

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Tomasz Borkowski

Zbigniew PRASAŁ

Wpływ termicznej denaturacji na obraz oscylopolarograficzny metaloproteidów i białek prostych

Влияние термической денатурации на осциллополярографическую картину металлопротеидов и протеинов

Effect of Thermal Denaturation on the Oscillopolarographic Pattern of Metalloproteids and Proteins

Analizę białek w oparciu o metodę oscylopolarograficzną zajmowali się Šantavý (11), Kalàb (6), Kalous i Valenta (7). Badane białka (insulina, trypsyna, pepsyna, ureaza, hemoglobina, kazeina, lizozym, albumina), a także surowica ludzka i zwierzęca już w stężeniu 0,01% okazały się oscylopolarograficznie aktywne. Białka analizowano w amoniakalnym środowisku jonów Co^{++} (2) lub jonów Ni^{++} (9). W tych warunkach następowało tworzenie się kompleksów białkowo-metalicznych, których głębokość wcięć na oscylogramie — zwiększająca się w zależności od stężenia białka zgodnie z krzywą izotermi adsorpcji Langmuira — była miarą ich stężenia.

Wydaje się, że metodę oscylopolarograficzną można by zastosować również do badania właściwości białek prostych i złożonych. W związku z tym za pomocą tej metody podjęto próby odróżnienia metaloproteidów od białek prostych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań stosowano preparaty białkowe o wysokim stopniu czystości. Ceruloplazminę ludzką (5% roztwór o czystości 95% w 0,14 M NaCl) otrzymywano w Wytwórni Surowic i Szczepionek w Warszawie. Pozostałe preparaty pochodziły z następujących źródeł: tyrozynaza z grzybów typ II (Sigma, St Louis, USA), cytochrom c typ III z serca konia (Sigma, St Louis, USA), trypsyna trzustkowa o aktywności 20000 jednostek Fulda — Grossa/g (Merck, Darmstadt, NRF), krystaliczna albumina w łowa (Koch Light Lab., Colnbrook, Wielka Brytania), α -globulina ludzka z frakcji IV osocza o czystości powyżej 95% (Calbiochem, Leewengraben, Szwajcaria), rybonukleaza z trzustki wołowej, 4 razy krystalizowana, 40 jednostek Kunitza/mg (Koch Light Lab., Colnbrook, Wielka Brytania).

Z 5% roztworów powyższych białek w 0,14 M NaCl pobierano po 0,2 ml do termostatowanego naczynka polarograficznego zawierającego 0,1 M mrówczanu amonu i 0,02 M bufor fosforanowy o pH 7,0. Zmiany zachodzące na polaryzowanej elektrodzie kroplowej podczas wzrostu temperatury obserwowano na ekranie polaroskopu LP 600 (Laboratori Přístroje, Praga, Czechosłowacja) lub rejestrowano fotograficznie za pomocą aparatu Exakta Varex.

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Oscylogramy natywnych form badanych białek (ryc. 1 — 1, 2, 3 i ryc. 2 — 1, 2, 3, 4) niezależnie od ich rodzaju i funkcji charakteryzują się pojedynczymi, symetrycznymi wcięciami po stronie katodowej i anodowej. Wcięcia ceruloplazminy i tyrozy-nazy (ryc. 1 — 1, 2) w porównaniu do pozostałych białek nie są ostre, co prawdopodobnie wskazywałoby na ich niepojemnościowy charakter. Okazało się jednak, że głębokość tych wcięć praktycznie nie zależy od stężenia badanych enzymów, co przemawiałoby za ich adsorpcyjnym charakterem. Należy stąd wnosić, iż jakość wcięć ceruloplazminowych i tyrozinazowych jest wypadkową przynajmniej dwóch czynników: adsorpcji powierzchniowo aktywnej warstwy monomolekularnej białka na elektrodzie rtęciowej i obecności atomów miedzi w centrach aktywnych tych enzymów (1, 3).

Obserwując zachowanie wszystkich badanych białek na elektrodzie kroplowej w roztworze o 10-krotnie zwiększonej sile jonowej, np. w 1 M KCl, stwierdza się: a) zupełny zanik wcięć symetrycznych odpowiadających ceruloplazminie i tyrozy-nazie, b) przesunięcie wcięcia katodowego cytochromu c w stronę ujemnych potencjałów i c) nienaruszenie wcięć albuminy, globuliny, rybonukleazy i trypsyny (oscylogramy nie były rejestrowane fotograficznie).

Hydroliza kwasowa 6 N HCl ceruloplazminy (ryc. 3. — 1), a także trawienie ceruloplazminy trypsyną (ryc. 3. — 2) likwiduje symetryczne wcięcia. Działanie 10 M mocznikiem w czasie 30 min. na ceruloplazminę i trypsynę nie usuwa symetrycznych wcięć, lecz jedynie zmniejsza ich głębokość. Należy stąd wnosić, że są one uwarunkowane obecnością wiązań peptydowych w strukturze białka, a głębokość tych wcięć zależy może od stopnia adsorpcji i rozfałdowania łańcuchów polipeptydowych. Jak wiadomo, hydroliza kwasowa czy enzymatyczna białek powoduje rozszczepienie wiązań peptydowych w strukturze białka, a funkcja mocznika polega na rozerwaniu mostków wodorowych między- i wewnątrzcząsteczkowych (12).

W miarę ogrzewania roztworu badanych białek w temp. 70° — 100° następuje zmiana obrazów oscylograficznych (ryc. 1. — 1a, 2a, 3a i ryc. 2. — 1a, 2a, 3a, 4a). Termiczna denaturacja powoduje zmiany wewnątrzcząsteczkowe, których część udaje się zaobserwować na ekranie polaroskopu. Na oscylogramach ceruloplazminy i tyrozy-nazy (ryc. 1. — 1a, 2a) zaczynają powstawać w części katodowej dodatkowe wcięcia sąsiadujące z poprzednim. Obraz cytochromu c (ryc. 1. — 3a) po stronie katodowej wzbogaca się aż o dwa nowe wcięcia. W przypadku α -globuliny (ryc. 2. — 3a) następuje lekkie stępienie prawego wierzchołka wcięcia symetrycznego, a u pozostałych białek łącznie z α -globuliną następuje pogłębienie wcięć (ryc. 2. — 1a, 2a, 3a, 4a), przy czym największe różnice występują na oscylogramie α -globuliny i albuminy (ryc. 2. — 3a, 4a). Zmniejszająca się rozpuszczalność białek wskutek denaturacji sprzyja przewadze adsorpcji na elektrodzie kroplowej nad dyfuzją i może być przyczyną pogłębienia wcięć (5). Analogiczny wpływ wywiera również hydratacja albuminy wskutek denaturacji termicznej (8).

Termiczna denaturacja ciągłym gradientem temperatury (0,5—1°/min) w zakresie 70—100° powoduje zatem głębszą dezintegrację struktury białka niż krótkotrwała denaturacja ceruloplazminy 0,2 M kwasem siarkowym w temp. 25° (10), która nie sprzyja powstawaniu dodatkowych wcięć. Wydaje się, że jakość wcięć symetrycznych metaloproteidów zależy od obecności jonów metali w strukturze tych białek. W przeciwnym razie kształt wcięć u wszystkich badanych białek byłby wyraźnie ostry i termicznie niezmienny. Poza tym jony metali, np. miedzi, warunkują w metaloproteidach o charakterze enzymatycznym obecność układu oksydo-redukcyjnego o pewnej wartości potencjału (4, 10).

Analiza otrzymanych oscylogramów pozwala na ogólną ocenę zmian w wyniku termicznej denaturacji białek, a mianowicie, denaturacja białek przyczynia się do deformacji kształtu katodowej części oscylogramów, pogłębienia wcięć u białek prostych i pozostawienia charakterystycznej, symetrycznej pary wcięć w stanie niezmienionym. Wiadomo bowiem, że zniszczenie przestrzennej struktury białka podczas denaturacji prowadzi do utraty aktywności enzymatycznej, zmiany rozpuszczalności białka, wzrostu liczby grup czynnych w cząsteczce. W związku z tym powstawanie dodatkowych wcięć katodowych na oscylogramach metaloproteidów należałoby odnieść do atomów miedzi w ceruloplazminie i tyrozynazie, a atomów żelaza w cytochromie c, które w wyniku denaturacji zostają ujawnione w cząsteczce białkowej wskutek zwiększonej zdolności do redukcji. Sprawia natomiast trudność wytłumaczenia zaniku i przesunięcia wcięć dla enzymów metaloproteidowych w roztworach o wysokiej sile jonowej, a brak tych zmian w przypadku białek prostych. Niezależnie od właściwej interpretacji tego zjawiska może ono obok różnic wcięć w stadium denaturacji stanowić dodatkowe elektrochemiczne kryterium odróżniające metaloproteidy od białek prostych.

PIŚMIENNICTWO

1. Blumberg W. E., Eisinger J., Aisen P., Morell A. G., Scheinberg J. H.: *J. Biol. Chem.* **238**, 1675—1682, 1963.
2. Brdička R.: *Collection* **5**, 112—123, 1933.
3. Broman L., Malmström Bo. G., Aasa R., Vanngard T.: *Biochim. Biophys. Acta* **75**, 365—376, 1963.
4. Fee J. A., Malmström Bo. G.: *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 299—302, 1968.
5. Heyrovsky J., Kalvoda R.: *Oszillographische Polarographie mit Wechselstrom*. Akademie-Verlag, Berlin 1960, str. 66.
6. Kaláb D.: *Pharmazie* **10**, 528—532, 1955.
7. Kalous V., Valenta P.: *Chem. listy* **50**, 1654—1659, 1956.
8. Loughlin W. J.: *Biochem. J.* **26**, 1557—1562, 1932.
9. Paleček R.: *Pharmazie* **11**, 551—559, 1956.
10. Prasał Z.: *Acta Biochim. Polon.* **15**, 235—239, 1968.
11. Šantavý F.: *Chem. listy* **49**, 834—840, 1955.
12. Steven F. S., Tristram G. R.: *Biochem. J.* **85**, 207—210, 1962.

Otrzymano 9.I.1971.

OPIS RYCIN

Ryc. 1. Enzymy metaloproteidowe. Oscylogramy natywnych (temp. 23°—1, 2, 3) i zdenaturowanych (temp. 95°—1a, 2a, 3a) 0,5% roztworów białek w 0,1 M mrówczanie amonu i 0,02 M buforze fosforanowym o pH 7,0 wykonane w układzie $dE/dt - f(E)$ na kropłowej elektrodzie rtęciowej w polaroskopie LP 600. 1 i 1a — ceruloplazmina ludzka, 2 i 2a — tyrozynaza z grzybów, 3 i 3a — cytochrom C z serca konia.

Ryc. 2. Białka proste. Warunki doświadczeń identyczne jak w opisie ryc. 1. 1 i 1a — rybonukleaza trzustkowa, 2 i 2a — trypsyna, 3 i 3a — α -globulina ludzka, 4 i 4a — albumina wołowa.

Ryc. 3. Hydrolizaty ceruloplazminy. 1) Oscylogram hydrolizatu kwasowego ceruloplazminy w temp. 23° Warunki hydrolizy: 6 M HCl w temp. 105° w zatopionej ampulce przez 18 godz.

2) Oscylogram hydrolizatu enzymatycznego ceruloplazminy temp. 23° Warunki: trawienie ceruloplazminy trypsyną w 0,02 M buforze fosforanowym o pH 7,0 przez 72 godz. w temp. 23°; z hydrolizatu nie usunięto trypsyny, odszczepiane jony miedzi hamowały zakażenie bakteryjne roztworu.

РЕЗЮМЕ

Сравнивали осциллограммы церулоплазмина, тирозиназы и цитохрома с с некоторыми белками в нативном и денатурированном термически состояниях на капельном ртутном электроде поляроскопа LP 600.

Для исследуемых белков характерно присутствие индивидуальной симметрической пары вырезов. Вырезки церулоплазмина и тирозиназы исчезали, а цитохрома с перемещались в 1 M растворе KCl. Во время термической денатурации цитохром с, тирозиназа, церулоплазмин и α -глобулин в отличие от альбумина, рибонуклеазы и трипсина проявляли добавочные катодные вырезки.

SUMMARY

The oscillograms of ceruloplasmin, tyrosinase and cytochrome C were compared with some proteins in the native and heat-denatured state, on the dropping mercury electrode of Polarscope LP 600.

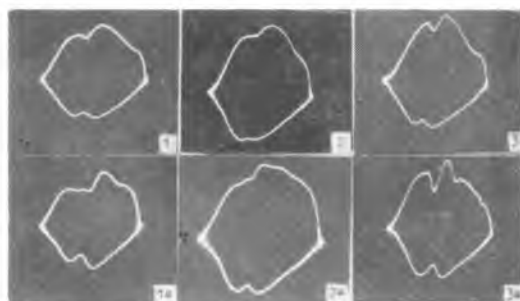
The examined proteins were characterized by one single pair of indentations. The indentations of ceruloplasmin and tyrosinase disappeared and those of cytochrome C shifted in 1 M KCl solution. During the thermal denaturation, cytochrome C, ceruloplasmin, tyrosinase and α -globulin showed the additional cathodic indentations contrary to albumin, ribonuclease and trypsin.

EXPLANATION OF FIGURES

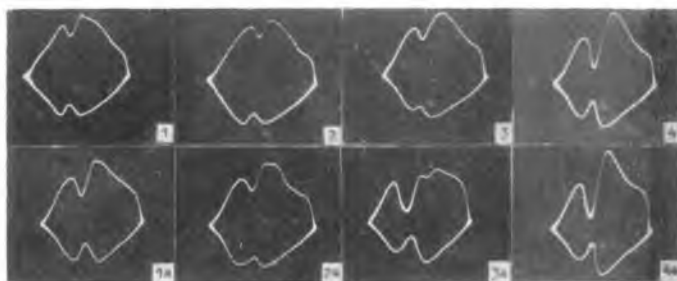
Fig. 1. Metaloproteid enzymes. Oscillograms of 0.5% protein solutions in 0.1 M ammonium formate with 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) in the native (temp. 23°—1, 2, 3) and denatured state (temp. 95°—1a, 2a, 3a) performed in the system of co-ordinates $dE/dt - f(E)$ on the dropping mercury electrode of Polarscope LP 600; 1, 1a — human ceruloplasmin, 2, 2a — fungal tyrosinase, 3, 3a — horse-heart cytochrome C.

Fig. 2. Proteins. Experimental conditions the same as in Fig. 1; 1, 1a — pancreatic ribonuclease, 2, 2a — trypsin, 3, 3a — human α -globulin, 4, 4a — bovine albumin.

Fig. 3. Ceruloplasmin hydrolisates; 1 — oscillogram of acid hydrolisate of ceruloplasmin at temp. 23°. Conditions: hydrolysis of ceruloplasmin in sealed ampoule with 6 M HCl at temp. 105° for 18 hrs, 2 — oscillogram of enzymatic hydrolysate of ceruloplasmin at temp. 23°. Conditions: ceruloplasmin digestion with trypsin in 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0) at temp. 23° for 72 hrs; trypsin was not removed from hydrolysate; cupric ions being splitted off inhibited the bacterial infection of the solution.



Ryc. 1



Ryc. 2



Ryc. 3

