

PEPTIDY KYSELINY CYSTEOVEJ IZOLOVANÉ Z BÁZICKEJ A NEUTRÁLNEJ FRAKCIE KYSLÉHO ČIASTOČNÉHO HYDROLYZÁTU KONSKEHO HEMOGLOBÍNU

PAVEL MÁSIAR

Biochemický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Košiciach

Poznávanie mikroštruktúry bielkovín o vyššej molekulovej váhe je v súčasnej dobe viazané na štúdium nižších peptidických fragmentov kyslej alebo enzymatickej hydrolyzy. Izolácia peptidov odvodených od určitej aminokyseliny a ich charakterizácia umožňuje vytvoriť si predstavu o stavbe polypeptidického reťazca študovanej bielkoviny v okolí zvoleného aminokyselinového zvyšku.

Cystein a cystin patria k aminokyselinám, ktoré zastávajú význačné postavenie v molekule bielkovín. Z biologického stanoviska prináležia k tým aminokyselinám, ktorých blokáda alebo iné (oxydatívne) narušenie vedie k strate funkčných vlastností bielkoviny, ba často až k denaturácii. Z hľadiska mikroštruktúry je dôležité, že ide o aminokyseliny tvoriace obyčajne základný skelet pre väzbu polypeptidických reťazcov v bielkovinových molekulách. Úlohou tejto práce bolo štúdium zoskupení aminokyselín v okolí cysteinu pri peptidoch izolovaných z bázikkej a neutrálnej frakcie kyslého čiastočného hydrolyzátu konského hemoglobínu.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Čistý hemoglobín sa pripravil pätnásobnou kryštalizáciou podľa F. Haurowitza [1]. Bielkovinová zložka — globín — sa získal vyzrážaním do okysleného acetónu [2] za chladu.

Čiastočná hydrolyza

2 g globínu sa 144 hod. hydrolyzovali koncentrovanou kyselinou solnou pri 37 °C. Kyselina solná sa z hydrolyzátu odstránila jednak na rotačnej odparke [3], jednak trojnásobným odparením vo vákuu nad tuhým hydroxydom sodným.

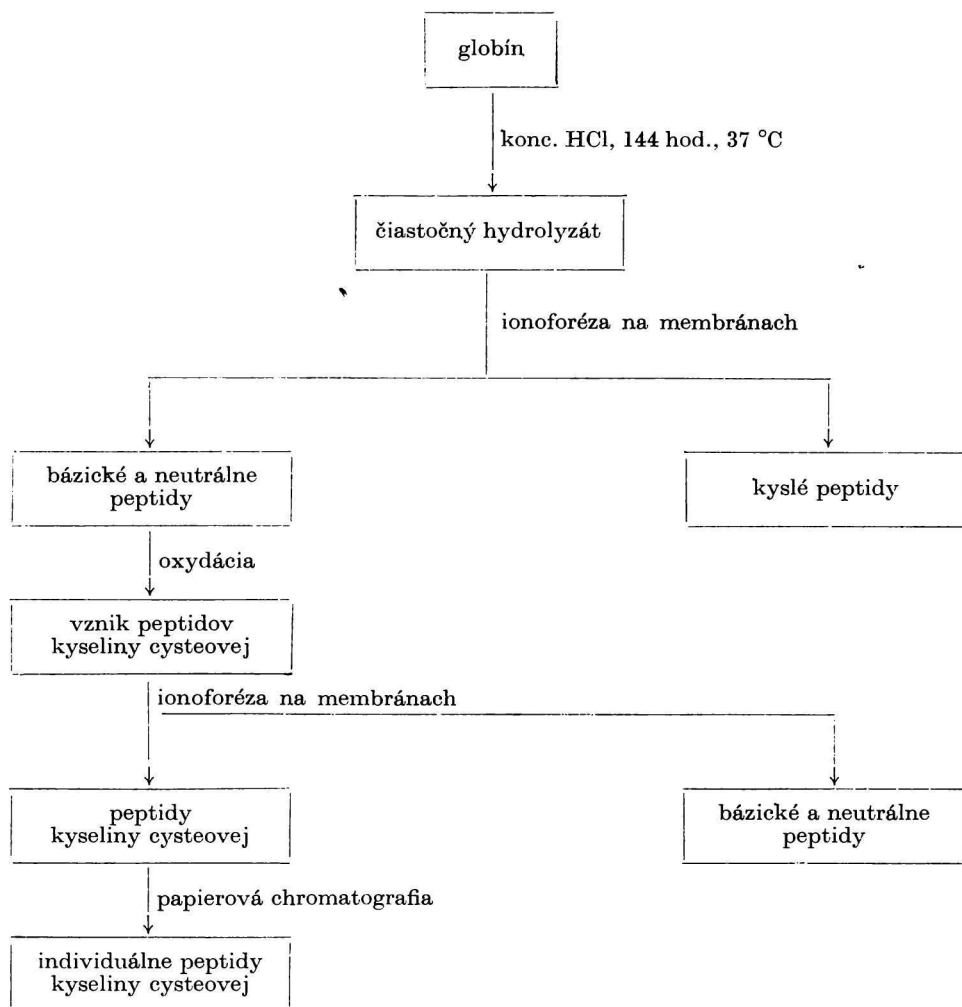
Izolácia peptidov kyseliny cysteovej

Postup pri frakcionácii a izolácii peptidov odvodených od kyseliny cysteovej prehľadne znázorňuje schéma 1.

Ionoforézou v pätkomorovom prístroji [4] bola z čiastočného hydrolyzátu oddelená skupina kyslých peptidov a aminokyselín. Postup pri oddelení skupiny kyslých peptidov bol ten istý, ako sme opísali v predchádzajúcej práci [5]. Frakcia kyslých peptidov a aminokyselín sa ďalej nespacovávala. Neutrálna a bázičná frakcia čiastočného hydrolyzátu sa podrobila oxydácii kyselinou peroxymravčou podľa B. Keila [6]. Týmto sa peptidicky viazaný cystein zoxidoval na kyselinu cysteovú. Peptidy odvodené od uvedených aminokyselín boli potom ako pozitívne nabité ióny oddelené z neutrálnej

Schéma 1

Izolácia peptidov kyseliny cysteovej z čiastočného hydrolyzátu konského hemoglobínu



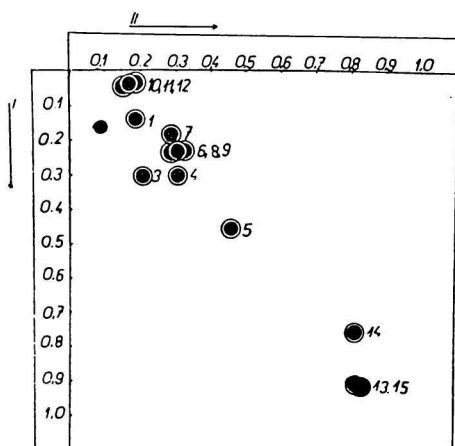
a bázeickej frakcie ionoforézou v päťkomorovom prístroji vyššie uvedeným postupom. Takto získaná skupina peptidov kyseliny cysteovej sa rozdeľovala dvojrozmernou papierovou chromatografiou v systéme *I* a *II* (pozri tab. 1). Ako nosič sa použil chromatografický papier Whatman 3. Detekcia peptidov bola uskutočnená pretiahnutím chromatogramu v 0,025 % roztoku ninhydrínu v acetóne. Takto ohraničený peptidický materiál bol eluovaný destilovanou vodou vytrepanou chloroformom. 10 % eluovaného materiálu bolo podrobené úplnej hydrolýze 6 N-HCl pri 105 °C po dobu 18 hodín. Hydrolýzou uvoľnené aminokyseliny boli identifikované papierovou chromatografiou v systéme *III*. Peptidy, ktorých úplné hydrolyzáty neobsahovali kyselinu cysteovú, boli eliminované. Peptidy

Tabuľka 1

Rozpúšťadlové sústavy použité pri papierovej chromatografii cysteových peptidov

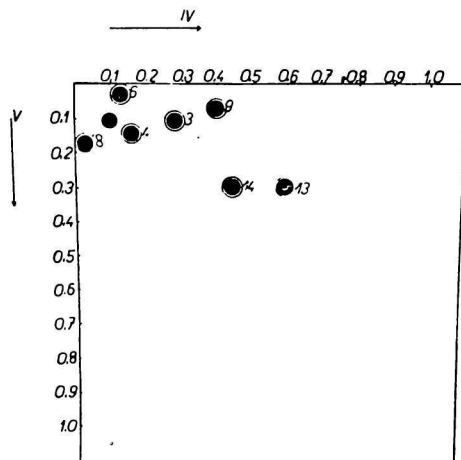
Sústava	Zloženie
<i>I</i>	izoamylalkohol—pyridín—voda (2 : 7 : 2)
<i>II</i>	<i>n</i> -butanol—voda—kyselina propiónová (124,6 : 87,4 : 62)
<i>III</i>	<i>n</i> -butanol—kyselina octová—voda (110 : 10 : 33)
<i>IV</i>	<i>n</i> -butanol—pyridín—kyselina octová—voda (30 : 20 : 6 : 24)
<i>V</i>	izoamylalkohol—pyridín—voda (1 : 3 : 1)
<i>VI</i>	fenol—voda (8 : 2)
<i>VII</i>	fenol nasýtený vodou (atmosféra nasýtená amoniakom)

obsahujúce kyselinu cysteovú boli oddeľované a dočisťované dvojrozmernou chromatografiou v systéme *IV* a *V*, ako aj v systéme *VI* a *III*. Chromatografické chovanie izolovaných peptidov kyseliny cysteovej je znázornené na obr. 1—3. Ako nosič pre chroma-



Obr. 1. Schematické znázornenie chovania (R_F) peptidov kyseliny cysteovej pri prvom oddeľovaní dvojrozmernou chromatografiou v systéme *I* a *II*.

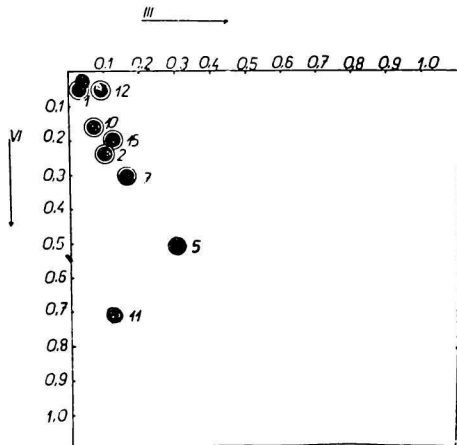
Čísla peptidov súhlasia s číslami uvedenými v tab. 2.



Obr. 2. Chromatografické chovanie (R_F) peptidov kyseliny cysteovej pri čistení dvojrozmernou papierovou chromatografiou v systéme *IV* a *V*.*

tografiu v uvedených systémoch sa použil papier Whatman 4. Po detekcii, ktorá bola uskutočnená pretiahnutím chromatogramu v 0,025 % roztoku ninhydrínu v acetóne, boli izolované peptidy eluované destilovanou vodou vytrepanou chloroformom. Získané

peptidy sa 18 hod. hydrolyzovali 6 N-HCl pri 105 °C. Aminokyseliny úplných hydrolyzátov izolovaných peptidov boli identifikované papierovou chromatografiou v systéme III. Sporné aminokyseliny boli identifikované papierovou chromatografiou v systéme VII. V oboch prípadoch sa ako nosič použil chromatografický papier Whatman 1.



Obr. 3. Chromatografické chovanie (R_F) peptidov kyseliny cysteovej pri čistení dvojrozmernou papierovou chromatografiou v systéme III a VI.*

Výsledky a diskusia

Molekula konského hemoglobínu je podľa údajov R. R. Portera a F. Sangera [7] zložená zo šiestich otvorených peptidických reťazcov. Pevné spojenie polypeptidických reťazcov v molekule väčšiny bielkovín sa predpokladá pomocou kovalentnej väzby (S—S) zvyškov cystín/2. Zistilo sa však [8], že v konskom hemoglobíne je prítomných len 6 zvyškov odpovedajúcich cysteín-cysteínovým sírnym atómom. Okrem toho V. M. Ingram [9] zistil, že 4 skupiny SH sú v natívnom hemoglobíne ako dva symetricky situované páry, kým v bielkovine denaturovanej Na-dodecylsulfátom sa objavuje aj tretí pár, maskovaný v natívnej bielkovine. Z toho vyplýva, že v konskom hemoglobíne nie sú prítomné disulfidické väzby, avšak musia existovať iné medzireťazcové väzby, ktoré rádovo odpovedajú typu väzby S—S. Keďže M. E. Reichmannovi a G. R. Colvinovi [10] sa podarilo oxydáciou kyselinou peroxymravčou (ktorá oxyduje práve sírne aminokyseliny) disociovať molekulu konského hemoglobínu na 4 menšie celky, je pravdepodobné, že zvyšky cysteínu sa týchto väzieb tak isto nejakým spôsobom zúčastňujú. Preto otázka aminokyselinových zoskupení v okolí cysteínových zvyškov hemoglobínu je aktuálna.

* Číslo peptidov súhlasia s číslami v tab. 2, ako aj s číslami na obr. 1. Hodnoty R_F sa vzťahujú na kyselinu cysteovú, ktorá je na obrázkoch bez čísla a je vyznačená len čiernou škrvnou bez vonkajšieho tenkého krúžku.

Ako vyplýva z výsledkov uvedených v tab. 2, okolie cysteínu v peptidických reťazcoch je tvorené prevažne vysokopolárnymi aminokyselinami zastúpenými

Tabuľka 2

Peptidy kyseliny cysteovej izolované z bázičkej a neutrálnej frakcie čiastočného hydrolyzátu konského hemoglobínu*

1	CySO ₃ H, his
2	CySO ₃ H, ser
3	CySO ₃ H, gly
4	CySO ₃ H, asp, ser
5	CySO ₃ H, asp, ser, gly
6	CySO ₃ H, asp, ser, ala
7	CySO ₃ H, asp, ser, gly, glu
8	CySO ₃ H, asp, ser, glu, thr, val, leu
9	CySO ₃ H, ser, ala
10	CySO ₃ H, lys, arg, ser
11	CySO ₃ H, lys, arg, ser, gly, glu
12	CySO ₃ H, lys, arg, ser, glu, thr
13	CySO ₃ H, his, asp, ser, ala, val
14	CySO ₃ H, lys, his, asp, ser, gly, glu, thr
15	CySO ₃ H, ser, glu, thr, val, leu

* Čísła peptidov súhlasia s číslami uvedenými na obr. 3.

skupinou dikarbónových aminokyselín (kyselina asparágová a kyselina glutamová), bázičkých aminokyselín (lyzín, histidín, arginín) a hydroxyamino-kyselín (serín, treonín). Ako vidieť, ide o aminokyseliny, ktorých aktívna úloha pri fixácii bielkovinovej globuly a pri tvorbe medzireťazcových spojov sa všeobecne predpokladá. Na priamy typ väzieb sa zatiaľ z uvedených výsledkov nedá usudzovať. Bude to pravdepodobne možné po zistení presnej sekvencie aminokyselín vedľa cysteínových zvyškov, na čom v súčasnej dobe pracujeme.

Zaujímavé je zastúpenie bázičkých aminokyselín v blízkom okolí kyseliny cysteovej, čo je v určitom rozpore s výsledkami H. Browna [11], ktorý z kyslého hydrolyzátu ľudského hemoglobínu izoloval peptidy obsahujúce vedľa kyseliny cysteovej prevažne zvyšky dikarbónových aminokyselín. Aj keď je potrebné brať do úvahy, že ide o bielkoviny stojace na rozličných stupňoch fylogeny, je pravdepodobnejšie, že metóda, ktorú použil H. Brown, nedovoľovala izoláciu peptidov obsahujúcich vedľa kyseliny cysteovej aj zvyšok bázičkej aminokyseliny. Skupina silne kyslých a kyslých peptidov, ktorú použitím Dowexu-2 v acetátovom cykle uvedený autor získal, nemohla obsahovať peptidy, ktoré ako jednu alebo viac svojich zložiek obsahovali zvyšok bázičkej aminokyseliny, pretože tieto ostávali v neutrálnej alebo slabo bázičkej oblasti.

V súvislosti s funkciou globínu v transportnom mechanizme hemoglobínu je dôležitá prítomnosť histidínu v blízkosti cysteínového zvyšku. Je známe, že imidazolový kruh histidínu jednak vytvára s hémom koordinatívnu väzbu [12, 13], jednak interaguje pri transporte kyslíka [14]. V dôsledku toho je pravdepodobné, že aktívne centrum hemoglobínu je niekde v okolí histidínových zvyškov. Je teda pravdepodobné, že okrem alanínu, leucínu, serínu, valínu a lyzínu izolovaných vedľa histidínu v predchádzajúcej práci [15] aj cysteín sa môže zúčastniť aminokyselinového zoskupenia aktívneho centra.

Ďakujem s. B. Korečkovej za technickú spoluprácu a kolektívu biochemického oddelenia I. Chemického ústavu Československej akadémie vied za láskavú pomoc a umožnenie vykonať časť pokusov na ich pracovisku.

Súhrn

Z kryštalického konského hemoglobínu bola izolovaná bielkovinová zložka globín a podrobená čiastočnej hydrolyze kyselinou soľnou.

Z bázeickej a neutrálnej frakcie čiastočného hydrolyzátu boli po predchádzajúcej oxydácii kyselinou peroxynravčou izolované peptidy kyseliny cysteovej a bolo stanovené ich sumárne zloženie. Zistilo sa, že v okolí kyseliny cysteovej sú v značnom množstve prítomné zvyšky vysokopolárnych dikarbónových aminokyselín (kyselina asparágová a kyselina glutamová), bázeických aminokyselín (lyzín, histidín, arginín) a hydroxyaminokyselín (serín, treonín).

V práci sa diskutuje o otázke medziretazových väzieb v molekule hemoglobínu, ako aj o možnostiach účasti cysteínu v aktívnom centre hemoglobínu.

ПЕПТИДЫ ЦИСТЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ИЗОЛИРОВАННЫЕ ИЗ ОСНОВНОЙ И НЕЙТРАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ КИСЛОГО ЧАСТИЧНОГО ГИДРОЛИЗАТА КОНСКОГО ГЕМОГЛОБИНА

ПАВЕЛ МЭСИАР

Биохимический институт Медицинского факультета Университета имени Коменского в Кошицах

Выводы

Из кристаллического конского гемоглобина была изолирована белковая часть глобин и подвергнута частичному гидролизу соляной кислотой.

Из основной и нейтральной фракций частичного гидролизата по предварительному окислированию пермуравьиной кислотой были изолированы пептиды цистеиновой кислоты и был определен их аминокислотный состав. Было выяснено, что в области цистеиновой кислоты присутствуют в значительном количестве остатки высокополярных дикарбоновых (аспарагиновая и глутаминовая кислоты), основных (лизин, гистидин, аргинин) и гидроксильных (серин, треонин) аминокислот.

В работе дискутируется вопрос междоцепочечных связей в молекуле гемоглобина а также и возможности участия цистеина в активном центре гемоглобина.

Поступило в редакцию 10. 1. 1958 г.

PEPTIDE DER CYSTEINSÄURE AUS DER BASISCHEN UND NEUTRALEN FRAKTION EINES SAUREN TEILWEISEN HYDROLYSATS VON PFERDEHÄMOGLOBIN

PAVEL MÁSIAR

Biochemisches Institut der Medizinischen Fakultät an der Komenský-Universität
in Košice

Zusammenfassung

Aus kristallischem Pferdehäoglobin wurde der Eiweissanteil Globin isoliert und einer partielle Hydrolyse mittels Salzsäure unterworfen.

Aus der basischen und neutralen Fraktion des Partialhydrolysats wurden nach einer vorausgegangenen Oxydation mittels Perameisensäure Peptide der Cysteinsäure isoliert und deren aminosäure Zusammensetzung bestimmt. Es wurde festgestellt, dass in der Umgebung der Cysteinsäure in beträchtlicher Menge Reste hochpolarer Dicarbonsäuren (Asparagin- und Glutaminsäure), basischer Aminosäuren (Lysin, Histidin, Arginin) und Hydroxyaminosäuren (Serin, Threonin) anwesend sind.

In dieser Arbeit wird die Frage der Zwischenkettenbindungen im Molekül des Hämoglobins diskutiert, ebenso auch werden die Möglichkeiten der Anteilnahme des Cysteins im aktiven Zentrum des Hämoglobins erörtert.

In die Redaktion eingelangt den 10. 1. 1958

LITERATÚRA

1. Haurowitz F., *Z. physiol. Chem.* **232**, 125 (1935). — 2. Anson M. L., Mirsky A. E., *J. Gen. Physiol.* **14**, 603 (1930). — 3. Craig L. C., Gregory J. D., Hausmann W., *Anal. Chem.* **22**, 1462 (1950). — 4. Vaněček J., Meloun B., Šorm F., *Chem. listy* **51**, 1367 (1957). — 5. Másiar P., Keil B., Šorm F., *Chem. listy* **51**, 352 (1957). — 6. Keil B., *Chem. listy* **48**, 1837 (1954). — 7. Porter R. R., Sanger F., *Biochem. J.* **42**, 287 (1948). — 8. Tristram G. R., *Advances in Protein Chem.* **5**, 83 (1949). — 9. Ingram V. M., *Biochem. J.* **59**, 653 (1955). — 10. Reichmann M. E., Coivin G. R., *Can. J. Chem.* **34**, 411 (1956). — 11. Brown H., *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 256 (1957). 12. — Conant J. B., *Harvey Lect.* **28**, 159 (1932). — 13. Wymann J., Jr., *J. Biol. Chem.* **127**, 1 (1939). — 14. Wymann J., Jr., *J. Biol. Chem.* **127**, 581 (1939). — 15. Másiar P., Keil B., Šorm F., *Chem. listy* **51**, 1728 (1957).

Došlo do redakcie 10. 1. 1958