



УДК 577.112.315.42 : 577.112.6 : 542.953.2

СИНТЕЗ С-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА ГИСТОНА Н1
С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ 152—184 И ЕГО СТРУКТУРА

Марьян Л. И., Буриченко В. К.

Институт химии им. В. И. Никитина Академии наук ТаджССР, Душанбе

Шибнев В. А.

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Классическими методами синтеза в растворе синтезирован С-концевой участок гистона Н1 с последовательностью Lys-Thr-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-Lys-Pro-Lys-Ala-Ala-Ala - Lys-Pro-Lys-Val-Ala-Lys-Pro-Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-Val-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala (152—184) без защиты гидроксильных групп серина и треонина. Рентгенографическим исследованием показано, что структура синтезированного участка аналогична структуре гистона Н1 и незначительно отличается от классической спирали поли-*L*-пролин II.

Первичная структура гистона Н1, выделенного из различных объектов, в значительной степени претерпевает изменения при переходе от одного вида к другому. Однако в N- и С-концевых участках молекулы, ответственных за взаимодействие с ДНК, присутствуют повторяющиеся структурные единицы, общие для различных вариантов гистона Н1. В N-концевом участке такой единицей является последовательность Ser-Pro- (основной аминокислотный остаток)₂, в С-концевой части молекулы, полная структура которой известна только для некоторых вариантов гистона Н1, выделенного из спермы морского ежа [1], форели [2] и тимуса кролика [3], — -Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-, повторяющаяся в молекуле пять, четыре и три раза соответственно [1—3]. При наличии в этой последовательности аминокислотных замен тип аминокислоты сохраняется; например, серин заменяется на треонин, а аланин на валин.

В других гистонах большинство остатков пролина не соединены с остатками серина, но также окружены основными аминокислотами. Из рассмотрения первичной структуры гистонов можно предположить, что в процессе эволюции сохраняется последовательность аминокислот, наиболее подходящая для взаимодействия с ДНК, и именно она дублируется для каждого вида до тех пор, пока не достигается оптимальная степень взаимодействия.

Исходя из всего сказанного особый интерес представляет исследование вторичной структуры той части С-концевого фрагмента молекулы гистона, которая содержит повторяющиеся последовательности, и определение константы ее связывания с ДНК. При этом следует учитывать, что остатки серина, входящие в состав повторяющихся последовательностей, могут фосфорилироваться в процессе митоза, что в свою очередь может повлиять на структуру хроматина.

В связи с этим мы осуществили синтез 33-членного пептида — фрагмента С-концевого участка гистона Н1, соответствующего последовательности 152—184 [3], в котором трижды повторяется структурная единица, указанная выше.

Синтез тририкоктапептида осуществлялся классическими методами по схеме $\{[2+(5+6)]+8\} + \{1+[6+(1+4)]\}$. Общий план синтеза заклю-

Принятые сокращения: DMF — диметилформамид, H₄-фуран — тетрагидрофуран, NOBt — 1-оксисбензотриазол, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, OPfp — пентафторфенил.

тался в конденсации трех фрагментов (152—164, 165—172 и 173—184, см. схему синтеза), приблизительно равных по величине, которые в свою очередь получали конденсацией более коротких блоков, синтезированных ступенчатым наращиванием цепи. Защитные группы подбирались с учетом возможности их селективного удаления на промежуточных стадиях синтеза. Так, для защиты N^α-аминогрупп аминокислот в основном использовали Вос-группу и лишь в некоторых случаях Z-группу. N^ε-Аминогруппу лизина блокировали бензилоксикарбонильной группой. Карбоксильные группы аминокислот защищали образованием метиловых и пентафторфениловых эфиров. Гидроксильные группы серина и треонина оставались незащищенными, что позволило снизить трудоемкость синтеза и сократить число стадий.

Чтобы избежать нежелательного O-ацилирования не защищенного по гидроксилу серина, мы вводили его в реакцию конденсации в условиях, подавляющих нежелательные реакции: в виде пентафторфенилового эфира при минимальных избытках основания, в качестве растворителя использовали диметилформамид. Условия введения оксиаминокислот без защиты гидроксильных групп были детально исследованы в работах [4—6] и успешно использованы в синтезе соматостатина [7].

Синтез фрагмента 173—184 осуществляли главным образом карбодимидным методом (в присутствии 1-оксибензотриазола) в абсолютном тетрагидрофуране или диметилформамиде, в качестве основания использовали N-метилморфолин. Схема синтеза этого фрагмента — 1+[6+(1+4)] — разработана таким образом, чтобы остатки серина подвергались минимальному воздействию. Так, исходя из Вос-Pro-OH и трифторацетата метилового эфира (N^ε-бензилоксикарбониллизил)₂-аланина, был получен тетрапептид 181—184, синтез которого описан нами в работе [8]. Затем методом пентафторфениловых эфиров к трифторацетату последнего присоединяли Вос-Ser-OPfp, в результате чего был получен пентапептид 180—184. Гексапептид 174—179 был получен конденсацией предварительно омыленного трипептида 174—176 и трифторацетата пептида 177—179 карбодимидным методом в присутствии оксибензотриазола. Конденсацией частично защищенных производных гекса-(174—179) и пентапептида (180—184) был синтезирован ундекапептид 174—184, к которому остаток серина присоединяли также в виде пентафторфенилового эфира. Таким образом, Ser¹⁷³ и Ser¹⁸⁰ участвовали не более чем в трех стадиях синтеза.

Синтез фрагмента 152—172 осуществлялся азидным методом, исходя из гидрозида защищенного пептида 152—164 и трифторацетата октапептида 165—172, синтез которых описан подробно в предыдущем сообщении [9]. Защищенный тритриаконтапептид с последовательностью 152—184 получали азидной конденсацией частично защищенных пептидов 152—172 и 173—184. Очистку пептидов 152—172 и 152—184 проводили на колонках с силикагелем и сефадексом LH-20. Для сравнения степени очистки пептидов мы провели также гель-фильтрацию на сефадексе LH-20 смеси этих пептидов с исходными продуктами. Сравнение кривых элюции пептидов, очищенных вышеуказанными способами, показало их полную идентичность (рис. 1 и 2).

Деблокирование N^α-аминогрупп пептидов на промежуточных стадиях синтеза осуществлялось либо CF₃COOH, либо ее 30—50% растворами в хлористом метиле. Защитные группы с конечного продукта удаляли действием НВг в трифторуксусной кислоте, используя в качестве протектора анизол. Полноту снятия бензилоксикарбонильных групп контролировали спектрофотометрически. Свободный 33-членный пептид очищали на колонке с сефадексом G-25 (рис. 3).

Данные по определению N-концевых аминокислот дансильным методом (исключением является пептид 152—184), аминокислотного анализа в совокупности с колоночной хроматографией на силикагеле и гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 свидетельствуют о чистоте полученных соединений.

В последние годы получены аргументы в пользу существования в гистонах левоспиральной конформации полипептидной цепи типа поли-L-про-

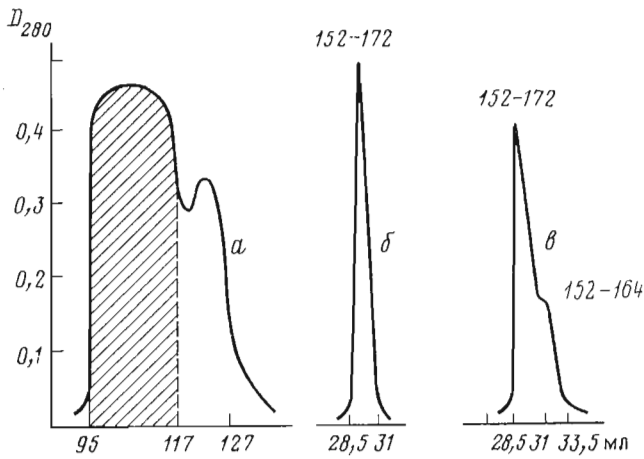


Рис. 1. Кривая элюции гевейкозапептида (XII) на колонке с сефадексом LH-20 в DMF: *a* — деление реакционной смеси на колонке размером $1,6 \times 100$ см (заштрихована отбираемая область); *b* и *v* — анализ выделенной фракции и контрольной смеси пептидов соответственно на аналитической колонке ($1,0 \times 80$ см)

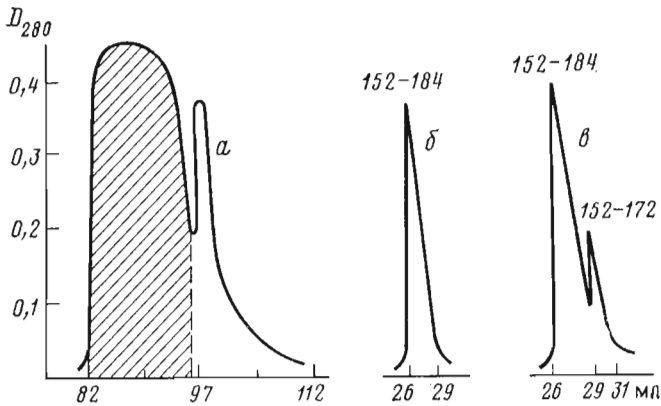


Рис. 2. Кривая элюции тритриакоптапептида (XIII) на колонке с сефадексом LH-20 в DMF: *a* — деление реакционной смеси на колонке размером $1,6 \times 100$ см (заштрихована выделяемая фракция), *b* и *v* — анализ выделенной фракции и контрольной смеси соответственно на аналитической колонке ($1,0 \times 80$ см)

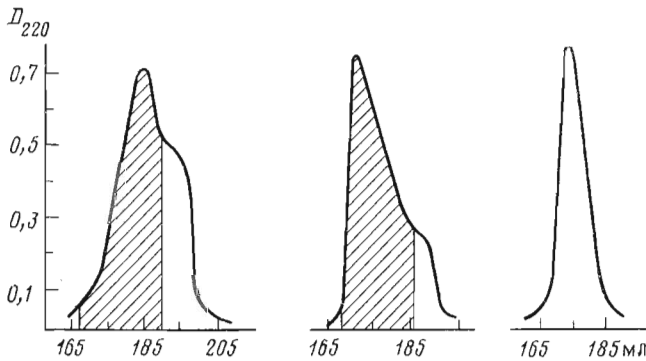


Рис. 3. Хроматографическое выделение полипептида с последовательностью 152-184 на колонке ($2,3 \times 100$ см) с сефадексом G-25 (fine) в $0,01$ н. CH_3COOH . Заштрихована область, соответствующая отбираемой фракции

лин II (РРII), которая носит универсальный характер в том смысле, что допускает встраивание любых аминокислотных остатков, в том числе и пролина, и может встречаться как в фибриллярных, так и в глобулярных белках [9—12].

Анализ аминокислотной последовательности гистонов позволяет сделать предположение о локализации фрагментов с левоспиральной конформацией в N- и C-концевых участках полипептидной цепи, в которых концентрируются остатки, имеющие предрасположенность к левоспиральной конформации (Ser, Pro, Arg, Gly).

Для доказательства реализации конформации типа РРII мы провели рентгенографическое исследование гистона H1 и синтезированного тритриаконтапептида (СН1). На рентгенограммах этих образцов можно видеть типичную для регулярной спиральной структуры дифракционную картину. Набор межплоскостных расстояний (d , Å), отвечающих наблюдаемым рефлексам, следующей:

H1	2,44	2,65	3,03	3,33	3,69	3,98	4,20	4,70	9,32
СН1		2,6±0,1	3,0±0,1			3,9±0,1		4,6±0,2	9,3±0,2

Из трех наиболее стабильных в энергетическом отношении спиральных структур лишь левая спираль типа РРII имеет проекцию остатка на ось спирали 3,13 Å.

Из-за большого диффузного фона не удалось точно определить величину шага спирали. Однако, судя по значениям межплоскостных расстояний, отклонение параметров спирали гистона H1 и его C-концевого фрагмента от классической спирали Z_1 незначительно (левая спираль РРII, три остатка на виток). Таким образом, нами показано, что структура синтезированного тритриаконтапептида с последовательностью C-концевого участка гистона H1 идентична структуре самого гистона.

Экспериментальная часть

В синтезе пептидов использовались L-аминокислоты. ТСХ всех соединений проводили на пластинках с закрепленным слоем (100/200 ммк, силикагель — гипс — вода, 1 : 0,25 : 3,1) в системах *n*-бутанол — вода — уксусная кислота, 100 : 30 : 10 (А), втор-бутанол — 3% NH₄OH, 100 : 44 (Б), хлороформ — метанол — уксусная кислота, 90 : 8 : 2 (В), метанол — хлороформ, 1 : 8 (Г), бензол — метанол, 2 : 0,3 (Д), метанол — хлороформ, 13 : 60 (Е), этилацетат — ацетон, 1 : 1 (Ж), метанол — бензол, 2 : 0,3 (З). Вещества обнаруживали на хроматограммах с помощью нингидрина, паров иода и в ультрафиолете.

При получении защищенных пептидов реакционную массу промывали водой, 10% раствором лимонной кислоты, 5% раствором NaHCO₃, водой и высушивали над Na₂SO₄.

Степень рацемизации была определена газохроматографически по методу [13]. Она не превышала 2%.

Измерение оптической активности исследуемых соединений выполняли на автоматическом поляриметре А1-ЕП1 (СССР). Для аминокислотного анализа пептиды подвергали кислотному гидролизу в стандартных условиях (6 н. HCl, 105°С, 24 ч), после чего с помощью автоматического аминокислотного анализатора типа Biotronic LC 2000 (ФРГ) определяли количественное содержание аминокислот в гидролизатах.

Рентгенографические исследования проводились в прецессионной камере (СССР) с расстоянием образец — пленка 50 мм. Использовали CuK_α-излучение, фильтрованное Ni-фильтром. Образцы исследовались в виде порошка.

Woc-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-OCH₃ (II). а) 2,91 г (4 ммоль) *Woc-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-OCH₃* обрабатывали 8 мл CF₃COOH в течение 50 мин. Затем реакционную смесь дважды упаривали с абс. бензолом. Перекристаллизацией из этилацетата получали CF₃COOH·H-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-OCH₃ (I) с выходом 2,91 г (98%), *R_f* 0,78 (А), 0,7 (Б), 0,45 (В).

б) К раствору 0,86 г (4 ммоль) Вос-Pro-OH в 5 мл абс. H_4 -фурана, охлажденному до -15°C , прибавляли 0,824 г (4 ммоль) DCC в 5 мл H_4 -фурана и 0,64 г (4 ммоль) HOBT. Через 2 ч к нему прибавляли 2,97 г (4 ммоль) трифторацетата пептида (I) в 12 мл абс. H_4 -фурана, нейтрализованного 0,44 мл (4 ммоль) N-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при -10°C , 10 ч при 0°C и 10 ч при 18°C , после чего растворитель упаривали, остаток растворяли в CH_2Cl_2 , охлаждали до 0°C , выпавшую дициклогексимочевину отфильтровывали, раствор обрабатывали обычным образом. Перекристаллизацией из этилацетата получали пептид (II) с выходом 2,93 г (89%), т. пл. $169-170^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} -88,3^\circ$ (с 1,0; CHCl_3), R_f 0,83 (A), 0,89 (B), 0,66 (B).

Вос-Ser-OPfp (III). К раствору 2,05 г (10 ммоль) Вос-Ser-OH и 1,84 г (10 ммоль) пентафторфенола в 20 мл абс. этилацетата, охлажденного до 0°C , прибавляли 2,06 г (10 ммоль) DCC. Реакционную массу перемешивали 30 мин при 0°C и 1 ч при 18°C . Затем охлаждали до 0°C и выпавшую дициклогексимочевину отфильтровывали. Фильтрат упаривали, а оставшееся масло растирали с петролейным эфиром и перекристаллизовывали из эфира. Выход 3,11 г (84%), т. пл. $98-99^\circ\text{C}$, R_f 0,83 (A), 0,71 (B).

Вос-Ser-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-OCH₃ (IV). а) 2,06 г (2,5 ммоль) пептида (II) в течение 1 ч обрабатывали CF_3COOH . Переосаждением из спирта эфиром получали трифторацетат пептида (IIa) с количественным выходом. Т. пл. $100-101^\circ\text{C}$, R_f 0,54 (A), 0,42 (B).

б) К раствору 1,68 г (2 ммоль) пептида (IIa) в 5 мл DMF, охлажденному до 0°C , прибавляли 0,24 мл (2,2 ммоль) N-метилморфолина и 0,73 г (2,2 ммоль) соединения (III). Реакционную смесь выдерживали 30 мин при 0°C и 1 ч при 18°C . Затем разбавляли 100 мл этилацетата и обрабатывали обычным образом. Выход пептида (IV) 1,63 г (89%), т. пл. 83°C (этилацетат), $[\alpha]_D^{25} -60^\circ$ (с 2,0; CHCl_3), R_f 0,83 (A), 0,84 (B), 0,61 (B). Аминокислотный анализ: Ser 0,81 (1), Pro 1,07 (1), Ala 1,00 (1), Lys 2,11 (2).

Вос-Val-Ala-Lys(Z)-OCH₃ (V). а) 4,66 г (10 ммоль) Вос-Ala-Lys(Z)-OCH₃ обрабатывали 50 мин CF_3COOH . Раствор упаривали с бензолом и многократно обрабатывали эфиром, затем переосаждали из хлороформа эфиром и получали трифторацетат метилового эфира аланил-N^ε-бензилоксикарбониллизина с выходом 4,1 г (86,2%), R_f 0,83 (A), 0,8 (B), 0,21 (B).

б) Аналогично соединению (II), исходя из 0,92 г (4,2 ммоль) Вос-Val-OH, 0,87 г (4,2 ммоль) DCC, 0,57 г (4,2 ммоль) HOBT, 2 г (4,2 ммоль) $\text{CF}_3\text{COOH}\cdot\text{H-Ala-Lys(Z)-OCH}_3$, 0,46 мл (4,2 ммоль) N-метилморфолина в абс. H_4 -фуране, получали 1,8 г (79%) пептида (V). Т. пл. 119°C (этилацетат — эфир), $[\alpha]_D^{25} -19,1^\circ$ (с 1,2; CHCl_3), R_f 0,87 (A), 0,83 (B), 0,6 (B).

Вос-Pro-Ala-Lys(Z)-OCH₃ (VI). Аналогично соединению (V), исходя из 0,91 г (4,2 ммоль) Вос-Pro-OH, 0,87 г (4,2 ммоль) DCC, 0,57 г (4,2 ммоль) HOBT, 2 г (4,2 ммоль) $\text{CF}_3\text{COOH}\cdot\text{H-Ala-Lys(Z)-OCH}_3$, 0,46 мл (4,2 ммоль) N-метилморфолина в абс. H_4 -фуране, получали 1,8 г (79%) пептида (VI) в виде аморфного порошка. Переосаждали из этилацетата эфиром и высушивали в вакууме. R_f 0,83 (A), 0,86 (B), 0,61 (B).

Вос-Pro-Ala-Lys(Z)-Val-Ala-Lys(Z)-OCH₃ (VII). а) 1,8 г (3,2 ммоль) пептида (VI) обрабатывали 2 ч 0,2 н. NaOH в ацетоне. Затем реакционную смесь экстрагировали этилацетатом, а водную фазу подкисляли на холоде 50% раствором лимонной кислоты до кислой реакции и экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу отмывали водой, высушивали и упаривали в вакууме. Остаток переосаждали из этилацетата эфиром и получали с количественным выходом пептид (VIa). R_f 0,48 (A), 0,47 (B), 0,13 (Г).

б) 1,8 г (3,2 ммоль) пептида (V) обрабатывали 45 мин 50% раствором CF_3COOH в CH_2Cl_2 и получали трифторацетат пептида (Va) с выходом 1,7 г (91,8%), т. пл. $113-114^\circ\text{C}$ (этилацетат — эфир), R_f 0,53 (A), 0,47 (B), 0,1 (B).

в) Аналогично соединению (II), исходя из 1,31 г (2,4 ммоль) соединения (VIa), 0,5 г (2,4 ммоль) DCC, 0,33 г (2,4 ммоль) НОВт, 1,39 г (2,4 ммоль) (Va), 0,27 мл (2,4 ммоль) N-метилморфолина, получали пептид (VII) с выходом 1,86 г (77,6%). Т. пл. 170° С (этанол), $[\alpha]_D^{25} -59,5^\circ$ (с 1,09; CHCl_3), R_f 0,75 (Б), 0,75 (Г), 0,81 (Е). Аминокислотный анализ: Pro 0,97 (1), Val 1,00 (1), Ala 2,13 (2), Lys 2,10 (2).

Boc-Pro-Ala-Lys(Z)-Val-Ala-Lys(Z)-Ser-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala - OCH_3 (VIII). а) 1,49 г (1,5 ммоль) пептида (VII) обрабатывали 2 ч 0,2 н. раствором NaOH в DMF в условиях, аналогичных получению соединения (VIa). Получали 1,32 г (89,6%) пептида (VIIa), т. пл. 199–200° С (хлороформ — эфир), R_f 0,53 (Б), 0,53 (Е), 0,13 (Г).

б) Обработкой 2,28 г (2,5 ммоль) пептида (IV) CF_3COOH в течение 55 мин получали 2,15 г (94%) трифторацетата пептида (IVa) с т. пл. 96–97° С (этилацетат).

в) Аналогично соединению (II), исходя из 2,94 г (3 ммоль) пептида (VIIa), 0,41 г (3 ммоль) НОВт, 0,62 г (3 ммоль) DCC, 2,78 г (3 ммоль) соединения (IVa), 0,33 мл (3 ммоль) N-метилморфолина в DMF, получали пептид (VIII) с выходом 3,74 г (70%). Очистку пептида проводили на колонке с силикагелем Л(40/100 ммк) в системе метанол — хлороформ, 1:8, скорость элюции 1,5 мл/ч. Отбирали фракции по 0,5 мл. Т. пл. 165° С, $[\alpha]_D^{25} -55,2^\circ$ (с 1,0; DMF), R_f 0,64 (Б), 0,8 (Г). Аминокислотный анализ: Ser 0,80 (1), Pro 2,07 (2), Ala 3,00 (3), Lys 4,18 (4), Val 0,95 (1).

Boc-Ser-Pro-Ala-Lys(Z)-Val-Ala-Lys(Z)-Ser-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-OCH_3 (IX). а) 2 г (1,13 ммоль) пептида (VIII) обрабатывали 35 мин 50% раствором CF_3COOH в CH_2Cl_2 и получали 1,86 г (92,3%) трифторацетата пептида (VIIIa) с т. пл. 157–160° С (этанол), R_f 0,5 (А), 0,41 (Б), 0,53 (З).

б) Аналогично соединению (IV), исходя из 0,74 г (2 ммоль) Boc-Ser-OPfp, 1,79 г (1 ммоль) пептида (VIIIa) и 0,132 мл (1,2 ммоль) N-метилморфолина, получали пептид (IX) с выходом 1,52 г (81%), т. пл. 133–134° С (этилацетат), $[\alpha]_D^{25} -27,2^\circ$ (с 0,9; CHCl_3), R_f 0,87 (А), 0,9 (Б), 0,59 (В), 0,72 (Е). Аминокислотный анализ: Ser 1,85 (2), Pro 1,94 (2), Val 1,00 (1), Ala 2,96 (3), Lys 4,23 (4).

Boc-Lys(Z)-Thr-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-Pro-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-Ala-Ala-Ala-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-Val-Ala-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-OCH_3 (XII). а) К раствору 1,06 г (0,5 ммоль) Boc-Lys(Z)-Thr-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-Pro-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-Ala-Ala-Ala-OCH₃ в 50 мл абс. этанола прибавляли 0,27 мл (10 ммоль) гидразингидрата, выдерживали 36 ч при 18° С, затем осаждали эфиром, промывали водой, ацетоном, а остаток дважды перекристаллизовывали из этанола. Получали гидразид пептида (X) с выходом 0,96 г (90,3%), т. пл. 186–188° С, R_f 0,75 (З), 0,1 (Г), 0,1 (Д).

б) 1,55 г (1 ммоль) Boc-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-Val-Ala-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-OCH₃ обрабатывали 40 мин 4,5 мл CF_3COOH . Получали 1,44 г (92%) трифторацетата пептида (XI). Т. пл. 100–102° С (хлороформ — эфир, 1 : 5), R_f 0,56 (А), 0,48 (Б), 0,21 (В).

в) К раствору 0,96 г (0,45 ммоль) гидразида пептида (X) в 4 мл DMF, охлажденному до –20° С, прибавляли 0,45 мл (1,8 ммоль) 4 н. раствора HCl в диоксане, а затем 0,096 мл (0,9 ммоль) *n*-бутилнитрита. Раствор перемешивали 30 мин при –20° С, затем охлаждали до –40° С и прибавляли 0,7 г (0,45 ммоль) трифторацетата пептида (XI) в 4 мл DMF и 0,3 мл (2,72 ммоль) N-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали 12 ч при 0° С, 10 ч при 10° С и 48 ч при 18° С. Затем осаждали на холоде 5% раствором CH_3COOH . Выпавший осадок растворяли в 200 мл CHCl_3 и промывали водой до нейтрального значения pH, высушивали, упаривали, осадок промывали ацетоном, этилацетатом, эфиром и перекристаллизовывали из 25 мл этанола. Дальнейшую очистку проводили на колонке (2,5×50 см) с силикагелем в системе метанол — хлороформ, 1:8, а также на сефадексе LH-20 в DMF (колонка 1,6×100 см). Получали пептид (XII) с выходом 1,27 г (80%), т. пл. 150–153° С, $[\alpha]_D^{25} -40^\circ$ (с 1,5;

DMF), R_f 0,54 (А), 0,65 (Б), 0,19 (В), 0,77 (Е). Аминокислотный анализ: Thr 0,87 (1), Lys 9,27 (9), Pro 4,89 (5), Ala 5,00 (5), Val 0,98 (1).

Boc-Lys(Z)-Thr-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-Pro-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-Ala-Ala-Ala-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-Val-Ala-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-Ser-Pro-Ala-Lys(Z)-Val-Ala-Lys(Z)-Ser-Pro-Lys(Z)-Lys(Z)-Ala-OCH₃ (XIII). а) К раствору 1 г (0,283 ммоль) пептида (XII) в 7 мл DMF прибавляли 0,1 мл (3,7 ммоль) гидразингидрата и выдерживали 2 ч при 18° С и 24 ч при 0° С, затем осаждали эфиром, осадок промывали водой, ацетоном, эфиром и перекристаллизовывали из этанола. Получали гидразид защищенного пептида (XIIIa) с выходом 0,9 г (80%), т. пл. 128–130° С, R_f 0,3 (В), 0,5 (Е).

б) 1 г (0,53 ммоль) пептида (IX) 40 мин обрабатывали CF₃COOH. Перекристаллизовывали из смеси спирт — ацетон — эфир, 1:10:5, получали трифторацетат пептида (IXa) с выходом 0,71 г (71%), т. пл. 148–150° С, R_f 0,3 (А), 0,5 (Б).

в) Конденсацию частично защищенных пептидов (XIIa) и (IXa) проводили в условиях получения соединения (XII), исходя из раствора 0,8 г (0,23 ммоль) гидразида пептида (XIIa) в 6 мл DMF, 0,23 мл (0,92 ммоль) 4 н. HCl в диоксане, 0,049 мл (0,46 ммоль) *n*-бутилнитрита 0,567 г (0,3 ммоль) трифторацетата пептида (IXa) и 0,154 мл (1,4 ммоль) *N*-метилморфолина. Через 4 сут к реакционной смеси прибавляли 200 мл эфира, выпавшее в осадок вещество промывали этилацетатом, CH₂Cl₂, ацетоном. Перекристаллизовывали из 50 мл этанола. Далее очищали на колонке с силикагелем в системе метанол — хлороформ, 13:60, скорость элюции 10 мл/ч (отбирали фракции по 1 мл) и на сефадексе LH-20 в DMF. Выход пептида (XIII) 0,95 г (80%), т. пл. 142–143° С, $[\alpha]_D^{25}$ –42,7° (*c* 1,92; CHCl₃). Аминокислотный анализ: Lys 13,00 (13), Thr 0,81 (1), Ser 1,72 (2), Pro 7,15 (7), Val 2,00 (2), Ala 8,30 (8).

Lys-Thr-Pro-Lys₂-Ala-Pro-Lys-Pro-Lys-Ala₃-Lys-Pro-Lys-Val-Ala-Lys-Pro-Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-Val-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys₂-Ala-OCH₃ (XIV). 0,52 г (0,1 ммоль) пептида (XIII) растворяли в 7 мл CF₃COOH, добавляли 0,5 мл анизола и пропускали ток сухого HBr в течение 45 мин. Затем упаривали в вакууме с бензолом и многократно обрабатывали ацетоном и эфиром. Осадок высушивали в вакууме над KOH. Получали 0,43 г (93,3%) бромгидрата тритриаконтапептида (XIV). Полученное вещество растворяли в 2 мл воды, доводили 0,5 н. водным аммиаком до нейтрального значения pH и наносили на колонку (2,3×100 см) с сефадексом G-25 (fine). Элюцию проводили 0,1 н. CH₃COOH со скоростью 9 мл/ч, отбирая фракции по 3 мл. Собранные фракции фотометрировали при 220 нм и лиофилизировали, затем рехроматографировали. Выход 0,25 г (73,5%), $[\alpha]_D^{25}$ –46,7° (*c* 0,76; 0,1 н. CH₃COOH). Аминокислотный анализ: Lys 13,30 (13), Thr 0,91 (1), Ser 1,72 (2), Pro 7,08 (7), Val 2,00 (2), Ala 8,00 (8).

Авторы благодарят М. В. Григолава за интерпретацию рентгенограмм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Strickland W. N., Strickland M., Brandt W. F., von Holt C., Lerhmann A., Wittman-Lielold B. Eur. J. Biochem., 1980, v. 104, № 2, p. 567–578.
2. Macleod A. R., Normann C. W., Wong, Dixon G. H. Eur. J. Biochem., 1977, v. 78, № 1, p. 281–291.
3. Cole R. D. In: The molecular biology of the mammalian genetic apparatus/Ed. Ts'o P. O. P. Amsterdam, New York: North-Holland Biomedical Press, 1977, v. 1, p. 93–104.
4. Гирин С. К., Швачкин Ю. П. Ж. общ. химии, 1978, т. 48, № 4, с. 902–908.
5. Гирин С. К., Швачкин Ю. П. Ж. общ. химии, 1978, т. 48, № 8, с. 1887–1891.
6. Гирин С. К., Швачкин Ю. П. Ж. общ. химии, 1979, т. 49, № 2, с. 451–457.
7. Швачкин Ю. П., Гирин С. К., Смирнова А. П., Мишкина А. А., Ермак Н. М. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 2, с. 187–196.
8. Марьяш Л. И., Шибнев В. А. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1972, т. 8, с. 1858–1860.
9. Tiffany M. L., Krimm S. Biopolymers, 1968, v. 6, № 9, p. 1379–1382.
10. Макаров А. А., Есипова Н. Г., Панков Ю. А., Лобачев В. М., Гришковский Б. А., Сухомудренко А. Г. Молекулярн. биология, 1976, т. 10, № 3, с. 704–711.
11. Макаров А. А., Есипова Н. Г., Панков Ю. А., Лобачев В. М., Гришковский Б. А. Биофизика, 1976, т. 21, № 2, с. 233–237.

12. Крылов А. С., Гурский Г. В., Кондратьева Н. О., Марьяш Л. И., Полегаев А. Л., Шибнев В. А. Молекулярн. биология, 1978, т. 12, № 2, с. 297-307.
13. Беликов В. М., Витт С. В., Пасконова Е. А., Сапорова М. Б., Никитина С. Б. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1974, т. 3, с. 676-682.

Поступила в редакцию
26.VII.1983
После доработки
30.IX.1983

SYNTHESIS AND STRUCTURE OF HISTONE H1 C-TERMINAL SEGMENT 152-18

MARYASH L. I., BURICHENKO V. K., SHIBNEV V. A.

*V. I. Nikitin Institute of Chemistry, Academy of Sciences of the Tajik SSR, Dushanbe;
Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Using classical methods of peptide synthesis in solution, the following C-terminal segment of histone H1 has been prepared: Lys-Thr-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-Lys-Pro-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Val-Ala-Lys-Pro-Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-Val-Ala-Lys-Ser-Pro - Lys-Lys-Ala. The hydroxyl groups of Ser and Thr residues were not protected. An X-ray analysis demonstrated that the structure of synthetic peptide was similar to that of histone H1 and differed insignificantly from classical poly-L-proline II helix.