

Štúdium vplyvu zmeny prostredia na teplotnú stabilitu a konformáciu Glukóza oxidázy

Lukáš Kandráč¹, Marián Antalík^{1,2}

¹Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Moyzesova 11, 040 01 Košice,

²Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied, Watsonová 47, Košice
lukas.kandrac@gmail.com

Glukóza oxidáza (GOX) z *Aspergillus niger* je flavoproteín, ktorý katalizuje oxidáciu β -D-glukózy za prítomnosti molekulového kyslíka ako akceptora elektrónu na δ -glukónolaktón, ktorý následne spontánne hydrolyzuje na kyselinu glukuronovú a peroxid vodíka. Je to dimér s molekulovou hmotnosťou 160 kDa zložený z dvoch identických podjednotiek. Každá podjednotka (monomér) obsahuje tesne nekovalentne viazanú molekulu FAD [1]. Štúdium glukóza oxidázy a jeho aplikácia je obmedzená jej konformačnou stabilitou. Je známe, že teplotná stabilita a dynamické vlastnosti enzýmu závisia na redoxnom stave [2]. Aj napriek výraznému pokroku v štúdiu GOX sa doposiaľ nepodarilo pochopiť mechanizmus ireverzibilnej teplotne indukovanej denaturácie/ inaktivácie glukóza oxidázy [1].

Absorpčné spektrum GOX sa vo viditeľnej oblasti vyznačuje prítomnosťou pásov prislúchajúcich flavinovému kofaktoru, prostredníctvom ktorých sa sledujú teplotne indukované zmeny v aktívnom mieste pri rôznych koncentráciách proteínu. Teplota prechodu teplotne indukovanej denaturácie GOX je monitorovaná aj metódou cirkulárneho dichroizmu (CD). CD spektrum GOX v natívnom stave sa vyznačuje relatívne silnými signálmi vo viditeľnej, blízkej-UV a ďalekej-UV oblasti. Vo viditeľnej oblasti je pozorovaný pozitívny Cottonov efekt s maximom pri 375 nm, ktorý prislúcha prítomnosti flavínového kofaktora [3]. Vo viditeľnej a blízkej-UV oblasti sú zmeny v CD spektrách GOX v teplotne denaturovanom a natívnom stave výrazné, hlavne vďaka disociácii FAD-u z proteínu [1]. Zvýšenie teplotnej stability v oxidovanom stave sa dá dosiahnuť externým prídavkom sorbitolu, glycerolu alebo iných polyolov, rôznych solí alebo polyelektrolytov [4].

V našej práci sa snažíme objasniť problematiku teplotnej stability modelového proteínu v oxidovanom stave v rôznom pH prostredia aj v prítomnosti látok potenciálne stabilizujúcich jeho štruktúru. Výrazným pokrokom v našej práci bolo objavenie vhodného redukčného činidla na redukciu GOX, ktoré zabezpečí trvalé redukčné prostredie (v definovanom rozsahu pH) potrebné na uskutočnenie merania teploty prechodu. Týmto spôsobom vieme predmetne porovnať hodnoty teplôt prechodu GOX v oxidovanom a redukovanom stave.

Príspevok bol vypracovaný v rámci projektov č. 26220120033 z ŠF EU, VEGA 2/0038/09, projekt APVV-0171-10 a VVGS PF 17/2011/Ch

[1] Gouda, M. D., Singh, S. A., Rao, A. G. A., Thakur, M. S., Karanth, N. G. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 24324–24333.

[2] Nakamura, S., Koga, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1977**, 78, 806–810.

[3] Strickland, E. H. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **1974**, 2, 113–175.

[4] Ye, W. N., Combes, D., Manson, P. *Enzyme Microb. Technol.*, **1988**, 10, 498–502.