

Sikérfehérjék C-terminális aminosavainak vizsgálata

I. A gliadin C-terminális aminosavainak vizsgálata hidrazinolízissel

NEDELKOVITS JÁNOS és WÖLLER LÁSZLÓ

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémia Tanszék

Érkezett: 1970. július 17.

A fehérjék végcsoportjait képező aminosavak meghatározása a fehérje-szerkezet-kutatás egyik fontos részét képezi. Azonosításuk kisebb molekulák esetében felvilágosítást nyújthat a szekvenciára, nagymolekulasúlyú fehérjék esetében a szekvencia meghatározásának fontos lépését jelenti. A végcsoportok mennyiségi viszonyainak ismerete módot nyújt arra, hogy következtessünk a fehérjét alkotó polipeptidláncok számára, valamint természetére.

A fehérje molekulában mindig található szabad aminocsoportot és szabad karboxilcsoportot tartalmazó láncvégi aminosav rész. Ezek szokásos megjelölése: N-terminális és C-terminális aminosav. A terminálisok analizésére sok módszer ismeretes. Funkcionális szempontból azonban csak két eljárást különböztetünk meg: a tisztán kémiai reakciókon alapuló meghatározásokat és a specifikus enzimek segítségével történő lebontásokat.

Általános érvényű és jól, biztonságosan alkalmazható módszerek elsősorban az N-terminálisok meghatározására ismeretesek. Ezekről a sikérfehérjék vonatkozásában több közlemény (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) ad tájékoztatást.

Bármilyen jelentős is a C-terminális, mint a polipeptidlánc jól definiált szerkezeti részlete, módszertani szempontból meghatározása messze elmarad az N-terminálisokhoz viszonyítva, nincs átfogó általános és minden igényt kielégítő metodika. A gyakorlatban elterjedtebb módszerek: a Tiohidantoinos, hidrazinolízis, karboxipeptidázos, továbbá a *Bergman-Zervas* lebontás és a LiAlH_4 -es redukció. A felsoroltak közül főleg az első három terjedt el a gyakorlatban. Mi mindezekkel a módszerekkel végeztük a vizsgálatokat, mivel az általánosan elterjedt felfogás, hogy a C-végcsoportok meghatározásánál több egymástól független eljárást érdemes és szükséges alkalmazni. Így a sikérfehérjére vonatkozó vizsgálatainknál a biztonságos eredmények elérése végett együttesen alkalmaztuk a hidrazinolízises, tiohidantoinos eljárást és a karboxipeptidázos lebontást. Jelen értekezésben a hidrazinolízissel végzett C-terminális meghatározásainkról számolunk be.

A sikérfehérjék C-terminális csoportjairól nagyon kevés adat áll rendelkezésre. *Frejman* és *tsai* (17) szovjet búzák gliadinjainál glutaminsav, aszparaginsav és cisztein C-terminálisokat mutatott ki. Mennyiségi vizsgálatokat nem végeztek.

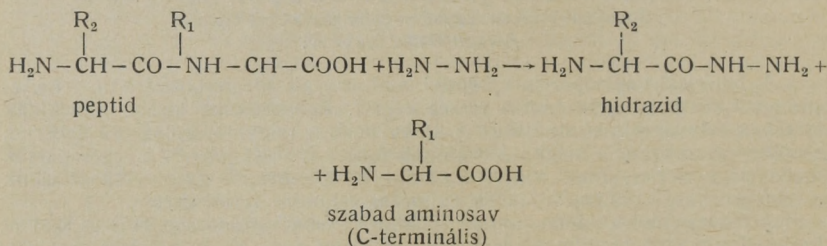
Néhány módszertani kérdés

Munkánkat a rendelkezésre álló szakirodalomban található, más fehérjék vizsgálatára leírt módszerekkel kezdtük. Első lépésként az egyes eljárásokat ismert anyagokkal (aminosavak, peptidek) végeztük. Ennek során több módszertani probléma merült fel mind az egyes reakciók kivitelezésénél, mind a keletkezett termékek elkülönítésénél és kimutatásánál. Ezek megoldásának módjait kidolgoztuk és annak ellenére, hogy minden zavaró körülményt nem lehe-

tett kiküszöbölni, ill. okait tisztázni, céljainknak megfelelő eljárásokat alakítottunk ki.

Peptidek és fehérjék C-terminális csoportjainak meghatározására *Akabori* és *mtsai* (9) vezették be a hidrazinolízist. Ezen eljárás során érdekes reakció játszódik le: a hidrazin hatására minden peptidkötés felszakad és közben a CO-csoportokon savhidrazidok keletkeznek. A láncvégi szabad karboxilcsoportokon ez a reakció nem megy végbe és így a C-terminális aminosavak szabad állapotban maradnak.

A reakció vázlatja a következő



A keletkezett hidrazidok benzaldehiddel, *Schiff*-bázis jellegű kondenzációs termékeké alakíthatók át, amelyek nehezen oldható vegyületek, így könnyen eltávolíthatók, és oldatban csupán a C-terminális aminosavak maradnak. A hidrazinolízis kivitelezésénél több tényezőt kell figyelembe venni, és az egyes vizsgálati körülményeket pontosan be kell tartani, mivel csak így juthatunk megbízható kvantitatív eredményekhez. Adott fehérjéhez meghatározott optimális hidrazin felesleg és megszabott reakcióidő szükséges. Rövidebb reakcióidő esetén előfordul, hogy di- és tripeptidek hasadnak le és ezeket határozzuk meg C-terminálisként. Nagy hidrazin felesleg és túl hosszú reakcióidő esetén bizonyos veszteségek lépnek fel. Erre vonatkozóan *Philips* (10) végzett vizsgálatokat néhány ismert aminosavval és megállapította, hogy az alanin 44%-a, a glicin 20%-a és a lizin 59%-a elvész a folyamat alatt.

Az aminosavak legnagyobb része aránylag stabilis marad a hidrazinolízis során és 0,5–0,85 ekv/mol kitermeléssel állíthatók elő hidrazidjaik. A glutaminsavnál és aszparaginsavnál a hozam kisebb és esetenként változó (0,2–0,8 ekv/mol). A hidrazinolízis során a kéntartalmú aminosavak gyakorlatilag teljesen elbomlanak, így a cisztin és a cisztin nem mutathatók ki. Egyes esetekben megfigyelték, hogy a metionin stabilis szulfoxiddá alakult át, az arginin pedig deguanileződik és ornitin képződik.

Több aminosav hidrazidja könnyen bomlik és ez okozhatja, hogy tévesen végcsoportnak mutatható ki. Ez elsősorban a glicin, szerin és treonin esetében áll fenn. Ezért lényeges, hogy a reakció végeztével a hidrazin feleslegét minél előbb eltávolítsuk.

A felsorolt nehézségek és hiányosságok ellenére a hidrazinolízises eljárás alkalmas a C-terminális meghatározására. A módszer teljesítőképességének határain belül egyértelmű eredményeket ad, amelyek jól reprodukálhatók.

A vizsgálati anyag előállítása

A vizsgálatainkhoz alkohololdható sikkéfehérje (gliadin) frakciót állítottunk elő. A sikért BL 112 jelzésű petroléterrel zsirtalanított búzalisztból 3%-os NaCl-os mosás után nyertük. A nedves sikért *Mc Donald* (11) eljárása szerint

dolgoztuk fel. Négyszeres mennyiségű 42%-os i-propilalkoholban diszpergáltuk, 24 órai állás után centrifugáltuk, és az oldat tisztájából hígítással nyertük a gliadint.

Az így előállított fehérjefrakció fehérjetartalma 91,5%-os volt és 7,24% nedvességet tartalmazott.

Vizsgálati módszerek

[A kiindulási aminosav-összetétel meghatározása

A kiindulási fehérjefrakció jellemzésére meghatároztuk annak aminosav összetételét és az egyes aminosavak mennyiségi viszonyait is. A meghatározáshoz szükséges hidrolízist *Mahowald* és mtsai útmutatása alapján végeztük (12) 6 n HCl-el. A kéntartalmú aminosavak meghatározásánál perhangyasavas oxidációt végeztünk (13) és a ciszteint, cisztint ciszteinsavként, a metionint pedig metioninszulfoxidként határoztuk meg. A hidrolízisnél figyelembe vettük, hogy a fehérjefrakcióban a peptidkötések kötési energiája igen különböző. Ezért a hidrolízis idejét optimalizáltuk, illetve a különböző hidrolízisekből – amelyek 24, 48, 72 órák voltak – nulla időre extrapolálva a polipeptidláncok eredeti aminosav összetételét határoztuk meg. A ciszteinsavat ciszteinre számítottuk át. A hidrolizátumot vákuum-filmbepárlóban (50 °C és N₂-áram) szárazra pároltuk és 2,2 pH-jú pufferben oldottuk.

A gliadin hidrolízisénel főleg a hidroxi-aminosavak bomlását észleltük, amely a szerinnél jelentősebb volt – minthogy 8–10% – mint a treoninnál. A prolinnál csak kismértékű bomlás figyelhető meg, ami az aszparaginsav katalitikus hatására vezethető vissza. Ugyancsak kismértékű bomlást szenved az arginin, amire a kromatogramban megtalálható ornitin utal.

Az aminosavak elválasztását és meghatározását „BC 200 BIOCAL” aminosav analízátorral végeztük. Az elválasztást egyoszlopos eljárással hajtottuk végre *Aminex A6*-os jelzésű ioncserélő gyantán, két puffer váltással.

A puffer: 0,2 Na⁺ ionerősségű, 3,25 pH-jú Na-citrát

B puffer: 0,8 Na⁺ ionerősségű, 4,29 pH-jú Na-citrát

A meghatározáshoz *Thomas* és mtsai (14) által kidolgozott módosított ninhidrin reagenst alkalmaztunk.

Az aminosav meghatározás eredményeit az 1. táblázatban tüntettük fel.

Hidrazinolízis

A hidrazinolízist *Fraenkel–Conrat* (15) leírása szerint végeztük.

1 g száraz, finoman porított kiindulási fehérjefrakcióhoz 100 ml vízmentes hidrazint (16) adtunk és 80%-os vízfürdőn felmelegítettük. Ezt követően az elegyből N₂ gázárammal kiűztük a levegőt, és az ampulla leforrasztása után 105 °C-on 12 óráig végeztük a reakciót. A reakcióidő leteltével viszkózus sárgás folyadékot kaptunk, melyet vákuumfilmbepárlóban N₂ gázáramban 30 °C-on szárazra pároltunk. Lényeges, hogy a feleslegben levő hidrazint minél hamarabb eltávolítsuk, mivel az a szabad C-terminálisokban veszteséget okoz. A hidrazin feleslegének eltávolítására általában a kénsav feletti huzamos tárolást alkalmazzák. Tapasztalataink szerint, ha vákuumexikkátorban kénsav felett távolítjuk el a felesleges reagenst, a hosszú állás miatt a hidrazidok jelentős bomlása következik be és a felszabaduló aminosavakat, mint végsoportokat mutathatjuk ki. A száraz maradékot kétszer desztillált vízzel (6–8 ml) felvettük és az előbbiekkal azonos módon bepároltuk.

Gliadin minta aminosavösszetétele

Hidr. idő	24 óra			48 óra			72 óra			Extrapolált érték	
	μmol	mg %	AS/100 AS	μmol	mg %	AS/100 AS	μmol	mg %	AS/100 AS	μmol	AS/100 AS
Asparagin sav	0,0154	3,428	2,73	0,0514	3,392	2,70	0,0405	3,396	2,77	3,438	2,77
Threonin	0,0482	2,868	2,28	0,0494	2,939	2,34	0,0425	2,630	2,15	2,94	2,34
Szerin	0,1022	5,366	4,28	0,0874	4,588	3,65	0,0967	4,836	3,95	5,37	4,28
Glutaminsav	0,722	53,067	42,25	0,7413	54,435	44,33	0,0762	54,66	44,66	54,63	44,66
Prolin	0,3327	19,13	15,23	0,3143	18,072	14,73	0,3743	17,015	13,90	19,13	15,23
Glicin	0,0067	2,847	2,27	0,0765	2,87	2,37	0,0706	2,878	2,35	2,87	2,37
Alanin	0,0688	1,901	1,51	—	1,96	1,60	0,0552	2,077	1,71	2,077	1,71
Valin	0,0823	4,815	3,84	0,0769	4,498	3,66	0,0845	5,273	4,80	5,27	4,30
Metionin	0,0252	1,877	1,50	—	—	—	0,0205	2,535	2,06	2,54	2,06
Izoleucin	0,0754	4,949	3,94	0,0904	5,921	4,82	0,0748	5,65	4,61	5,92	4,82
Leucin	0,1564	10,244	8,15	0,1492	9,773	7,96	0,1454	10,87	8,88	10,87	8,88
Tirozin	0,0332	3,06	2,44	0,0221	2,000	1,63	0,0135	1,335	1,09	3,06	2,44
Fenilalanin	0,0819	6,757	5,38	0,0783	6,459	5,26	0,081	7,71	6,30	7,71	6,30
Lizin	0,0100	0,73	0,58	0,0087	0,635	0,52	0,0077	0,60	0,49	0,73	0,58
Hisztidin	0,027	2,092	1,67	0,022	1,720	1,40	0,019	1,541	1,25	2,09	1,67
Arginin	0,0284	2,471	1,97	0,020	1,775	1,45	0,020	1,777	1,45	2,47	1,97
Cisztein	0,050	3,121	2,48	0,052	3,224	2,58	0,052	3,224	2,58	3,224	2,58

Bemérés: 126,15 mg
Hígítás: 500 X

126,04 mg
500 X

125,97 mg
500 X

2. táblázat

Gliadin minta hidrazinolízise

Hidrazinolízis idő (ó)	Talált aminosavak mennyisége AS/100 AS						
	Szerin	Prolin	Glicin	Alanin	Leucin	Tirozin	Fenilalanin
5	0,54	0,27	0,38	0,14	0,286	0,021	—
6	0,59	0,23	0,41	0,12	0,22	0,02	0,17
10	0,69	0,51	0,68	0,16	0,43	0,022	0,30
12	0,73	0,49	0,67	0,17	0,47	0,027	0,32
14	0,70	0,50	0,61	0,14	0,50	0,020	0,34

A maradékot 10 ml vízben feloldottuk, 4 ml desztillált benzaldehidet adtunk hozzá és 1,5 óráig erősen rázattuk. A kivált csapadékot szűrőssel távolítottuk el a rendszerből. A tiszta oldatot ezután hideg etilacetáttal kiráztuk, és a vizes fázist elkülönítettük, majd ezt az előzőekben leírt módon bepároltuk.

A megfelelő hidrazinolízis idő kiválasztására sorozatvizsgálatot végeztünk, melynek során 5, 6, 10, 12 és 14 órás reakcióidőt alkalmaztunk gliadin alapminták esetében. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

A reakcióidő és az aminosav-mennyiség közötti összefüggés minden alkalommal egy olyan függvényt ad, amelynek szélső értéke van. Meggondolásaink szerint ezen szélső értékek adják az optimumot. Ebből adódik az általunk választott 12 órás reakcióidő.

A C-terminális aminosavak kimutatását és meghatározását az előzőekben ismertetett módon aminosavanalizátorral végeztük. A szárazra párolt aminosavkeveréket 2,2 pH-jú Na-citrát pufferben feloldottuk és aliquot részét az oszlopra vittük.

Vizsgálati eredmények és értékelésük

A hidrazinolízises eljárással kapott C-terminális aminosavakat a 3. táblázatban soroljuk fel.

3. táblázat

Gliadin C-terminális aminosavai

C-terminális aminosav	[AS végcso./100 AS]			
	1	2	3	Átlag
Szerin	0,696	0,73	0,707	0,71
Prolin	0,91	0,78	0,69	0,79
Glicin	0,62	0,68	0,67	0,65
Alanin	0,16	0,17	0,14	0,15
Leucin	0,28	0,24	0,22	0,24
Tirozin	0,02	0,02	0,02	0,02
Fenilalanin	0,36	0,32	0,37	0,35

Az eljárás során az alkalmazott módszerrel hét különböző végcsoportos aminosav jelenlétét sikerült kimutatni és mennyiségileg meghatározni.

A hidrazinolízisből származó aminosavak kromatogramján a fenti C-terminális aminosavakon kívül még néhány ninhidrin pozitív csúcs is látható, amelyek az ornitin, alfa-aminovajsav és glükozamin helyén jelennek meg. A kromatogramon található olyan csúcsok is, amelyek bizonyos foszforaminosavak helyén jelennek meg, nevezetesen az o-foszfoszerin, o-foszfotreonin és az o-foszfó-4-hidroxiprolin. Ezen aminosavak utalhatnak a gliadinban a foszfolipidek jelenlétére, amelyet megerősíteni látszik az a tény is, hogy a gliadin hidrazinolízise előtti éteres extrakció után a fent említett foszfoaminosavak mennyisége csökken.

I R O D A L O M

- (1) Körös Z.: Magyar Kémiai Folyóirat 56, 131, 1950.
- (2) Deutsch T.: Acta Phys. Acad. Sci. Hung. 6, 209, 1954.
- (3) Dévényi T. – Szörényi E.: Acta Phys. Acad. Sci. Hung. 9, 301, 1956.
- (4) Lásztity R. – Nedelkovits J. – Kobács B.: Magyar Kémiai Folyóirat 70, 153, 1964.
- (5) Lásztity R. – Nedelkovits J. – Varga J.: Magyar Kémiai Folyóirat 72, 197, 1966.

- (6) Varga J.: ÉVIKE. 13, 284, 1967.
 (7) Varga J.: Búzalisztfehérjék N-terminális aminosavainak vizsgálata Sanger 2,4-dinitrofluorbenzolos módszerével. Műszaki Doktori értekezés. Budapest. 1967.
 (8) Varga J.—Lászlóty R.: Élelmiszertudomány 2, 185, 1968.
 (9) Akabori, S.—Ohno, K.—Narita, K.: Bull. Chem. Soc. 25, 214, 1952.
 (10) Philips, J.: J. Chromatogr. 37, 131, 1968.
 (11) McDonald, C. E.: Cer. Chem. 39, 311, 1962.
 (12) Mahowald, Th.—Noltmann, E.: J. Biol. Chem. 237, 1146, 1962.
 (13) Hirs, C. H. N.: Methods in Enzymology. XI. New York — London, 1967.
 (14) Thomas, A. J.—Evans, R. A.—Sirinardene, J. A. S.—Robins, A. J.: Biochem. J. 99, 5c, 1966.
 (15) Fraenkel-Conrat, J.—Harris, J.: Methods of Biochemical Analysis. New York, 1955.
 (16) Dévényi T.—Gergely J.: Aminosavak, peptidek, fehérjék. Budapest, 1963.
 (17) Frejman, A. A.—Vekszler, V. I.—Resnyicsenko, N. Sz.: Biochimija. 29, 583, 1964.

ИСПЫТАНИЕ С-ТЕРМИНАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПБЕЛКОВ КЛЕЙКОВИНЫ

I. ИСПЫТАНИЕ С-ТЕРМИНАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ ГЛИАДИНА ГИДРАЗИНОЛИЗОЙ

Я. Неделкович и Л. Вёллер

Авторы в процессе исследований гидразинолизмом методом испытывали С-терминальные аминокислоты спирторастворимых белков клейковин полученных из пшеничной муки обезжиренной петролейным эфиром БЛ 112.

Для определения С-терминальных аминокислот экспериментально установили самые подходящие сроки реакции и на основании этих проводили гидразинолиз. В результате испытаний выявили 7 крайних С-групп аминокислот (серин, пролин, глицин, аланин, леуцин, тирозин, фенилаланин) и определили их количество.

Для характеристики образца белковой фракции гидролизой определили их аминокислотный состав.

PRÜFUNG DER C-TERMINALEN AMINOSÄUREN VON KLEBEREIWEISS-STOFFEN

I. UNTERSUCHUNG DER C-TERMINALEN AMINOSÄUREN DES GLIADINS VERMITTELS HYDRAZINOLYSE

J. Nedelkovits und L. Wöller

Die Verfasser untersuchten die C-terminalen Aminosäuren der alkohollöslichen Eiweiss-stoffe von aus mit BL 112 bezeichneten, mit Petrolaether entfettetem Weizenmehl bereiteten Kleber mit hydrazinolytischem Verfahren.

Zur Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren stellten sie experimentell die günstigste Reaktionszeit fest und führten die Hydrazinolyse unter Beachtung derselben durch. Das Ergebnis ihrer Versuche war Nachweis und quantitative Bestimmung von 7 C-terminalen Aminosäuren (Serin, Prolin, Glycin, Alanin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin).

Zwecks Charakterisierung der Eiweissfraktionprobe wurde nach der Hydrolyse ihre Aminosäurezusammensetzung betimmt.

INVESTIGATION INTO THE C-TERMINAL AMINO ACIDS OF GLUTEN PROTEINS.

I. STUDY OF THE C-TERMINAL AMINO ACIDS OF GLIADIN BY HYDRAZINOLYSIS

J. Nedelkovits, and L. Wöller

The C-terminal amino acids of the alcohol soluble proteins of gluten obtained from wheat flour defatted by petroleum ether BL 112 were examined by the hydrazinolytic procedure.

In order to determine the C-terminal amino acids the optimum reaction time was established experimentally. As a result of the experiments 7 C-terminal amino acids (serine, proline, glycine, alanine, leucine, tyrosine and phenylalanine) could be detected and determined quantitatively.

In order to characterize the protein fraction sample the amino acid composition was determined after hydrolysis.

EXAMEN DES AMINOACIDES C-TERMINAUX DES PROTÉINES DU GLUTEN.

I. LA MISE AU POINT DES AMINOACIDES C-TERMINAUX DE LA GLIADINE PAR L'HYDRAZINOLYSE

J. Nedelkovits et L. Wöller

Les auteurs ont effectué l'examen au procédé de la hydrazinolyse des aminoacides C-terminaux des protéines alcoolosolubles du gluten obtenues de la farine de froment dégraissée à l'aide de l'éther de pétrole BL 112.

Afin de déterminer les aminoacides C-terminaux on a établi par voie expérimentale la durée la plus favorable de la réaction et c'est en connaissance de cette dernière qu'on a effectué la hydrazinolyse. On a réussi ainsi à déceler et à doser 7 aminoacides C-terminaux (la sérine, la proline, la glycine, l'alanine, la leucine, la tyrosine et la phénylalanine).

Afin de caractériser la fraction, on a établi — après l'hydrolyse — la composition en aminoacides.