

A VÖRÖSVÉRSEJT MEMBRÁN

KÉMIAI FELÉPÍTÉSÉNEK

TANULMÁNYOZÁSA

/ Doktori értekezés /

Fehér Tibor

okl. vegyész

3
SZEGED. 1959.



Diss. B 135



TARTALOMJ EGYZŐK.

BEVEZETÉS.	1. old.
I. A VVS-EK FIZIKAI TULAJDONSÁGAI.	3 "
1. Általános leírás.	3 "
2. Hemolizis.	3 "
3. Rezisztencia.	5 "
4. Permeabilitás.	5 "
5. Agglutináció.	5 "
II. A VVS-EK KÉMIAI TULAJDONSÁGAI.	7 "
1. Hemoglobin.	7 "
2. Sztróma.	9 "
3. Zsirok és lipoidok.	9 "
4. Szénhidrátok.	10 "
5. Egyéb alkotórészek.	11 "
III. A VVS-EK MORFOLÓGIAI TULAJDONSÁGAI.	12 "
1. Bevezetés.	12 "
2. Felületi tulajdonságok.	13 "
3. A membrán felépítése.	14 "
4. A felületi sajátságok értékelése,	19 "
5. A membrán vizsgálatának kémiai lehetősége.	20 "
IV. FEHÉRJÉK VÉGCSOPORTMEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ MÓDSZEREK.	22 "

1. Enzimatiszus módszerek.	22. old.	
2. Fizikai-kémiai módszerek.	22	"
2-1. Titrálási állandók mérése.	22	"
2-2. Racemizáció.	23	"
2-3. Egyensulyi állandók mérése.	23	"
3. Kémiai módszerek.	24	"
3-1. Aminovégcsoport meghatározások.	24	"
3-2. Karboxilvégcsoport meghatározások.	29	"
4. Egyéb módszerek.	32	"
4-1. Modellekkel történő összehasonlítás.	32	"
4-2. Van Slyke-analízis.	32	"
V. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALKALMAZÁSÁNAK		
INDOKLÁSA.	33	"
VI. A SANGER-FÉLE AMINOVÉGCSONORT MECHATÁROZÁS		
LEBIRÁSA.	35.	"
VII. FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS AZOK ELŐÁLLÍTÁSA.		
1. Vörösvérsejt.	40	"
2. Dinitrofluorbenzol.	40	"
3. FIZIOLOGIÁS állapotú karbonát- hidrogénkarbonát puffer.	40	"
4. Éterben oldódó lipoidoktól mentes sztróma.	41	"
5. Éterben oldódó lipoidok.	41	"
6. Éteres hemolizátum.	41	"

7. A papirkromatográfiánál alkalmazott szolvenssek.	42	old.
8. Felhasznált egyéb anyagok.	42	"
VIII. A SANGER-FÉLE MÓDSZER ALKALMAZÁSÁNAK NEHÉZSÉGEI;		
	43	"
1. Reakció-közeg.	43	"
2. A reakció hőmérséklete.	44	"
3. A reakció pH-ja.	44	"
4. A reakció ideje.	45	"
5. A kondenzált termék tisztítása.	46	"
6. A DNP-vvs hidrolizise.	46	"
7. A DNP-származékok elválasztása.	47	"
IX. A NATIV VVS KEZELÉSE DNFB-AL.	49	"
1. A-jelzésű termék vizsgálata.	51	"
2. B-jelzésű termék vizsgálata.	54	"
3. C-jelzésű termék vizsgálata.	56	"
4. D-jelzésű termék vizsgálata.	58	"
5. E-jelzésű termék vizsgálata.	59	"
X. ÉTERBEN OLDÓDÓ LIPOIDOKTÓL MENTES SZTROMA VIZSGÁLATA.	61	"
1. F-jelzésű termék vizsgálata.	62	"
XI. ÉTERBEN OLDÓDÓ LIPOIDOK VIZSGÁLATA.	66	"
XII. A HEMOLIZIS TERMÉKEINEK VIZSGÁLATA.	68	"

XIII. VIZOLDÉKONY DNP-SZÁRMAZÉKOK

VIZSGÁLATA.

70 old.

XIV. A KISÉRLETI EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE.

72 "

1. Nativ vvs.

74 "

2. Sztróma.

75 "

3. Éterben oldódó lipoidok.

77 "

4. Hemolizátum.

78 "

ÖSSZEFOGLALÁS.

80 "

Az emberi vörösvérsejt /továbbiakban vvs/ felépítésének, fizikai és kémiai tulajdonságainak a tanulmányozása esetenként nehézségekbe ütközik. E nehézségek oka elsősorban abban keresendő, hogy e kolloid méretű partikula in vitro nehezen vizsgálható természetes állapotában, a szervezetből történt eltávolítása sokszor egyik-másik tulajdonságának a megváltozásával jár együtt. Ennek tulajdonítható, hogy az irodalomban fellelhető megfigyelések és adatok közül számosak egymással ellentétben állnak.

A vvs-nek vagy valamely alkotórészének morfológiai vizsgálata jelenti legtöbbször a legnagyobb nehézségeket. Ugyanis a szervezetben, a vérben helyetfoglaló vvs-ek a vérnek mint kolloid méretű szuszpenzióknak diszperz részei olyan bonyolult összetételű diszperziós közegben /vérplazmában/ foglalnak helyet, amely alkotórészei - plazmafehérjék, lipoidok, szénhidrátok, hormonok, vitaminok, szervetlen alkotórészek, stb. - és tulajdonságai ezideig csak részben ismeretesek. A vvs-eknek e szuszpenzoidból történt kiválasztása természetesen ezen összetett rendszer felbomlását jelenti, amely igen sokszor e sejteket felépítő vegyületek átalakulását, szétesését, új vegyületek keletkezését eredményezi.

Ezeknek és más hasonló nehézségeknek a kiküszö-

bőlésére biológiai és fiziológiai vizsgálati módszerek az esetek egyes részeiben nem alkalmasak. Feltételezhető, hogy egyszer-másszor /igy a vvs morfológiai felépítésének néhány kérdésében/ kémiai jellegű vizsgálati módszer jelentheti a feladat megközelítését vagy megoldását.

I.

A VVS-EK FIZIKAI TULAJDONSÁGAI.

1. Általános leírás.

Az emberi vvs természetes állapotában gömbalaku vagy bikonkáv képződmény, rendkívül rugalmas, és ellentétben a legtöbb emberi szervezetet felépítő sejttel, sejtmaggal nem rendelkezik. A vvs-ek száma a szervezetben különböző tényezők hatására változik, nagyságrendben $4,5-5,5 \times 10^6 / \mu l$, míg a vér összmenyisége az emberben 60-90 ml/kg testsúly. A vvs átmérője $7,1-7,9 \mu$ között változik, tehát mikrocita nagyságrendű 9μ -nál nagyobb sejteket makro-, ennél kisebbeket pedig mikrocitáknak neveznek/. Térfogata $60-120 \mu^3$ között változik, nagy általánosságban $90 \mu^3$. Felülete $100-115 \mu^2$. Az emberben található vvs-ek összfelülete hozzávetőlegesen $3200 m^2./l/$.

2. Hemolizis.

Ha izotóniás oldatban /melynek ozmotikus nyomása megegyezik a vvs-et természetes állapotában körülvevő diszperziós közeg, a vérsavó ozmotikus nyomásával/ szuszpendáljuk a vvs-eket, azok gömbalakot vesznek fel. Ebben az esetben az ionok diffúziója a vvs-felület alkotta félígáteresztő hártján egyirányban - vagy a vvs belsejébe vagy a vvs belsejében helyetfoglaló saját ionok a közegbe - nem következik be. Az izotóniás oldat NaCl-ra vonatkoztatva 0,95 %-os oldatot jelent. Ennél nagyobb

ionkoncentrációjú hipertóniás oldat esetében a vvs-ek víztartalmukból veszítenek ozmotikus egyensúlyig. Hipotóniás közeg esetében pedig, amikor az ionkoncentráció alacsonyabb, a vvs vízfelvétele következik be. A vvs-ek e vízfelvétele által okozott ozmotikus nyomás adott esetben meghaladja a sejtfal ellenállóképességét, a sejtfal megrepedezése útján a sejt belső állománya, elsősorban a hemoglobin /továbbiakban Hb/ felszabadul, a vvs hemolizál. A vvs-ek hemolizise többféle módon következhet be:

- a. A fentiekben leírt jelenség ozmotikus hemolizis, mely bizonyos esetekben a sejt reverzibilis, főként azonban irreverzibilis változását eredményezi.
- b. Mechanikus hemolizis akkor következik be, ha a Hb felszabadulása a sejt mechanikus úton bekövetkező károsodásával jön létre /rázódás, zuzódás/.
- c. Hőhatású hemolizis relative magas és fagypont körüli hőmérsékleten játszódik le $-2...+2^{\circ}\text{C}$ és $40...60^{\circ}\text{C}/$.
- d. Kolloid ozmotikus hemolizisről akkor beszélünk, ha a sejtfalat parciálisan oldó valamely anyag /"lizin"/ jelenlétében megváltozik a kation-áteresztőképesség egyensúlya.

- e. Hemolizist eredményezhet megfelelő intenzitású ultraibolya fény illetőleg radioaktív besugárzás is.

3. Rezisztencia.

Az a határérték, amely az előbbieknél leírt behatásokkal szemben mutatott maximális ellenállóképességet jelenti, a vvs ozmotikus rezisztenciája. Ezen értéknek a klinikai gyakorlatban van jelentősége. Mérése különböző koncentrációjú NaCl oldatokkal történik.

4. Permeabilitás.

Eddig kevésbé felderített okokból kifolyólag a vvs-ek áteresztőképessége különböző anyagokkal, így a vérsavó alkotórészeivel szemben szelektív. Egyes aminosavak, a tirozin, alanin, fenilalanin képes behatolni a vvs belsejébe. Mások, pl. az aszparaginsav, glutaminsav nem. Hasonlóképpen viselkedik a vvs felülete az elektrolitokkal szemben is. E jelenség oka ezideig nagyrészt ismeretlen.

5. Agglutináció.

A vvs-ek azon kolloidkémiai változását, amelynek során azok reverzibilis vagy irreverzibilis koagulációja következik be, agglutinációnak nevezzük. E jelenségnek az okai, tehát vajjon elsődleges /kémiai/ vagy más

természetű kötőerők felelősek a jelenség létrejöttéért, továbbá az agglutináció mechanizmusa ezideig csaknem teljes egészében ismeretlenek. Gyakorlati fontosságát a vércsoport-elemzés, a szerológia és a virológia alapvető kérdései jelentik.

Ezidőszereint ismeretessé vált, hogy az agglutináció oka vagy következménye a vvs töltéseinek elvesztése /2/, amelyet általában plazmafehérjék vagy mástermészetű /idegen/ fehérjék, az agglutininek idéznek elő /3/. Számos ilyen agglutinin ismeretes. A vércsoportok kialakításában elsőrendű fontosságú izoagglutinin a vérplazmából PILLEMER és munkatársai izolálták a plazmafehérjék egyik frakciójaként a COHN-EDSALL szerinti hideg etanolos fehérjefrakcionálás módszerével /4/. A vércsoportelemzésben sok nehézséget okozó aspecifikus pan-agglutinin a fenti módszer módosításával FEHÉR és SZÉKÁCS nyerték ki hasonlóképen a plazma fehérjéi közül /5/.

II.

A VVS-EK KÉMIAI TULAJDONSÁGAI.

A vvs legfontosabb alkotórészeit és azok relatív mennyiségét az irodalomban megadott mértékegységekben az 1. táblázat tünteti fel /1,6,7,8,9,10,11/.

Alkotórészek	Mennyiség	Egység
Vistartalom	707	g/l
Könnyen lehasadó vis	495	"
Kötött vis	212	"
Fehérje	175	"
Szárazanyagtartalom	32-35	%
" organikus	95-98	"
" anorganikus	2-5	"
Fehérjéhez kötött bázis	44	mM/l/l
Karbamid	5	"
Glukoz	3	"
Egyéb organikus vegyületek	3	"
K	80-100	meq/l
" Hb-hoz kötött	25-30	"
Na	20	"
Mg	2	"
Ca	0	"
Cl	52	"
HCO ₃	19	"
Savoldékony organikus foszfát	17	"
Organikus foszfáthoz kötött bázis	17	"
Anorganikus foszfát	2	"
Anorganikus foszfáthoz kötött bázis	2	"
SO ₄	1	"
Szulfáthoz kötött bázis	7	"
Összbázis	103	"
Összsav	134	"
Fe	50,7	mg%
" Hb-hoz kötött	44,4	"
" 4%-os sósavval lehasítható	6,3	"
Zn	0,03-1,3	"
Cu	0,08-0,14	"

1. táblázat.

1. Hemoglobin.

A vvs 1/3 részét, a szárazanyagtartalomnak 80 %-át

Hb alkotja. 100 ml vérben 14-18 g Hb található. Lelényesebb feladata a szervezet egyéb sejtjeinek energiatermeléséhez szükséges oxigénnek, és az anyagcsere folyamán termelt széndioxidnak a szállítása. A vér jóval nagyobb mennyiségű oxigént és széndioxidot képes reverzibilisen megkötni, mint amennyi a vérben mint vizes oldatban megkötni képes. Ez onnan ered, hogy a Hb az oxigénnel laza komplexet alkot. Vízben jól oldódik, magas hőmérsékleten és lúgos közegben denaturálódik. Molekulásúlya 68.000. A Hb az összes fehérjék közül az eddigiekben leginkább felderített olyan összetett fehérje, amely Hemből és a hozzákapcsolt fehérje-részből /Globin/ áll. 1 mól Globinhoz 4 mól Hem kapcsolódik. A Hemben előforduló Fe kétértékű alakban alkot komplexet. 1 mól Hem 1 mól oxigént képes megkötni, tehát a Hb molekulánként 4 mól oxigént szállít. Izoelektromos pontja 6,8.

A Globin aminosavtartalmára jellemző a többi fehérjékkel szemben magas hisztidin tartalma. A Hemből sósavas alkohollal történő főzésnél a Fe lehasad, és **Protoporfirin** marad vissza, melynek szerkezete ismert, szintézisét H. FISCHER valósította meg /12/. A Hem....
....Globin kapcsolódásra vonatkozóan megállapítást nyert, hogy a kötésért a ferro szabadon lévő 2 koordinációs vegyértéke a Globinban lévő hisztidin imidazol gyűrűjében lévő savanyú NH-csoporthoz kapcsolódik./13/.

2. Sztróma.

A vvs-ben a Hb-on kívül előforduló struktur-fehérjéket együttesen sztrómának nevezzük. A sztróma-fehérjék egymással valamiféle kötést alkotnak, egymástól nem, vagy csak nehezen választhatók el. A sztróma vízben nem oldódik, a vvs-ben előforduló lipoidok egy részével komplexet alkot /14/, amelynél a kötés természetére vonatkozó ismeretekkel nem rendelkezünk. E komplex elsőrendű szerepet tölt be a vvs morfológiai tulajdonságainak a kialakításában. A sztróma lipoid mentes állapotban a vvs 1,68 %-át, a hozzákapcsolódó lipoidokkal együttesen 2,14 %-át alkotja. Jellemzője a relative magas kén-tartalom, 12,9-14,0 % össz-N mellett 0,71-0,72% össz-S /15/. Elektroforézis útján A és B komponensre választható szét /16/, míg valamely fehérje-frakcionálási módszerrel további fehérje-frakcióra, az elininre bontható, amely a sztrómához viszonyítva kevesebb össz-N -el és több össz-P tartalommal rendelkezik./17/.

3. Zsírok és lipoidok.

A vvs-ben előforduló zsírok és lipoidok hasonlóképpen a vvs morfológiai állapotáért felelősek első sorban /18/. A zsiranyagok 60 % foszfatida, 30 % koleszterin és 10 % koleszterineszter, illetőleg neutrális zsir tartalommal rendelkeznek. A foszfatidáknak kb. 50 %-a kefalin /14/. Ezek az értékek a vvs össz-

mennyiségéhez viszonyítva a következőképpen oszlanak meg
/2. táblázat/:

Zsir és lipoidféleségek	mg%
Összzsir	400
Összfoszfatida	196 /100/
Éterben nem oldódó foszfatida	47 /24/
Lecitin	32 /16/
Kefalin	117 /60/
Cerebrozida	51

A zárójelben szereplő adatok az összfoszfatidára számolt értékeket tartalmazzák.

2. táblázat.

A diamino-foszfatidák és monoamino-foszfatidák aránya a vvs-sztrómában /amely a lipoidoknak csaknem egészét tartalmazza/ 1 : 2. A lipoidok egy részükben lipoproteidek, főként szfingomielinek és cerebrozidák alakjában fordulnak elő /19/.

4. Szénhidrátok.

A vvs szénhidrát tartalmára vonatkozóan igen kevés adat áll rendelkezésünkre. Feltételezhető, hogy egyéb sejtekhez hasonlóan a vvs relative magas glukoz és glukozeamin tartalommal rendelkezik. A vvs-ben szereplő poliszaccharidák valószínűleg a sztróma-fehérjékhez és lipoidokhoz hasonlóan felelősek a vvs morfológiai állapotáért

annak vázszerkezetéért. Kóros elváltozások esetén a szénhidrát tartalom a vvs-ben a legnagyobb mértékben változhat. A plazmában oly fontos szerepet játszó glikogén és fruktóz előfordulására a vvs-ben ezidőszerint nincsenek adataink.

5. Egyéb alkotórészek.

A vvs alkotórészei között kénvegyületek 190 mg%-ban fordulnak elő. Ebből 97,9 % fehérje-S, 1,3 % organikus, nem fehérje természetű kénvegyület, a maradék pedig SO_4 -ion alakjában van jelen /11/. A nem fehérje természetű organikus kénvegyületek leglényegesebb képviselője a glutation.

Fermentek közül számottevő a kataláz előfordulása, amely a Hb-mérgek elleni védelem /elsősorban H_2O_2 / funkcióját végzi /20/, továbbá a kolineszteráz, foszfátáz, pirofoszfátáz, amiláz, D- és L-peptidáz, argináz, ribonukleáz, koleszterineszteráz, amely utóbbi a vvs Zn-tartalmának hordozója /1/.

A vitaminok közül a vvs-ben a karotinoidek, B₁-vitamin, riboflavin, pantoténsav, aszkorbinsav jelenlétét sikerült ezideig kimutatni /1/.

III.

A VVS-EK MORFOLÓGIAI TULAJDONSÁGAI.

1. Bevezetés.

Az emberi vvs morfológiájáról és szerkezetéről alkotott nézetek régi keletűek. E kérdést először BIDLOO vetette fel 1685-ben /2/. Klasszikus teóriája, majd ehhez kapcsolódva SCHWANN és HEWSON elképzelése szerint /21/ a vvs ballonszerű képződmény /"ballon theory"/, melynek belsejében mindennemű rendeződés nélkül helyezkednek el a Hb-részecskék és anorganikus sók.

E klasszikus nézettel ellentétben áll a még mindig kevés exakt megfigyelést tartalmazó feltevés, amely alapján SCHAFER, majd inkább ROLETT /22/ szerint a vvs mátrix-szerkezettel rendelkezik /"gelatin lozenge theory"/, ahol a vvs szintelen mátrix- vagy sztróma-vázból, és ennek üregeiben elhelyezkedő Hb molekulákból áll. E feltételezés szerint a két alkotórész /sztróma és Hb/ egymással kémiai kötést alkot.

Amíg az előbbi szerzők a vvs-ben előforduló molekulák elhelyezkedéséről, orientációjáról természet-szerűleg nem beszélnek, a későbbiekben GOUGH /23/ és TEITEL-BERNARD /24/ vizsgálatai szerint a vvs olyan bikonkáv, diszkoid formájú képződmény, ahol a molekulák /"mátrix"- és Hb-molekulák/ a bennük fellépő erők követ-

keztében orjéntáltan helyezkednek el. Meg kell említeni, hogy e szerzők egyike sem tesz említést ezideig a vvs felületéről, vagy a felület speciális tulajdonságairól.

2. Felületi tulajdonságok.

Felületi tulajdonságok felderítésére először ERICKSON, WILLIAMS, BERNSTEIN, ARVIN, JONES, MACY /14/ végeztek kísérleteket. Azt észlelték, ha 10-szeres mennyiségű vízzel pH 5,5-ön hemolizálták a vvs-eket, a sejt lipoidtartalmának 10 %-a felszabadul, és oldatba megy. Elemzési adataik szerint e lipoidok 50 %-a neutrális zsír és koleszterineszter.

FRICKE, PARKER, PONDER /25/ megmérték súlyszerint, majd WILLIAMS, ERICKSON, MACY /26/ foszfolipoid tartalomról kiszámították poszthemolitikus állapotban a fix vázszerkezet %-os mennyiségét, és egyértelműen 3,4 % -nak találták. Elemzéseikből kiderült, hogy e váz lipoidokból és proteinekből tevődik össze. A váz /"sztróma", "ghost"/ további elemzésére a benne foglalt alkotórészeket azután parciálisan felszabadították, és a visszamaradt partikula méreteit meghatározták.

WAUGH, SCHMITT /27/ megmérték a lipoidokból alkotott rétegnek a vastagságát, amely 50-60 Å-nek adódott. Akkor pedig, ha a vvs-eket széndioxiddal telített vízzel hemolizálták, a lipoidok egy része szintén

felszabadul, s a natív 50-60 Å rétegvastagságú hártya-szerű képződmény 30-40 Å-re csökken. Ez utóbbi érték különbözik BRICKSON és munkatársai /24/ értékeitől, amikor a vvs-et elektrolit mentes hemolízis-médiumban tartva 15 perctől néhány óráig, 60 % lipoidon kívül a protein-alkotórész 25 %-a is felszabadult.

3. A membrán felépítése.

A fenti utóbbi vizsgálatok mindegyike megegyezik abban, hogy a vvs-nél membránszerű képződményről kell beszélni, e membrán elsősorban lipoidokból és proteinekből áll, méretei azonban bizonytalanok, a nyert értékek a szerint változnak, hogy a vvs felületét milyen módszerrel tették vizsgálat tárgyává.

A vvs-felület további tanulmányozása során közelebbről megvizsgálták e felületeken elhelyezkedő membrán alkotórészeit.

FRICKE /28/ a vvs-membrán vastagságát impedancia és dielektromos állandó mérések adataiból 30 Å-nek találta. Az idézett szerző szerint elegendő lipoid van a vvs-ben kettősrétegű membrán kialakítására. Ezen rétegek egymással a zsírsav láncokon keresztül érintkeznek, a külső réteg poláros csoportjai az külvilág, a belső pedig a sejt belseje felé néznek. Bizonyosságul szolgál ennek a szerző szerint az a tény, hogy a lipoidok nagy-

része proteinekhez kapcsolódik, másrésről pedig a protein molekulák természetüknél fogva inkább alkalmasak orientációra, mint a kettősréteg egyéb alkotórészei.

PARPART és DZIEMIAN /29/ például analitikai adatokból kiszámították, minden egyes fehérje molekulára 90 lipoid molekula esik a sztrómában, melyből valószínű, hogy a lipoidok 40-60 %-a lipoproteidek alakjában van jelen.

Azt a feltevést, hogy felület egyaránt tartalmaz lipoidokat és proteineket, alátámasztják BALLANTINE, PARPART /30/ azon kísérletei, mely szerint a különféle lipáz enzimek a vvs-eken csak permeabilitásbeli változásokat, s nem hemolizist idéznek elő, viszont a proteolitikus enzim, a papain és a mexakain hemolitikusak.

BUNGENBERG DE JONG és WINKLER /31/ szerint a vvs-felület 2 monomolekulás membránból áll, ahol a külső lipoidok, főként lecitin, a belsőt optikailag kettőstörő sztromatin-fehérjék alkotják. Ezekben a rétegekben helyetfoglaló kationok felelősek azután a felépítmény permeabilitásáért.

WOLPERS /32/ véleménye szerint enyhe lipoid-extrakció a struktur-szerkezetet a lipoidokon kívül nem károsítja. Ezt elektronmikroszkópos felvételei támasztották alá. Extrakció után porózusabb lett ugyan a vvs-felület, lényeges morfológiai elváltozás azonban nem

következett be. A natív vvs-ek elektronmikroszkópos felvételei - összehasonlítva az extrakció után visszamaradt sztróma ozmiumos fixálással elkészített felvételeivel, ahol a fehérje molekulák elektron denzitásának a változása pontosabb észlelésre nyújt lehetőséget - igen valószínűvé tesznek a vvs esetében olyan micelláris szerkezetet, melyben a fehérjék állványszerű képződményt / "Gerüst" / alkotnak, a felületük közelében lipid molekulákkal töltve.

JUNG /33/ a vvs-eket különböző fizikai behatásoknak tette ki, így ultrahanggal, relative alacsony és magas hőmérséklettel, ultraibolya besugárzással történt kezelés után vizsgálta elektronmikroszkóp alatt a vvs-ek károsodását. Amíg a sejtek kifagyasztása és ultraibolya besugárzása a sejt-membránt nem károsítja, az ultrahanggal történő kezelés teljes egészében, a relative magas hőmérséklet /46-60°C/ részlegesen okoz elváltozásokat, elsősorban a lipidok elmozdulását, ezt követő fehérje denaturálódást, majd hemolizist, amely sorrendben bekövetkező elváltozások szerint a sztrómát övező monomolekulás lipid hártya létezése valószínűvé válik.

PONDER /21/ polarizációs mikroszkópban vizsgálva a vvs felületét, felteszi, hogy a proteinekből és lipidokból álló membrán esetében a proteinek a vvs tengelyében tangenciális, a lipid micellák pedig radiális orientációjuk. Mérési adatai és ebből kiinduló feltevései sze-

rint a tangenciálisan elhelyezkedő sztromatin-fehérjék átmérője körülbelül 40 Å. Ezek a fehérjék határozzák meg a lipoidok orientációját is, amely szerint a lipoidok kettős rétegei poláros csoportjaikkal kifelé és befelé szénhidrogén láncokkal érintkezve radiálisan helyezkednek el. Minden ilyen protein-lipoid meghatározta felületen lévő nyáláb körülbelül 60 Å mélységű, a szénhidrogén láncok egymástól való távolsága pedig 3 Å.

A lipoidok ezen radiális elhelyezkedése a kefalin, lecitin, szfingomielin molekuláknak tulajdonítható, a zsírsav részeikkel kifelé, szerin és kolin alkotórészeikkel pedig mintegy átszúrva a belső médiumot, befelé irányítottak. A zsírsavak szolgáltatott aciditás felelős azután a vvs-ek elektroforetikus mozgékonyaságáért /34,35/.

A vvs izoelektromos pontja pH 1,7, a lipoid extraktumé 2,6, a sztrómáé 4,7. Az elektroforetikus mozgékonyaságból és izoelektromos pontokból - összevetve a vvs magas kefalin tartalmával - feltételezhető, hogy a domináló savanyú csoportok a kefalin foszfor-sav részei, továbbá a rokon lipoidok hasonló csoportjai. Azonban e viselkedés nem zárja ki, a fenti és egyéb mikroszkópos adatok pedig egyenesen alátámasztanak a felületen bizonyos mennyiségű szabad proteint.

LINDEMANN /36/ kiterjesztette Jung fentiekben leírt vizsgálatait, s elektronmikroszkópos felvételeket

készített ultrahang útján bekövetkező hemolízis különböző állapotairól. Megállapította, hogy az ultrahang útján bekövetkező károsodás diffúziós hemolízis, amelynél kavitáció útján a sejt belsejében helyetfoglaló Hb-molekulák olyan egyedekre esnek szét, amelyek a felületi membrán morfológiai elváltozása nélkül felszínre kerülnek. Véleménye szerint a stabil felület léteért kettősmembrán, elsősorban egy lipoid membrán a felelős.

PEROSA és RACCUGLIA /37/ a vvs hemolízisével elkészítettek olyan sztromatint, amely Hb-t nem, de a lipoidokat gyakorlatilag teljes egészében tartalmazta. E sztromatint azután Edsall-Weber féle oldószerrel /38/ feloldották, s papírkromatografáltak. Azt találták, hogy a vvs-membránt elsősorban felépítő sztromatin 4 lipoprotein alkotórészből tevődik össze, tehát a felületi alkotórészek, a lipoidok és proteinek nagyrészen lipoproteidok formájában együttesen funkcionálnak.

Vizsgálva a vvs foszfát adszorpcióját, JONAS /39/ a vvs-eket izotóniás, ^{32}P -t tartalmazó ortofoszfát oldattal kezelte. Megállapította, hogy a foszfát adszorpció Freundlich-féle adszorpciós izoterma szerint játszódik le. Az adszorpció fokából és a vvs ismert alkotórészeiből kiindulólág feltételezi, hogy az adszorpció olyan komplex képződésével jár, amely kalcium ionokból, proteinből és lecitin molekulákból áll. E komplex csak abban az esetben

keletkezhet, ha a vvs felület egyaránt tartalmazza az említett komplex összes alkotórészeit.

4. A felületi sajátságok értékelése.

A vvs morfológiai felépítéséről ismertetett irodalmi adatokból kitűnik, hogy a vvs biológiai funkcióiért elsődlegesen felelős vvs-membrán kémiai alkotórészeire, illetőleg morfológiai állapotára két hipotézis áll fenn. Az egyik szerint a vvs összefüggő lipoid burookban foglal helyet, s külső felületként szereplő hártván belül található a vázszerkezetű sztromatin fehérje és a sejt állományát képező egyéb alkotórészek. A másik feltevés elveti összefüggő, a felületi sajátságokért kizárólagosan felelős lipoid burok létezését, s különböző vizsgálatok szerint olyan vázszerkezetet tételez fel a membrán esetében, amely fehérje vázból, s e váz üregeiben helyetfoglaló lipoid molekulákból áll.

E kérdés vizsgálatát ezideig főként fizikai, kisebb mértékben biológiai módszerek alkalmazása jellemezte. Feltehető - az ismertetett törekvéseken kívül - a vvs-membrán alkotórészeinek kémiai úton történő vizsgálata további megközelítését, esetleg megoldását jelentheti ennek az alapvető biológiai és egyaránt kémiai problémának.

5. A membrán vizsgálatának kémiai lehetősége.

A vvs-membrán felépítésének a tanulmányozását a natív vvs-membrán lipoid partikuláinak vagy fehérjéinek közelebbről, natív állapotban történő kémiai vizsgálata jelentheti. Mivel egy biológiai szubsztrátumban jelenlévő lipoidok funkciós csoportjainak, egyéb alkotórészeinek és molekula-elrendeződésének meghatározása ezideig nehézséget jelent lipoidszerű anyagok nagy száma és megfelelő vizsgálati módszer hiánya miatt, célszerűbbnek látszik a tulnyomórészben /esetenként kizárólag/ aminosavakból álló proteinek kémiai úton történő tanulmányozása. A fehérjéknek egyik legjellemzőbb alkotórésze azok karboxil- és amino-végcsoportja.

Ha feltételezzük, hogy a vvs összefüggő lipoid burokokban foglal helyet, akkor a membrán-fehérjék natív állapotukban nem adják a jellemző és jóldefiniált fehérje-reakciókat, csak abban az esetben, ha a lipoid hártya valamely oknál fogva denaturálódott, megszűnt kontinuuusan elfedni a membrán fehérjét, vagy esetleg a vvs-ről levált. Ha létezik olyan kémiai módszer, amely nem idéz elő a lipoidokban vagy fehérjékben denaturálódást, de főként morfológiai elváltozásokat, és azon áthatolni nem képes, akkor a probléma megközelítésére alkalmasnak bizonyulhat. Mivel a fehérjék kémiai behatásokra nagymértékben szenzibilisek, azok végcsoportjainak a meghatározására szolgáló

módszerek csak kiméletes behatást jelenthetnek. Ezért feltehető, hogy a végcsoportmeghatározások reakciókörülményei a fenti feltételeket kielégítik.

Jelen munkánk ilyen természetű vizsgálatok ismeretetését célozza.

IV.

FEHÉRJÉK VÉGCSOPORTMEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ MÓDSZEREK.

1. Enzimatiszus módszerek.

E módszerek lényege abban áll, hogy valamely enzim valamely protein egyik vagy másik végcsoportját hordozó aminosavat szelektíve lehasítja, s ez a végcsoportra jellemző hasadási termék az eggyel kevesebb aminosav szekvenciát tartalmazó protein mellett kimutatható.

E módszerek alapját LINDERSTRÖM-LANG /40/ kísérletei képezték, amely szerint tiszta állapotban "jóldefiniált specifitással" állította elő a proteinázt erre a célra. ABDERHALDEN és ABDERHALDEN /41/ például hasonló célból tisztították, vizsgálták és alkalmazták végcsoportmeghatározás céljaira a karboxipeptidáz enzimet.

Meg kell jegyezni, hogy az enzimatiszus módszerek csak speciális esetekben és nem mindig megfelelő specifitással szolgáltak végcsoportmeghatározások céljaira.

2. Fizikai-kémiai módszerek.

2-1. Titrlási állandók mérése.

A glutation szerkezetéről alkotott helyes kép kialakulását nagymértékben elősegítették a vegyületben

szereplő disszociábilis csoportok titrálási állandóinak HARRIS, SIMMS, PIRIE és PINHEY /42,43,44/ által történt tanulmányozása.

2-2. Racemizáció.

E vizsgálat lényegét a terminális aminosavak racemizációval szemben tanúsított relatív ellenállóképességének a tanulmányozása képezi. DAKIN és munkatársai /45/46,47/ nagyszámu protein terminális aminosavainak racemizációs készségét vizsgálták hideg lug jelenlétében. Azt tapasztalták, hogy a láncközi aminosavak sokkal könnyebben racemizálódnak, mint a láncvégiek. Ilyen módon a lugos reakció után a proteineket hidrolizálták, a keletkezett aminosavakat elválasztották, és megvizsgálták az egyes aminosavak optikai forgatóképességét.

2-3. Egyensúlyi állandók mérése.

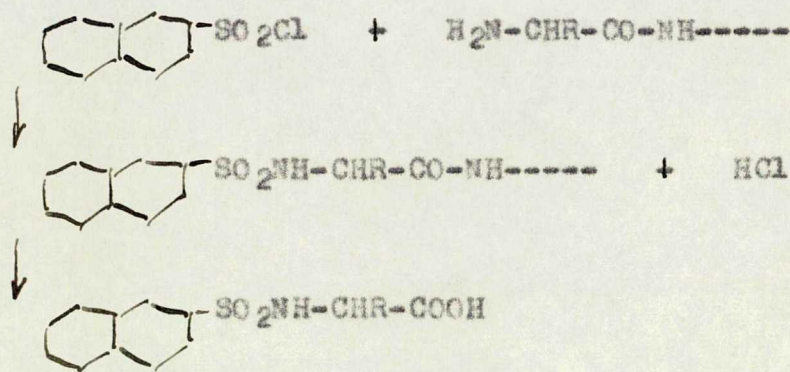
FRANKEL és KATZHALSKY /48,49,50/ azt észlelték, hogy különböző, fehérjékkal végrehajtott reakciók egyensúlyi állandói bizonyos mértékben függnék a terminális aminosavak tulajdonságaitól, arra bizonyos körülmények között jellemzőek. E megállapítás vizsgálataik értelmében elsősorban igaz glicin, alanin, leucin esetében, de kevésbé a például peptid-komplexekben előforduló fenilalaninra vagy glutaminsavra.

3. Kémiai módszerek.

3-1. Aminovégcsoport meghatározások.

a. β -naftosulfosavkloridos módszer.

A β -naftosulfonil csoport a módszer értelmében kopulációs reakcióba lép a fehérje aminocsoportjával lúgos közegben a Schotten-Bauman féle eljárás szerint.



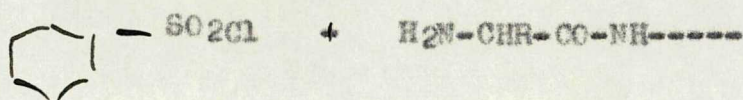
A képződött β -naftosulfonil-peptid hidrolizise útján a megfelelő aminosav származék képződik, amely a hidrolizis termékből izolálható.

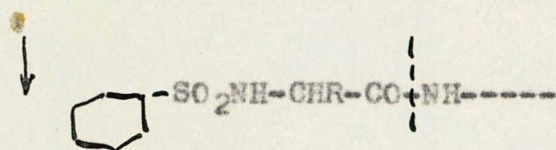
Ezzel a módszerrel határozták meg FISCHER, BERGELL /51/, FISCHER, ABDERHALDEN /52/, ABDERHALDEN /53,54/ a selyemfibroinban lévő glicilalanin és alanilglicil-tirozin szerkezetét.

b. Benzolsulfosavkloridos módszer.

A reakció hasonló módon játszódik le mint a

β -naftosulfosavklorid esetében:

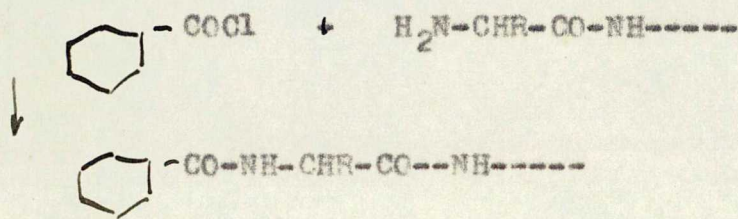




Ezzel a módszerrel állapította meg GURIN és CLARKE /55/, hogy a zselatinnak láncvégi aminovégcsoportja nincsen, míg a molekulában ϵ -lizinből származó láncközi aminosoportok találhatók.

c. Benzoilkloridos módszer.

ABDERHALDEN és HEYNS /56/ a selyem alaniltirozin csoportját benzoilkloriddal reagáltatták:



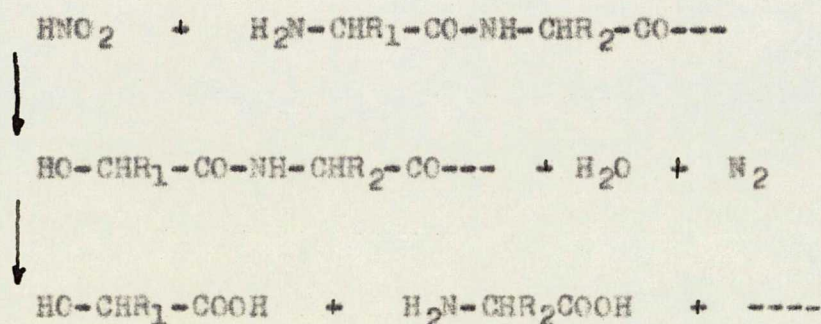
A proteinben jelenlevő fenolos hidroxil csoport is benzoileződött. 20 %-os kénsavval véghezvitt 4 órás hidrolízis után N-benzoilalanil-O-benzoil-tirozinból 3 termék, benzoilalanin, tirozin, benzooesav keletkezett 74,82 és 91 %-os nyeredékkal.

d. Glicin-szinreakció.

ABDERHALDEN és NEUMANN /57/ o-ftálaldehiddel színreakciót hoztak végre, amikor is a reagens proteinek glicin-tagjának karboxil csoportjával lépett jól regisztrálható reakcióba. R. ABDERHALDEN /58/ alloxánt és ninhidrint használt hasonló eredménnyel.

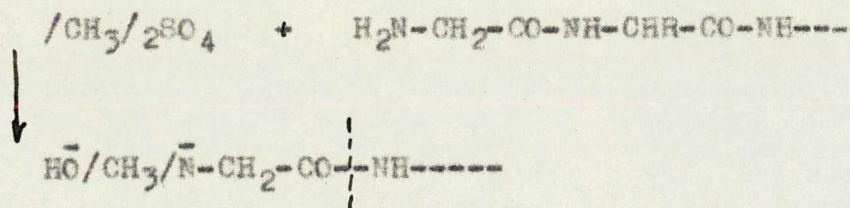
e. Dezaminálás.

CONDEN, GORDON, MARTIN /59/ kis lánchosszuságú peptidek strukturanalizisére a salétromossav segítségével végrehajtott dezaminálást alkalmazták, és a keletkezett OH-savat elkülönítették papírkromatográfiás módszer segítségével a többi ninhidrin-pozitív aminosavtól.



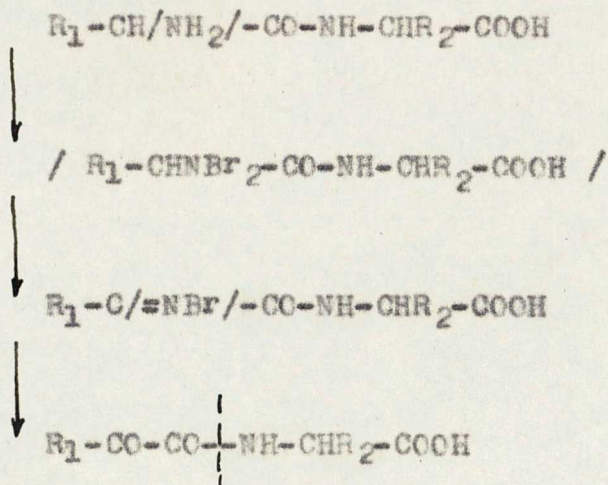
f. Aminocsoportok metilezése.

ZIMMERMANN /60/ dimetilszulfátot, ABDERHALDEN és SICKEL /61/ nitrometánt alkalmaztak szabad aminocsoportok metilezésére. A terméket azután a szokásos módon hidrolizálták és a dimetilamino származékot izolálták.



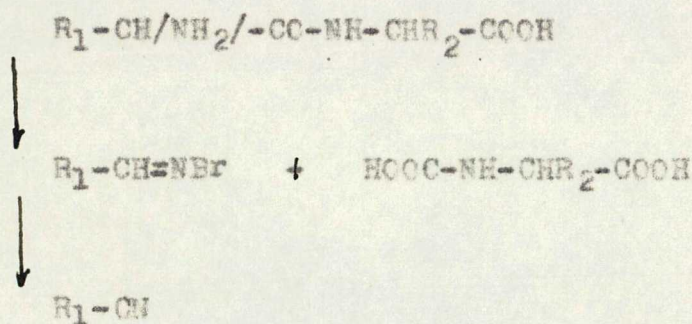
g. Hipobromitos módszer.

Hipobromit proteinek aminogéncsoportjaival különbözőképpen reagál, attól függően, savanyu vagy lúgos közegben játszódott le a reakció /62/:



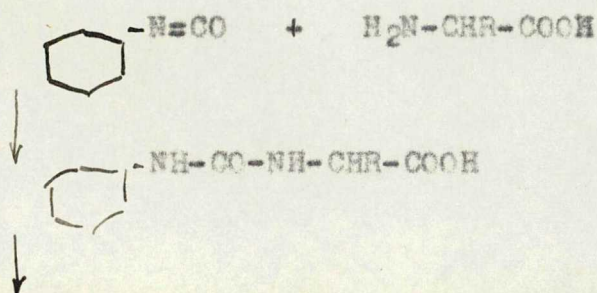
A képződött ketosav azután könnyűszerrel identifikálható.

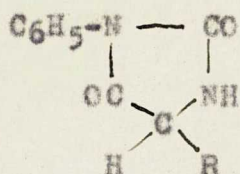
Alkáli hipobromit esetén a reakció a következőképen játszódik le:



h. Arilizocianátos módszer.

Aminvégcsoportok meghatározására BERGMANN, MIEKLEY, KANN /63/ fenilizocianátot alkalmaztak. A kondenzációs reakció szobahőfokon jó hatásfokkal lejátszódik. A kondenzációs termék hidrolizise útján fenilhidantoin képződik.

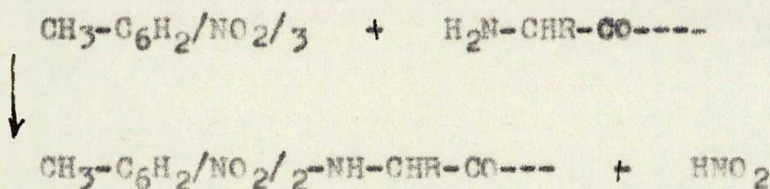




Jobb hatásfokkal alkalmazható fenilizocianát helyett fenilizotiocianát, amelynél a hidrolízis termékek elválasztására kényelmesebben és biztonságosabban nyílik lehetőség.

1. Trinitrotoluolos módszer.

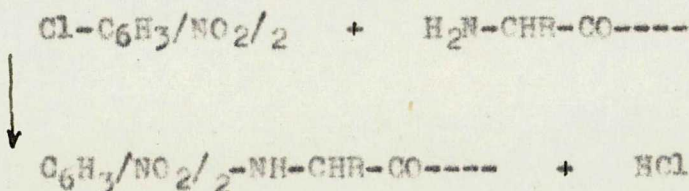
Nehezen hidrolizáló peptidek aminovégcsoport meghatározására használják a trinitrotoluolos módszert /64/.



A képződött dinitrotolil-peptid azután hidrolizálható, és a megfelelő hidrolizistermék identifikálható.

j. Dinitroklórbenzolos módszer.

2.4-dinitroklórbenzollal reagáltatta peptidek aminocsoportjait ABDERHALDEN és STIX /65/:



A keletkezett kondenzációs termékek hidrolízise nem vezetett a származékok megfelelő kitermeléséhez.

k. Dinitrofluorbenzolos módszer.

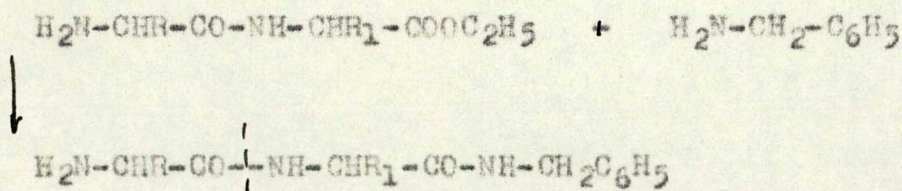
A reakció során keletkező dinitrofenil származékok hidrolízise nagyságrendben jobb kitermeléshez vezet, mint az előbbi módszer esetében / a módszer részletes leírását lásd később /.

3-2. Karboxilvégecsoport meghatározások.

a. Benzilaminos módszer.

A benzilaminos módszert karboxilvégecsoport meghatározásként ABDERHALDEN és BROCKMANN /66/ vezették be.

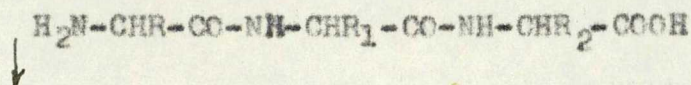
A reakció során a peptidek karboxil csoportjai eszterifikálódnak, amely eszterek azután benzilaminos közegben peptid-benzilaminná alakulnak.

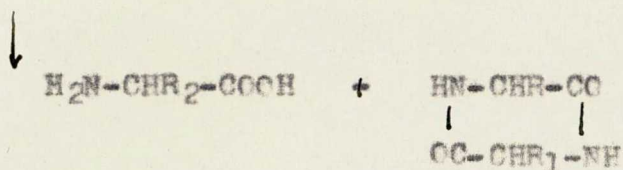


Hidrolízis után a benzilamino származékok azután kristályos állapotban izolálják.

b. β -naftolos módszer.

Ezt a módszert LICHTENSTEIN, HESTRIA, DIMANT és BRZOZA /67/ alkalmazta először. A módszer igen jól bevált tripeptidek szerkezetvizsgálatára.

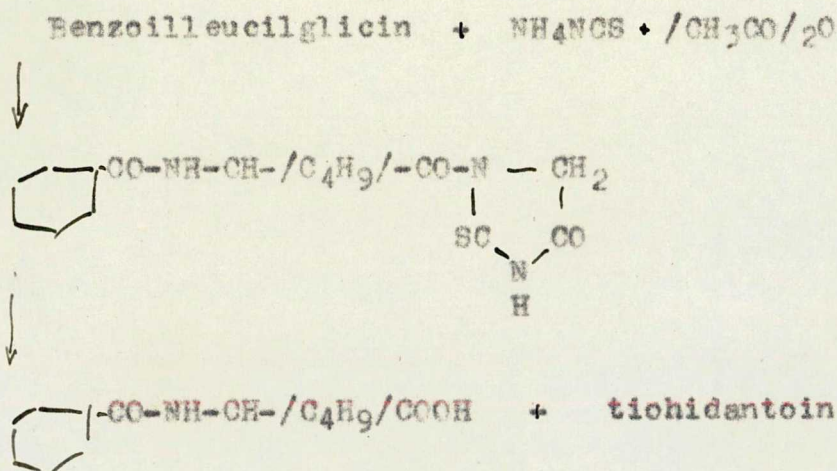




Ha a reakció értelmében valamely tripeptidet β -naftol jelenlétében 135-150°C-on hevítünk, a szabad karboxil végcsoportot hordozó aminosav felszabadul, míg a molekula többi része szubsztituált diketopiperazinná alakul, amely azután a reakció termékeiből izolálható.

c. Tichidantoinos módszer.

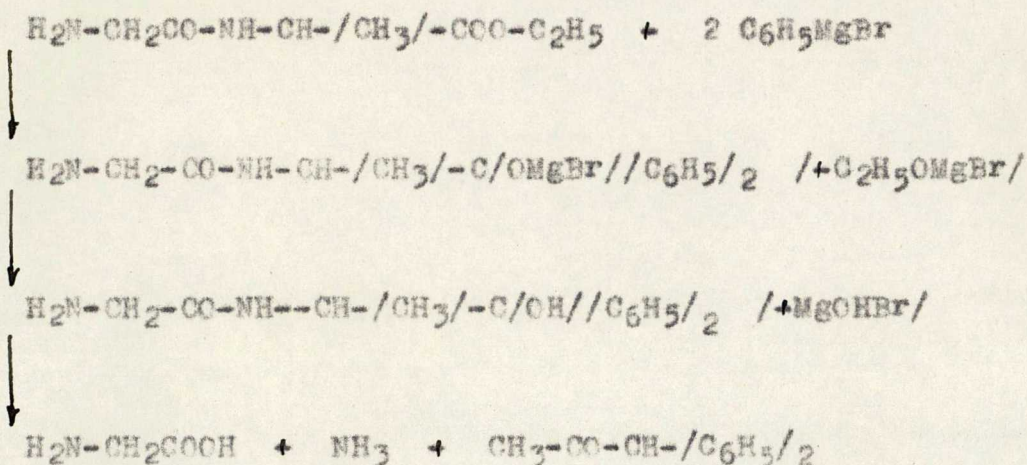
Ez a módszer nagymértékben hasonlít az izocianátos aminovégcsoport meghatározáshoz. SCHLACK és KUMPF /68/ vezette be benzoilleucil-glicin és benzoil-triglicin elemzésénél.



d. Grignard-reakció.

E módszert akkor szokták alkalmazni, ha a vizsgálandó szubsztrátum 100 mg-nál kisebb mennyiségben áll rendelkezésre. Ezért a módszer szemimikró méretű. Először BETTZICHE és MENGESER /69/ alkalmazták peptidek esetében,

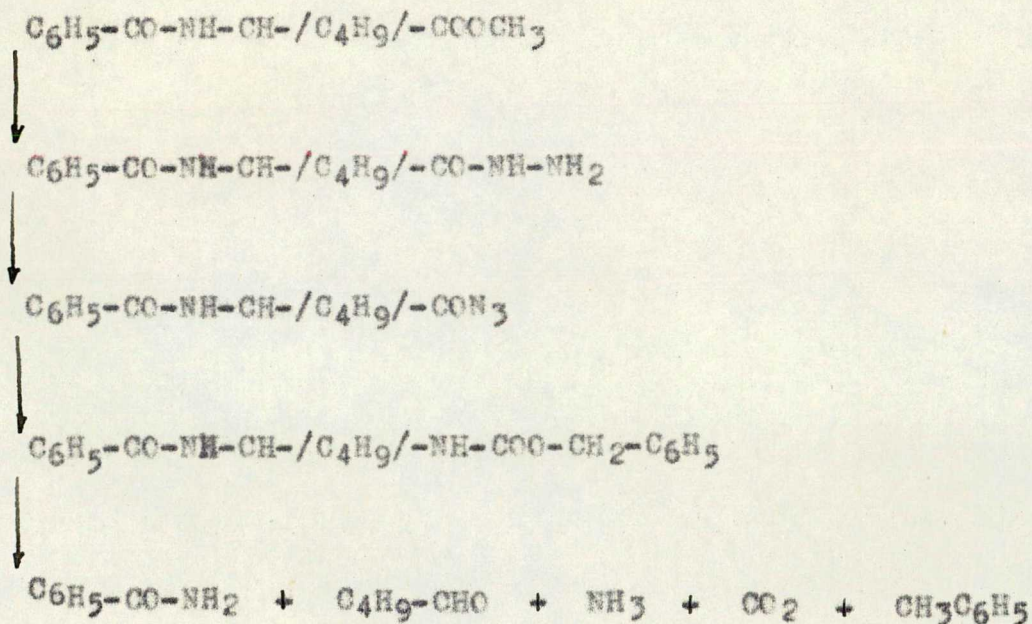
s végtermékként a megfelelő ketont nyerték.



A jelen példában a szerzők a difenilacetont 52 %-os nyeredékkal tudták előállítani.

e. Bergmann-Zervas lebontás.

Karboxil végcsoportok identifikálására a legelegánsabb módszer a Curtius lebontáson alapuló BERGMANN-ZERVAS lebontás /70/. A reakció lényegét a következő reakcióegyenletek szemléltetik:



A reakcióegyenletek értelmében a peptidesztert benzoilálják, hidrazinnal azidóá, majd benziluretánná alakítják, amelyet végül hidrogéneznek, s az eredeti terminális aminosavnak megfelelő eggyel kisebb tagszámú aldehidet nyerik.

A reakció során azaldehid 10 %-os mennyiségben keletkezett a kiindulási N-benzoil-leucin metileszterhez viszonyítva.

4. Egyéb módszerek.

4-1. Modellekkel történő összehasonlítás.

Ha erre mód nyílik, ismeretlen peptideket végcsoportjaik azonosítása céljából szintetikus eredetű modellvegyületekkel hasonlítják össze.

4-2. Van Slyke - analízis.

DIRR és FELIX /71/ klupeinból izolált hidroxiprolin-arginin dipeptid aminosavainak a meghatározására a Van Slyke-féle reakciót alkalmazta eredménnyel. E vizsgálat során csak a jelenlévő, illetőleg kötött állapotú aminoscsoportok számát határozták meg, és ezekből az adatokból következtettek a szóbanforgó dipeptid és más kisebb molekula termékek összetételére.

V.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALKALMAZÁSÁNAK

INDOKLÁSA.

Ismeretes a vvs-ek izoelektromos pontjából és elektroforetikus mozgékonyaságából, hogy felületükön nagyszámu karboxil csoportot tartalmaznak. E karboxil csoportok legnagyobb-részt zsírsavak alkotószerei [21]. Ezért célszerűnek látszik az ismertetett fehérje-végcsoportmeghatározási módszerek közül valamely aminovégcsoport-meghatározási módszert alkalmazni a korábbiakban ismertetett célokra.

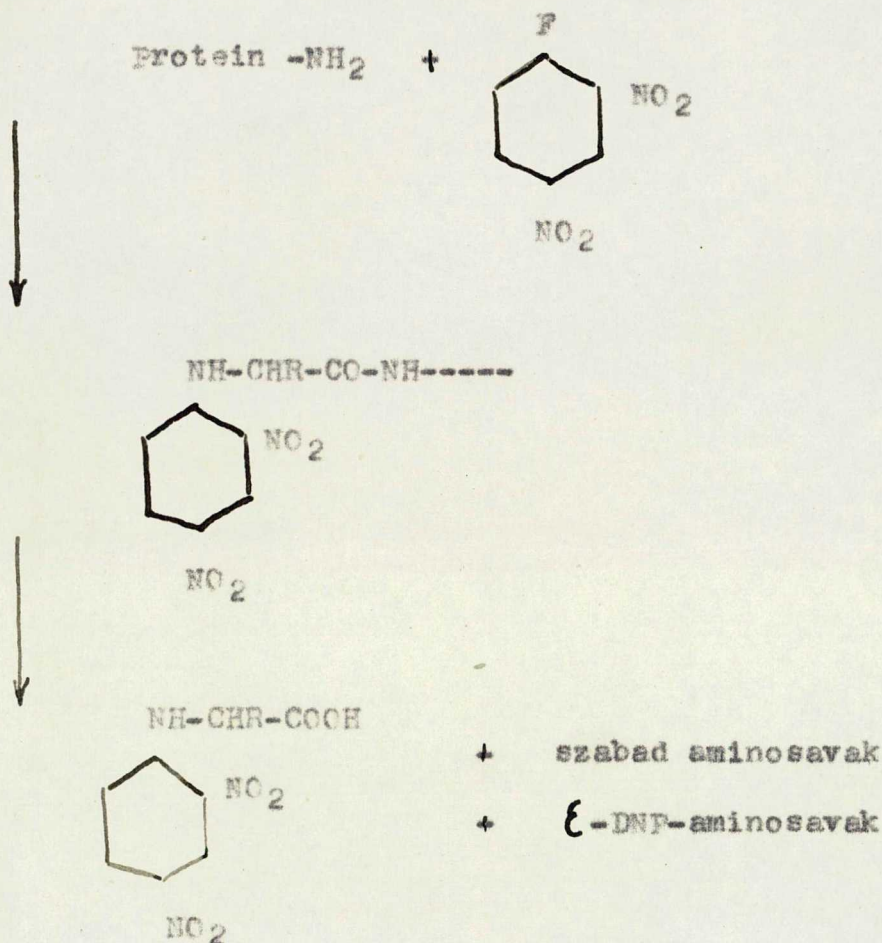
Ha tehát - a leírt megfontolások alapján - a vvs összefüggő (összefüggő) lipoid hárttyával rendelkezik, a felületen fehérjékből eredő aminovégcsoport nem foglalhat helyet. Ha a végcsoport meghatározás végcsoportok jelenlétére utal, az előbbivel ellentett hipotézis a valószínű, monovagy polimolekulás lipoid hárttya nem övezi a vvs-t, a membrán lipoidjai és sztromatin-fehérjéi egyaránt határozzák meg a felületet valamely másféle rendező elv alapján. E megállapítás természetszerűleg csak abban az esetben helyénvaló, ha bizonyítotttnak tudhatjuk, hogy az aminovégcsoport meghatározás reagense adott reakciókörülmények mellett csak a felülettel lép reakcióba, annak a vvs belsejébe történő diffúziójára, így vvs-en belüli fehérjékkel való kölcsönhatásra nincs lehetőség.

E kísérletek elvégzésére megfelelőnek látszott a SANGER- /72/ által kidolgozott, s az ABDERHALDEN-féle dinitroklórbenzolos módszerből kialakított dinitrofluórbenzolos /DNFB/ aminovégcsoport-meghatározási módszer.

VI.

A SANGER-FÉLE AMINOVÉGCsoPORT-MEGHATÁROZÁS

LEIR/SA /73-98/.



A fenti kondenzációs reakció végrehajtására meghatározott mennyiségű /általában 50-500 mg/ proteint pH 7,0-9,5 között DNFB 5-10 %-os etilalkoholos oldatával 20-40°C-on 1-6 órán keresztül reagáltatjuk enyhe keverés közben. A reakciónak a lúgos pH-tartomány kedvez. Általában a vizsgálandó aminosav vagy fehérje természete szabja meg, hogy a megadott pH-, hőmérséklet-, reakcióidő-tartományon belül melyik bizonyulhat a legmegfelelőbbnek.

Reakció után az oldatot vagy szuszpenziót 5,7 N sósavval pH 3,0-ra savanyítjuk, a DNP-proteint vákuumban bepároljuk vagy lecentrifugáljuk attól függően, milyen állapota a kondenzált termék, majd éterrel, etilalkohollal vagy acetonnal mossuk a feleslegben alkalmazott DNFB eltávolítására. E mosást mindaddig megismételjük, amíg a mosófolyadék sárga színű. Mosás után a proteint 2-12 N sósavval hidrolizáljuk 37-105°C-on 0,15-12,0 napig szintén a protein vagy a DNP-aminosav természetétől függően.

A képződött DNP-származékok hidrolizise képezi az eljárás egyik leglényegesebb lépését. PORTER és SANGER vizsgálva a hidrolízis termékek állapotát, kémiai tulajdonságait, megállapították, hogy a DNP-aminosavak sósavas közegben a hidrolites reakció alatt többé vagy kevésbé bomlanak, és a bomlékonyságuk felépítésük függvénye. Adataikat a 3. táblázat foglalja össze.

DNP-aminosavak	Hidrolízis 5,7 N HCl-al 10 óra	Kitermelés %	Hidrolízis 12 N HCl-al 105°C-on 16 óráig Kitermelés %
DNP-alanin	12	80	75
DNP-arginin	12	90	75
DNP-aszparaginsav	24	60	75
di-DNP-cisztin	12	25	0
DNP-glutaminsav	12	75	75
DNP-glicin	8	40	50
DNP-oxiprolin	4	40	50
DNP-izoleucin	12	80	75
DNP-leucin	12	80	75
di-DNP-lizin	8	95	75
DNP-lizin	12	95	75
DNP-metionin	12	75	75
DNP-fenilalanin	12	70	50
DNP-prolin	2	10	50
DNP-szerin	12	90	75
DNP-treonin	24	90	75
DNP-triptofán	12	90	0
DNP-tirozin	12	75	50
DNP-valin	12	80	75

Mivel a hidrolízis útján keletkező DNP-származékok legnagyobbbrészt éter, etilacetát, etilalkohol oldékonyak, a hidrolizátumnak ezen poláros oldószerekkel történő extrakciója, és ezáltal a DNP-származékoknak a hidrolizátumból történő kinyerése könnyen kivitelezhető, /6-8-szoros kirázás/.

Ismeretesek olyan DNP-aminosavak, amelyek az említett oldószerekben nem oldódnak. A DNP-hisztidin, DNP-triptofán például éterben egyáltalán nem, a DNP-arginin csak kismértékben oldódik, a leggyakrabban alkalmazott éteres extrakció esetében a vizes oldatban marad oldva. Ezek a tényezők a módszer szempontjából további figyelmet igényelnek, s adott esetben egyéb extrakcióknak az előbbivel történő kombinálását teszik szükségessé.

A hidrolizátumból ezen az uton elválasztott DNP-származékok keveréke további elválasztást igényel. Leggyakrabban oszlopkromatográfiát vagy papirkromatográfiát alkalmaznak.

A bázikus aminosavakból a DNFB-es reakció során keletkező, legtöbb esetben nem aminovégcsoportot jelentő ξ -DNP-származékok, főként ξ -DNP-lizin előzetes elválasztására talakumon savanyu közegben végrehajtott oszlop-kromatográfiával nyilik lehetőség. Papirkromatográfia alkalmazása esetén ilyen előzetes elválasztás nem történik,

az ϵ -DNP-származékoknak a szűrőpapíron elfoglalt diszkrét helye jelzi azok jelenlétét.

A DNP-származékok elválasztására alkalmazott oszlop-kromatográfia esetében adszorbensként szilikagél, talkumot, diatómaföldet, celitet, alloprént, különböző puffer-oldatokkal kezelt egyéb anyagokat használnak. Szolvensként pedig etilacetátot, etilacetát-butanol elegyét, kloroformot, étert, különböző pH-ju foszfát puffereket, stb. alkalmaznak.

Papirkromatográfiás uton történő elválasztás esetében főként Whatman No 4. és Schleicher-Schüll 2043 a és b -t alkalmaznak természetes állapotban vagy különböző anyagokkal történő előkezelés után. Oldószerként pedig vízzel telített n-butanolt, n-butanol-n-butilacetát-NH₄OH, benzol-ecetsav, n-butanol-jégecet-víz, n-butanol-NH₄OH-víz elegyét, és a legkülönbözőbb speciális feladatok elvégzésére pedig a legkülönbözőbb egyéb oldószereket vagy azok elegyét. Ismeretesek olyan eljárások, amelyeknél - elsősorban kétdimenziós futtatás esetében - mind a 20-22 aminosav egymástól eltérő R_f-értékkel vándorol, mindegyik egyetlen kétdimenzióban történő futtatással egymástól elkülöníthető. Az alábbi 4. táblázat az aminosavak R_f-értékeit tünteti fel különböző oldószerekben.

Mivel a DNFB és származékai fényérzékenyek, célszerű a kondenzációs reakciót és a termékek szétválasztását fénytől védett helyen végezni.

DNP-származékok	Oldószerek			
	A	B	C	D
DNP-amin	90	97	96	88
DNP-leucin	74	71	70	75
di-DNP-tirozin	78	90	33	70
DNP-isoleucin	73	70	70	-
di-DNP-lizin	72	81	11	61
DNP-fenilalanin	71	70	55	68
DNP-triptofán	70	68	28	-
DNP-valin	68	47	63	66
DNP-metionin	65	48	47	59
DNP-hidroxiid	56	25	99	59
DNP-alanin	50	18	28	48
DNP-prolin	48	17	44	50
DNP-treonin	43	12	0	39
DNP-glicin	36	8	7	36
DNP-szerin	32	6	0	25
DNP-glutaminsav	14	0	0	12
DNP-aszparaginsav	12	0	0	11
di-DNP-hisztidin	35	50	0	51
DNP-arginin	37	0	0	50
DNP-ε-lizin	32	5	0	-
DNP-α-lizin	33	0	0	-

4. táblázat.

Ahol a táblázatban szereplő oldószerek:

A. vízzel telített n-butanol.

B. n-butanol:n-butylacetát:1% NH_4OH = 1:2:3 /amelyet
használat előtt 18 órával készítünk el/

C. benzol:1% ecetsav = 1:1

D. n-butanol:1% NH_4OH = 1:1

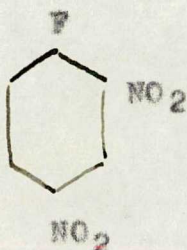
VII.

PELHASZNÁLT ANYAGOK, ÉS AZOK ELŐÁLLÍTÁSA.

1. Vörösvérsejt.

Megfelelő kísérleti céljainkra bármely vércsoportba tartozó normál állapotú emberi vér, amelyet citrát pufferben fogtunk fel alvadás elkerülése céljából. A citrátos vért azután szobahőmérsékleten 2000 ford/perc sebességgel lecentrifugáltuk, és fiziológiás konyhasóval mostuk ismételt centrifugálás útján mindaddig, amíg a mosófolyadék valamely fehérje reakcióval nem jelezte a vérplazma-fehérjék teljes eltávolítását. Ezután a mosott vvs-eket fiziológiás konyhasó oldatban hűtőszekrényben tároltuk. Lehetőséghez mérten mindig friss készítményt használtunk fel kísérleteinkhez.

2. Dinitrofluorbenzol/DNFB/.



Ms. 186,10

Cp. 24,3°C

/Merck-készítmény./

3. Fiziológiás állapotú karbonát-hidrogénkarbonát puffer.

0,1 M NaHCO_3 és 0,05 M Na_2CO_3 oldatokból pH 8,0-ás puffer oldatot készítettünk el, és annyi NaCl-et oldottunk fel benne, amennyi a fiziológiás oldat ionerősségének felel meg /0,125 M, 0,95 % NaCl/.

4. Éterben oldódó lipoidoktól mentes sztróma.

10 ml lecentrifugált vvs-péphez hozzáadtunk 20 ml fiziológias, karbonát mentes konyhasó oldatot és 10 ml étert. E rendszert 5 percig rázógépből ráztuk, majd 3000 ford/perc sebességgel 10 percig centrifugáltuk. A centrifugálás után 3 fázist nyertünk, a felső lipoid tartalmu éteres fázist, az alsó vizoldékony hemolizis-termékeket /főként Hb-t/ tartalmazó vizes fázist, s a két folyadék határfelületén rózsaszín gyűrű alakjában a szilárd sztrómát. A sztrómát a két folyadékfázistól elválasztottuk, és a fenti kezelést még ötször megismételtük, és az oldatokat összegyűjtöttük. Végezetül sárgás-fehér éteroldható lipoidoktól és Hb-től mentes sztrómát nyertünk, ezt fiziológias konyhasó oldatban szuszpendáltuk, 37°C-on 10-15 percig szárítottuk, és hűtőszekrényben tároltuk.

5. Éterben oldódó lipoidok.

A 4. alatt nyert éteres extraktumot 35-37°C-on bepároltuk, a terméket exikátorban szárítottuk, és hűtőszekrényben tároltuk.

6. Éteres hemolizátum.

A 4. alatt előállított nagy Hb-tartalmu vizes oldatot 35-37°C-on 10-15 percig szárítottuk az éter

elűzéséig, s a továbbiakban e vizes oldatot dolgoztuk fel.

7. A papirkromatográfiánál alkalmazott szolvensek.

a. Azonos mennyiségű n-butanolt és 0,1 súly%-os vizes NH_4OH oldatot összeráztunk, a két fázist egymástól elválasztottuk, és a felső fázist oldószerként, az alsót pedig telítőként alkalmaztuk.

b. 6,0 pH-jú foszfát puffer elkészítése céljából 1 M NaH_2PO_4 -ot és 0,5 M Na_2HPO_4 -ot 1000 ml desztillált vízben oldottunk fel.

c. Egyenlő súlyrészben összeráztunk i-amilalkoholt és 5%-os ecetsavat, és a két elkülönülő fázist olymódon alkalmaztuk, mint a. esetében.

8. Felhasznált egyéb anyagok.

5,7 N sósav és 0,88 fs-u NH_4OH oldat hidrolízis céljára. 1 %-os ninhidrin vizes, illetőleg n-butanolos oldata aminosavak és fehérjék kimutatására.

VIII.

A SANGER-FÉLE MÓDSZER ALKALMAZÁSÁNAK

NEHÉZSÉGEI.

Az ismertetett SANGER-féle módszernek vvs esetében történő alkalmazása, a végcsoport-meghatározás kivitelezése többhelyütt a vvs károsodását, hemolizisét, azaz denaturálódását jelenti. Ezért a módszer módosításra szorul.

1. Reakció-közeg.

Az első nehézséget a kondenzációs reakció közege jelenti. A módszer szerint a reagens alkoholos oldata vesz részt a reakcióban, ugyanis a DNFB vízben csak igen kismértékben oldódik. Ez az oldat azonban a végcsoport-meghatározást célzó reakció n kívül a vvs felületi lipoidjainak igen számottevő részét is képes kioldani, amely természetszerűleg a felületi sajátságok megváltozását, hemolizist eredményez. Ennek kiküszöbölésére a kondenzációt feltétlenül vizes oldatban kell végrehajtani, a reagensen kívül más organikus komponens távollétében.

Ebből a célból megkíséreltük a DNFB olyan vizes oldatát elkészíteni, amely még koncentrációjára nézve a reakció szempontjából kedvezőnek bizonyul. Azt tapasztaltuk, hogyha DNFB-t 37°C-os termosztátban víz jelenlé-

tében 1 órán át keverünk, elkészíthető a reagens 1 %-os vizes oldata.

Ezután kísérleteket végeztünk abból a célból, hogy a DNFB 1 %-os vizes oldata alkalmas-e, s ha igen, mily nyeredékkal lép reakcióba különböző aminosavakkal. Vizsgálat tárgyává tettünk néhány neutrális, bázikus és savanyu karakterű aminosavat, így alanint, szerint, valint, leucint, hisztidint, arginint, ciszteint, aszparaginsavat. Azt tapasztaltuk, hogy bármely DNP-származék 70-90 %-os kitermeléssel ilyen hig oldatban is előállítható, és ezek az értékek nem alacsonyabbak az alkoholos oldatban nyert értékeknél.

2. A reakció hőmérséklete.

A vvs-ek igen alacsony hőmérsékleten /0°C alatt/ és relative magas hőmérsékleten /46-60°C-on/ hemolizálnak. Mindennemű hőmérséklet útján bekövetkező károsodás elkerülése céljából reakció hőmérsékletül a fiziológias állapot hőmérsékletét, s a fent leírt 1 %-os DNFB oldat telítési hőmérsékletét /amely azonosnak adódott/, 37°C-t választottunk.

3. A reakció pH-ja.

Mint már említettük, a kondenzációs reakciónak a pH 7,0-9,5-ös tartomány kedvez. A vvs esetében azonban

a reakció pH-ja nem növelhető tetszés szerint, mivel pH 9,0 fölött hemolizissal kell számolni. Ezért a reakció pH-jául közbűlső értéket, pH 8,0-t választottunk, melyet a korábbiakban leírt hidrogénkarbonát-karbonát pufferrel állítottunk be.

4. A reakció ideje.

A vvs-nek a reakció során - mint említettük - bármely effektus eredményeként bekövetkező hemolizise nem értékelhető kísérletet jelent, mivel a hemolizis során felszínre kerülő sejt-alkotórészek /elsősorban a Hb/ aminosavak tartalmazzák. Ezért kísérletet végeztünk abból a célból, a fenti kísérleti körülmények között véghezvitt DNFB-os kezelés okoz-e egyáltalán, s ha igen, mely időben hemolizist. Az VII. fejezetben leírt módon előkészített 10 ml vvs-péphez 50 ml 1 %-os DNFB és NaCl-ra nézve fiziológias /izotóniás/ oldatot adtunk, s 37°C-os termosztátban enyhén kevertük. E kísérletből kiderült, hogy 60 percig semminemű hemolizis nem következik be, a sejtek nem károsodnak, a rendszer lecentrifugálása után nyert felüluszó folyadék fehérjét vagy aminosavat nem tartalmaz /ninhidrin-próba/. a 65-70. percben a vvs belsejéből Hb-molekulák jutnak az oldatba. E tény alapján tehát a reakció időtartama

nem haladhatja meg a 60 percet 37°C-on. Ha figyelembe vesszük, hogy a szobahőmérsékleten 2-3 óra a kondenzáció gyakorlatilag teljes /72/, 37°C-on 60 perc alatt is gyakorlatilag teljesnek tekinthető. E feltevést LEVY kísérleti adatai is alátámasztották /83/.

5. A kondenzált termék tisztítása.

Az említett okoknál fogva a kondenzáció után főlésslegben visszamaradt DNFB eltávolítása /tehát a kondenzációs reakció letörése/ sem történhet organikus oldószerrel vagy a pH megváltoztatásával.

E probléma megoldására kísérleteket végeztünk a főlésslegben visszamaradt DNFB-nak fiziológias konyhasó oldattal történő eltávolítására. Azt tapasztaltuk, hogy a kondenzációs terméknek 37°C-os hőmérsékletű fiziológias konyhasó oldattal történő mosása /a vvs-ek 6-8-szori szuszpendálása és centrifugálása/ a tisztítás olyan hatásfokával jár, mint az egyébként szokásos 6-8-szoros éteres vagy alkoholos extrakció, tehát a papirkromatográfia során szétválasztott, és a későbbiek során leírt DNP-származékok között a főlésslegben visszamaradó dinitrofenol /DNFB hidrolizis terméke/ e termékek között nem volt fellelhető.

6. A DNP-vvs hidrolízise.

A DNP-vvs-et és a vvs különböző részeinek DNP-

származékait minden esetben 5,7 N sósavval 105°C-on 6 órán keresztül hidrolizáltuk. Az ily módon reaktív hidrogénion-koncentráció, a hidrolízis reakcióideje az irodalomban leírt feltételek középértékének tekinthető, és egyben a legáltalánosabban alkalmazott feltételeket elégíti ki.

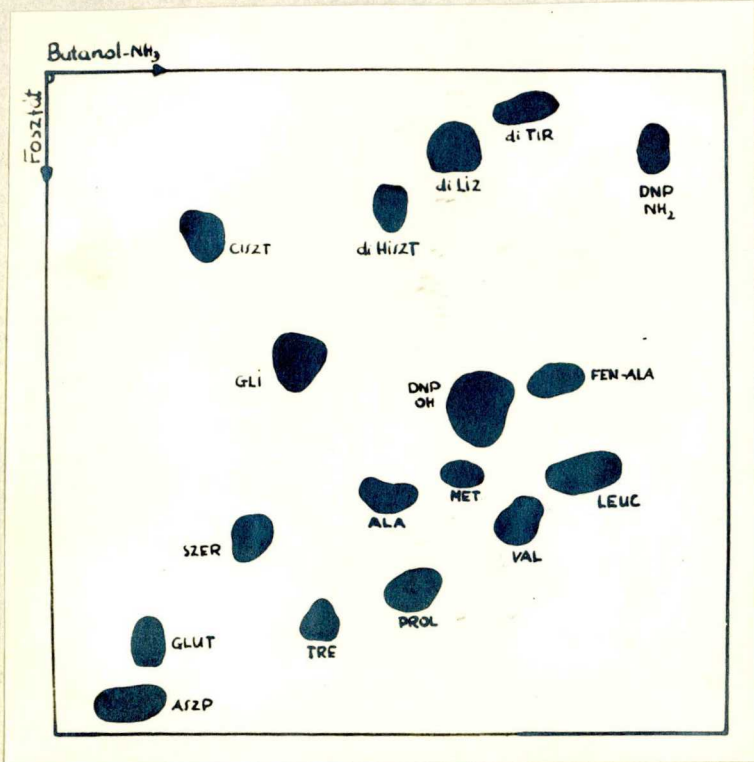
7. A DNP-származékok elválasztása.

A DNP-származékok elválasztására, minőségi meghatározására legegyszerűbbnek és leggyorsabbnak papirkromatográfiás módszer alkalmazása látszott. Ezért kísérleteink során a KOCH és WEIDEL /99/ által leírt kétdimenziós módszert alkalmaztuk, amelynél szolvensként a VII. fejezet 8. pontjának a. és b. anyagát alkalmaztuk. A termékek identifikálása kétféleképpen történt:

a. Koch és Weidel által, továbbá Levy által /83/ közölt DNP-aminosavak lefutási térképei alapján.

b. Modellvegyületeknek a kérdéses DNP-származékok mellett és azokkal együtt történt futtatása által.

A Koch-Weidel féle térképen szereplő DNP-aminosavak képét az b. ábra mutatja.



1. ábra

IX.

A NATIV VVS KEZELÉSE DNFB-AL.

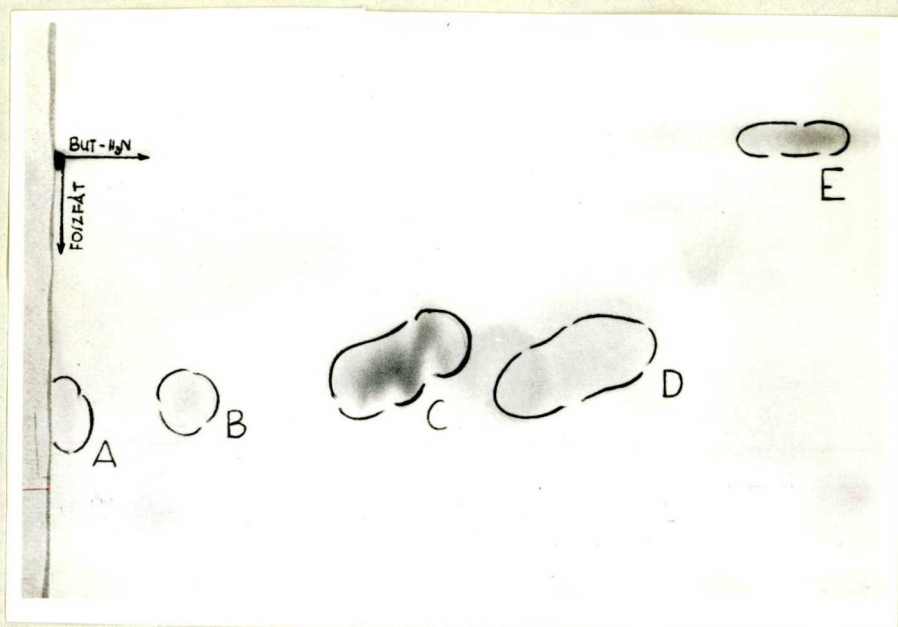
A fenti szempontok figyelembevételével a nativ /normál állapotú/ vvs-eken a következőképpen hajtottunk végre SANGER-féle aminosavcsoport-meghatározást:

A VII. fejezetben leírt módon előkészített vvs-pép 10 ml-éhez hozzáadtuk a DNFB olyan 1 %-os vizes oldatát, amely NaCl-tartalomra nézve fiziológiás állapotú volt, és amely hidrokarbonát-karbonát tartalma 8,0 pH-t eredményezett /0,15 M/. A rendszert 37°C-os termosztátban pontosan 60 percen keresztül enyhén kevertük. 60 perces reakció után a terméket 37°C-os centrifugában /MSR-rendszerű hűthető-fűthető szupercentrifuga/ 3000 ford/perc sebességgel lecentrifugáltuk, s a felüluszó folyadékot elöntöttük. Ezután a kezelt vvs-eket 37°C-os fiziológiás konyhasó oldattal a fölösleges DNFB eltávolítására 8-szor mostuk, és ismételten centrifugáltuk. Az utolsó centrifugálás után a mosófolyadék DNFB-t már nem tartalmazott. A kezelt vvs-péphez ekkor hozzáadtunk 50 ml 5,7 N só-savat, s leforrasztott csőben 105°C-on 6 órán keresztül hidrolizáltuk. Hidrolízis után a termék pH-ját szilárd NaOH-al hűtés közben pH 3,0-ra állítottuk be, 5000 ford/perc sebességgel lecentrifugáltuk, s a sárgaszínű felüluszó folyadékot 6x10 ml éterrel extraháltuk. A sárga DNP-származékokat tartalmazó éteres oldatot 4000-on



1/10-ére bepároltuk, s ezt az oldatot használtuk fel a termék szétválasztását célzó papirkromatográfia céljaira.

A papirkromatográfiát Schleicher-Schüll 2043 b papíron hajtottuk végre kétdimenzióban, ahol mindkét dimenzió leszálló frontot jelentett. A papír mérete a startpontoktól számítva 36x36 cm volt. Az első dimenzióban $\text{nutanol-H}_3\text{N}$, a második dimenzióban 1,5 M foszfát puffer szolgált oldószerül. A natív vvs-ből előállított kétdimenziós kromatogramot a 2. ábra tünteti fel.



2. ábra

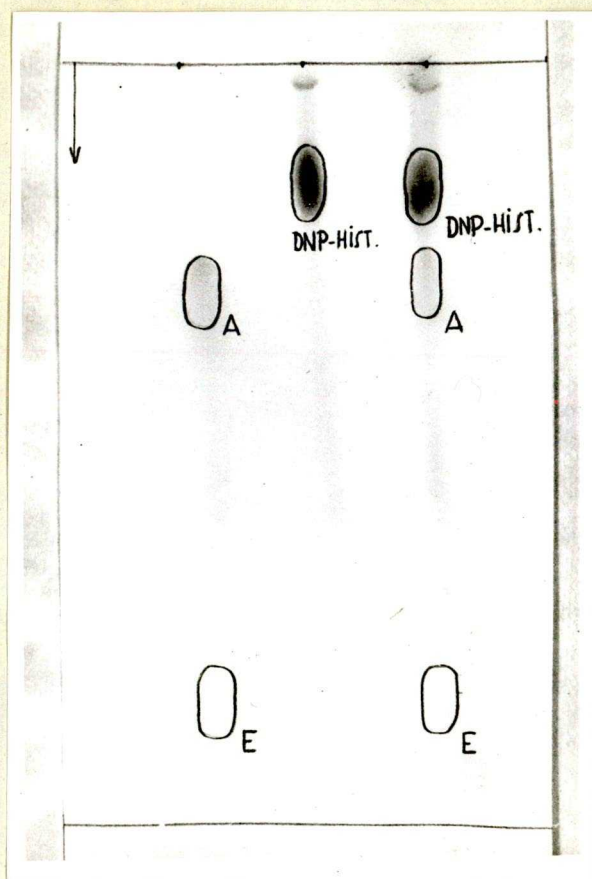
Az ábrán látható kromatogramm csak hozzávetőleges értékelésre nyújtott lehetőséget. A különböző DNP-származékok identifikálása céljából további vizsgálatok elvégzése, feltételezéseink megerősítése bizonyult szükségesnek. A foltok egyenként történő további értékelését a következő fejezetek tárgyalják.

1. A-jelzésű termék vizsgálata.

Az **A** foltot képező DNP-származék butanol- H_3N -ban egyáltalán nem vagy csak kevéssé fut, R_f -értéke további megismételt futtatások alkalmával 0-5 között változik /a fronttól futó anyag R_f -értéke 100/, míg mozgékonyasága foszfát pufferben közepes. Ezután a foltot a kromatogrammból kivágva megkíséreltük éterrel eluálni, amé y azonban sikertelennek, míg vizes extrakció sikeresnek bizonyult. Az extrahált terméket ezután 0,88 fs-u NH_4OH -al $105^{\circ}C$ -on 6 órán keresztül hidrolizáltuk a kondenzáció útján képződött kötés elbontására, a szabad aminosavvegyület előállítására érdekében/100/. Hidrolizis után a terméket vízfürdőn bepároltuk, a bepárlási maradékot vízben oldottuk, és ninhidrin pró bának vetettük alá, amely ez esetben pozitívnak bizonyult, bizonyosságául annak, hogy aminosavval állunk szemben.

Szemügyre véve a DNP-aminosavak oldékonyságát,

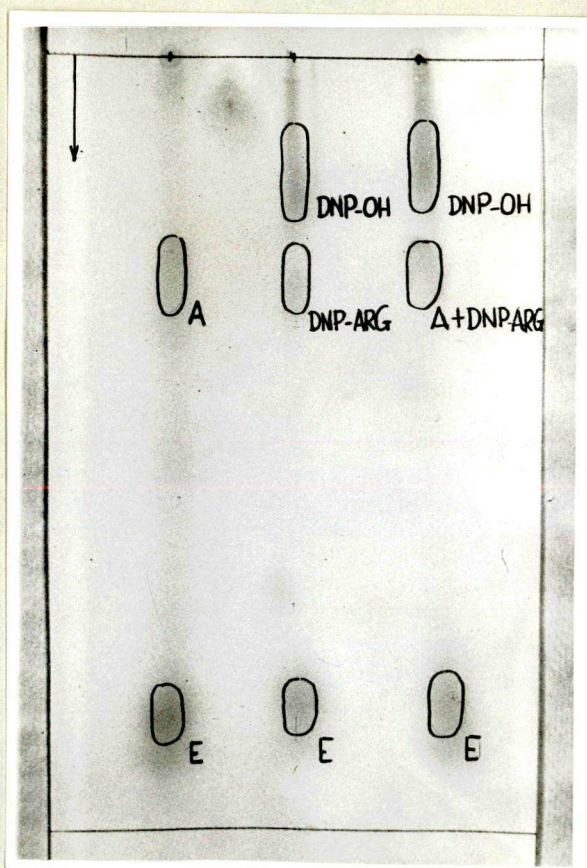
látható, hogy a DNP-hisztidin, a DNP-triptofán egyáltalán nem, míg a DNP-arginin csak csekély mértékben oldódik éterben. A DNP-triptofán mozgékonyasága butanol- H_3N -ban a Koch-Weidel féle térkép alapján jóval nagyobb az általunk észlelténél, míg a másik két aminosav DNP-származéka egyáltalán nem vándorol. Ily módon elkészítettük modellvegyületként a DNP-hisztidint és DNP-arginint, és összehasonlítottuk a natív vvs-ből nyert A folttal. Mivel az említett oldószerben a vegyület mozgékonyasága nulla, BLOCK /101/ szerint i-amilalkohol:5% ecetsav - 1:1 arányu elegy organikus fázisában futtattuk a terméket felszálló front utján. Az ily módon egydimenzióban kifejlesztett kromatogramot a 3. ábra mutatja.



3. ábra

A 3. ábrán feltüntetett kromatogram és minden további összehasonlító egydimenziós papírkromatográfiás vizsgálat esetében a kérdéses vegyületek 3 sorban futottak, amelynél balról jobbra az ismeretlen-, illetőleg a modellvegyület, illetőleg az előző kettő együttesen foglalt helyet a startpontokon.

A szóbanforgó ábrán látható, hogy a modellvegyületként alkalmazott DNP-hisztidin nem azonos A-val. Ezért következőként az ismeretlen A aminosavat DNP-argininnel hasonlítottuk össze, és az alábbi kromatogramot nyertük:



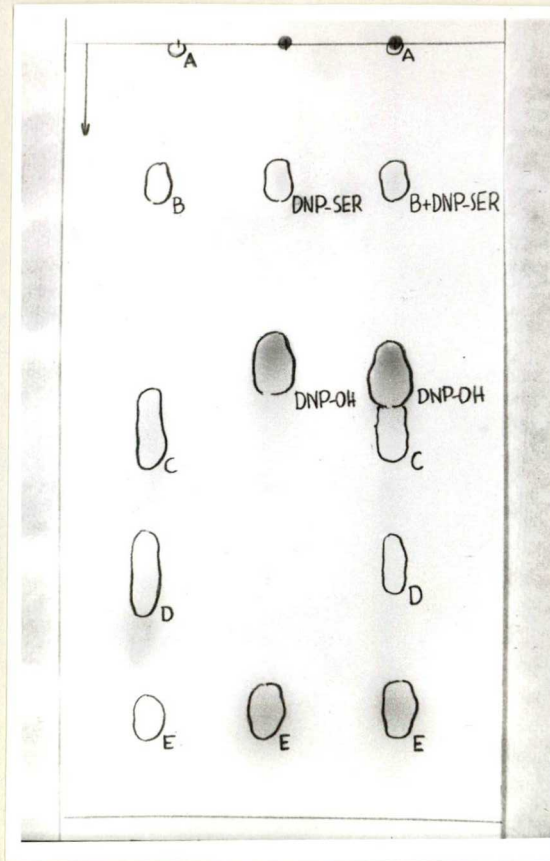
4. ábra

Az ábrából kitűnik, hogy az A anyag a DNP-arginin modellvegyülettel azonos mozgékonyssággal rendelkezik. A fenti megfigyelések alapján tehát, amelyek szerint az A DNP-származék a Koch-Weidel féle butanol- H_3N oldószerben egyáltalán nem vándorol - amelyet a DNP-hisztidinnel együtt ezért a szerzők térképükön nem is tüntettek fel -, továbbá, mivel az e vegyületek számára speciális oldószerben azonos lefutásuak, megállapíthatjuk, hogy az A vegyület DNP-arginin bázikus aminosav.

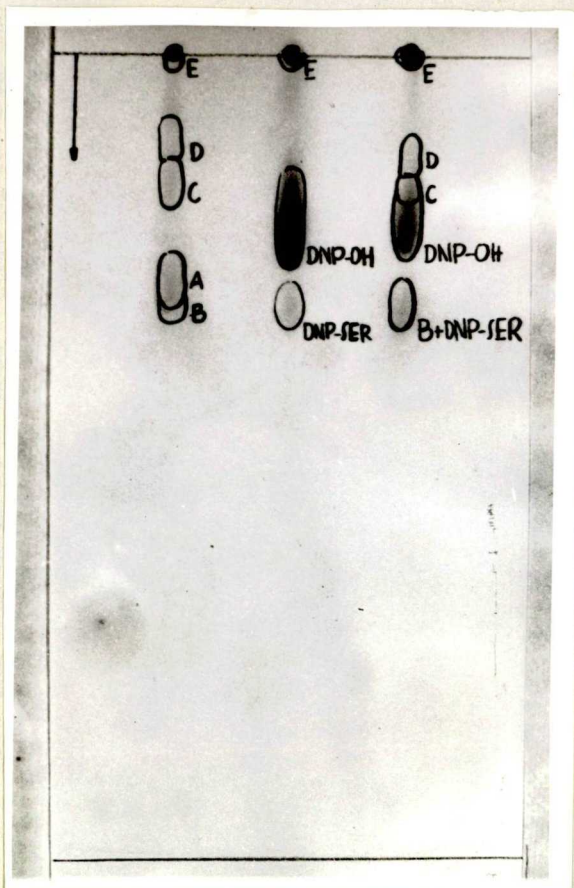
2. B-jelzésű termék vizsgálata.

A B DNP-származék R_f -értéke butanol- H_3N -ban 22-24-nek bizonyult, a kétdimenziós aminosav-térkép alapján DNP-szerin. E megállapítás alátámasztására elkészítettünk modellként DNP-szerint, s a modellvegyület mellett, illetőleg egymásban futtattuk a termékeket butanol- H_3N -ban. A kromatogramot az 5. ábra tünteti fel.

Látható, hogy a B folt együttesen fut a DNP-szerinnel. Ezért, ha a második dimenziót jelentő foszfát pufferben is azonos mozgékonyssággal rendelkezik a két vegyület, megállapítható, hogy a natív vvs B származéka a DNP-szerinnel azonos. A 6. ábrán feltüntetett kromatogramm e feltételezés igazolását jelenti.



5. ábra

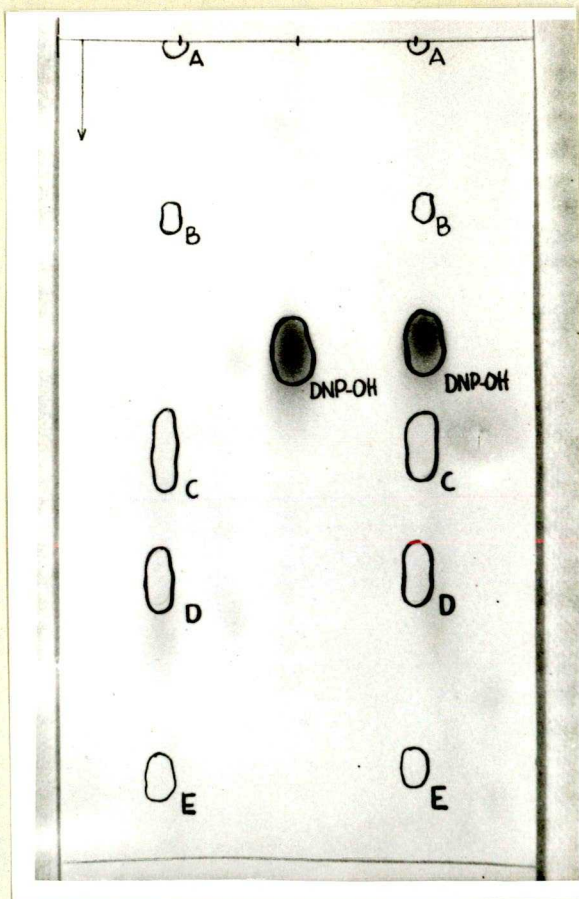


6. ábra.

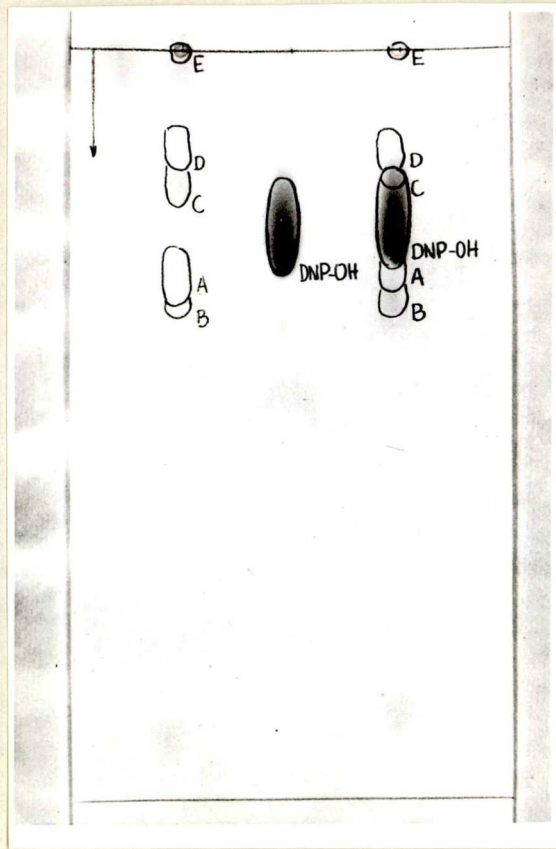
3. C-jelzésű termék vizsgálata.

A normál állapotú vvs kondenzációs reakciója útján nyert C származék a fentiekben leírt éteres extrakció és lúgos hidrolízis után ninhidrin-negatívnak bizonyult. Ennek alapján két feltevés lehetséges. E C folt R_f -értéke alapján, amely 52-nek bizonyult vagy a kondenzációs reakció után nem teljes egészében eltávolított DNFB hidrolízis termékeként dinitrofenolt jelent, vagy pedig - mivel az aminosav-reakció negatívnak bizonyult -

valamilyen más, föltehetően a vvs lipoidjaiból eredő amin DNP-származékát jelenti. A következőkben feltüntetett 7. és 8. ábrából - amelyeken DNP-OH modellvegyülettel együttesen futattuk a kezelt vvs-származékokat butanol- H_3N -ban, illetőleg foszfát pufferben - kitűnik, hogy a keletkezett C vegyület nem azonos DNP-OH-al, föltehetően karboxil csoportot nem tartalmazó valamilyen más amino vegyülettel állunk szemben. Mivel kezdeti célkitűzésünk értelmében e vegyület további tulajdonságai különböznek, ezért további elemzésétől eltekintettünk.



7. ábra



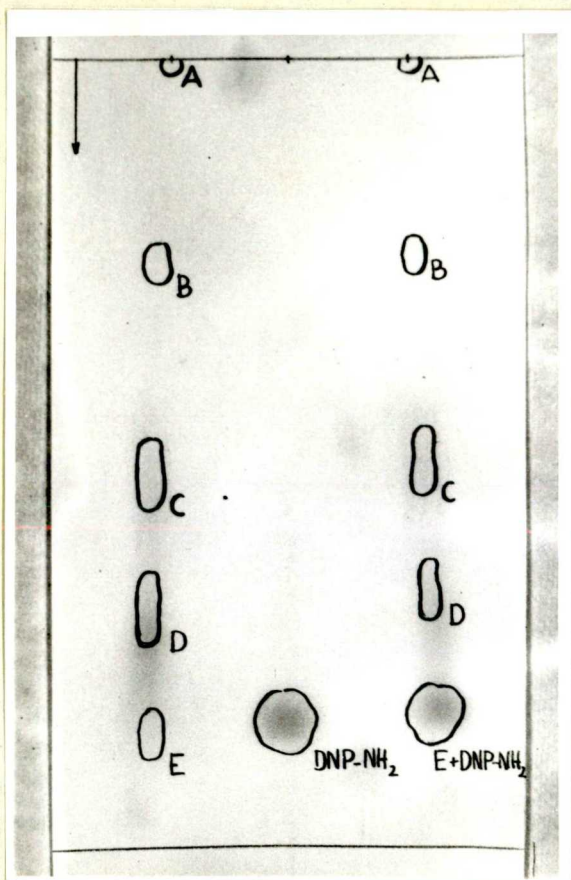
8. ábra

4. D-jelzésű termék vizsgálata.

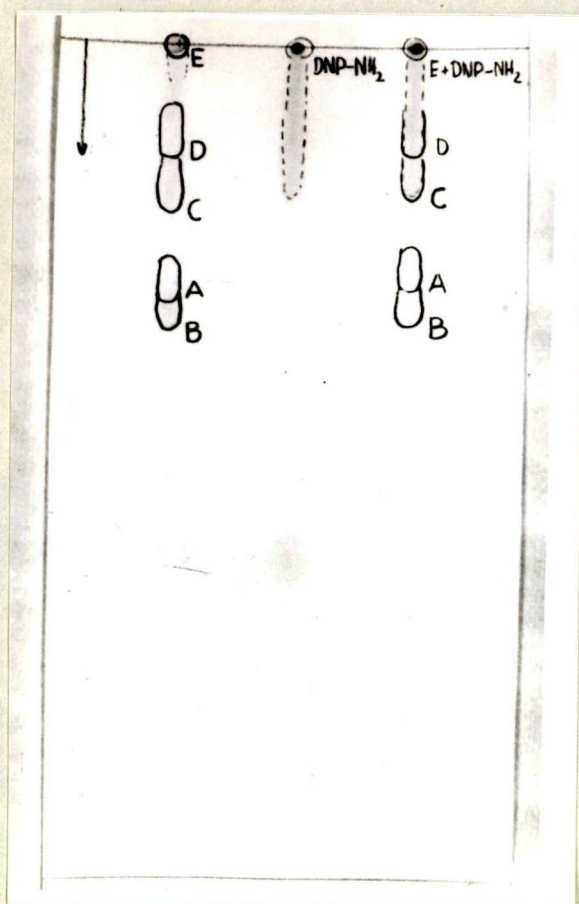
E vegyület elemzését hasonlóképen végeztük, mint C esetében. Megállapítottuk, hogy a 68-as Rf-értékkel rendelkező származék nem aminosav karakterű vegyület, tehát valószínűség szerint a vvs-nek nem valamely proteinje, hanem felületi lipoidja foglalja magában.

5. R-jelzésű termék vizsgálata.

Mint említettük, a DNP-proteinek hidrolizisekor azok többé vagy kevésbé bomlanak. A folyamat egyik legszármazottabb bomlásterméke a DNP-anilín, amely csaknem minden ilyen természetű elemzés esetén jól definiált, nagy mozgékonyaságú sárga foltot eredményez a kromatogrammon. További jellemzője, hogy míg butanol- H_3N -ban 83-85-ös R_f -értékkel vándorol /9. ábra/, foszfát pufferben vagy egyáltalán nem vagy elmosódó csóvájával válik ismertté /10. ábra/.



9. ábra



10. ábra

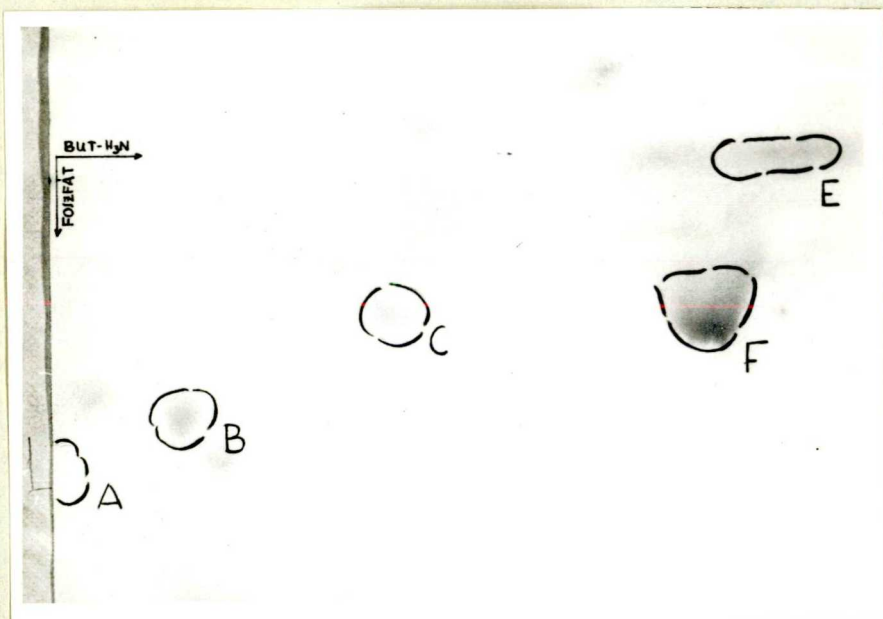
A natív vvs-ből képzett kromatogram E foltja az ábrák szerint szintén DNP-NH₂-t jelent, ninhidrin-negatív, vándorlási sebessége azonos a modellvegyületével.

A natív állapotú vvs-eknek a fentiekben leírt kezelését összesen 10 alkalommal különböző egyénekből eredő vér vvs-jeivel /akik vércsoportja különböző volt/ megismételtük, s az eredményeket minden esetben azonosnak találtuk.

X.

ÉTERBEN OLDÓDÓ LIPOIDOKTÓL MENTES
SZTRÓMA VIZSGÁLATA.

A VII. fejezetben leírt módon elkészített éterben oldódó lipoidoktól mentes sztrómán hasonlóképen hajtottunk végre kondenzációs reakciót, mint a normál állapotú mosott vvs-eken, amely reakciót azután további 9 esetben szintén megismételtünk. A normál vvs-ekhez történő összehasonlítás érdekében 10 ml vvs-pépből állítottuk elő megfelelő módon a lipoid mentes sztrómát. A kondenzáció, hidrolízis, tisztítás után a sztrómának hasonló elv szerint elkészített kétdimenziós kromatogramját a 11. ábrán feltüntetett fénykép szemlélteti.



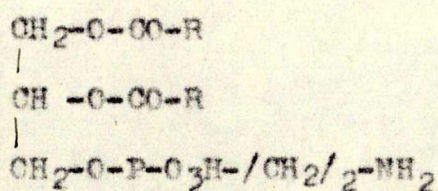
11. ábra

Az ábrából kitűnik, hogy a lipoid mentes sztróma a nativ vvs-hez hasonlóan 5 DNP-származék foltját tartalmazza, azonban e foltoknak nem mindegyike azonos az előbbiekkal. Mint látható, a sztróma A, B, C, E, foltja helyében és természetében megegyezik a nativ vvs hasonló betűvel jelzett foltjaival, tehát DNP-arginin, DNP-szerin, egy ismeretlen DNP-amin és DNP-NH₂ jelenlétével kell számolnunk. A különbség egyedül abban mutatkozik meg, hogy egyrészt a sztróma DNP-szerinje a nativ vvs-éhez viszonyítva hozzávetőlegesen 3-szoros mennyiségű, míg az ismeretlen amin mennyisége a vvs-lipoid éteres extrakciója alkalmával hozzávetőlegesen a felére csökken. Mivel a jelen munka csak elvi, szerkezeti probléma megközelítését, kizárólagosan kvalitatív vizsgálatok elvégzését célozza, a keletkezett DNP-származékok kvantitatív vizsgálatára kísérleteket nem végeztünk. Ennek ellenére azonban a kromatogramokon kifejlesztett foltok terjedelméből /átmérőjéből/, színintenzitásából ilyentermészetű összehasonlító megfigyelésekre nyílt lehetőség, annál is inkább, mert ezeknek elvi jelentőségét kellett tulajdonítanunk.

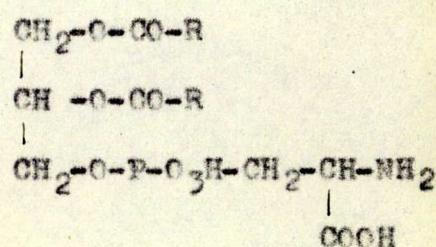
1. F-jelzésű termék vizsgálata.

A nativ vvs és az éteres sztróma 4. foltja mozgékonyságára nézve egymástól nagymértékben különbözik, míg a nativ vvs esetében ez 68-nak, a sztróma esetében 73-nak adódott.

Ismeretes, hogy a vvs-membrán lipoidjai nagymennyiségben tartalmaznak foszfatidokat, így elsősorban kefalint. E glicerín-foszfatida valamiféle életfunkciót végző szubsztrátumban általában kétféleképpen vesz részt, ugymint szerin-kefalin, illetőleg kolamin-kefalin alakjában a következő képletek szerint:

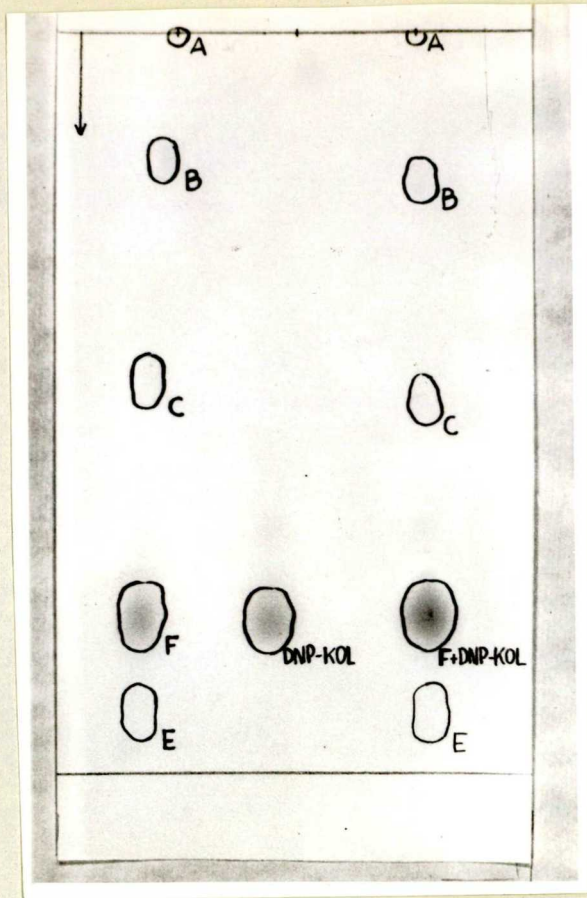


kolamin-kefalin

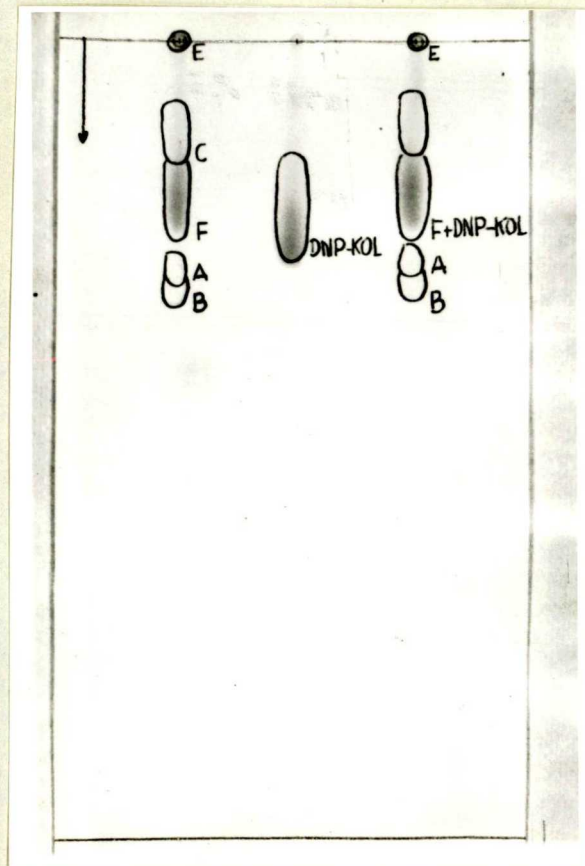


szerin-kefalin

Feltételezhető, mivel a vvs-lipoidok legnagyobb-részt a vvs-felületen találhatók, e kefalin is a membránt bizonyos részben felépítő lipoidok egyik alkotórésze. Ezért elfogadhatónak látszik az a feltevés, miszerint - ha natív vvs felületén nem is - a sztrómán képződő DNP-aminovegyületek egyike a kefalinból hidrolízis útján lehasadt DNP-kolamin /DNP-etanolamin/ lesz. Ennek értelmében a szóbanforgó DNP-származékot a leírt módon extraháltuk, lugosan hidrolizáltuk, bepároltuk /neutrizáltuk/, s ninhidrin reakciónak alávetve, azt negatív-nat találtuk. Ezután modellként DNP-kolamint készítettünk, s a megfelelő két oldószerben futtattuk a sztrómával párhuzamosan, illetve avval együtt. E két kromatogram képét a 12. illetőleg 13. ábra mutatja.



12. ábra



13. ábra

Az ábrákból kitűnik, hogy a sztróma ismeretlen
F feltja mind butanol- H_2N -ban, mindpedig foszfát
pufferben együtt fut a DNP-kolaminnal, amely értelmében
a fenti feltevésünket igazoltnak mondhatjuk.

/Meg kell jegyezni, hogy a DNP-származékok
identifikálása céljából előállított modell vegyületek
esetében a kondenzációs reakciót, a termékek tisztítását
hasonló módon végeztük, mint a natív vvs, illetve vvs-
alkotóelemek esetében./

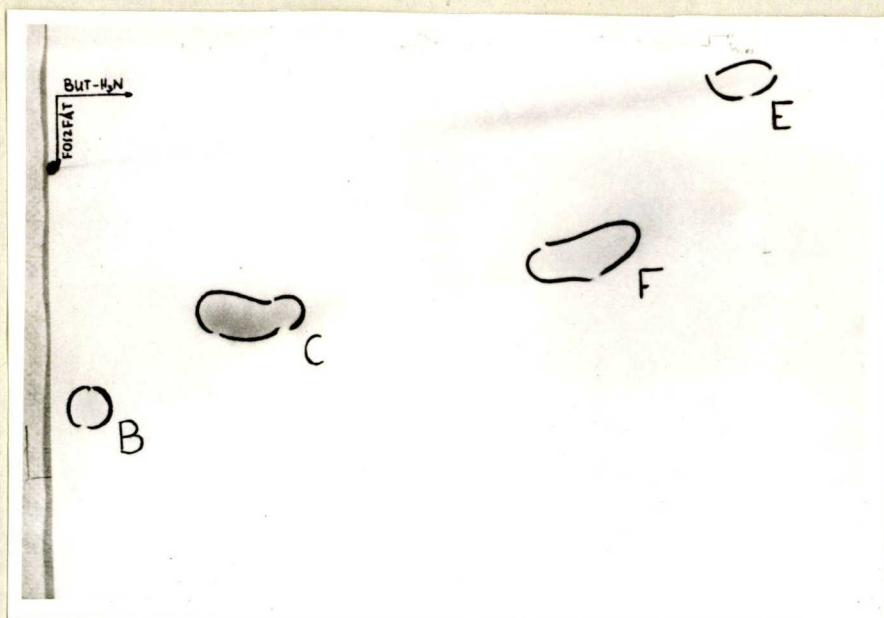
XI.

ÉTERBEN OLDÓDÓ LIPOIDOK VIZSGÁLATA .

Ha a natív állapotú vvs-eket éterrel extraháltuk, a vvs-ek felületén lévő és az elektroforetikus mozgékony-ságért elsődlegesen felelős lipoidok tetemes része a vvs-membránról leoldódott. Idézett szerzők szerint e li-poidok teljesen vagy egy részükben fehérjékhez kémiaiilag kötött formában, tehát lipoproteidek formájában fordul-nak elő. Mára a sztróma-fehérjék éterben nem oldódnak, mégis feltételezhető, hogy egyes zsírszerű anyagok éterben történő nagy oldékonysága folytán a lipoproteidek egy része éteres extrakcióval képes a sztróma felületéről leválni.

Ezért csak akkor mondhatjuk teljesnek a sztróma-fehérjék aminocsoportjairól alkotott képünket, ha vizsgál-lat tárgyává tesszük, hogy az éterben oldódó frakció a lipoid aminocsoportjain kívül tartalmaz-e olyan aminovégcsoportokat, amelyeket fehérjékből fehérjékhez rendelt aminosavak hordoznak. Ennek érdekében a VII. fejezetben leírt módon előkészített éter-extraktábilis lipoidokat hasonlóképen DNFB-al kezeltük, s az ismertetett vizsgálatot ezen a terméken is végrehajtottuk.

E termék kétdimenziós kromatogramját a 14. ábra szemlélteti /az oldó szerek mindkét dimenzióban megegyeztek az előbbiekkal/.



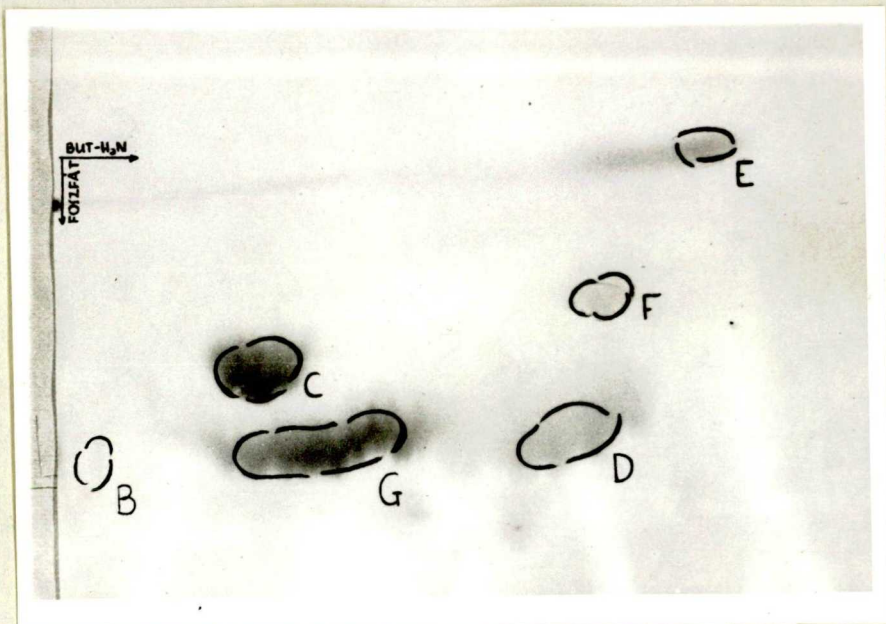
14. ábra

Látható az ábrából, hogy a kérdéses lipoid-frakcióban 4 szabad aminocsoport szerepel. DNP-szerin, egy ismeretlen nem aminosav karakterű amino származék, DNP-kolamin és DNP-NH₂, melyek mindegyike az előbbi termékek valamelyikében már szerepelt. E DNP-származékok közül csak az egyik, a DNP-szerin aminosav, mivel azonban e termék feltehetően a lipoidokban meglévő kefa-
lin egyik alkotórésze, továbbá mivel e frakcióban fehér-
jeszerű anyag jelenlétében egyéb aminovegyületeket, DNP-aminosavakat kellett volna nyernünk a szerin mellett, ebben a frakcióban tehát fehérje természetű anyagok jelenlétével nem kell számolnunk.

XII.

A HEMOLIZIS TERMÉKEINEK VIZSGÁLATA.

Végezetül DNFB-al történő aminovégcsoport meghatározásokat hajtottunk végre olyan vvs-hemolizátumon, melynek készítmódját a VII. fejezetben írtuk le. A végrehajtott kondenzáció, előzetes tisztítás és hidrolízis után nyert kromatogramot a 15. ábra tünteti fel.



15. ábra

Az ábrán 6 DNP-származék látható, melyből 5 /B, C, D, E, F/ megegyezik az előbbieket valamelyikével, a 6. G folt pedig nem. E folt Rf-értéke 56-nak adódott, ninhidrin-pozitív, az aminosav-térkép alapján valin. Mivel SANGER egyértelmű vizsgálatait értelmében /102/

az emberi vér Hb-ja 2 mól valin végcsoporttal rendelkezik, továbbá mivel a vvs-hemolizátum természetesen túlnyomórészt Hb, kromatogramunk ezen uralkodó foltjának további elemzésétől eltekintettünk, s e foltot DNP-valinnak fogadtuk el.

A fenti tények értelmében megállapíthatjuk, hogy a leírt úton előállított hemolizátum 2 szabad aminos csoportot jelentő aminosavval, a szerinnel és valinnal rendelkezik, ezen túlmenően pedig megtalálható még a kolamin szabad aminos csoportja 2 másik ismeretlen aminosavvegyület kíséretében.

XIII.

VIZOLDÉKONY DNP-SZÁRMAZÉKOK VIZSGÁLATA.

A SANCER-féle aminovégcsoport-meghatározás leírásánál említettük, hogy a reakció során keletkező lehetséges termékek közül néhány az általunk extraháló ágensként alkalmazott éterben nem oldódik, tehát extrakció után a sósavas hidrolízis vizes oldatában marad vissza. Ilyen elsősorban a DNP-hisztidin és DNP-triptofán.

Mivel a leirt kísérleteink során kizárólag étert használtunk DNP-származékok kinyerésére, szükségesnek bizonyult az előbbi két csakis vízben oldódó termék jelenlétére megvizsgálni az éteres extrakció után visszamaradt vizes oldatot.

E célból a következőképen jártunk el: Mivel nem célszerű a papirkromatográfiának alávetett oldatok ionerejét megfelelő érték fölé növelni, a jelzett oldatot, amely sósavra nézve 5,7 N volt, vákuumban sósavcsapda közbeiktatásával bepároltuk, a visszamaradt szilárd terméket desztillált vízben oldottuk, s papirkromatografáltuk a már ismert módon. A leírásunkban szereplő 4 vvs-frakció mindegyikével ezt végrehajtva azt észleltük, hogy a már ismert amino-vegyületeken kívül ujjabbal, így DNP-hisztidinnel és DNP-triptofánnal nem kell számolnunk, a vizes oldatokból csak egyetlen termék izolál-

ható, az éterben kismértékben oldódó, de az éteres extraktumban is megtalálható DNP-arginin. A vizes elemzésének eredményét az alábbi összefoglaló táblázat tünteti fel:

VVS-frakciók	DNP-származékok
Natív vvs	DNP-arginin
Sztróma	DNP-arginin
Lipoidok	-
Hemolizátum	-

5. táblázat

XIV.

A KISÉRLETI EREDMÉNYEK KIÁRTÉKELÉSE.

Kísérleteinkben aminovégcsoport-meghatározásokat végeztünk nativ állapotú emberi vvs-en, és ennek különböző frakcióin a célból, hogy kémiai metodika alkalmazása útján támpontot nyerjünk a vvs felületi strukturájára vonatkozóan. A végcsoport meghatározásokat DNFB segítségével végeztük el, és a SANGER által leírt módszert körülményeinknek megfelelően módosítottuk. Ólunk volt a jelen módszer alkalmazásával alátámasztani az irodalomból ismert azon feltevések egyikét, amely a vvs-membrán alapvető kémiai strukturájára vonatkozik. Mint leírtuk, 2 hipotézis lehetséges. Egyik szerint a vvs felületén kizárólagosan lipoid molekulák dominálnak, a vvs-membrán összefüggő lipoid hártýából áll, amely teljes egészében elfedi a vvs vázszerkezetéért felelős sztróma-fehérjéket. A másik feltevés kétségbe vonja ilyen hártýa létezését, és azt tételezi fel, hogy a vvs felületén nagyszámú karboxil csoporttal rendelkező lipoidok és amfoter karakterű fehérjék együttesen léteznek, s a különböző sajátosságú vegyületek együttesen felelősek a felületi tulajdonságok kialakulásáért.

Kísérleteinket megelőzően feltételeztük, hogy ha az aminovégcsoport-meghatározás eredményeként bizonyítható

módon fehérjéből eredő aminosav vagy aminosavak szabad aminos csoportját észleljük, akkor az említett feltételezések közül az utóbbit kell valószínűnek tartanunk.

Eredményeink kiértékelése céljából a 6. táblázatban feltüntettük a nativ állapotú vvs-felületnek és a vvs-ből előállított összes frakcióknak az általunk használt SANGER-módszer útján nyert termékeit, amelyek szabad aminos csoportokkal rendelkeznek.

DNP-származékok	Rf x 100 But-NH ₃	Nativ vvs	Lipoid mentes sztróma	Extr. lipoidok	vvs hem.
DNP-arginin /A/	0-5	+	+	-	-
DNP-szerin /B/	22-24	+	+	+	+
Ism.am.vegy. /C/	50-52	+	+	+	+
Ism.am.vegy. /D/	66-68	+	-	-	+
DNP-amin /E/	83-85	+	+	+	+
DNP-kolemin /F/	72-74	-	+	+	+
DNP-valin /G/	55-57	-	-	-	+

6. táblázat

A zárójelben lévő nagybetűk szerint jelöltük az előbbieik során készült kromatogramokon a szóbanforgó vegyületeket.

1. Natív vvs.

A természetes állapotú vvs kezelése során 5 aminovegyületet nyertünk, amelyek közül 2 aminosav, 2 ismeretlen, de bizonyosan nem aminosav karakterű DNP-származék, 1 pedig a meghatározással járó melléktermék.

A 2 aminosav származék közül a DNP-szerin egyaránt származhat sztromatin-fehérjékből és lipoidokból, ugyanis a vvs-ben tetemes mennyiségben található kefalin /összlipoidok 40 %-a/. E kefalin egyik megjelenési formájában alfa vagy béta helyzetben szerint tartalmaz a foszforsav molekula-részhez kötött állapotban. Éppen ezért a DNP-szerinnek a keletkezése, tehát a vvs-felületen szerinből eredő aminocsoportnak a jelenléte nem tekinthető bizonyító erejűnek a vvs felületén esetlegesen helyetfoglaló fehérje molekulákra vonatkozóan. A jelenlevő DNP-szerinen kívül azonban jól definiálható mennyiségben DNP-arginin keletkezik, tehát az arginin bázikus aminosav aminovégcsoportjával a vvs-felületen foglal helyet.

E vegyület 1 karboxil csoporttal, 2 amino csoporttal és 1 imino csoporttal rendelkezik, tehát 4, de különösen az első 3 funkciós csoportjával a fehérjék felépítésében szereplő peptid kötés kialakításában egyaránt szerepelhet. E szerint az a tény, hogy DNP-arginin keletkezik, nem jelent okvetlenül fehérje lánc végén helyetfoglaló aminovégcsoportot, a szabad aminocsoport láncközi

arginin is tartalmazhatja. Ez azonban a felvetett kérdés szempontjából közömbösnek tekinthető, mert az arginin mindkét lehetséges előfordulása est én a vvs felületén közvetlenül funkcionáló arginin molekulával, s így - minthogy e molekula eddigi ismereteink szerint szinte kizárólagosan fehérjék alkotóeleme - fehérjével kell számolnunk. E megállapítás tehát kizárja a vvs felületén összefüggő lipoid hártya létezését, kísérletünk értelmében az említett két hipotézis közül az utóbbit kell alátámasztanunk.

2. Sztróma.

Mint ismertettük, az éteres extrakció után előállított éteroldható lipoidoktól mentes sztrómában szintén 5 szabad aminos csoport található. Ezek közül 2 aminosav, amelyek megegyeznek a natív állapotú vvs esetében nyert aminosavakból származó aminos csoportokkal, 1 nem aminosav karakterű DNP-származék, amely szintén megtalálható a normál állapotú vvs felületén, 1 származék pedig a meghatározásból eredő melléktermék, az 5. pedig DNP-kolemin.

Az ilyen úton előállított, s nagyrészt fehérjékből álló sztróma szintén tartalmaz DNP-arginint, a papirkromatográfia útján nyert hasonló terjedelmű folt értelmében a natív vvs-el megegyező mennyiségben. E szerint a mindkét

esetben megtalálható arginin molekulákat a sztróma-fehérjék építőköveinek kell tekintenünk. Ezt alátámasztja BLOCK és ROLLING közlése /103/ is, mely szerint az emberi vérből eredő sztróma-fehérjék hisztidinen, lizinén, tirozinon, triptofánon, ciszteinen, metioninon kívül ezen összes aminosavak közül legnagyobb mennyiségben arginint tartalmaznak.

Mivel mind a szerin-kefalin, mindpedig a kolamin-kefalin igen jól oldódnak éterben /1/, feltételezhető volt, hogy ha a natív vvs kefalinból eredő szerint tartalmaz, vvs éteres extrakciója útján előállított sztróma kromatogramján a DNP-szerin foltját nem fogjuk megtalálni. Ezzel szemben azonban azt észleltük, hogy DNP-szerin sztróma esetében körülbelül 3-szoros mennyiségben keletkezik a natív vvs-hez viszonyítva. Ennek magyarázata több okban kereshető. Elsőrendű oka lehetséges, hogy mivel éteres extrakció útján nem távolítható el a rendszerből, sőt a lipoidoknak a vvs felületéről történt bizonyos mérvű leoldása után nagyjából részben válik a DNFB reagens számára hozzáférhetővé, a szerin sztróma-fehérjék alkotóeleme, egyrészt a natív vvs felületén is megtalálható, nagyobb részében csak enyhe lipoid extrakció következtében válik hozzáférhetővé. Ezzel ellentétben felmerülhet annak is a lehetősége, hogy a szerint hordozó kefalin molekulák is csak egy részükben találhatók meg a vvs-membrán felü-

letén, nagyobb részüket azonban egyéb éterben oldódó lipoidok a vvs természetes állapotában elfedik. E mellett szól az is, hogy míg a nativ vvs esetében DNP-kolamint nem nyertünk, a sztróma esetében ennek feltja számottevő mennyiségben jelentkezett. Mindkét állapotu kefalinnak ilyen elhelyezkedése természetsszerűleg csak abban az esetben válik lehetővé, ha a kefalin molekulák vagy proteinekhez kémiailag rendelt lipoidok, tehát lipoproteidek alkotórészei, és ezért nem képes az éter azokat a vv-membránból kioldani, vagypedig a víz szerkezetű sztromatin-fehérjék sztérikus okoknál fogva gátolják a kefalin molekulák távozását a sztróma valamely részéből. A kefalinoknak lipoproteidekben történő előfordulását alátámasztja az is, hogy olyan DNFB-al reagáló, föltehetően lipoidokból eredő ismeretlen amino vegyület található mind a nativ vvs, mindpedig a sztróma esetében, amely lipoid extrakció útján sem távolítható el a vvs felületéről.

3. éterben oldódó lipoidok.

Mint irodalmi összefoglalásunkban említettük, ERICKSON és munkatársai vizsgálatai értelmében a vvs-et körülvevő membrán proteinjei képesek hemolizis során bizonyos mennyiségben a vvs-ről leválni, és a lipoidokkal együtessen oldatba menni. ERICKSONNAK és munkatársainak ezen adatai is azt a megfigyelést támasztják alá, miszerint

a lipoidok egy része proteinekhez kémiaailag kötött állapotban, lipoproteidek alakjában fordulnak elő.

Ezek eredményeként kísérleteink során felmerült annak a lehetősége, hogy az éter segítségével történt lipoid extrakció a sztromatin-fehérjék egy részének a leoldódását is jelentette. Ezért szükségesnek látszott ezt a frakciót is megvizsgálni szabad aminos csoportok jelenlétére vonatkozóan. Mint említettük, 4 szabad aminos csoport jelenlétével kell számolni, melyek közül csak 1, a szerin aminosav, s minthogy ez feltehetően ez kefalinnból származik, melyet az ugyan ebben a frakcióban hasonlóképpen megtalált INP-kolamin jelenléte is alátámaszt, valószínűnek mondhatjuk, hogy e vvs frakció lipoproteideket, illetőleg proteineket nem tartalmaz.

4. Hemolizátum.

A normál állapotú vvs DNFB-os kezelése során - mint leírtuk - felfigyelhet annak a lehetősége, hogy a DNFB nemcsak a felületen lévő aminos csoportokkal reagál, hanem a nagy permeabilitással rendelkező membránon átdiffundálva a vvs belsejében lép kölcsönhatásba valamely szabad aminos csoporttal. Ha e sejt belsejében történő DNFB-diffúzió bekövetkezik, a módszer természetesen a membrán kémiai strukturájának a tanulmányozására nem alkalmas. Ha diffúzió a reakció során bekövetkezik,

akkor a vvs belsejében lévő Hb molekuláknak a jelzett irodalmi adatok alapján 2 mól valin végcsoportja is elreagál, s a hidrolízis termékeiből kimutatható.

Mint hogy azonban a nativ vvs 5 származéka közül egyik sem DNP-valin, valószínűvé válik, hogy diffúzióval nem kell számolnunk. Teljes bizonyossággal ezt akkor állíthatjuk, ha a kondenzáció ilyen reakciókörülményei között modellként szereplő valinból a DNP-származék könnyűszerrel előállítható, másrészt pedig, ha a vvs-hemolizátum kondenzációja után a Hb valin végcsoportjai jól definiálható mértékben a hidrolizátumból kinyerhetők. A 15. ábrán feltüntetett kromatogramm jól mutatja a hemolizátumból nagy koncentrációban keletkezett DNP-valin jelenlétét, mely szerint most már megállapíthatjuk, hogy a nativ vvs kezelése során csak a felületen lejátszódó kölcsönhatásról lehetett szó, nativ vvs esetében DNP-valin nem, míg a hemolizátum esetében nagy mennyiségben keletkezett.

Említsre méltó még, hogy a hemolizátum DNP-származékai között a DNP-szerin és DNP-kolamin hasonlóképpen megtalálható.

ÖSSZEFOGLALÁS.

Jelen munkánkban megkíséreltünk támpontot nyerni a vörösvérsejt-membrán szerkezetére vonatkozóan. Célkitűzésünk annak a megközelítése volt, vajjon a vörösvérsejt-membrán külső felépítéséért kizárólagosan lipoidok, vagy pedig lipoid molekulák és fehérjék együttesen felelősek. Vizsgálatainkat a SANGER-féle módszerrel végeztük. Lényege enyhe reakciókörülmények között aminovégcsoport-meghatározások elvégzése fehérje molekulákon.

Célkitűzéseink elérésére normál állapotú emberi vörösvérsejteket és azok egyes frakcióit kezeltük dinitrofluorbenzollal, a Sanger-féle módszer reagensével. Vizsgálatainknál az eredeti módszer nem volt használható, ezért az módosításra szorult. A vörösvérsejt egyes frakcióit éteres frakcionálással állítottuk elő. Eredményeinket a következőképen foglalhatjuk össze:

1. A normál állapotú vörösvérsejt esetében 5 szabad aminocsoportot nyertünk. Ezen aminocsoportok közül 2 aminosavnak az aminocsoportját jelenti, amelyek közül az egyik /DNP-arginin/ bizonyosan sztróma-fehérből ered, míg a másik /DNP-szerin/ egyaránt származhat proteinből és a nagyszámu lipoid egyik leglényegesebb képviselőjéből, a kefalin glicerín-foszfátidából. A nyert 5 DNP-származék közül további két ismeretlen

összetételű, nem aminosav jellegű amino vegyület, 1 pedig a meghatározás során keletkező melléktermék.

2. Elkészítettünk olyan vörösvérsejt-sztrómát, amely a vörösvérsejt hemolízis termékeit és az éterben oldódó lipoidokat nem tartalmazta. E termék aminovégcsoport analízise értelmében szintén 5 DNP-származék volt izolálható, 2 hasonlóképpen megegyezett az előző termék 2 aminosavjával, az egyik DNP-kolamin /amely az ilyenalakú kefalin alkotórésze/, 1 ismeretlen amino vegyület, 1 pedig a meghatározással járó melléktermék.

3. Az éterextrahálható lipoid frakció hasonló elemzése során 4 termék keletkezett. Ezek a feltehetően kefalinból származó DNP-szerinen kívül más aminosavat nem tartalmaztak, jelölül annak, hogy e frakció fehérjeszerű anyagokat, amelyek a sztróma-fehérjék részei lennének, nem foglal magában.

4. A vörösvérsejt-hemolízis vizes frakciójának, a hemoglobin tartalmu hemolizátumnak az elemzése során keletkezett termékek a DNP-argininen kívül az összes előbbi származékokat tartalmazták. Ezen túlmenően pedig igen nagy koncentrációban izolálható volt e frakcióból a hemoglobin aminovégcsoportjaként ismeretes DNP-valin.

Ezeknek a kísérleteknek az eredményeként megállapíthatjuk, hogy a vörösvérsejt-membrán struktúrájára

vonatkozóan az irodalomban leírt hipotézisek közül azt tekinthetjük valószínűnek, amely szerint a vörösvérsejtreakciókért elsődlegesen felelős membrán felületének az építőkövei fehérjékből és lipoid molekulákból együttesen tevődnek össze.

ZUSAMMENFASSUNG.

In vorliegender Arbeit suchten wir einen Hinweis zu finden über die Struktur der roten Blutkörpermembran. Die Zielsetzung unseres Versuches war annähernd festzustellen, ob für den äusseren Aufbau der roten Blutkörpermembran ausschliesslich die Lipide, oder die Lipoidmolekeln und die Eiweissstoffe gemeinsam verantwortlich sind. Unsere Versuche wurden mit der SANGERSchen Methode durchgeführt. Das Wesentliche dieser Methode ist unter milden Reaktionsverhältnissen die Bestimmung der Aminoendgruppen an Eiweissmolekeln.

Zu diesem Zweck behandelten wir normalkonditionierte rote Blutkörper und deren einzelne Fraktionen mit Dinitrofluorbenzol, dem Reagens der SANGERSchen Methode. Bei diesen Untersuchungen war die ursprüngliche Methode nicht anwendbar und musste dieselbe modifiziert werden. Die einzelnen Fraktionen der roten Blutkörper wurden mit Aetherfraktionierung hergestellt. Unsere Ergebnisse können im Folgenden zusammengefasst werden:

1. Mit normalkonditionierten roten Blutkörpern erhielten wir 5 freie Aminogruppen. Von diesen Aminogruppen zeigen zwei die Aminogruppen der Aminosäuren an, von welchen die eine/DNP-Arginin/ sicherlich von Stromseiwissstoffen stammt, wogegen die andere /DNP-Serin/

sowohl von Protein, als auch von dem wichtigsten Vertreter des in Lipoiden in grossen Mengen vorhandenen Kephalin-Phosphatides stammen kann. Von den 5 DNP-Derivaten sind weitere zwei Derivate Aminoverbindungen von unbekannter Zusammensetzung jedoch von keinem Aminosäurecharakter, und eines ein während des Versuches entstandenes Nebenprodukt.

2. Es wurde rotes Blutkörperstoma hergestellt, das die Hämolyseprodukte der roten Blutkörper und die in Aether löslichen Lipide nicht enthielt. Im Sinne der Aminoendgruppenanalyse dieses Produktes waren ebenfalls 5 DNP-Derivate isolierbar, von denen zwei mit den zwei Aminosäuren des vorherigen Produktes übereinstimmen, eines war DNP-Kolamin /ein Bestandteil des Kephalins in dieser Form/ eines ein unbekanntes Aminoderivat und eines ein bei der Bestimmung gebildetes Nebenprodukt.

3. Im Laufe der ähnlichen Analyse der mit Aether extrahierbaren Lipoidfraktion bildeten sich 4 Produkte. Diese enthielten ausser dem voraussichtlich von Kephalin herrührenden DNP-Serin keine anderen Aminosäuren als Zeichen dessen, dass diese Fraktion eiweissartige Stoffe, die Teile der Stromaproteine sein könnten, nicht enthält.

4. Die während der Analyse des hämoglobinhaltigen

Hämolysats, die wässrige Fraktion der roten Blutkörper-
hämolyse, entstandenen Produkte, enthielten, ausser
DNP-Arginin, die sämtlichen vorherigen Derivate. Ausserdem
war aus dieser Fraktion in grosser Konzentration das
als die Aminoendgruppe des Hämoglobins bekannte DNP-
VALIN isolierbar.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse kann fest-
gestellt werden, dass von den in der Literatur beschrie-
benen Hypothesen hinsichtlich der Struktur des roten
Blutkörpermembrans jene als die Wahrscheinlichste
angenommen werden kann, wonach die Bausteine der für die
roten Blutkörperreaktionen in erster Linie verantwort-
lichen Membraneoberfläche sowohl aus Eiweissstoffen
wie auch aus Lipoidmolekeln bestehen.

IRODALOM.

- /1/ Flaschenträger, B.: Physiologische Chemie. II. 1a. 254-546.
Berlin, Göttingen, Heidelberg. 1954.
- /2/ Höber, R.: Handb. Physiol. 6/1. 656-65/1928/.
- /3/ Primberger, F.: Ergebn. Inn. Med. 61, 680-785/1942/.
- /4/ Pillemer, L., Oncley, D. L., Melin, M., Elliot, J., Hutchinson, M.:
J. Clin. Invest. 23, 550/1944/.
- /5/ Fehér, T., Székács, I.: Chim. Clin. Acta. Közlés alatt.
- /6/ Ball, E. G., McKee, R. W., Anfinsen, C. B., Cruz, W. O., Geiman, Q. M.
J. Biol. Chem. 175, 547/1948/.
- /7/ Schönberger, I.: Biochem. Zeitschr. 251, 167/1932/.
- /8/ Cacippo, F., Pusterino, D.; Lattante. 20, 95/1949/.
- /9/ Vallee, B. L., Gibson, I. O.: J. Biol. Chem. 176, 446/1948/.
- /10/ Wolff, H.: Eli. Wo. 1950, 105.
- /11/ Larizza, P.: Fisiol. e Meg. 6, 203/1935/.
- /12/ Fischer, H., Pützer, B.: H. 154, 39/1926/.
- /13/ Straub, F. B.: Biokémia. Budapest. 1949. 101-113 o.
- /14/ Erickson, B. N., Williams, H. H., Bernstein, S. S., Arvin, J.,
Jones, R. L., Macy, J. G.: J. Biol. Chem. 122, 515/1937-38/.
- /15/ Beach, R. P., Erickson, B. N., Bernstein, S. S., Williams, H. H.,
MACY, J. G.: J. Biol. Chem. 128, 342/1939/.
- /16/ Stern, K. G., Reiner, M., Silber, R. H.: J. Biol. Chem.
161, 731/1945/.
- /17/ Calvin, M., Evans, R. S., Behrend, V., Calvin, G.: Proc. Soc.
exp. Biol. Med. 61, 416/1946/.
- /18/ Rubin, S. H.: J. Biol. Chem. 131, 691/1939/.
- /19/ Brückner, J.: H. 268, 251/1941/.
- /20/ Bingold, K.: Dtsch. Arch. klin. Med. 177, 230/1935/.

- /21/ Ponder, E.: Hemolysis and Related Phenomena. New York. 1945.
- /22/ Rolett, A.: Sitzungsber. K. Akad. Wissensch. Math.-Naturwissensch. Cl. Wien. 46, 73/1862/.
- /23/ Gough, A.: Biochem. J. 18, 202/1924/.
- /24/ Teitel-Bernard, A.: Arch. Roumain. Path. 5, 389/1932/;
Le Song. 8, 298/1934/.
- /25/ Fricke, H., Parker, E., Ponder, E.: J. Cell. and Comp. Physiol. 13, 69/1939/.
- /26/ Williams, H. H., Erickson, B. N., Macy, I. O.: Quart. Rev. Biol. 16, 80/1941/.
- /27/ Waugh, D. F., Schmitt, F. O.: Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biology. 8, 233/1940/.
- /28/ Fricke, H.: J. Gen. Physiol. 9, 137/1925/.
- /29/ Parpart, A. K., Dziemian, A. J.: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biology. 8, 17/1940/.
- /30/ Ballantine, R., Parpart, A. K.: J. Cell. and Comp. Physiol. 16, 49/1940/.
- /31/ Winkler, K. A., Bungendberg de Jong, H. S.: Arch. néerl. Physiol. 25, 431/1941/.
- /32/ Wolpers, C.: Naturwiss. 29, 416/1941/.
- /33/ Jung, F.: Kli. Wo. 1942, 917.
- /34/ Schmitt, F. O., Bear, R. S., Ponder, E.: J. Cell. and Comp. Physiol. 9, 89/1936/; 11, 309/1938/.
- /35/ Furchgott, R. F., Ponder, E.: J. Gen. Physiol. 24, 447/1941/.
- /36/ Lindemann, B.: Archiv. exper. Path. u. Pharm. 209, 44/1950/.
- /37/ Perosa, L., Raccuglia, G.: Exper. 8, 382/1952/.
- /38/ Cigada, M., Citterio, P., Orlandi, A., Ranzi, S., Tosi, L.: Rend. Istit. Lombar. Sci. Lett. /Cl. Scienze/. 82, 354/1949/.
- /39/ Jonas, H.: Biochim. et Biophys. Acta. 13, 241/1954/.
- /40/ Linderström-Lang, K.: Ergeb. Physiol. 35, 415/1933/.
- /41/ Abderhalden, E., Abderhalden, R.: Fermentforschung. 16, 48/1938/.

- /42/ Harris, L., J.: Proc. Roy. Soc. /London/. B 95, 440/1923-24/.
- /43/ Simms, H. S.: J. Gen. Physiol. 11, 629/1927-28/.
- /44/ Pirie, N. W., Pinhey, K. G.: J. Biol. Chem. 84, 321/1929/.
- /45/ Dakin, H. D.: J. Biol. Chem. 13, 357/1912/.
- /46/ Dakin, H. D., Dale, H. H.: Biochem. J. 13, 248/1919/.
- /47/ Dakin, H. D., Dudley, H. W.: J. Biol. Chem. 15, 263/1913/.
- /48/ Frankel, M., Katchalsky, A.: Biochem. J. 31, 1595/1937/.
- /49/ Frankel, M., Katchalsky, A.: Biochem. J. 32, 1904/1938/.
- /50/ Katchalsky, A.: Biochem. J. 35, 1024/1941/.
- /51/ Fischer, E., Bergell, P.: Ber. 36, 2592/1903/.
- /52/ Fischer, E., Abderhalden, E.: Ber. 40, 3544/1907/.
- /53/ Abderhalden, E.: Z. Physiol. Chem. 72, 1/1911/.
- /54/ Abderhalden, E.: Z. Physiol. Chem. 72, 13/1911/.
- /55/ Gurin, S., Clarke, H. T.: J. Biol. Chem. 107, 395/1934/.
- /56/ Abderhalden, E., Rejns: Z. Physiol. Chem. 202, 37/1931/.
- /57/ Abderhalden, E., Neumann, A.: Z. Physiol. Chem. 238, 177/1936/.
- /58/ Abderhalden, E.: Z. Physiol. Chem. 252, 81/1938/.
- /59/ Martin, A. I. P.: Ann. New York Acad. Sci. 49, 261/1948/.
- /60/ Zimmermann, W.: Z. Physiol. Chem. 231, 19/1935/.
- /61/ Abderhalden, E., Sickel, H.: Z. Physiol. Chem. 159, 163/1926/.
- /62/ Goldschmidt, S., Wiberg, E., Nagel, F., Martin, K.:
Ann. 456, 1/1927/.
- /63/ Bergmann, M., Mickleley, A., Kann, E.: Ann. 458, 56/1927/.
- /64/ Barger, G., Tutin, F.: Biochem. J. 12, 402/1918/.
- /65/ Abderhalden, E., Stix, W.: Z. Physiol. Chem. 129, 143/1923/.
- /66/ Abderhalden, E., Brockmann, H.: Biochem. Z. 225, 386/1930/.
- /67/ Lichtenshtein, N., Hestrin, S., Dimant, E., Brzoza, H.:
J. A. C. S. 60, 560/1938/.

- /68/ Slack, P., Kumpf, W.: Z. Physiol. Chem. 154, 125/1926/.
- /69/ Bettzieche, F., Menger, R.: Z. Physiol. Chem. 161, 37/1926/.
- /70/ Bergmann, M., Zervas, L.: J. Biol. Chem. 113, 341/1936/.
- /71/ Dirr, K., Felix, K.: Z. Physiol. Chem. 209, 5/1932/.
- /72/ Sanger, F.: Biochem. J. 39, 507/1945/.
- /73/ Krisnarau, Sober: J. A. C. S. 76, 1328/1954/.
- /74/ Schroeder: J. A. C. S. 75, 4612/1953/.
- /75/ Eisen: J. A. C. S. 75, 4583/1953/.
- /76/ Carsten, Eisen: J. A. C. S. 75, 4455/1953/.
- /77/ Thompson: Nature. 168, 390/1951/.
- /78/ Lowther: Nature. 167, 767/1951/.
- /79/ Lowther: Nature. 164, 501/1949/.
- /80/ Lowther: Nature. 165, 403/1950/.
- /81/ Perrone: Nature. 167, 513/1951/.
- /82/ Cruickhank: Nature. 174, 123/1954/.
- /83/ Levy, A. L.: Nature. 174, 126/1954/.
- /84/ Heikens: Nature. 174, 1187/1954/.
- /85/ Schroeder: J. A. C. S. 74, 5118/1952/.
- /86/ Waley: J. Chem. Soc. 2394/1951/.
- /87/ Porter: Meth. in Med. Research. 3, 256/1950/.
- /88/ Porter: Biochem. J. 46, 473/1950/.
- /89/ Blackburn: Biochem. J. 48, 126/1951/.
- /90/ Porter, Sanger: Biochem. J. 42, 287/1948/.
- /91/ Felix, Kerkels: Zeits. phys. Chem. 290, 78/1952/.
- /92/ Thompson: Biochem. et Biophys. Acta. 10, 633/1953/.
- /93/ Bromer, Staub, Diller, Bird, Sinn, Behrens:
J. A. C. S. 79, 2794/1957/.

- /94/ Biserte, G., Osteux, R.: Bull. soc. chim. Biol. 33, 50/1951/.
- /95/ Acher, Laurilla: Bull. soc. chim. Biol. 35, 413/1953/.
- /96/ Ravery, M., Fabre, C.: Bull. soc. chim. Biol. 35, 541/1953/.
- /97/ Mills: Biochem. J. 50, 707/1951-52/.
- /98/ Braunitzer: Biochem. et Biochys. Acta. 19, 574/1956/.
- /99/ Koch, G., Weidmel, W.: Hoppe-Seyler's Ztschr. 303, 213/1956/.
- /100/ Lowther, A.G.: Nature/London/. 167, 767/1951/.
- /101/ Block, R.I., Durrum, E.L., Zweig, G.: A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresys. New York. 1958.
- /102/ Sanger, F.: Biochem. Soc. Sympos. 3, 29/1950/.
- /103/ Block, R.I., Bolling, D.: The Amino Acid Composition of Proteins and Foods. Springfield, Thomas. 1951.

