

## O hemoglobíne (XVI) Izolácia a charakterizácia reťazcov hemoglobínu opice *Macacus rhesus*\*

P. MÁSIAR, J. VNEK

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

W. A. Schroeder a spolupracovníci [1, 2] upozornili na existenciu dvoch homológnych typov polypeptidových reťazcov v ľudskom hemoglobíne. Potvrdili tak už predtým V. M. Ingramom [3] a L. Paulingom [4] vyslovený predpoklad, že ľudský hemoglobín sa skladá z dvoch veľkostí podobných polymolekul, ktorý sa neskoršie potvrdil aj pre niektoré zvieracie hemoglobíny [5, 6, 7].

V zápätí sa ukázalo, že tieto polymolekuly, ktoré škola Schroederova pomenovala pri ľudskom hemoglobíne ako  $\alpha$  reťazce a  $\beta$  reťazce, možno izolovať chromatograficky [8] a pomocou protiprúdového roztrepávania [9].

Pri štúdiu *N*-terminálneho zakončenia hemoglobínu opice *Macacus rhesus* sme ukázali [10], že hemoglobín tejto opice má niektoré charakteristiky zhodné s ľudským hemoglobínom. Zistili sme, že jedinou *N*-terminálnou aminokyselinou je valín. Zistenie *N*-terminálnych sekvencií Val.Leu a Val.His nás viedlo k záveru, že opičí hemoglobín, podobne ako ľudský, je zložený z dvoch homológnych typov reťazcov, ktoré sme pomenovali  $\alpha$  a  $\beta$  podobne ako Schroederova škola v prípade ľudského hemoglobínu.

S týmito charakteristikami boli v dobrom súlade aj skôr [11] stanovené sekvencie Gly.His.Gly.Lys ( $\alpha$ 57—61) a Ala.His.Gly.Lys ( $\beta$ 62—65), ktoré sme zistili úplne identické v tryptických hydrolyzátoch ľudského a opičieho hemoglobínu. Keďže každá z uvedených sekvencií je charakteristická pre určitý typ polypeptidových reťazcov ľudského hemoglobínu, ich zistenie v tryptickom hydrolyzáte hemoglobínu opice poukazovalo na ďalšie identické usporiadanie aminokyselín v určitej časti polypeptidových reťazcov ľudského a opičieho hemoglobínu. Porovnávacie štúdie enzymatických hydrolyzáto, uskutočnené kombináciou papierovej elektroforézy a papierovej chromatografie [12], poukazovali tiež na nápadnú zhodnosť v elektroforetickom a chromatografickom chovaní nižších fragmentov vyštiepených z oboch molekúl.

Avšak zisťovania na celej molekule umožňovali získať len čiastkové poznatky o stavbe bielkovinovej molekuly opičieho hemoglobínu. Podobnosť v elektroforetickom chovaní určitých fragmentov vyštiepených z  $\alpha$  reťazcov a  $\beta$  reťazcov neumožňovala dosť rýchle rozlíšiť, ku ktorému z typov reťazcov patria,

\* Výsledky prednesené na II. celoštátnych biochemických dňoch v Starom Smokoveci 27. a 28. apríla 1961.

preto pre ďalší pokrok v práci sa ukázalo nevyhnutným študovať každý typ reťazcov osobitne. Izolácia a čiastočná charakterizácia  $\alpha$  reťazcov a  $\beta$  reťazcov hemoglobínu opice *Macacus rhesus* je účelom tejto práce.

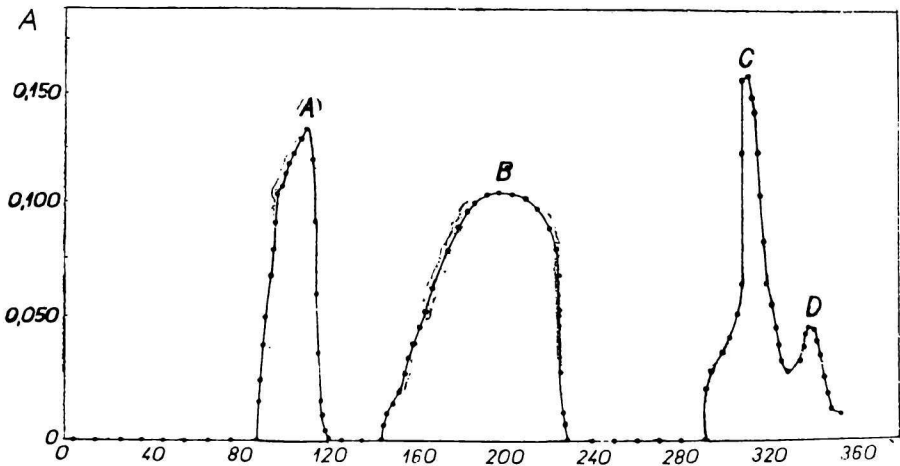
### Experimentálna časť

Hemoglobín opice *Macacus rhesus* sa získal v kryštalickom stave postupom, ktorý sme opísali v práci [13]. Bielkovinová zložka globín sa získala odštiepením hému pomocou metódy, ktorú opísali M. L. Anson a A. E. Mirski [14].

#### Izolácia reťazcov

Na izoláciu reťazcov sme použili metódu, ktorú S. Wilson a D. B. Smith [8] použili pri izolácii reťazcov konského hemoglobínu. 1 g globínu sme rozpustili v 10 ml 11,7 % kyseliny mravčej a v 1 % suspenzii vlhkého vymieňača iónov sme naniesli na základný stĺpec Amberlitu IRC 50 (X)E 64 v H cykle o rozmere kolóny  $2,2 \times 60$  cm. Vyvíjanie chromatogramu a elúciu frakcií sme robili pomocou gradientu močoviny 2 — 8 M, pH ktorej sme kyselinou solnou upravili na hodnotu 1,8. Frakcie vytekajúce z kolóny rýchlosťou 120 ml/hod. sme chytali v množstve 5 ml pomocou automatického zberača frakcií. Vytekajúci eluát sme vyhodnocovali zmeraním optickej hustoty vzoriek na spektrofotometri SF 4 pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 280$  m $\mu$ .

V súlade so vzniknutými krivkami (obr. 1) sme eluáty zodpovedajúce jednotlivým



Obr. 1. Spektrofotometrické zhodnotenie priebehu chromatografie globínu opice *Macacus rhesus* na vymieňači iónov IRC 50. Chromatografia vykonaná za použitia gradientu močoviny 2—8 M, okyslenej koncentrovanej kyselinou solnou na pH 1,8.

Na osi  $x$  je zachytený počet skúmaviek eluátu, na osi  $y$  je znázornená optická hustota nameraná na spektrofotometri SF 4 pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 280$  m $\mu$ .

frakciám spojili. Močovinu sme odstránili dialýzou proti tečúcej vode po dobu 24 hodín a proti destilovanej vode po dobu 18 — 24 hodín. Bielkovinové frakcie sme vysušili mrazovou sublimáciou.

### *Tryptická hydrolyzá*

Alikvotnú časť 0,2  $\mu$ mólu z každej frakcie sme suspendovali v 250  $\mu$ l 0,5 % roztoku uhličitanu amónneho a podrobili štiepeniu trypsínom. Použili sme československý preparát trypsínu fy Organofarma, prečistený v našom laboratóriu. Pomer enzým : substrát sme volili 1 : 50, koncentráciu substrátu 0,025 %. Štiepenie prebiehalo pri 37 °C po dobu 8 hodín, načo sme hydrolyzát zmrazili a podrobili mrazovej sublimácii.

### *Izolácia vysokobázických peptidov obsahujúcich histidín*

Tryptický hydrolyzát sa rozpustil v pyridín—acetátovom tlmivom roztoku o pH 3,5 a aplikoval sa na 10 cm prúžok chromatografického papiera Whatman 1. Taktó upravená vzorka sa podrobila elektroforéze v pyridín—acetátovom tlmivom roztoku o pH 3,5 pri potenciálovom spáde 60 V/cm po dobu 90 minút. Peptidy migrujúce v oblasti bázických aminokyselín sa eluovali 5 % kyselinou octovou a vysušili sa v exsikátore nad lúhom sodným a koncentrovanou kyselinou sírovou. Úplná kyslá hydrolyzá izolovaných peptidov sa vykonala 6 N-HCl pri 105 °C v priebehu 18 hodín. Aminokyselinové zloženie v kyslých hydrolyzátoch izolovaných peptidov sa stanovilo elektroforézou v 3 % kyseline mravečnej na papieri Whatman 1 pri potenciálovom gradiente 80 V/cm počas 40 minút.

### *Stanovenie N-terminálnych aminokyselín*

N-terminálne aminokyseliny sa stanovili metódou H. Fraenkel—Conratta a J. I. Harisa [15] vo forme fenyltiohydantoínov.

### *Výsledky*

Chromatografiou disociovaného globínu opice *Macacus rhesus* na stĺpci IRC 50 sme získali 4 frakcie (obr. 1), ktoré sme označili ako frakcie A, B, C, D. Z frakcie A sme po dialýze a lyofilizácii získali 263 mg, z frakcie B 486 mg, z frakcie C 138 mg a z frakcie D 27 mg sušiny. Majoritnou frakciou, ako vidieť, bola frakcia B, kým frakcia D, ktorá vytekala po drastickom pôsobení 8 M močoviny, predstavovala minoritnú frakciu. O tejto frakcii, ktorá pravdepodobne predstavuje disociované zvyšky pôvodnej bielkoviny, neuvažuje sa ďalej v práci. Priebeh frakcionácie je znázornený v tab. 1.'

### *Analýza tryptického hydrolyzátu*

Analýzou tryptického hydrolyzátu jednotlivých frakcií sme dostali tento obraz: Z frakcie A sme izolovali dva histidín obsahujúce vysokobázické peptidy s úplne rovnakým kvalitatívnym zložením aminokyselín His, Gly, Lys. Pri jednom z peptidov sa pozoroval zvýšený obsah lyzínu, čo by nasvedčovalo prítomnosti peptidov Gly.His.Gly.Lys a Gly.His.Gly.Lys.Lys. Vo frakcii B sme zistili peptid s aminokyselinovým zložením Ala, His, Gly, Lys s kvalitatívne viac vyznačeným glycínom. Vo frakcii C sme zistili peptid toho istého aminokyselinového zloženia, ako sme uviedli pri frakcii B. Prehľad o amino-

Tabuľka 1

Výťažok jednotlivých frakcií získaných chromatografiou disociovaného globínu opice *Macacus rhesus* na stĺpci vymieňača iónov IRC 50

Frakcia	Výťažok v mg	Počet skúmaviek	Gradient močoviny (M)
A	263	30	3,9—4,3
B	486	82	4,8—6,4
C	138	62	7,8—8,0
D	27	10	8,0

kyselinovom zložení uvedených peptidov je v tab. 2. Kvantitatívne zastúpenie, ako bolo vidieť z referentných zmesí, bolo rozdielne. V prípade peptidu A<sub>1</sub> sme po ninhydríne pozorovali obdobné žlté sfarbenie, aké zodpovedalo sfarbeniu opísanému v predchádzajúcich prácach.

Tabuľka 2

Aminokyselinové zloženie vysokobázických peptidov obsahujúcich histidín, izolovaných z tryptického hydrolyzátu frakcií A, B a C opičieho globínu

Frakci	Peptid	Zloženie aminokyselín				Farba po ninhydríne
		Lys	His	Gly	Ala	
A	A <sub>1</sub>	+	+	+		žltá
B	B <sub>1</sub>	+	+	+	+	modrá
C	C <sub>1</sub>	+	+	+	+	modrá

### *N*-terminálne aminokyseliny

*N*-terminálne aminokyseliny stanovené vo všetkých frakciách zhrneme v tab. 3. Ako z tabuľky vyplýva, valín je jedinou *N*-terminálnou aminokyselinou, stanovenou vo všetkých frakciách.

### Diskusia

O separáciu disociovaných zložiek bielkovinovej molekuly konského hemoglobínu na kolóne vymieňača iónov sa po prvýkrát pokúsili S. Wilson a D. B. Smith [8]. Použitím stále stúpajúceho gradienta okyslenej močoviny od 2—8 M podarilo sa im oddeliť niekoľko frakcií. Štúdiom *N*-terminálnych

Tabuľka 3

Aminokyseliny identifikované na *N*-terminálnej časti reťazcov izolovaných frakcií hemoglobínu opice *Macacus rhesus* v I. stupni degradácie fenylytiohydantoínovou technikou

Frakcia	Identifikované <i>N</i> -terminálne aminokyseliny	
	kyslý extrakt	alkalický
<i>A</i>	valín	—
<i>B</i>	valín	—
<i>C</i>	valín	—
<i>D</i>	valín	—

sekvencií zistili, že najrýchlejšie postupujúca frakcia zodpovedá reťazcu zakončenému sekvenciou valyl-leucyl..., ostatné frakcie zodpovedali reťazcom zakončeným valyl-glutamyl... V. M. Ingram [16] podobnou metódou dosiahol separáciu ľudského globínu na dve frakcie, z ktorých najmä frakcia zodpovedajúca  $\alpha$  reťazcom predstavovala ešte čiastočne zmesný produkt. V našich informatívnych pokusoch na ľudskom hemoglobíne sme touto metódou takisto získali viac frakcií, z ktorých posledné predstavovali váhove minoritné frakcie. Takáto situácia si vyžadovala bližšiu charakterizáciu produktov získaných chromatografickou frakcionáciou hemoglobínu opice *Macacus rhesus*. Z toho dôvodu sme pri všetkých frakciách podrobili štúdiu *N*-terminálne zakončenie reťazcov. Ako z tab. 2 vyplýva, vo všetkých frakciách sme ako jedinú *N*-terminálnu aminokyselinu objavili valín. Tieto výsledky sú v súlade s naším predchádzajúcim zistením na celej molekule hemoglobínu [10].

Na rozlíšenie typov reťazcov sme využili predtým zistenú skutočnosť [11], že hemoglobín opice, podobne ako ľudský hemoglobín, obsahuje vo svojich reťazcoch charakteristické zoskupenie aminokyselín, a to v pozícii 57—61  $\alpha$  reťazcov Gly.His.Gly.Lys a v pozícii 62—65  $\beta$  reťazcov Ala.His.Gly.Lys. Zistenie týchto peptidov, ktoré sú charakteristické svojím zafarbením po ninhydribovej detekcii chromatogramu a aminokyselinovým zložením, môže významne pomôcť pri charakterizácii reťazcov. Z výsledkov uvedených v tab. 2 možno uzatvárať, že vysokobázický histidín obsahujúci peptid zistený vo frakcii *A* je charakteristický pre  $\alpha$  typ polypeptidových reťazcov. Vysokobázické peptidy frakcie *B* sú charakteristické pre  $\beta$  typ polypeptidových reťazcov. Podobný výsledok ako pri frakcii *B* sa zaznamenal aj pri analýze tryptického hydrolyzátu frakcie *C*. Na základe týchto výsledkov možno uzatvárať, že frakcia *A* zodpovedá  $\alpha$  reťazcom, frakcie *B* a *C* zodpovedajú  $\beta$  reťazcom. Avšak vzhľadom na to, že zistenie aminokyselín zodpovedajúcich zoskupeniu Ala.His.Gly.Lys

môže zahrňovať aj prímes zoskupenia His.Gly.Lys, nemožno vylúčiť najmä pri frakcii B prímes zvyškov  $\alpha$  reťazcov. Analýzy C-terminálnych aminokyselín pomocou karboxypeptidázy [17] tieto naše charakteristiky potvrdili. Úplný obraz o izolovaných frakciách poskytne nám komplexná analýza izolovaných frakcií, ktorou sa zaoberáme v ďalšej práci.

Pri posudzovaní uvedených výsledkov treba zaujať kritické stanovisko k používaniu kontinuálneho zvyšovania koncentrácie močoviny priamo na kolóne. Zdá sa, že výhodnejší postup volili A. T. Chernoff a J. C. Liu [18], ktorí pre frakcionáciu použili prerušovanú výmenu močoviny o presnej molarite, čím sa vyhlí elúcií pomerne silne adsorbovaných zvyškov, ktoré vytlačí 8 M močovina.

### Súhrn

Z kryštalického hemoglobínu opice *Macacus rhesus* izolovali autori bielkovinovú zložku globín a študovali jej skladbu. Frakcionáciou na kolóne vymieňača iónov Amberlit IRC 50 (X)E 64 izolovali pomocou gradienta močoviny v kyslej oblasti pH bielkovinové reťazce. Zistili, že molekula opičieho globínu sa skladá z dvoch homológnych reťazcov  $\alpha$  a  $\beta$ . N-terminálne zvyšky aminokyselín oboch typov reťazcov sú v úplnej zhode so zakončením  $\alpha$  reťazcov a  $\beta$  reťazcov ľudského hemoglobínu. Podobnosť s ľudským hemoglobínom sa potvrdila aj izoláciou a identifikáciou vysokobázických peptidov obsahujúcich histidín, ktoré sú charakteristické pre  $\alpha$  typ a  $\beta$  typ polypeptidových reťazcov ľudského hemoglobínu.

#### О ГЕМОГЛОБИНЕ (XVI)

#### ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПОЧЕК ГЕМОГЛОБИНА ОБЕЗЬЯНЫ *MACACUS RHESUS*

П. Мэснар, Я. Влек

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

Из кристаллического гемоглобина обезьяны *Macacus rhesus* авторы выделили белковую составную часть глобин и изучали её строение. Фракционированием на колонке с ионообменной смолой Амберлит IRC 50 (X)E 64 выделили с помощью градиента мочевины в кислой области pH белковые цепочки. Обнаружили, что молекула обезьяньего глобина состоит из двух гомологических цепочек  $\alpha$  и  $\beta$ . N-терминальные остатки аминокислот цепочек обоих типов находятся в полном соответствии с концами  $\alpha$  и  $\beta$  цепочек человеческого гемоглобина. Сходство с человеческим гемоглобином было подтверждено также выделением и идентифицированием высокоосновных гистидин содержащих пептидов, характерных для  $\alpha$  и  $\beta$  типов полипептидных цепочек человеческого гемоглобина.

ÜBER HÄMOGLOBIN (XVI)  
ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER HÄMOGLOBINKETTEN  
DES AFFENS *MACACUS RHEBUS*

P. Mäsiar, J. Vnek

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

Die Autoren isolierten aus kristallisiertem Hämoglobin des Affens *Macacus rhesus* die Eiweisskomponente Globin und untersuchten deren Aufbau. Durch Fraktionierung auf der Kolonne des Ionenaustauschers Amberlit IRC 50 (X)E 64 isolierten sie unter Zuhilfenahme des Gradienten des Harnstoffs im sauren pH-Gebiet die Eiweissketten. Sie stellten fest, dass das Molekül des Affen-Globins aus zwei homologen Ketten  $\alpha$  und  $\beta$  zusammen gesetzt ist. Die N-terminalen Aminosäurenreste beider Kettentypen befinden sich in völliger Übereinstimmung mit den Endigungen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Human-Hämoglobins. Diese Ähnlichkeit mit dem Human-Hämoglobin wurde auch durch die Isolierung und Identifizierung hochbasischer Peptide, welche Histidin beinhalten, die für den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typ der Polypeptidketten des Human-Hämoglobins charakteristisch sind, bestätigt.

LITERATÚRA

1. Rhinesmith H. S., Schroeder W. A., Pauling L., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4682 (1957).
2. Rhinesmith H. S., Schroeder W. A., Martin N., *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3358 (1958).
3. Hunt J. A., Ingram V. M., *Nature* **184**, 640 (1959).
4. Pauling L., *Haemoglobin*, 57. Symposium, Cambridge 1949.
5. Mäsiar P., Smolnický T., *Collection* **24**, 2790 (1959).
6. Mäsiar P., Jurovčík J., *Chem. zvesti* **13**, 58 (1959).
7. Braunitzer G., Matsuda G., *Z. physiol. Chem.* **325**, 91 (1961).
8. Wilson S., Smith D. B., *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 405 (1959).
9. Hill R. J., Craig L. C., *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 2272 (1959).
10. Mäsiar P., *Chem. zvesti* **14**, 603 (1960).
11. Mäsiar P., *Sborník prác LF UPJŠ* **4**, 29 (1961); *Collection* **27**, 1598 (1962).
12. Mäsiar P., *Chem. zvesti* (v tlači).
13. Mäsiar P., Vnek J., *Bratislavské lekárske listy* **42**, 129 (1962).
14. Anson M. L., Mirski A. E., *J. Gen. Physiol.* **13**, 469 (1930).
15. Fraenkel—Conrat H., Harris J. I., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 6058 (1956).
16. Ingram V. M., *Nature* **183**, 1795 (1959).
17. Mäsiar P., *Chem. zvesti* (v tlači).
18. Chernoff A. I., Liu J. C., *Blood* **17**, 54 (1961).

Do redakcie došlo 5. 4. 1962  
V revidovanej podobe 11. 1. 1963

*Adresa autorov:*

*Doc. MUDr. Pavel Mäsiar, inž. Ján Vnek, Katedra biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika, Košice, Šrobárova 57.*