O HEMOGLOBÍNE (VI)
K OTÁZKE POČTU A ZAKONČENIA POLYPEPTIDOVÝCH REŤAZCOV HEMOGLOBÍNU MAČKY

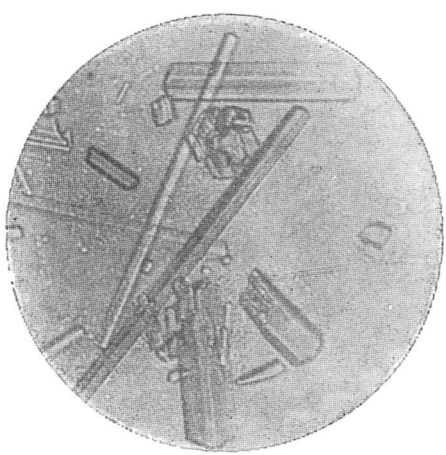
PAVEL MÄSIAR
Katedra biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach

V jednej z predchádzajúcich prác sme vykonali analýzu tryptického hydrolyzátu bielkovinovej zložky hemoglobínu izolovaného z mačacích erytrocytov [1]. Ako sa ukázalo pri porovnaní analýz tryptických hydrolyzátov iných typov, celý rad trypsínom vyštiepených polypeptidových fragmentov sa pri všetkých typoch hemoglobínu chová analogicky v elektrickom poli i pri chromatografovaní [1, 2]. Na druhej strane už táto metóda nám umožnila poukázať na rozdiely v štruktúre študovaných hemoglobínov. Výsledky dosiahnuté elektrochromatograficky však nestačili na objasnenie presného miesta v polypeptidových reťazcoch, v ktorom sa zistené diferencie vyskytovali, preto sme sa rozhodli postupne spresňovať a lokalizovať zistené rozdiely v mikroštruktúre hemoglobínov. V tejto práci sme podrobili štúdiu zakončenie polypeptidových reťazcov mačacieho hemoglobínu.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Ako materiál sme použili kryštalický preparát (obr. 1) mačacieho hemoglobínu pripravený v našom laboratóriu podľa D. L. Drabkina [3]. Do pokusu sme brali bielkovinovú zložku — globín, izolovaný postupom, ktorý vypracovali M. L. Anson a A. E. Mirsky [4].



Obr. 1. Kryštály mačacieho hemoglobínu získané metódou D. L. Drabkina [3].

Dinitrofenylačná technika

1 μM (66 mg) globínu sme substituovali dinitrofluórbenzénom za podmienok, ktoré uvádza F. Sanger [5]. Získaný dinitrofenylderivát globínu sme podrobili kyslej hydrolýze 6 N-HCl v zatavenej trubici pri 105 °C po dobu 18 hodín. Nato sme hydrolyzačnú zmes zriedili destilovanou vodou 1 : 1 a dinitrofenylderiváty aminokyselín sme extrahovali éterom (v éteri rozpustné) a butanolom (kvôli extrakcii dinitrofenylaminokyselín rozpustných vo vode). Éterický extrakt sme zahustili prúdom suchého vzduchu a dosušili v exsikátore nad koncentrovanou kyselinou sírovou a tuhým lúhom. Odparky obidvoch extraktov sme použili na kvalitatívnu analýzu DNP-aminokyselín a na izoláciu N-koncového peptidu. V nezávislom pokuse sme vyššie opísaným spôsobom substituovali dvakrát 0,2 μM globínu dinitrofluórbenzénom. Dinitrofenylderivát globínu sme hydrolyzovali 10 N-HCl pri 105 °C po dobu 48 hodín. Éterické extrakty získané opísaným spôsobom sme použili na kvalitatívnu analýzu. Pre stanovenie korekčného faktora sme hydrolyzovali 2 × 0,2 μM DNP-valínu, DNP-metionínu a DNP-glycínu spolu s 0,2 μM globínu. Hydrolyzáty týchto štandardov sme podrobili tej istej procedúre ako vyššie uvedené hydrolyzáty dinitrofenylglobínov.

Fenyltiohydantoínová technika

N-koncové aminokyseliny sme kvantitatívne stanovili fenyltiohydantoínovou metódou [6].

Analýza dinitrofenylderivátov

Dinitrofenylderiváty aminokyselín sme analyzovali dvojrozmernou chromatografiou v systéme terciárny butanol—*izo*amylalkohol —1 % hydroxyd amónny (1 : 1 : 2) a 1,5 M fosfátový tlmivý roztok o pH 6,0 v druhom smere. Analýzu fenyltiohydantoínov príslušných aminokyselín sme vykonali jednorozmernou zostupnou chromatografiou v systémoch *A*) heptán—pyridín (7 : 3), *B*) heptán—*n*-butanol—kyselina mravčia (4 : 4 : 2) podľa J. Sjöquista [7]. Pre chromatografiu sme použili chromatografický papier Whatman 1. Jedine na kvantitatívne stanovenie DNP-aminokyselín sme upotrebili chromatografický papier Whatman 3.

Výsledky a diskusia

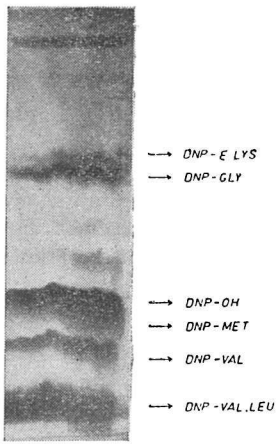
Výsledky kvalitatívnej analýzy kyslých hydrolyzátov dinitrofenylglobínu získané 18 hodinovou hydrolýzou 6 N-HCl sú zhrnuté v tab. 1 a znázornené

Tabuľka 1

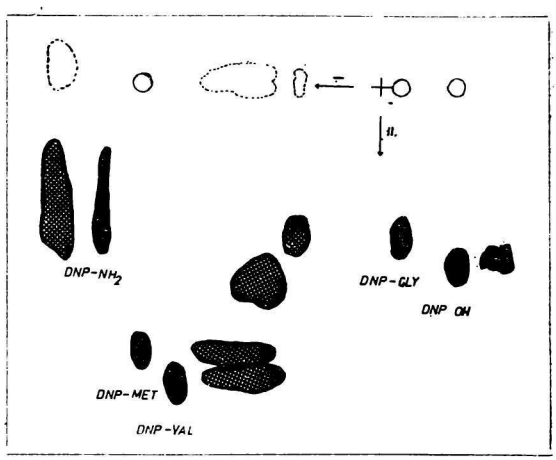
Uvoľňovanie dinitrofenylaminokyselín v závislosti od trvania hydrolýzy

Vzorka	6 N-HCl 105 °C, 18 hodín	6 N-HCl 105 °C, 24 hodín	10 N-HCl 105 °C, 48 hodín	C-koncové aminokyseliny
DNP-globín	DNP-val DNP-met DNP-gly DNP-val.leu	DNP-val DNP-met DNP-gly DNP-val.leu	DNP-val DNP-met DNP-gly —	neboli analyzované
DNP-val.leu	— —	DNP-val DNP-val.leu	DNP-val —	leu leu

na obr. 2 a 3. Ako je zrejmé z obr. 2, chromatografickou analýzou odparku éterickej fázy kyslého hydrolyzátu dinitrofenylglobínu sa zistili DNP-glycín,



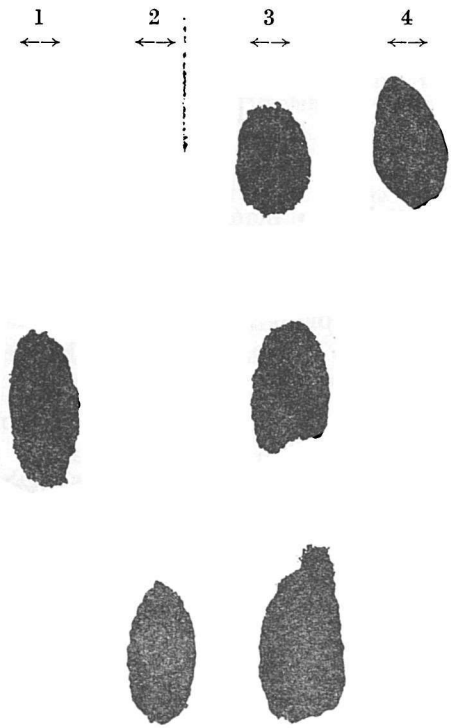
Obr. 2. Preparatívny jednorozmerný zostupný chromatogram éterickej frakcie kyslého hydrolyzátu dinitrofenylglobínu. Chromatografovalo sa v systéme terciárny butanol—*izo*amylalkohol —1 % hydroxyd amónny (1 1 : 2). Fotografovalo sa v ultrafialovom svetle. Neoznačené škvrny predstavujú artefakty vzniknuté rozpadom bielkovinovej molekuly a absorbujúce v ultrafialovom svetle. Označené škvrny predstavujú dinitrofenylderiváty aminokyselín a peptidov.



Obr. 3. Dvojrozmerný chromatogram éterickej frakcie kyslého hydrolyzátu, DNP-globínu (hydrolýza 10 N-HCl pri 105 °C počas 48 hodín). Chromatografovalo sa v systéme terciárny butanol—*izo*amylalkohol —1 % hydroxyd amónny (1 1 : 2) v jednom smere (*I*) a 1,5 M fosfát o pH 6 v druhom smere. Plné škvrny značia referenčné aminokyseliny.

εDNP-lyzín, DNP-metionín, DNP-valín a látka s R_F podobným DNP-leucínu. Všetky zóny uvedené na obr. 2 sme eluovali a opäť podrobili hydrolýze 6 N-HCl pri 105 °C po dobu 24 hodín. Chromatografickou analýzou DNP-aminokyselín získaných po opätovnej hydrolýze sme zistili DNP-glycín, DNP-metionín a DNP-valín. Hydrolýzou rýchlo postupujúcej látky sme získali DNP-valín ako N-koncovú aminokyselinu a leucín ako C-koncovú aminokyselinu. Kvalitatívnou analýzou kyslého hydrolyzátu dinitrofenylglobínu získaného 48 hodinovou hydrolýzou 10 N-HCl pri 105 °C sme zistili DNP-valín, DNP-metionín a DNP-glycín (obr. 3). Tieto zistenia nasvedčovali tomu, že polypeptidové reťazce mačacieho hemoglobínu sú zakončené glycínom, valínom a metionínom. Pretože takéto zakončenie predstavuje určitú kuriozitu vzhľadom na doteraz známe N-terminálne zakončenia hemoglobínov [6, 8—10], najmä pokiaľ ide o N-koncový glycín, podrobili sme zakončenie polypeptidových reťazcov mačacieho globínu analýze fenyltiohydantoínovou metódou. Kvalitatívnou analýzou I. stupňa postupnej degradácie študovaného hemo-

globínu papierovou chromatografiou v systéme *A* a *C* podľa J. Sjöquista [7] sme zistili PTH-glycín, PTH-metionín a PTH-valín (obr. 4). Týmto sme pokladali existenciu glycínu, metionínu a valínu ako N-terminálnych aminokyselín mačacieho hemoglobínu za potvrdenú. Kvantitatívne hodnotenie dinitrofenylderivátov zistených N-koncových aminokyselín sme robili len



Obr. 4. Jednorozmerný chromatogram fenyltiohydantoínov aminokyselín získaných v I. stupni postupnej degradácie polypeptidových reťazcov. Chromatografovalo sa v systéme *A* podľa J. Sjöquista [7]. Čísla *1*, *2* a *4* označujú syntetické fenyltiohydantoíny chromatografované ako referenčné vzorky, číslo *3* označuje pôvodnú vzorku fenyltiohydantoínov získaných degradáciou mačacieho hemoglobínu.
1. PTH-metionín, *2*. PTH-valín, *3*. vzorka, *4*. PTH-glycín. Fotografovalo sa kontaktnou fotografiou na dokumentačnej kopírke.

orientačne, pretože podmienky hydrolýzy potrebné na úplné uvoľnenie DNP-valínu vedú k silnej deštrukcii metionínu a glycínu. Za týchto okolností sme stanovili počet zvyškov valínu a metionínu dohromady. Zistili sme, že na 1 μM DNP-globínu pripadá 4,33 μM DNP-valínu a metionínu, t. j. ca 2 μM pripadajú na valín a 2 μM na metionín. Hodnotu glycínu nebolo možné za uvedených podmienok kvantitatívne stanoviť. Na objasnenie počtu N-terminálnych zvyškov sme použili modifikovanú metódu [6] pomocou fenyltiohydantoínov aminokyselín. Výsledky uvádzame v tab. 2.

Tabuľka 2

Fotometrické vyhodnotenie PTH-aminokyselín mačacieho hemoglobínu

Vzorka	Extinkcia pri 265 mμ			$\frac{V \cdot d}{14,5}$	$\frac{V \cdot d}{17}$	$\frac{V \cdot d}{16}$	μM/1 μM globínu		
	PTH-gly	PTH-met	PTH-val	PTH-gly	PTH-met	PTH-val	gly	met	val
1	0,187	0,190	0,193	0,129	0,112	0,120	2,3	1,8	2,1
2	0,180	0,183	0,188	0,124	0,108	0,117	2,2	1,8	2,0
3	0,187	0,188	0,188	0,129	0,110	0,117	2,3	1,8	2,0
4	0,196	0,198	0,199	0,135	0,116	0,124	2,3	1,8	2,1
5	0,203	0,205	0,205	0,140	0,120	0,128	2,2	1,8	2,1

Ako vidieť, na 1 μM globínu mačky pripadajú 2 μM PTH-valínu, 2 μM PTH-metionínu a 2 μM PTH-glycínu, čo odpovedá 2 zvyškom valínu, 2 zvyškom metionínu a 2 zvyškom glycínu na 1 molekulu hemoglobínu.

Pokiaľ ide o sekvenciu v okolí N-terminálnych aminokyselín, možno na základe uvedených výsledkov uzatvárať len na sekvenciu α-reťazca, ktorá je reprezentovaná zoskupením H.valyl.leucyl.

Sekvencie v okolí ostatných reťazcov nebolo možné týmito metódami stanoviť s ohľadom na počet N-terminálnych aminokyselín.

Posudzujúc uvedené výsledky z hľadiska všeobecných zákonitostí v štruktúre hemoglobínov izolovaných z rozličných druhov cicavcov, dochádzame k záveru, že N-terminálne zakončenie α-reťazca predstavuje styčný bod pre všetky dosiaľ študované hemoglobíny, kým v ostatných reťazcoch sú jasne oddiferencované zmeny v terminálnom zakončení.

Ďakujem s. O. Gendovej za technickú spoluprácu pri pokusnej časti.

Súhrn

Podrobilo sa štúdiu zakončenie amínového konca mačacieho hemoglobínu. Dinitrofenylačnou a fenyltiohydantoínovou technikou sa zistilo, že polypeptidové reťazce mačacieho hemoglobínu sú zakončené valínom, metionínom a glycínom.

Kvantitatívnou analýzou dinitrofenyl- a fenyltiohydantoínových derivátov N-terminálnych aminokyselín sa zistilo, že hemoglobín mačky je zakončený 2 zvyškami valínu, 2 zvyškami metionínu a 2 zvyškami glycínu, počítané na m. v. 66,000.

Zakončenie α-reťazcov mačacieho hemoglobínu je tvorené sekvenciou H.valyl-leucyl.

О ГЕМОГЛОБИНЕ (VI) К ВОПРОСУ КОЛИЧЕСТВА ОКОНЧАНИЙ ПОЛИПЕПТИДИЧЕСКИХ ЦЕПЕЙ ГЕМОГЛОБИНА КОШКИ

ПАВЕЛ МЕСИАР

Кафедра биохимии Медицинского факультета Университета имени П. И. Шафарика в Кошицах

Выводы

Автор подробил изучению окончание аминового конца кошачьего гемоглобина. Динитрофениловой и фенилтиогидантоиновой техникой обнаружил, что полипептидические цепи кошачьего гемоглобина оканчиваются валином, метионином и глицином.

Количественным анализом динитрофенил и фенилтиогидантоиновых дериватов N-терминальных аминокислот обнаружил, что гемоглобин кошки оканчивается 2 остатками валина, 2 остатками метионина и 2 остатками глицина на 66,000 м. в.

Окончание α-цепей гемоглобина создается секвенцией H.валил-лейцил.

Поступило в редакцию 22. 6. 1960 г.

ON HAEMOGLOBIN (VI) TO THE QUESTION OF THE NUMBER AND TERMINATION OF POLYPEPTIDIC CHAINS OF CAT HAEMOGLOBIN

PAVEL MÄSIAR

Department of Biochemistry Faculty of Medicine University of P. J. Šafárik, Košice

Summary

A termination of polypeptidic chains of cat haemoglobin has been studied. It was found by dinitrofenylation's and fenylthiohydatoin's procedure valine, methionine and glycine to be N-terminal aminoacids of cat haemoglobin.

Two residues of valine, methionine and glycine have been estimated by quantitative analysis of dinitrofenyl and fenylthiohydantoin's derivates isolated from cat haemoglobin, calculated on m. w. of 66,000.

H.valyl-leucyl was deduced as N-terminal sequence of α-chains of cat haemoglobin.

Received 22. Juni 1960

LITERATÚRA

1. Mäsiar P., Jurovčík M., Chem. zvesti *13*, 58 (1959). — 2. Mäsiar P., Smolnický T., Chem. listy *52*, 1991 (1958). — 3. Drabkin D. L., J. Biol. Chem. *164*, 703 (1946). — 4. Anson M. L., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol. *14*, 603 (1930). — 5. Sanger F., Biochem. J. *39*, 507 (1945). — 6. Mäsiar P., Chem. zvesti *14*, 717 (1960). — 7. Sjöquist J., Acta Chem. Scand. *7*, 447 (1953). — 8. Porter R. R., Sanger F., Biochem. J. *42*, 287 (1948). — 9. Ozawa H., Satake K., J. Biochem. (Japan) *42*, 641 (1955). — 10. Mäsiar P., Chem. zvesti *14*, 717 (1960).

Do redakcie došlo 22. 6. 1960

Adresa autora:

Doc. MUDr. Pavel Mäsiar, Košice, ulica Košického vlád. programu 57, Katedra biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika.