

O hemoglobíne (XVII)***Účínok karboxypeptidázy *A* a *B* na polypeptidové reťazce izolované z hemoglobínu opice *Macacus rhesus***

P. MÄSIAR

Katedra biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika, Košice

Karboxypeptidáza je enzým katalyzujúci postupnú degradáciu polypeptidového reťazca smerom od karboxylového konca k aminovému. Táto skutočnosť sa dnes široko využíva pri štúdiu chemickej stavby vyšších peptidov i bielkovín. Ukázalo sa, že použitie uvedeného enzýmu umožňuje s dostatočnou presnosťou stanoviť aminokyseliny situované na tzv. karboxylovom (*C*) konci polypeptidového reťazca a v určitých peptidoch i sekvenciu niekoľkých aminokyselín, zúčastňujúcich sa na tvorbe polypeptidového reťazca v blízkosti voľnej karboxylovej skupiny. Pri štúdiu štruktúry ľudského hemoglobínu použili túto metódu s úspechom viacerí autori [1—8]. Použitie karboxypeptidázy nahradilo staršie chemické metódy stanovenia *C*-terminálnych aminokyselín pomocou hydrazinolyzy a pod.

Nadväzujúc na pokusy s disociáciou bielkovinovej časti hemoglobínu opice *Macacus rhesus* [9], použili sme v tejto práci karboxypeptidázu *A* a *B* na stanovenie *C*-terminálnych aminokyselín a sekvencií pri α reťazcoch a β reťazcoch hemoglobínu tejto opice.

Experimentálna časť*Materiál*

a) Ako substrát sme použili bielkovinové frakcie *A*, *B* a *C* získané chromatografiou disociovaného globínu opice *Macacus rhesus* na Amberlite IRC 50 pomocou gradienta (2 — 8 M) močoviny okyslenej na pH 1,8 kyselinou soľnou [9, 10].

b) Ako enzým sme použili kryštalické preparáty karboxypeptidázy *A* a karboxypeptidázy *B*.

Odbúranie pomocou karboxypeptidázy A

Metodický základ pre odbúranie bielkovinových frakcií karboxypeptidázou sme vytvorili kombináciou základných podmienok, ktoré opisali T. H. J. Huisman a spolupracovníci [1] a G. Quidotti [11]. 6,6 mg frakcie *B* a *C* sa suspendovalo v 2,4 ml 0,2 M

* Výsledky prednesené na II. celoštátnych biochemických dňoch v Starom Ľm. okvoci 27.—28. apríla 1961 a na V. medzinárodnom biochemickom kongrese v Meseke v auguste 1961.

fosfátového tlmivého roztoku o pH 8, obsahujúceho 0,056 M laurylsulfát a chlorid lítny v konečnej koncentrácii 0,5 %. Do tejto zmesi sa pridalo 15 μ l 2 % suspenzie karboxypeptidázy a 10 μ l diizopropylfluorofosfátu na potlačenie aktivity iných proteáz. Zmes sa inkubovala v termostate pri 37 °C. Vzorky sa odoberali v čase 0 hodín 0,4 ml, po 1 hodine 0,8 ml a po 3 hodinách 1,2 ml. Na odsolenie produktov sa použil vymieňač iónov Dowex 50 \times 8 (20 — 50 mesh). Do každej odobranej vzorky sa po inkubácii pridalo 50 mg Dowexu 50 \times 8 (20 — 50 mesh) s 8 % sieťovaním. Celá zmes sa preniesla na malú kolónku (použila sa 2 ml sklená injekčná striekačka), ktorá sa 6 krát premyla vodou. Uvoľnené aminokyseliny sa vytlačili 0,4 ml 4 N-NH₄OH pri voľnom prietoku kolónkou a odparili sa vo vákuu nad koncentrovanou kyselinou sírovou.

Odbúranie aminokyselín pomocou karboxypeptidázy B

6,6 mg frakcie A (α reťazce) sa suspendovalo v 2,4 ml 0,2 M fosfátového tlmivého roztoku o pH 8 s laurylsulfátom a chloridom lítnym podobným spôsobom, ako sme opísali vyššie. Do zmesi sa pridalo 10 μ l 2 % karboxypeptidázy B a 10 μ l diizopropylfluorofosfátu. Zmes sa inkubovala opäť 3 hodiny pri 37 °C, vzorky sa odoberali v čase 0 hodín, po 1 hodine a po 3 hodinách. Produkty sa odsolili na Dowexe 50, podobne ako sme už opísali.

Analýza produktov

Aminokyseliny odštiepené karboxypeptidázou sa analyzovali vysokovoltovou elektroforézou v 3 % kyseline mravčej pri gradiente 80 V/cm. Ako nosič sa použil chromatografický papier Whatman 1.

Kvantitatívna analýza

Na kvantitatívnu analýzu uvoľnených aminokyselín sa opäť použila papierová elektroforéza za vyššie opísaných podmienok. Pre vlastné vyhodnotenie aminokyselín sa použil postup, ktorý opísal F. Bode [12]. Škvrnky vzniknuté po ninhydrínovej detekcii sa stabilizovali roztokom dusičnanu meďnatého a farbivo sa eluovalo do metanolu. Eluáty sa premeriavali pri zelenom filtri na elektrickom fotokolorimetri sovietskej výroby FEMK. Hodnoty sa odpočítavali z kalibračnej krivky aminokyselín, zostrojenej podobným spôsobom.

Výsledky

Výsledky kvalitatívnej i kvantitatívnej analýzy sú uvedené v tab. 1. Ako je z tabuľky zrejmé, po účinku karboxypeptidázy A uvoľnili sa z frakcie B a C (β reťazce) opičieho hemoglobínu tieto aminokyseliny: histidín, tyrozín a lyzín. Pri kvantitatívnom hodnotení vyniká najmä histidín, ktorý sme zistili v majoritnom množstve. V postupne klesajúcich množstvách sme zistili tyrozín. V stopách boli prítomné glycín, serín, treonín, valín a leucín. Účinok karboxypeptidázy B na frakciu A (α reťazce) sa prejavil uvoľnením koncového arginínu, tyrozínu a lyzínu. V stopách sa opäť zistili aminokyseliny: glycín, valín, alanín a leucín. Kvantitatívna analýza poukázala na rovnaké zastúpenie arginínu a tyrozínu v konečnom produkte.

Tabuľka 1
 Účinok karboxypeptidázy na polypeptidové reťazce opičieho
 (*Macacus rhesus*) hemoglobínu

Vyštiepené aminokyseliny	Karboxypeptidáza A			Karboxypeptidáza B	
	frakcia B		frakcia C	frakcia A	
	1 hod. *	3 hod. **	3 hod.	1 hod.	3 hod.
Lys	+	0,09	0,18	++	0,51
Arg	—	—	—	+++	0,52
His	+++	0,46	0,46	—	—
Try	—	—	—	—	—
Asp	—	—	—	—	—
Glu	—	—	—	—	—
Gly	stopy	—	—	stopy	—
Ala	stopy	—	—	stopy	—
Val	stopy	—	—	stopy	—
Leu	stopy	—	—	stopy	—
Ileu	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	—	—
Tyr	++	0,3	0,3	+++	0,52
Pro	—	—	—	—	—
Met	—	—	—	—	—
Cys	—	—	—	—	—
Ser	stopy	—	—	—	—
Thr	—	—	—	—	—

* Aminokyseliny skúmané vizuálne.

** Aminokyseliny skúmané kvantitatívne, vyjadrené v $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ globínu (34 000).

Diskusia

Účinok karboxypeptidázy na polypeptidový reťazec možno charakterizovať schémou



Karboxypeptidáza by podľa tejto schémy mala postupne degradovať reťazec až po vznik tripeptidu, prípadne dipeptidu. Avšak ani v jednom prípade sa nepodarilo tento ideálny stav pri štúdiu bielkovín dosiahnuť, pretože účinok karboxypeptidázy je viazaný nielen na existenciu voľnej karboxylovej skupiny, ale viaže sa aj špecificky na zakončenie určitého substrátu. Napríklad karboxypeptidáza *A* veľmi pomaly odštiepuje *C*-koncový arginín, kým karboxypeptidáza *B* ho odštiepuje niekoľkonásobne rýchlejšie. Vzniknuté produkty štiepenia tiež postupne inhibujú účinok karboxypeptidázy, takže maximálna účinnosť, ktorú možno dosiahnuť, je charakterizovaná rozriešením sekvencie na úrovni hexapeptidu až heptapeptidu.

V našej práci šlo o to stanoviť *C*-terminálne sekvencie α reťazcov a β reťazcov opičieho (*Macacus rhesus*) hemoglobínu. Ako vyplýva z tab. 1, na *C*-konci frakcie *B* a *C* sa jednoznačne stanovil histidín, ktorý bol objavený v najväčšom množstve. Histidín je charakteristický pre zakončenie β reťazcov ľudského hemoglobínu. Možno sa teda domnievať, že vo frakcii *C* a *B* sa z celkovej molekuly oddelili β reťazce opičieho hemoglobínu. Menší výskyt tyrozínu a lyzínu svedčí o tom, že aj koncová sekvencia β reťazcov je identická so sekvenciou β reťazcov ľudského hemoglobínu. Na základe výsledkov uvedených v tab. 1 možno dedukovať na sekvenciu lyzyl-tyrozył-histidín, ktorá vytvára *C*-terminálne zakončenie β reťazcov.

Účinkom karboxypeptidázy *B* sa odštiepili aminokyseliny: arginín, tyrozín a lyzín. Arginín a tyrozín kvantitatívne vykazujú rovnaké hodnoty. Avšak pri uvážení, že arginín sa vo všeobecnosti veľmi ťažko štiepi karboxypeptidázou, sme predpokladali, že arginín je tou aminokyselinou, ktorá vytvára *C*-terminálne zakončenie α reťazcov. Tomu nasvedčovalo analogické zistenie v ľudskom hemoglobíne. Pre podporu tejto koncepcie sme v inej práci podrobili analýzám tryptický hydrolyzát α reťazcov hemoglobínu opice [13], z ktorého sa nám podarilo izolovať peptid tyrozył-arginín. Ak vezmeme do úvahy zákonitosti spojené so špecifickým účinkom trypsinu, možno takýto peptid lokalizovať len na *C*-terminálnu časť polypeptidového reťazca.

Z týchto zistení možno uzatvárať, že karboxylový koniec α reťazcov hemoglobínu opice je charakterizovaný sekvenciou lyzyl-tyrozył-arginín. Porovnaním diskutovaných sekvencií so sekvenciami zistenými pri ľudskom hemoglobíne [1—8] vyniká úplne jasne zhodnosť v štruktúre ľudského a opičieho (*Macacus rhesus*) hemoglobínu v oblasti *C*-terminálneho zakončenia. O podobnej zhode sa diskutovalo v našej predchádzajúcej práci [14] v súvislosti s *N*-terminálnym zakončením polypeptidových reťazcov ľudského hemoglobínu a hemoglobínu opice *Macacus rhesus*.

Ďakujem dr. J. I. Harrisovi z Department of Biochemistry University of Cambridge a dr. I. Rychlíkovi z Ústavu organickej chémie a biochémie ČSAV v Prahe za poskytnutie preparátov karboxypeptidázy *A* a *B*.

Súhrn

Študoval sa účinok karboxypeptidázy *A* a *B* na frakcie získané chromatografiou disociovaného globínu opice *Macacus rhesus*. Zistilo sa, že frakcia *A* zodpovedajúca svojou mobilitou α reťazcom je zakončená sekvenciou lyzyl-tyrozy-arginín, ktorá zodpovedá rovnakej sekvencii α reťazcov ľudského hemoglobínu. Vo frakcii *B* a *C* sa zistilo zakončenie lyzyl-tyrozy-histidín, ktoré zodpovedá *C*-terminálnemu zakončeniu β reťazcov ľudského hemoglobínu.

О ГЕМОГЛОБИНЕ (XVII)

ДЕЙСТВИЕ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ *A* И *B* НА ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ЦЕПОЧКИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ГЕМОГЛОБИНА ОБЕЗЬЯНЫ *MACACUS RHEBUS*

П. Мэсиар

Кафедра биохимии Медицинского факультета Университета
им. П. Й. Шафарика, Кошице

Изучалось действие карбоксипептидазы *A* и *B* на фракции, полученные хроматографией диссоциированного глобина обезьяны *Macacus rhesus*. Обнаружено, что фракция *A*, отвечающая своей подвижностью α -цепочкам, заканчивается последовательностью лизил-тирозил-аргинин, которая отвечает одинаковой последовательности α -цепочек человеческого гемоглобина. Во фракциях *B* и *C* обнаружена концовка лизил-тирозил-гистидин, которая отвечает *C*-терминальной концовке β -цепочек человеческого гемоглобина.

ÜBER HÄMOGLOBIN (XVII)

WIRKUNG DER CARBOXYPEPTIDASE *A* UND *B* AUF DIE AUS DEM
HÄMOGLOBIN DES AFFENS *MACACUS RHEBUS* ISOLIERTEN
POLYPEPTIDKETTEN

P. Mäsiar

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

Es wurde die Wirkung der Carboxypeptidase *A* und *B* auf jene Fraktionen untersucht, die durch Chromatographie des dissoziierten Globins des Affens *Macacus rhesus* erhalten wurden. Dabei wurde festgestellt, dass die Fraktion *A* durch ihre den α -Ketten entsprechende Mobilität durch die Sequenz Lysyl-Tyrosyl-Arginin beendet ist, welche derselben Sequenz der α -Ketten des Human-Hämoglobins entspricht. In der Fraktion *B* und *C* wurde die Endigung Lysyl-Tyrosyl-Histidin festgestellt, welche der *C*-terminalen Endigung der β -Ketten des Human-Hämoglobins entspricht.

LITERATÚRA

1. Huisman T. H. J., Dozy A., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 400 (1956).
2. Braunitzer G., Rudloff V., Hilse K., Liebold B., Müller R., *Z. physiol. Chem.* **320**, 283 (1960).
3. Braunitzer G., Hilschmann N., Hilse K., Liebold B., Müller R., *Z. physiol. Chem.* **322**, 96 (1960).
4. Braunitzer G., Hilschmann N., Wittmann — Liebold B., *Z. physiol. Chem.* **325**, 94 (1961).
5. Braunitzer G., Gehring — Müller R., Hilschmann N., Hilse K., Hobom G., Rudloff V., Wittmann — Liebold B., *Z. physiol. Chem.* **325**, 283 (1961).
6. Konigsberg W., Guidotti G., Hill R. J., *J. Biol. Chem.* **236**, PC55 (1961).
7. Hill R. J., Konigsberg W., *J. Biol. Chem.* **236**, PC7 (1961).
8. Konigsberg W., Hill R. J., *Symposium 1, V. Medzinárodný biochemický kongres, Moskva* 1961.
9. Mäsiar P., Vnek J., *Chem. zvesti* **17**, 346 (1963).
10. Wilson S., Smith D. B., *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 405 (1959).
11. Quidotti G., *Biochim. Biophys. Acta* **42**, 177 (1960).
12. Bode F., *Biochem. Z.* **326**, 433 (1955).
13. Mäsiar P., Teleha M., Vnek J., *Collection* **28**, 271 (1963).
14. Mäsiar P., *Chem. zvesti* **15**, 212 (1961).

Do redakcie došlo 9. 4. 1962

V revidovanej podobe 11. 1. 1963

Adresa autora:

Dcc. MUDr. Favel Mäsiar, Katedra biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika, Košice, Šrobárova 57.