

O HEMOGLOBÍNE (I) K OTÁZKE VÄZBY AMINOKYSELÍN NA KARBOXYLOVOM KONCI LYZÍNU A ARGINÍNU V POLYPEPTIDICKOM REŤAZCI LUDSKÉHO A KONSKÉHO HEMOGLOBÍNU

PAVEL MÄSIAR

Biochemický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Košiciach

Jednou zo základných otázok stavby bielkovín je otázka vzájomnej väzby aminokyselín v polypeptidickom reťazci bielkovinovej molekuly. V jednej z predchádzajúcich prác [1] sme poukázali na relatívnu početnosť výskytu daného typu väzby v polypeptidickom reťazci celého radu rozmanitých bielkovín, kým iný typ väzby sa vyskytoval menej často alebo sa nevyskytoval vôbec. Je pochopiteľné, že exaktné vyhodnotenie tejto otázky je v súčasnej dobe ešte obmedzené malým počtom prác riešiacich štruktúrne otázky pri rozličných typoch bielkovín. Avšak dostupný materiál zatiaľ jednoznačne svedčí pre určitú zákonitú výberovosť vzájomnej väzby medzi jednotlivými aminokyselinami v peptidických reťazcoch bielkovín. Pri hemoglobíne koňa a svine bola podrobne analyzovaná otázka väzieb v okolí arginínu a histidínu [2, 3]. Zistilo sa, že hoci v oboch prípadoch boli dané teoretické predpoklady k vzájomnej väzbe všetkých osemnástich prirodzených aminokyselín, z čiastočného hydrolyzátu oboch hemoglobínov bolo možné izolovať len peptidy určitého typu. Väzby v okolí lyzínových zvyškov boli analyzované v hemoglobíne svine [4]. Treba poznamenať, že za podmienok kyslej čiastočnej hydrolyzy možno predpokladať úplnú dekompozíciu peptidických väzieb aj kratších reťazcov, v dôsledku čoho časť peptidov je izolovateľná v takom malom množstve, že nestačí na exaktné stanovenie štruktúry. So zreteľom na uvedenú skutočnosť rozhodli sme sa v tejto práci doplniť výsledky získané analýzou kyslých čiastočných hydrolyzátov o analýzu enzymatických hydrolyzátov a súčasne porovnať väzby aminokyselín na karboxylovom konci lyzínu a arginínu v polypeptidických reťazcoch ľudského a konského hemoglobínu.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Materiál

Konský hemoglobín bol kryštalický preparát izolovaný z čerstvej konskej krvi odobranej pri porážke. Ľudský hemoglobín bol izolovaný z erytromasy získanej z transfúznej stanice v Prahe.

Enzým

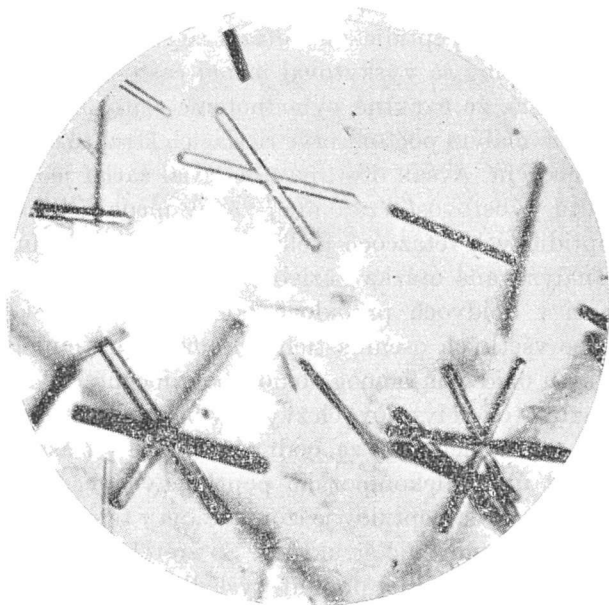
Na hydrolyzu sa použil kryštalický preparát trypsínu fy. Biogena, n. p., Praha.

Príprava substrátu

Obidva hemoglobíny boli skryštalované a trikrát rekrýštalované dialýzou proti nasýtenému roztoku síranu amónneho podľa F. Haurowitza [5]. Preparáty sa odsolili dialýzou proti tečúcej vode spôsobom opísaným v jednej z predchádzajúcich prác [4]. Takto pripravené preparáty konského a ľudského hemoglobínu boli zbavené prostetickej skupiny — hému — metódou, ktorú opísali M. L. Anson a A. E. Mirsky [6].

Príprava enzýmu

Raz kryštalovaný obchodný preparát trypsínu sa prečistil trojnásobnou opakovanou rekrýštalizáciou podľa J. H. Northropa [7] (obr. 1). Odsaté kryštály sa rozpustili



Obr. 1. Mikroskopická snímka kryštálov trypsínu. Kryštály získané kryštalizáciou podľa J. H. Northropa [7].

v 0,1 N-H₂SO₄. Roztok sa po každej kryštalizácii filtroval cez kremelinu. Po poslednej kryštalizácii sa roztok trypsínu dialyzoval proti okyslenej destilovanej vode o pH 4,0 a lyofilizoval sa. 50 mg lyofilizovaného preparátu sa rozpustilo v 5 ml 0,16 M-HCl a inkubovalo sa pri 37 °C v termostate 24 hodín, aby sa inaktivovali prípadné stopy prímiesi [8].

Hydrolyza

Pre hydrolyzu sme brali 0,5 % roztok (suspenzia) denaturovanej bielkoviny. Na dokonalú homogenizáciu denaturovanej bielkoviny sme použili homogenizátor podľa V. R. Pottera a C. A. Elvehjema [9]. Takto získanú jemnú suspenziu sme za stáleho miešania preinkubovali vo vodnom kúpeli, až teplota vnútri roztoku dosiahla 30 °C; pH roztoku sme upravili na hodnotu 7,5. Enzým upravený vyššie opísaným spôsobom sme pridali k substrátu v 0,025 % koncentrácii. Hydrolyza za týchto podmienok a stá-

leho miešania prebiehala 24 hodín. pH roztoku sme v pravidelných polhodinových intervaloch kontrolovali a upravovali na hodnotu 7,5. Obidva preparáty globínov sme hydrolyzovali za tých istých podmienok. Priebeh reakcie sme pri kônskom a ľudskom hemoglobíne sledovali papierovou elektroforézou, a to v 2—4—8—16—24 hodinových intervaloch. Hydrolyzu sme zastavili kyselinou trichlóroctovou, ktorú sme pridali k zmesi v množstve odpovedajúcom 1 % výslednej koncentrácii. Vzniknutú zrazeninu sme z hydrolyzátu odstránili filtráciou. Kyselinu trichlóroctovú sme z filtrátu odstránili vytrepáním do éteru. Takto získaný hydrolyzáat sme v 0,5 cm vrstve naliali na Petriho misky o priemer 10—15 cm, zmrazili a v zmrazenom stave vákuove odparili nad tuhým hydroxydom sodným a koncentrovanou kyselinou sírovou.

Dinitrofenylácia

Hydrolyzou uvoľnené aminoskupiny s arginínom a lyzínom susediacich aminokyselín výsledných hydrolyzáatov sme substituovali dinitrofluórbenzénom. Alikvotnú časť odpovedajúcu 15 mg pôvodnej bielkoviny sme rozpustili v 1 ml 0,5 % roztoku trimetylamínu. K tomu sme pridali 1,5 ml 0,6 % roztoku dinitrofluórbenzenu v absolútnom etanole. Zmes sme tri hodiny inkubovali pri 37 °C. Po tejto dobe sme vzorky odparili vo vákuu nad kyselinou sírovou. Odparky sme opäť rozpustili v 1 ml 0,25 % trimetylamínu a nadbytok dinitrofluórbenzenu sme vytrepali do éteru. Vytrepávali sme tak dlho, až éterická fáza bola bezfarebná, najmenej však trikrát. Vodnú fázu sme opäť odparili vo vákuu nad kyselinou sírovou. Takto substituované vzorky enzymatických hydrolyzáatov sme podrobili úplnej hydrolyze 12 N-HCl 8 hodín pri 105 °C. Dinitrofenylované aminokyseliny sme po predchádzajúcom zriedení hydrolyzáatu redestilovanou vodou (1 : 1) oddelili adsorpciou na kolónku Zerolytu H 2 % podľa B. Keila [10].

Hydrazinolýza

Alikvotnú časť hydrolyzáatu odpovedajúcu 5 mg pôvodnej bielkoviny sme podrobili hydrazinolýze za účelom stanovenia C-koncových aminokyselín hydrolyzáatu. K suchému odparku hydrolyzáatu sme pridali 150 μ l bezvodého hydrazínu a 8 hodín zahrievali pri 110 °C v zatavenej kapiláre. Nadbytočný hydrazín sme odparili vo vákuu nad kyselinou sírovou. K odparku sme pridali 80 μ l vody a 80 μ l bezvodého benzaldehydu. Zmes sme opäť nasali do kapiláry a zatavili. Po pretrepaní sme zmes v zatavenej kapiláre centrifugovali. Na rozhraní obidvoch fáz sme kapiláru rozlomili a vodnú vrstvu naniesli na chromatografický papier Whatman 1.

Chromatografia dinitrofenylovaných aminokyselín

Na identifikáciu hydrolyzou uvoľnených dinitrofenylovaných aminokyselín sa použila jednorozmerná a dvojrozmerná papierová chromatografia.

Jednorozmerná chromatografia sa uskutočnila v systémoch:

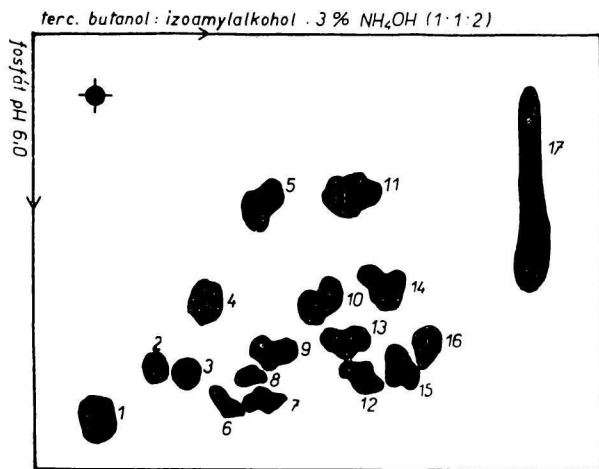
- fenol—*izo*amylalkohol—voda (1 : 1 : 1) — atmosféra v komere nasýtená parami amoniaku;
- terciárny butanol—*izo*amylalkohol—3 % hydroxyd amónny (1 : 1 : 2) — atmosféra v komere nasýtená parami spodnej fázy.

Dvojrozmerná papierová chromatografia sa vykonala v systémoch:

A. prvý smer: toluén—etylénchlórhydrín—pyridín—0,8 N-NH₄OH (5 : 3 : 1,5 : 3) vzostupne; druhý smer: 1,5 M fosfát zostupne tak, ako to opisuje A. L. Levy [11].

B. Lepšie sa nám osvedčila naša modifikácia. Prvý smer: terciárny butanol—*izo*amylalkohol—3 % NH₄OH (1 : 1 : 2) zostupne 60 hodín pri 20 °C po dlhšej strane Whatmanovho papiera (46 × 57). Atmosféra v komere nasýtená parami spodnej amoniakálnej

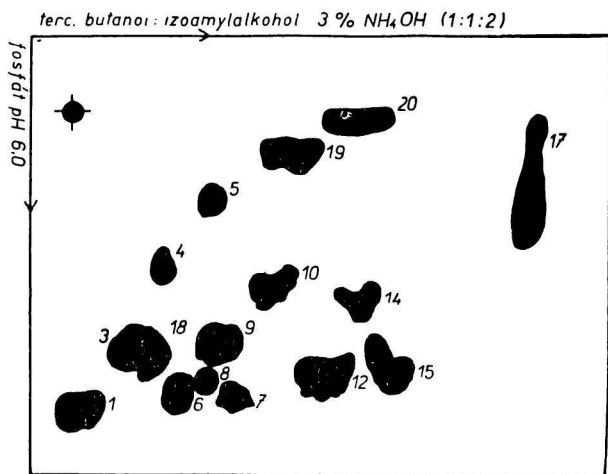
fázy; druhý smer: 1,5 M fosfát zostupne 12 hodín pri 20 °C po kratšej strane Whatmanovho papiera (obr. 2). Ako nosič sa v obidvoch prípadoch použil chromatografický papier



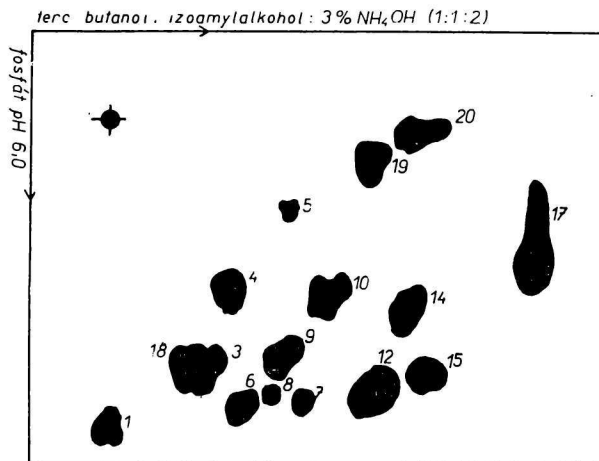
Obr. 2. Dvojrozmerný chromatogram zmesi dinitrofenylderivátov aminokyselín. Chromatografia na papieri Whatman 1.

Číslo pri jednotlivých škvrnách označujú dinitrofenylderiváty týchto aminokyselín: 1. DNP CySO₃H, Asp, Glu; 2. DNP AspNH₂; 3. DNP Ser; 4. DNP Gly; 5. DNP His; 6. DNP Thr; 7. DNP Pro; 8. DNP Arg; 9. DNP Ala; 10. DNP-OH; 11. DNP Try; 12. DNP Val; 13. DNP Met; 14. DNP Phe; 15. DNP Leu; 16. DNP Ileu; 17. DNP-NH₂; 18. DNP e-Lys; 19. DNP Tyr; 20. DiDNP Lys.

Whatman 1. Chromatografia aminokyselín uvoľnených hydrazinolýzou sa uskutočnila v systéme *m*-krezol—voda (1 : 1) na papieri Whatman 1 zostupne.



Obr. 3. Dvojrozmerný chromatogram dinitrofenylderivátov aminokyselín získaných kyslou hydrolyzou dinitrofenylovaného tryptického hydrolyzátu konského hemoglobínu.



Obr. 4. Dvojrzmerný chromatogram dinitrofenylderivátov aminokyselín získaných kyslou hydrolyzou dinitrofenylovaného tryptického hydrolyzátu ľudského hemoglobínu.

Detekcia

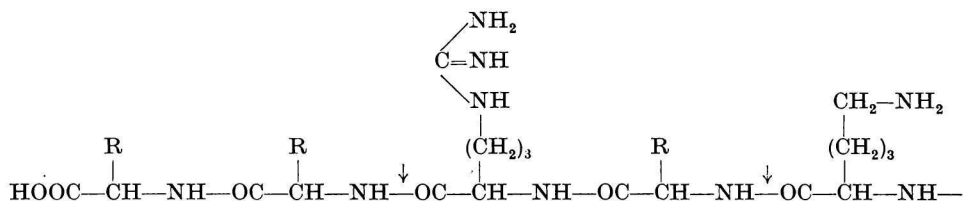
Detekciu dinitrofenylderivátov aminokyselín sme robili v ultrafialovom svetle. Aminokyseliny uvoľnené hydrazinolýzou sme detegovali pretiahnutím chromatogramu v 0,5 % roztoku ninhydrínu v acetóne.

Výsledky

Výsledky analýz sú zhrnuté v tab. 1—3.

Diskusia

Štiepenie polypeptidického reťazca trypsínom možno vyjadriť schémou



Zo schémy je zrejmé, že trypsín štiepi polypeptidický reťazec bielkovín špecificky na karboxylovom konci arginínu a lyzínu [12]. Túto okolnosť možno s výhodou použiť pri štúdiu štruktúrnych otázok väčšiny bielkovín, s výnimkou niektorých pankreatických proteáz, ktoré sú ním aktivované aj po predchádzajúcej denaturácii.

Za predpokladu, že máme k dispozícii metódu umožňujúcu izolovať aminokyseliny, ktoré sa s arginínom a lyzínom viažu svojou aminoskupinou, možno

tryptickou hydrolyzou stanoviť väzby na karboxylovom konci arginínu a lyzínu v molekule študovanej bielkoviny. Tento predpoklad je dobre splniteľný substitúciou voľných aminoskupín pomocou dinitrofluórbenzénu podľa F. Sangera [13] s následnou chromatografickou analýzou dinitrofenylderivátov aminokyselín uvoľnených kyslou hydrolyzou. V diskutovanej práci sa využili obidva spomínané princípy. Ako vyplýva z tab. 1, karboxylový koniec

Tabuľka 1

N-koncové aminokyseliny uvoľnené 24 hodinovou tryptickou hydrolyzou ľudského a konského hemoglobínu

Hemoglobín	N-koncové aminokyseliny*																			
	Arg	His	Lys	Try	Ala	CySH	CyS-S	Gly	Ileu	Leu	Met	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr	Asp	AspNH ₂	Glu	GluNH ₂
ľudský	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
konský	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

* Aminokyseliny označené znamienkom (+) boli izolované ako DNP-deriváty z tryptického hydrolyzátu obidvoch hemoglobínov.

lyzínu a arginínu je v hemoglobíne viazaný s aminoskupinou histidínu, lyzínu, arginínu, alanínu, glycínu, valínu, tyrozínu, kyseliny asparárovej, serínu, leucínu, fenylalanínu a prolínu. Špecifické štiepenie bielkovín prirodzene silne závisí od čistoty enzymatického preparátu. Táto okolnosť je obzvlášť dôležitá preto, že pankreatické proteázy už v minimálnej koncentrácii sú schopné odbúravať bielkovinu. Najmä dôležitá je tu prítomnosť prímiesi chymotrypsínu, ktoré pri nedokonalej čistote preparátu umožňujú vznik artefaktov. Tomuto sme sa vyhli prečistením preparátu opakovanou kryštalizáciou a inaktíváciou prípadných zvyškov iných proteáz vyššie opísaným spôsobom. Ako vidieť z tab. 2, hydrazinolýzou sa ako C-koncové aminokyseliny uvoľnili len arginín a lyzín, z čoho je zrejmé, že preparát použitý v našej práci predstavoval čistý špecificky štiepiaci enzým. V našich predchádzajúcich prácach [2—4] boli izolované peptidy odvodené od bázičných aminokyselín z kyslého čiastočného hydrolyzátu určitých typov hemoglobínov. Na základe týchto údajov, berúc do úvahy určitú výberovosť väzieb, možno pre nami zistené N-koncové aminokyseliny tryptického hydrolyzátu navrhnúť určité rozdelenie. Podľa toho by s lyzínom vstupovali do väzieb aminokyseliny ako histidín, alanín, glycín, leucín, valín, lyzín, kyselina asparágová, treonín a serín; s arginínom aminokyseliny ako alanín, leucín, fenylalanín, lyzín, serín a tyrozín. Tento

Tabuľka 2

C-koncové aminokyseliny tryptického hydrolyzá-
tu ľudského a konského hemoglobínu uvoľnené
hydrazinolýzou

Hemoglobín	
ľudský	konský
arginín	arginín
lyzín	lyzín

návrh je prirodzene obmedzený len na molekulu hemoglobínu za použitia tryptickej hydrolýzy. Ako vidieť z tohto rozdelenia, boli tu zahrnuté aj také aminokyseliny, ktoré sme v predchádzajúcich prácach objavili v peptidoch lyzínu, ale pre nedostatok materiálu nebolo im možné stanoviť štruktúru; ide o histidín objavený v peptide vedľa lyzínu (lys. his) a o kyselinu asparágovú, pri ktorej sa zistilo, že prichádza s lyzínom, ale nestanovilo sa ich poradie v peptide. Naše výsledky ukazujú, že uvedené aminokyseliny sa v hemoglobíne vyskytujú vo väzbe: -lyzylhistidyl-, a-lyzylasparagyl-. Podobne bola dokázaná sekvencia -lyzyllyzyl-a-arginyllyzyl-. Spornou ostáva otázka prolínu, ktorý sa zistil ako N-koncová aminokyselina v oboch hydrolyzátoch, keďže uvedená aminokyselina nebola v kyslých čiastočných hydrolyzátoch objavená. Preto možno o nej uvažovať len alternatívne ako o väzbe lys. pro alebo arg. pro. V súvislosti s vyššie uvedeným navrhujeme pre ľudský a konský hemoglobín okrem arginínu a lyzínu sekvencie uvedené v tab. 3.

Pri porovnávaní výsledkov platných pre obidva druhy hemoglobínov treba konštatovať, že sa nám na karboxylovom konci arginínu a lyzínu v polypeptidickom reťazci konského a ľudského hemoglobínu nepodarilo zistiť kvalitatívne rozdiely. Možnosť diferencií v množstve jednotlivých väzieb v molekule obidvoch hemoglobínov nemožno však vylúčiť.

V súvislosti s možnosťou transpeptidačných reakcií aj v roztokoch 6 N-HCl, ako to tvrdia niektorí autori [14], treba poznamenať, že výsledky nami uskutočnenej hydrolýzy úplne potvrdzujú výsledky získané kyslou hydrolýzou, čo svedčí proti priebehu transpeptidačných reakcií v roztokoch 6 N-HCl.

Uvedené výsledky dovoľujú sa dotknúť i niektorých nezistených sekvencií tripeptidov, ktoré sa našli v predchádzajúcich prácach [3, 4]. Zistilo sa, že vysokobázický tripeptid objavený v konskom hemoglobíne je zložený z lyzínu, arginínu a histidínu. Vychádzajúc z teoretických predpokladov, bolo by možné pre tento tripeptid odvodiť šesť sekvencií: lys. arg. his; lys. his. arg;

Tabuľka 3

Väzby na karboxylovom konci lyzínu a arginínu v ľudskom a konskom hemoglobíne navrhované na základe analýzy dinitrofenylovaných tryptic-
kých hydrolyzátov

Väzby na karboxylovom konci arginínu:	arg. ala lys. arg arg. leu arg. phe arg. ser arg. tyr
Väzby na karboxylovom konci lyzínu:	lys. ala lys. arg lys. asp lys. gly lys. his lys. leu lys. lys lys. ser lys. val lys. pro
(pre konský hemoglobín):	arg. his. lys

his. lys. arg; his. arg. lys; arg. his. lys; arg. lys. his. Na základe väzby -lyzyl-
-histidyl- prichádzajú do úvahy len tieto dve: lys. his. arg alebo arg. his. lys.
Pravdepodobnejšia sa nám zdá druhá alternatíva, pretože v kyslom čiastoč-
nom hydrolyzáte lysozymu bol peptid tejto sekvencie dokázaný. Ak berieme
do úvahy určitú výberovosť väzieb v polypeptidickom reťazci aminokyselín,
hovorí to v zmysle navrhovanej alternatívy. Je prirodzené, že presnú odpoveď
na to dajú nám ďalšie pokusy v tomto smere.

*Ďakujem akademikovi F. Šormovi a kolektívu Biochemického oddelenia Chemického
ústavu Československej akadémie vied v Prahe za nevšedný záujem o prácu a za vecné pri-
pomienky. Súčasne ďakujem O. Gendovej za technickú spoluprácu.*

Súhrn

Pomocou tryptickej hydrolyzy študovala sa otázka väzieb aminokyselín na
karboxylovom konci lyzínu a arginínu v polypeptidických reťazcoch ľudského
a konského hemoglobínu.

Dinitrofenylačným postupom sa zistilo, že v peptidickej väzbe s arginínovým
a lyzínovým karboxyloom sa v reťazcoch obidvoch bielkovín nachádzajú tieto
aminokyseliny: arginín, histidín, lyzín, alanín, glycín, leucín, fenylalanín,
prolín, serín, valín, tyrozín a kyselina asparágová.

О ГЕМОГЛОБИНЕ (I)
 К ВОПРОСУ СВЯЗИ АМИНОКИСЛОТ НА КАРБОКСИЛЬНОМ КОНЦЕ
 АРГИНИНА И ЛИЗИНА В ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ЛЮДСКОГО
 И КОНСКОГО ГЕМОГЛОБИНА

ПАВЕЛ МЭСИАР

Биохимический институт Медицинского факультета Университета имени Коменского в Кошицах

Выводы

При помощи триптического гидролиза был исследован вопрос связи аминокислот на карбоксильном конце лизина и аргинина в полипептидных цепях людского и конского гемоглобина.

Динитрофенилационным способом было обнаружено, что в полипептидной связи с аргининовым и лизиновым карбоксилем в цепях обоих белков содержатся следующие аминокислоты: аргинин, гистидин, лизин, аланин, глицин, лейцин, фенилаланин, пролин, серин, валин, тирозин, аспарагиновая кислота.

Поступило в редакцию 26. 4. 1958 г.

ON HAEMOGLOBIN (I)
 TO THE QUESTION OF SEQUENCES OF AMINO ACIDS ON THE
 CARBOXYL END OF LYSIN AND ARGININ OF HUMAN AND
 HORSE HAEMOGLOBIN

PAVEL MÄSIAR

The institute of Biochemistry, Faculty of Medicine Komensky University Košice

Summary

The question of sequences on the carboxyl end of lysin and arginin in the polypeptide chains of human and horse haemoglobin has been studied by means of tryptic hydrolysis.

It was found by DNP-method that arginin, histidin, lysin, alanin, glycin, leucin, phenylalanin, prolin, serin, valin, tyrosin and aspartic acid forme the peptide-linkage with arginin and lysin's carboxyl in both studied proteins.

Received April 26, 1958

LITERATÚRA

- Šorm F., Keil B., Holeyšovský V., Knesslová V., Kostka V., Mäsiar P., Meloun B., Mikeš O., Tomášek V., Vaněček J., Chem. listy 51, 1171 (1957). —
- Mäsiar P., Keil B., Šorm F., Chem. listy 51, 352 (1957). —
- Mäsiar P., Keil B., Šorm F., Chem. listy 51, 1728 (1957). —
- Mäsiar P., Kandidátska dizertačná práca, Praha 1957. —
- Haurowitz F., Z. physiol. Chem. 232, 125 (1935). —
- Anson M. L., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol. 14, 603 (1930). —
- Northrop J. H., J. Gen. Physiol. 16, 267 (1932). —
- Anfinsen C. B., J. biol. Chem. 221, 385 (1956). —
- Potter V. R., Elvehjem C. A., J. biol. Chem. 114, 495 (1936). —
- Keil B., Chem. listy 48, 725 (1954).
- Levy A. L., Nature 174, 126 (1954). —
- Bergmann M., Fruton J., Advances Enzymol. 1, 63 (1941). —
- Sanger F., Biochem. J. 39, 507 (1945). —
- Orechovič V. N., Diskusný príspevok na medzinárodnej konferencii o bielkovinách, Liblice 1956.

Došlo do redakcie 26. 4. 1958