

bonsäure-diamids und der Dimethyl- und Diäthylester der Pyrazin-2,3-dicarbon-säure in Alkohol wird beschrieben; sie führte meist zu Piperazinen, d. h. Hexahydro-derivaten. Die Hydrierung des Pyrazin-2,3-dicarbon-säure-imids lieferte ein intensiv rotes Tetrahydroderivat. – Die erhaltenen Piperazin-2-carbonsäure und Piperazin-2,3-dicarbon-säure wurden in die optischen Antipoden gespalten.

Institut für allgemeine Chemie der Universität Pavia und
Forschungsabteilung der BRACCO INDUSTRIA CHIMICA, Mailand

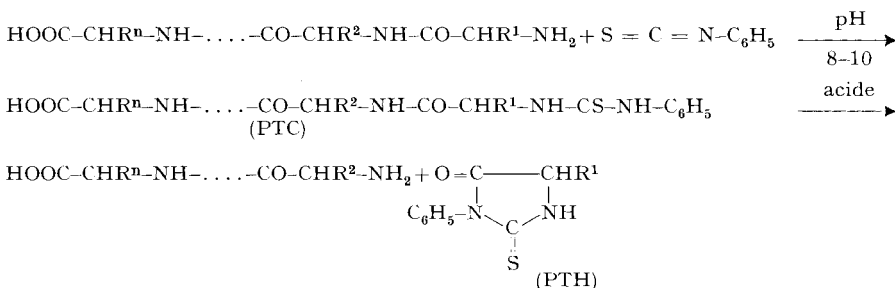
118. Etude de structures peptidiques à l'aide du phénylisothiocyanate-[³⁵S]

par Emile Cherbuliez, Br. Baehler, M. C. Lebeau, A. R. Sussmann
et J. Rabinowitz

(29 III 60)

Les méthodes chimiques permettant de déterminer la séquence des acides aminés d'un polypeptide peuvent être classées en deux catégories selon que le peptide est attaqué du côté de la fonction amino terminale ou du côté de la fonction carboxyle terminale. L'attaque de la fonction carboxyle nécessite le blocage préalable de la fonction amino terminale et ne se fait pas avec un très bon rendement¹⁾.

Il nous a donc paru plus intéressant d'appliquer la méthode d'EDMAN²⁾, qui consiste à attaquer la fonction amino par l'isothiocyanate de phényle. On obtient ainsi, en premier lieu, en milieu légèrement alcalin, un phénylthiocarbamyl-peptide (PTC), qui sous l'influence d'un acide (HCl p. ex.) se scinde en une phénylthiohydantoïne substituée (PTH) et en un fragment polypeptidique raccourci, ayant perdu l'acide aminé N-terminal.



Cette méthode permet d'obtenir souvent de bons rendements, presque quantitatifs quelquefois.

La PTH ainsi obtenue, qui contient l'acide aminé N-terminal du peptide, peut être identifiée directement par chromatographie sur papier³⁾. Le polypeptide rac-

¹⁾ G. W. KENNER, H. G. KHORANA & R. J. STEDMAN, *J. chem. Soc.* 1953, 673.

²⁾ P. EDMAN, *Acta chem. scand.* 4, 283 (1950).

³⁾ J. SJÖQUIST, *Acta chem. scand.* 7, 447 (1953).

courci, traité de la même façon, réagit à nouveau par son acide aminé N-terminal, et ainsi de suite jusqu'à dégradation totale du peptide; cette méthode qui n'attaque que l'acide aminé N-terminal, permet donc d'établir la séquence des acides aminés dans un peptide. Au lieu de phénylisothiocyanate, BUYLE⁴⁾ a utilisé le p-iodophénylisothiocyanate pour effectuer ces réactions, la vitesse de thiocarbamylation étant augmentée par la présence de l'I en p (par rapport au groupement $-N=C=S$).

Pour que cette méthode donne de bons résultats, le rendement de chaque opération doit être presque quantitatif, autrement on aurait au bout de quelques stades un mélange de peptides qui, par traitement au réactif d'EDMAN, donneraient simultanément plusieurs PTH différentes, et la détermination de la séquence des acides aminés devient de plus en plus compliquée, voire impossible.

Dans la biochimie moderne, le développement de microméthodes est indispensable. En ce qui concerne les matières protéiques, les méthodes chromatographiques ordinaires permettent souvent de travailler avec des quantités de l'ordre du μmole^3)⁴⁾ (quelquefois 0,1 μmole). L'introduction du marquage par des isotopes radioactifs permet d'augmenter considérablement la sensibilité des méthodes. Voilà pourquoi nous avons étudié l'emploi du ³⁵S (période: 87,1 jours) dans la méthode d'EDMAN.

BUYLE⁴⁾ a déjà montré que l'on pouvait révéler la position des PTH, en soumettant le chromatogramme sur papier à un flux de neutrons (produits par une pile), ce qui rendait l'iode (du dérivé de la p-iodophénylthiohydantoïne) radioactif et permettait la localisation du PTH sur le papier; mais il faut alors disposer d'une source de neutrons, sujétion que nous avons voulu éviter.

Nous nous sommes inspirés de la technique micro mise au point par BUYLE⁴⁾ pour la dégradation des peptides. L'emploi de l'isothiocyanate de phényle marqué au soufre 35 apporte une grande simplification à la révélation des chromatogrammes puisqu'il n'est plus nécessaire de disposer d'une source de neutrons.

Bien que nous n'ayons travaillé jusqu'à présent que sur des di- et tri-peptides, les résultats obtenus nous semblent suffisamment nets pour mériter une première publication. En effet, même avec un réactif ne possédant qu'une activité spécifique de 15 mc/mM, il a été possible d'abaisser considérablement les quantités de peptide qui jusqu'à présent étaient nécessaires à cette dégradation. Toutefois, comme nous le verrons plus loin, certaines complications ou anomalies peuvent se présenter avec quelques acides aminés (généralement les acides aminés possédant un autre groupement fonctionnel: $-OH$, ou bien une deuxième fonction $-NH_2$ ou $-COOH$), par le fait que des produits secondaires de la réaction, non révélables par la méthode chimique, sont localisés par des mesures de radioactivité. Nous n'étudierons pas ici ces phénomènes, nous nous contenterons de les mentionner uniquement.

Partie expérimentale

I. Matériel utilisé. – A) *Pour la dégradation des polypeptides.* Pour des raisons pratiques, nous avons tenu à utiliser un matériel aussi simple que possible pour effectuer la dégradation des peptides. Des volumes de 5 μl sont encore facilement mesurables avec exactitude au moyen de micropipettes, aussi ne sommes-nous pas descendus au-dessous de cette limite.

Nous avons choisi des microtubes $\varnothing = 2$ mm environ, de 40 mm de longueur. Un léger étranglement situé à 10 mm au-dessous de l'ouverture diminue les risques de projection au cours des évaporations sous vide.

⁴⁾ R. BUYLE, Thèse présentée à l'Université libre de Bruxelles, 1955.

Pour effectuer les extractions au moyen de solvants organiques, nous avons utilisé un micro-agitateur rotatif constitué par un fil d'acier inoxydable terminé par une anse et entraîné par un moteur électrique rapide. On obtient ainsi une agitation très efficace. La séparation des phases est obtenue par centrifugation des tubes au moyen d'une centrifugeuse à main, et la phase sur-nageante est prélevée au moyen d'une micropipette.

Les micropipettes servant au prélèvement des solutions et au pompage des phases organiques sont en polyéthylène. Leur pointe est effilée de manière qu'elle puisse pénétrer jusqu'au fond des microtubes. Le polyéthylène a l'avantage de ne pas se mouiller et de ce fait, de ne pas retenir de liquide lors de la vidange de la pipette.

B) *Pour la lecture des chromatogrammes radioactifs.* Le dispositif servant à localiser les taches radioactives sur les chromatogrammes comprend: 1° Un détecteur de radioactivité (SC 55 TRACERLAB INC., Boston, U.S.A.) constitué par un tube de GEIGER (GC-2 TRACERLAB INC., Boston, U.S.A.) à fenêtre de mica (1,7 mg/cm²) utilisé sous tension de 1400 volts, protégé par un château de plomb de 5 cm d'épaisseur. Un dispositif d'entraînement automatique fait passer une règle métallique sous le tube de GEIGER, le chromatogramme étant fixé sur cette règle. 2° Un appareil de comptage (Monitor SU 3C, TRACERLAB INC., Boston U.S.A.), relié au détecteur par l'intermédiaire d'un préamplificateur (P-11, TRACERLAB INC., Boston, U.S.A.). 3° Un enregistreur-intégrateur graphique (Graphic Recorder G 10, VARIAN ASSOCIATES, Palo Alto, Calif., U.S.A.) commandé par l'appareil de comptage. Cet enregistreur est relié mécaniquement au détecteur par un câble souple, ce qui assure la synchronisation des mouvements de la règle et du papier.

II. *Mode opératoire.* - 1° *Synthèse du phénylthiocarbamylpeptide.* Dans un microtube, on introduit 0,020, 0,010 ou 0,005 μ M de peptide en solution dans 5 μ l de solution tampon: véronal sodique 0,05M. On ajoute alors 0,200 μ M d'isothiocyanate de phényle-[³⁵S]⁶) (activité 7-15 mc/mM) dissous dans 5 μ l d'alcool absolu. On homogénéise le contenu du tube par un mouvement de rotation rapide, on bouche et on porte 2 h à l'étuve à 40°. Après refroidissement, on dilue le contenu du tube avec 20 μ l de solution tampon au véronal sodique 0,05M. On extrait l'excès d'isothiocyanate de phényle à 5 reprises, chaque fois avec 20 μ l de benzène contenant 10% de pyridine. On évapore la phase aqueuse sous le vide d'une pompe à huile.

2° *Cyclisation du phénylthiocarbamylpeptide.* Le résidu d'évaporation est dissous dans 20 μ l d'un mélange d'acide acétique et de HCl conc. (4 vol. + 1 vol.). Après 2 h de repos à température ordinaire, l'élimination du reste N-terminal substitué et sa cyclisation sont achevées. On évapore les acides sous vide poussé en présence de KOH.

3° *Isolement de la phénylthiohydantoïne dérivée de l'acide aminé N-terminal (PTH).* Le résidu est repris par 15 μ l de NaOH 0,05N et 5 μ l de solution de véronal sodique 0,05M. La PTH est extraite par le benzène (3 fois 20 μ l) et identifiée par chromatographie sur papier.

La solution aqueuse résiduelle contenant le peptide raccourci d'une unité, est évaporée sous vide, reprise par 5 μ l d'eau, additionnée de 5 μ l de solution de phénylisothiocyanate marqué, et retraitée de la manière ci-dessus en vue de l'isolement du 2e acide aminé N-terminal, etc.

4° *Chromatographie des PTH.* La méthode utilisée est celle préconisée par SJÖQUIST⁸): chromatographie descendante sur papier WHATMAN No. 1 imprégné d'une solution d'amidon à 0,5% et séché. Le solvant est un mélange de 7 vol. d'heptane et de 3 vol. de pyridine. La révélation chimique est obtenue par aspersion d'iode + azide de sodium⁵). Les taches apparaissent en blanc sur fond brun-violet: en effet, les PTH, en raison de leur fonction thiocétone (tautomérisable en fonction -SH), catalysent la réaction suivante entre iode et azide de sodium: $I_2 + 2 NaN_3 = 2 NaI + 3 N_2$, ce qui fait disparaître l'iode en présence d'une quantité suffisante de NaN_3 . On obtient donc une plage blanche aux endroits où se trouvent les PTH.

5° *Lecture des chromatogrammes radioactifs.* Les chromatogrammes sont coupés en bandes de 2,5 cm de largeur; les bandes fixées sur une règle métallique défilent automatiquement sous le compteur de GEIGER. Un système amplificateur et un intégrateur fournissent un enregistrement graphique de la radioactivité. On obtient ainsi des pics qui correspondent à des taches actives du chromatogramme; ces taches actives sont identifiées par leurs Rf et par comparaison avec ceux de PTH connues, chromatographiées simultanément sur le même papier. Ces produits de

⁵) F. FEIGL & E. CHARGAFF, Z. analyt. Chem. 74, 376 (1928).

⁶) Fourni par THE RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham.

Détermination de la séquence de di- et tri-peptides avec le $[^{35}\text{S}]_1$ -phénylthiocyanate (15 mc/mM)

Peptide	Quantité utilisée μM	Niveau moyen radio-activité cpm	PTH des acides aminés N-terminaux*										Remarques		
			1er			2e			3e						
			Rf _c **	Rf _f ***	cpm	Rf _c	Rf _f	cpm	Rf _c	Rf _f	cpm				
D,L-Leucyl-glycine . . .	0,02	50	0,47	0,50	200	0,25	0,24	520	—	—	—	—	—	—	PTH leucine: un 2 ^d pic, inconnu, à Rf: 0,83, cpm: 220
D,L-Alanyl-glycine . . .	0,01 0,005	50 45	0,45 0,42	0,48 0,43	210 110	0,23 0,26	0,22 0,29	350 180	—	—	—	—	—	—	Pas de pics parasites Pas de pics parasites
Glycyl-L-proline . . .	0,02	50	0,24	0,25	350	0,51	0,51	185	—	—	—	—	—	—	Pas de pics parasites
Valyl-tyrosine . . .	0,02	65	0,54	0,55	170	0,19	0,21	210	—	—	—	—	—	—	PTH valine: pic inconnu à Rf 0,71, cpm 170; le pic normal et le pic parasite sont étalés et se recouvrent partiellement
Prolyl-tyrosyl-N _ε - tosyl-lysine (L, L, L)	0,01	40	0,50	0,53	500	0,24	0,23	125	0,24	0,39	230	—	—	—	Pas de taches parasites aux 2 premiers stades. Pour la PTH de la tosyl-lysine, les 2 pics observés aux Rf 0,39 et 0,91 ne correspondent pas à des dérivés connus; ces pics sont toutefois reproductibles

* On utilise chaque fois 0,200 μM de $[^{35}\text{S}]_1$ -phénylthiocyanate en solution dans 5 μl d'alcool ou de pyridine: on obtient moins de pics parasites avec l'alcool.

** Rf_c = Rf chimique.

*** Rf_f = Rf radioactif.

référence (non marqués) sont déposés en quantité suffisante pour être révélables chimiquement. On élimine ainsi les erreurs dues aux légères différences de Rf que l'on peut observer d'un chromatogramme à l'autre pour une même substance. Le passage du chromatogramme sous le compteur et le déroulement du papier dans l'enregistreur se font à la même vitesse, ce qui facilite les comparaisons entre les taches de référence par révélation chimique sur les chromatogrammes, et les pics de radioactivité.

III. *Peptides étudiés.* Nous avons appliqué la méthode décrite à quelques dipeptides et à un tripeptide. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau.

Dans les mesures de la radioactivité des taches actives sur les chromatogrammes, il faut tenir compte du fait que les chromatogrammes présentent souvent des traînées radioactives qui viennent s'ajouter au bruit de fond (25–30 cpm). Pour chaque graphique, il faut donc établir le niveau moyen de la radioactivité entre les pics (qui est de l'ordre de 40–50 cpm). Pour être significatifs, ces pics doivent présenter une radioactivité au moins double de celle du niveau moyen.

Comme le montre le tableau, les PTH de certains acides aminés tels que la glycine, la proline, etc., présentent un seul pic bien net et sont donc facilement identifiés. Par contre, la PTH dérivant de la lysine fournit un pic très étalé, alors que celui de la N-tosyl-lysine donne 2 pics nets (Rf 0,39 et 0,91) mais qui ne correspondent pas au Rf 0,24 de la PTH de la N_ε-tosyl-lysine; il s'est formé vraisemblablement des produits de décomposition, non révélables par la méthode chimique, et que nous n'avons pas encore identifiés.

Par cette méthode, nous avons pu obtenir des pics tout à fait nets en travaillant avec des quantités de 0,005 μ M de dipeptides et 0,01 μ M de tripeptide, avec un réactif marqué possédant une activité spécifique de 15 mc/mM.

Nous nous proposons d'un côté d'étudier la possibilité d'augmenter rationnellement la sensibilité de cette méthode par l'augmentation de l'activité spécifique du réactif, et de l'autre, de déterminer la nature des taches parasites, ou tout au moins comment éviter leur formation. Ensuite, nous étendrons cette méthode à la détermination de la séquence de peptides plus compliqués.

Les auteurs remercient sincèrement la COMMISSION POUR LA SCIENCE ATOMIQUE du FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, de l'aide financière accordée pour ce travail.

SUMMARY

The use of [³⁵S]-phenylisothiocyanate (EDMAN's reagent, with radioactif tracer) for the determination of the sequence of amino acids in peptides is described. With an activity of 15 mc/mM in this reagent, quantities of 0.005 to 0.01 micromole of peptide (di- and tri-peptides) can be used. With certain amino acids, parasite pics of still unknown nature appear.

Laboratoires de chimie organique et pharmaceutique
de l'Université de Genève
