

O PRÁCI V OBORU BÍLKOVIN

BOŘIVOJ KEIL

V dnešní době je nesporně jedním z klíčových temat vědy problém bílkovin. V něm se setkávají neoddelitelně složité otázky biologické a neobyčejně aktuální, prakticky závažné otázky národohospodářské, průmyslové i zemědělské. Výzkum bílkovin je nesmírně důležitý pro fyziologii, lékařství a výživu. Vedle potravinářského průmyslu je klíčovou otázkou výzkumnou pro průmysl vlnářský, kožedělný, filmový, farmaceutický a průmysl umělých hmot. Rozvinutí práce v oboru bílkovin je tím bezokladnější, že pro svou obtížnost zůstá tento obor metodicky i kádrově značně pozadu za ostatními obory chemie a biochemie. V zanedbanosti ho leda předstihují obor nukleových kyselin a lipidů.

V době, ve které bílkoviny byly pro organického chemika nepopulárním tenkým ledem, na který je lépe se nepouštět, provedl Bedřich Engels hlubokou analýsu významu bílkovin pro život a jeho funkce. Ačkoliv ještě nebyl průkazný materiál nashromážděn, Engels již tehdy viděl základní projevy života jako projevy výše organizované hmoty, jako speciální vlastnost bílkovinných systémů a jejich reakci na vnější prostředí.

Výzkum bílkovin se dnes v základě ubírá dvěma úzce na sebe navazujícími cestami a to po trati více méně chemické, kam spadá výzkum konstitučních, fyzikálně-chemických a biochemických otázek, a po trati více méně biologické, kam lze řadit imunologické, enzymologické, fyziologické a podobné problémy. Pochopitelně není možno tyto stránky věci od sebe odtrhovat. Bylo by základní chybou snažit se vysvětlovat některé vlastnosti bílkovin, vzniklé vyšší organizací hmoty z vlastností běžných organických nízkomolekulárních látek. Na to často organická chemie nestačí, protože už výše organizovaná hmota není prostě její obor. Naproti tomu by bylo pro pokrok nebezpečné podceňovat význam chemie a snahu po exaktní definici těch vlastností bílkovin, na jejichž sledování dnes už chemické metody existují a vedou k jednoznačným výsledkům. A teď bychom se mohli obrátit k některým otázkám chemie bílkovin, přičemž bych příležitostně uvedl některé, zatím sporé zkušenosti, které jsme v Ústředním ústavu chemickém v bílkovinářských sektorech získali.

Konstituce

S rozšiřováním vědomostí o bílkovinách se tvořily zároveň teorie o jejich konstituci. Přitom ty teorie, které se opíraly pouze o jednu speciální vlastnost nebo měření, byly během doby vyvráceny. Idealistické koncepce Bergmanna a Wrinchové, kteří se snažili z nedokonalých analys nebo spekulací najít schemata pro uspořádání

* Prednesené na pracovnej konferencii chemických výskumníkov, technikov, zlepšovateľov a novátorov v Banskej Štiavnici v júli 1951.

aminokyselin v molekule bílkoviny, se ukázaly nesprávnými. Podobný osud stihl teorii Svedberga, který se domníval, že existuje zákonitost v molekulárních vahách bílkovin a že jsou odvozeny od určité základní molekulární váhy jako celistvé její násobky.

Velkým přínosem pro další vývoj, našich názorů na strukturu bílkovin byla globulární teorie sovětských pracovníků Breslera, Passinského, Afanasjeva a Talmuda. Opírajíc se o fyzikálně chemická pozorování, thermodynamické úvahy a modelové syntetické sloučeniny, učí nás tato teorie dívat se na bílkoviny jako spirální útvary, kde hlavní peptidický řetězec je vlivem rozložení hydrofilních a hydrofobních skupin deformován tak, že statisticky většina hydrofobních zbytků alifatických nebo aromatických (valin, leucin, tryptofan atd.) směřuje ke středu spirály, zatím co hydrofilní karboxylové a basické skupiny (asparagové kys., lysinu, argininu atd.) jsou orientovány do vnějšího prostředí. Celá molekula je v dynamické rovnováze a velká část jejích vlastností je silně ovlivňována vnějším prostředím. Tato teorie dává odpověď na otázky denaturace, deformace vlivem prostředí, řeší specifickou velikost molekul, atakovatelnost enzymy a mnohé jiné. Pro její závažnost jsme o ní referovali jinde [1].

Isolace a identifikace

Velkou pomocí při izolaci bílkovin je možnost čistit tyto komplikované směsi často až do krystalického stadia. Několikarásobnou krystalisací při různých pH roztoku je u řady bílkovin možno dospět k více méně homogenním preparátům, které se všemi dostupnými způsoby měření jeví jako jednotné. Je beze sporu, že vytržením bílkovin z jejich přirozeného prostředí se často u nich způsobí změny a destrukce, takže výsledný preparát je artefakt. Přesto metody krystalisační umožnily dalekosáhlý pokrok v našich vědomostech.

Z čistících metod mají dnes největší význam frakcionace síranem amonným v různé koncentraci a frakcionace organickými rozpouštědly za nízkých teplot. V našich laboratořích bylo zatím připraveno asi 25 různých krystalických bílkovin a enzymů, z nichž některé lze připravit poměrně snadno ve velkých desítigramových kvantech v laboratoři. Je to na př. hemoglobin, chymotrypsinogen, aldolasa, trypsin, ovalbumin, ferritin, serumalbuminy, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa a pod. Poměrně dobře jdou krystalovat i některé bílkoviny rostlinné. Poněkud obtížnější již je krystalisace trypsinogenu, pepsinu, chymotrypsinu, lidského serumalbuminu, fibrinogenu, karboxypeptidasy, pepsinogenu a insulinu.

Alkoholová frakcionace za nízkých teplot a nízkých koncentrací anorganických solí je velmi elegantní, účinná metoda, která umožňuje přípravu velké řady bílkovin ve velmi čisté formě. Má řadu výhod proti klasické frakcionaci síranem amonným, vyžaduje však daleko pečlivější práci a nákladná zařízení, jako chladičí lázně, chlazené vysokoobrátkové odstředivky, mrazovou sublimaci a pod. Takovou malou ukázkou vý-

hodnosti této metody bylo převedení ferritinu na apoferritin, které jsme před časem popsali [2].

Chromatografické metody jsou zatím jen velmi nedokonalé a hlavní obtíž, že tuto v jiných případech účinnou operaci není možno úspěšně zatím na bílkovinné směsi použít, je jejich nestálost ve styku s velkými povrchy a nerozpustnost v nevodných prostředích. Zato velmi účinné je dělení bílkovinných směsí v homogenním elektrickém poli. Dosavadními konstrukcemi je možno sice zpracovat jen malá množství látky, ale dělení je velmi jemné a dobře sledovatelné. Existuje několik řešení preparativních elektrofores. Navazující na způsob Con s d e n ů v, umožňující dělit nízké peptidy ve vrstvě silikagelu, vypracovali jsme v našich laboratořích techniku, kterou lze elektroforeticky velmi účinně dělit směsi bílkovin v agarovém gelu [3]. Naše výsledky při studiu složek plasmy, bílkovin vaječného bílku, hemoglobinu, pepsinu, ferritinu, haemocyaninu a jiných ukázaly, že jsou srovnatelné s klasickou analytickou metodou Tiseliovou.

Chemické reakce některých skupin

Vedle reaktivních skupin aminokyseliných zbytků, vázaných uprostřed peptidických řetězců, jsou v bílkovinně reaktivní skupiny na obou koncích hlavního řetězce, a to karboxylový a aminový zbytek koncových aminokyselin. Určení těchto koncových aminokyselin je nám záhytným bodem, umožňujícím srovnávat jemné rozdíly na př. mezi podobnými bílkoviny různých zvířecích druhů. Největší studie v tomto směru byly provedeny na hemoglobinech. Vhodnou modifikací těchto metod je možno objasnit řazení většího počtu aminokyselin na konci peptidického řetězce. Aplikující jednu z těchto metod, vypracovali jsme pro ni nové typy pomocných dělicích operací na basi rozdělovací chromatografie [4] a dále se nám podařilo připravit bílkoviny, substituované dinitrofenylovými zbytky, v nativní formě [5], zatím co dosavadní postupy měly za následek denaturaci.

Štěpení bílkovin a peptidy

Totální hydrolysa bílkovin na aminokyseliny je cenná z několika důvodů. Předně nám umožňuje stanovit procentové zastoupení jednotlivých aminokyselin, které je pro bílkovinu často charakteristické. Nejdokonalejší analytická metoda, umožňující dnes kvantitativní stanovení všech aminokyselin z 10—20 mg bílkoviny, je dnes rozdělovací chromatografie na škrobovém sloupci dle M o o r a a S t e i n a, spojená s ninhydrinovou kolorimetrií.

Druhý význam totálních hydrolyz bílkovin tkví v možnosti získat některé aminokyseliny v preparativním měřítku. Výhodné je takto izolovat cystin, arginin, serin, glutamovou kyselinu, prolin speciálními postupy, vývoj dělicích metodik nám však v budoucnu jistě umožní získávat obecně řadu čistých aminokyselin z jednoho hydrolyzátu v jedné nebo několika málo operacích.

Konečně z konstitučních i biologických hledisek je významná možnost izolovat z totálních hydrolyrátů bílkovin nové, dosud nepopsané aminokyseliny. Využitím kombinovaných metod rozdělovací chromatografie, chromatografie na uhlí a na vyměňovačích iontů podařilo se v naší laboratoři připravit v čisté formě z želatinového hydrolyrátu aminokyselinu hydroxylysin [6].

Pracovně obtížnější, ale ještě důležitější než totální hydrolysy jsou parciální hydrolysy bílkovin na nižší peptidy. Dávají nám možnost nahlédnout do vnitřní struktury bílkovin a rozvrstvení jednotlivých aminokyselinových zbytků podél peptidického řetězce. Zatím existovala jen jedna bílkovina, ve které byl *Waldschmidt-Leitzem* navržen sled aminokyselin, a to protamin klupein. Parciální hydrolysou a analýsou štěpných produktů klupeinu se v naší laboratoři podařilo dokázat, že toto schéma, tradované ve všech učebnicích biochemie, je chybné [7].

Protože k peptidům patří velká řada látek fyziologicky nesmírně zajímavých (růstové faktory, toxické látky, látky s hormonálním účinkem atd.) je velmi důležité hledat cesty k jejich účinnému dělení. Ačkoliv dnes neexistuje nějaké obecné schéma, máme k dispozici velmi účinné operace, jako roztřepávání, rozdělovací chromatografie, iontoforezy, vyměňovače iontů a další, které určité řešení dávají.

Zatím byla známa konstituce pouze jednoho přirozeného polypeptidu, a to *Gramicidinu S*. Podařilo se v něm stanovit přesné řazení pěti aminokyselin. V naší laboratoři jsme isolovali podle popsaných metod ze zelené muchomůrky silně toxický hexapeptid faloidin v krystalickém stavu a pokusili se o stanovení jeho konstituce. Vzhledem k malému množství krystalického faloidinu (jen 17 mg) jsme při práci mohli použít pouze mikrometodik. Přesto kombinací parciálních hydrolys na nižší peptidy, rozdělovací chromatografie, iontoforezy a spektrální analýsy jsme dospěli k závěrům, na základě nichž bylo možno navrhnout pro faloidin cyklický hexapeptidický strukturní vzorec [8]. Jak se z další práce ukazuje, bude nutno tento vzorec podrobit revidi (poz. autora).

Synthesa bílkovin

Bylo by idealismem, čekat vyřešení syntesy bílkovin od organické chemie. Je nesmírně obtížné provést syntesu vyššího peptidu s různými aminokyselinovými zbytky. Je to jeden z nejnevědčejších oborů organické syntesy. Pro přípravu nižších fyziologicky významných peptidů je to ovšem cesta nezbytná. V našich laboratořích byla úspěšně provedena syntesa fyziologicky důležitého peptidu glutathionu novou cestou [9]. Jakmile však se přikročí k syntese vyššího polypeptidu, hromadí se stále nepřekonatelnější obtíže.

Zcela jinou cestu k syntese bílkovin volil sovětský fyzikální chemik *Bresler*. Objevil, že proteolytické enzymy, které za normálních podmínek štěpí bílkoviny na peptidy, použitím vysokého tlaku naopak

syntetisují vysokomolekulární bílkoviny z nízkých peptidů. To otvírá úplně nové možnosti v konstitučních pracech v bílkovinářském oboru. O této závažné serii prací bylo referováno v našem odborném tisku [10].

Závěr.

Chceme-li proniknout blíže k podstatě a projevům života, je bezpodmínečně nutné rozvinout co nejširší výzkum bílkovin, základní i aplikovaný. V Sovětském svazu je tato klíčová otázka řešena dnes stovkami výzkumných pracovníků a každoročně probíhají pracovní konference, přinášející pro obor bílkovin stále nové poznatky zásadního rázu. Globulární strukturní teorie bílkovin, tlaková resyntesa bílkovin, metabolismus aminokyselin, teorie biosyntesy peptidických vazeb, role nukleových kyselin a bílkovin při tvorbě koacervátních kapek, to jsou jen některé přínosy sovětských bílkovinářských pracovníků, které dalekosáhle rozšiřují naše dosavadní znalosti v tomto oboru.

U nás chemii bílkovin a enzymologii prakticky žádné větší pracoviště meřešilo. Proto se tento obor stal částí pracovní náplně Ústředního ústavu chemického, jak s hlediska základního výzkumu, tak z potřeb národohospodářských. Jediná domácí tradice, o kterou se jeho pracovníci mohli opřít, byla práce prof. Laufbergera, objevitele krystalické bílkoviny ferritinu, jinak bylo nutno hledat zkušenosti u pracovníků zahraničních. Dnes lze říci, že první dětské nemoci tohoto oboru jsou za námi. Musíme zde v Československu širokou spoluprací všech pracovišť, které řeší bílkovinářskou a enzymologickou problematiku dosáhnout základních cílů: dohnat a předejnat vědu kapitalistického světa, být schopni řešit úkoly, které před nás staví naše národní hospodářství a hledat ve svém oboru všechny cesty, které nás ruku v ruce se sovětskou vědou povedou blíže k socialismu a ke komunismu.

LITERATURA

1. Keil B., Chem. listy 45, 227 (1951).
2. Keil B., Potůčková J., Chem. listy 45, 225 (1951).
3. Gordon A. H., Keil B., Šebesta K., Knessl O., Šorm F., Coll. Czech. chem. comm. 15, 1 (1950).
4. Knessl O., Keil B., Malý A., Chvalovský J., Šorm F., Chem. listy 45, 145 (1951).
5. Šorm F., Körbl J., Matoušek L., Coll. Czech. chem. comm. 15, 259 (1951).
6. Šorm F., Mikeš O., Coll. Czech. chem. comm. 15, 288 (1951).
7. Šorm F., Šormová Z., Chem. listy 45, 215 (1951).
8. Šorm F., Keil B., Chem. listy 45, 278 (1951).
9. Rudinger J., Šorm F., Chem. listy 45, 212 (1951).
10. Šebesta K., Chem. listy 45, 90 (1951).