

O HEMOGLOBÍNE (III)*
K OTÁZKE PODOBNOSTI V ŠTRUKTÚRE BIELKOVINOVEJ ZLOŽKY
MAČACIEHO A KRYSIEHO HEMOGLOBÍNU

P. MÄSIAR, M. JUROVČÍK

Biochemický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Košiciach

Otázka štruktúrnych analógií bielkovín je v súčasnej dobe predmetom intenzívneho štúdia. Podstatou tohto štúdia je snaha vystihnúť analógie v mikroštruktúre druhove odlišných bielkovín s podobnou, nie však špecificky totožnou biologickou funkciou, syntetizovaných rovnakým typom buniek toho istého orgánu (napr. pankreatických enzýmov) [1—4]. Na druhej strane ide o vystihnutie odchýlok v mikroštruktúre študovaných bielkovín, odpovedajúcich danému stupňu fylogenézy, prípadne ontogenézy individua, ktoré ich syntetizuje. V súvislosti s tým bol vyslovený predpoklad [5], že tieto odchýlky by mali predstavovať len odchýlky nižšieho rádu, ktoré možno súčasnými metódami postihnúť bez toho, že by bolo nevyhnutné riešiť celú ich mikroštruktúru, čo je v súčasnej dobe pri celom rade bielkovín problém ešte neobyčajne obťažný. Prvé práce v tomto smere, ktoré sa vykonali v laboratóriách školy F. Šorma [6, 7], poukázali na možnosti objaviť analógie v mikroštruktúre bielkovinovej molekuly pomocou analýzy nižších peptidických štiepných produktov kyslej hydrolýzy, ako aj na odchýlky v sumárnom zložení peptidov odvodených od tej istej aminokyseliny. Súčasne dostupné údaje literatúry (pozri napr. [8]) prinášajú už celý rad dôkazov pre tento predpoklad a je pravdepodobné, že cielavedome zamerané štúdium, rozšírené na širší okruh analyzovaných bielkovín, umožní vystihnúť totožné zákonitosti aj v stavbe bielkovín všeobecne a položí základ ich systematike, ako aj osvetleniu príčin svojráznych biologických funkcií bielkovinových molekúl. V oblasti štúdia mikroštruktúry hemoglobínu sa dokázali analógie, ako aj rozdiely pri hemoglobínoch izolovaných z rozličných druhov zvierat, najmä v N-koncových aminokyselinách a peptidoch [9—13]. Vo vnútornej stavbe reťazca bielkovinovej molekuly sa vystihli rozdiely medzi normálnym ľudským hemoglobínom a hemoglobínom srpkovitej anémie [14].

V našich predchádzajúcich prácach sme dokázali podobnosti vo vnútornej stavbe konského a prasačieho hemoglobínu analýzou peptidických štiepných produktov kyslej čistočnej hydrolýzy [15, 16], obsahujúcich arginín a histidín. Podobne sa nám podarilo vystihnúť analógie a diferencie vo fyzikálno-chemických vlastnostiach vyšších peptidických štiepných produktov, získaných tryptickou hydrolýzou konského a ľudského hemoglobínu [17]. V tejto práci

* Predchádzajúca práca (II) sa uverejňuje v Chem. listoch 52, 1991 (1958).

sme vykonali štúdium vyšších peptidických štiepných produktov kryšieho a mačacieho hemoglobínu, získaných enzymatickou hydrolýzou.

Experimentálna časť

Materiál

Kryší hemoglobín sme pripravili v kryštalickom stave kombináciou metód J. Marshalla a W. H. Welkera [18] a K. Kaniga [19] v našej modifikácii [20]. Prečistenie hemoglobínu sa dosiahlo 4 krát opakovanou rekryštalizáciou. Mačací hemoglobín sme pripravili kryštalizáciou síranom amónnym podľa F. Haurowitza [21]. Do práce sme vzali 4 krát rekryštalovaný preparát, a to len jeho bielkovinovú zložku globín; podobne sme postupovali aj pri kryšom hemoglobíne. Odštiepenie bielkovinovej zložky obidvoch hemoglobínov sa vykonalo podľa M. Ansona a A. E. Mirského [22].

Enzým

Na hydrolýzu sa použil trojnásobnou rekryštalizáciou prečistený preparát trypsínu fy. Organofarma, n. p., Praha. Trypsín sa pred pokusom upravil postupom opísaným v predchádzajúcej práci [23].

Hydrolýza

Enzymatické štiepenie obidvoch bielkovín sa vykonalo spôsobom opísaným v predchádzajúcich prácach [17, 23].

Analýza tryptických hydrolyzátov elektrochromatografiou

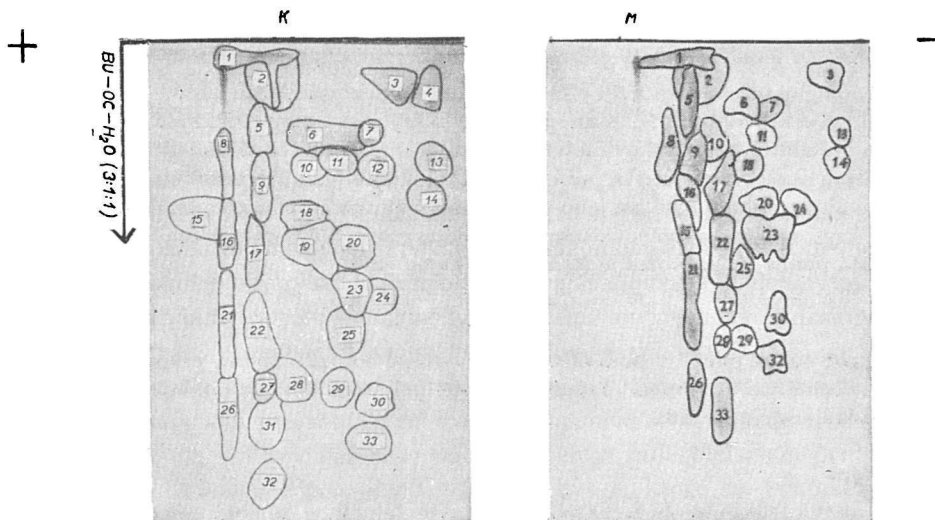
Na analýzu tryptických hydrolyzátov sa použila elektrochromatografia podľa V. E. Ingrama [14] a preparatívna elektroforéza a chromatografia [17]. Alikvotná časť tryptického hydrolyzátu (2 mg bielkoviny) sa naniesla na 1 cm prúžok chromatografického papiera Whatman 1 a podrobila sa elektroforéze v pyridín—acetátovom tlmivom roztoku o pH 5,6 a potenciálovom spáde 40 V/cm. Po vysušení sa elektroforegram v kolmom smere podrobil papierovej chromatografii v zmesi *n*-butanol—kyselina octová—voda (3 : 1 : 1). Detekcia elektrochromatogramov sa uskutočnila 0,5 % roztokom ninhydrínu v acetóne. Ďalšie dva elektrochromatogramy z obidvoch bielkovín sa detegovali Paulyho reagentom na prítomnosť histidínovej zložky a Sakaguchiho reagentom na prítomnosť arginínu.

Preparatívna jednorozmerná chromatografia

Alikvotná časť (10 mg pôvodnej bielkoviny) každej vzorky sa v dvoch samostatne nanesených prúžkoch podrobila papierovej chromatografii v systéme *n*-butanol—pyridín—kyselina octová—voda (30 : 20 : 6 : 24) dvakrát opakovaným vyvíjaním podľa B. Keila [24]. Prúžky sa naniesli na šírku 1,5 cm vedľa seba na jeden hárok chromatografického papiera Whatman 3. Prvá časť materiálu (1,5 cm prúžok) sa použila na detekciu, druhá časť sa na základe vykonanej detekcie vystrihla z papiera a eluovala sa destilovanou vodou vytrepanou chloroformom. Eluovaný materiál sa nadbytku rozpúšťadla zbavil odparením vo vákuu nad tuhým hydroxydom sodným a za opísaných podmienok sa podrobil elektroforéze na papieri Whatman 1. Chromatogramy sa detegovali 0,5 % roztokom ninhydrínu v acetóne, Paulyho a Sakaguchiho reagentom.

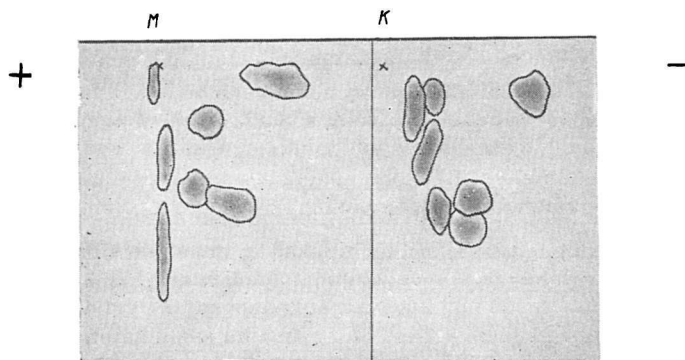
Výsledky a diskusia

Výsledky analýz znázornené na obr. 1—4 ukazujú, že v prevažnej väčšine sa z obidvoch bielkovín vyštíepili fragmenty s podobnými fyzikálno-chemic-



Obr. 1. Elektrochromatogram tryptického hydrolyzátu krysieho (K) a mačacieho (M) hemoglobínu.

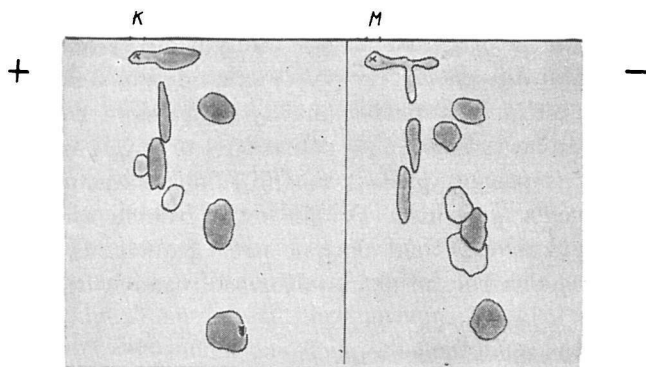
Elektroforéza sa vykonala zostupne podľa O. Míkeša [26] v prídín—acetátovom tlmivom roztoku o pH 5,6 priebehom 2 hodín pri potenciálovom spáde 40 V/cm. Papier Whatman 1. Chromatografia sa vykonala v systéme *n*-butanol—kyselina octová—voda (3 1 1). Detegovalo sa 0,5 % roztokom ninhydrínu.



Obr. 2. Elektrochromatogram tryptického hydrolyzátu mačacieho (M) a krysieho (K) hemoglobínu.

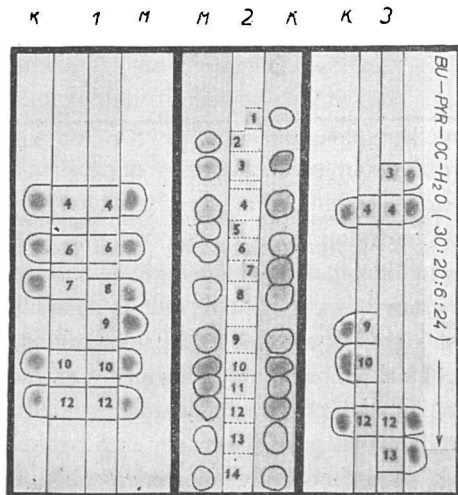
Elektrochromatografia sa vykonala za vyššie opísaných podmienok. Detekcia Paulyho reagentom.

kými vlastnosťami. Táto podobnosť najlepšie vynikne na obr. 4, ktorý znázorňuje chromatografické chovanie bielkovinových štiepných produktov za použitia jednorozmernej chromatografie. Obr. 4 poukazuje však aj na to, že



Obr. 3. Elektrochromatogram tryptického hydrolyzátu krysieho (K) a mačacieho (M) hemoglobínu.

Elektrochromatografia sa vykonala spôsobom uvedeným na obr. 1 a 2.
Detekcia Sakaguchiho reagentom.

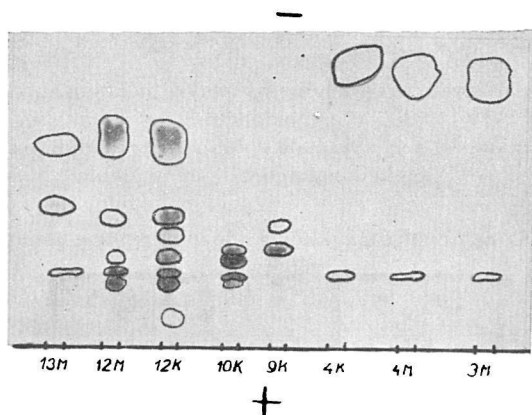


Obr. 4. Preparatívna jednorozmerná chromatografia tryptického hydrolyzátu krysieho (K) a mačacieho (M) hemoglobínu.

Chromatografia sa vykonala na papieri Whatman 3 v systéme *n*-butanol—pyridín—kyselina octová—voda (30 20 6 24) 2 krát opakovaným vyvíjaním. Číslo 1, 2, 3 označujú detekciu okrajových prúžkov.

1. detekcia Sakaguchiho reagentom, 2. detekcia 0,2 % roztokom ninhydrínu, 3. detekcia Paulyho reagentom.

kým prevažná časť frakcií, a to 3, 4, 6, 8—14 vykazuje podobné chromatografické chovanie, frakcie 1, 2, 6, 7 vykazujú v chromatografickom chovaní zrejme odchýlky. Frakcie obsahujúce peptidy s arginínovou zložkou vykazujú úplnú zhodu, okrem frakcie 9, ktorá pri krysom hemoglobíne nedávala pozitívny Sakaguchiho test, aj keď sa pri ninhydrínovej detekcii v uvedenej frakcii nezaznamenali diferencie. Ako vyplýva z oddielu 3 na obr. 4, frakcia 9 prítomná u krysy nie je prítomná u mačky. Vzhľadom na to, že odchýlky v mikroštruktúre sú často viazané na zámennosť určitých aminokyselín v polypeptidickej reťazci (pozri napr. [8]), možno takúto zámennosť predpokladať aj v peptidoch uvedenej frakcie. Pokiaľ ide o frakciu obsahujúcu histidín (obr. 4, oddiel 3), vykazovala vzhľadom na počet frakcií značné rozdiely. Toto zistenie potvrdila aj elektroforetická analýza eluovaných frakcií (obr. 5). Ako



Obr. 5. Elektroforegram frakcií obsahujúcich histidín, ktoré sa získali preparatívnou chromatografiou tryptického hydrolyzátu krysieho (K) a mačacieho (M) hemoglobínu. Číslo jednotlivých frakcií korešponduje s číslami na obr. 4.

vidieť na obr. 5, chromatograficky korešpondujúce frakcie obsahujú aj elektroforeticky podobné peptidické fragmenty. Podobný obraz dalo i elektroforetické porovnanie peptidických frakcií obsahujúcich arginín. Vzhľadom na to, že pri oboch bielkovinách sa použil ten istý typ proteázy a hydrolyza prebiehala za tých istých experimentálnych podmienok, možno o analógiách v chovaní jednotlivých peptidických fragmentov uvažovať ako o analógiách v štruktúre študovaných bielkovín. Pre tento predpoklad svedčí skutočnosť, že substitúciou aminoskupín uvoľnených hydrolyzou sa zistilo [23], že v oboch prípadoch sa na karboxylovom konci arginínu a lyzínu uvoľnili tie isté aminokyseliny. Z porovnania výsledkov získaných analýzou tryptického hydrolyzáta konského a ľudského hemoglobínu [17] vidieť, že pri všetkých štyroch analyzovaných hemoglobínoch možno nájsť jasné analógie v celom

rade peptidických fragmentov. Aj v oblasti peptidov obsahujúcich histidínové zvyšky sú niektoré analógie evidentné. Ak uvažujeme o peptidoch obsahujúcich histidín, je pozoruhodné, že vo všetkých štyroch analyzovaných bielkovinách je ich nápadne nízky počet. Toto zistenie je v súlade so zisteniami v predchádzajúcich prácach [16, 25], kde z čiastočného kyslého hydrolyzátu dvoch hemoglobínov sa izolovalo zhruba päť typov dipeptidov. Obidve tieto zistenia ostro kontrastujú s počtom zvyškov histidínu (33—35) v molekule hemoglobínu. Pre túto skutočnosť je možný dvojitý výklad: buď sa sekvencie obsahujúce histidín v molekule hemoglobínu viackrát opakujú, alebo sú prítomné také zoskupenia v molekule hemoglobínu, kde je nakumulovaných viac zvyškov histidínu. Táto otázka ostáva zatiaľ otvorená. Keďže ide o zásadnú otázku, v súčasnej dobe je spolu s diferentnými peptidmi hemoglobínov predmetom nášho ďalšieho štúdia. V súvislosti s hodnotením štruktúry hemoglobínu ako celku nachádzame v krysom a mačacom hemoglobíne pri elektrochromatografii zhruba polovičný počet štiepných produktov, než by to odpovedalo množstvu arginínových a lyzínových zvyškov v molekule obidvoch hemoglobínov. Tieto výsledky sú v dobrom súhlase s výsledkami, ktoré získal V. E. Ingram [14] pri štúdiu ľudského hemoglobínu.

Súhrn

Vykonala sa chromatografická a elektroforetická analýza tryptických hydrolyzáto v krysieho a mačacieho hemoglobínu. V súvislosti s tým sa zistilo, že z obidvoch bielkovín sa vyštíepila väčšina peptidov s podobným chromatografickým a elektroforetickým chovaním, čo nasvedčuje pre určité analógie v mikroštruktúre obidvoch bielkovín. Pri obidvoch bielkovinách sa zistili aj diferentné fragmenty. Časť diferentných fragmentov obsahuje vo svojej molekule arginín a histidín, časť predstavuje peptidy neobsahujúce uvedené aminokyseliny. V obidvoch bielkovinách sa zistil malý počet peptidov odvodených od histidínu, čo nasvedčuje, že v molekule hemoglobínu je zvláštne usporiadanie sekvencií obsahujúcich histidín. Počet škvŕn zistených elektrochromatografiou predstavoval približne polovicu teoreticky možných štiepných produktov, z čoho možno usudzovať na podobnú stavbu molekuly, aká sa zistila pri ľudskom a konskom hemoglobíne.

Ďakujeme akademikovi F. Šormovi a kolektívu Biochemického oddelenia Chemického ústavu Československej akadémie vied v Prahe za nevšedný záujem a za vecné pripomienky. Zároveň ďakujeme V. Kadukovi za technickú spoluprácu.

О ГЕМОГЛОБИНЕ (III) К ВОПРОСУ СХОДСТВА В СТРУКТУРЕ БЕЛКОВОГО КОМПОНЕНТА КОШАЧЬЕГО И КРЫСЬЕГО ГЕМОГЛОБИНА

П. МЭСИАР, М. ЮРОВЧИК

Биохимический институт Медицинского факультета Университета имени Коменского
в Кошицах

Выводы

Был проведен хроматографический и электрофоретический анализ триптических гидролизатов крысью и кошачью гемоглобина. В связи с этим было обнаружено, что из обоих белков было отщеплено большинство пептидов с подобным хроматографическим и электрофоретическим поведением, что свидетельствует о определенной аналогии в микроструктуре обоих белков. У обоих белков были найдены также отличающиеся фрагменты. Часть отличающихся фрагментов содержит в своей молекуле аргинин и гистидин, часть представляет пептиды, у которых вышеупомянутые аминокислоты отсутствуют. У обоих белков было обнаружено малое количество пептидов, происходящих из гистидина, что свидетельствует о особом расположении секвенций, содержащихся в молекуле гемоглобина. Количество пятен обнаруженных электрохроматографией представляло приблизительно половину теоретически возможных расщеплений, из чего можно судить на подобное строение молекулы, как это было найдено у людского и конского гемоглобина.

Поступило в редакцию 26. 4. 1958.

ON HAEMOGLOBIN (III) TO THE QUESTION OF RESEMBLANCES IN THE STRUCTURE OF PROTEIN COMPONENTS OF CAT AND RAT HAEMOGLOBIN

P. MÄSIAR, M. JUROVČÍK

Institute of Biochemistry Faculty of Medicine Komensky University Košice

Summary

A chromatographic and electrophoretic analysis of tryptic hydrolysates of rat and cat haemoglobin has been carried out. Thereby it has been found that both hydrolysates contain a surplus of peptides with a similar chromatographic and electrophoretic tendency; this is a sign of a certain analogy in microstructure of both proteins. In both proteins there were also found different fragments. Part of the different fragments contains in its molecule arginin and histidin, a small part contains peptides without these amino acids. A small number of peptid's fragments deduced from histidin was found in both proteins, which is a sign of the special arrangement of histidin sequences in the molecule of haemoglobin. The number of ninhydrin spots found by means of the electrochromatographic method represented approximatively one half of the fragments theoretically expected. From these results it is possible to arrive at the conclusion of a similar structure of human and horse haemoglobin molecules.

Received April 26, 1958

LITERATÚRA

1. Vaněček J., Keil B., Šorm F., Chem. listy 48, 1677 (1954). — 2. Vaněček J., Meloun B., Šorm F., Chem. listy 51, 1367 (1957). — 3. Meloun B., Vaněček J., Šorm F., Chem. listy 52, 523 (1958). — 4. Keil B., Chem. listy (v tlači). — 5. Šorm F.,

Chem. listy 48, 722 (1954). — 6. Knesslová V., Kostka V., Keil B., Šorm F., Chem. listy 49, 913 (1955). — 7. Keil B., Šorm F., Chem. listy (v tlači). — 8. Šorm F., Keil B., Holeyšovský V., Knesslová V., Mäsiar P., Meloun B., Mikeš O., Tomášek V., Vaněček J., Chem. listy 51, 1171 (1957). — 9. Porter R. R., Sanger F., Biochem. J. 42, 287 (1948). — 10. Ozawa H., Satake K., J. Biochem. (Japan) 42, 641 (1955).

11. Devényi T., Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 9, 321 (1956). — 12. Sanger F., Nature 161, 491 (1948). — 13. Brown H., Arch. Biochem. Biophys. 61, 241 (1956). — 14. Ingram V. E., Nature 178, 792 (1956). — 15. Mäsiar P., Keil B., Šorm F., Chem. listy 51, 352 (1957) — 16. Mäsiar P., Keil B., Šorm F., Collection 22, 1203 (1957); Chem. listy 51, 1728 (1957). — 17. Mäsiar P., Smolnícky T., Chem. listy 52, 1991 (1958); Collection (v tlači). — 18. Marshall J., Welker W. H., J. Am. Chem. Soc. 35, 820 (1913). — 19. Kaniga K., Biochem. Z. 325, 347 (1954). — 20. Mäsiar P., Nepublikované výsledky.

21. Haurowitz F., Z. physiol. Chem. 232, 125 (1935). — 22. Anson M. L., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol. 14, 603 (1930). — 23. Mäsiar P., Chem. zvesti 12, 713 (1958). — 24. Keil B., Chem. listy 48, 725 (1954). — 25. Mäsiar P., Kandidátska dizertačná práca, Praha 1957. — 26. Mikeš O., Chem. listy 51, 138 (1957).

Došlo do redakcie 26. 4. 1958

Adresa autorov:

MUDr. Pavel Mäsiar, MUDr. Michal Jurovčík, Košice, Šrobárova 57, Biochemický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského.