

Andrzej NOWORYTA, Anna TRUSEK-HOŁOWNIA, Magdalena LECH

e-mail: andrzej.noworyta@pwr.edu.pl

Zakład Inżynierii Bioprosesowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Modelowanie enzymatycznej hydrolizy białek**Wstęp**

Reakcja depolimeryzacji jest bardzo specyficzną reakcją szeregowo-równoległą. Z danego biopolimeru powstaje szereg oligomerów, które są substratem dla dalszej depolimeryzacji. Dla biopolimerów zawierających setki merów (a takimi są m.in. białka) układ reakcyjny ze względu na liczbę występujących indywiduów chemicznych jest bardzo złożony.

Opracowano matematyczny model procesu hydrolizy biopolimerów, który pozwala na obliczanie postępu reakcji mierzonego całkowitym stopniem przereagowania oraz na określenie ilościowego składu mieszaniny reakcyjnej [Trusek-Hołownia i Noworyta, 2015]. W tym modelu kinetyki zachodzącego procesu przyjęto podstawowe założenie, że substratami reakcji hydrolizy są poszczególne wiązania chemiczne mer-mer zawarte w danym biopolimerze.

W przypadku białek poszczególne aminokwasy tworzące ten biopolimer różnią się łańcuchem bocznym i stąd wiązania peptydowe występujące między nimi nie są tak samo podatne na hydrolizę przez dany enzym. Odniesienie reaktywności do wiązania peptydowego powoduje, że ilość wiązań o danej sekwencji aminokwasowej oraz ich położenie w danym łańcuchu oligomeru determinują opis kinetyki rozpatrywanej reakcji.

Modelowanie tak złożonego układu reakcyjnego wymagało przyjęcia pewnych założeń, a mianowicie:

1. Znana jest sekwencja merów w hydrolizowanym biopolimerze oraz specyficzność substratowa stosowanego enzymu. Dane takie można z dobrą dokładnością uzyskać z dostępnych bibliotek np.: *BIOPEP*, *PDB*, *Expasy*, *Prosites*, *PIR*, *InterPro*, *Scop*, *MEROPS*.
2. W wyniku pojedynczej reakcji zostaje rozcięte tylko jedno wiązanie.
3. Hydroliza wszystkich wiązań opisana jest równaniem kinetycznym tej samej postaci uwzględniającym współczynniki reaktywności, przy czym każde z wiązań chemicznych w zależności od podatności na hydrolizę przez dany enzym ma zdefiniowany współczynnik reaktywności. Przyjęto dodatkowo, że wiązania występujące w danym biopolimerze można pogrupować na kilka rodzajów różniących się wartością współczynnika reaktywności (β). Liczba grup dobierana jest w zależności od specyficzności stosowanego enzymu w stosunku do danego substratu. W przypadku proteaz proponuje się podział ograniczyć do 3 grup:
 - wiązania silnie reaktywne o współczynniku $\beta = 1$
 - wiązania słabo reaktywne o współcz. z zakresu $\beta (0,1)$
 - wiązania niereaktywne o współczynniku $\beta = 0$
4. Każdemu merowi w danym biopolimerze przypisuje się taką samą średnią masę molową.

Omawiany model uwzględnia wszystkie aspekty występujące w reakcji enzymatycznej, tj.: wspomniana wyżej reaktywność każdego z wiązań, stężenie składnika mieszaniny reakcyjnej zawierającego dane wiązanie, możliwość wystąpienia inhibicji oraz inaktywację enzymu w czasie.

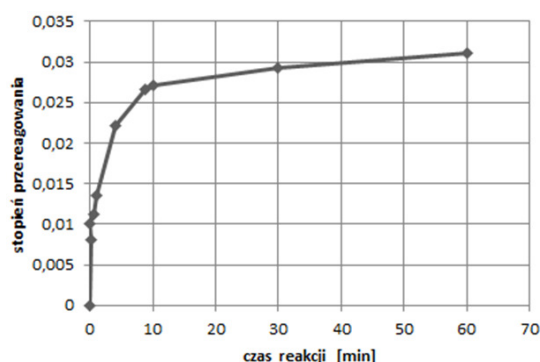
W niniejszej pracy przedstawiono wybrane wyniki uzyskane przy weryfikacji tego modelu na przykładzie hydrolizy typowego białka.

Doświadczalna weryfikacja na przykładzie hydrolizy albuminy serum

Przeprowadzono reakcje hydrolizy albuminy wołowej (*Sigma-Aldrich*) przy zastosowaniu termolizyny (*Sigma-Aldrich*). Reakcje prowadzono w reaktorze okresowym w temperaturze 60°C, w pH 7,0.

Skład mieszaniny reakcyjnej określano przy wykorzystaniu SE-HPLC (*Shimadzu*) na połączonych szeregowo kolumnach: *BioSep-SEC-s2000* i *Yarra-3u-SEC-2000* (*Phenomenex*) (0,1 M bufor fosforanowy pH 6,8; 0,6 mL/min; 214 nm; 25 °C; 60 min.). Na podstawie uzyskiwanych chromatogramów obliczano udział masowy poszczególnych frakcji oligomerów oraz ogólny stopień przereagowania (α) rozumiany jako ułamek zhydrolizowanych wiązań peptydowych.

Na rys.1 przedstawiono typowy przebieg stopnia przereagowania w czasie, charakterystyczny również dla innych białek poddawanych enzymatycznej hydrolizie.



Rys. 1 Przykładowy przebieg stopnia przereagowania albuminy przy zastosowaniu termolizyny jako katalizatora. Stężenie początkowe substratu 2,5 g/L, stężenie enzymu 0,005 g/L, temp. 60°C

Wyróżnić można dwa charakterystyczne okresy. W pierwszym, trwającym zwykle do jednej minuty, ma miejsce bardzo szybka reakcja, po czym następuje silne załamanie szybkości hydrolizy i dalszy zdecydowanie wolniejszy przebieg reakcji. Taki przebieg potwierdza słuszność założenia o występowaniu w surowcu wiązań o wyraźnie różnej reaktywności. Przeprowadzenie obliczeń wg opracowanego modelu wymagało znajomości liczby i położenia w łańcuchu biopolimeru wiązań bardzo reaktywnych, co zwyczajowo robi się wykorzystując dostępne biblioteki specyficzności substratowej dla stosowanej proteazy. Przebieg wyznaczonej doświadczalnie wartości stopnia przereagowania (Rys. 1), można dodatkowo wykorzystać do zweryfikowania poprawności wyznaczenia liczby tych wiązań.

Zmniejszenie szybkości hydrolizy białek, zwłaszcza przy niewielkim stopniu przereagowania, może być również spowodowane inhibicją, z reguły tworzącymi się w wyniku reakcji peptydami o krótkich i średnich długościach łańcucha [Greenwell i in., 1969; Wei i Zhimin, 2006]. Kolejnym krokiem było zatem potwierdzenie lub wykluczenie takiego mechanizmu zachodzących reakcji. Jeżeli w danej reakcji ma miejsce inhibicja produktem (produktami) reakcji, należy inhibitor zidentyfikować oraz określić rodzaj inhibicji.

W procesie okresowym stężenie inhibitora (jednego z produktów reakcji) jest zmienne. Stosując nomenklaturę analogię do terminologii używanej w inżynierii reakcji chemicznych można powiedzieć, że jest to reakcja autoinhibicji. Aby potwierdzić występowanie inhibicji i określić jej rodzaj przeprowadza się standardowe testy, prowadząc reakcję przy różnych stężeniach surowca a niezmiennym stężeniu enzymu bądź/ przy różnych stężeniach enzymu. Wykonano takie badania, a analiza uzyskanych wyników wykazała, że rozpatrywany proces hydrolizy albuminy z udziałem termolizyny przebiega z inhibicją produktem(-ami) reakcji, przy czym im wyższe jest początkowe stężenie surowca, tym silniejszy efekt inhibicji.

Opracowany algorytm obliczania przebiegu reakcji depolimeryzacji [Trusek-Hołownia i Noworyta, 2015] pozwala na wyznaczenie

stężenia wszystkich składników mieszaniny reakcyjnej, w tym również inhibitora. Pozostaje do ustalenia, co jest inhibitorem danej reakcji zawierającej setki reagentów. Można to udowodnić doświadczalnie, ale należy dysponować zbiorem próbek wszystkich substancji (powstających oligomerów) obecnych w mieszaninie reakcyjnej, co jest to praktycznie niemożliwe.

Literatura dostarcza jednak licznych informacji o potencjalnych inhibitorach danego enzymu, wskazuje je bezpośrednio, bądź określa istotne cechy chemicznej budowy takiego inhibitora [Chanprapaph i in., 2005; Ceruso i in., 2012]. Z reguły w tak złożonej mieszaninie reakcyjnej jest obecnych kilka inhibitorów. Przyjęto zatem, aby na potrzeby obliczeń modelowych utworzyć frakcję inhibitorów, której stężenie reprezentować będzie inhibitor w równaniu kinetycznym.

Ponieważ, jak już zaznaczono, inhibitorami są peptydy o krótkich i średnich łańcuchach, z reguły nie są one produktami pośrednimi występujących reakcji następczych. Przeprowadzone obliczenia wykazały, że ich stężenie monotonicznie rośnie a udział poszczególnych składników tej frakcji jest w trakcie procesu z wystarczającą dokładnością stały.

W rozpatrywanym przypadku hydrolizy albuminy przyjęto, że w skład frakcji inhibitorów wchodzi peptydy zawierające od jednego do szesnastu aminokwasów w łańcuchu. Na tej podstawie możliwe jest wyznaczenie na drodze estymacji stałych równania kinetycznego, w tym stałej inhibicji odniesionej do frakcji inhibitorów.

Fakt, że w trakcie procesu okresowego zmienia się stężenie inhibitora(-ów) powoduje, że trudno jest w sposób jednoznaczny stwierdzić, jaki rodzaj inhibicji występuje. Literatura [Greenwell i in., 1969; Chanprapaph i in., 2005] oraz przeprowadzone badania sugerują, że prawdopodobna jest inhibicja kompetycyjna i taką też przyjęto w niniejszej pracy. Stąd do opisu kinetyki zachodzącego procesu wybrano równanie o postaci:

$$r = \frac{r_{\max} c_0 (1 - \alpha)}{K_M \left(1 + \frac{y_I c_0}{K_I} \right) + c_0 (1 - \alpha)} \quad (1)$$

gdzie:

c_0 – początkowe stężenie białka, [g/L]

K_I – stała inhibicji, [g/L]

K_M – stała Michaelisa-Menten, [g/L]

r – szybkość reakcji [g/L·s]

y_I – ułamek masowy frakcji inhibitora, [-]

α – stopień przereagowania, [-]

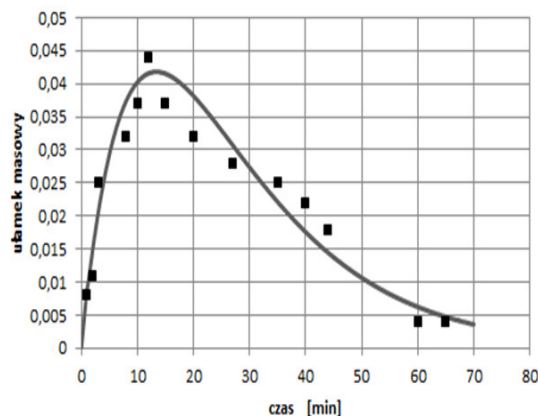
Ostateczną weryfikację modelu przeprowadzono wykorzystując dane o składzie mieszaniny reakcyjnej w trakcie przebiegu procesu. Dane takie nie są łatwe do uzyskania, jako że jak już wspomniano w układzie występuje bardzo duża liczba reagentów ich rozdzielanie do celów analitycznych jest skomplikowane, a czasami wręcz niemożliwe. Z tej przyczyny celowym jest pogrupowanie występujących reagentów na frakcje względem długości łańcucha aminokwasów (masy cząsteczkowej). Od strony algorytmu obliczeń opartego na opracowanym modelu nie stanowi to żadnej trudności, bowiem stężenie każdego reagenta liczone jest oddzielnie. Grupowanie na frakcje należy zatem przeprowadzić w taki sposób, w jaki uda się rozdzielić piki na chromatogramie.

Na rys. 2 przedstawiono przebieg dwóch wybranych frakcji, tj. frakcji zawierającej od 160 do 177 aminokwasów, jako przykład reagentów pośrednich w reakcji następczej oraz frakcji zawierającej od 10 do 18 aminokwasów, jako przykład frakcji końcowej.

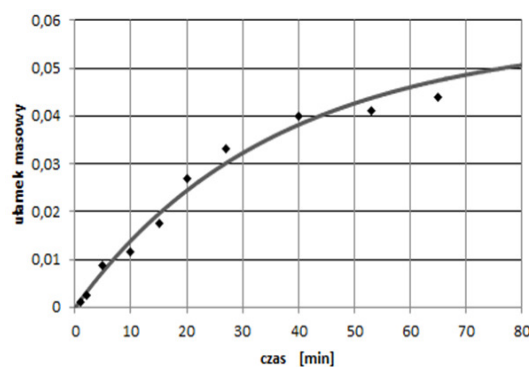
Porównanie przebiegu modelowego z doświadczalnym można uznać za zadowalające, zwłaszcza pamiętając jak złożona jest analiza poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej.

Wnioski

Proces enzymatycznej hydrolizy albuminy serum przy zastosowaniu termolizyny opisano modelem depolimeryzacji białek.



Rys. 2a. Zmiana ułamka masowego frakcji zawierającej od 160 do 177 aminokwasów w czasie reakcji. (Linia obrazuje przebieg modelowy)



Rys. 2b. Zmiana ułamka masowego frakcji zawierającej od 10 do 18 aminokwasów w czasie reakcji (Linia obrazuje przebieg modelowy)

Uzyskano bardzo dobrą zgodność odnośnie całkowitego stopnia hydrolizy oraz zadowalającą zgodność co do składu poszczególnych peptydów w mieszaninie reakcyjnej. Ta ostatnia zależność jest bardzo ważna w strategii prowadzenia hydrolizy białek, ponieważ spośród wielkiej liczby powstających peptydów tylko niektóre przedstawiają istotną wartość technologiczną i proces powinien być tak prowadzony, aby ich stężenie było jak największe.

LITERATURA

- Ceruso M., Howe N., Malthouse J.P.G., 2012. Mechanism of the binding of Z-L-tryptophan and Z-L-phenylalanine to thermolysin and stromelysin-1 in aqueous solutions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1824**, 303-310. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.10.007
- Chanprapaph S., Saparpakorn P., Sangma Ch., Niyomrattanakit P., Hannongbua S., Angsuthanasombath Ch., Katzenmeier G., 2005. Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **330**, 1237-1246. DOI: 0.1016/j.bbrc.2005.03.107
- Greenwell P., Knowles J.R., Sharp H., 1969. The inhibition of pepsin-catalysed reactions by products and product analogues. Kinetic evidence for ordered release of products. *Biochem. J.*, **113**, 363-368.
- Trusek-Holownia A., Noworyta A., 2015. A model of kinetics of the enzymatic hydrolysis of biopolymers – a concept for determination of hydrolysate composition. *Chem. Eng. Proc.*, **89**, 54-61. DOI: 10.1016/j.cep.2015.01.008
- Wei Q., Zhimin H., 2006. Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model. *Front. Chem. China*, **3**, 308-314. DOI 10.1007/s11458-006-0026-9

Praca została sfinansowana z grantu badawczego 011/03/B/ST8/06029 Narodowego Centrum Nauki.