

Analiza MS polipeptydów otrzymywanych z kolagenu: od technologii do ciekawego odkrycia?

Agnieszka MIKUS, Jerzy GUZIŃSKI, Stanisław OSTROWSKI* – Instytut Chemii, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2016, 70, 3, 144–149

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie polipeptydami, ponieważ są one przedmiotem wielu prac badawczych i aplikacyjnych w różnych obszarach przemysłu chemicznego i lekkiego, w medycynie, farmakologii, kosmetologii, w przemyśle spożywczym, itp. [1–8]. Na dużą skalę można je m. in. otrzymywać w procesie hydrolizy kolagenu [9, 10]. Niedawno opublikowano proekologiczną i energooszczędną technologię produkcji polipeptydów z tego surowca (tj. z rozdrobnionych skórek zwierzęcych, pozyskiwanych w czasie uboju bydła i trzody chlewnej). Była ona opracowana i wdrożona w Chemicznej Spółdzielni „Żelatyna” w Słupsku (późniejszy LOTON) [11]. Niezwykle ważnym zagadnieniem w tej technologii jest analiza otrzymywanego hydrolizatu, tj. określenie wielkości cząsteczek polipeptydów. Ostatecznie zaproponowano szybką i dogodną metodę analizy za pomocą spektrometrii mas (MS), pozwalającą prowadzić kontrolę 'on-line' w trakcie hydrolizy, jak również identyfikować tworzące się frakcje peptydowe po zakończeniu procesu (w finalnym produkcie). Widma rejestrowano technikami tzw. jonizacji miękkiej (elektrosprej, fotosprej, fotojonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym). Idea i szczegóły tej metody zostały opublikowane w [12].

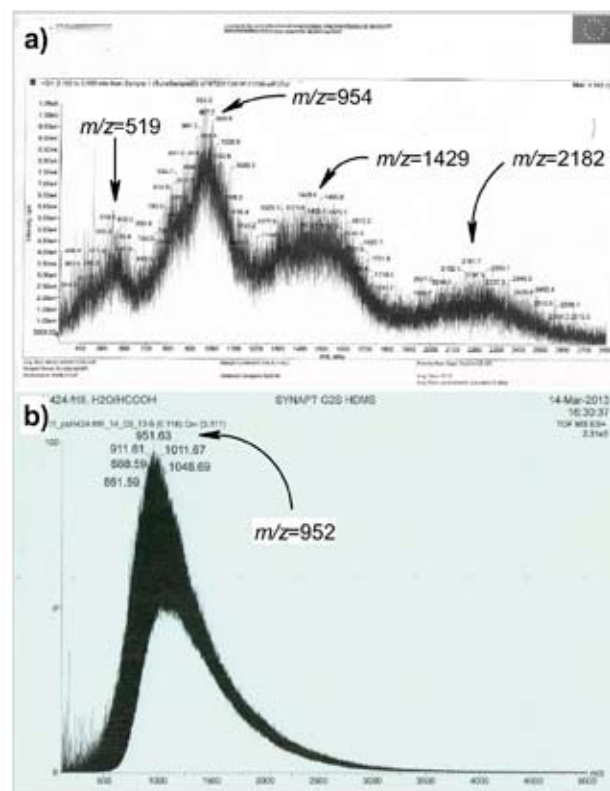
Opracowanie metody, pod kątem wykorzystania w dyskutowanej technologii, było możliwe dzięki poczynionej obserwacji, że cząsteczki polipeptydów, niezależnie od wielkości łańcucha, jonizują się ok. 50-krotnie. Są to ciekawe i bardzo zaskakujące wyniki. Obserwowana prawidłowość została potwierdzona prowadzonymi równoległe badaniami metodą elektroforetycznej analizy porównawczej [12], którą często stosuje się do analizy białek i peptydów. Właściwie to korelacja pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą MS oraz metodą elektroforezy pozwoliła sformułować wniosek o takiej samej krotności jonizacji. W widmach MS pojawiały się serie sygnałów w niskim zakresie wartości $m/z = 400\text{--}2500$ (przykład na Rys. 1a). Zastanawiające było ich wzajemne podobieństwo, z charakterystycznym, szerokim rozkładem (obwiednią) pików na widmie.

Widma są mało czytelne, co niewątpliwie jest związane z ogromną populacją mierzonych jonów. Na przykład, w przedziale 43–44 kDa (rzeczywista frakcja; patrz [12]) potencjalnie można oczekiwać nawet tysiąca łańcuchów polipeptydowych. Każdy z nich może być wielokrotnie zjonizowany i dla każdego powinien być widoczny gaussowski rozkład (dla serii sygnałów odpowiadających kolejnym ładunkom) [13]. Zauważając przedział zmiany ładunku tylko do $z_{sr} \pm 10$ ($\Delta z = 20$), zaobserwuje się $1000 \times \Delta z = 20000$ jonów dla wybranej frakcji polipeptydów. Dodatkowo, każdy jon ma charakterystyczny rozkład izotopowy, dobrze widoczny dla dużych mas molekularnych; np. dla $M = \text{ok. } 40 \text{ kDa}$ wyraźnie daje się zaobserwować siedem jonów izotopowych. Prowadzi to do $20000 \times 7 = 140000$ jonów. Interpretacja tak 'szerokiego pików' jest praktycznie niemożliwa, szczególnie w przypadku nakładania się z innymi podobnymi 'pikami' z sąsiedztwa. Ale

można określić maksimum krzywej, tzw. średnią wartość $[m/z]_{sr}$.

W rozpatrywanych widmach obserwowane maksima pasują bardzo dobrze do stopnia jonizacji $z_{sr} = \text{ok. } 50+$ (dobra korelacja dyskutowanej wyżej tendencji do multi-jonizacji z wynikami uzyskanymi metodą elektroforezy [12] i pomiarami metodą optyczną [11, 14]). Oznacza to, że wszystkie cząsteczki polipeptydów tworzące się w procesie hydrolizy kolagenu (niezależnie od masy molekularnej) jonizują się w trakcie pomiaru MS ok. 50 razy. Dzięki temu udało się zidentyfikować frakcje o różnych masach cząsteczkowych, głównie z przedziału 28–82 kDa.

Podsumowując, jeśli założenie o krotności jonizacji jest prawdziwe, to kształt pasm, dla ogromnej populacji jonów, jest wynikiem: (a) różnej wielkości łańcuchów polipeptydowych, (b) różnego stopnia jonizacji dla każdej cząsteczki (ujawniającego się w przybliżeniu z rozkładem gaussowskim), (c) pojawiania się jonów izotopowych i (d) nakładania się z pikami z sąsiedztwa (pochodzącymi od innych frakcji). W widmie produktu, tworzącego się w końcowej fazie hydrolizy (Rys. 1b), większość pików mieści się w przedziale $m/z = 700\text{--}1500$ ($[m/z]_{sr} = \text{ok. } 950$), co odpowiada $M = 35\text{--}75 \text{ kDa}$. Serie sygnałów pod obwiednią, bardziej oddalone od uśrednionego m/z , mogą być następstwem uwarunkowań ujętych w punktach (a)–(d).



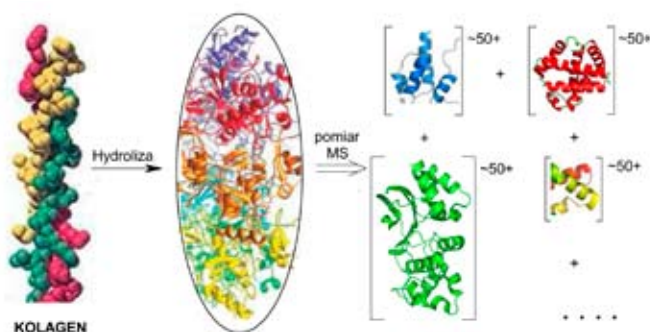
Rys. 1. Widma MS frakcji polipeptydowych: (a) początkowa faza hydrolizy kolagenu (technika ESI turbo-sprej), (b) widmo wybranej frakcji (technika ESI); szczegóły eksperymentalne – patrz [12]. Maksima $m/z \times 50$ w przybliżeniu odpowiadają uśrednionym wartościom mas cząsteczkowych tworzących się polipeptydów.

Autor do korespondencji:
Prof. Stanisław OSTROWSKI, e-mail: stan@uph.edu.pl

Zastanawiająca jest sprawa protonowania fragmentów polipeptydowych. Wprawdzie są one układami znanymi z dużej tendencji do przechodzenia w jony wielokrotnie naładowane [15] i jest to zjawisko dość powszechne w trakcie pomiaru MS-ESI, ale kwestią otwartą jest nieznaną preferencją „wyekspozowania” ok. 50 grup podatnych na protonowanie. Jak wynika z pomiarów, dzieje się tak niezależnie od długości łańcucha. Z literatury, dotyczącej widm MS połączeń białkowych (rejestrowanych techniką MS-ESI) wiadomo, że liczba przyłączonych protonów na ogół zależy od wielkości cząsteczki i (w przypadku mniejszych molekuł) ma ścisły związek z liczbą zasadowych aminokwasów wchodzących w ich skład. Ostateczne wyjaśnienie tego zjawiska zapewne wymagałoby podjęcia kompleksowych studiów, w tym obejmujących pomiary MS dla pojedynczych nici peptydowych. Niniejszy artykuł stanowi próbę dyskusji tego zjawiska na podstawie danych MS (uzyskanych i literaturowych) oraz wiedzy o tworzeniu się i strukturze kolagenu.

Po pierwsze, w literaturze są przykłady widm MS, w których obserwowano wysoki stopień jonizacji tego typu związków (transferyna: głównie 52+/54+ [16], α -fetoproteina (glikoproteina występująca w surowicy płodowej): ok. 50+ [17], surowiczca albumina bydlęca (BSA): średnio 45+ [15]). Kto wie, czy nie jest to obszar jakiejś granicznej wartości stopnia jonizacji dla tych cząsteczek ($z =$ ok. 50). Ale wydaje się, że rozstrzygającej odpowiedzi należy szukać w samej strukturze kolagenu, gdzie mamy do czynienia z niespotykaną regularnością rozmieszczenia aminokwasów [18]. Niewiele innych białek wykazuje taką regularność.

Po drugie, kolagen składa się głównie z powtarzających się triad aminokwasów: glicyna-prolina-hydroksypolina. Zawsze co trzecią pozycję w łańcuchu polipeptydowym okupuje glicyna, ale zamiast dwóch ostatnich (jest ich łącznie ok. 30%) w niewielkich ilościach pojawia się w tych triadach hydroksylizyna i niektóre inne aminokwasy. Charakterystyczne, że hydroksypolina praktycznie nie występuje w innych białkach (lub występuje sporadycznie). Nie ma ona kodu genetycznego kontrolującego jej wbudowywanie do syntetyzowanego białka. W przypadku kolagenu, nic jest budowana głównie z proliny; i wybrane jednostki prolinowe są utleniane potranslacyjnie (w procesie katalizowanym przez hydroksylazy w obecności witaminy C) do hydroksyproliny. Jak wiadomo, niedobór witaminy C powoduje szkorbut i ma to bezpośredni związek z utratą zdolności organizmu do tworzenia kolagenu.



Schemat I. Uproszczony schemat analizy MS polipeptydów otrzymanych z kolagenu

Po trzecie, łańcuchy polipeptydowe kolagenu, na skutek oddziaływań między sobą, mają tendencję do przyjmowania ściśle określonych konformacji. Trzy długie skręcone, zagięte w lewo łańcuchy (zawierające po ok. 1000 aminokwasów) owijają się spontanicznie nawzajem w podjednostki zwane tropokolagenem, który ma kształt potrójnej, prawoskrętnej, ściśle upakowanej helisy. Cząsteczki tropokolagenu, związane ze sobą bokami i końcami, tworzą włókna kola-

genowe [18, 19]. Obecność hydroksyproliny, w połączeniu z proliną, zapewnia wytworzenie bardzo mocno zwiniętej struktury. Wpływ na ostateczny kształt włókien mają stabilizujące helisę wiązania kowalencyjne i wodorowe.

Być może jest to kluczowa sprawa. I w procesie odwrotnym, czyli w trakcie hydrolizy, 'pocięte' łańcuchy przyjmują (w związku z regularną budową) charakterystyczne dla siebie konformacje, które równomiernie i w określonej ilości mają rozlokowane grupy dostępne do protonowania w trakcie pomiaru MS (Schemat I). Jest więc inaczej niż w przypadku niewielkich oligopeptydów, gdzie – jak wspomniano wyżej – liczba przyłączonych protonów na ogół zależy od liczby zasadowych aminokwasów, a tym samym od wielkości cząsteczki.

Tak więc kolagen zarówno tworzy się inaczej, jak i prawdopodobnie rozpada się inaczej. A utrwalona struktura łańcuchów po hydrolizie jest zapewne wymuszana przez jakieś względy konformacyjne.

Podsumowanie

Trudno powiedzieć, jaka jest rzeczywista przyczyna tej zunifikowanej jonizacji. W niniejszym artykule przedstawione zostały fakty eksperymentalne – że tak jest. Pokazano też, na podstawie doniesień literaturowych, że wielokrotna jonizacja peptydów w trakcie pomiaru MS jest możliwa. Podjęto próbę wyjaśnienia, dlaczego tak się dzieje. Ale powyższe rozważania nie dają ostatecznej odpowiedzi. Są zwróceniem uwagi na obserwowane zjawisko i mają stanowić zachętę do dalszej dyskusji. Wszystko razem przyczyniło się do opracowania dogodnej metody analizy polipeptydów, otrzymywanych w technologii hydrolizy kolagenu.

Literatura

1. Miller A.T.: Patent USA No 4388331, 1983.
2. Olsen D., Yang Ch., Bodo M., Chang R., Leigh S., Baez J., Carmichael D., Perälä M., Hämmäläinen E.-R., Jarvinen M., Polarek J.: *Recombinant collagen and gelatin for drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev. 2003, **55**, 1547–1567.
3. Rocha L.B., Goissis G., Rossi M.A.: *Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing*. Biomaterials 2002, **23**, 449–456.
4. Bardhan P.N., Coyaji B., Ram M.: *Treatment of shock with gelatin as plasma expander*. Ind. J. Med. Res. 1963, **51**, 871–889.
5. Nimmi M.E. (red.): *Collagen, I: Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988.
6. Fratzl P. (red.): *Collagen: Structure and mechanics*. Springer Science and Business Media, Boston, MA, 2008.
7. Barth D.: *Kollagenmodellpeptide: Synthese und biophysikalische Eigenschaften* (PhD Thesis), Max-Planck-Institut für Biochemie, München, 2003.
8. Zakłady Chemiczne LOTON w Słupsku, Producent kosmetyków.
9. Cioca G.: Patent USA No 4363760, 1982.
10. Zhang Z.K., Li G.Y., Shi B.: *Physicochemical properties of collagen, gelatin, and collagen hydrolysate derived from bovine lamed split wastes*. J. Soc. Leather Technol. Chem. 2005, **90**, 23–28; i odsył. tam cytowane.
11. Guziński J., Ostrowski S.: *Technologia otrzymywania polipeptydów w procesie hydrolizy kolagenu i możliwości wykorzystania produktu [Technology of polypeptides preparation by hydrolysis of collagen and the possibilities of utilization of the product]*. Przem. Chem. 2010, **89**, 1189–1193.
12. Ostrowski S., Guziński J., Mikus A., Świder P., Tylingo R.: *Szybka i dogodna metoda analizy produktów hydrolizy kolagenu [A fast and convenient method for analysis of collagen hydrolysis products]*. Przem. Chem. 2016, **95**, 89–92.
13. Fenn J.B., Mann M., Meng Ch.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.: *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science 1989, **246**, 64–71.
14. Grosman A.: informacja prywatna.
15. Trauger S.A., Webb W., Siuzdak G.: *Peptide and protein analysis with mass spectrometry*. Spectroscopy 2002, **16**, 15–28.
16. <http://www.zba.wbbib.uj.edu.pl/documents/23149178/a1aebb27-f35b-423c-b3ea-ec2272c64dc1> (01.12.2015).

17. Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.M., Tai H.L.: *Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications*. Clin. Biochem. Rev. 2003, **24**, 3–12.
18. Eyre D.R.: *Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold*. Science 1980, **207**, 1315–1322.
19. Brodsky B., Persikov A.V.: *Molecular structure of the collagen triple helix*. Adv. Prot. Chem. 2005, **70**, 301–339.

Dr Agnieszka MIKUS ukończyła studia na Wydziale Chemiczno-Matematycznym Akademii Podlaskiej, 2001 (obecnie Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach). Pracuje w Instytucie Chemii macierzystej Uczelni, gdzie uzyskała stopień doktora nauk chemicznych (2005). Jej praca doktorska, dotycząca chemii porfiry, została wyróżniona w 2006 r. w konkursie Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Sigma-Aldrich. Specjalność – chemia organiczna.

Mgr Jerzy GUZIŃSKI ukończył studia wyższe na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu (1955). Przez wiele lat był związany z Chemiczną Spółdzielnią „Żelatyna” w Słupsku (późniejszy LOTON), gdzie m.in. pełnił funkcję prezesa. Pracował także w Zakładach Chemicznych Przemysłu Organicznego „Rokita” w Brzegu Dolnym oraz w fabrykach żelatyny w Brodnicy, w Calbe (Niemcy), w Ljublanie (Słowenia) i w Skopje (Macedonia). Obecnie – na emeryturze.

Prof. Stanisław OSTROWSKI ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej (1984). Pracuje w Instytucie Chemii Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, jest kierownikiem Zakładu Syntezy Organicznej. Specjalność – chemia i technologia organiczna.

Aktualności z firm

News from the Companies

Dokończenie ze strony 139

Grupa Azoty SA – porozumienie z Urzędem Dozoru Technicznego (UDT)

Działania, które będą realizowane na podstawie porozumienia, mają podnieść poziom bezpieczeństwa eksploatowanych przez Grupę Azoty SA urządzeń technicznych i instalacji podlegających dozoru technicznemu. Porozumienie dotyczy w szczególności przygotowania i wdrożenia programu eksperckiego opartego na metodzie Risk Based Inspection (RBI) oraz wypracowania rozwiązań zmierzających do optymalizacji okresów międzyinspekcyjnych i międzyremontowych wynikających z tego programu. Współpraca obejmuje także konsultacje lub przeprowadzanie analiz zagrożeń HAZOP, analiz warstw zabezpieczeń LOPA i analizy zagrożeń układów automatyki sterowania C-HAZOP.

– *W Grupie Azoty stawiamy na ciągły rozwój. Chcemy być nowocześniejsi, bardziej konkurencyjni i przede wszystkim chcemy dbać o to, co jest naszym podstawowym obowiązkiem czyli bezpieczeństwo techniczne. Naszym celem jest zapewnienie go na najwyższym światowym poziomie, a podpisane dziś porozumienie z Urzędem Dozoru Technicznego daje nam dodatkowo możliwość poprawy efektywności urządzeń i tym samym obniżenia kosztów produkcji – powiedział Witold Szczypiński, wiceprezes zarządu Grupy Azoty. UDT konsekwentnie realizuje strategię redefinicji inspekcji technicznej w kierunku wykorzystywania najnowszych metod badawczych. To dla nas wielka satysfakcja, że tak ważny dla polskiej gospodarki podmiot z branży chemicznej, jakim jest Grupa Azoty, dołączył do firm – liderów bezpieczeństwa technicznego. Decyzja Grupy Azoty o podjęciu ścisłej współpracy z UDT w zakresie wdrażania nowoczesnych światowych rozwiązań w dziedzinie optymalizacji zakresu, metod i częstotliwości inspekcji urządzeń technicznych, przekłada się bezpośrednio na obniżenie kosztów związanych z postojami remontowymi, a co za tym idzie, na poprawę konkurencyjności naszych partnerów z przemysłu – zaznaczył Mieczysław Borowski prezes UDT.* (<http://grupazoty.com/pl/wydarzenia>, 10.03.2016)

Grupa TAURON rozpoczyna trzeci program poprawy efektywności

Grupa TAURON przyjęła program poprawy efektywności na lata 2016–2018. Program obejmuje wszystkie obszary działalności holdingu i przyniesie 1,3 mld PLN oszczędności. Łączny skumulowany wzrost EBITDA z tytułu Programu Poprawy Efektywności w latach 2016–2018 szacowany jest na ok. 1 mld PLN. Będzie to już trzecia inicjatywa tego typu i – co warto podkreślić – największa pod względem spodzie-

wanych efektów. Poprzednie, prowadzone w latach 2010–2015, przyniosły łącznie 2,3 mld PLN oszczędności. (kk)

(<http://media.tauron.pl/>, 9.03.2016)

KONKURSY, NAGRODY, WYRÓŻNIENIA

Wybitni inżynierowie nagrodzeni w plebiscycie „Złoty Inżynier 2015”

25 inżynierów nagrodzono w plebiscycie „Złoty Inżynier 2015” promującym dokonania polskich inżynierów. Organizatorem XXII edycji plebiscytu o tytuł Złotego Inżyniera są: Federacja Stowarzyszeń Naukowo-Technicznych Naczelna Organizacja Techniczna oraz czasopismo Przegląd Techniczny. Nagroda ma promować dokonania polskich inżynierów i zwrócić uwagę na ich rolę w budowaniu innowacyjnej i konkurencyjnej gospodarki. Inżynierów nagrodzono w 9 marca br. podczas gali w Warszawskim Domu Technika. (więcej na str. 167) (kk)

(<http://naukawpolsce.pap.pl/>, 10.03.2016)

TAURON liderem relacji inwestorskich

TAURON, po raz drugi z rzędu, zwyciężył w największym w kraju badaniu relacji inwestorskich spółek z WIG30 zorganizowanym przez Izbę Domów Maklerskich i Gazetę Giełdy i Inwestorów „Parkiet”. Spółka prowadzi aktywny dialog z inwestorami poprzez m.in. konferencje prasowe, konferencje inwestorskie, dni inwestora i analityka, roadshows, czaty inwestorskie i spotkania z inwestorami indywidualnymi. Tegoroczna, zdobyta drugi raz z rzędu, nagroda przyznana w badaniu relacji inwestorskich spółek z WIG30 zorganizowanym przez Izbę Domów Maklerskich i Gazetę Giełdy i Inwestorów „Parkiet” to kolejne przyznane TAURONOWI wyróżnienie. (kk)

(<http://media.tauron.pl/>, 4.03.2016)

PCC EXOL SA złotym sygnatariuszem społecznej odpowiedzialności biznesu

Spółka PCC EXOL SA, największy w Polsce i regionie Europy Środkowo-Wschodniej producent surfaktantów, otrzymała złoty poziom społecznej odpowiedzialności biznesu przyznany przez kapitułę platformy EcoVadis. Złoty poziom CSR jest bardzo istotnym i niezwykle prestiżowym wyróżnieniem, przyznawanym za proekologiczny rozwój i osiągnięcia w obszarach dotyczących środowiska, zatrudnienia, uczciwych praktyk biznesowych oraz łańcucha dostaw. (kk)

(<http://www.pcc-exol.eu/>, 25.02.2016)

Dokończenie na stronie 149