

Áhrif viðtengdra kítósanfáliða á stöðugleika ensíma

Fannar Jónsson og Hörður Filippusson

Raunvísindastofnun Háskólans

Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

Ágrip Ensímið trypsín úr nautabrisi (EC 3.4.21.4) var tengt við þrjár mislangar kítósanafleiður með aðstoð vatnsleysinna karbódíímíðefna. Markmiðið var að rannsaka hvort slíkar breytingar hafi áhrif á stöðugleika próteinasans við hitun og geymslu. Aukinn stöðugleiki próteina er áhugaverður í tengslum við notkun próteina sem lyfja, til að auka geymsluþol ensíma og við hvötun efnahvarfa við hærri hitastig. Niðurstöðurnar sýndu að trypsín tengt 7-8 eininga kítósanfáliðum gaf mestan stöðugleika. Helmingunartíminn ensímvirkinnar jókst um 60% við 60°C og um 130% við 50°C. Virkjunarorka afmyndunar jókst einnig um 17%.

Inngangur

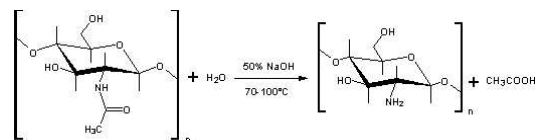
Trypsín er sérinpróteasi sem klýfur peptíðtengi próteina, þar sem aminosýrurnar argínín eða lýsín eru karbónýlmegin við tengið. Stöðugleiki trypsíns var ákvarðaður sem mismunur tveggja ástandsforma, annars vegar myndað form (M) og hins vegar afmyndað form (A). Afmyndun ensímsins með hitun var mæld sem virknitap þess og má almennt líta á sem fyrsta stigs efnahvarf:



Þar sem k er afvirkjunarhraðafasti afmyndunar og upphafshraði (v_0) þess er $-d[M]/dt = k[M]$.

Mörg náttúruleg prótein eru tengd fásýkrum og fjölsýkrum og kölluð glýkóprótein. Þessi flokkur próteina gegna ýmsum sérhæfðum hlutverkum innan og milli fruma eins og sem flutningsprótein, himnuviðtakar og stuðla að viðloðun milli fruma. Glýkóprótein gegna oft hlutverkum innan fruma við aðstæður sem sambærileg prótein án sykra myndu ekki þola. Það væri því skynsamlegt að tengja fásýkrur inn á ensím til að auka stöðugleika þeirra til notkunar í iðnaði eða í lækni- og lyfjafræðilegum tilgangi við aðstæður sem óbreytta ensímið myndi ekki þola. Sýnt hefur verið fram á að auka megi stöðugleika trypsíns úr nautabrisi með því að tengja inn á það mismunandi gerðir fjölsykra/fásykra [1,2]. Kítósan hefur verið notað til stöðgunar á mismunandi gerðum ensíma [3].

Kítín er fjölliða gerð úr β -(1-4)-tengdum N-acetyl-D-glúkósamínleifum. Kítín er einkum unnið úr skel krabba og rækja, en er einnig að finna í flestum gerðum skordýra. Skeljarnar eru fyrst soðnar í basískri lausn til að losa prótein, síðan er

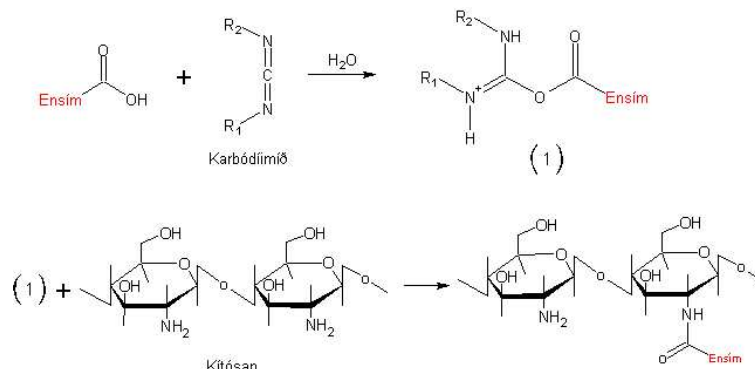


Mynd 1. Brottnám asetýlhóps af N-asetýlglútamínleif breytir kítín í kítósan.

kalsíumkarbónat í skelinni leyst upp við súrar aðstæður til þess að fá hreint kítín. Með vatnsrofi í sterkri alkalískri lausn (50% NaOH) eru asetleifar fjarlægðar af kítíni og fæst þannig kítósan (sjá mynd 1).

Kítín og kítósan eru líffræðilega virkar fjölsýkrur og algengastar í náttúrunni á eftir sellulósa, sem gerir þær vishverfar [4] og þær hafa enga eiturvirkni. Fóðrunartilraunir músa gaf LD₅₀ meira en 16 g/kg, sem er hærra en fyrir súkrósa [5]. Ólíkt flestum náttúrulegum fjölliðum, sem eru oftast hlutlausar eða súrar, þá eru kítín og kítósan frekar basískar fjölliður. Í súrri lausn er kítósan hlaðin sameind en ekki kítín, vegna frjálsra amínóhópa kítósans. Þetta gerir kítósan að mun leysanlegri sameind heldur en kítín. Þessir eiginleikar kítíns og kítósans gerir það nothæft til annara og/eða viðtækari nota heldur en sellulósa, dextran, agar og fleiri [6].

Um margar aðferðir var að velja við að mynda samgild tengi kítósans við ensím. Tvær aðferðir voru prófaðar, annars vegar að mynda brú á milli amínóhópa ensíms og kítósans með aðstoð glúteraldehýðs og hins vegar að tengja ensím beint við kítósan með aðstoð karbódíímíðefna [7]. Sú síð-



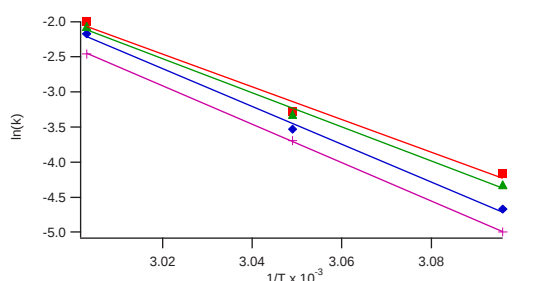
Mynd 2. Tenging karboxýlhóps ensíms við aminóhóp kítósans með aðstoð karbódíimíðefna. Hvörfin eiga sér stað í vatnslausn við pH 5 og við herbergishita.

ari reyndist betri. Karbódíimíðefni virkja karboxýlhópa á yfirborði ensíma þannig að ensímin geti hvarfast við frjálsa aminóhópa á kítósanleifum og myndað amíðtengi, eins og sjá má á mynd 2. Mynd 2 sýnir einungis tvær sykruleifar en í þessu verkefni voru notuð 6-7, 7-8 og 12-18 sykruleifa kítósan. Ensímið á mynd 2 binst einungis einum frjálsum aminóhóp, en í raun gæti það bundist hverjum hinna. Einnig gæti einungis önnur sykruleifin verið afasetýleruð.

Notkunarmöguleikar kítíns og kítósans fara stöðugt vaxandi og víða um heim eru rannsóknir á því sviði í gangi. Má þar nefna virkni kítósans gegn bakteríum og veirum sem hefur ráðið miklu um áhuga manna á rannsóknum á þessu sviði, t.d. við húðun ávaxta og úðun akra [8]. Einnig hefur kítósan verið bundið inn í fatnað eins og strigaskó o.fl. til að koma í veg fyrir vonda lykt sem baktériur mynda [9]. Áhugaverðar rannsóknir á notkun kítósans í stjórnu á upptöku lyfja í líkamanum hafa verið gerðar, þar sem kítósan stuðlar að verndun og uppleysi lyfja háð sýrustigi meltingarvegs [10].

Efni og aðferð

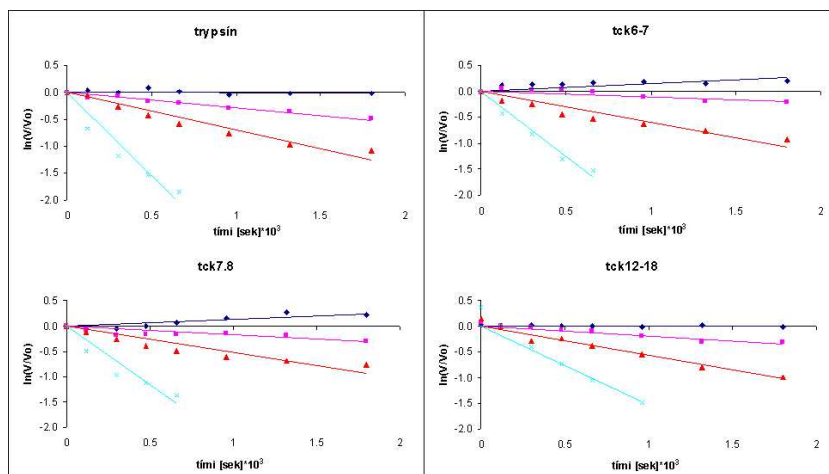
Kítósanafleiðurnar sem voru rannasakaðar komu frá Primex ehf. og voru unnar úr rækjuskel frá Siglufirði. Afleiðurnar voru þurrkaðar og skilgreindar eftir stærð (DP (degree of polymerization)) og hleðslu (DDA (degree of deacetylation)). Einnig var meðalmólmassinn mældur ásamt saltinnihaldi. Tafla 1 sýnir eiginleika afleiðanna þriggja sem notaðar voru. Allar tengingar trypsíns úr nautabrisi við kítósan voru framkvæmdar eins. Leyst var upp 1,5 mmól (35 mg) af trypsíni úr nautabrisi (Sigma), 30mmól (5,8 mg) af 1-etyl-3-(3-dimetýlamínoprópyl)-karbódíimíði (EDAC) (Sigma) og 30 mmól (39 mg) af kítósani í 5 mL af eimuðu vatni og pH stillt á 5.



Mynd 3. Lýsir afvirkjun trypsíns og afleiða þess. Grafið er teiknað út frá jöfnu Arrheniusar (3) sem notast við afvirkjunarhraðafastann (k), samkvæmt jöfnu (2), á hitastigsbilinu 50-60°C. Trypsín = ■, tck12.18 = ▲, tck6.7 = ◆ og tck7.8 = ✕.

Lausnin var hrist varlega yfir nótt við herbergishita. 30 mmól (2,1 mg) af hýdroxýlammóníum-klóríði (Merck) var síðan bætt út í lausnina, pH stillt á 7 og lausnin hrist varlega í 6 klst við herbergishita. Lausnin var síðan afsöltuð með PD-10 hlaupsíunarsúlu (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svíðþjóð) með buffer (TEA 0,112 M; CaCl₂ 11 mM; pH 7,80).

Tölvustýrður örplötuljósmaflir (Molecular Device Corp., Menlo Park, CA, USA) var notaður við virknimælingar á trypsíni og afleiðum þess. Helsti kostur mælisins er að hægt er að mæla mörg sýni í einu, þar sem örplatan inniheldur 96 bolla. Þannig var hvert sýni mælt 8 sinnum til að gefa sem marktækastar niðurstöður. Mælirinn var keyrður með SOFTmax forriti í Macintosh tölvu sem reiknar út Vmax gildi sýnanna (hámarkshvarfhraði við ríkjandi aðstæður), sem hægt var að nota til að ákvarða virkjunarorku og hraðafasta trypsíns og afleiða þess. 235 µL af hverju sýni var bætt út í 3 mL af buffer (TEA 0,112 M; CaCl₂ 11 mM; pH 7,80) við hitastigin 40, 50, 55, 60 og 70°C. Sýni voru fjarlægð og kæld frá 0 til 30 mínútur eftir



Mynd 4. Gröf sem lýsa hitastigsafvirkjun trypsíns úr nautabrisi og trypsíns tengt þrem mismunandi gerðum af kítósani, y-ásinn er náttúrulegi logaritminn af hámarksvirkni deilt með upphafsvirkni, x-ásinn er tíminn í sekúndum sem nefnd sýni þurfa að þola í nefndu hitastigi. Bláir tíglar standa fyrir afvirkjun við 45°C, bleikir kassar við 50°C, rauðir þríhyrningar við 55°C og ljósblá X við 60°C. Við 70°C af algjör afvirkjun allra sýnanna, ekki sýnt.

Tafla 1. Upplýsingar um eiginleika kítosanfaliðanna sem fengust hjá Primex ehf.

Sykrufleiða:	DP	DDA [%]	Meðal mólmassi [kDa]	% salt
G 000331 (12.18)	12-18	86	N/A	N/A
G 010920-1K (6.7)	6-7	44	1,3	8,3
G 020701-1K (7.8)	4-8	55	1,34	20,4

hitun. Hvert sýni var síðan virknimælt í örplötu-ljósmaelinum samkvæmt aðferð Bergmeyers [11] við herbergishita við bylgjulengdina 405 nm með BAPNA (u.þ.b. 0,33 mg/mL), 10 μL af sýni voru síðan þynntir í 240 μL af hvarflausn með hlutföllunum 2,3 M BAPNA 1:2 buffer (0,2 M TEA; CaCl₂ 20 mM; pH 7,80) í hvern bolla.

Niðurstöður og umræður

Virkjunarorkan fyrir hitavirknitap og helmingunartíma trypsíns og trypsíns tengt 12-18 sykruleifa kítósan (tck12.18), trypsíns tengt 6-7 sykruleifa kítósan (tck6.7) og trypsíns tengt 7-8 sykruleifa kítósan (tck7.8) kemur fram í myndum 3 og 4 og töflum 2 og 3 við hitastig 50, 55 og 60°C. Eiginleikar sykruleifanna þriggja má sjá í töflu 1 (upplýsingar fengnar frá Primex ehf.). Afvirkjunarhraðafastinn (k) fæst með jöfnu (2), þar sem náttúrulegi logaritminn af hvarfhraðanum deilt með upphafshraðanum er teiknaður sem fall af tíma. Hallatala ferilsins er -k, sjá mynd 4.

$$\ln \left(\frac{V}{V_0} \right) = -k \times t \quad (2)$$

Jafna Arrheniusar (3) er síðan notuð til að finna virkjunarorku (Ea) trypsíns í hverju sýni fyrir sig,

sem kemur fram í töflu 2. Virkjunarorka ensíms er sú orka sem þarf til þess að gera ensímið óvirk.

$$k = A \times e^{\left(\frac{E_0}{RT} \right)} \Rightarrow \ln k = - \left(\frac{E_0}{R} \right) \times \frac{1}{T} + \ln A \quad (3)$$

Útfrá afvirkjunarhraðafastanum (k) samkvæmt jöfnu (2) má finna helmingunartíma trypsíns (sá tími sem það tekur helminginn af ensíminu að afvirkjast) með jöfnu (4).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4)$$

Niðurstöðurnar sýndu að trypsin tengt 7-8 sykruleifa kítósani gaf mestan stöðugleika af þeim sykrum sem prófaðar voru. Helmingunartíminn jókst um 60% við 60°C og um 130% við 50°C. Virkjunarorka tck7.8 jókst einnig um 17%, eins og sést í töflu 2.

Líkleg ástæða fyrir þessari stöðgun ensímsins er að kítósan myndar vetnistengi við vatnsfælið yfirborð þess, þannig að ensímið verður mun pakkaðra og verndað fyrir áhrifum vatns og sjálfmeltu. Einnig hefur verið sýnt fram á að seigja lausnar hefur mikil áhrif á stöðugleika próteina [12], þar sem seigja lausnarinnar pakkar próteinið meira saman sem eykur stöðugleika þess [13].

Tafla 2. Virkjunarorka trypsíns og afleiður þess, fengin úr hallatölum jöfnu bestu lína í mynd 3 og útreikningar sýndir í jöfnu (3).

Sýni	Hallatala línu	E_a [kJ/mól]	E_a aukning	%
Trypsín	$-23,21 \pm 2,54$	$193,0 \pm 21,1$	-	-
Tck12.18	$-24,20 \pm 1,70$	$201,2 \pm 14,1$	8,2	4,3
Tck6.7	$-26,80 \pm 1,49$	$222,8 \pm 12,4$	29,8	15,4
Tck7.8	$-27,22 \pm 0,28$	$226,3 \pm 2,3$	33,3	17,3

Tafla 3. Helmingunartími trypsíns og afleiða þess, fengin útfra afvirkjunarhraðafastanum (k) samkvæmt jöfnu (4).

T	Trypsin		Tck12.18		tTck6.7		Tck7.8	
[°C]	k [mín ⁻¹]	t _{1/2} [mín]	k [mín ⁻¹]	t _{1/2} [mín]	k [mín ⁻¹]	t _{1/2} [mín]	k [mín ⁻¹]	t _{1/2} [mín]
50	0,0156	44,4	0,0133	52,1	0,0094	73,7	0,0068	101,9
55	0,0379	18,3	0,0362	19,1	0,0294	23,6	0,0250	27,7
60	0,1354	5,1	0,1264	5,5	0,1137	6,1	0,0854	8,1

Næstu skref í þessari rannsóknarvinnu eru að finna hver áhrif kítósans eru á ensímið, annars vegar í lausn og hins vegar bundið ensíminu. Má þar nefna pH-stöðugleika, áhrif gagnvart afmyndurum eins og karbamíði (urea) og guanidine HCl, áhrif á pökkun ensímsins og annars stigs byggingu þess sem framkvæmt verður með CD-mæli.

Þakkir

Þetta verkefni hófst sem sérverkefni í lífefnafræði og þróaðist áfram í að vera hluti meistaraþrófsverkefnis. Styrktaraðilar eru Raunvísindastofnun Háskólans og Vísindasjóður Rannís. Einnig viljum við þakka Primex ehf. fyrir þeirra framlag.

Summary: The enzyme bovine pancreatic trypsin (EC 3.4.21.4) was chemically modified by conjugation with three types of chitosan derivatives with the help of a water-soluble carbodiimide. The derivatives were chito-oligosaccharides of different lengths. The aim was to investigate whether such modification would alter the thermal and storage stability of the protease. Improved stability of proteins is of interest in delivery of protein pharmaceuticals, enzyme storage and enzyme catalysis at elevated temperatures. The results showed that trypsin chemically modified with chitosan oligosaccharides of 7-8 residues gave the greatest increase in stability. The half-life of the enzyme activity was increased by 60% at 60°C and by 130% at 50°C. The activation energy of thermal denaturation was also increased by 17%.

Heimildir

- [1] R. Venkatesh, P.V. Sundaram, *Protein Engineering* **11**, 691-698 (1998).
- [2] R. Villalonga, M. Fernandez, A. Frago, R. Cao, L. Mariniello, R. Porta, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **38**, 53-59 (2003).
- [3] C. O'Fagain, *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 137-149 (2003).

- [4] H. Onishi, Y. Machida, *Biomaterials* **20**, 175-182 (1999).
- [5] K. Arai, *Bull. Tokai Reg. Fish Lab* **43**, 89-94 (1968).
- [6] M. Kumar, *Reactive and Functional Polymers* **46**, 1-27 (2000).
- [7] W.O. Baek, M.A. Vijayalakshmi, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1336**, 394-402 (1997).
- [8] P. Vander, K.M. Varum, A. Domard, N.E. El Gueddari, B.M. Moerschbacher, *Plant Physiology* **118**, 1353-1359 (1998).
- [9] S.H. Lim, S.M. Hudson, *Journal of Macromolecular Science-Polymer Reviews* **C43**, 223-269 (2003).
- [10] H. Tozaki, J. Komoike, C. Tada, T. Maruyama, A. Terabe, T. Suzuki, A. Yamamoto, S. Muranishi, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **86**, 1016-1021 (1997).
- [11] H.U.e. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie Weinheim, 1974.
- [12] P. Sa-Pereira, A.S.L. Carvalho, M. Costa-Ferreira, M.R. Aires-Barros, *Enzyme and Microbial Technology* **34**, 278-282 (2004).
- [13] M. Sola-Penna, J.R. Meyer-Fernandes, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **360**, 10-14 (1998).

Um höfundana: Fannar Jónsson er að ljúka M.Sc.-námi í lífefnafræði við Háskóla Íslands haustið 2004. Dr. Hörður Filippusson er dósent í lífefnafræði við raunvísindadeild Háskóla Íslands.

Raunvísindastofnun Háskólans
Dunhaga 3, IS-107 Reykjavík
hfil@hi.is
fannar@hi.is

Móttekin: 6. janúar 2004