

O HEMOGLOBÍNE (V) ZAKONČENIE POLYPEPTIDOVÝCH REŤAZCOV HEMOGLOBÍNU KRYSY

PAVEL MĀSIAR

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

V predchádzajúcej práci [1] sme referovali o N-terminálnych aminokyselinách bielkovinovej zložky opice *Macacus rhesus*. V tejto práci predkladáme výsledky štúdia N-terminálnych aminokyselinových zvyškov hemoglobínu krysy.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Materiál

Hemoglobín sme získali z čerstvej krvi kryš typu Wistar. 10 kryš o priemernej váhe 250 g sme dekapitovali a krv sme odobrali do 200 ml Erlenmeyerovej nádobky obsahujúcej sklené guľôčky. Dokonalým pretrepávaním krvi so sklenenými guľôčkami sme krv defibrinovali, fibrín sme odstránili precedením cez skladanú gázu. Čisté erytrocyty sme získali odstránením plazmy na odstredivke Media pri 1500 G. Zvyšky plazmy sme odstránili premývaním erytrocytov rovnakým objemom 0,9 % roztoku NaCl s následným odstredením erytrocytov za vyššie opísaných podmienok. Premývanie sme skončili, keď supernatantná tekutina bola úplne bezfarebná (približne po 7 premývaniach). Takto získaná erytromasa nám slúžila ako východiskový materiál pre kryštalizáciu hemoglobínu.

Kryštalizácia

Hemoglobín sme kryštalovali nami vypracovaným postupom, ktorý spočíva v kombinácii niektorých prvkov metódy J. Marshalla a spol. [2] a K. Kaniga [3]. K sedi-



Obr. 1. Kryštály krysieho hemoglobínu získané kryštalizáciou etyléteru.

mentovaným erytrocytom sme po kvapkách pridávali čistý etyléter za mierneho miešania do objavenia vínočervenej farby, ktorá označuje koniec hemolýzy. Pôvodná suspenzia erytrocytov nadobudla na viskozite a predstavovala hustú vínočervenú kašu. Prida-

ním ďalších 5—10 ml etyléteru za ustavičného miešania vznikli kryštály doštičkovitého tvaru (obr. 1). Objavenie kryštálov sme kontrolovali mikroskopom. Do takto získanej suspenzie kryštálov hemoglobínu sme pridali 5 ml toluénu a po dokonalom rozmiešaní sme kryštály sedimentovali centrifugáciou pri 1500 G. Stromatá vyfotovali a spolu so supernatantnou tekutinou sa odsali a zahodili. Flotáciu toluénom za vyššie opísaných podmienok sme vykonali po prvej kryštalizácii trikrát.

Rekryštalizácia

Sediment kryštálov sme suspendovali v 5 ml destilovanej vody a opatrným pridávaním 5 N-NaOH sme kryštály previedli do roztoku. Rekryštalizáciu sme uskutočnili opatrným pridávaním 0,1 N-HCl za ustavičného miešania. Opätovné vylúčenie kryštálov signalizuje zmena farby roztoku hemoglobínu z vínoočervenej do tehlovočervenej. Objavenie kryštálov sme sledovali mikroskopicky. Rekryštalizáciu vyššie opísaným spôsobom možno urobiť štyrikrát. Pri viac ako štvornásobnej kryštalizácii stúpne koncentrácia soli natoľko, že ďalšiu kryštalizáciu možno robiť až po dialýze. Bližšie podrobnosti o kryštalizácii hemoglobínu touto metódou opíšeme neskoršie.

Izolácia globínu

Bielkovinový zložku globínu sme získali metódou, ktorú opísali M. L. Anson a A. E. Mirski [4].

Dinitrofenylačná technika

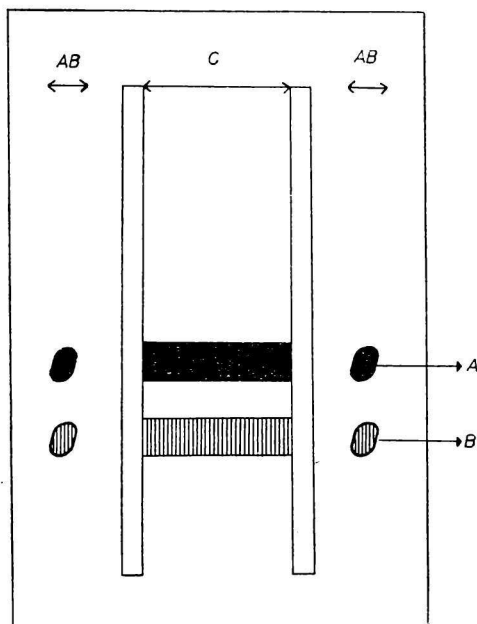
1,5 μM globínu sme substituovali dinitrofluórbenzénom za podmienok opísaných F. Sangerom [5]. Vzniknutý dinitrofenylový (DNP) derivát globínu sme 18 hodín pri 105 °C hydrolyzovali 6 N-HCl pre kvalitatívnu analýzu. Úplný kyselý hydrolyzátny DNP-globínu po zriedení destilovanou vodou sme roztrepli medzi éter a vodu. Éterickú fázu sme odparili a odparok použili na analýzu. Pre kvantitatívnu analýzu sme substituovali dvakrát 0,2 μM globínu DNFB vyššie opísaným spôsobom. Úplnú hydrolyzu sme vykonali 10 N-HCl pri 105 °C po dobu 48 hodín. Hydrolyzátny sme opäť extrahovali éterom a odparok éterickej frakcie sme použili na analýzu.

Fenyltiohydantoinová metóda

Na potvrdenie výsledkov získaných analýzou DNP-globínu sme použili PTH-metódu bližšie opísanú v predchádzajúcej práci [1].

Kvantitatívnu analýzu PTH-derivátov aminokyselín sme uskutočnili v typickom pokuse. Do pokusu sme brali ca 0,1 μM krysieho globínu. Šesťkrát po 0,1 μM globínu v 10 % amoniaku sme aplikovali na prúžok chromatografického papiera Whatman 1 o rozmeroch 8 × 8 cm. Papier sme pred aplikáciou i po aplikácii roztoku globínu vysušili do konštantnej váhy a z rozdielu obidvoch váh sme stanovili množstvo bielkoviny branej do pokusu. Nato sme aplikovali na šesť papierov obsahujúcich bielkovinu 500 μl 20 % roztoku PTC v dioxáne a nechali 8 hodín inkubovať v atmosfére vodného pyridínu. Nadbytočný PTC sme po uplynutí inkubačnej doby extrahovali do benzénu a alkohol—éteru (1 : 1) spôsobom opísaným v [1]. K trom ostávajúcim prúžkom sme pridali po 0,2 μM PTH-valínu a 0,2 μM PTH-metionínu v roztoku acetónu a vysušili sme. Potom sme všetkých 9 prúžkov rozstrihali a podrobili hydrolyze v 3 ml roztoku 3 N-HCl pri teplote laboratória po dobu 3 hodín za ustavičného trepania v trepačke. PTH-deriváty aminokyselín sme extrahovali vytrepaním hydrolyzačnej zmesi dvakrát 15 ml octanu etylnatého. Po doplnení na konštantný objem 45 ml sme extrakty fotometrovali na spektrofotometri SF-4 pri vlnovej dĺžke 265 m μ proti octanu etylnatému. Po vyhodnotení totálneho množstva sme zmes PTH-aminokyselín od seba oddelili preparatívne papierovou chromato-

grafiou v systéme *A*, ktorý navrhol J. Sjöquist [6]. Súbežne s tým sme chromatografovali kontroly na osobitných prúžkoch (obr. 2). Po detekcii kontrol sme zóny od-



Obr. 2. Schéma preparatívnej chromatografie PTH-derivátov aminokyselín získaných v prvom stupni postupnej degradácie kryšieho hemoglobínu.

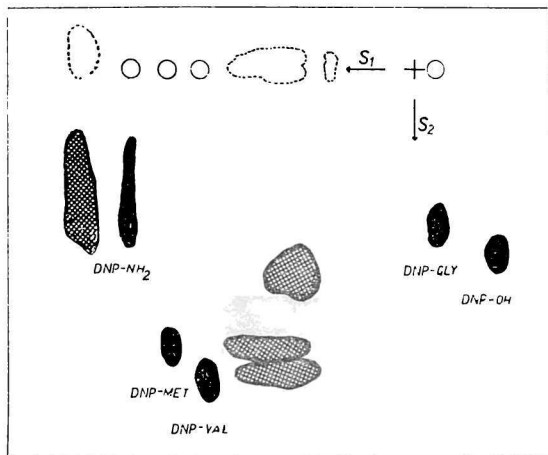
AB — zmes syntetického PTH-valínu a metionínu, *C* — zmes PTH-valínu a metionínu izolovaného v prvom stupni z kryšieho PTC-globínu.

povedajúce PTH-valínu a PTH-metionínu vystrihli a dvakrát extrahovali 15 ml etylacetátu. Extrakty sme po doplnení objemu opäť premerali pri 265 m μ na spektrofotometri SF-4 proti octanu etylnatému. Zvyšky sme vypočítali podobným spôsobom, ako sme už referovali [1].

Výsledky a diskusia

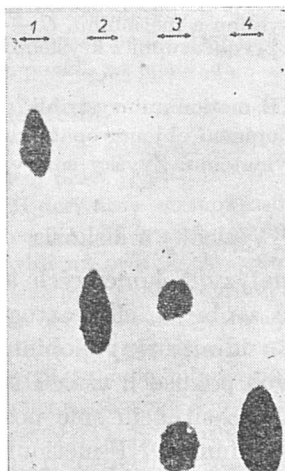
Výsledky kvalitatívnej analýzy N-koncových aminokyselín sú znázornené na obr. 3 a 4. Ako vyplýva z obr. 3, chromatografickou analýzou éterickej frakcie kyslého hydrolyzátu dinitrofenylglobínu sme objavili DNP-valín a DNP-metionín. Vo viacerých pokusoch však DNP-metionín dával jednotnú škvrnu s DNP-valínom. Takúto situáciu sme pozorovali aj pri analýze éterického extraktu zmesi DNP-valínu a DNP-metionínu, ktoré sme spolu s bielkovinou podrobili hydrolyze v kontrolnom pokuse. Preto sme sa rozhodli naše výsledky preveriť fenyltiohydantoinovou metódou. Ako vidieť na obr. 4, chromatografickou analýzou fenyltiohydantoinov koncových aminokyselín kryšieho hemoglobínu získali sme PTH-valín a PTH-metionín, ktoré predstavujú N-terminálne zvyšky hemoglobínu krysy. Podobne ako sme uviedli

pri štúdiu N-koncových zvyškov hemoglobínu opice [1], po 18 hodinovej kyslej hydrolyze DNP-globínu 6 N-HCl pri 105 °C objavili sme látku s chromatografickým chovaním v oblasti DNP-leucínu. Túto látku sme izolovali jedno-



Obr. 3. Dvojrozmerný chromatogram éterickej frakcie kyslého hydrolyzátu dinitrofenylovaného kryšieho globínu.

Čierne škvry označujú pohyb referenčných dinitrofenylovaných aminokyselín, bodkované škvry značia zistené dinitrofenylderiváty v éterickej frakcii kyslého hydrolyzátu. Krúžky na štarte znamenajú miesta nakvapnutia referenčných vzoriek v druhom smere chromatografie.

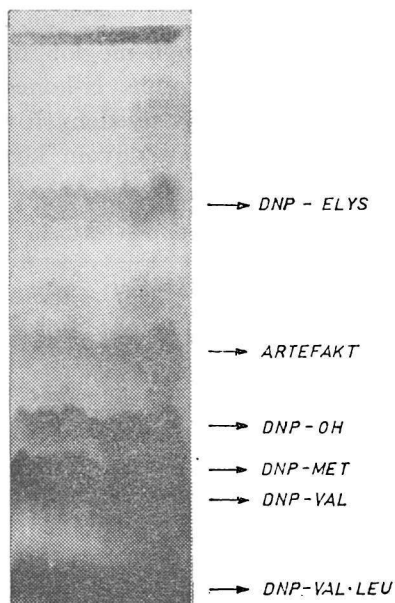


Obr. 4. Chromatogram fenyltiohydantoinových derivátov aminokyselín získaných v prvom stupni postupnej degradácie kryšieho hemoglobínu.

Číslo 1, 2 a 4 značia referenčné PTH-aminokyseliny.

1 — PTH-glycín, 2 — PTH-metionín, 3 — PTH-deriváty izolované pri odbúrání kryšieho hemoglobínu, 4 — PTH-valín. Chromatogramy boli fotografované kontaktným spôsobom za použitia dokumentačnej kopírky.

rozmernou preparatívnou chromatografiou zostupne v systéme *n*-butanol—*izoamylalkohol*—1 % hydroxyd amónny (1 : 1 : 2); pozri obr. 5. Po hydrolyze



Obr. 5. Preparatívna chromatografia éterickej frakcie dinitrofenylderivátov kyslého hydrolyzátu získaného hydrolyzou dinitrofenylglobínu 6 N-HCl po dobu 18 hodín pri 105 °C. Fotografované v ultrafialovom svetle ortuťovej výbojky.

6 N-HCl v priebehu 48 hodín sme opäť identifikovali DNP-valín a analýzou vodnej fázy leucín. To nás viedlo k predpokladu, že α -retazce krysieho hemoglobínu sú zakončené sekvenciou valyl-leucyl. Na objasnenie N-koncovkej sekvencie β -retazcov sme 0,2 μ M krysieho globínu podrobili postupnému odbúraníu vyššie opísanou fenyltiohydantoínovou technikou vo dvoch stupňoch. Výsledky zhrnuté v tab. 1 ukazujú, že v druhom stupni postupnej degradácie boli identifikované PTH-leucín a PTH-glycín. Keďže leucín sme DNP-techni-

Tabuľka 1
Postupné odbúranie krysieho hemoglobínu
fenyltiohydantoínovou metódou

Stupeň	Identifikovaný PTH-derivát	Abs. maximum m μ
I	→ PTH-valín	265
	→ PTH-metionín	265
II	→ PTH-leucín	265
	→ PTH-glycín	265

kou objavili viazaný na valín, usudzujeme, že N-terminálna sekvencia β -reťazcov je tvorená sledom metionyl-glycyl. Pri pokusoch o stanovenie počtu reťazcov dinitrofenylačnou technikou sme zistili, že rozpad metionínu pri dlhotrvajúcej hydrolyze je taký veľký, že jeho kvantitatívne stanovenie je nemožné. Preto na stanovenie počtu polypeptidových reťazcov krysieho hemoglobínu sme použili vyššie opísanú metódu kvantitatívneho stanovenia N-koncových aminokyselín fenyltiohydantoínovou metódou. Z výsledkov uvedených v tab. 2 vyplýva, že zakončenie polypeptidového reťazca na aminovom konci je

Tabuľka 2
Kvantitatívne vyhodnotenie N-koncových aminokyselín krysieho hemoglobínu

Vzor- ka č.	Zistené množstvo PTH-valínu*	Počet zvyškov	Zistené množstvo PTH-metionínu*	Počet zvyškov	Poznámka
1	0,19	2	0,19	2	Vzorka znič.
2	0,17	2	—	—	
3	0,22	2	0,22	2	
4	0,24	2	0,24	2	
5	0,22	2	0,23	2	
6	0,21	2	0,21	2	

* Hodnoty sú vyjadrené v μM na 1 μM krysieho globínu.

tvorené dvoma zvyškami valínu a dvoma zvyškami metionínu. Z toho uzatvárame, že molekula krysieho hemoglobínu je tvorená dvoma polypeptidovými reťazcami typu α zakončenými sekvenciami valyl-leucyl a dvoma polypeptidovými reťazcami typu β zakončenými sekvenciou metionyl-glycyl.

Ďakujem s. O. Gendovej za technickú spoluprácu pri experimentálnej časti práce.

Súhrn

V práci sú zhrnuté výsledky štúdia N-koncových aminokyselín a peptidov krysieho hemoglobínu. Zistilo sa, že hemoglobín krysieho je zakončený dvoma zvyškami valínu a dvoma zvyškami metionínu. Na základe toho sa uzatvára na prítomnosť dvoch polypeptidových reťazcov typu α zakončených valínom a dvoch polypeptidových reťazcov typu β zakončených metionínom.

Z kyslého hydrolyzátu dinitrofenylglobínu sa izoloval peptid valyl-leucyl, ktorý predstavuje N-terminálnu sekvenciu α -reťazcov krysieho hemoglobínu. Postupnou degradáciou polypeptidových reťazcov fenyltiohydantoínovou metódou sa zistil leucín a glycín ako PTH-deriváty druhého stupňa Edmanovej procedúry.

Uzatvára sa, že α -reťazce sú zakončené sekvenciou valyl-leucyl, β -reťazce sekvenciou metionyl-glycyl.

V práci je opísaná modifikácia kryštalizácie krysieho hemoglobínu a kvantitatívne stanovenie PTH-derivátov pomocou papierovej chromatografie.

О ГЕМОГЛОБИНЕ (V) ОКОНЧАНИЕ ПОЛИПЕПТИДИЧЕСКИХ ЦЕПЕЙ ГЕМОГЛОБИНА КРЫС

ПАВЕЛ МЕСНАР

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

Выводы

В работе собраны результаты изучения N-концовых аминокислот и пептидов гемоглобина крыс. Автор обнаружил, что гемоглобин крыс оканчивается двумя остатками валина и двумя остатками метионина. Из этого заключает на присутствие двух полипептидических цепей типа α , заканчивающихся валином и двух полипептидических цепей типа β , заканчивающихся метионином.

Из кислого гидролизата динитрофенилглобина был изолирован пептид валил-лейцил, который представляет N-терминальную секвенцию α -цепей крысего гемоглобина. Постепенной деградацией полипептидических цепей фенилтиогидантоиновым методом обнаружил автор лейцин и глицин как PTH-дериваты второй степени Эдмановой процедуры.

Автор заключает, что α -цепи окончены секвенцией валил-лейцин, β -цепи секвенцией метионил-глицил.

В работе описывается модификация кристаллизации крысего гемоглобина и количественное определение PTH-дериватов при помощи бумажной хроматографии.

Поступило в редакцию 2. 4. 1960 г.

ON HAEMOGLOBIN (V) N-TERMINAL AMINOACIDS AND THE NUMBER OF POLYPEPTIDIC CHAINS OF RAT HAEMOGLOBIN

PAVEL MÁSIAR

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

Summary

A study of N-terminal aminoacids and peptides of rat haemoglobin is reported in this work. Two valines and two methionines residues have been found as N-terminal aminoacids of rat haemoglobin. It was concluded that rat haemoglobin contains two types of polypeptidic chains: α -one with valine and β -one with methionin as N-terminal aminoacids.

A sequence valyl-leucyl — was isolated from acid hydrolysate of DNP-globin and PTH-leucin and PTH-glycin were astimated as N-terminal aminoacids of the second step of Edman's stepwise degradation procedure of rat haemoglobin.

On the ground of these results following conclusion has been made by autor: rat haemoglobin contains two α polypeptidic chains terminated with sequence valyl-leucyl and two β polypeptidic chains terminated with sequence methionyl-glycyl.

A crystallisation of rat haemoglobin in new modification and quantitative astimation of PTH-aminoacids using paper chromatography are described in this work.

Received 2. April 1960

LITERATÚRA

1. Mäsiar P., Chem. zvesti 14, 603 (1960). — 2. Marshall J., Welker W. H., J. Am. Chem. Soc. 35, 820 (1913). — 3. Kanig K., Biochem. Z. 325, 347 (1954). — 4. Anson M. L., Mirski A. E., J. Gen. Physiol. 14, 603 (1930.) — 5. Sanger F., Biochem. J. 39, 507 (1945). — 6. Sjöquist J., Acta Chem. Scand. 7, 447 (1953).

Do redakcie došlo 2. 4. 1960

Adresa autora:

Doc. MUDr. Pavel Mäsiar, Košice, Šrobárova 57, Biochemický ústav Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika.