

Кинетические свойства и термостабильность глюкозооксидазы при комплексообразовании с полиэлектролитными микрокапсулами.

М.Г. Фомкина³, Р.Е. Казаков¹, Г.М. Минкабирова, Ю.А. Ким²

Учреждение Российской академии наук Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»¹,

Учреждение Российской академии наук Институт биофизики клетки РАН²

142290 г. Пущино, Московская область, Институтская 3,

8(916)0394598, e-mail: mfomkina@mail.ru³

Резюме

Биохимические и кинетические свойства глюкозооксидазы хорошо изучены, тогда как данных о пространственной структурной организации и динамике конформационных изменений фермента под влиянием различных факторов недостаточно, в частности не изучены процессы комплексообразования глюкозооксидазы с полиэлектролитами и полиэлектролитными поверхностями. Эти исследования важны при поиске путей увеличения стабильности и чувствительности фермента, применяемого в биосенсорах.

В данной работе методами флуоресцентной спектроскопии и микрокалориметрии проводили исследования конформационных изменений и термостабильности глюкозооксидазы при ее взаимодействии с полиэлектролитами. Кинетические свойства глюкозооксидазы определяли по скорости реакции ее ферментативного окисления, регистрируемой амперометрическим методом по снижению концентрации кислорода. Эксперименты показали, что комплексы фермент-полиэлектролит (РАН или PSS) и фермент-полиэлектролитные капсулы (PSS-РАН-PSS или РАН-PSS-РАН) формируются за счет электростатических взаимодействий. В этом случае наблюдаются конформационные изменения структуры глюкозооксидазы, а ее каталитическая активность возрастает. Образование комплексов ферментов с полиэлектролитами может способствовать стабилизации фермента и активировать его каталитические свойства.

Ключевые слова: полиэлектролиты, микрокапсулы, глюкозооксидаза, глюкоза, комплексообразование

Kinetic properties and thermal stability of glucose oxidase in complexation with polyelectrolyte microcapsules.

M.G. Fomkina³, R.E. Kazakov¹, G.M. Minkabirova, Yu.A. Kim²

Institution of the Russian Academy of Sciences Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Federal State Institution "Scientific Center of Expertise for medical application" ¹, Institution of the Russian Academy of Sciences, Institute of Cell Biophysics RAS² 142290, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya 3, e-mail: mfomkina@mail.ru³

Summary

Polymer technology are increasingly being used to create new composite materials with various functions, applications which have been steadily expanding. In particular, polymeric capsules are used in medicine and pharmacy for the storage and delivery of various proteins and peptides [1,2], oligonucleotides [3,4], hormones [5], growth factors [6] and as a self substance, and as a functional element of diagnosing the system [7,8]. One of the problems solved by using microcapsules loaded with enzymes and immobilized on a solid surface, is the ability to use them to selective detect the substrates in the solution. Sphere of application the surfaces containing functionally active enzymes found primarily in biosensor technology. One of the most important enzymes in terms of medical diagnostics is glucose oxidase, which can be used to determine the concentration of glucose in the blood and other biological fluids. Putting in polyelectrolyte microcapsules of glucose oxidase and the subsequent immobilization of the enzyme with capsules on hard surfaces in the long run will create a polymeric glucose biosensor. However, the interaction of glucose with polyelectrolytes and polyelectrolyte surfaces forming shell capsules are currently not well studied. These interactions can influence the sensitivity and stability of glucose oxidase.

Keywords: polyelectrolytes, microcapsules, glucose oxidase, D-glucose, complexation

Введение

Полимерные технологии все чаще используются для создания новых композитных материалов различной функциональности, область практического применения которых неуклонно расширяется. В частности полимерные капсулы находят применение в медицине и фармацевтике для хранения и доставки различных белков и пептидов [1,2],

олигонуклеотидов [3,4], гормонов [5], факторов роста [6] и как в качестве самостоятельного препарата, так и в виде функционального элемента диагностирующей системы [7,8]. Одной из задач, решаемых с помощью микрокапсул, нагруженных ферментами и иммобилизованных на твердой поверхности, является возможность с их помощью избирательно детектировать субстраты в исследуемом растворе. Область применения таких поверхностей, содержащих функционально-активные ферменты, находится, прежде всего, в биосенсорных технологиях. Одним из наиболее важных ферментом с точки зрения медицинской диагностики остается глюкозооксидаза, с помощью которой можно определять концентрацию глюкозы в крови и других биологических жидкостях. Помещение глюкозооксидазы в полиэлектролитные микрокапсулы и последующая иммобилизация капсул с ферментами на твердой поверхности в перспективе позволит создать полимерный биосенсор глюкозы. Однако, взаимодействия глюкозооксидазы с полиэлектролитами и полиэлектролитными поверхностями, образующими оболочку капсул, в настоящее время недостаточно изучены. Эти взаимодействия могут влиять на чувствительность и стабильность глюкозооксидазы.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие реактивы: глюкозооксидаза (GOx, Type VII from *Aspergillus niger*) (EC 1.1.3.4) (Sigma-Aldrich), буферы MES (Sigma), ТРИС-HCl ("Sigma"), CaCl_2 , Na_2CO_3 , NaCl, ЭДТА и глюкоза (D-glucose) (Sigma-Aldrich) имели градацию х.ч или ч.д.а., полиаллиламин гидрохлорид (ПАН) и полистиролсульфонат (PSS) фирмы "Aldrich" с мол. массой 60 000 – 70 000. Все растворы готовили на деионизованной воде, полученной путем очистки дистиллированной воды с помощью Arium 611-UF (Sartorius). Проводимость воды составляла 1 мкС.

Полиэлектролитные микрокапсулы готовили методом поочередной адсорбции (layer-by-layer) с нанесением молекул PSS и ПАН на кальций-карбонатные сферолиты и составные фермент-содержащие кальций-карбонатные сферолиты, как описано в работах [9,10]. Полиэлектролиты (ПЭ) для изготовления микрокапсул использовали в виде растворов 0,33 М NaCl. В работе исследовались трехслойные полые положительно (ПАН-PSS-ПАН) и отрицательно (PSS-ПАН-PSS) заряженные полиэлектролитные микрокапсулы, а также пятислойные фермент-содержащие положительно и отрицательно заряженные полиэлектролитные микрокапсулы: ПАН-(PSS-ПАН)_2 и PSS-(ПАН-PSS)_2 . Контроль размеров микрокапсул и сферичность кальций-карбонатных частиц осуществляли с

помощью светового микроскопа Nikon eclipse E200 и анализатора субмикронных частиц BECKMAN COULTER №5 Submicron Particle Size Analyzer. Удаление кальций-карбонатных частиц из микрокапсул осуществляли при выдерживании раствора с микрокапсулами в диализных мешках в течение 3 часов в 25 мМ ЭДТА. Концентрацию глюкозооксидазы определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности при 278 нм [11]. Количество капсул в растворе подсчитывали с помощью камеры Горяева. Температурную зависимость избыточного удельного теплопоглощения (далее термограммы) растворов глюкозооксидазы регистрировали с помощью дифференциального адиабатического сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (ИБП РАН, Россия) [12, 13]. Измерения проводили в среде инкубации 2мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6,0 при скорости нагревания 1 К/мин. Уровень шума не превышал 30 мкДж/К, воспроизводимость базовой линии была не ниже 160 мДж/К. Анализ термограмм проводили с помощью программы MicroCal™ Origin™ 5 (Microcal Software, Inc., Northampton, США).

Спектры флуоресценции белка измеряли на спектрофлуориметре Perkin Elmer MPF-44B (США) в термостатируемой кювете при температуре 25°C.

Кинетические свойства глюкозооксидазы определяли по скорости реакции ее ферментативного окисления, регистрируемой по снижению концентрации кислорода. Измерения осуществлялись в термостатируемой ячейке с перемешиванием с помощью закрытого электрода Кларка амперометрическим способом. При постоянном напряжении (650 мВ) изменение концентрации кислорода в среде вызывало изменение тока, который регистрировался, и результаты измерений фиксировались и обрабатывались на персональном компьютере с помощью четырехканального компьютерного интерфейса (АЦП) – «Рекорд 4». В ходе эксперимента в среду (2 мМ MES, pH=5,3, 10 мМ NaCl) добавляли свободную или инкапсулированную глюкозооксидазу, реакцию ферментативного окисления запускали введением глюкозы в концентрации 5,55 мМ.

Для установления влияния взаимодействия глюкозооксидазы с полиэлектролитами или их комплексами на ее ферментативную активность в среду (2 мМ MES, pH 5,3, 10 мМ NaCl) вносили полиэлектролиты РАН или PSS или собранные на их основе полые трехслойные положительно (РАН-PSS-РАН) и отрицательно (PSS-РАН-PSS) заряженные микрокапсулы или дистиллированную воду (в случае контроля). Затем добавляли глюкозооксидазу (конечная концентрация 10 мкг/мл) и инкубировали не менее 5 мин. до запуска кинетической реакции. Температура (25°C) в экспериментальной ячейке с исследуемым раствором, общим объемом 3мл, поддерживалась с помощью термостата U-

1 (Германия).

Результаты и обсуждение

Комплексы белков с синтетическими полиэлектролитами спонтанно образуются, главным образом, за счет электростатических взаимодействий, устойчивы в широком интервале значений рН и ионной силы и отличаются высокой стабильностью благодаря кооперативному характеру взаимодействия [14,15]. Было найдено, что полиэлектролит стабилизирует ту конформацию белка, которая существует в условиях образования комплекса. Этот факт делает комплексообразование с ПЭ одним из наиболее эффективных и универсальных методов стабилизации белков и в частности, ферментов [16,17].

На рис.1 приведены размеры составных сферолитов, которые использовались для формирования микрокапсул с глюкозооксидазой. Поскольку толщина оболочки микрокапсул составляет десятки нанометров [18], предполагается, что трех-пятислойные микрокапсулы, сформированные на этих сферолитах с последующим удалением кальций карбонатного ядра, имеют такие же размеры. Так как процесс капсулирования ферментов связан с образованием кальций-карбонатных сферолитов, затем вымываемых в процессе очистки, то чувствительность к кальцию могла бы быть критичным фактором, лимитирующим и осложняющим работу инкапсулированного фермента. Однако нами было установлено, что повышение в среде исследования концентрации хлорида кальция до 2,75 мМ не оказывало на реакцию окисления глюкозы ферментом ощутимого влияния.

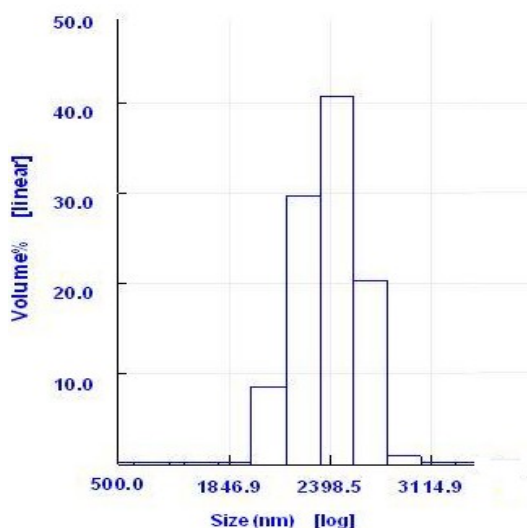


Рис.1 Размеры ферментсодержащих кальций-карбонатных сферолитов.

Используемые в работе фермент-содержащие пятислойные микрокапсулы имели размеры $2,4 \pm 0,5$ мкм. Трехслойные полые микрокапсулы, получаемые при тех же условиях (скорость и время перемешивания растворов, температура), были несколько больших размеров и составляли $3,2 \pm 0,5$ мкм. Вероятно, это обусловлено тем, что полые сферолиты имеют менее плотную по сравнению со составными сферолитами структуру кальций-карбонатного ядра.

Глюкозооксидаза содержит нековалентно связанный флавинадениндинуклеотид (ФАД), который имеет максимум поглощения света вблизи 450 нм и флуоресценции около 520 нм. На рис. 2 представлены спектры флуоресценции глюкозооксидазы, полученные нами при 25°C и в присутствии полиэлектролитных капсул (ПЭК) разной концентрации. Максимум флуоресценции ФАД в белке практически совпадал с параметром свободного ФАД, а ее максимум смещался в коротковолновую часть спектра при образовании комплекса с капсулами. Можно предположить, что в результате взаимодействия с молекулами полиэлектролитных капсул меняется конформация белка, приводящая к изменению полярности окружения ФАДа.

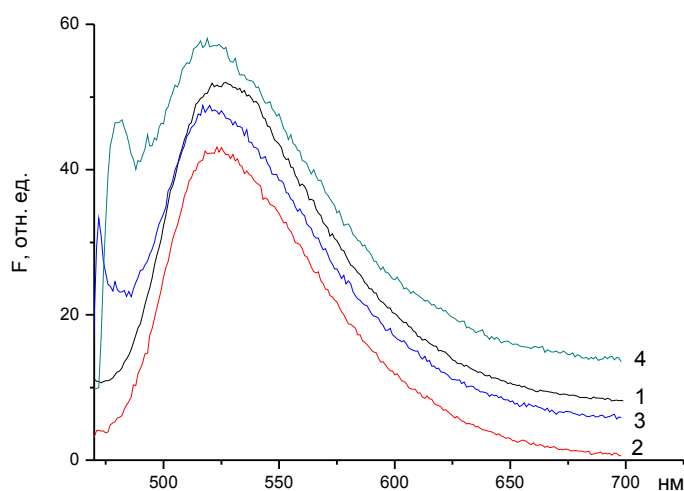


Рис. 2 Флуоресценция ФАДа в растворе глюкозооксидазы, 0,2 мг/мл, $\lambda_{\text{возб.}} = 455$ нм. Среда инкубации - фосфатный буфер 20 мМ, 150 мМ NaCl, pH 7,4

- 1- Контроль,
- 2- $+0,5 \cdot 10^5$ / мл ПЭК (PSS-PAH-PSS)
- 3- $+2,0 \cdot 10^5$ /мл ПЭК (PSS-PAH-PSS)
- 4- $+4,0 \cdot 10^5$ /мл ПЭК (PSS-PAH-PSS)

Спектры разнесены по вертикали.

Плавление глюкозооксидазы характеризовалось двумя пиками теплового перехода (рис. 3, кривая 1) с $T_m = 41,5 - 42,0^\circ\text{C}$ и $70,5 - 71,0^\circ\text{C}$, т.е. процесс тепловой денатурации являлся кооперативным и на промежуточных стадиях не происходило диссоциации молекулы фермента на отдельные субъединицы. Повторный прогрев образца глюкозооксидазы показал, что процесс денатурации необратим. Температура теплового перехода также не зависела от концентрации молекул фермента и при нормировке на концентрацию энтальпия перехода была постоянной, т.е. характер кривых плавления свидетельствовал о мономолекулярном процессе тепловой денатурации. Энтальпия перехода нативного белка составляла 799 ± 39 кДж/моль.

Как следует из рисунка 3, в присутствии полиэлектролитных капсул меняются параметры плавления фермента, в основном выражаемые в уменьшении температуры переходов (рис. 3, кривые 2-4).

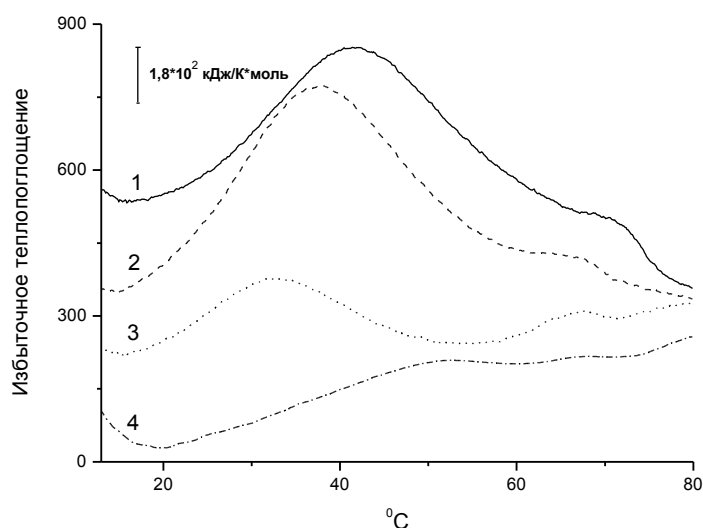


Рис. 3. Термограммы плавления глюкозооксидазы, (0,2 мг/мл):

1-контроль, 2- + $1,0 \cdot 10^5$ /мл ПЭК, 3- + $5,0 \cdot 10^5$ /мл ПЭК, 4- + $1,0 \cdot 10^6$ /мл ПЭК

Среда инкубации - 2мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6,0

Термограммы разнесены по вертикали.

Причем эти изменения наблюдаются независимо от электрического заряда внешнего слоя полиэлектролитных капсул. Эти результаты согласуются с данными по изучению образования белок–полиэлектролитных комплексов, в которых показано, что пространственная структура полиэлектролита обычно существенным образом изменяется, причем конформация белка также может измениться [19]. Из наших экспериментов

следует, что конформация белка изменилась, (что подтверждается изменениями флуоресценции ФАД в белке в присутствии полиэлектролитных микрокапсул (рис.2)) и при этом термостабильность комплекса глюкозооксидаза-ПЭК уменьшилась.

На рисунке (рис. 4) приведены примеры реакций окисления глюкозы глюкозооксидазой, инкубировавшейся с противоположно заряженными полиэлектролитами.

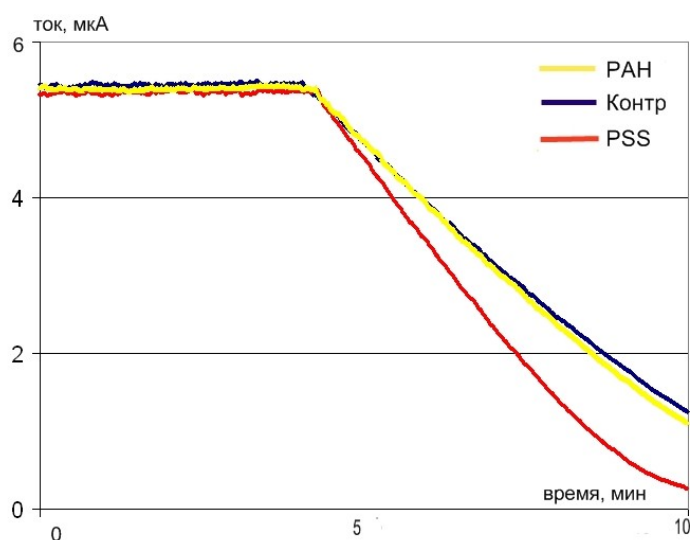


Рис. 4. Диаграммы экспериментов, в которых полиэлектролиты РАН и PSS в концентрации 30 мкг/мл инкубировали с глюкозооксидазой в течение 5 мин, после чего запускали реакцию добавлением глюкозы (5,55 мМ).

В ходе исследований влияния свободных противоположно заряженных полиэлектролитов РАН и PSS (20 мкг/мл и 30 мкг/мл) на скорость окисления глюкозы свободной глюкозооксидазой (в течение 5 минут инкубировавшейся в реакционной ячейке полярографа с одним из полиэлектролитов) было показано, что скорость снижения концентрации кислорода не только не снижалась, а увеличивалась. То есть, взаимодействие со свободными полиэлектролитами РАН и PSS не оказывало ингибирующего воздействия на скорость окисления глюкозы. Более того, наблюдалась тенденция к увеличению скорости реакции по сравнению с контролем в присутствии полиэлектролита PSS и в меньшей степени в присутствии полиэлектролита РАН. Скорость каталитической реакции разложения глюкозы увеличилась на 12% при инкубации фермента с 20 мкг/мл, и на 36% при инкубации с 30 мкг/мл полиэлектролита PSS.

Похожая картина наблюдалась при инкубации (5 мин.) глюкозооксидазы с

трехслойными капсулами, собранными из полиэлектролитов и имеющих противоположные заряды: PАН-PSS-PАН и PSS-PАН-PSS. При этом было обнаружено, что полые капсулы, как и свободные полиэлектролиты, не только не ингибируют ферментативную реакцию окисления глюкозы, а наоборот увеличивают скорости реакций. Средняя скорость реакции разложения глюкозы в контрольных пробах составила $2,0 \pm 0,13$ мкА/мин, а при инкубации фермента с ПЭК, имеющими оболочки PАН-PSS-PАН и PSS-PАН-PSS в концентрации $4,0 \cdot 10^5$ капсул/мл — $2,33 \pm 0,26$ и $2,45 \pm 0,39$ мкА/мин, соответственно. Сопоставление контрольных проб ($n=5$) с пробами, в которых фермент инкубировали с капсулами ($n=4$), при помощи критерия Манна-Уитни дало значение $p < 0,06$. Инкубация глюкозооксидазы с капсулами с оболочкой PSS-PАН-PSS в термостатируемой (25°) ячейке полярографа при перемешивании в течение 1,5 часов позволило увеличить скорость реакции до 2,7 мкА/мин, что еще на 11% больше по сравнению с инкубацией в течение 5 минут.

Исследования активности инкапсулированной глюкозооксидазы, оболочки капсул которой состояли из 5 слоев противоположно заряженных полиэлектролитов двух типов: PАН-(PSS-PАН)₂ и PSS-(PАН-PSS)₂, по реакции окисления глюкозы, показали, что с помощью инкапсулированной глюкозооксидазы возможно проводить измерения ее концентрации амперометрическим методом (данные не представлены). При этом различий в скорости реакции в зависимости от заряда внутреннего слоя оболочки полиэлектролита не наблюдалось. Сопоставление скоростей окисления глюкозы капсулированным и свободным ферментом, измеренные в двух различных средах (2 мМ MES, pH 5,3 и 2 мМ Трис-HCl, pH 7,2 0,9% NaCl), показало, что капсулированный фермент работает в 2–4 раза медленнее, чем свободная глюкозооксидаза (во всех случаях концентрация белка 10 мкг/мл). Но при этом инкапсулированная глюкозооксидаза, по крайней мере, неделю сохраняла свою активность (хранение при $T=4^\circ\text{C}$ в дистиллированной воде), в то время как свободная глюкозооксидаза при хранении в тех же условиях уже на следующий день не проявляла активности.

В работах [20-22] было исследовано влияние разных полиэлектролитов с катионными и анионными заряженными группами (а также с разным по гидрофобности полимерным остовом) на каталитические характеристики ферментов лактатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и уреазы, а также на миоглобин и гемоглобин. Показано, что белки ингибируются в присутствии полиэлектролитов, но ингибирование происходит по-разному: лактатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, миоглобин и гемоглобин ингибируются в присутствии полиэлектролитов с анионными

заряженными группами, в то время как скорость расщепления мочевины, катализируемая уреазой, падает в присутствии катионных полиэлектролитов.

В наших экспериментах показано, что наблюдаются конформационные изменения в структуре глюкозооксидазы как при взаимодействии с полианионами и поликатионами, так и при взаимодействии с капсулами из этих же полиэлектролитов. При этом ингибирование каталитических свойств фермента не наблюдается, а наоборот, происходит активация ее ферментативной активности. Таким образом, при помещении фермента в полиэлектролитную капсулу, можно не только защитить фермент от разрушающих воздействий внешней среды, но и активировать и стабилизировать работу фермента.

Литература

1. Lameiro M.H., Lopes A., Martins L.a., Alves P.M., Melo E. // Int. J. Pharm., 2006, v. 312, p. 119 - 130.
2. Grenha A., Seijo B., Remunan-Lopez C. //Eur. J. Pharm. Sci., 2005, v.25, NQ 4-5, p. 427-437.
3. Lambert G., Fattal E., Couvreur P. //Adv. Drug. Deliv. Rev., 2001, v. 47, NQ 1, p. 99 - 112.
4. De Rosa G., Quaglia F., La Rotonda M., Besnard M., Fattal E. //Int. J. Pharm., 2002, v. 242, №1-2, p. 225 - 228.
5. Hattori Y., Maitani Y. // Curro Drug. Deliv., 2005, v. 2, № 3, p. 243 - 252.
6. Peter S.J., Lichun L.U., Kim D.J., Stamatias G.N., Miller MJ., Yaszemski M.I, Mikos A.G. // Biomed. Mater. Res., 2000, V. 50, NQ 3, p. 452 - 462.
7. Монтрель М.М., Терновский В.И., Фомкина М.Г., Петров А.И. //Патент № 2333231. Бюл. № 25, 2008.
8. Терновский В.И., Чернохвостов Ю.В., Фомкина М.Г., Монтрель М.М. //Биофизика, 2007, Т.52, вып.5, с.825-829
9. Petrov A.I., Volodkin D.V., Sukhorukov G.B. //Biotechnology Progress, 2005, 21, 918-925.
10. Sukhorukov G.B, Volodkin V.D., Gunther A.M., Alexander I. Petrov A.I., Shenoy D. B., Mohwald H. // J. Mater. Chern., 2004, v. 14, p. 2073 2081
11. Wilson R., Turner A. // Biosens. Bioelectron. 1992. 7. P. 165.
12. Shnyrov V.L., Sanchez–Ruiz J.M., Boiko B.N., Zhadan G.G., Permyakov E.A. //Thermochim. Acta., 1997. V. 302. P. 165–180.
13. Freire E., van Osdol W. W., Mayorga O. L., Sánchez–Ruiz J. M.//Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1990. V. 19. P.159–188.

14. Изумрудов В.А., Зезин А.В., Кабанов В.А. // ДАН СССР. 1984. Т. 275. С.1120–1123;
15. Кабанов В.А., Мустафаев В.И. //ВМС А. 1981. Т. 23. С. 255–260.
16. Gladilin A.K., Kiselev M.V., AgeevaE.V., Melik'Nubarov N.S., Lisitsky E.A., Sveshnikov P.G., Korpela T., Leva'shov A.V. // International conference Biocatalysis, Moscow. 2000. P. 26.;
17. Kudriachova E.V., Gladilin A.K., Vaku'rov A.V., Mozhaev V.V., Levashov A.V.// Biotech. Bioeng. 1997. Vol. 55. P.267–277.
18. Montrel M.M., Stroustrup N.//Macromol. Rapid Commun. (2002), v. 23, No 18, p. 1134-1137.
19. Е. В. Кудряшова, А. К. Гладилин, А. В. Левашов. Успехи биологической химии, т. 42, 2002, с. 257-294
20. Сабурова Е.А., Тихоненко С.А., Дыбовская Ю.Н., Сухоруков Б.И. // Журнал Физической Химии, 2008, т. 82, N 3, С. 554-561.
21. Сабурова Е.А., Басова Л.В., Дыбовская Ю.Н., Сухоруков Б.И.//Журнал Физ. Химии.- 2006.-Т.80,№8,-С.1503-1514
22. Сабурова Е.А., Бобрешова М.Е., Елфимова Л.И., Сухоруков Б.И.//Биохимия.-2000.- Т.65,№8.-С.976-985

*Работа поддержана Министерством образования и науки Российской федерации, государственный контракт № П 1417 от 03.09.2009 г., в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.