 37°C в интервале pH от 2 до 8 теряют NH₃, что может сопровождаться быстрым образованием пирролидонкарбоновой кислоты [2]. Указания на этот тип вторичного преобразования N-концевого глутамила были получены при исследовании первичной структуры различных белков. Исследованиями Мелвилля [2] установлено, что образования остатка пирролидонкарбоновой кислоты можно ожидать при длительных процедурах выделения белков и пептидов, особенно при повышенной температуре.

Очевидно, что присутствие остатков пироглутаминовой кислоты обуславливает значительные трудности при структурном анализе пептидов и белков. Наиболее серьезным осложнением является невозможность деградации пептидов с N-конца. N-Концевой пироглутамил не реагирует с фенилизотиоцианатом, динитрофторбензолом и дансилхлоридом, обычно используемыми при определении аминокислотных последовательностей

**Аминокислотные последовательности пептидов, подвергнутых
обработке метиламином**

Пептид	Аминокислотная последовательность	Кол-во остатков аминокислот в пептиде
А	Gln-Ile-Lys	3
Б	Gln-Phe-Pro-Glx-Pro-Val-Ile-Ser-Glx- Ala-Val-Glx-Pro-Lys	14
В	Gln-Tyr-Glu-Pro-His-Arg	6
Г	Gln-Phe-Pro-Glx-Pro-Val-Ile-Ser-Glx- Ala-Val-Glx-Pro-Lys-(Gly, Ala, Val, Ile, Phe, Arg)	20

пептидов. Пептид, содержащий на N-конце остаток пироглутаминовой кислоты, не окрашивается нингидрином (если он не содержит одновременно остатков лизина).

Существует несколько методов раскрытия пирролидинового кольца в пептидах, но все они имеют серьезные недостатки, связанные либо с труднодоступностью реагентов, либо с довольно жесткими условиями обработки пептидов, что может приводить к разрушению или модификации других аминокислотных остатков или даже разрывам пептидной связи. Так, использование 1 М NaOH [3—5] может привести к следующим побочным реакциям: гидролизу пептидных связей [6, 7], разрушению остатков цистеина [8, 9], образованию необычных аминокислот [8—11]. Восстановление пироглутамила в остатки пролина [12] дибораном в тетрагидрофуране сопровождается восстановлением остатков аспарагиновой кислоты в гомосерин, приводит к уменьшению количества тирозина, в некоторых случаях наблюдается восстановление карбоксильных и пептидных групп [12]. При метанолизе пирролидинового кольца N-концевой пироглутаминовой кислоты 1 н. HCl в метаноле [13] наблюдалось расщепление связи Gly-Gly, обратимая этерификация карбоксильных групп и N→O-ацильная миграция остатков серина и треонина.

Удаление аминоконцевого остатка пироглутаминовой кислоты пирролидонкарбоксилилизептидазой из *Pseudomonas fluorescens* [14, 15] — самый мягкий и достаточно эффективный из имеющихся методов деблокирования пироглутамилипептидов. Природа соседнего остатка сильно влияет на скорость отщепления, а в том случае, когда соседним с остатком пироглутаминовой кислоты является остаток пролина, отщепления вообще не наблюдается. Авторы этого метода подчеркивают его ограниченность при использовании для длинных пептидов.

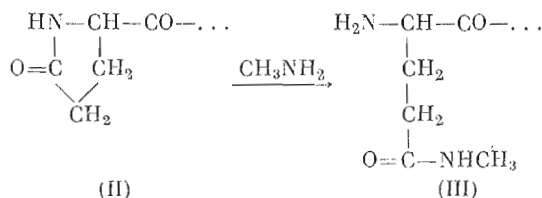
В настоящей работе представлен новый метод раскрытия пирролидинового кольца N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты в пептидах с помощью метиламина. В основе метода лежит способ получения γ -метилового производного глутаминовой кислоты, предложенный Н. Лихтенштейном [16] и заключающийся в обработке пирролидонкарбоновой кислоты 17% раствором метиламина в течение 10 сут при 37° С.

В своем исследовании мы использовали четыре пептида, полученные при протеолитическом расщеплении фактора элонгации IF-G* (таблица). Все они содержали на N-конце остаток пироглутаминовой кислоты и были подвергнуты обработке раствором метиламина. Аминокислотные последовательности пептидов А, Б, Г были определены после раскрытия пирролидинового кольца. Последовательность пептида В была известна.

Можно предположить, что в соответствии с данными Н. Лихтенштейна при обработке пироглутамила раствором метиламина должно происходить раскрытие пирролидинового кольца с образованием γ -метилового

* Подробное сообщение готовится к печати.

производного остатка глутамина, так называемого метилглутамина (III)

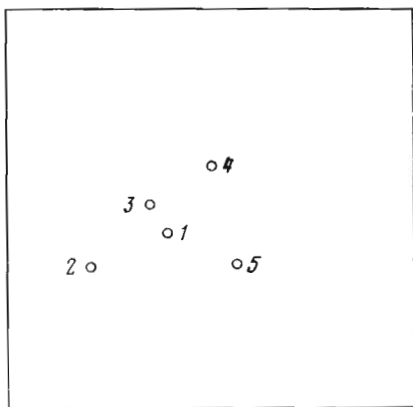


Метилглутамин является довольно устойчивым соединением [16]. Он имеет свободную аминогруппу, способную вступать в реакцию с реагентами, используемыми при определении аминокислотных последовательностей пептидов, в том числе с дансилхлоридом, что позволяет регистрировать его появление в ходе реакции. Необходимо иметь в виду, что на самом деле при этом регистрируется дансильное производное глутаминовой кислоты, так как в условиях кислотного гидролиза, которому подвергаются пептиды после обработки дансилхлоридом, метиламин отщепляется [17]. По интенсивности пятна Dns-Glu при ТСХ на силикагеле можно судить о ходе превращения пироглутамила в остаток метилглутамина в пептиде.

Метиламин является летучим соединением, поэтому после обработки пептидов он легко удаляется упариванием. Однако некоторое его количество все же сорбируется сухим остатком пептида и вместе с ним подвергается реакции дансильрования. На рисунке показано положение пятна, соответствующего дансильному производному метиламина при ТСХ на силикагеле. Остаток метилглутамина легко вступает в реакцию с фенилизотиоцианатом [17], что дает возможность определять аминокислотные последовательности пептидов, содержащих его на N-конце, методом Эдмана.

При обработке метиламином всех вышеперечисленных пептидов (таблица) не наблюдалось появления дополнительных N-концевых аминокислотных остатков. Следовательно, в указанных условиях расщепления пептидной связи не происходило. Аминокислотный состав пептидов остался неизменным.

Для исследования кинетики образования метилглутамина и влияния концентрации метиламина на этот процесс был использован пептид А, который подвергли обработке метиламином в различных условиях. Увеличение времени обработки пептида (более 14 ч) не привело к усилению интенсивности пятна Dns-Glu при ТСХ на силикагеле. Уменьшение концентрации метиламина, по-видимому, резко замедляет процесс. Оптимальными условиями для данного пептида является обработка 17% раствором метиламина в течение 14 ч. Концентрация пептида в растворе не имеет особого значения. При исследовании пептида В (таблица) первоначальная обработка метиламином в течение ночи при 37°С не привела к раскрытию пирролидинового кольца, поэтому инкубацию продолжили в течение 2 сут при 50°С. Однако даже при повышенной температуре не произошло раскрытия цикла. Очевидно, расположение остатка тирозина по соседству с пироглутамилом снижает реакционную способность пирро-



Двумерная ТСХ на силикагеле дансильного производного метиламина (1). Для сравнения указаны положения Dns-Ser (2), Dns-Gly (3), Dns-Ala (4), Dns-Pro (5). Условия см. [18, 19]

лидонового кольца. Аналогичный эффект наблюдался и при обработке пироглутамилпептидов пирролидонкарбоксилилизпептидазой [14].

Представленный в данной работе метод раскрытия пирролидонового кольца пироглутамила метиламином обладает рядом преимуществ по сравнению с описанными в литературе. Во-первых, обработка пептидов проводится в достаточно мягких условиях, которые не приводят к модификации других аминокислотных остатков и расщеплению пептидной связи. Во-вторых, метиламин не является дефицитным реактивом, что определяет доступность метода для широкого круга исследователей, и, наконец, метод достаточно прост в исполнении.

Экспериментальная часть

Раскрытие пирролидонового кольца пироглутамила. 20–30 нмоль пептида высушивали в стеклянных ампулах, добавляли 50 мкл 17% раствора метиламина (ч.) и инкубировали при 37° С. Для контроля за ходом реакции через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 5 нмоль и определяли в них N-концевой остаток метилглутамина. Для этого аликвоты высушивали в вакууме, добавляли 30 мкл воды, встряхивали и снова высушивали. Промывку водой повторяли три раза (для удаления избытка метиламина). Высушенный пептид растворяли в воде и подвергали процедуре определения N-концевой аминокислоты дансильным методом с последующей идентификацией Dns-аминокислот ТСХ на силикагеле [18, 19]. Реакцию заканчивали через 14 ч, после прекращения роста интенсивности пятна, соответствующего Dns-Glu.

Аминокислотные последовательности пептидов определяли методом Эдмана в модификации Р. Чена [20].

Авторы выражают глубокую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянный интерес и ценные советы при обсуждении этой работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Methods in Enzymology (1967) vol. XI, pp. 398–411, C. H. W. Hirs, ed., Acad. Press, New York, London.
2. Melville J. (1935) Biochem. J., **29**, 179–186.
3. Dekker C. A., Stone D., Fruton J. S. (1949) J. Biol. Chem., **181**, 719–729.
4. Blombäck B., Doolittle R. F. (1963) Acta chem. scand., **17**, 1816–1819.
5. Ikenaka T., Schmid K. (1965) Proc. Soc. Exptl Biol. Med., **120**, 749–751.
6. Levene P. A., Bass L. W. (1929) J. Biol. Chem., **82**, 171–172.
7. Werner R. C., Cannan R. K. (1942) J. Biol. Chem., **142**, 725–739.
8. Cecil R., McPhee J. R. (1959) Adv. Prot. Chem., **14**, 255–260.
9. Patchornik A., Sokolovsky M. (1964) J. Amer. Chem. Soc., **86**, 1206–1212, 1860–1861.
10. Bohak Z. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2878–2887.
11. Ziegler K., Melchert I., Lürken C. (1967) Nature, **214**, 404–405.
12. Takahashi S., Cohen L. A. (1969) Biochemistry, **8**, 864–870.
13. Kawasaki I., Itano H. A. (1972) Anal. Biochem., **48**, 546–556.
14. Uliana J. A., Doolittle R. F. (1969) Arch. Biochem. and Biophys., **131**, 561–565.
15. Doolittle R. F., Armentraut R. W. (1969) Biochemistry, **8**, 864–870.
16. Lichtenstein N. (1942) J. Amer. Chem. Soc., **64**, 1021–1023.
17. Муранов А. В., Муранова Т. А., Маркова Л. Ф., Овчинников Ю. А. (1979) Био-орган. химия, **5**, 987–1006.
18. Белецкий Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. (1967) Докл. АН СССР, **172**, 91–93.
19. Белецкий Б. Г., Ганкина Э. С., Прявишников С. Р., Эрастов Д. П. (1967) Молекулярн. биология, **1**, 184–189.
20. Chen R. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, 873–886.

Поступила в редакцию
15.III.1979

METHYLAMINE USE FOR OPENING THE PYRROLIDONE RING OF N-TERMINAL PYROGLUTAMYL RESIDUES IN PEPTIDES

MURANOVA T. A., MURANOV A. V.

Institute of Protein Research, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

For opening the pyrrolidone ring of the amino-terminal pyroglutamic acid residues, peptides were treated with 17% solution of methylamine at 37° for 14 hours. Under these conditions the conversion of pyroglutamyl into γ -methyl glutamyl residues took place, no concomitant cleavage of peptide bonds being observed.