

O HEMOGLOBÍNE (XI)

ŠTÚDIUM ZÁKONITOSTÍ V OKOLÍ ARGINÍNU A LYZÍNU V MOLEKULE OVČIEHO A HOVÄDZIEHO HEMOGLOBÍNU

M. TELEHA, P. MÄSIAR

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

Výskum chemickej stavby bielkovín je v súčasnej dobe v štádiu hromadenia faktov. Na jednej strane ide o fakty týkajúce sa sekvencií celej molekuly určitej bielkoviny, v súčasnej dobe dostupné prevažne pre molekuly nižšieho rádu, na druhej strane si však ekonomizácia práce vynucuje skúmanie dielčích štruktúr viacerých bielkovín daného typu, umožňujúce štúdium všeobecných zákonitostí v chemickej stavbe bielkovinových molekúl a tým vytváranie predpokladov pre poznanie stavby vyšších bielkovín.

Jednou z posledne uvažovaných ciest je štúdium okolia typických aminokyselín a výberovosti väzieb v ich blízkosti, aby bolo možné na základe širšieho materiálu nájsť určité zovšeobecnenia, platné pre väčší súbor bielkovín.

V prácach [1, 2] sme toto hľadisko uplatnili na štúdium okolia karboxylového konca lyzínu a arginínu v molekule ľudského, konského a mačacieho hemoglobínu a hemoglobínu ošípanej. Úlohou tejto práce bolo štúdium zákonitostí v okolí lyzínu a arginínu ako typických bázičných aminokyselín v molekule ovčieho a hovädzieho hemoglobínu s cieľom zistiť väzby, ktoré možno očakávať v okolí uvádzaných aminokyselín pri riešení štruktúry obidvoch hemoglobínov.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Materiál

Analyzovali sme bielkovinovú zložku kryštalických preparátov ovčieho a hovädzieho hemoglobínu — globín. Kryštalizáciu uvedených hemoglobínov sme uskutočnili metódou opísanou v predchádzajúcej práci [3]. Preparáty ovčieho a hovädzieho hemoglobínu sme zbavili prostetickej skupiny — hému — spôsobom, ktorý opísali M. L. Anson a A. E. Mirsky [4].

Substrát

Na analýzu väzieb na karboxyle lyzínu sme použili normálny globín, na analýzu väzieb na karboxyle arginínu globín modifikovaný substitúciou ϵ -aminoskupín lyzínu priamo v neporušenej bielkovinovej molekule.

Substitúcia globínov

ϵ -aminoskupiny lyzínu bielkovinovej zložky ovčieho a hovädzieho hemoglobínu sme substituovali 2,4-dinitrofluórbenzénom (DNFB) podľa F. Sangera [5]. 200 mg globínu a 800 mg kyslého uhličitánu sodného sme suspendovali v 4 ml destilovanej vody. Do suspenzie sme po kvapkách pridali 8 ml 5 % roztoku DNFB v 96 % etanole. Dinitrofenylácia prebiehala za stáleho miešania vibračným miešadlom 2 hodiny v centrifugačných

skúmanvách v tme za podmienok laboratórnej teploty. Po dvoch hodinách sme reakciu zastavili oxyslením zmesi 6 N-HCl na pH 3,0. Nadbytočný DNFB sme zo zmesi odstránili gšťkrát opakovaným vytrepáním do 30 ml éteru. Po odstránení nadbytočného DNFB sme suspenziu DNF-globínu odparili vo vákuu nad kyselinou sírovou a tuhým lúhom sodným.

Hydrolýza

Na hydrolýzu sme použili kryštalický preparát trypsínu fy Organofarma Praha, ktorý sme prečistili štvornásobnou kryštalizáciou podľa Northropa [7]. Do pokusu sme brali po 200 mg preparátov ovčieho a hovädzieho globínu, vysušených na konštantnú váhu, z ktorých sme pripravili vodnú suspenziu odpovedajúcu 0,5 % koncentrácii. Bielkovinu sme homogenizovali v trecej miske. Jemnú suspenziu bielkoviny sme preinkubovali na vodnom kúpeli, až teplota roztoku dosiahla 30 °C. Trypsín rozpustený v 0,062 N-HCl sme pridali do roztoku substrátu v koncentrácii vytvárajúcej pomer $E/S^* = 1 : 10$. pH roztoku sme 3 % hydroxydom amónnym upravili na hodnotu 8,0. Za stáleho miešania, kontroly a úpravy pH hydrolýza prebiehala 8 hodín pri konštantnej teplote 30 °C. Hydrolýzu sme zastavili kyselinou trichlóroctovou, ktorú sme do hydrolyzátu pridali v množstve odpovedajúcom 1 % výslednej koncentrácii. Zrazeninu trypsínu sme z hydrolyzátu odstránili filtráciou a kyselinu trichlóroctovú štvornásobným vytrepáním do éteru. Hydrolyzát sme vákuove odparili nad tuhým hydroxydom sodným a nad koncentrovanou kyselinou sírovou.

Hydrolýza DNF - globínov

Hydrolýzu DNF-globínov trypsinom sme urobili vyššie opísaným spôsobom s tým rozdielom, že hydrolýza prebiehala 24 hodín a hydrolyzát sme roztrepali medzi vodu a kyselinu octovú [2]. Pred totálnou kyslou hydrolýzou všetkých troch frakcií sme znovu vykonali dinitrofenyláciu.

Dinitrofenylácia peptidových fragmentov uvoľnených po hydrolýze trypsinom

Peptidové fragmenty uvoľnené tryptickou hydrolýzou sme 2,4-dinitrofluórbenzénom substituovali tak, ako sme opísali v jednej z predchádzajúcich prác [2].

Minerálna hydrolýza

Minerálnu hydrolýzu DNFB substituovaných peptidových fragmentov, uvoľnených tryptickou hydrolýzou študovaných globínov, a dinitrofenylovaných tryptických hydrolyzáto DNF-globínov sme robili 6 N-HCl v zatavených trubiciach po dobu 18 hodín pri 105 °C. DNF-aminokyseliny uvoľnené totálnou kyslou hydrolýzou sme extrahovali vytrepáním do éteru (v éteri rozpustné) a *n*-butanolu (vo vode rozpustné). Odparky sme analyzovali chromatograficky.

Identifikácia DNF-aminokyselín

DNF-aminokyseliny sme identifikovali dvojrozmernou papierovou chromatografiou v systémoch S_1 — prvý smer: terciárny butanol—izoamylalkohol—3 % NH_4OH (1 : 1 : 2) zostupne 60 hodín po dlhšej strane chromatografického papiera Whatman 1 pri teplote 20 °C a S_2 — druhý smer: 1,5 M fosfát o pH 6,0 zostupne 10 hodín po kratšej strane papiera pri 20 °C. Chromatografická komora sa v prvom prípade nasýtila parami spodnej amoniakálnej fázy, v druhom prípade parami vody.

* Enzým/Substrát.

Detekcia

DNF-aminokyseliny sme detegovali vo filtrovanom svetle ortuťovej výbojky s maximálnou priepustnosťou pri 366 m μ .

Výsledky

Výsledky chromatografickej analýzy dinitrofenylderivátov aminokyselín identifikovaných v úplnom kyslom hydrolyzáte dinitrofluórbenzénom substituovaných peptidov tryptickej hydrolyzy ovčieho a hovädzieho hemoglobínu uvádzame v tab. 1.

Tabuľka 1

Dinitrofenylaminokyseliny identifikované v úplnom kyslom hydrolyzáte substituovaných peptidov tryptickej hydrolyzy ovčieho a hovädzieho globínu

Hemo- globín	DNF - aminokyselina															
	Arg	His	Lys-G	Thr	Ala	CySH	CyS-S	Gly	Ileu	Leu	Met	Phe	Pro	Ser	Val	Tyr
ovčí	—	—	+	+	+	—	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+
hovädzí	—	—	+	+	+	—	—	+	—	+	—	+	—	+	+	+

Glu⁼ — kyselina asparágová a kyselina glutamová boli stanovené spoločne.

Tabuľka 2

Aminokoncové aminokyseliny, situované na karboxylovom konci arginínu, identifikované ako DNF-deriváty tryptického hydrolyzátu DNF-substituovaného ovčieho a hovädzieho globínu

Hemoglobín	Frakcia	Identifikované DNF-aminokyseliny									
ovčí	V	ser leu									
hovädzí	V	asp (glu)	ser	thr	ala						
ovčí	O	ser									
hovädzí	O	ser leu									
ovčí	N	asp (glu)	G-lys	ser	thr	gly	ala	val	phe	tyr	
hovädzí	N	asp (glu)	G-lys	ser	thr	gly	ala	val	phe	tyr	

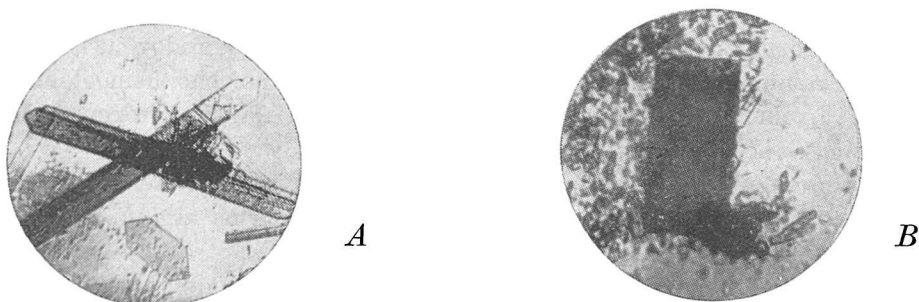
Výsledky analýz DNF-aminokyselín uvoľnených kyslou hydrolyzou DNF-peptidov modifikovaného ovčieho a hovädzieho globínu zhrnujeme v tab. 2.

Výsledky zhrnuté v obidvoch tabuľkách boli potvrdené v troch nezávisle urobených pokusoch.

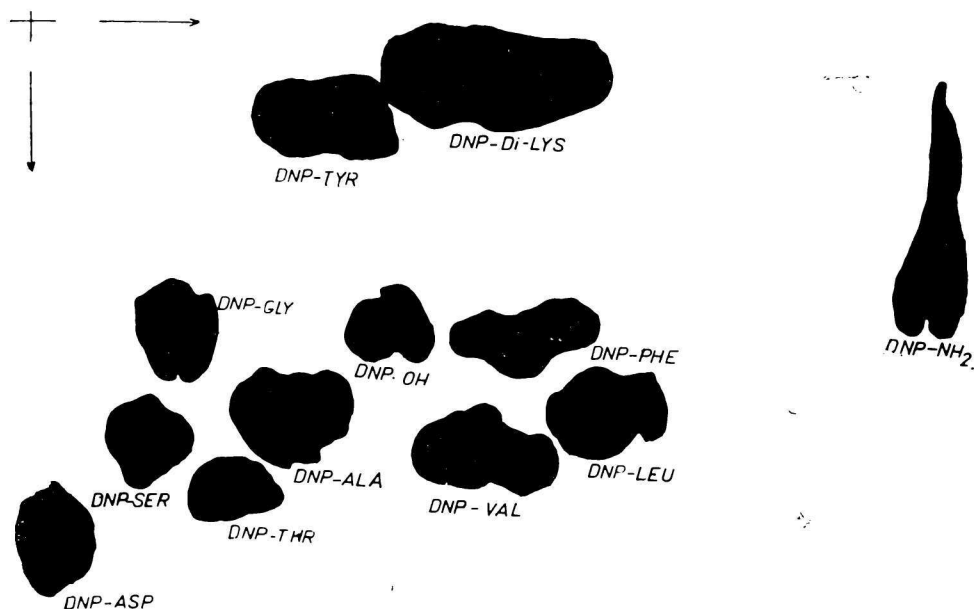
Diskusia

Dnes je už vo všeobecnosti uznávanou skutočnosťou, že dobre prečistená proteáza trypsín štiepi peptidové väzby bielkovinového reťazca špecificky na lyzylovom a arginylovom konci v súhlase so zistením M. Bergmanna a J. Frutona [6]. Pri tomto procese sa uvoľňujú α -aminoskupiny tých

aminokyselín, ktoré sa peptidicky viazali na karboxyl lyzínu a arginínu. Substitúciou uvoľnených α -aminoskupín 2,4-dinitrofluórbenzénom možno na lyzín a arginín sa viažúce aminokyseliny označiť a po ich oddelení od peptidového reťazca úplnou hydrolýzou vo forme DNF-derivátu chromatograficky identifikovať. Takýto postup nám, pravda, umožní určiť aminokyseliny viažúce sa aj na karboxylovom konci lyzínu aj na karboxylovom konci arginínu dohromady. Aby sme vylúčili väzby na arginín, modifikovali sme v ďalšom pokuse molekulu globínu substitúciou DNFB, čím sa blokovali ϵ -amino-



Obr. 1. Mikroskopická snímka kryštálov *A* — ovčieho, *B* — hovädzieho hemoglobínu.



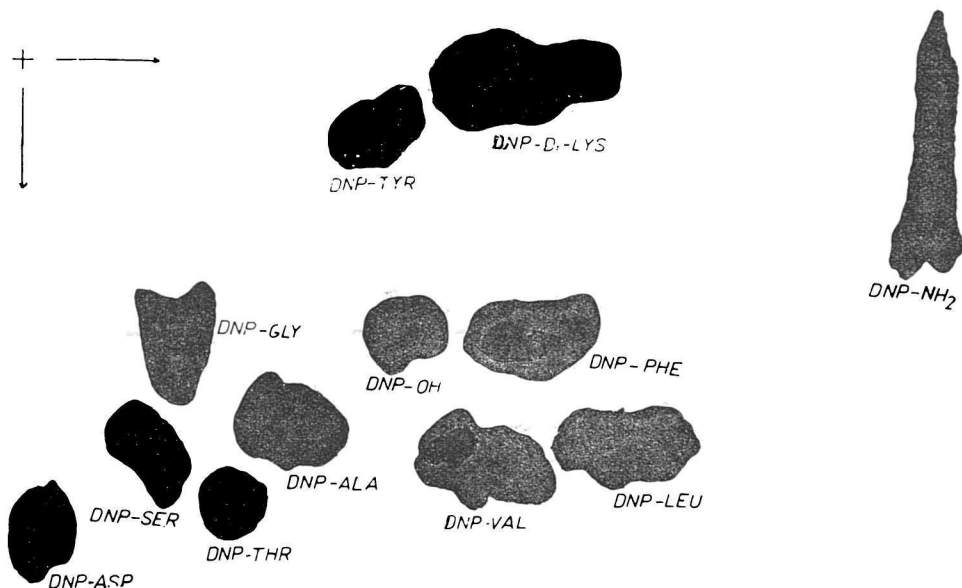
Obr. 2. Dvojrozmerný chromatogram dinitrofenylderivátov aminokyselín získaných kyslou hydrolýzou dinitrofenylovaného tryptického hydrolyzátu ovčieho globínu.

skupiny lyzínu. Na takto modifikovaný substrát pôsobí trypsín tak, že štiepi len väzby na karboxylovom konci arginínu [7].

Na základe výsledkov zhrnutých v tab. 1 možno usudzovať, že do väzby s lyzínom a s arginínom vstupujú aminokyseliny: glycín, alanín, valín, leucín, serín, treonín, fenylalanín, tyrozín, kyselina asparágová (kyselina glutamová) a lyzín. Kvalitatívne rozdiely vo väzbách na lyzín a arginín sme pri študovaných hemoglobínoch nezistili. Analýza aminokyselín viažúcich sa na karboxyl arginínu (tab. 2) ukázala, že ani v tomto prípade niet pozoruhodných rozdielov čo do kvality hydrolýzou uvoľnených DNF-aminokyselín v ovčom a hovädzom hemoglobíne. Sumarizáciou výsledkov získaných analýzou vo vode a v kyseline octovej rozpustných a nerozpustných frakcií DNF-peptidov usudzujeme, že na arginínový a lyzínový zvyšok ovčieho a hovädzieho hemoglobínu sa viažu: glycín, alanín, leucín, serín, treonín, fenylalanín, tyrozín, kyselina asparágová (kyselina glutamová).

Z porovnania výsledkov analýz substituovaných a nesubstituovaných ovčích a hovädzích globínov vyplýva, že vo väzbách na arginín a lyzín nedochádza k zásadným kvalitatívnym odchýlkam.

Otázkou špecifického účinku endopeptidáz na nemodifikovaný substrát konského globínu sa zaoberala škola P. Desnuelle [8]. Títo autori zistili, že v konskom globíne dochádza k prednostnému uvoľňovaniu niektorých



Obr. 3. Dvojrzmerný chromatogram dinitrofenylderivátov aminokyselín získaných kyslou hydrolýzou dinitrofenylovaného tryptického hydrolyzátu hovädzieho globínu.

väzieb účinkom trypsínu. V našej práci šlo o to, zistiť všetky typy väzieb, s ktorými možno počítať v okolí arginínu a lyzínu po štiepení trypsinom. Preto sme volili také podmienky digestie, za ktorých je zaručená maximálna štiepiteľnosť a za známej citlivosti DNF-techniky nedochádza k ovplyvneniu výsledkov produktmi autolýzy trypsínu.

Na základe uvedených výsledkov uzatvárame, že v okolí lyzínu a arginínu ovčieho a hovädzieho hemoglobínu možno očakávať sekvencie zhrnuté v tab. 3.

Tabuľka 3

Sekvencie na karboxylovom konci lyzínu a arginínu v molekule ovčieho a hovädzieho hemoglobínu

Hemoglobín	
ovčí	hovädzí
(arg) lys . ala	(arg) lys . ala
(arg) lys . gly	(arg) lys . gly
(arg) lys . val	(arg) lys . val
(arg) lys . leu	(arg) lys . leu
(arg) lys . ser	(arg) lys . ser
(arg) lys . thr	(arg) lys . thr
(arg) lys . phe	(arg) lys . phe
(arg) lys . tyr	(arg) lys . tyr
(arg) lys <asp glu	(arg) lys <asp glu
(arg) lys . lys	(arg) lys . lys

V tab. 3 uvedené sekvencie (arg) lys... sú alternatívne a ich bezprostredné stanovenie vzhľadom na arginín a lyzín závisí od výsledkov kvantitatívnej analýzy.

Súhrn

Študovala sa otázka väzieb na karboxylovom konci lyzínu a arginínu v polypeptidových reťazcoch ovčieho a hovädzieho hemoglobínu pomocou tryptickej hydrolýzy nesubstituovaných a DNFB substituovaných globínov. Zistilo sa, že vo väzbách aminokyselín na tieto bázičné aminokyseliny niet kvalitatívnych rozdielov. Vo väzbe na arginín a lyzín v reťazcoch študovaných hemoglobínov možno očakávať: glycín, alanín, valín, leucín, serín, treonín, fenylalanín, tyrozín, kyselinu asparágovú, kyselinu glutamovú a lyzín.

О ГЕМОГЛОБИНЕ (XI) ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ В СРЕДЕ АРГИНИНА И ЛИЗИНА В МОЛЕКУЛЕ ОВЕЧЬЕГО И ГОВЯЖЕГО ГЕМОГЛОБИНА

М. ТЕЛЕГА, П. МЭШАР

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

Выводы

С помощью триптического гидролиза незамещенных и DNFB замещенных глобинов изучался вопрос связей на карбоксильном конце лизина и аргинина в полипептидовых

цепях овечьего и говяжьего гемоглобина. Авторы определили, в связях аминокислот на эти основные аминокислоты нет больших количественных разниц. В качестве соединения на аргинин и лизин в цепях изучаемых гемоглобинов можно ожидать: глицин, аланин, валин, лейцин, серин, треонин, фенилаланин, тирозин, аспарагиновая кислота, глутамовая кислота и лизин.

Поступило в редакцию 30. 12. 1960 г.

ÜBER HÄMOGLOBIN (XI) STUDIUM DER GESETZMÄSSIGKEITEN IN DER UMGEBUNG DES ARGININS UND LYSINS IM MOLEKÜL DES SCHAF- UND RINDERHÄMOGLOBINS

M. TELEHA, P. MÄSIAR

Lehrstuhl für Biochemie der Medizinischen Fakultät an der
Universität P. J. Šafárik in Košice

Zusammenfassung

Mit Hilfe der tryptischen Hydrolyse nichtsubstituierter und DNFB-substituierter Globine wurde die Frage der Bindungen am Carboxylende des Lysins und Arginins in der Polypeptidketten des Schaf- und Rinderhämoglobins einem Studium unterworfen. Die Autoren stellten fest, dass in den Bindungen der Aminosäuren für diese basischen Aminosäuren keine grössere qualitativen Unterschiede bestehen. In der Bindung zum Arginin und Lysin in den Ketten der untersuchten Hämoglobine kann erwartet werden: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Serin, Threonin, Phenylalanin, Tyrosin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin.

In die Redaktion eingelangt den 30. 12. 1960

LITERATÚRA

1. Mäsiar P., Chem. zvesti 12, 713 (1958). — 2. Mäsiar P., Teleha M., *Sborník prác Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika* (v tlači). — 3. Mäsiar P., *Kandidátska dizertačná práca*, Chemický ústav ČSAV, Praha 1957. — 4. Anson M. L., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol. 14, 603 (1930). — 5. Sanger F., Biochem. J. 39, 567 (1945). — 6. Bergmann M., Fruton J., Advances Enzymol. 1, 63 (1941). — 7. Anfinsen C. B., J. Biol. Chem. 221, 385 (1956). — 8. Rovery M., Desnuelle P., Bonjour G., Biochim. Biophys. Acta 6, 166 (1950).

Do redakcie došlo 30. 12. 1960

Adresa autorov:

Prom. lek. Michal Teleha, Doc. MUDr. Pavel Mäsiar, Košice, ulica Košického vládného programu 57, Katedra biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika.