

Jerzy ISKIERKO, Janusz KLIMEK  
Andrzej GÓRSKI, Tadeusz URBAN  
Ewa SIENKIEWICZ

**Próby zastosowania izoselenocyjanianu fenylu  
do odsłaniania N-końcowych aminokwasów łańcuchów polipeptydowych  
i syntezy analogów selenowych PTH-aminokwasów**

Попытки применения изоселеноцианата фенила к выявлению N-остаточных  
аминокислот полипептидовых цепей и к синтезу селеновых аналогов  
PTH-аминокислот

Tests of Applying Phenyl Izoselenocyanate for Unveiling N-terminal Amino Acids  
of Peptides Chains and the Synthesis of Analogous Selenium of PTH-amino Acids

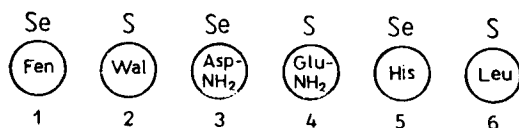
W badaniach struktury I-rzędowej białek i peptydów stosuje się różne metody chemiczne i enzymatyczne, pozwalające na odszczepienie kolejnych aminokwasów od N- lub C-końca (1, 2, 10, 11). Najczęściej stosowana jest metoda Edmana przy użyciu izotiocyjanianu fenylu oraz łączna metoda Edman-Dansyl z zastosowaniem dodatkowego reagenta chlorku dansylu (3, 4). W łącznej metodzie Edman-Dansyl izotiocyjanian fenylu odsłania kolejne N-końcowe aminokwasy łańcucha polipeptydowego, które są odszczepione i identyfikowane w postaci DNS-pochodnych. Zastosowanie chlorku dansylu zwiększa czułość metody (5, 6, 9). PTH- i DNS-pochodne aminokwasów są rozdzielone i identyfikowane metodami chromatografii cienkowarstwowej lub bibułowej. Niektórzy autorzy poddają PTH-pochodne hydrolyzie do wolnych aminokwasów, jednakże ten sposób identyfikacji przedłuża znacznie czas analizy. W przedstawionej pracy podjęto próbę modyfikacji metody Edmana przez zastąpienie izotiocyjanianu fenylu analogiem selenowym tego związku. Z badań przeprowadzonych w Zakładzie Chemii Ogólnej pod kierunkiem S. Billńskiego wynika, że izoselenocyjanian fenylu wykazuje większą aktywność w reakcjach ze związkami aminowymi. Półmetaliczny charakter selenu powoduje również zróżnicowanie właściwości jego połączeń w porównaniu z odpowiednimi połączeniami siarki (8). Omówione właściwości selenu stwarzały możliwości zastosowania izoselenocyjanianu fenylu celem uzyskania specyficznych efektów reakcji Edmanowskiej korzystnej dla omawianej metody bez naruszenia jej ogólnych założeń.

## MATERIAŁY I METODY

Zestaw wzorców PTH-aminokwasów — Nutritional Biochemical Corporation USA, DNS-aminokwasy — Sigma USA, zestaw wzorcowych aminokwasów — BDH Anglia, syntetyczne peptydy o znanej sekwencji oraz łańcuch B-insuliny — Instytut Chemii Organicznej i Biochemii Czechosłowackiej Akademii Nauk w Pradze, izoselenocyjanian fenylu — wg Jensen a i wsp. (7) — wysentytyzowany przez S. Bilińskiego w Zakładzie Chemii Ogólnej Instytutu Chemii Podstawowych AM w Lublinie, izotiocyjanian fenylu — Koch-Light Anglia. Izotiocyjanian fenylu oraz selenowy analog rozpuszczano w heptanie do 5% koncentracji. Bufor pirydynowy pH 9,5 (10 ml H<sub>2</sub>O+15 ml pirydyny+1 ml trójetyloaminy). Acetonowy roztwór DNS-Cl (6 mg/ml). Układy rozwijające do chromatografii: chloroform, metanol 90:10 V/V oraz ksylen, aceton 5:1 V/V. Żel krzemionkowy G-Merck (8 g żelu+17 ml H<sub>2</sub>O) przygotowywano bezpośrednio przed naniesieniem na szklane płytki o wymiarach 10×15 cm. Oddzielenie ciekłych faz przeprowadzono przy pomocy wirówki oraz urządzenia do odsyfonowania połączonego do pompy próżniowej. Widma PTH-aminokwasów i analogów selenowych wyznaczano w 1 cm kwarcowych naczynkach przy użyciu spektrofotometru VSU-2P. Położenie PTH-aminokwasów na chromatogramach uwidaczniiano przy pomocy par jodu i amoniaku, a DNS-aminokwasów przy pomocy lampy HPW z filtrem Wooda-Philipsa.

## BADANIA WŁASNE

Kontrolny model badawczy stanowił łańcuch B-insuliny oraz wzorcowe trój- i cztero-peptydy o znanej sekwencji. Doświadczenia zaprogramowano w ten sposób, że do kolejnego skracania łańcucha peptydowego zastosowano na przemian izoselenocyjanian i izotiocyjanian fenylu.



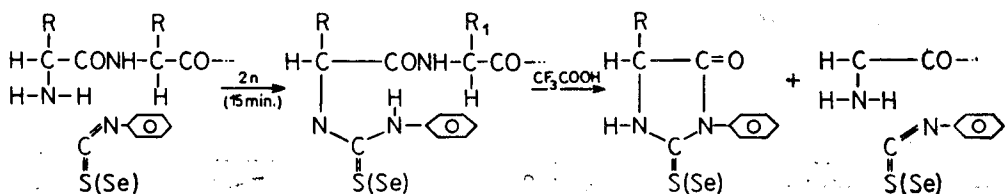
Degradacja: Se - izoselenian fenylu  
S - izotiocyjanian fenylu

Ryc. 1. Chromatogram na żelu krzemionkowym-G PTH-aminokwasów oraz selenowych analogów w układzie: ksylen, aceton 50:10

Chromatogram on silica gel-G of PTH-amino acids and selenium analogues in a solvent mixture: xylol, acetone 50:10

Degradacje przeprowadzono następująco: 4 mg badanego preparatu rozpuszczano w 1 ml buforu o pH 9,5 a następnie dodawano 0,5 ml izoselenocyjanianu fenylu i 15 minut inkubowano w temperaturze pokojowej. Po tym czasie nadmiar odczynnika usuwano przy pomocy benzenu i octanu etylu. Pozostałą fazę wodną odparowywano w strumieniu azotu. Do suchej pozostałości wprowadzano 0,3 ml kwasu trójfluorooctowego, nasycano gazowym azotem i ogrzewano 15 min w temp. 40°C, a następnie

ponownie odparowywano w sposób wyżej podany. Odłączony N-końcowy fragment izolowano przy pomocy dwuchloroetanu. Po usunięciu rozpuszczalnika uzyskany produkt reakcji, prawdopodobnie selenokarbaminian fenylu, cyklizowano w środowisku 1 M HCl do selenowej pochodnej PTH-aminokwasu.



Polipeptyd uboższy o jedną resztę aminokwasową rozpuszczano w 1 ml buforu pH 9,5, pobierając następnie 0,2 ml tego roztworu do reakcji dansylacji. Dansylację przeprowadzano rozpuszczając 0,2 ml próbki zawierającej około 0,8 mg peptydu z 0,1 N NaHCO<sub>3</sub>. Przy pomocy 0,1 N NaOH ustalano pH 8,5—9,0 i następnie dodawano 0,2 ml acetonowego roztworu DNS-Cl i inkubowano 2 godziny w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Po odparowaniu suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml 6 N HCl i hydrolizowano w zatopionych ampułkach w temp. 105°C w ciągu 12 godzin. Roztwór po hydrolizie odparowano i rozpuszczono w 0,2 ml roztworu (aceton: 0,1 N kwas octowy) i nanoszono na płytki pokryte cienką warstwą żelu krzemiankowego. Po rozwinięciu chromatogramu odpowiednim układem rozpuszczalników ustalano położenie DNS-aminokwasów w świetle lampy rtęciowej. DNS-pochodną N-końcowego aminokwasu identyfikowano przy pomocy odpowiednich wzorców. Pozostałą część peptydu poddawano kolejnej degradacji przy użyciu izotiocyanianu fenylu, przy czym inkubację przeprowadzano 2 godziny w temp. 40°C. Otrzymaną PTH-pochodną identyfikowano chromatograficznie przy użyciu wzorców. Łańcuch peptydowy, uboższy o dwa fragmenty aminokwasowe, rozpuszczano w buforze i pobierano część na reakcję dansylacji, a resztę przeznaczano do odsłonięcia kolejnego N-końcowego aminokwasu przy użyciu izoselenocyjanu fenylu. Po stwierdzeniu, że odczynnik ten reaguje z N-końcowymi aminokwasami łańcucha peptydowego, przeprowadzono reakcje tego związku z 13 różnymi wolnymi aminokwasami. Badania te miały na celu wykazanie, czy izoselenocyjanian fenylu reaguje w sposób analogiczny z wolnymi aminokwasami jak izotiocyanian fenylu. W tym celu zachowano analogiczny tok postępowania prowadzący do otrzymania z wolnych aminokwasów i izotiocyanianu fenylu PTH-pochodnych. W przebiegu omawianego procesu zmieniono tylko ze względu na większą reaktywność izoselenocyjanianu fenylu czas inkubacji z 2 godzin

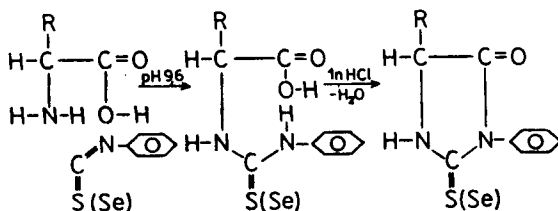
do 15 minut i temperaturę z 40°C do temperatury pokojowej. Syntezę selenowych analogów PTH-aminokwasów przeprowadzono następująco: 10 mM aminokwasu rozpuszczano w 5 ml buforu pH 9,5 (10 ml H<sub>2</sub>O + 15 ml pirydyna + 1 ml trójetyloamina). Do tego roztworu dodawano 7 ml 5% izoselenocyjanianu fenylu w heptanie, a następnie ogrzewano na łaźni wodnej w temp. 40°C 1 godz. Po tym czasie nadmiar reagenta ekstrahowano czterokrotnie 4 ml porcjami benzenu. Górną warstwę benzenu, zawierającą nadmiar reagenta, odsyfonowano za pomocą kapilary połączonej węzłem gumowym z pompą wodną. Pozostałość po ekstrakcji suszono strumieniem gazowego azotu, umieszczając probówkę w łaźni wodnej o temp. 50°C. Osad w probówce rozpuszczano w 1,5 ml 1 N HCl i ogrzewano na łaźni wodnej w temp. 40°C w ciągu 1 godz. Po cyklizacji roztwór ponownie suszono w atmosferze azotu oraz przy użyciu pompy olejowej. Uzyskane produkty reakcji rekrytalizowano z odpowiednich rozpuszczalników. Selenowe analogi PTH-aminokwasów suszono w eksykatorze nad stałym KOH i stężonym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Tab. 1. Rf analogów selenowych PTH-aminokwasów w różnych układach rozwi-  
ajających

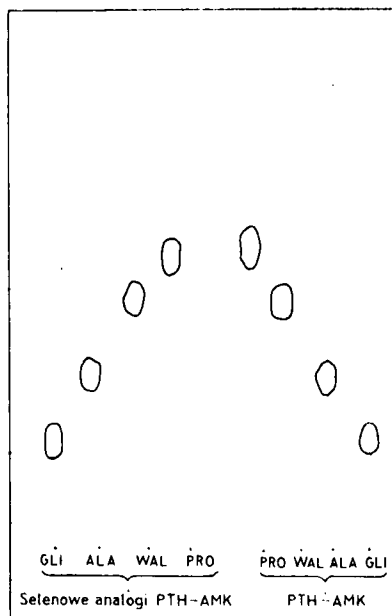
Rf analogues selenium of PTH-amino acids in different solvent mixtures

Selenowy analog PTH-amino- kwasu	Ksylen:aceton 50:10	Chloroform:me- tanol 90:10
Ala	0,37	0,76
Arg	—	0,02
Asp	—	0,03
Phe	0,49	0,88
Glu	—	0,15
Gly	0,23	0,61
Ile	0,65	0,86
Leu	0,60	0,87
Met	0,41	0,85
Pro	0,62	0,86
Ser	0,44	0,41
Tyr	0,20	0,66
Wal	0,54	0,66

Omawiana synteza na podstawie przebiegu poznanych już reakcji aminokwasów z izotiocyanianem fenylu przebiega z selenowym analogiem tego związku prawdopodobnie według poniższego schematu.



Selenowe analogi PTH-aminokwasów poddawano kontroli chromatograficznej i spektrofotometrycznej. Z tego więc względu otrzymane związki nanoszono na płytki szklane pokryte żelazem krzemionkowym, a obok nakraplano odpowiednie wzorce PTH-aminokwasów. Chromatogramy rozwijano w różnych układach. Położenie plam omawianych związków uwiadczniano przy pomocy par jodu i amoniaku. Charakterystyczny chromatogram kilku wzorcowych PTH-aminokwasów i ich selenowych analogów przedstawia ryc. 1.



Tab. 2. A min — minima i A max — maksima absorbancji analogów selenowych i odpowiednich PTH-aminokwasów w nm  
 A min — minimums and A max — maximums of absorption of selenium analogues and suitable PTH-amino acids in nm

Amino- kwas	Analog selenowy		PTH-ami- nokwasu		PTH-aminokwas	
	A min	A max	A min	A max	A min	A max
Ala	265	301	245	270	245	270
Arg	267	289	240	267	240	267
Asp	262	297	245	267	245	267
Phe	269	300	245	269	245	269
Glu	267	291	245	269	245	269
Gly	260	298	245	267	245	267
Ile	266	298	245	269	245	269
Leu	260	296	245	269	245	269
Met	264	300	245	269	245	269
Pro	269	301	250	270	250	270
Ser	276	308	245	269	245	269
Tyr	269	301	245	270	245	270
Wal	263	299	245	269	245	269

Wartości  $R_f$  badanych związków w różnych układach rozwijających przedstawiono w tab. 1. Są one zbieżne z  $R_f$  odpowiadających im wzorcowym PTH-aminokwasom. Uzyskane analogi selenowe rozpuszczano w etanolu i mierzono ich absorbcancję w zakresie 240—310 nm. Równolegle badano w podanym zakresie absorbcancję etanolowych roztworów odpowiadających selenowym analogom PTH-aminokwasów. Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 2.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Niniejsza praca wiąże się z poszukiwaniem nowych korzystniejszych reagentów do badań struktury pierwszorzędowej peptydów i białek. Próby zastosowania izoselenocyjanianu fenylu do degradacji Edmanowskiej wykazały, że odczynnik ten jest również dobrym reagentem dla grup aminowych jak powszechnie stosowany izotiocyjanian fenylu. Badania wstępne dotyczyły sprawdzenia, czy i w jakich warunkach izoselenocyjanian fenylu reaguje z N-końcowymi aminokwasami łańcuchów peptydowych i czy może być zastosowany jako reagent do odsłaniania kolejnych N-końcowych aminokwasów. Aby uzyskać odpowiedź na te zagadnienia, posłużono się techniką degradacji Edmanowskiej, stosując jako modele badawcze łańcuch B-insuliny oraz cztero- i trój-peptydy o znanej sekwencji aminokwasowej. Kolejne skracanie łańcucha B-insuliny było dokonywane na przemian z izoselenocyjanianem fenylu i izotiocyjanianem fenylu według schematu I. Przebieg degradacji sprawdzono za pomocą reakcji dansylacji, potwierdziła ona odsłanianie kolejnych N-końcowych aminokwasów przez izoselenocyjanian fenylu. Dodatkowo identyfikowano odszczepiony N-końcowy aminokwas w postaci PTH-pochodnej.

Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń, oba reagenty odsłaniają w łańcuchu peptydowym kolejne N-końcowe aminokwasy. Na podkreślenie zasługuje to, że w przypadku izoselenocyjanianu fenylu reakcja przebiegała 15 minut, tj. w znacznie krótszym czasie i w temperaturze pokojowej. Natomiast reakcja z izotiocyjanianem fenylu przebiegała dwie godziny w temp. 40°C. Fakt ten dowodzi większej reaktywności izoselenocyjanianu fenylu wobec grup aminowych aminokwasów w porównaniu z analogiem siarkowym. Przebieg reakcji z izoselenocyjanianem fenylu w temperaturze pokojowej i w czasie kilkakrotnie krótszym niż z izotiocyjanianem stanowi pewien postęp w procesie degradacji Edmanowskiej.

Połączenia selenowe otrzymanych PTH-aminokwasów dawały na chromatogramach plamy o intensywnym zabarwieniu. Na podkreślenie zasługuje fakt, że selenowe PTH-analogi: tryptofanu, fenyloalaniny i tyrozyny dawały podobnie jak PTH-aminokwasy wzorcowe żółto zabarwione plamy. Natomiast selenowy analog PTH-glicyny posiadał barwę wiśniowo-

fioletową w odróżnieniu od różowej PTH-glicyny wzorcowej. Zdolność reagowania izoselenocyjanianu z grupami aminowymi potwierdzono na 13 różnych wolnych aminokwasach. Uzyskane wzorce selenowych analogów PTH w badaniach chromatograficznych przy użyciu różnych układów rozpuszczalników wykazywały zbieżności w  $R_f$  z odpowiadającymi im PTH-aminokwasami. Ilustruje to tab. 1 i ryc. 1. Porównując minima i maksima absorbancji analogów selenowych z wzorcowymi PTH-aminokwasami, zaobserwowano u analogów selenowych przesunięcie zarówno minimum, jak maksimum absorbancji w kierunku fal dłuższych.

Badania chromatograficzne i spektrofotometryczne, analogiczne  $R_f$  oraz charakterystyczne zabarwienie plam niektórych PTH-pochodnych aminokwasów oraz zbliżone absorbancje analogów selenowych do wzorcowych PTH-aminokwasów są pośrednim dowodem przebiegu reakcji aminokwasów z izoselenocyjanianem fenylu. Na drodze reakcji Edmanskowskiej uzyskano odpowiednie wzorcowe analogi selenowych pochodnych 13 aminokwasów.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Bailey J.: *Techniques in Protein Chemistry*, 163—221, Elsevier Publishing Company, Amsterdam—London New York 1967.
  2. Bleckburn S.: *Amino Acid Determination*, 151—179, Marcel Dekker, New York 1968.
  3. Edman P.: *Acta Chem. Scand.*, **4**, 277—282, 1950.
  4. Edman P.: *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283—293, 1950.
  5. Gray W., Hartley B.: *Biochem. J.* **89**, 59P—59P, 1963.
  6. Gray W., Hartley B.: *Biochem. J.*, **89**, 379—380, 1963.
  7. Jensen K., Frøderiksen E.: *Z. anorg. Chem.*, **230**, 31—33, 1936.
  8. Klenha J.: *Chem. Listy*, **60**, 1657—1698, 1966.
  9. Percy M., Buchwald B.: *Anal. Biochem.*, **45**, 60—67, 1972.
  10. Sanger F.: *Biochem. J.*, **39**, 507—515, 1945.
  11. Worowski K.: *Wiadomości Chem.*, **27**, 789—811, 1973.
- Otrzymano 9 IX 1975.

#### РЕЗЮМЕ

Доказано, что изоселеноцианат фенила является хорошим реагентом для иминовых групп N-остаточных аминокислот. Реактив этот может применяться при деградации полипептидовых цепей и в выявлении N-остаточных аминокислот. Применяемый реагент бывает более активным по отношению к аминокислотным группам чем изоселеноцианат фенила, потому что он реагирует в комнатной температуре и в значительно более коротком сроке.

## SUMMARY

It has been confirmed that phenyl izoselenocyanate is a good reagent for the amines groups of N-terminal amino acids. This reagent can be used for the degradation of peptide chains as well as for unveiling N-terminal amino acids. The applied reagents is more active for the amines groups than phenyl izothiocyante, for it can react in room temperature and in a shorter time.