

O HEMOGLOBÍNE (IV) PRÍSPEVOK K POZNANIU ŠTRUKTÚRY BIELKOVINOVEJ ZLOŽKY HEMOGLOBÍNU OPICE *MACACUS RHEBUS*

PAVEL MÁSIAR

Biochemický ústav Lekárskej fakulty Univerzity P. J. Šafárika v Košiciach

Práce F. Sangera [1] otvorili cestu k poznávaniu základných zákonitostí v chemickej stavbe bielkovín. Jednou z prvých látok, pri ktorých sa začalo štúdium chemickej stavby bielkovinovej molekuly, bol hemoglobín [2]. Napriek tejto skutočnosti, ba aj napriek tomu, že hemoglobín patrí k bielkovinám ľahko dostupným, poznanie jeho chemickej stavby zaznamenalo za posledné desaťročie len dielčie úspechy.

Jednou z príčin je pomerne veľká molekulová váha (66,000) a donedávna aj metodické ťažkosti pri izolácii jednotlivých polypeptidických reťazcov zodpovedajúcich príslušným kritériám čistoty. Druhou príčinou až donedávna boli nejasnosti okolo celkovej štruktúry bielkovinovej molekuly hemoglobínu. Nejasnou sa zdala najmä otázka počtu, väzby a celkového usporiadania polypeptidických reťazcov v molekule hemoglobínov, pri ktorých na rozdiel od iných bielkovín [3] sa zistili pomerne značné diferencie v miestach *n*-terminálnych zvyškov [2]. Rozdiely v stavbe a usporiadaní polypeptidických reťazcov v bielkovinovej molekule hemoglobínu sa zistili v závislosti od druhu individua, z ktorého sa hemoglobín izoloval [2, 4, 5], ako aj v závislosti od ontogenézy [2, 6].

Uvedené zistenia spolu so zisteniami V. M. Ingrama [7] a P. Mäsiara a spolupracovníkov [8, 9] naznačovali, že základný skelet molekuly hemoglobínu je tvorený dvoma typmi pravdepodobne rozvetvených polypeptidických reťazcov. Tento predpoklad sa v poslednom čase experimentálne potvrdil pre ľudský hemoglobín [10, 11].

Úlohou tejto práce bolo objasniť zákonitosti v stavbe bielkovinovej zložky hemoglobínu jedného, druhove človeku veľmi blízko stojaceho individua — opice *Macacus rhesus*.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Materiál

Použili sme hemoglobín izolovaný z erytrocytov opice *Macacus rhesus*.*

Izolácia

Čerstvú krv sme odobrali do roztoku 0,14 M citrátu sodného v pomere 1 : 10. Erytrocyty sme odstredili na odstredivke MSE pri 600 g/15 minút. Zvyšky plazmy sme odstránili

* Erytrocyty nám poskytol Chemický ústav ČSAV.

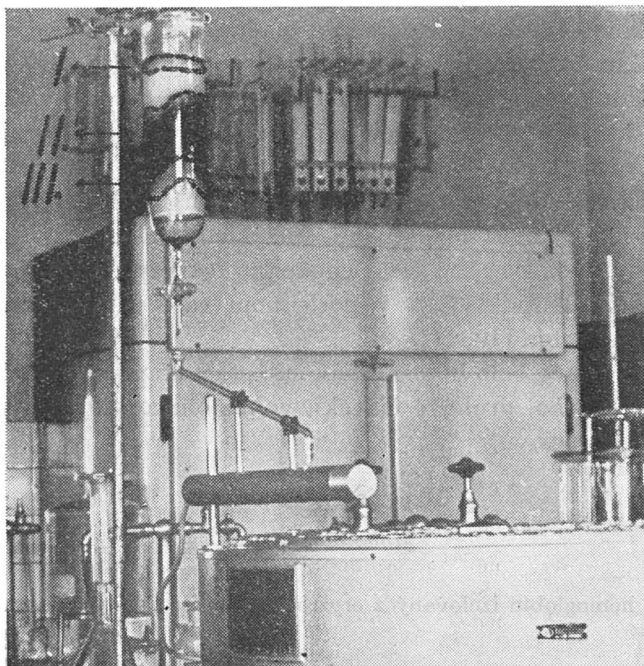
štvornásobným praním v 1 % roztoku NaCl s následným odstredením za vyššie uvedené podmienok. Hemolýzu sme vykonali rozriedením erytrocytov rovnakým objemom destilovanej vody. Takto získaný roztok hemoglobínu sme podrobili precipitácii síranom amónnym. Precipitáciu sme uskutočnili nasycovaním roztoku hemoglobínu tuhým síranom amónnym až do úplného vylúčenia bielkoviny. Precipitovanú bielkovinu sme z roztoku odstránili filtráciou. Filtračný koláč precipitovaného hemoglobínu sa použil ako materiál pre kryštalizáciu.

Kryštalizácia

2 g (počítané na sušinu) filtračného koláča hemoglobínu sme rozpustili v 10 ml destilovanej vody. pH roztoku sme upravili na hodnotu 6,7 s následným nasýtením roztoku tuhým síranom amónnym do nasýtenia 0,6. Takto upravený roztok sme naliali na Petriho misku o priemere 15 cm a nechali stáť v chladničke pri teplote 4 °C. Po desiatich dňoch sa vyzrážali drobné kryštáliky, ktoré sme odsali na Büchnerovom lieviku. Re-kryštalizáciu sme urobili tým istým spôsobom.

Chromatografia hemoglobínu opice na stĺpci karboxymetyl-(CM)-celulózy

1,5 g dvakrát kryštalovaného hemoglobínu sme rozpustili v 10 ml destilovanej vody a naliali do dialyzačnej trubice, ktorú sme ponorili do 0,005 M fosfátového tlmivého roztoku. Dialýzu proti fosfátovému tlmivému roztoku sme uskutočňovali 18 hodín pri teplote 4 °C. Takto získaný ekvilibrovaný roztok hemoglobínu sme v niekoľkých por-



Obr. 1. Chromatogram hemoglobínu opice na stĺpci CM-celulózy.

I — minoritná frakcia ostávajúca na štarte, *II* — majoritná frakcia spracovávaná ďalej, *III* — minoritná frakcia s najrýchlejšou pohyblivosťou na stĺpci — zahodená.

ciách naniesli na stĺpec CM-celulózy pripravenej za podmienok, ktoré opísali E. A. Peterson a spolupracovníci [12]. Chromatografovali sme premývaním stĺpca fosfátovým tlmivým roztokom s postupne sa zvyšujúcou molaritou. Pre chromatografiu sme použili tieto tlmivé roztoky: 1. 0,005 M fosfátový tlmivý roztok o pH 6,5; 2. 0,02 M fosfátový tlmivý roztok o pH 6,5; 3. 0,05 M fosfátový tlmivý roztok o pH 6,5; 4. 0,05 M fosfátový tlmivý roztok o pH 7,5. Rozvíjanie chromatogramu sme sledovali vizuálne a jednotlivé frakcie sme chytali do skúmaviek. Vcelku sme zachytili 74 skúmaviek po 20 ml. Pre ďalšie pokusy sme brali len majoritnú frakciu a obidve minoritné frakcie (obr. 1) sme zahodili.

Odštiepenie hému

Bielkovinová zložka globínu sa získala odštiepením hému metódou podľa M. L. Ansona a A. E. Mirského [13]. 10 % roztok hemoglobínu sa zmiešal s rovnakým objemom 0,1 N-HCl. Vzniknutá zmes bielkoviny a hému sa nakvapkala do 5 násobného objemu acetónu upraveneho koncentrovanou kyselinou soľnou na výslednú koncentráciu 0,01 N-HCl. Za týchto podmienok sa získala zrazenina čiastočne denaturovaného globínu. Globín sa získal odfiltrovaním supernatantu cez Büchnerov lievik a zrazenina sa dosušila opakovaným premývaním acetónom a alkohol—éterom.

Dinitrofenylácia

Substitúciu hemoglobínu dinitrofluórbenzénom (v ďalšom DNFB) sme robili klasickou metódou, ktorú opísal F. Sanger [1]. Do 100 mg globínu sme pridali 0,8 g NaHCO₃. Zmes sme suspendovali v 6 ml destilovanej vody v homogenizátore podľa V. R. Pottera a C. A. Elvehjema [14]. Do suspenzie sme pridali 8 ml 5 % alkoholického roztoku DNFB (dinitrofluórbenzenu) za ustavičného miešania pri laboratórnej teplote po dobu 2 hodín v centrifugačnej skúmavke. Dinitrofenylovanú bielkovinu sme sedimentovali centrifugovaním. Prebytočný DNFB sme po okyslení roztoku 6 N-HCl vytrepali do peroxydu neobsahujúceho éter. Získaný DNP-globín sme vysušili vo vákuu nad H₂SO₄ a NaOH.

Odbúranie N-koncových aminokyselín vo forme PTH-derivátov

Fenyltiohydantoínové deriváty N-koncových aminokyselín sme získali postupom, ktorý opísal P. Edman [15], v modifikácii H. Fraenkela-Conrata [16]. 1 μM (66 mg) globínu sme rozpustili v 10 % amoniaku a v niekoľkých porciách za stáleho sušenia naniesli na prúžok papiera Whatman 1 o rozmeroch 8 × 8 cm. Po dokonalom vysušení papiera v termostate sme na papier obsahujúci bielkovinu aplikovali 500 μl 20 % roztoku (PTC) fenyltioizokyanátu v dioxáne. Nato sme vzorku inkubovali v pyridínovej atmosfére pri teplote 40 °C po dobu 3 hodín. Po trojhodinovej inkubácii sme prebytočný PTC extrahovali postupným vytrepávaním do benzénu a zmesi alkohol—éteru (1 : 1). Získaný preparát sme hydrolyzovali nad parami 6 N-HCl a ľadovej kyseliny octovej.

Hydrolyza

a) Dinitrofenylderiváty opičieho globínu sme hydrolyzovali 6 N-HCl pri teplote 105 °C po dobu 8 hodín pre kvalitatívnu analýzu a 10 N-HCl po dobu 48 hodín pre kvantitatívnu analýzu. Po zriedení hydrolyzačnej zmesi 1 : 1 destilovanou vodou sme dinitrofenylderiváty aminokyselín extrahovali do éteru a butanolu. Éterické extrakty sme odparili prúdom vzduchu a dosušili vo vákuu nad koncentrovanou kyselinou sírovou a tuhým hydroxydom sodným.

b) PTC-deriváty globínu sme hydrolyzovali v exsikátore nad parami ľadovej kyseliny octovej a 6 N-HCl po dobu 12 hodín. Vzniknuté PTH-deriváty aminokyselín sme z pa-

piera extrahovali do éteru zbaveného peroxydov. Po odparení rozpúšťadla sme všetky vzorky vystavili ešte hodinovej hydrolyze 3 N-HCl pri laboratórnej teplote za ustavičného trepania. Po takto vykonanej hydrolyze sme PTH-deriváty opäť extrahovali do éteru. Éter sme odparili prúdom vzduchu a odpadky dosušili vo vákuu nad koncentrovanou kyselinou sírovou a tuhým hydroxydom sodným.

Identifikácia N-koncových aminokyselín

Éterickú a butanolovú frakciu úplného hydrolyzátu dinitrofenylglobínu sme analyzovali dvojrozmernou chromatografiou v systémoch S_1 a S_2 (tab. 1). Alikvotnú časť 10 %

Tabuľka 1
Rozpúšťadlové systémy použité pre papierovú chromatografiu

Systém	Zloženie	Literatúra
A	heptán—pyridín (7 : 3)	[17]
C	heptán— <i>n</i> -butanol—kyselina mravčia (4 : 4 : 2)	[17]
S_1	terciárny butanol—izoamylalko- hol — 3 % hydroxyd amónny (1 : 1 : 2)	[18]
S_2	1,5 M fosfát o pH 6,0	[18]
S_3	<i>n</i> -butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 5)	

odparku éterickej frakcie sme rozpustili v 200 μ l acetónu a naniesli do rohu chromatografického papiera Whatman 1. Chromatogram sme vyvíjali 48 hodín v systéme S_1 a 8 hodín kolmým smerom v systéme S_2 . PTH-deriváty sme identifikovali jednorozmernou chromatografiou v systéme A a C podľa J. Sjöquista [17].

Kvantitatívne stanovenie N-koncových aminokyselín

N-koncové zvyšky aminokyselín opičieho globínu sme kvantitatívne stanovili zmeraním extinkčných hodnôt ich dinitrofenylderivátov. Dvakrát 0,2 μ M (13,2 mg) globínu sme podrobili dinitrofenylácii za vyššie opísaných podmienok. K takto pripraveným preparátom DNP-globínu sme pridali 1 ml 10 N-HCl a v zatavenej trubici hydrolyzovali 48 hodín pri teplote 105 °C. Hydrolyzáat sme zriedili destilovanou vodou 1 : 1 a roztrepali medzi éter a vodu. Na analýzu sme brali éterické frakcie oboch hydrolyzáatov. Po odparení éteru prúdom vzduchu sme obidve vzorky naniesli na chromatografický papier Whatman 3 a chromatografovali dvojrozmerné v systéme S_1 a S_2 . Škrvny po ohraničení v ultrafialovom svetle ortuťovej výbojky sme z papiera vystrihli a eluovali do 6 ml 1 % roztoku amoniaku. Paralelne s tým sme hydrolyzovali známe množstvo kryštalického DNP-valínu zodpovedajúce 0,85 μ M spolu s 0,2 μ M globínu v dvoch paralelných pokusoch. Obidva hydrolyzáty sme podrobili tej istej procedúre ako hydrolyzáty DNP-globínu, výtane chromatografie za rovnakých podmienok. Škrvny sme po ohraničení vystrihli a eluovali do 6 ml 1 % roztoku amoniaku. Extinkčné hodnoty všetkých eluátov sme stanovili na spektrofotometri SF-4 pri vlnovej dĺžke 365 m μ . Získané množstvo DNP-valínu sme vypočítali podľa vzorca

$$\mu M = D \cdot M,$$

pričom

D = optická hustota v absorpčnom maxime,

M = objemový faktor.

Zistené hodnoty sme násobili korekčným faktorom strát vypočítaným zo zistených hodnôt známeho množstva hydrolyzovaného DNP-valínu. Výsledky sú zhrnuté v tab. 3.

Kvantitatívne stanovenie PTH-derivátov valínu

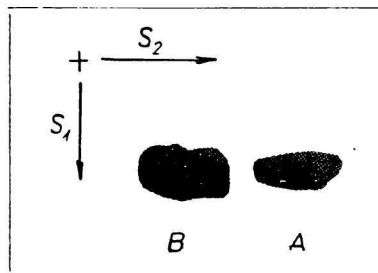
PTH-deriváty N-koncových aminokyselín globínu sme kvantitatívne stanovili metódou H. Fraenkela-Conrata [16] nami upravovanou pre kvantitatívne účely. Stanovenie sme vykonali v typickom pokuse: Na 8 prúžkov predtým do konštantnej váhy vysušeného papiera Whatman 1 o rozmeroch 8×8 cm sme naniesli konštantné množstvo zodpovedajúce približne $0,1 \mu M$ bielkoviny rozpustenej v amoniaku. Po vysušení papiera obsahujúceho bielkovinu do konštantnej váhy sme na 6 prúžkov naniesli $500 \mu l$ 20 % roztoku PTC v dioxáne a nechali reagovať za vyššie opísaných podmienok. K dvom prúžkom sme pridali konštantné množstvo syntetického PTH-valínu v acetóne a nechali vysušiť. Po skončení reakcie sme prebytočný PTC zo šiestich prúžkov vytrepali do benzénu a zmesi alkohol—éteru (1 : 1) — celkove dvakrát 15 ml benzénu a dvakrát 15 ml alkohol—éteru. Po vysušení sme každý z ôsmich prúžkov rozstrihali a v kúskoch vpravili do 50 ml zabrušených valcov. K tomu sme pridali 10 ml 3 N-HCl a za ustavičného miešania hydrolyzovali tri hodiny pri laboratórnej teplote. PTH-deriváty sme vytrepali z roztoku dvakrát pätnástimi ml etylacetátu. Po odparení etylacetátu sme vzorky rozpustili v 60 ml absolútneho etanolu a merali na spektrofotometri SF-4 pri vlnovej dĺžke $265 m\mu$. Kvantitatívne údaje PTH-valínu sme získali výpočtom zo vzorca

$$Q = \frac{V \cdot d}{16},$$

pričom sme brali do úvahy, že molárny extinkčný koeficient PTH-valínu je 16 000, Q = množstvo PTH-valínu v mikromóloch, d = optická hustota a V = objem v ml. Zistené hodnoty sme korigovali faktorom vypočítaným z pomeru pridaného a zisteného množstva PTH-valínu v kontrolných pokusoch. Výsledky sú zhrnuté v tab. 4.

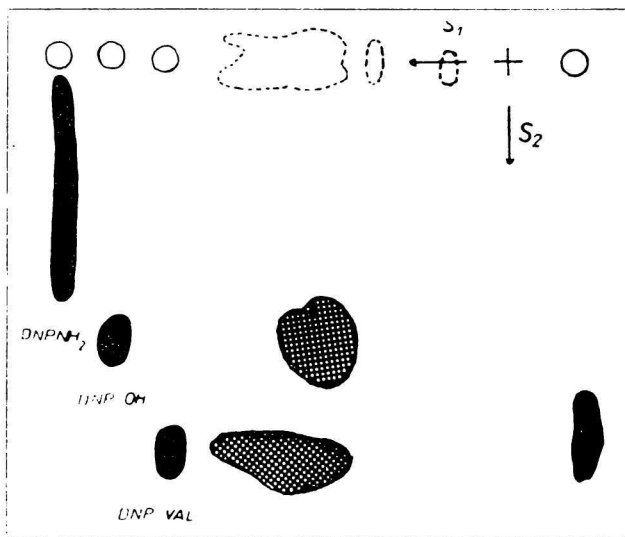
Výsledky a diskusia

Výsledky kvalitatívnej analýzy dinitrofenylderivátov N-koncových aminokyselín sú znázornené na obr. 2. Ako vidieť, pri 8 hodinovej hydrolyze 6 N-HCl pri $105^\circ C$ sme v éterickej frakcii identifikovali látky: A lokalizovanú v ob-



Obr. 2. Chromatogram éterickej frakcie 8 hodinového kyslého hydrolyzáta dinitrofenylglobínu.

lasti dinitrofenylleucínu, *B* s chromatografickým chovaním ako dinitrofenylvalín. Hydrolýzou 10 *N*-HCl pri 105 °C po dobu 48 hodín látka *A* zmizne a ostáva len látka *B* s chromatografickým chovaním ako dinitrofenylvalín (obr. 3). Chromatografickou analýzou butanolovej frakcie sme identifikovali jedine ϵ -dinitrofenyllyzín. Skutočnosť, že látka *A* sa za drastickéjších podmienok hydrolýzy stráca, viedla nás k predpokladu, že je to dinitrofenylovaný derivát nejakého ťažko hydrolyzovateľného koncového peptidu. Preto sme túto látku preparatívnu jednorozmernou chromatografiou izolovali a podrobili opäť hydrolýze 6 *N*-HCl po dobu 24 hodín. Hydrolyzátny sme za vyššie opísaných podmienok roztrepali medzi éter a vodu a odparky obidvoch fáz (éterickej a vodnej) sme analyzovali chromatograficky. Chromatografickou analýzou éterickej fázy v systémoch *S*₁ a *S*₂ sme zistili dinitrofenylvalín a chromatografickou analýzou odparku vodnej fázy jednorozmernou chromatografiou



Obr. 3. Chromatogram éterickej frakcie kyslého hydrolyzátnu dinitrofenylglobínu. Hydrolýza sa robila 10 *N*-HCl pri 105 °C po dobu 48 hodín.

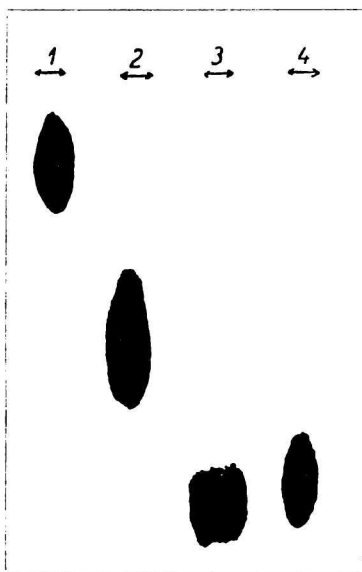
v systéme *S*₃ leucín. Toto nasvedčovalo, že jedinou koncovou aminokyselinou bielkovinovej zložky opičieho globínu je valín, ktorý viazaný na leucín vytvára ťažko hydrolyzovateľnú sekvenciu valyl-leucyl. Keďže zistená sekvencia reprezentuje v súčasnej dobe aminokoncový sled α -reťazca [10, 11] ľudského hemoglobínu, pokúsili sme sa tento sled potvrdiť a zistiť sekvenciu, ktorá zodpovedá *n*-terminálnemu zakončeniu β -reťazca. Na potvrdenie uvedených skutočností sme použili Fraenkel—Conratom [16] modifikovanú metódu postupného odbúrania peptidov od aminového konca. Výsledky získané touto metódou sú zhrnuté na obr. 4 a v tab. 2.

Aj pri odbúrání koncových aminokyselín za podmienok, ktoré opísal H. Fraenkel—Conrat [16], vyskytuje sa vedľa hlavnej škvrny PTH-valínu

Tabuľka 2
Postupné odbúrание hemoglobínu [17]

Stupeň	Analýza v systéme	Identifikovaný PTH-derivát	Abs. maximum
I	A →	PTH—Val	265 m μ
	C →	PTH—Val	265 m μ
II	A →	PTH—Leu	265 m μ
	C →	PTH—Leu	265 m μ
IIa	A →	PTH—His	265 m μ
	C →	PTH—His	265 m μ
III	A →	PTH—Glu-NH ₂	265 m μ
		PTH—Leu	265 m μ
	C →	PTH—Glu-NH ₂	265 m μ
		PTH—Leu	265 m μ

menšia škvrna s R_F zodpovedajúcim oblasti medzi PTH-leucínom a PTH-valínom. Po jednoodinovej hydrolýze 3 N-HCl sa táto škvrna stráca (obr. 4)



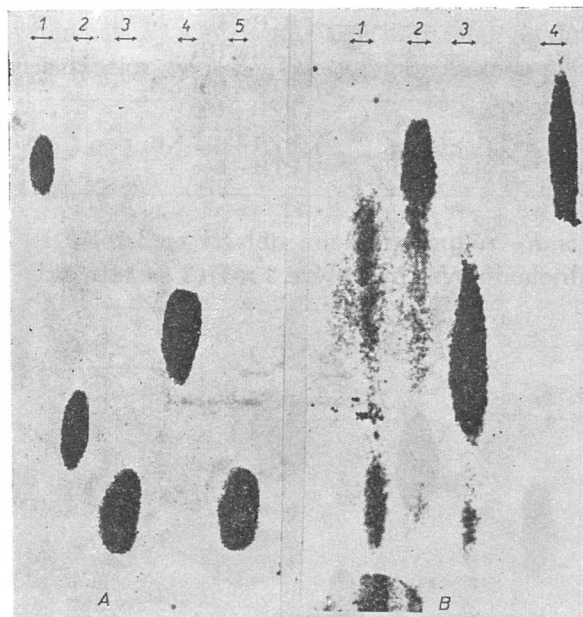
Obr. 4. Chromatogram fenyliothidantoinového derivátu aminokyseliny získanej v I. stupni odbúrání polypeptidických reťazcov hemoglobínu opice.

Čísla 1, 2 a 4 značia syntetické PTH-deriváty chromatografované ako kontroly.

1 — PTH-glycín, 2 — PTH-metionín, 4 — PTH-valín. Pod č. 3 bol chromatografovaný PTH-derivát izolovaný v I. stupni postupnej degradácie hemoglobínu opice. Fotografie boli zhotovené kontaktnou fotografiou za použitia dokumentačnej kopírky.

a ostáva čistá škvrna PTH-valínu. Vo vodnej fáze nachádzame čistý leucín. Fenylothiohydantoiny aminokyselín identifikované chromatograficky boli potvrdené aj analýzou voľných aminokyselín získaných totálnou hydrolýzou PTH-derivátov 6 N-HCl pri 150 °C po dobu 18 hodín.

Tieto skutočnosti svedčia o tom, že jedinou koncovou aminokyselinou hemoglobínu opice je valín, a potvrdzujú existenciu sekvencie valyl-leucyl ako zakončenia α -reťazca hemoglobínu opice *Macacus rhesus*. Na objasnenie sekvencií aminokonca ostatných reťazcov sme študovanú bielkovinu podrobili ďalšiemu odbúraniu. Tento spôsob sa ukázal nádejším najmä po zistení, že valín je jedinou koncovou aminokyselinou. Ako vyplýva z tab. 2 a obr. 5,



Obr. 5. Chromatogram PTH-derivátov získaných v II. stupni postupného odbúrania hemoglobínu opice.

Časť A. Chromatogram PTH-derivátu extrahovaného pred neutralizáciou. Chromatografovalo sa v systéme heptán—pyridín (7 : 3). Čísla 1, 2, 4 a 5 označujú referenčné syntetické PTH-aminokyseliny.

1 — PTH-glycín, 2 — PTH-valín, 3 — vzorka, 4 — PTH-metionín, 5 — PTH-leucín.

Časť B. Chromatografia PTH-derivátu II. stupňa degradácie extrahovaného po neutralizácii nad parami amoniaku. Chromatografovalo sa v systéme heptán—*n*-butanol—kyselina mravčia (4 : 4 : 2).

1 — PTH-leucín, 2 — vzorka, 3 — PTH-glu-NH₂, 4 — PTH-histidín.

v druhom stupni postupnej degradácie globínu fenylothiohydantoinovou metódou sme zistili PTH-leucín a po neutralizácii papierika parami hydroxydu amónneho sa nám podarilo izolovať PTH-histidín. V III. stupni sme izolovali a identifikovali opäť PTH-leucín a PTH-glutamín.

Na základe týchto výsledkov uzatvárame, že aminové zakončenie polypeptidických reťazcov hemoglobínu opice je tvorené sekvenciami valyl-leucyl a valyl-histidyl. PTH-aminokyseliny zistené v treťom stupni degradácie aminového konca polypeptidických reťazcov nemožno jednoznačne zaradiť ani k jednej z uvedených sekvencií. Ak možno na základe celkovej podobnosti N-terminálnych aminokyselín opičieho a ľudského hemoglobínu usudzovať na podobnosti aj v niektorých sledoch, bolo by možné uvažovať o sekvencii valyl-leucyl-glutaminyl pre α -zoskupenie a valyl-histidyl-leucyl pre β -zoskupenie polypeptidických reťazcov. Vyjasnenie stanoviska k tejto otázke, ako aj širšie štúdium okolia polypeptidických reťazcov bude úlohou ďalšej práce. Význam analýzy tretieho stupňa postupnej degradácie bol v tom, že opätovné zistenie dvoch aminokyselín potvrdilo existenciu dvoch skupín polypeptidických reťazcov v molekule opičieho hemoglobínu. Keďže naše zistenia pri hemoglobíne opice sa v hrubých črtách zhodujú s výsledkami štúdia ľudského hemoglobínu, ktoré vykonali H. S. Rhinesmith a spolupracovníci [11, 12], vyvstala otázka celkového počtu polypeptidických reťazcov. Kvantitatívne stanovenie dinitrofenylderivátov a fenyltiohydantoínov valínu je

Tabuľka 3
Kvantitatívne stanovenie N-koncového valínu
opičieho hemoglobínu dinitrofenylačnou technikou

Pokus č.	<i>D</i>	<i>M</i> 6	Korekcia na váhu	<i>DM</i>	Korekčný faktor strát	Zistená hodnota na 6,6 mg globínu
1 _k	0,225	0,384	1,17	0,103	9,7	0,51 μM
1 _v	0,280	0,384	—	0,107	9,7	
2 _k	0,220	0,384	1,17	0,098	10,2	0,54 μM
2 _v	0,275	0,384	—	0,106	10,2	

zhrnuté v tab. 3 a 4. Ako vyplýva z tab. 3, dinitrofenylačnou technikou sme zistili v priemere 5,2 μM DNP-valínu na 1 μM DNP-globínu, čo svedčí o existencii 5 zvyškov N-koncového valínu na 1 molekulu globínu. Naše výsledky dosiahnuté DNP-technikou sa kryjú s výsledkami, ktoré získali R. R. Porter a F. Sanger [2] pre ľudský hemoglobín, no sú v určitom rozpore s výsledkami, ktoré v poslednom čase získali H. S. Rhinesmith a spolupracovníci [11, 12]. Táto skutočnosť nás viedla k snahe preveriť tieto výsledky inou technikou. Fenyltiohydantoínová metóda v našej úprave vyhovuje vcelku požiadavkám kvantitatívnej práce. Výsledky dosiahnuté touto technikou (tab. 4) v zásade potvrdzujú zistenia získané dinitrofenylačnou technikou. Aj keď treba brať do úvahy, že obidve použité metódy pri práci v mikromerítke sú zaťažené určitou chybou, na základe získaných poznatkov

možno usudzovať na prítomnosť 4—5 aminokoncových valínov v molekule hemoglobínu opice.

V prípade, že nové oddelovacie techniky neumožnia v budúcnosti korigovať molekulovú váhu hemoglobínu, možno v molekule hemoglobínu opice pred-

Tabuľka 4
Kvantitatívne stanovenie N-koncového valínu
opičieho hemoglobínu fenyltiohydantoínovou metódou

Vzor- ka	Váha	$\frac{V \cdot d}{16}$	Korekčný faktor strát	Upravovaná zistená hodnota v μM	Hodnota upravená na 6,6 mg globínu
O ₁	8,5	0,319	1,9	0,60	0,47 μM
O ₂	7,1	0,312	1,9	0,59	0,42 μM
O ₃	7,6	0,340	1,9	0,64	0,48 μM
O ₄	7,6	0,340	1,9	0,64	0,48 μM
O ₅	7,4	0,312	1,9	0,59	0,43 μM
O ₆	8,2	0,312	1,9	0,59	0,48 μM

pokladať existenciu štyroch, prípadne piatich polypeptidických reťazcov. Výsledky získané postupnou degradáciou však jednoznačne ukazujú na dva typy reťazcov: reťazce typu α s N-terminálnou sekvenciou valyl-leucyl a reťazce typu β s N-terminálnou sekvenciou valyl-histidyl.

Vyjasnenie otázky prinesie izolácia obidvoch skupín reťazcov v prípade, že ide o podobnú stavbu molekuly ako pri ľudskom hemoglobíne [11, 12]. Riešenie tejto otázky, ako aj otázok súvisiacich s objasnením chemickej stavby ďalších častí polypeptidických reťazcov bielkoviny hemoglobínu je úlohou našej ďalšej práce.

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

Súhrn

Preštudovala sa otázka N-terminálneho zakončenia bielkovinovej zložky hemoglobínu opice *Macacus rhesus*. Dinitrofenylačnou technikou sa zistilo, že jedinou N-koncovou aminokyselinou študovaného hemoglobínu je valín. Tento výsledok sa potvrdil aj metódou postupnej degradácie peptidov pomocou tvorby fenyltiohydantoínov.

Kvantitatívnou analýzou DNP-technikou sa zistilo 5 N-koncových valínov a pre kvantitatívne účely prispôsobenou PTH-metódou priemer 4,6 zvyškov valínu na 1 molekulu hemoglobínu opice *Macacus rhesus*, čo svedčí o existencii 4—5 polypeptidických reťazcov v molekule študovanej bielkoviny.

Z kyslého hydrolyzátu DNP-globínu sa izolovalo zoskupenie valyl-leucyl, ktoré predstavuje N-terminálnu sekvenciu jednej skupiny reťazcov opičieho

hemoglobínu. Existencia tejto sekvencie sa potvrdila aj technikou postupného odbúravania polypeptidického reťazca.

Postupnou degradáciou polypeptidického reťazca hemoglobínu opice PTH-metódou sa zistilo, že N-terminálnu sekvenciu druhej skupiny reťazcov predstavuje zoskupenie valyl-histidyl.

V treťom stupni postupnej degradácie sa identifikovali opäť len dve aminokyseliny: PTH-leucín a PTH-glutamín. Z toho uzatvárame na prítomnosť dvoch typov polypeptidických reťazcov: α reprezentovaný N-terminálnou sekvenciou valyl-leucyl (prípadne val. leu. glu-NH₂) a β reprezentovaný N-terminálnou sekvenciou valyl-histidyl (prípadne val. his. leu).

Opisuje sa modifikácia PTH-metódy pre kvantitatívne účely.

О ГЕМОГЛОБИНЕ (IV) ЗАМЕТКА К ПОЗНАНИЮ БЕЛКОВОЙ ЧАСТИ ГЕМОГЛОБИНА ОБЕЗЬЯНЫ *MACACUS RHEBUS*

ПАВЕЛ МЕСНАР

Биохимический институт Медицинского факультета
Университета имени П. П. Шафарика в Кошицах

Выводы

Автор изучал вопросы N-терминального окончания белковой части гемоглобина обезьяны *Macacus rhesus*. Динитрофениловой техникой было обнаружено, что единственной N-концевой аминокислотой изучаемого гемоглобина является валин. Этот результат был подтвержден и методом постепенной деградации при помощи возникновения фенилтиогидантоинов.

Количественным анализом DNP техникой автор нашел 5 N-концевых валинов и для количественных целей приспособленным PTH-методом обнаружил в среднем 4,6 остатков валина на 1 молекулу гемоглобина обезьяны *Macacus rhesus*, что свидетельствует о существовании 4—5 полипептидических цепей в молекуле изучаемого белка.

Из кислого гидролизата DNP-глобина автор изолировал группу валил-лейцил, которая представляет N-терминальную секвенцию одной группы цепей обезьяне гемоглобина. Существование этой секвенции автор подтвердил и техникой постепенной деградации полипептидической цепи.

Постепенной деградацией полипептидической цепи гемоглобина обезьяны PTH-методом автор обнаружил, что N-терминальную секвенцию второй группы цепей представляет группировка валил-гистидил.

В третьей степени постепенной деградации автор идентифицировал опять только две аминокислоты а то PTH-лейцин и PTH-глутамин. На основании этого автор судит о присутствии двух типов полипептидических цепей: α репрезентированную N-терминальной секвенцией валил-лейцил (или же вал. лей. глю-NH₂) и β репрезентированную N-терминальной секвенцией валил-гистидил (или же вал. гис. лей).

В работе описывается модификация PTH-метода для количественных целей.

Поступило в редакцию 2. 4. 1960 г.

ON HAEMOGLOBIN (IV)
A CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF THE STRUCTURE OF
PROTEIN COMPONENT OF MONKEY *MACACUS RHESUS*
HAEMOGLOBIN

PAVEL MÄSIAR

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

Summary

N-terminal sequences of protein component of monkey haemoglobin were studied by DNP and PTH methods. Only valine in the form of DNP and PTH-derivates was found as N-terminal amino acid of monkey haemoglobin.

Five N-terminal valine-residues were found by quantitative analysis of DNP-derivates and 4,6 valine residues on an average by quantitative analysis of PTH-derivates of N-terminal amino acids of monkey haemoglobin. On the ground of these results it has to be 4 and 5 polypeptidic chains in the molecule of monkey haemoglobin respectively.

A sequence of DNP valyl. leucyl which represents the N-terminal sequence of one group of polypeptidic chains was isolated from acid hydrolysate of DNP-monkey haemoglobin.

A sequence of valyl. hystidyl was found by PTH stepwise degradation procedure as N-terminal sequence of a second group of polypeptidic chains of monkey haemoglobin.

PTH-leucine and PTH-glutamine was identified in the third step of stepwise degradation procedure of protein molecule of haemoglobin. These results show on the existence of two kind of polypeptidic chains in monkey haemoglobin: α chains with N-terminal sequences valyl. leucyl (valyl. leucyl. glutaminyl respectively) and β chains with N-terminal sequences valyl. histidyl (valyl-histidyl-leucyl respectively).

A modification of PTH-method for the quantitative purpose was described.

Received April 2, 1960

LITERATÚRA

1. Sanger F., *Biochem. J.* 39, 507 (1945). — 2. Porter R. R., Sanger F., *Biochem. J.* 42, 287 (1948). — 3. Šorm F., Keil B., Holeyšovský V., Knesslová V., Kostka V., Mäsiar P., Meloun B., Mikeš O., Tomášek V., Vaněček J., *Collection* 22, 1310 (1957). — 4. Ozawa H., Satake K., *J. Biochem. (Japan)* 42, 641 (1955). — 5. Devényi T., *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 9, 321 (1956). — 6. Huisman T. H. J., *Clin. Chim. Acta* 3, 201 (1958). — 7. Ingram V. M., *Nature* 178, 792 (1956). — 8. Mäsiar P., Smolnický T., *Collection* 24, 2790 (1959). — 9. Mäsiar P., Jurovčík M., *Chem. zvesti* 13, 58 (1959). — 10. Rhinesmith H. S., Schroeder W. A., Pauling L., *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4682 (1957).
11. Rhinesmith H. S., Schroeder W. A., Martin N., *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3358 (1958). — 12. Peterson E. A., Sober H. A., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 751 (1956). — 13. Anson M. L., Mirski A. E., *J. Gen. Physiol.* 14, 603 (1930). — 14. Potter V. R., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.* 114, 495 (1946). — 15. Edman P., *Acta Chem. Scand.* 4, 283 (1950). — 16. Fraenkel-Conrat H., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3606 (1954). — 17.

Sjöquist J., Acta Chem. Scand. 7, 447 (1953). — 18. Mäsiar P., Chem. zvesti 12, 713 (1958).

Do redakcie došlo 2. 4. 1960

Adresa autora:

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