

Institutul de Chimie Fiziologică al Universității Ruhr din Bochum, R.F.G.
(director: prof. dr. H. Faillard) și Laboratorul de biochimie clinică a I.M.F.
Tirgu Mureș (cond.: conf. dr. E. Mody doctor în medicină)

IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA MUCINEI SUBMAXILARE DE CAL. LEGĂTURILE GLUCIDO-PEPTIDICE POSIBILE. II. CARACTERIZAREA CHIMICĂ *

dr. H. Huser, dr. E. Mody, dr. H. Faillard

Compoziția glucidică și aminoacidică a mucinelor submaxilare de porc, bou și oaie a fost publicată recent (1. 2). Spiro (3) și Tipson (4) prezintă sinteze ample referitoare la diferitele tipuri de legături glucido-peptidice și caracterizarea chimică a acestora. În cele ce urmează compoziția glucidică și aminoacidică a glucoproteinei submaxilare de cal (GSC) a fost

*) Lucrarea a fost efectuată cu sprijinul Fundației Humboldt din R.F. a Germaniei

studiată în compoziție cu cea a mucinelor submaxilare de porc, de bou și de oaie.

Material și metode

1. Cercetarea conținutului glucidic al GSC

a) Determinări cantitative:

Acidul neuraminic a fost determinat după *Aminoff* (5) și *Svennerholm* (6). Ca standard s-a utilizat acidul N-acetilneuraminic.

Fucoza a fost determinată cu ajutorul metodei *Dische* și *Shettles* (7). Ca standard s-a utilizat L-fucoză (*Fluka*, *Buchs*, *Elveția*).

Galactoza și fucoza au fost determinate cu ajutorul metodei cu fenol — acid sulfuric a lui *Dubois* și colab. (8). Valorile de fucoză determinate independent au fost înmulțite cu factorul 0,574 (7), apoi au fost scăzute din cantitatea totală a glucidelor neutre (*Dubois*, 8). După această scădere s-au obținut valorile pentru galactoză. Ca standard s-a utilizat D-galactoză (*Merck*, *Darmstadt*, *R.F.G.*).

Hexozaminele au fost determinate cu ajutorul metodei lui *Elson* și *Morgan* (9), utilizându-se ca standard un amestec 1:1 de glucozamină-HCl și galactozamină-HCl (*Fluka*, *Buchs*, *Elveția*).

Acidul neuraminic a fost eliminat prin hidroliză acidă (1 oră hidroliză cu acid sulfuric 0,1 N la 80°C) înaintea determinării glucidelor totale (5), hidroliza fiind urmată de o dializă față de apă distilată la rece, GSC desialinizată și liofilizată a fost apoi incubată cu diferite concentrații de acid sulfuric, pentru diferite intervale de timp și la diferite temperaturi.

După 1, 5, 10 și 15 ore de hidroliză s-au scos probe, s-au răcit cu gheață și s-au neutralizat cu hidroxid de bariu substanță, respectiv soluție saturată. Sulfatul de bariu format s-a îndepărtat prin centrifugare. Supernatantele au fost purificate cu ajutorul coloanelor de *Dowex* 1 × 8 (200—400 mesh, încărcate cu format, 2 × 11 cm). Eluatele au fost evaporate în vid într-un evaporator rotativ la temperatura de 40°C. Resturile uscate au fost redizolvate în apă deionizată și au fost purificate prin coloane de *Dowex* 50 × 4 (2 × 12 cm, forma H⁺, 200—400 mesh). Glucidele neutre au fost eluate cu apă deionizată, iar hexozaminele cu procedeul descris de *Gardell* (10) și *Crumpton* (11).

b) Determinări calitative:

Identificarea monozaharidelor obținute a fost efectuată cu ajutorul cromatografiei în strat subțire (13—15).

Plăcile de celuloză au fost preparate în felul următor: 16 g de MN-celuloză (*Macheray*, *Nagel et Co.*, *Düren*, *R.F.G.*) au fost amestecate cu 90 ml de acid boric 0,1 M. Pe plăci de sticlă de 20 × 20 cm au fost trase straturi de 0,3 mm grosime cu ajutorul unei instalații ajustabile (*Desaga*, *Heidelberg*, *R.F.G.*). Plăcile au fost uscate la temperatura camerei, ținute peste noapte la 40°C și depozitate în exsicator, peste clorură de calciu uscată.

Înainte de aplicarea probelor, plăcile au fost imbibate cu solventul respectiv, apoi uscate. Probele (eluatele de pe coloanele Dowex) aplicate au fost cromatografiate de două ori succesiv în același solvent. Developarea cromatogramelor s-a făcut în mediul alcalin cu azotat de argint (15, 16).

c) Analiza compoziției aminoacide a GSC

Numeroși autori (17, 18) recomandă hidroliza unei soluții cât se poate de diluate de glucoproteină, în vederea evitării formării substanțelor huminice.

3—4 mg de GSC (uscată peste KOH în exsicator, la temperatura camerei timp de 24 de ore) au fost dizolvate în 15 ml de acid clorhidric cu un punct de fierbere constant (107—108,5° C). Tuburile au fost umplute cu azot, închise și apoi supuse hidrolizei la 110° C pentru 24, 48 și 72 de ore. Probele au fost uscate cu un curent de azot, evaporând acidul clorhidric la 40° C. Reziduurile uscate au fost dizolvate în acid clorhidric 0,1 N, conținând 12,5% zaharoză. Pentru fiecare interval de timp s-au efectuat cel puțin trei hidrolize. Analiza aminoacizilor s-a făcut cu ajutorul unui autoanalizator Technicon (20), după metoda lui Spackmann (19).

2. Legătura posibilă a glucidelor cu proteinele

Beta-eliminarea alcalină este o proprietate caracteristică pentru tipurile de legături dintre glucide și aminoacidul serină, respectiv treonină (3, 4, 21). Serina și treonina cuprinse în legături peptidice se reduc în acid 2-amino-acrilic, respectiv acid 2-amino-crotonic. Acești doi acizi prezintă un maximum de absorbție la 241 nm (22, 23). Creșterea absorbției la această lungime de undă poate indica deci tipul legăturii glucidice.

Pentru acest scop 20 mg de GSC au fost incubate în 100 ml NaOH 0,1 N la 20° C timp de 7 ore. Drept control au servit 4 mg de N-acetilgalactozamină în 10 ml NaOH 0,1 N. S-a urmărit din 30 în 30 de minute modificarea absorbției la 241 nm.

În vederea reducerii acidului 2-amino-acrilic și 2-amino-crotonic în alanină, respectiv în acid alfa-amino-butaric, s-a efectuat scindarea reductivă a substanței cu borohidrida de Na. Un procedeu similar a fost descris de Carlson (24).

1 g de GSC a fost dizolvată în 400 ml de NaOH 0,01 M conținând 0,5 M de BHNa. Soluția a fost incubată la 45° C pentru câteva ore. Probe de câte 100 ml au fost scoase din oră în oră, acidificate cu acid acetic glacial până la un pH de 5,0 sub răcire. Soluția acidificată a fost apoi dializată față de apă deionizată la rece. Reziduuul liofilizat a fost cercetat după conținutul lui în glucide legate covalent.

Rezultate

În urma analizei hidrolizatelor obținute după diferite intervale de timp s-a constatat că, cantitatea maximă de fucoză este deja eliberată după 30 de minute de hidroliză cu acid sulfuric N 1,0 la 100° C. Valorile medii ale diferitelor glucide obținute prin hidroliză sint cuprinse în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Compoziția glucidică a GSC

Componentul glucidic	Cantitatea %
Acid neuraminic	11,5±1,5
Fucoză	8,0±0,7
Galactoză	18,3±1,0
Hexozamine	20,1±1,3

După *Spiro* (26) și *Payza* și colab. (27), cu cât un glucid este situat mai periferic în lanțul glucidelor, cu atât apare mai devreme în hidrolizat. S-a constatat că, rata de eliberare a galactozei și a fucozei este aproximativ aceeași. Valoarea maximă a fucozei apare însă mai devreme, ceea ce pledează pentru poziția terminală a acesteia. În interpretarea acestei observații trebuie ținut cont însă de faptul, că în aceste condiții nu toate legăturile glucozidice sînt suficient de stabile (21). Hexozaminele se eliberează mai tîrziu, decît fucoza și galactoză.

Identificarea glucidelor:

Cromatografia în strat subțire prezintă multe avantaje față de cromatografia pe hirtie, mai ales în ceea ce privește timpul necesar pentru obținerea cromatogramelor. Separarea diferitelor glucide este bună și depinde de prezența sau absența sărurilor, precum și de o echilibrare bună a camerei. Atît glucidele neutre, cît și hexozaminele au fost separate cu ajutorul cromatografiei în strat subțire de celuloză, utilizînd 2 sisteme diferite de solvenți (fig. nr. 1 și 2).

Așadar, GSC conține următoarele glucide: fucoză, galactoză și acid neuraminic (determinat prin metode chimice), precum și galactozamină și glucozamină.

Analiza aminoacizilor prezenți în GSC:

Pentru evitarea degradării, respectiv interacțiunii aminoacizilor cu glucidele prezente în moleculă (17, 18, 21), 3—4 mg de GSC au fost hidrolizate în 15 ml acid clorhidric cu un punct ebulioscopic constant (107—108,5° C). Rezultatele analizei aminoacizilor sînt cuprinse în tabelul nr. 2.

Din datele prezentate în tabelul nr. 2 reiese că aminoacizii cu conținut de sulf sînt prezenți numai în urme. Cantitatea aminoacizilor aromatiți, ca tirozina, fenilalanina și histidina este la fel scăzută. Dintre aminoacizii alifatici predomină treonina, serina, acidul glutamic, prolina, glicina, alanina și acidul aspartic.

Legătura probabilă dintre glucide și porțiunea peptidică

În cursul primelor experiențe s-a urmărit absorpția citită în mediu alcalin la 241 nm. Reacția se stabilește după 4 ore de incubație. Aceeași experiență s-a efectuat și cu o incubație la 45° C. Scindarea legăturilor are

Tabelul nr. 2

Compoziția aminoacidică a GSC în $\mu\text{mol g GSC}$

Aminoacid	Dura ta hidrolizei cu HCl		
	24 ore	48 ore	72 ore
Asp	147,9 \pm 6,0	145,8 \pm 6,3	151,5 \pm 7,4
Thr	219,7 \pm 12,9	213,3 \pm 9,5	215,1 \pm 7,7
Ser	213,5 \pm 13,7	217,7 \pm 11,7	203,8 \pm 10,5
Glu	229,3 \pm 12,0	233,1 \pm 10,0	233,4 \pm 8,4
Pro	274,8 \pm 19,5	251,9 \pm 11,4	272,8 \pm 25,6
Gly	322,2 \pm 16,4	323,7 \pm 10,7	337,8 \pm 7,7
Ala	234,0 \pm 12,2	234,3 \pm 7,6	243,2 \pm 4,3
Val	127,7 \pm 9,5	134,1 \pm 7,2	154,4 \pm 4,4
Cys	cantități prea reduse pentru a putea fi evaluate		
Meth			
Ileu	49,0 \pm 2,9	49,7 \pm 1,6	49,0 \pm 4,8
Leu	126,2 \pm 8,4	127,2 \pm 1,8	129,2 \pm 4,2
Thyr	35,2 \pm 2,3	23,5 \pm 8,0	25,5 \pm 11,2
Thre	45,7 \pm 4,9	45,2 \pm 2,1	46,9 \pm 2,6
NH ₃	919,5 \pm 97,4	926,6 \pm 128,0	1172,5 \pm 4,6
Lys	80,0 \pm 4,7	79,8 \pm 2,9	84,2 \pm 4,6
His	29,0 \pm 2,8	29,9 \pm 7,8	30,9 \pm 2,9
Arg	87,5 \pm 4,5	87,5 \pm 7,6	90,9 \pm 2,1

loc mai rapid la această temperatură, se pare însă că și N-acetil-galactozamina se degradează într-o oarecare măsură.

Cu prilejul scindării reductive alcaline cu borohidrida de Na (24) se eliberează numai 40% din acidul neuraminic, 70% a hexozaminelor, 80% a glucidelor neutre și 75% a fucozei.

Discutarea rezultatelor

Rezultatele analizelor referitoare la conținutul aminoacidic al mucinelor submaxilare de porc, bou, oaie, câine și de cal sînt redată în tabelul nr. 3.

Se constată că compoziția aminoacidică a GSC seamănă cel mai mult cu cea a glucoproteinei submaxilare de câine. Cea din urmă conține însă mai multă fucoză și hexozamine, dar mai puțin acid neuraminic și galactoză decît GSC.

Yosizawa și colab. (32) au găsit în glucoproteina submaxilară de oaie, de bou și de porc un conținut în triptofan mai mic decît 0,004 $\mu\text{mol/mg}$ de glucoproteină. Circa 50—70% din acizii aspartic și glutamic sînt prezenți sub formă de asparagină, respectiv de glutamină. Din datele cuprinse în tabelul nr. 3 reiese că, glucoproteinele submaxilare conțin în urme, sau nu conțin de loc aminoacizii sulfurați. Cantitatea aminoacizilor aromati ci este mai redusă decît de obicei. Aceste substanțe prezintă din această cauză o absorbție relativ scăzută la 280 nm (21).

H. HUSER ȘI COLAB.: IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA MUCINEI
SUBMAXILARE DE CAL...

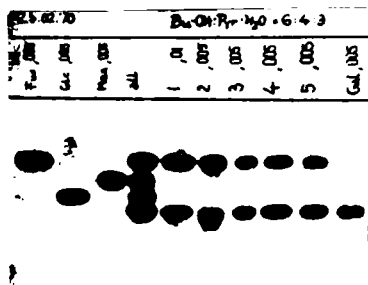


Fig. nr. 1: Cromatografia in strat subțire de celuloză a componentilor glucidici neutrali ai GSC într-un sistem de solvenți: N-butanol:piridină:apă dist. = 6:4:3. L-fuc = 20 μ g fucoză; Glc = 20 μ g glucoză; Man = 20 μ g manoză; gal = 20 μ g galactoză; all = aceleași cantități din fiecare monozaharid, aplicate simultan; 1. 2. 3. 4. 5 = hidrolizate de GSC după diferite perioade de timp

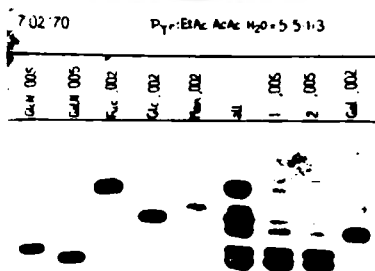


Fig. nr. 2: Cromatografia in strat subțire de celuloză a hexozaminelor din GSC într-un sistem de solvenți piridină etilacetat:acid acetic:apă dist. = 5:5:1:3. GlcN = 20 μ g clorhidrat de glucozamină; GalN = 20 μ g clorhidrat de galactozamină; all = 10 — 10 μ g fucoză, manoză, galactoză, glucoză și 20 — 20 μ g clorhidrat de glucozamină și galactozamină, aplicate simultan; 1.2 = hidrolizate de GSC

Tabelul nr. 3

Amino- acid:	BSM maj.	BSM min.	OSM maj.	OSM min.	OSM Gottsch.	PSM	CSM	BSLM	GSC
Ala	12,2	5,1	13,6	10,4	11,3	14,9	10,0	9,5	10,6
Asp	2,1	13,3	1,7	7,3	4,7	2,2	4,0	4,7	6,6
Cys	urme	5,0	0	0	2,7	1,1	1,8	2,3	urme
Glu	5,8	8,3	5,3	8,4	6,2	6,7	6,2	7,0	10,1
Gly	17,7	9,9	19,8	11,0	15,8	19,6	21,8	6,8	14,7
Ileu	1,6	4,0	1,3	3,1	2,9	3,0	2,1	1,6	2,1
Leu	0,4	4,7	5,2	5,7	4,5	1,2	4,3	4,1	5,6
Met	0,1	0,8	0	0	0	0,2	0,5	1,4	urme
Phen	0,4	2,5	1,6	3,6	2,4	0,6	2,6	1,4	2,0
Pro	11,1	5,9	9,6	6,4	9,7	7,7	9,0	9,9	11,9
Ser	20,1	11,5	17,5	14,8	14,3	19,9	11,0	11,3	10,1
Thr	15,3	11,5	14,8	12,6	11,7	12,8	12,8	24,1	9,5
Tyr	urme	3,2	urme	1,4	0,8	0,6	1,2	1,1	1,5
Val	6,7	5,4	6,0	6,7	7,1	7,5	5,0	8,6	6,3
Arg	4,3	3,4	3,6	3,7	3,8	0,3	5,0	3,4	4,0
His	0,2	1,2	0	1,1	0,4	0,3	1,3	1,4	1,3
Lys	0,6	4,6	0,3	3,8	2,0	1,2	2,0	1,8	3,7

Compoziția aminoacidică a mucinelor submaxilare (2) în mol 100 mol aminoacizi (BSM = mucină submaxilară de bou, OSM = de oaie, Gottsch. = după Gottschalk, PSM = de porc, CSM = de ciine, BSLM = mucină sublinguală de bou, GSC = glucopeptina submaxilară de cal. maj., min. = component major, respectiv minor).

Conținutul în triptofan (32), histidină și arginină este la fel de redus. Acești aminoacizi după Lowry și colab. (33) joacă un rol important în mecanismul reacției de dozare a proteinelor. Prin urmare, atât citirea absorbției la 280 nm, cât și metoda lui Lowry pot fi utilizate numai cu rezerve în dozarea cantitativă a glucopeptinelor submaxilare.

Pe baza datelor din literatură, până în momentul de față nimeni nu a reușit să scindeze totalitatea lanțurilor laterale glucidice din molecula glucopeptinelor submaxilare cu ajutorul scindării alcaline cu borohidridă de Na (24, 34, 35). În mediu alcalin se pot hidroliza și unele legături peptidice (36, 37). Glucopeptidele rezultate pot avea o stabilitate crescută față de beta-eliminare (38, 39).

Se cunosc glucopeptine care dispun de două tipuri diferite de legături glucido-proteice (3, 4). Unele lanțuri oligozaharidice pot fi legate prin legături stabile față de alkali.

Fucoza și acidul neuraminic au fost găsiți ocupând un loc terminal în structura glucopeptinelor (1, 4). Deoarece GSC conține ambii componenți glucidici, se poate presupune că există oligozaharide ramificate în această macromoleculă, în mod similar ca în cazul glucopeptinei submaxilare de porc (24, 40).

Concluzii

Cu ajutorul unor metode chimice s-a analizat compoziția glucidică cantitativă, iar cu ajutorul cromatografiei în strat subțire de celuloză cea

calitativă a GSC. GSC conține 11,5% acid neuraminic, 8,0% fucoză, 18,3% galactoză și 20,1% hexozamine, conținutul total glucidic fiind de 56,4% \pm 1.1. Compoziția în aminoacizi a GSC a fost studiată cu ajutorul unui autoanalizator Technicon. S-a remarcat absența aminoacizilor sulfurați, cantitatea redusă a aminoacizilor aromatici și predominanța treoninei, serinei, acidului glutamic, a prolinei, glicinei, alaninei și a acidului aspartic. Pe baza scindării cu borohidrida de Na în mediu alcalin, precum și a hidrolizei parțiale a GSC este probabilă localizarea terminală a acidului neuraminic și a fucozei, ceea ce pledează pentru existența unor catene glucidice ramificate.

Sosit la redacție: 27 iunie 1972

Bibliografie

1. MONTGOMERY R.: în „The Carbohydrates“, vol. II. B., sub redacția PIGMAN W., HORTON D., Academic Press, New York, 1970; 2. PIGMAN W., TETTAMANTI G.: în „Biochemistry of Glycoproteins and related Substances“, sub redacția ROSSI E., STOLL E., Ed. S. Krager, Basel, 1968; 3. SPIRO R. G.: Ann. Rev. Biochem. (1970), 39, 599; 4. TIPSON R. S., HORTON D.: Adv. Carbohydr. Chem. (1970), 25, 407; 5. AMINOFF D.: Biochem. J. (1961), 81, 384; 6. SVENNERHOLM L.: Biochim. Biophys. Acta (1957), 24, 604; 7. DISCHE Z., SHETTLES L. B.: J. Biol. Chem. (1948), 175, 595; 8. DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., SMITH D.: Anal. Chem. (1956), 28, 350; 9. ELSON L. A., MORGAN W. T. J.: Biochem. J. (1933), 27, 1824; 10. GARDELL S.: Acta Chem. Scand. (1957), 7, 207; 11. CRUMPTON M. J.: Biochem. J. (1959), 72, 479; 12. STAHL E., KALTERBACH U.: sub redacția STAHL E.: „Dünnschichtchromatographie“, Ed. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1962; 13. RANDEATH K.: „Dünnschichtchromatographie“, Ed. Chemie, Weinheim, 1966; 14. LEWIS B. A., SMITH F.: sub redacția STAHL E. „Dünnschichtchromatographie“, Ed. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1967; 15. TREVELYAN W. E., PROCTER D. P., HARRISON J. S.: Nature (1950), 166, 444; 16. HONGH L., JONES J. K. N.: Methods in Carbohydrate Chemistry (1962), 1, 21; 17. GOTTSCHALK A.: Ann. N. Y. Acad. Sci. (1963), 106, 168; 18. PUSZTAI A., MORGAN W. T. J.: Biochem. J. (1963), 88, 546; 19. SPACKMANN D. H., STEIN W. H., MOORE S.: Anal. Chem. (1958), 30, 1190; 20. *** Technicon Instruction Manual, 1970; 21. GOTTSCHALK A.: Glycoproteins, vol. 5, Elsevier Publ. Co., Amsterdam 1966; 22. PRICE V. E., GREENSTEIN J. P.: Arch. Biochem. Biophys. (1948), 18, 383; 23. CARBELLI R., BHAVANANDAN V. P., GOTTSCHALK A.: Biochim. Biophys. Acta (1965), 101, 67; 24. CARLSON D. M.: J. Biol. Chem. (1968), 243, 616; 25. KATSURA N., DAVIDSON E. A.: Biochem. Biophys. Acta (1966), 121, 120; 26. SPIRO R. G.: J. Biol. Chem. (1962), 237, 646; 27. PAYZA N., RIZVI S., PIGMAN W.: Arch. Biochem. Biophys. (1969), 129, 68; 28. HOUGH L., JONES J. K. N.: Methods in Carbohydrate Chemistry 1962, vol. I, p. 21; 29. SCHWEIGER A.: J. Chromat. (1962), 9, 374; 30. GÜNTHER H., SCHWEIGER A.: J. Chromat. (1965), 17, 599; 31. NICOT C., CHEFTEL R. I., MORETTI J.: J. Chromat. (1967), 31, 565; 32. YOSIZAWA S., OZEKI T., ENDO M., PIGMAN W.: Biochim. Biophys. Acta (1969), 192, 162; 33. LOWRY O. H.,

ROSENBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J.: J. Biol. Chem. (1951), 193, 265; 34. HARBON S., HERMAN G., CLAUSER H.: Europ. J. Biochem. (1951), 4, 265; 35. MURTY V. L. N., HOROWITZ M. I.: Carbohydr. Res. (1968), 6, 266; 36. BERTOLINI M., PIGMAN W.: J. Biol. Chem. (1967), 242, 3776; 37. BORNSTEIN P.: Biochemistry (1970), 9, 2408; 38. RILEY G., TURNBULL J. H., WILSON W.: J. Chem. Soc. (1957), 1373; 39. BERTOLINI M., PIGMAN W.: Carbohydr. Res. (1970), 14, 53; 40. KATZMANN R. L., EYLAR E. H.: Arch. Biochem. Biophys. (1968), 127, 233.
