

УДК 543.23::66.096.4:[577.15+[678.7-139:661.185.2]]

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ФЕРМЕНТ-ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ГЕКСАГИСТИДИНСОДЕРЖАЩЕЙ ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗЫ

И.В. Лягин, Е.Н. Ефременко, А.В. Кабанов

(кафедра химической энзимологии; e-mail: elena_efremenko@list.ru)

Получен набор нековалентных и ковалентных полиэлектролитных комплексов на основе фермента гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы. Использовали полианионы и поликатионы в виде блок-сополимеров с полиэтиленгликолем. Для получения ковалентных комплексов фермента применяли разные сшивающие агенты: глутаровый альдегид, N-этил-N-(3-диметиламинопропил)-карбодимид (EDC) и 3-сульфо-N-гидрокси-сукцинимид. Лучший результат по каталитической эффективности действия ковалентно-сшитого комплекса достигнут в случае EDC, он составил $(2,8 \pm 0,3) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Проведенная модификация поверхности белка направлена на создание препаратов для биомедицинского назначения.

Ключевые слова: гексагистидинсодержащая органофосфатгидролаза, полиэлектролит, фермент-полиэлектролитный комплекс.

Фосфорорганические соединения (ФОС) представляют собой эфиры ортофосфорной и алкилфосфоновой кислот, а также их производных. К их числу относятся пестициды, широко применяемые в сельском, приусадебном и домашнем хозяйстве, а также ингибиторы коррозии, применяемые в теплоэнергетике, нефте- и газодобывающей промышленности, пластификаторы и стабилизаторы, используемые в строительной промышленности, в составе моющих и чистящих средств промышленного назначения, а также высокотоксичные боевые отравляющие вещества нервно-паралитического действия – зоман, зарин, Vx и продукты их разложения (метилфосфовая кислота и ее эфиры) [1–2].

Ежегодное производство, хранение и применение ФОС в объеме сотен тысяч тонн [3] для нужд сельского хозяйства, а также низкая скорость разложения ФОС в условиях окружающей среды приводят к накоплению и обнаружению этих веществ первоначально в почве, а затем в грунтовых и речных водах, продуктах питания, табачных и хлопчатобумажных изделиях, домашней пыли [4–5]. Кроме того, проникновение ФОС в организм человека может происходить трансдермально при непосредственном контакте с загрязненными объектами. ФОС оказывают на организм человека нейротоксичное воздействие, которое в зависимости от концентрации может быть острым или отдаленным. Эти вещества являются также мутагенами, вызывающими хромосомную аберрацию, при

этом негативный эффект, как правило, носит кумулятивный характер.

Проблема разложения ФОС в самых разнообразных объектах может быть решена биотехнологически с использованием высокоактивного фермента – органофосфатгидролазы, содержащей гексагистидиновою последовательность на N-конце молекулы белка (His₆-ОРН) [6]. Была показана высокая эффективность действия этого фермента в средах сложного химического состава при гидролизе различных ФОС (пестицидов и отравляющих веществ) [7–8], что позволило вплотную подойти к решению вопроса о применении этого фермента для биомедицинских целей, в частности, для разложения ФОС *in vivo*. Поскольку His₆-ОРН является бактериальным ферментом, то для нивелирования возможного иммунного ответа со стороны организма при его введении необходима модификация поверхности His₆-ОРН. Из литературы известно, что с этой целью может использоваться пэгилирование [9] или образование полиэлектролитных комплексов [10]. Кроме того, полиэлектролитные комплексы между ферментом и полимером могут существенно стабилизировать белок, а модификация такого комплекса путем химической сшивки может дополнительно повысить стабильность этих биокатализаторов при использовании. Цель данной работы состояла в разработке и исследовании каталитических характеристик ковалентно-сшитых фермент-полиэлектролитных ком-

плексов на основе His₆-ОРН, предназначенных для гидролиза различных ФОС.

Материалы и методы

Для получения His₆-ОРН в клетках *E. coli* SG13009[pREP4] использовали ранее запатентованную экспрессионную систему [11]. Выделение и очистку His₆-ОРН проводили, как это было описано ранее [12].

Ферментативную активность определяли спектрофотометрически на УФ-видимом спектрофотометре «Agilent 8453» (Германия), снабженном термостатируемым кюветным отделением, по накоплению продукта гидролиза Параоксона («Sigma», США) – 4-нитрофенолят аниона ($\lambda = 405$ нм, $\epsilon = 18500$ М⁻¹см⁻¹, рН 10,5).

В типичном эксперименте в спектрофотометрическую кювету, содержащую 0,1 М карбонатный буфер, добавляли аликвоту 10 мМ водного раствора субстрата. Реакция инициировалась внесением в кювету аликвоты раствора фермента чистотой 98±1%. Концентрация фермента в кювете составляла 10⁻¹⁰–10⁻⁹ М.

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, осуществляющее гидролиз 1 мкмоль Параоксона в 1 мин при 25°C.

Расчет скорости ферментативной реакции проводили по начальным линейным участкам кинетических кривых ($v_0 = \text{tg}\alpha$). Максимальную скорость ферментативной реакции ($v_{\text{макс}}$) и константу Михаэлиса (K_M) определяли, используя гиперболическую аппроксимацию и двойные обратные координаты $1/v_0 - 1/[S]$ (Лайнуивера–Берка) в программе Origin Pro 8.1 SR3.

Для получения фермент-полиэлектrolитных комплексов, согласно методу (модифицированному), описанному в работе [13] использовали раствор высокоочищенного фермента His₆-ОРН с концентрацией не менее 0,2 мг/мл в карбонатном буфере (рН 10,5).

Комплексы на основе поликатионов получали добавлением к раствору фермента 20 мг/мл водного раствора блок-сополимера ПЭГ с полилизинном (ПЭГ₁₁₃-ПЛ₁₀, $M_w = 6,6$ кДа) («Alamanda Polymers», США) или ПЭГ с полиэтиленимином (ПЭГ-ПЭИ, $M_w = 12$ кДа) в мольном соотношении фермент:полимер, равном 1:5 или 1:1 соответственно. После этого смесь перемешивали на вортексе, готовили аликвоты (по 1 мл) и выдерживали в течение 30 мин. при +8°C. Затем в аликвоты вносили по 10 мкл 25%-го раствора глутарового альдегида. После инкубации при +8°C в смесь вносили по 5 мкл

50 мМ NaBH₄ («Sigma», США) и все перемешивали. После экспонирования в течение различных интервалов времени образцы помещали в диализные мешки, где они диализовались против 2 л 0,1 М карбонатного буфера (рН 10,5) в течение 20 ч.

Комплексы на основе полианионов получали добавлением к раствору фермента 20 мг/мл водного раствора блок-сополимера ПЭГ с полиглутаминовой кислотой (ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀, $M_w = 13$ кДа) («Alamanda Polymers», США) в мольном соотношении фермент:полимер, равном 2:1 или 1:5. После этого смесь перемешивали на вортексе, готовили аликвоты (по 1 мл) и выдерживали в течение 30 мин при +8°C. Затем в смесь вносили по 30 мкл раствора N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид гидрохлорида (EDC) («Sigma», США) или натриевой соли 3-сульфо-N-гидрокси-сукцинимиды (SNHS) («Sigma», США) такой концентрации, чтобы мольное соотношение глутаминовой кислоты и сшивающего агента составляло 1:1, 1:10 или 1:100. После экспонирования в течение некоторого времени при комнатной температуре образцы помещали в термошейкер, где они выдерживались при 37°C и 900 об/мин в течение 3 мин. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры и хранили при +8°C. Все эксперименты проводили как минимум в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение

Разработка и исследование фермент-полиэлектrolитных комплексов His₆-ОРН на основе поликатионов

В качестве поликатионов в работе использовали блок-сополимер полиэтиленгликоля (ПЭГ) с полилизинном (ПЭГ₁₁₃-ПЛ₁₀, $M_w = 6,6$ кДа) или полиэтиленимином (ПЭГ-ПЭИ, $M_w = 12$ кДа). Такой выбор был обусловлен тем, что ПЭГ₁₁₃-ПЛ₁₀ и ПЭГ-ПЭИ несут разные заряды (0,08 и 0,55 соответственно) в расчете на мономерное звено. Таким образом, оболочка, формируемая из ПЭГ блок-сополимеров на поверхности фермента, в этих двух случаях существенно различается.

В качестве базовой для получения фермент-полиэлектrolитного комплекса использовали методику, описанную в работе [13], заменив буфер на 0,1 М карбонатный (рН 10,5). При этом процесс получения ковалентно сшитых ферментных комплексов оптимизировался по двум основным параметрам: 1) времени обработки фермент-полиэлектrolитного комплекса сшивающим агентом (глутаровым альдегидом); 2) времени восстановления оснований Шиффа

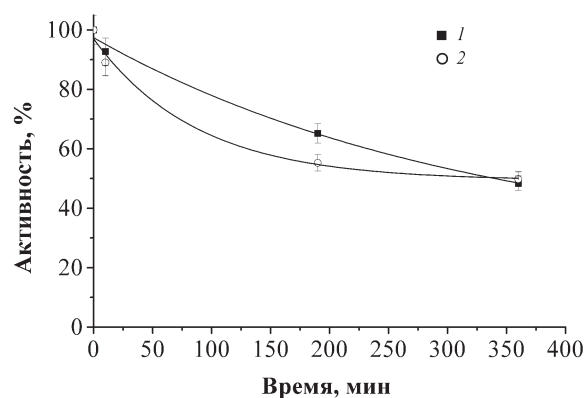


Рис. 1. Изменение ферментативной активности в ходе обработки фермент-полиэлектролитных комплексов на основе фермента NiS₆-ОРН и различных поликатионов сшивающим агентом (глутаровым альдегидом): 1 – ПЭГ₁₁₃-ПЛ₁₀, 2 – ПЭГ-ПЭИ

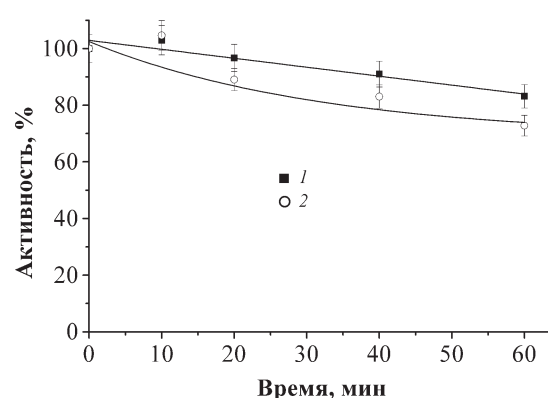


Рис. 2. Изменение ферментативной активности в ходе восстановления оснований Шиффа в фермент-полиэлектролитных комплексах на основе фермента NiS₆-ОРН и различных поликатионов с использованием NaBH₄: 1 – ПЭГ₁₁₃-ПЛ₁₀, 2 – ПЭГ-ПЭИ.

с использованием 0,25 мМ раствора NaBH₄. При увеличении времени обработки глутаровым альдегидом наблюдалось снижение ферментативной активности (рис. 1). Очевидно, что кинетика этого процесса зависит от типа поликатиона (ПЛ₁₀ или ПЭИ), и в случае ПЭГ-ПЭИ, в котором плотность зарядов выше, процесс заканчивался быстрее. Тем не менее после 6 ч экспонирования независимо от использованного поликатиона остаточная активность составляла ~50% от исходного уровня. Дальнейшее экспонирование фермент-полиэлектролитных комплексов в присутствии сшивающего агента мы сочли нецелесообразным и выбрали данное время (6 ч) в качестве оптимального.

Увеличение времени восстановления получаемых оснований Шиффа с использованием NaBH₄ также привело к снижению ферментативной активности (рис. 2). При этом снижение за 1 ч исходной активности в случае ПЭГ-ПЭИ составило 20%, а в случае

ПЭГ₁₁₃-ПЛ₁₀ – 10%. Для дальнейших экспериментов было выбрано наиболее оптимальное (20 мин) время обработки восстанавливающим агентом.

Определены каталитические характеристики ковалентно сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов, полученных в оптимальных условиях, в реакциях гидролиза пестицида Параоксона (табл. 1). Установлено, что ковалентно сшитые фермент-полиэлектролитные комплексы, полученные на основе поликатионов, обладают существенно ухудшенными каталитическими характеристиками по сравнению с нативным ферментом. По всей видимости, защитная роль поликатионов в комплексе с ферментом недостаточна, а значит глутаровый альдегид имеет свободный доступ к NH₂-группам в активном центре фермента, способствуя значительному снижению активности полученных ферментных препаратов.

Исследована стабильность ковалентно сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов разной кон-

Т а б л и ц а 1

Каталитические характеристики гидролиза Параоксона под действием ковалентно сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов на основе фермента NiS₆-ОРН и различных поликатионов

Блок-сополимер	Мольное соотношение	K _M , мкМ	v _{макс} /E ₀ , с ⁻¹	v _{макс} /(E ₀ × K _M), М ⁻¹ с ⁻¹
–	1:0	10,0±0,5	5100±100	(5,1±0,3) × 10 ⁸
ПЭГ ₁₁₃ -ПЛ ₁₀	1:5	68,7±2,8	2160±30	(3,1±0,1) × 10 ⁷
ПЭГ-ПЭИ	1:1	81,4±4,9	2390±60	(2,9±0,1) × 10 ⁷

Примечание. E₀ – начальная концентрация фермента.

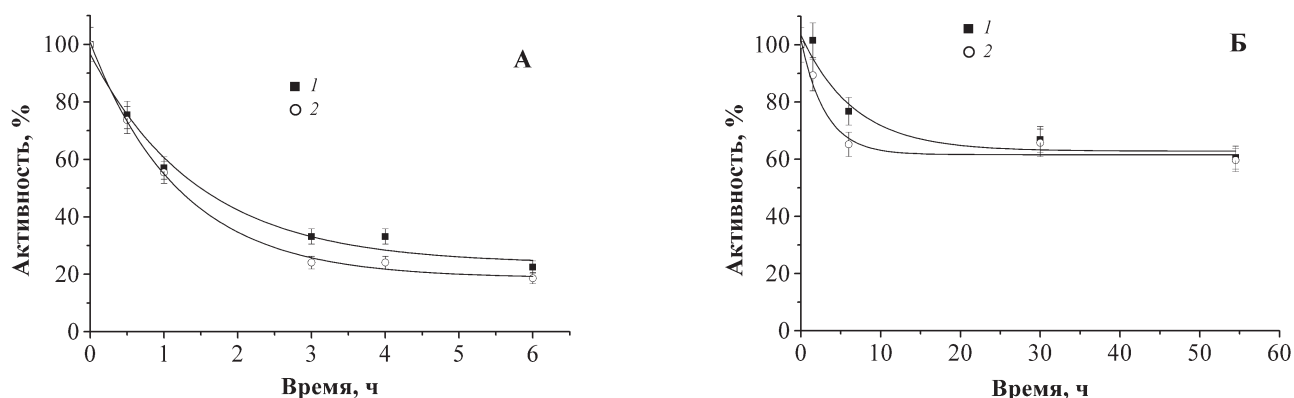


Рис. 3. Изменение ферментативной активности ковалентно сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов на основе фермента His₆-ОРН и различных поликатионов при хранении в концентрации 15 мкг/мл (А) и 150 мкг/мл (Б) в фосфатно-солевом буфере: 1 – ПЭГ₁₁₃-ПЛ₁₀, 2 – ПЭГ-ПЭИ

центрации в условиях хранения при +8°C (рис. 3). Установлено существенное снижение ферментативной активности при хранении таких препаратов, имеющих концентрацию по белку 15 мкг/мл (рис. 3, а). В частности, за 3 ч эти препараты теряли 70–80% своей исходной активности.

Хранение ковалентно сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов в концентрированном (150 мкг/мл) виде также приводило к существенному снижению активности, и за 6 ч потеря активности достигала 20–35% (рис. 3, б).

Таким образом, было установлено, что получение фермент-полиэлектролитных комплексов на основе His₆-ОРН с использованием разных поликатионов приводит к существенному ухудшению каталитических характеристик фермента и невысокой стабильности этих препаратов при хранении.

Разработка и исследование фермент-полиэлектролитных комплексов His₆-ОРН на основе полианионов

Полианионы также были использованы в работе для получения ковалентно сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов на основе His₆-ОРН. Ковалентное связывание компонентов таких комплексов может проводиться за счет реакции сшивающих агентов с карбоксильными группами, имеющимися на поверхности фермента, а также в боковых радикалах полианиона, например полиглутаминовой кислоты.

В качестве сшивающих агентов использовали N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (EDC) и натриевую соль 3-сульфо-N-гидросукцинимид (SNHS), которые добавляли в разной

концентрации к фермент-полиэлектролитным комплексам на основе His₆-ОРН и ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀, взятых в мольном соотношении фермента и полимера, равном 2:1 и 1:5.

Исследована кинетика изменения ферментативной активности фермент-полиэлектролитных комплексов после внесения сшивающих агентов (рис. 4). Результирующая ферментативная активность полученных образцов ковалентно-сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов представлена на рис. 5. Стоит отметить, что и EDC, и SNHS оказались более «мягкими» сшивающими агентами по сравнению с глутаровым альдегидом, приводящим к 50%-й потере ферментативной активности. Снижение ферментативной активности под действием EDC и SNHS не превышало 20%. В свою очередь, использование фермент-полиэлектролитных комплексов при мольном соотношении фермента и полимера, равном 1:5, позволило достичь получения препаратов с минимальным уровнем инактивации фермента (10%). Необходимо отметить, что наблюдаются различия профилей зависимости остаточной активности фермент-полиэлектролитных комплексов от количества используемого для химической прошивки сшивающего агента и его природы (рис. 5).

Исследованы каталитические характеристики фермент-полиэлектролитных комплексов на основе His₆-ОРН и ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀, полученных при мольном соотношении 2:1 или 1:5 в 0,1 М карбонатном буфере (рН 10,5) и сшитых ковалентно под действием 100-кратного избытка EDC или SNHS по отношению к введенной в фермент-полиэлектролитный комплекс глутаминовой кислоте. Выбор 100-кратного избытка сшивающего агента обусловлен тем, что

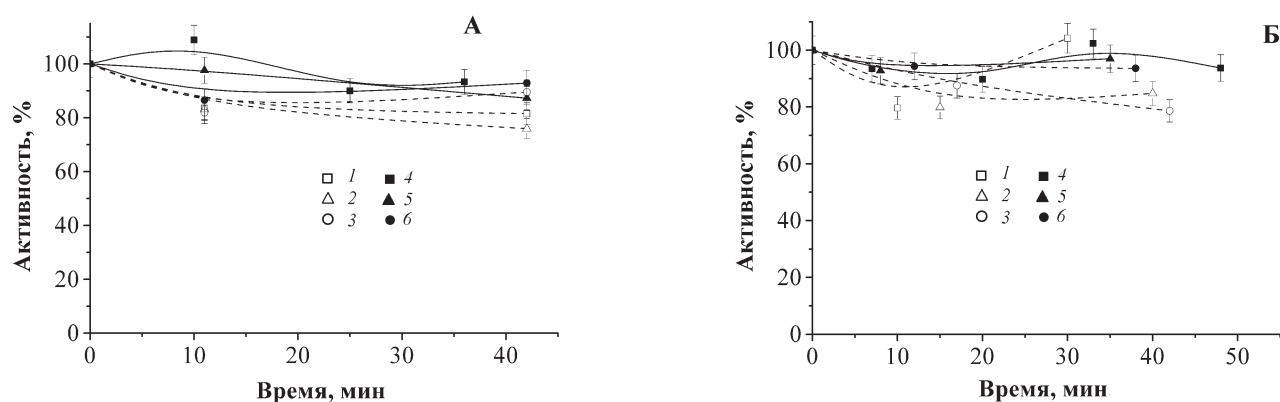


Рис. 4. Кинетика изменения ферментативной активности фермент-полиэлектролитных комплексов на основе His₆-ОРН и ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀, полученных при мольном соотношении «фермент:полимер» 2:1 (1, 2, 3) и 1:5 (4, 5, 6) в 0,1 М карбонатном буфере (рН 10,5) под действием EDC (А) и SNHS (Б); мольное соотношение «глутаминовая кислота:сшивающий агент» составляло 1:1 (3, 6), 1:10 (2, 5) и 1:100 (1, 4)

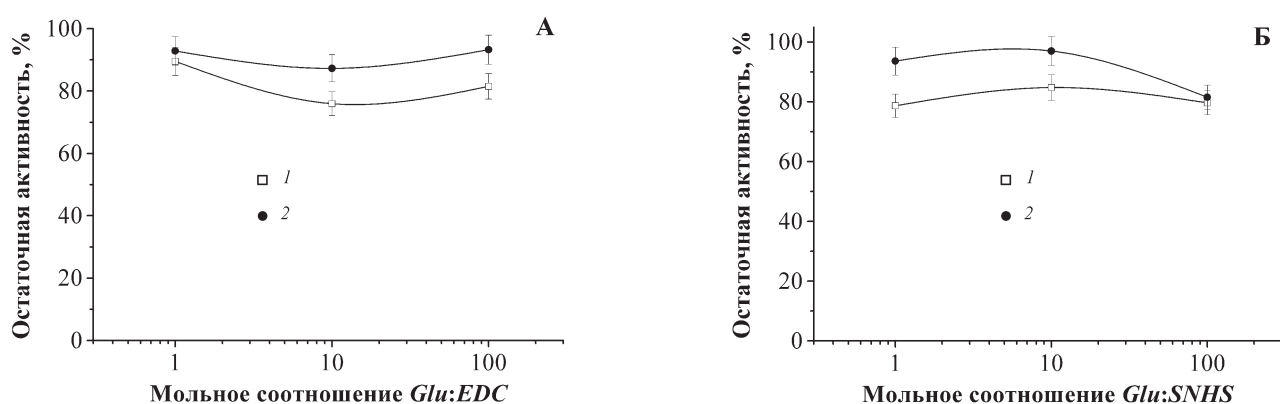


Рис. 5. Ферментативная активность фермент-полиэлектролитных комплексов, полученных на основе His₆-ОРН и ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀ при мольном соотношении 2:1 (1) и 1:5 (2) в 0,1 М карбонатном буфере (рН 10,5) и сшитых ковалентно под действием EDC (А) и SNHS (Б) через 45 мин с момента начала сшивки фермент-полиэлектролитных комплексов (за 100% принята исходная активность фермента)

в этом случае степень сшивки фермент-полиэлектролитных комплексов одинакова.

Рассчитанные каталитические константы действия ковалентно-сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов в реакции гидролиза Параоксона представлены в табл. 2. Сравнение каталитических характеристик фермент-полиэлектролитных комплексов, сшитых EDC или SNHS, показало, что EDC – оптимальный сшивающий агент, позволяющий достичь максимальной эффективности ферментативного гидролиза.

Идентичность каталитических характеристик фермент-полиэлектролитных комплексов, сшитых SNHS, свидетельствует о том, что этот сшивающий агент взаимодействует в первую очередь с ферментом, в то

время как EDC – с сополимером. В случае SNHS снижение ферментативной активности, происходящее до одного общего уровня ($3660 \pm 120 \text{ c}^{-1}$), предопределено количеством функциональных групп на поверхности фермента, способных вступать в химическое взаимодействие с этим сшивающим агентом. Ввиду значительного избытка SNHS (мольное соотношение с ферментом составляло 1:2500 и 1:25000) очевидно, что большая часть сшивающего агента находилась в свободном виде в растворе.

Сравнение каталитических констант ковалентных фермент-полиэлектролитных комплексов, сшитых EDC (табл. 2), и нековалентных комплексов (табл. 3), полученных на основе His₆-ОРН и блок-сополимера ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀, позволило сделать вывод о том, что

Т а б л и ц а 2

Каталитические характеристики гидролиза Параоксона под действием фермент-полиэлектролитных комплексов на основе фермента His₆-ОРН и сополимера ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀, полученных при различных мольных соотношениях в 0,1 М карбонатном буфере (рН 10,5) и сшитых ковалентно под действием разных сшивающих агентов

Мольное соотношение	EDC			SNHS		
	K_M , мкМ	v_{\max}/E_0 , с ⁻¹	$v_{\max}/(E_0 \times K_M)$, М ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мкМ	v_{\max}/E_0 , с ⁻¹	$v_{\max}/(E_0 \times K_M)$, М ⁻¹ с ⁻¹
2:1	15,9±0,9	4510±210	(2,8±0,3)×10 ⁸	22,2±2,6	3620±120	(1,6±0,2)×10 ⁸
1:5	19,0±1,6	4070±150	(2,1±0,3)×10 ⁸	22,1±1,7	3690±130	(1,7±0,2)×10 ⁸

Примечание. E_0 – начальная концентрация фермента.

Т а б л и ц а 3

Каталитические характеристики гидролиза Параоксона под действием нековалентных фермент-полиэлектролитных комплексов на основе фермента His₆-ОРН и блок-сополимера ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀, полученных при рН 10,5 и взятых в различных мольных соотношениях.

Мольное соотношение	K_M , мкМ	v_{\max}/E_0 , с ⁻¹	$v_{\max}/(E_0 \times K_M)$, М ⁻¹ с ⁻¹
2:1	16,7±0,9	5005±60	(3,0±0,2)×10 ⁸
1:5	38,0±1,7	4190±100	(1,1±0,1)×10 ⁸

Примечание. E_0 – начальная концентрация фермента.

у ковалентно сшитых фермент-полиэлектролитных комплексов происходит ожидаемое снижение каталитической константы на 3–10%. В случае использования максимального количества сополимера наблюдалось снижение константы Михаэлиса в 2 раза по сравнению с нековалентными фермент-полиэлектролитными комплексами. По всей видимости, это свидетельствует о существенном структурировании полимерной оболочки, в результате которого исчезают стерические затруднения, создающиеся блок-сополимером, для взаимодействия фермента с субстратом. В результате для образца фермент-полиэлектролитного комплекса, полученного при мольном соотношении фермента и полимера, равном 1:5 и ковалентно сшитого EDC (табл. 2), удалось значительно увеличить (в 1,9 раза) константу эффективности действия по сравнению с его нековалентным вариантом (табл. 3).

В сравнении с известными аналогами, полученные путем пэгирования ОРН [9, 14], разработанные

нами фермент-полиэлектролитные комплексы на основе His₆-ОРН обладают более высокими каталитическими характеристиками. Каталитическая константа действия фермент-полиэлектролитных комплексов на основе His₆-ОРН и ПЭГ₁₁₃-ПГК₅₀ в 1,3–4,0 раза выше, константа Михаэлиса в 1,5–16,8 раза ниже, а в целом константа эффективности действия в 2,3–25,5 раза больше, чем у аналогов.

Таким образом, были разработаны и исследованы ковалентно сшитые фермент-полиэлектролитные комплексы на основе His₆-ОРН и различных блок-сополимеров. Варьирование блок-сополимера, а также условий получения таких комплексов позволило получить высокоэффективные биокатализаторы, способные гидролизовать ФОС. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании полианиона (блок-сополимера ПЭГ с полиглутаминовой кислотой), который ковалентно связывали с ферментом с помощью производного карбодиимида (EDC).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (договор №11G.34.31.0004 от 30 ноября 2010 г).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kwong T.C.* // Ther. Drug. Monit. 2002. **24**. N 1. P. 144.
2. *Gupta R.C.* Handbook of toxicology of chemical warfare agents. L., 2009. P. 1168.
3. *Gold R.S., Wales M.E., Grimsley J.K.* // Disarm. Technol. 2000. **23**. P. 263.
4. *Obendorf S.K., Lemley A.T., Hedge A., et al.* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2006. **50**. N 1. P. 31.
5. *Lemley A., Hedge A., Obendorf S.K., et al.* // Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 2002. **69**. N 2. P. 155.
6. *Votchitseva Y.A., Efremenko E.N., Aliev T.K., Varfolomeyev S.D.* // Biochemistry (Mosc.). 2006. **71**. P. 167.
7. *Sirotkina M., Lyagin I., Efremenko E.* // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2012. **68**. P. 18.
8. *Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Лягин И.В., Сенько О.В., Гудков Д.А., Аксенов А.В., Степанов Н.А., Сироткина М.С., Спиричева О.В., Иванов Р.В., Лозинский В.И., Варфоломеев С.Д., Кондратьев В.Б., Холстов В.И.* Способ биоразложения фосфорорганических соединений в составе реакционных масс, получаемых после химического уничтожения вещества типа Vx. Пат. РФ № 2408724, 2011. Бюл. № 1.
9. *Novikov B.N., Grimsley J.K., Kern R.J., et al.* // J. Control. Release. 2010. **146**. P. 318.
10. *Kabanov A.V., Bronich T., Batrakova E., Gendelman H.* Compositions for protein delivery and methods of use thereof. Pat. WO 2008/141155 A1, 2008.
11. *Ефременко Е.Н., Вотчitseва Ю.А., Алиев Т.К., Варфоломеев С.Д.* Рекомбинантная плазмидная ДНК рTES-His-ОРН и продуцент олигогистидинсодержащей органофосфатгидролазы. Пат. РФ № 2255975, 2005. Бюл. № 19.
12. *Ефременко Е., Вотчitseва Y., Plieva F., et al.* // Appl. Microbiol. Biot. 2006. **70**. P. 558.
13. *Kabanov A.V., Bronich T., Batrakova E., Gendelman H.* Compositions for protein delivery and methods of use thereof. Patent US 2010/0291065 A1, 2010.
14. *Jun D., Musilová L., Link M., et al.* // Chem.-Biol. Interact. 2010. **187**. P. 380.

Поступила в редакцию 30.01.14

CATALYTIC CHARACTERISTICS OF ENZYME-POLYELECTROLYTE COMPLEXES BASED ON HEXAHISTIDINE-CONTAINING ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE

I.V. Lyagin, E.N. Efremenko, A.V. Kabanov

(Chemical Enzymology Department)

A number of covalent and non-covalent polyelectrolyte complexes based on enzyme such as hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase were developed in the work. Polyanions and polycations were used in the form of block-copolymers with poly(ethylene glycol). To obtain covalent complexes of the enzyme, different coupling agents (glutaric aldehyde, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt) were tried. The best catalytic efficiency of action of covalently bound complex $((2.8 \pm 0.3) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ was obtained in the case of samples with EDC. The modification of the protein surface was undertaken as an approach to its further biomedical application.

Key words: hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase, polyelectrolyte, enzyme-polyelectrolyte complex.

Сведения об авторах: Лягин Илья Владимирович – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (lyagin@mail.ru); Ефременко Елена Николаевна – зав. лаб. эковиокатализа кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. биол. наук (elena_efremenko@list.ru); Кабанов Александр Викторович – зав. лаб. химического дизайна бионаноматериалов кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (skabanov@me.com).