

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΒΑΜΒΑΚΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
LABORATORY OF ANALYTICAL CHEMISTRY**

MASTER OF SCIENCE

**NANOSTRUCTURES
IN SENSORS AND BIOSENSORS**

VASILIKI VAMVAKAKI

IRAKLION 2004

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χανιωτάκης Νίκος (*Επιβλέπων Καθηγητής*)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γανωτάκης Δημήτριος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κατερινόπουλος Χαράλαμπος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κ. Ν. Χανιωτάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση του, την εμπιστοσύνη του αλλά και την ηθική και οικονομική υποστήριξη του κατά τη διάρκεια της πολύχρονης συνεργασίας μας.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Εξεταστικής μου Επιτροπής, τους καθηγητές Δ. Γανωτάκη και Χ. Κατερινόπουλο για τα πολύτιμα σχόλια και τις παρατηρήσεις τους που συνέβαλαν στην τελική διαμόρφωση αυτής της εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Σ. Σωτηροπούλου και τη Μ. Φουσκάκη καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας για την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη συνεισφορά τους στην εργασία αυτή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. D. Fournier του πανεπιστημίου P. Sabatier της Τουλούζης για τη συνεργασία μας στην ανάπτυξη των νανοαισθητήρων των λιποσωμάτων και τον καθηγητή κ. Α. Ρίζο για τα φάσματα δυναμικής σκέδασης φωτός.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ και από το ευρωπαϊκό πρόγραμμα SAFEGARD.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη συνεχή τους υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
1. INTRODUCTION.....	3
2 ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	4
3. ENZYMA.....	6
3.1 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYΜΩΝ	7
3.2 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYΜΩΝ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	9
4. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	12
5. ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ	14
5.1 ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ ΆΝΘΡΑΚΑ	14
5.2 ΠΟΡΩΔΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΠΥΡΙΤΙΟΥ.....	15
5.3 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	16
6. ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYΜΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ.....	19
6.1 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYΜΩΝ ΣΕ ΠΟΡΩΔΗ ΠΥΡΙΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	19
6.1.1 <i>Κατασκευή βιοαισθητήρα οξειδάσης της γλυκόζης με πορώδη σφαιρίδια</i> <i>διοξειδίου του πυριτίου.....</i>	19
6.1.2 <i>Συνθήκες μέτρησης.....</i>	20
6.1.3 <i>Αποτελέσματα.....</i>	20
6.2 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYΜΩΝ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ.....	21
6.2.1 <i>Παρασκευή λιποσωμάτων</i>	22
6.2.2 <i>Τρόποι Ανίχνευσης</i>	23
7. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	26
7.1 ΠΟΡΩΔΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ	26
7.1.1 <i>Ακινητοποίηση GOx και AChE σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του</i> <i>πυριτίου</i>	26
7.1.2 <i>Σταθερότητα GOx και AChE στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του</i> <i>πυριτίου</i>	27
7.1.3 <i>Μελέτη σταθερότητας ενζύμων σε νανοπορώδη/μεσοπορώδη σφαιρίδια</i> <i>διοξειδίου του πυριτίου.....</i>	27
7.1.4 <i>Μελέτη εκρόφησης ενζύμων από τα πυριτικά υποστρώματα.....</i>	27
7.2 ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	27
7.2.1 <i>Ενθυλάκωση GOx και AChE σε λιποσώματα.....</i>	28
7.2.2 <i>Σταθεροποίηση λιποσωμάτων</i>	28
7.2.3 <i>Εισαγωγή πορινών στα λιποσώματα.....</i>	29
7.2.4 <i>Φθορισμομετρική ανίχνευση.....</i>	29
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	32

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια καθιστά δυνατή την ανάπτυξη και αξιολόγηση νανο-συστημάτων που βασίζονται σε νανοϋλικά και παρέχουν νέες προοπτικές στον τομέα των βιοαναλυτικών συστημάτων. Οι ερευνητικές προσπάθειες προσανατολίζονται κυρίως στη σταθεροποίηση ενζύμων σε νανοπορώδη υλικά με διάμετρο πόρων στην κλίμακα των νανομέτρων. Τα νανοπορώδη υλικά παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την ακινητοποίηση ενζύμων σε σύγκριση με άλλα υλικά λόγω της υψηλότερης δραστηκής τους επιφάνειας και της πορώδους δομής τους, που επιτρέπει μεγαλύτερα ενζυμικά φορτία. Επιπλέον η συσχέτιση του μεγέθους των πόρων των νανοδομών και της διαμέτρου των ενζυμικών μορίων φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη σταθεροποίηση των ακινητοποιημένων ενζύμων.

Στην εργασία αυτή μελετάται η ακινητοποίηση ενζύμων σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου με καθορισμένη διάμετρο πόρων ώστε να εξεταστεί η σταθεροποίηση των ενζύμων κατά την ακινητοποίηση. Παράλληλα εξετάζεται η σταθεροποίηση ενζύμων στο εσωτερικό νανο-περιβάλλον λιποσωμάτων. Απώτερος στόχος είναι η εισαγωγή-ενσωμάτωση των συστημάτων νανοδομών-βιολογικών μορίων σε συστήματα αισθητήρων και βιοαισθητήρων για την ανάπτυξη βελτιωμένων αναλυτικών τεχνικών που θα παρέχουν τη δυνατότητα ποσοτικών και ποιοτικών προσδιορισμών με αξιοπιστία και ακρίβεια.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Νανοπορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου, λιποσώματα, σταθεροποίηση ενζύμων, βιοαισθητήρες

1. INTRODUCTION

Recent advances in the field of nanotechnology has enabled the development and evaluation of nano-systems based on novel nanomaterials that offer new directions in the field of bio-analytical systems. Research efforts are mainly focused on the stabilization of enzymes in nanoporous materials with pores or internal spaces in the range of nanometers. Nanoporous materials are more exciting candidates for enzyme immobilization compared with conventional materials due to their large surface area and opened pore structure that allows high enzyme loadings. Moreover the size matching between the pore size of the nanomaterials and the molecular diameter of the enzymes seems to provide a stabilizing effect to the immobilized enzymes.

In this study enzyme immobilization in nanoporous silica beads with well controlled pore sizes is evaluated in order to verify the stabilization effect of immobilization. Also enzyme stabilization in the internal nanoenvironment of liposomes is examined. The aim of the project is the introduction of the nanomaterials-biomolecules complexes in biosensor systems for the development of advanced analytical techniques that allow for reliable quantitative and qualitative analysis.

KEYWORDS: Nanoporous silica beads, liposomes, enzyme stabilization, biosensors.

2 ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι χημικοί αισθητήρες αποτελούν κλάδο της αναλυτικής χημείας με ευρεία ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Ο χημικός αισθητήρας σύμφωνα με την IUPAC¹ είναι ένας μικροποιημένος μετατροπέας σήματος που αποκρίνεται επιλεκτικά και αντιστρεπτά σε χημικές ουσίες ή ιόντα και παράγει αναλυτικό σήμα που εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αναλύτη. Τα βασικά τμήματα του χημικού αισθητήρα είναι το αισθητήριο σημείο και ο μεταλλάκτης σήματος². Στο αισθητήριο σημείο λαμβάνει χώρα η χημική αναγνώριση του αναλύτη και στη συνέχεια η χημική πληροφορία μεταφράζεται μέσω του μεταλλάκτη σε ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα το οποίο ενισχύεται και παρουσιάζεται.

Βασική κατηγορία των χημικών αισθητήρων είναι οι βιοαισθητήρες στους οποίους η χημική αναγνώριση του αναλύτη επιτυγχάνεται μέσω ενός βιολογικού μορίου (ενζύμου, υποδοχέα, DNA). Απαραίτητη προϋπόθεση για ένα βιοαισθητήρα είναι το βιολογικό μόριο να βρίσκεται σε στενή επαφή τόσο με τον αναλύτη όσο και με το μεταλλάκτη σήματος. Η σύζευξη του επιλεκτικού βιολογικού μορίου με το μεταλλάκτη σήματος παρέχει πολύτιμες ποσοτικές ή ημιποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες³.

Το πιο διαδεδομένο είδος βιοαισθητήρων είναι οι ενζυμικοί, όπου το βιολογικό μόριο είναι ένα ακινητοποιημένο ένζυμο. Οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες έχουν γίνει αποδεκτοί ως αναλυτικά όργανα την τελευταία δεκαετία λόγω της προόδου που έχει επιτευχθεί στον τομέα⁴. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα κάποια αναλυτικά χαρακτηριστικά που απαιτούν περαιτέρω μελέτη και βελτιστοποίηση. Αυτά είναι η σταθερότητα των βιοαισθητήρων κατά την αποθήκευσή τους ή σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας, η ευαισθησία τους και η αναπαραγωγίμη κατασκευή τους σε μεγάλες ποσότητες⁵.

Μεταξύ αυτών των παραμέτρων, ο βασικότερος παράγοντας που επηρεάζει τα αναλυτικά χαρακτηριστικά είναι η σταθερότητα του βιολογικού μορίου. Η σταθερότητα των βιοαισθητήρων εξαρτάται κυρίως από το χρόνο ζωής και από το ρυθμό αποικοδόμησης ή απενεργοποίησης του βιολογικού μορίου που χρησιμοποιείται. Διάφοροι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH και οργανικοί διαλύτες, μπορούν να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση του βιολογικού μορίου κατά τη διάρκεια παρασκευής των βιοαισθητήρων ή ακόμα κατά τη διάρκεια των μετρήσεων.

Απαιτούνται λοιπόν, νέες τεχνικές και μεθοδολογίες προκειμένου να σταθεροποιηθούν τα ένζυμα στο αισθητήριο υλικό και να προστατευτούν από θερμική ή χημική αποικοδόμηση, γεγονός που θα επιφέρει άμεση βελτίωση των βιοαισθητήρων. Οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες και πιο συγκεκριμένα η βελτίωση της σταθερότητάς τους, μέσω σταθεροποίησης του ενζύμου αποτελούν το θέμα της παρούσας εργασίας και για το λόγο αυτό θα γίνει ιδιαίτερα αναφορά στα ένζυμα και στις ήδη υπάρχουσες μεθόδους σταθεροποίησης τους.

3. ENZYMA

Οι πρωτεΐνες και ειδικότερα τα ένζυμα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες, στις οποίες συμμετέχουν ως καταλύτες. Μπορούν να επιταχύνουν μία αντίδραση τουλάχιστον κατά 10^{12} φορές⁶ σε σύγκριση με την ταχύτητα της αντίδρασης απουσία του ενζύμου. Η επιτάχυνση της βιολογικής αντίδρασης πραγματοποιείται εξαιτίας της μείωσης της ενέργειας της μεταβατικής κατάστασης. Με άλλα λόγια το ένζυμο διευκολύνει το υπόστρωμα να πάρει εκείνη τη δομή στο χώρο που θα προκαλέσει τη μετατροπή του σε προϊόντα⁷. Παράλληλα τα ένζυμα εμφανίζουν μεγάλη επιλεκτικότητα καθώς έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν εξειδικευμένα και να δεσμεύουν ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα και να το μετατρέπουν ταχύτατα στα αντίστοιχα προϊόντα.

Η απώλεια της καταλυτικής δράσης των ενζύμων αποτελεί ένα από τα βασικά προβλήματα που εμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή τους. Αυτό οφείλεται στην αδυναμία των ενζύμων να διατηρήσουν την ενεργότητα τους σε περιβάλλον που διαφέρει σημαντικά από το φυσικό τους. Διάφορες παράμετροι όπως οι ακραίες τιμές θερμοκρασίας ή pH, αλλά και τα απορρυπαντικά, μεταβάλλουν την τριτοταγή δομή των ενζύμων συμβάλλοντας στη μείωση της δραστηριότητάς τους. Η απώλεια της δραστηριότητας μπορεί να οφείλεται σε αποδιάταξη, οξειδωτική αποσύνθεση, μη αντιστρεπτή αναστολή, πρωτεόλυση ή καθίζηση. Η μείωση της ενεργότητας ενός ενζύμου είναι αποτέλεσμα της αποδιάταξης της τεταρτοταγούς δομής του. Το ένζυμο μεταπίπτει από την ενεργή του μορφή (N) στην αποδιαταγμένη του μορφή (U). Η διαδικασία αυτή είναι συνήθως αντιστρεπτή και το ένζυμο μπορεί να επαναδιαταχτεί και να αποκτήσει και πάλι την ενεργή του μορφή. Ωστόσο κάποια περαιτέρω χημική αλλαγή στην πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη απενεργοποίηση του ενζύμου (I)⁸.

Η προστασία των ενζύμων από τους παράγοντες εκείνους που επηρεάζουν την καταλυτική τους δραστηριότητα αλλά και τη σταθερότητα τους αποτελεί ένα πεδίο που συγκεντρώνει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

3.1 Σταθεροποίηση ενζύμων

Τα ένζυμα ως βιοκαταλύτες χρησιμοποιούνται κυρίως σε υδατικά συστήματα. Η σταθερότητα των ενζύμων σε υδατικά διαλύματα είναι περιορισμένη καθώς συχνά προκαλείται αποδιάταξη τους⁹. Παράλληλα όμως και οι οργανικοί διαλύτες δεν αποτελούν το καταλληλότερο μέσο για τα ένζυμα καθώς συμβάλλουν στην απενεργοποίησή τους. Ο βαθμός απενεργοποίησης εξαρτάται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται και από το ποσοστό του νερού στο μέσο¹⁰. Η παρουσία του νερού έστω και σε μικρό ποσοστό είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της καταλυτικής δράσης των ενζύμων¹¹. Έτσι σε κάθε περίπτωση πρέπει να βρίσκεται το καταλληλότερο μέσο ώστε όχι μόνο να είναι σταθερό το ένζυμο αλλά και δραστικό.

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη σταθερότητα των ενζύμων σε διάλυμα¹². Ένας βασικός παράγοντας είναι η θερμοκρασία αφού τα ένζυμα είναι σταθερά σε μικρό εύρος θερμοκρασιών. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία οι δεσμοί υδρογόνου γίνονται πιο ασθενείς και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μειώνονται. Έτσι σε υψηλές θερμοκρασίες ευνοείται η αποδιάταξή τους. Μία άλλη σημαντική παράμετρος είναι το pH του περιβάλλοντος. Σε πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές τιμές pH τα ένζυμα υφίστανται υδρόλυση και απενεργοποιούνται. Πολλές φορές η παρουσία μικρής συγκέντρωσης αλάτων σε πρωτεϊνικά διαλύματα ευνοεί τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Ωστόσο όταν η συγκέντρωση του άλατος γίνεται πολύ μεγάλη αυξάνεται η επιφανειακή τάση του διαλύματος με αποτέλεσμα να παρατηρείται καταβύθιση της πρωτεΐνης και τελικά απενεργοποίησή της.

Για να αποφευχθεί η απενεργοποίηση των ενζύμων σε διάλυμα έχουν προταθεί πολλές διαδικασίες για τη σταθεροποίησή τους. Οι βασικότερες από αυτές αναπτύσσονται στη συνέχεια.

Μετάλλαξη

Στην πρωτεϊνική μηχανική εφαρμόζεται ευρύτατα η μετάλλαξη ενζύμων με στόχο τη σταθεροποίηση και τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους¹³. Γενικά η αντικατάσταση συγκεκριμένων αμινοξέων στην πρωτεϊνική αλυσίδα αποσκοπεί στην αύξηση των πιθανών δεσμών υδρογόνου και των δυνάμεων Van der Waals ή στην ενίσχυση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στην πρωτεϊνική αλυσίδα¹⁴. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται σταθεροποίηση της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Η αντικατάσταση συγκεκριμένων καταλοίπων στην αλληλουχία των αμινοξέων μπορεί να επιφέρει αύξηση στη σταθερότητα των πρωτεϊνών. Μάλιστα συνήθως

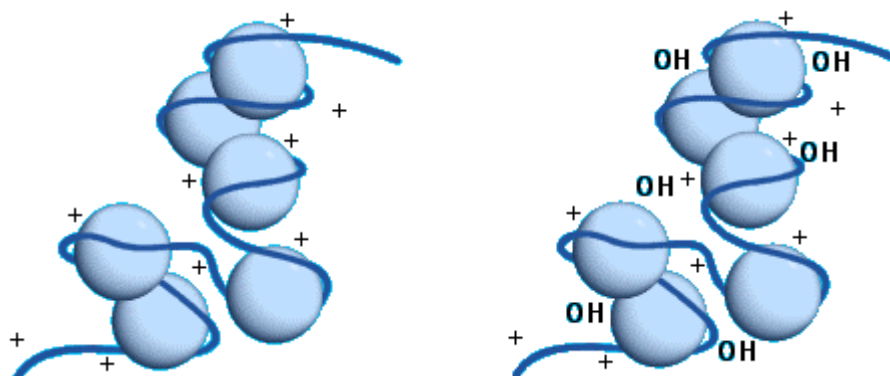
πραγματοποιείται μετάλλαξη στα κατάλοιπα εκείνα στα οποία έχει μεγαλύτερη πρόσβαση ο διαλύτης. Έχει βρεθεί ότι η εισαγωγή όξινων καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και βασικών καταλοίπων στο καρβοξυ-τελικό άκρο, σταθεροποιεί τις έλικες της πρωτεΐνης. Επίσης η αύξηση των δισουλφιδικών δεσμών στην πρωτεϊνική δομή αυξάνει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης εμποδίζοντας την αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής της¹³.

Χημική τροποποίηση

Η χημική τροποποίηση των πρωτεϊνών πολλές φορές συμβάλλει στη σταθεροποίηση τους. Πολύ σημαντική είναι η μετατροπή των μη-πολικών ομάδων της εξωτερικής επιφάνειας της πρωτεΐνης σε πολικές¹⁵. Η σταθεροποίηση αυτή πραγματοποιείται με την αντικατάσταση των μη-πολικών αμινοξέων από πολικά ή με δέσμευση υδατανθράκων σε επιφανειακά αμινοξέα της πρωτεΐνης. Με αυτή τη διαδικασία η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά καλύτερα με πολικούς διαλύτες και η ενδεχόμενη αποδιάταξη της περιορίζεται. Παράλληλα, η δέσμευση πολυαιθυλενογλυκόλης με πολικές ή άπολες ομάδες, σε επιφανειακά αμινοξέα αυξάνει τη διαλυτότητα και την ενεργότητα της πρωτεΐνης σε πολικούς και άπολους διαλύτες αντίστοιχα.

Πρόσθετα

Η σταθερότητα των ενζύμων σε υδατικά διαλύματα αυξάνεται με την προσθήκη ορισμένων ενώσεων¹⁶, όπως οι πολυαλκοόλες, τα σάκχαρα και οι πολυηλεκτρολύτες, που ονομάζονται πρόσθετα. Τα σάκχαρα και οι πολυαλκοόλες αυξάνουν την επιφανειακή τάση του νερού, με αποτέλεσμα λιγότερα μόρια νερού να περιβάλλουν το ένζυμο και να μην ευνοείται η αποδιάταξη του⁸ (εικόνα 1). Η αύξηση της σταθερότητας των ενζύμων παρουσία των πολυηλεκτρολυτών όπως η πολυαιθυλενιμίνη¹⁷, η διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη¹⁸ και το DNA¹⁹ θεωρείται ότι επιτυγχάνεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που προστατεύουν το ένζυμο. Δημιουργείται μία δομή κλουβιού γύρω από το ένζυμο που συμβάλλει στη διατήρηση της ενεργής του διαμόρφωσης.



Εικόνα 1. Σταθεροποίηση ενζύμων με πολυηλεκτρολύτες και πολυαλκοόλες.

Ακίνητοποίηση

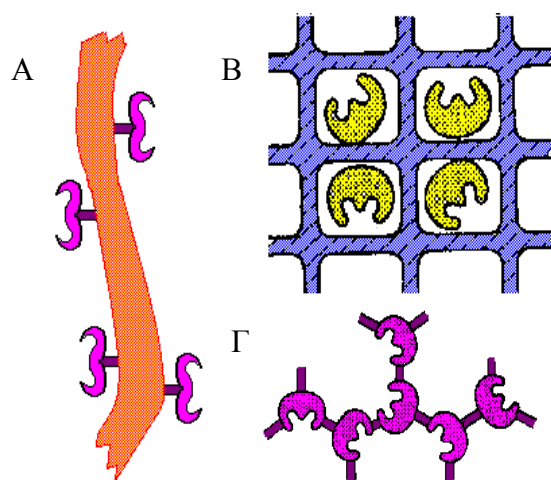
Ένας επιπλέον τρόπος σταθεροποίησης των ενζύμων αποτελεί η ακίνητοποίηση τους σε στερεά υποστρώματα. Ο τρόπος αυτός σταθεροποίησης είναι ο πιο διαδεδομένος ειδικά στην περίπτωση των ενζυμικών βιοαισθητήρων, καθώς με την απευθείας ακίνητοποίηση του ενζύμου στο μετάλλακτη δεν απαιτείται επιπλέον σταθεροποίηση του ενζύμου και για το λόγο αυτό η μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

3.2 Σταθεροποίηση ενζύμων με ακίνητοποίηση

Διάφορα οργανικά και ανόργανα υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για την ακίνητοποίηση βιολογικών μορίων και συγκεκριμένα ενζύμων. Οι πιο βασικές μέθοδοι ακίνητοποίησης των ενζύμων είναι η φυσική προσρόφιση, η ομοιοπολική δέσμευση, η διαμοριακή σύνδεση και η παγίδευση εντός πολυμερικού πλέγματος²⁰ (εικόνα 2).

Φυσική προσρόφιση

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος ακίνητοποίησης είναι η φυσική προσρόφιση σε στερεά υλικά. Το ένζυμο συγκρατείται στο υλικό στήριξης μέσω ισχυρών ιοντικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου καθώς και ασθενών δυνάμεων Van der Waals ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων¹⁰.



Εικόνα 2. Ακίνητοποίηση ενζύμων μέσω Α) ομοιοπολικής πρόσδεσης σε στερεό φορέα, Β) παγίδευσης εντός πολυμερούς και Γ) διαμοριακής σύνδεσης.

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν επηρεάζεται κατά τη φυσική προσρόφηση με αποτέλεσμα να διατηρείται πλήρως η δραστηριότητα του ενζύμου. Ωστόσο πολύ συχνά παρατηρείται εκρόφηση του ενζύμου λόγω της ασθενούς δέσμευσής του στο υλικό στήριξης.

Ομοιοπολική δέσμευση

Πιο αποτελεσματική μέθοδο ακίνητοποίησης αποτελεί η ομοιοπολική δέσμευση σε επιφάνειες μέσω διαφόρων δραστικών ομάδων. Συνήθως ο ομοιοπολικός δεσμός σχηματίζεται μεταξύ των αμινομάδων, καρβοξυλομάδων, υροξυλομάδων και θειολικών ομάδων των αμινοξέων του ενζύμου με τις αντίστοιχες δραστικές ομάδες της επιφάνειας του υλικού δέσμευσης¹⁰. Για τη διατήρηση της δραστηριότητας του ενζύμου, οι συνθήκες των αντιδράσεων πρέπει να είναι ήπιες και τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου είναι απαραίτητο να προστατεύονται ώστε να μη συμμετέχουν στον ομοιοπολικό δεσμό.

Διαμοριακή σύνδεση

Μία ακόμη μέθοδος χημικής ακίνητοποίησης πραγματοποιείται μέσω διαμοριακής σύνδεσης των ενζύμων. Τα ενζυμικά μόρια συνδέονται μεταξύ τους μέσω διαφόρων συνδετικών κρίκων, όπως η γλουταραλδεϋδη και τελικά σχηματίζεται ένα πρωτεϊνικό πλέγμα. Μεγάλες συγκεντρώσεις του ενζύμου πρέπει

να αποφεύγονται καθώς στην περίπτωση αυτή είναι πολύ πιθανό να προκύψει πλέγμα ενζύμων με μειωμένη δραστηριότητα¹⁰.

Παγίδευση

Η παγίδευση ενζύμων σε τρισδιάστατα πολυμερικά πλέγματα πραγματοποιείται μέσω διαφόρων μεθόδων πολυμερισμού. Το πλέγμα προκύπτει κατά το συμπολυμερισμό των κατάλληλων μονομερών παρουσία του ενζύμου. Με τον τρόπο αυτό ελέγχονται οι συνθήκες ακινητοποίησης του ενζύμου. Ωστόσο η αστάθεια των πολυμερικών πλεγμάτων αποτελεί βασικό μειονέκτημα της μεθόδου.

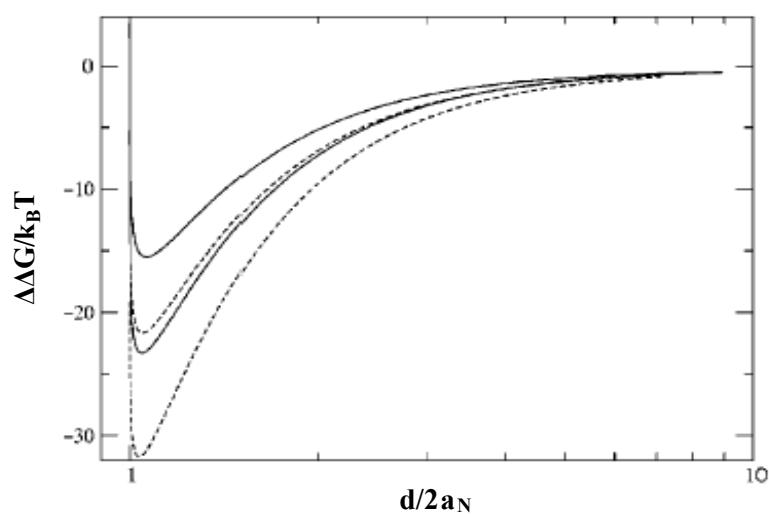
Γενικά η ακινητοποίηση ενζύμων σε επιφάνειες στερεών υποστρωμάτων περιορίζει την απενεργοποίησή τους μέσω διαδικασιών όπως είναι η συσσωμάτωση και η πρωτεόλυση. Ο βαθμός σταθεροποίησης που επιτυγχάνεται διαφέρει, ανάλογα με το ένζυμο και το υπόστρωμα ακινητοποίησης. Για αυτό άλλωστε γίνονται μελέτες βελτιστοποίησης σε κάθε περίπτωση, ώστε να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες για την ακινητοποίηση των ενζύμων.

Οι παραπάνω μέθοδοι ακινητοποίησης εμφανίζουν αρκετά προβλήματα με αποτέλεσμα να μην έχει επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός σταθερότητας του ενζύμου. Τα ένζυμα είτε δεσμεύονται ασθενώς στα υποστρώματα είτε απενεργοποιούνται λόγω των χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά την ακινητοποίησή τους. Παράλληλα είναι δυσχερής η εφαρμογή των διαδικασιών ακινητοποίησης σε συστήματα βιοαισθητήρων καθώς οι περισσότερες περιλαμβάνουν περισσότερα του ενός στάδια, με αποτέλεσμα να μην είναι επαναλήψιμη η διαδικασία.

Πρόσφατα όμως μαθηματικά μοντέλα δημιουργήθηκαν ώστε να μελετηθεί θεωρητικά η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τα υλικά ακινητοποίησης. Η ανάπτυξη των θεωρητικών αυτών μοντέλων θεωρείται ότι μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού σταθεροποίησης και άρα στην ανάπτυξη μίας καθολικής διαδικασίας ακινητοποίησης και σταθεροποίησης.

4. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Οι Zhou et. al. σε πρόσφατο θεωρητικό μοντέλο²¹, αναφέρονται στη σταθεροποίηση πρωτεϊνών κατά τον εγκλωβισμό τους σε περιορισμένους χώρους. Στην περίπτωση αυτή οι δυνάμεις αναδίπλωσης των πρωτεϊνών διαφοροποιούνται σε σχέση με αυτές των ελεύθερων πρωτεϊνών σε διάλυμα και έτσι δεν επιτρέπονται κάποιες διαμορφώσεις της αποδιαταγμένης αλυσίδας της πρωτεΐνης και επομένως η χαλάρωση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3. Μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών συναρτήσει του μεγέθους της κοιλότητας στην οποία έχουν εγκλωβιστεί. Οι δύο πάνω καμπύλες είναι για κυβικές κοιλότητες ενώ οι δύο κάτω για σφαιρικές. Το μέγεθος των πρωτεϊνών είναι (—) 100 κατάλοιπα και (·····) 200 κατάλοιπα.

Στη μελέτη εξετάστηκαν κοιλότητες διαφόρων μεγεθών και σχημάτων ως προς την ικανότητα τους να σταθεροποιούν πρωτεΐνες. Σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης της πρωτεΐνης ($\Delta\Delta G \text{ k}_B^{-1}\text{T}^{-1}$) σε συνάρτηση με το μέγεθος-διάμετρο της κοιλότητας ($d/2a_N$), όπου k_B είναι η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, d η διάμετρος της κοιλότητας, a_N η ακτίνα της ενεργής μορφής της πρωτεΐνης και N ο αριθμός των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών συνοψίζονται στο γράφημα του σχήματος 3, όπου οι

δύο πάνω καμπύλες αντιστοιχούν σε κυβικές κοιλότητες ενώ οι δύο κάτω σε σφαιρικές κοιλότητες. Χαρακτηριστικό είναι ότι όλες οι καμπύλες εμφανίζουν ένα ελάχιστο που αντιστοιχεί σε πολύ μικρές διαμέτρους των κοιλότητων. Από το γράφημα επίσης προκύπτει ότι στην περιοχή των πολύ μικρών διαμέτρων των κοιλότητων, η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης είναι πολύ μικρότερη για τις σφαιρικές κοιλότητες σε σύγκριση με τις κυβικές. Επιπλέον σημαντικό είναι ότι για κάθε σχήμα των κοιλότητων, αύξηση του αριθμού των καταλοίπων της πρωτεΐνης συνοδεύεται από μείωση της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης και επομένως αύξηση της σταθεροποίησης της πρωτεΐνης.

Το παραπάνω μοντέλο επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερο μοντέλο το οποίο προτείνει ότι οι πρωτεΐνες σταθεροποιούνται στο εσωτερικό σφαιρικών κοιλότητων²².

Από τους παραπάνω θεωρητικούς υπολογισμούς αποδείχθηκε ότι μέγιστη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται σε σφαιρικές κοιλότητες και μάλιστα με μέγεθος περίπου 2-6 φορές μεγαλύτερο από αυτό της πρωτεΐνης. Σύμφωνα πάντα με τους υπολογισμούς αυτούς και λαμβάνοντας υπόψιν ότι το μέγεθος μίας ενυδατωμένης πρωτεΐνης μεσαίου μεγέθους κυμαίνεται γύρω στα 10nm είναι προφανές ότι σφαιρικές κοιλότητες με διάμετρο στην κλίμακα των nm, θα επιτρέπουν την εισαγωγή και σταθεροποίηση πρωτεϊνικών μορίων.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι διάφορα υλικά που περιέχουν σφαιρικές κοιλότητες με διάμετρο από 10 έως 300nm (νανοδομές) μπορούν να αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση των ενζύμων.

5. NANOΔΟΜΕΣ

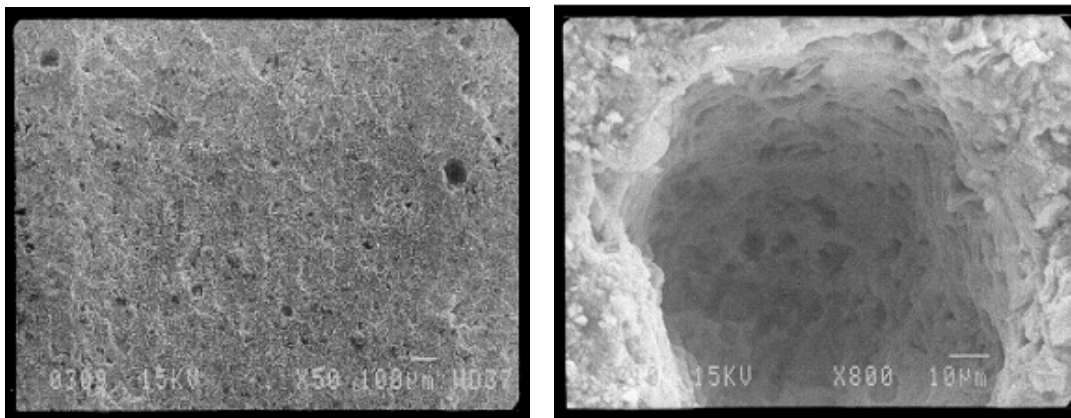
Οι νανοδομές βρίσκονται στο επίκεντρο του σύγχρονου ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω της ευρύτερης τάσης που υπάρχει για την ανάπτυξη μικροποιημένων συστημάτων και την εξέλιξη της νανοτεχνολογίας. Το μέγεθος των νανοδομών αλλά και οι ιδιότητες τους τις καθιστούν χρήσιμα υποστρώματα για ευρύτατες τεχνολογικές εφαρμογές. Η σύζευξη των συστημάτων αυτών με βιολογικά μόρια επιτρέπει τη μελέτη μηχανισμών μοριακής ή και βιολογικής αναγνώρισης με περαιτέρω επίδραση στους τομείς της βιοχημικής ανίχνευσης, της γονιδιακής θεραπείας και της μεταφοράς φαρμάκων. Ωστόσο πολλές από τις ιδιότητες και δυνατότητες των συστημάτων αυτών παραμένουν ανεξερεύνητες.

Με βάση τα αποτελέσματα του μοντέλου που περιγράφηκε παραπάνω είναι προφανές ότι μία εξαιρετικά χρήσιμη ιδιότητα των νανοδομών είναι αυτή της σταθεροποίησης των βιολογικών μορίων. Έτσι στην παρούσα εργασία θα μελετηθεί η αλληλεπίδραση των ενζύμων με τις νανοδομές και η δυνατότητα που έχουν τα νανοπορώδη υλικά να σταθεροποιούν ένζυμα.

Διάφορα μεσο-νανο πορώδη υλικά όπως ο άνθρακας έχουν ήδη εξεταστεί ως προς την καταλληλότητά τους να παγιδεύουν ένζυμα και να τα σταθεροποιούν στους πόρους τους.

5.1 Νανοδομές Άνθρακα

Ο πορώδης άνθρακας έχει διαπιστωθεί ότι αποτελεί άριστο υπόστρωμα ακινητοποίησης ενζύμων. Η ακινητοποίηση στο υλικό αυτό πραγματοποιείται μέσω φυσικής προσρόφησης των ενζύμων. Σταθερά ένζυμα, όπως η οξειδάση της γλυκόζης²³ αλλά και σχετικά ασταθή ένζυμα όπως η οξειδάση του πυρουβικού¹⁹, η οξειδάση του γαλακτικού^{23,24} και η ακετυλχολινεστεράση²⁵ έχει αποδειχτεί ότι παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα στους πόρους του άνθρακα. Στην εικόνα 4 φαίνεται το μέγεθος και η κατανομή των πόρων του συγκεκριμένου άνθρακα όπως προκύπτει από πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy). Διακρίνονται δύο μεγέθη πόρων σφαιρικού σχήματος στο υπόστρωμα άνθρακα που οι διαστάσεις τους είναι είτε 100-300nm είτε μικρότεροι των 70 nm. Η ποικιλία αυτή στη διάμετρο των πόρων προφανώς επιτρέπει τη σταθεροποίηση ενζύμων διαφόρων μεγεθών.



Εικόνα 4. SEM μικροφωτογραφίες A) της επιφάνειας του άνθρακα και B) ενός πόρου του άνθρακα. Οι παύλες αντιστοιχούν σε μήκος 100µm και 10µm αντίστοιχα.

Εκτός από τον πορώδη άνθρακα και άλλα νανοπορώδη υλικά όπως ο ενεργοποιημένος υαλώδης άνθρακας²⁶, τα φουλερένια²⁷ και οι νανοσωλήνες άνθρακα^{28,29,30} έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων.

Στη συνέχεια θα εστιαστούμε στα χαρακτηριστικά που εμφανίζουν άλλες νανοδομές και στη δυνατότητα τους να εγκλωβίζουν ένζυμα.

5.2 Πορώδη υποστρώματα πυριτίου

Τα πορώδη πυριτικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια ως προσροφητικά υλικά, καταλύτες και βιοενεργές επιφάνειες. Ανάλογα με το μέγεθος των πόρων τους τα υλικά αυτά διακρίνονται σε μικροπορώδη με διάμετρο πόρων μικρότερη των 2.0 nm, μακροπορώδη με διάμετρο που ξεπερνά τα 50 nm και μεσοπορώδη με ενδιάμεση διάμετρο μεταξύ 2.0 και 50.0 nm. Η εξέλιξη στον τομέα της σύνθεσης υλικών παρέχει τη δυνατότητα ρύθμισης του μεγέθους των πόρων και της πορωσιμότητας των πυριτικών υποστρωμάτων. Όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος των πόρων τόσο πιο μεγάλη είναι η ενεργός επιφάνεια του υλικού και επομένως τόσο πιο δραστικό είναι. Παράλληλα η δυνατότητα τροποποίησης των υλικών αυτών με την εισαγωγή λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια τους οδηγεί σε υποστρώματα με επιθυμητές ιδιότητες.

Πολλά πορώδη πυριτικά υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών και ενζύμων. Η ακινητοποίηση πραγματοποιείται συνήθως

μέσω απλής προσρόφησης ή μέσω ομοιοπολικής δέσμευσης και συμβάλλει στη σταθεροποίηση των βιολογικών μορίων. Επειδή όμως η διάμετρος των πόρων ορισμένων πυριτικών υποστρωμάτων προσέγγιζε τη μοριακή διάμετρο των ενζύμων προτάθηκε η ενθυλάκωση ενζύμων στα υποστρώματα αυτά³¹. Πολύ σύντομα αποδείχτηκε πειραματικά ότι τόσο το μέγεθος των πόρων των πυριτικών υποστρωμάτων όσο και ο χαρακτήρας της επιφάνειας του υλικού παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επίτευξη βέλτιστης σταθερότητας και ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Κατά την ακινητοποίηση του ενζύμου HRP (Horse Radish Peroxidase) σε διάφορα πυριτικά υποστρώματα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, η μεγαλύτερη δραστηριότητα ενζύμου παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα εκείνο που το μέγεθος των πόρων του ήταν παρόμοιο με το μέγεθος του ενζύμου³². Επίσης επιβεβαιώθηκε ότι ευνοείται η σταθεροποίηση πρωτεϊνών κατά τον εγκλωβισμό τους σε sol-gel πυριτίου όπου το μέγεθος των πόρων του είναι παρόμοιο με το μέγεθος των πρωτεϊνών. Η ακινητοποίηση της λυσοζύμης, της α-λακταλβουμίνης και της μυοσφαιρίνης³³ στα υποστρώματα αυτά αυξάνει τη θερμική σταθερότητα των πρωτεϊνών. Παράλληλα η εισαγωγή λειτουργικών ομάδων όπως καρβοξυλομάδων στην επιφάνεια των πόρων πυριτικών υποστρωμάτων συνέβαλε τόσο στην ενθυλάκωση μεγαλύτερης ποσότητας οργανοφωσφορικής υδρολάσης (organophosphorus hydrolase) όσο και σε αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου³⁴.

Υπάρχουν επομένως κάποιες πρώτες ενδείξεις ότι τα νανο-πορώδη πυριτικά υποστρώματα αποτελούν κατάλληλα υποστρώματα για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων.

5.3 Λιποσώματα

Τα λιπίδια εμφανίζουν αμφίφιλο χαρακτήρα καθώς αποτελούνται από ένα τμήμα που διαλύεται σε πολικούς διαλύτες και ένα δεύτερο που διαλύεται σε μη πολικούς διαλύτες. Η ιδιότητα τους αυτή προάγει την αυθόρμητη συνάθροιση τους σε ποικίλες μικροδομές όταν αυτά βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον⁷. Το σχήμα και το μέγεθος των διαφορετικών μικροδομών που σχηματίζονται εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη γεωμετρία των λιπιδίων.

Μία τέτοια μικροδομή αποτελούν τα λιποσώματα. Πρόκειται για σφαιρικά κυστίδια που αποτελούνται από λιπιδικές διπλοστοιβάδες οι οποίες περιβάλλουν-εγκλωβίζουν υδατικό διάλυμα στο εσωτερικό τους. Τα λιποσώματα μπορούν να αποτελούνται από μία μόνο λιπιδική διπλοστοιβάδα που περιβάλλει τον υδατικό

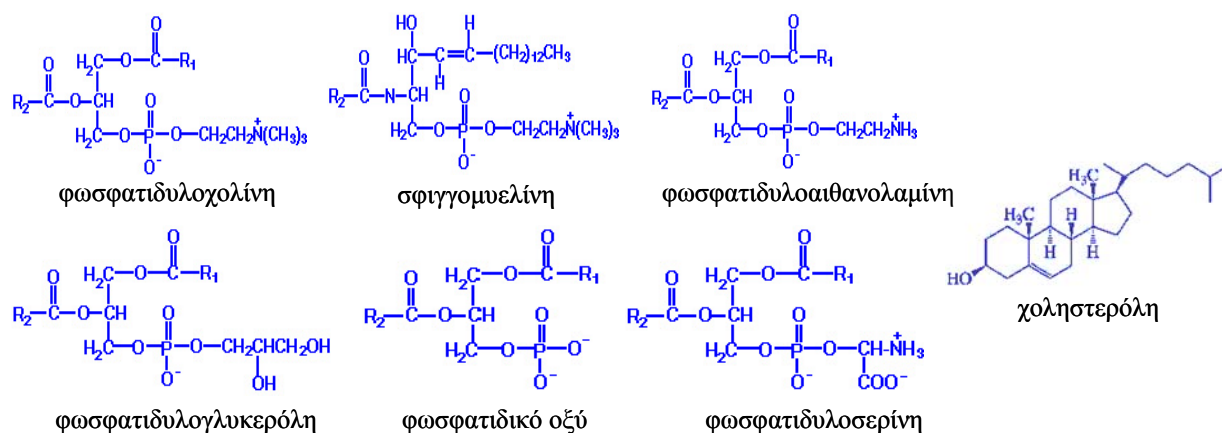
πυρήνα (unilamellar) ή από μερικές διπλοστοιβάδες που περιβάλλουν ομοκεντρικά τον υδατικό πυρήνα (multilamellar)³⁵. Στη λιπιδική διπλοστοιβάδα οι υδρόφοβες ουρές των λιπιδίων προσανατολίζονται προς το εσωτερικό της μεμβράνης ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές προς το υδατικό περιβάλλον στο εσωτερικό και εξωτερικό της μεμβράνης.

Το μέγεθος και οι ιδιότητες των λιποσωμάτων εξαρτώνται από το πρωτόκολλο παρασκευής τους και τα συστατικά της διπλοστοιβάδας³⁵. Το μέγεθος τους κυμαίνεται από πολύ μικρά διαμέτρου 20nm έως πολύ μεγάλα διαμέτρου 10μm. Η επιλογή των συστατικών της διπλοστοιβάδας καθορίζει την ακαμψία και το φορτίο των λιποσωμάτων.

Έτσι μπορούμε να έχουμε ουδέτερα ή φορτισμένα λιποσώματα ανάλογα με το φορτίο των φωσφολιπιδίων που χρησιμοποιούνται, ενώ η μεμβράνη μπορεί να είναι ρευστή ή άκαμπτη. Ουδέτερα φωσφολιπίδια είναι η σφιγγομυελίνη και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη. Το πιο γνωστό όμως φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη) που χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του μικρού της κόστους και του ουδέτερου φορτίου της. Η φωσφατιδυλοχολίνη που συναντάται στη φύση αποτελεί μίγμα φωσφολιπιδίων με αλυσίδα που διαφέρει ως προς το μήκος και το βαθμό ακορεστότητας⁷ (εικόνα 5). Τα κορεσμένα φωσφολιπίδια με μακριές άκυλο-αλυσίδες όπως η διπαλμιτόϋλο-φωσφατιδυλοχολίνη σχηματίζουν άκαμπτες, μη διαπερατές διπλοστοιβάδες, ενώ από την ακόρεστη φωσφατιδυλοχολίνη (από φυσικές πηγές όπως αυγά ή σόγια) προκύπτουν διαπερατές και σχετικά ασταθείς διπλοστοιβάδες. Αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια είναι η φωσφατιδυλογλυκερόλη, το φωσφατιδικό οξύ και η φωσφατιδυλοσερίνη. Η χοληστερόλη αποτελεί ένα άλλο σημαντικό συστατικό των βιολογικών μεμβρανών καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της διαπερατότητας και της ρευστότητας της μεμβράνης.

Τα λιποσώματα δημιουργούνται παρόμοια με τις βιολογικές μεμβράνες και για αυτό συχνά χρησιμοποιούνται ως μοντέλα κυτταρικών μεμβρανικών συστημάτων. Παράλληλα τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν διάφορες ενεργές λιπόφιλες ή υδρόφιλες ουσίες (π.χ. φάρμακα, αντιγόνα) και να τις προστατεύουν από πιθανή αποικοδόμηση. Επίσης μπορούν να κατευθύνουν τις ουσίες αυτές σε καθορισμένα σημεία-στόχους και στη συνέχεια να τις ελευθερώνουν. Λόγω των ιδιοτήτων τους αυτών συναντώνται ευρύτατα σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων³⁶,

στη γονιδιακή θεραπεία και στη βιομηχανία καλλυντικών ως συστατικά σε κρέμες και λοσιόν.



Εικόνα 5. Δομές φωσφολιπιδίων.

Τα λιποσώματα όμως χρησιμοποιούνται επιτυχώς και ως μέσα ακινητοποίησης και σταθεροποίησης πρωτεϊνών και ενζύμων. Τα ένζυμα όταν εισέρχονται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων παραμένουν ελεύθερα μέσα σε ένα περιορισμένο χώρο χωρίς να μεταβάλλεται η διαμόρφωση τους. Μάλιστα το μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο βρίσκονται είναι αρκετά βιοσυμβατό καθώς είναι παρόμοιο με αυτό εντός των βιολογικών κυτταρικών μεμβρανών. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων και της μεμβράνης του λιποσώματος σταθεροποιεί τη διαμόρφωση των ενζύμων³⁷. Επιπλέον τα ενθυλακωμένα ένζυμα προστατεύονται από προσβολή από εξωτερικούς παράγοντες (πρωτεάσες).

Κατά την ενθυλάκωση μικρής συγκέντρωσης του ενζύμου ακετυλχολινεστεράση σε λιποσώματα παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο είναι πολύ πιο σταθερό από ότι όταν είναι ελεύθερο σε διάλυμα³⁸. Παράλληλα όμως πολλά άλλα ένζυμα έχει αποδειχτεί ότι σταθεροποιούνται κατά την ενθυλάκωση τους μέσα σε λιποσώματα³⁵. Η παρουσία λιποσωμάτων μάλιστα, πολλές φορές μπορεί να συμβάλλει στην επαναδιάταξη ενζύμων που έχουν αποδιαταχτεί³⁹.

Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι η ενθυλάκωση ενζύμων μέσα σε λιποσώματα δίνει τη δυνατότητα στα ένζυμα να βρίσκονται σε ένα περιβάλλον που μοιάζει αρκετά με το φυσικό τους περιβάλλον και παράλληλα οι διαστάσεις του λιποσώματος είναι ιδανικές σύμφωνα πάντα με το προαναφερθέν μοντέλο.

6. ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYMΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η σταθεροποίηση ενζύμων σε νανοδομές και συγκεκριμένα σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και σε λιποσώματα.

Αρχικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να εξεταστεί η αλληλεπίδραση των ενζύμων με τις υπό εξέταση νανοδομές και τα προκαταρκτικά αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται παρακάτω. Η παρακολούθηση των ενζυμικών αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροχημικές και φασματοφωτομετρικές μεθόδους.

6.1 Σταθεροποίηση ενζύμων σε πορώδη πυριτικά υποστρώματα

Μία αρχική μελέτη όσον αφορά στη σταθεροποίηση ενζύμων σε σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου με πόρους διαμέτρου 10nm πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης. Το ένζυμο ακινητοποιείται στα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και η δραστηριότητα του προσδιορίζεται ηλεκτροχημικά μέσω της αμπερομετρικής μεθόδου.

6.1.1 Κατασκευή βιοαισθητήρα οξειδάσης της γλυκόζης με πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου.

Η προσρόφηση του ενζύμου στα σφαιρίδια επιτυγχάνεται με προσθήκη 0.5g/mL σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου σε διάλυμα του ενζύμου 50mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M pH 6.0. Το εναιώρημα αναδεύεται για 24h στους 4° C. Ακολουθεί διήθηση του διαλύματος με φίλτρα 0.2 μm, διαδοχική έκπλυση των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου με ρυθμιστικό διάλυμα και ξήρανσή τους σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια με την προσροφημένη οξειδάση της γλυκόζης ακινητοποιούνται σε ηλεκτρόδιο πλατίνας με τη βοήθεια μίας Nafion μεμβράνης. Το διάλυμα Nafion (ρητίνη σε 5% διάλυμα αλκοολών μικρού μοριακού βάρους με 15-20% H₂O) αραιώνεται με αιθανόλη 98% σε τελική συγκέντρωση 1%, και το pH ρυθμίζεται στο 5.5 με NaOH. Έπειτα αναμιγνύονται τα σφαιρίδια με το διάλυμα Nafion 1% (10mg/mL) και 10μL του τελικού διαλύματος εναποτίθενται στην επιφάνεια ηλεκτροδίου πλατίνας (d = 5.9mm). Σε χρονικό διάστημα μίας ώρας παρατηρείται πλήρης εξάτμιση του διαλύτη και σχηματίζεται μία λεπτή μεμβράνη

στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Ακολουθεί έκπλυση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με ρυθμιστικό διάλυμα.

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία παρασκευάζεται ένα ακόμα ηλεκτρόδιο, στο οποίο όμως η οξειδάση της γλυκόζης ακινητοποιείται απευθείας στην επιφάνεια πλατίνας με Nafion μεμβράνη. Το ένζυμο διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M pH 6.0 στην επιθυμητή συγκέντρωση και προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα Nafion 1%. Η περιεκτικότητα του μίγματος σε νερό είναι 10%. Η GOx-Nafion μεμβράνη σχηματίζεται με την προσθήκη 10μL του μίγματος στην επιφάνεια ενός ίδιου ηλεκτροδίου πλατίνας.

6.1.2 Συνθήκες μέτρησης

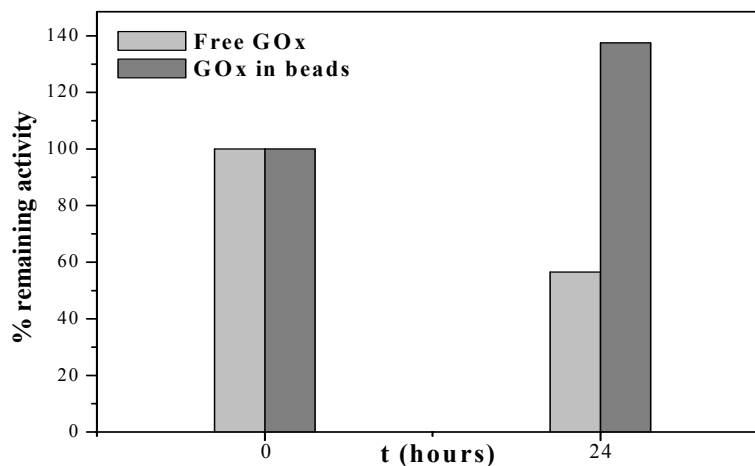
Τα δύο ηλεκτρόδια εξετάζονται ως προς την απόκριση τους στη γλυκόζη με τη μέθοδο της αμπερομετρίας. Για όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιείται σύστημα τριών ηλεκτροδίων, που αποτελείται από το ηλεκτρόδιο εργασίας (βιοαισθητήρας), το ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου (Pt). Τα τρία ηλεκτρόδια εμβαπτίζονται σε σταθερό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος και εφαρμόζεται στο σύστημα σταθερό δυναμικό +0.8V. Ακολουθούν προσθήκες συγκεκριμένης ποσότητας υποστρώματος γλυκόζης και σε όλη τη διάρκεια του πειράματος καταγράφεται το ρεύμα. Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή στους 25° C με τη βοήθεια θερμοστατούμενου υδρόλουτρου.

6.1.3 Αποτελέσματα

Εξετάστηκε η σταθερότητα και των δύο συστημάτων, με ή χωρίς πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου, υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας, παρακολουθώντας την ευαισθησία των αντίστοιχων βιοαισθητήρων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν φαίνονται στο γράφημα 6. Στην περίπτωση του βιοαισθητήρα χωρίς τα σφαιρίδια η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται κατά 43.5% μετά από 24 ώρες συνεχούς λειτουργίας. Ωστόσο, όταν το ένζυμο είναι προσροφημένο σε σφαιρίδια, όχι μόνο δεν παρατηρείται μείωση της ενεργότητας του, αλλά αντίθετα παρουσιάζεται μία αύξηση στην ενεργότητα του κατά 37.5%, μετά από 24 ώρες συνεχούς λειτουργίας του αντίστοιχου βιοαισθητήρα.

Η αύξηση που παρατηρείται στην ενεργότητα της οξειδάσης της γλυκόζης αποτελεί ένα γνωστό γενικά φαινόμενο που αποδίδεται σε αλλαγές στην τριτοταγή δομή του ενζύμου μέσα σε πορώδη υποστρώματα⁴⁰. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι

όταν το ένζυμο βρίσκεται μέσα στα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου είναι πιο σταθερό σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο.



Εικόνα 6. Ενεργότητα της ελεύθερης οξειδάσης της γλυκόζης (GOx) και της ακινητοποιημένης GOx σε σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου, σε συνάρτηση με το χρόνο κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας του αντίστοιχου βιοαισθητήρα (0.8V vs Ag/AgCl).

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν φαίνεται γενικά να συμφωνούν με το θεωρητικό μοντέλο που περιγράφηκε παραπάνω για τη σταθεροποίηση ενζύμων σε υλικά με πόρους σφαιρικού σχήματος και μεγέθους της τάξης των nm. Οι πρώτες αυτές θετικές ενδείξεις θέτουν τη βάση για περαιτέρω μελέτη του συστήματος.

6.2 Σταθεροποίηση ενζύμων σε λιποσώματα

Προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητα των ενζύμων μέσα στα λιποσώματα και με στόχο να αξιοποιηθούν τα συστήματα λιποσωμάτων-ενζύμων για την ανάπτυξη βελτιστοποιημένων βιοαισθητήρων, εξετάστηκε η ενθυλάκωση του ενζύμου ακετυλχολινεστεράση σε λιποσώματα. Η μελέτη των λιποσωμάτων πραγματοποιείται σε συνεργασία με τον καθηγητή Didier Fournier του πανεπιστημίου Paul Sabatier, της Τουλούζης στη Γαλλία.

6.2.1 Παρασκευή λιποσωμάτων

Αρχικά διαλύονται 5mg φωσφατιδυλοχολίνης σε 100μL ρυθμιστικού διαλύματος μονόξινων και δισόξινων φωσφορικών 25mM pH 7.0. Στο διάλυμα προστίθενται 100μL ακετυλχολινεστεράσης (200Units περίπου). Ακολουθεί διαδοχική ψύξη και τήξη του διαλύματος τοποθετώντας το για 5s σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια για 30s σε υδρόλουτρο στους 37°C. Πραγματοποιούνται 50 κύκλοι⁴¹ ψύξης και τήξης του μίγματος ενώ μετά από κάθε κύκλο το μίγμα αναδεύεται καλά. Κατά την ψύξη του διαλύματος η μεμβράνη των σχηματιζόμενων λιποσωμάτων σπάει σε ορισμένα σημεία λόγω της διόγκωσης του νερού στο εσωτερικό τους. Στη συνέχεια κατά τη διαδικασία της τήξης, η μεμβράνη των λιποσωμάτων επανασχηματίζεται, εγκλωβίζοντας διάλυμα με ακετυλχολινεστεράση. Έτσι με τη διαδοχική ψύξη-τήξη του μίγματος, επιτυγχάνεται η εισαγωγή της ακετυλχολινεστεράσης στο εσωτερικό των λιποσωμάτων. Στη συνέχεια, το μίγμα αραιώνεται σε τελικό όγκο 1mL με ρυθμιστικό διάλυμα και περνάει από νάυλον φίλτρο 0.2μm δέκα φορές τουλάχιστον. Με τη διήθηση του διαλύματος τα λιποσώματα μεγάλου μεγέθους σπάνε και τελικά σχηματίζονται λιποσώματα με παρόμοιο μέγεθος χωρίς απώλεια ενζύμου.

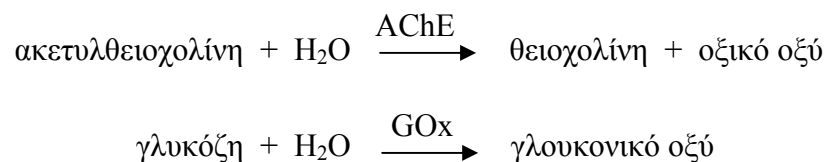
Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία παρασκευής λιποσωμάτων προκύπτουν δομές με μία μόνο λιπιδική διπλοστοιβάδα⁴². Το μέγεθος των λιποσωμάτων με το ένζυμο προσδιορίστηκε με δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering) (Εργαστήριο Σκέδασης Φωτός, ΙΤΕ, Α. Κ. Ρίζος). Παρατηρήθηκε μία ομοιομορφία στο μέγεθος των λιποσωμάτων και η διάμετρος τους βρέθηκε περίπου 300nm.

Το ποσοστό της AChE που εγκλωβίζεται στα λιποσώματα υπολογίζεται με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Ellman⁴³. Συγκρίνεται η αρχική ενεργότητα του ενζύμου (πριν την ανάμιξη του με τα λιποσώματα) και η ενεργότητα του ενζύμου που δεν εγκλωβίστηκε στα λιποσώματα αλλά παρέμεινε ελεύθερο στο διάλυμα. Η μέτρηση της ενεργότητας της AChE βασίζεται στην παρακολούθηση της κινητικής της αντίδρασης της με το υπόστρωμα ακετυλθειοχολινιωδίδιο (ACThI). Κατά την αντίδραση της AChE με ACThI παράγεται οξικό οξύ και θειοχολίνη. Η θειοχολίνη στη συνέχεια αντιδρά με το διθειονιτροβενζοϊκό οξύ που περιέχεται στο αντιδραστήριο Ellman και παράγεται ένα προϊόν που απορροφά στα 412nm. Από την κλίση της καμπύλης της απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο προσδιορίζεται η

ενεργότητα του ενζύμου ($\text{Abs min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή βρέθηκε ότι το 20% της AChE εγκλωβίζεται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων.

6.2.2 Τρόποι Ανίχνευσης

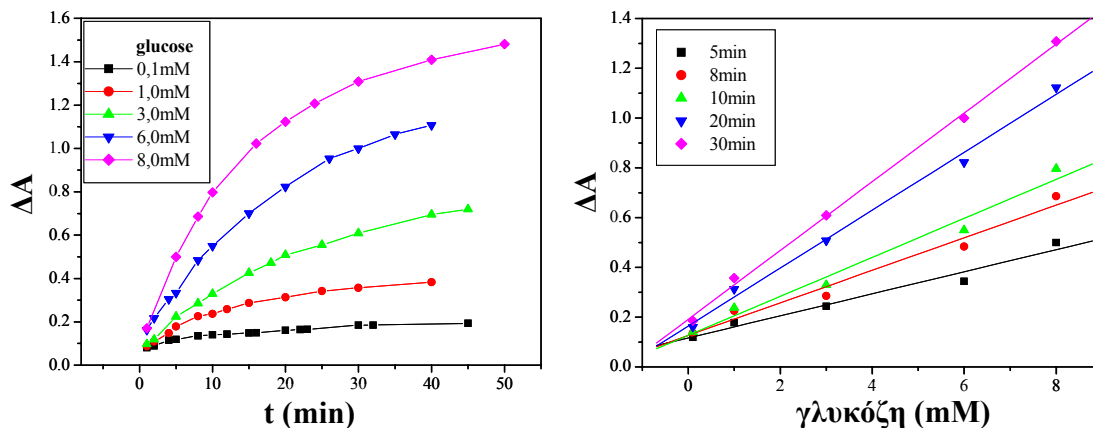
Η παρακολούθηση των ενζυμικών αντιδράσεων βασίζεται συνήθως στην ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων. Όταν τα προϊόντα αυτά είναι οξέα, τότε μεταβάλλεται η τιμή του pH του διαλύματος και είναι εφικτή η ανίχνευση της συγκέντρωσης του υποστρώματος του ενζύμου μέσω της μεταβολής στην τιμή του pH. Οι καταλυτικές αντιδράσεις των ενζύμων ακετυλχολινεστεράση και οξειδάση της γλυκόζης αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα ενζυμικών αντιδράσεων όπου μεταβάλλεται το pH. Η ακετυλχολινεστεράση (AChE) καταλύει την υδρόλυση της ακετυλθειοχολίνης προς θειοχολίνη και οξικό οξύ ενώ η οξειδάση της γλυκόζης (GOx) την οξειδωση της γλυκόζης προς γλουκονικό οξύ.



Τα παραγόμενα οξέα μεταβάλλουν τοπικά το pH του διαλύματος. Η ανίχνευση του pH μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω ενός ηλεκτροδίου pH είτε μέσω δεικτών, που είναι ευαίσθητοι σε μεταβολές του pH. Στην παρούσα εργασία, που στόχος είναι η παρακολούθηση ενζυμικών αντιδράσεων μέσα σε λιποσώματα, προτιμάται η χρήση οπτικών και φθορισμομετρικών δεικτών.

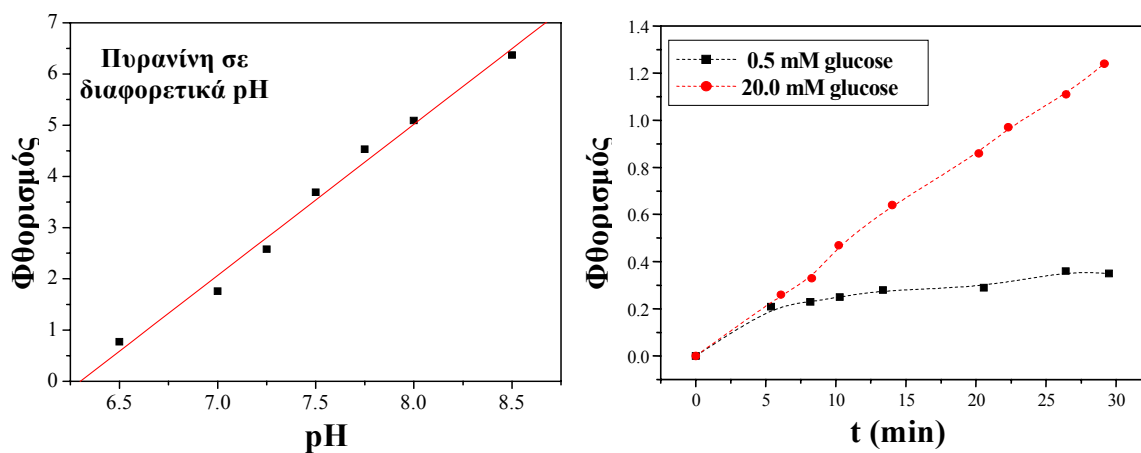
Δύο δείκτες, ένας οπτικός και ένας φθορισμομετρικός, εξετάστηκαν για να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα μέτρησης τοπικών μεταβολών του pH σε διάλυμα.

Αρχικά μελετήθηκε ο οπτικός δείκτης μπλε της βρωμοθυμόλης που είναι ευαίσθητος σε μεταβολές του pH σε εύρος 6.0-7.6 και απορροφά στο ορατό στα 620nm. Σε διάλυμα του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM pH=7.8, προστίθεται 1%w/v δείκτης και μετά την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος καταγράφεται η μεταβολή της απορρόφησης στα 620nm συναρτήσει του χρόνου (εικόνα 7A). Όπως φαίνεται στην εικόνα 7B υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής της απορρόφησης και της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



Εικόνα 7. Μεταβολή της απορρόφησης του δείκτη μπλε της βρωμοθυμόλης στα 620nm A) σε συνάρτηση με το χρόνο για διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης. B) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης για διαφορετικούς χρόνους.

Για τη φθορισμομετρική ανίχνευση χρησιμοποιείται ο δείκτης πυρανίνη του οποίου η δομή φαίνεται στην εικόνα 10. Η πυρανίνη χρησιμοποιείται σε ουδέτερα pH, έχει $pK_a=7.3$ και τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής της είναι τα 460nm και 513nm. Μείωση του pH προκαλεί ελάττωση στο σήμα φθορισμού της πυρανίνης. Μάλιστα, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του δείκτη στις αλλαγές του pH είναι δυνατή η ανίχνευση πολύ μικρών αλλαγών στο pH όπως φαίνεται στην εικόνα 8A.



Εικόνα 8. A) Εξασθένιση έντασης φθορισμού της πυρανίνης με μείωση του pH.

B) Μεταβολή της έντασης φθορισμού της πυρανίνης σε συνάρτηση με το χρόνο για διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης.

Ο συγκεκριμένος δείκτης προστέθηκε σε ενζυμικό διάλυμα (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM pH 7.8) και εξετάστηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, 0.5mM και 20mM. Στην εικόνα 8B παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της μεταβολής της έντασης φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο. Παρατηρείται ότι στο πολύ μικρό χρονικό διάστημα των 10min, η διαφορά στο σήμα φθορισμού για τις δύο συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι αρκετά μεγάλη. Επομένως το σύστημα διαθέτει την επιθυμητή ευαισθησία.

7. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η δυνατότητα ακινητοποίησης και σταθεροποίησης ενζύμων σε νανοπορώδη υποστρώματα-νανοδομές και συγκεκριμένα σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και σε λιποσώματα. Σύμφωνα με θεωρητικά μοντέλα, κατά την παγίδευση ενζύμων σε κοιλότητες σφαιρικού σχήματος και μεγέθους παρόμοιου με το μέγεθος του ενυδατωμένου ενζύμου, μειώνεται η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης του ενζύμου και κατά συνέπεια αυξάνεται η σταθερότητα του. Επιβεβαίωση αυτού του μοντέλου θα συμβάλλει στην αντιμετώπιση των προβλημάτων που συναντώνται στις κλασικές μεθόδους ακινητοποίησης των ενζύμων. Μακροπρόθεσμα η εφαρμογή των σταθεροποιημένων συστημάτων νανοδομών-ενζύμων σε βιοαισθητήρες θα επιφέρει βελτίωση στη σταθερότητά τους.

Για την επιβεβαίωση του μοντέλου σταθεροποίησης απαιτείται να ακινητοποιηθούν ένζυμα σε μια σειρά από υποστρώματα, και να εξεταστεί η σταθερότητά τους με τη χρήση ηλεκτροχημικών και οπτικών μεθόδων. Ορισμένα πειράματα που θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν για το σκοπό αυτό αναφέρονται παρακάτω.

7.1 Πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου

Τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά πάνω στα οποία μπορεί να στηριχθεί η ακινητοποίηση και σταθεροποίηση των ενζύμων. Η ευκολία δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των επιφανειακών ενεργών ομάδων του διοξειδίου του πυριτίου, μαζί με την πολύ καλή κατανομή μεγέθους των νανοπόρων αυτών των υλικών, είναι ορισμένα από τα σημαντικά χαρακτηριστικά τους.

7.1.1. Ακινητοποίηση *GOx* και *AChE* σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου

Τόσο η οξειδάση της γλυκόζης όσο και το ευαίσθητο ένζυμο ακετυλχολινεστεράση μπορούν να ακινητοποιηθούν σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου που έχουν διάμετρο πόρων 10nm. Βελτιστοποίηση των συνθηκών ακινητοποίησης μπορεί να πραγματοποιηθεί εξετάζοντας διάφορες παραμέτρους όπως είναι το pH και η συγκέντρωση του ενζύμου.

7.1.2. Σταθερότητα GOx και AChE στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου

Προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητα και των δύο ενζύμων στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου, τα σφαιρίδια με το ένζυμο πρέπει να ακινητοποιηθούν σε ηλεκτρόδια πλατίνας και αμπερομετρικά να παρακολουθείται η ευαισθησία των βιοαισθητήρων. Η σταθερότητα του συστήματος τόσο κατά την αποθήκευση όσο και υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας μπορούν να εξεταστούν.

7.1.3. Μελέτη σταθερότητας ενζύμων σε νανοπορώδη/μεσοπορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου

Για να επιβεβαιωθεί ότι η αντιστοιχία στο μέγεθος του ενυδατωμένου ενζύμου (περίπου 10nm) και της διαμέτρου των πόρων των σφαιριδίων (10nm) είναι καθοριστικής σημασίας για την αποτελεσματική σταθεροποίηση των ενζύμων, μπορούν να πραγματοποιηθούν αντίστοιχα πειράματα με μεσο-πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και να συγκριθούν τα αποτελέσματα.

7.1.4. Μελέτη εκρόφησης ενζύμων από τα πυριτικά υποστρώματα

Παράλληλα είναι δυνατό να εξεταστεί τόσο στα νανο-πορώδη όσο και στα μεσο-πορώδη σφαιρίδια ο ρυθμός εκρόφησης του ενζύμου προς το διάλυμα, παράμετρος που πολύ συχνά συναντάται στην προσρόφηση μορίων σε στερεά υποστρώματα. Η ποσότητα του ενζύμου που διαρρέει προς το διάλυμα υπολογίζεται βάσει της απορρόφησής του στα 280nm.

Αναμένεται ότι η ακινητοποίηση ενζυμικών μορίων στα νανο-πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου θα παρέχει μεγαλύτερη σταθερότητα στα ένζυμα και θα εμποδίζει τη διαρροή τους προς το διάλυμα.

7.2 Λιποσώματα

Οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες των λιποσωμάτων περιβάλλουν ένα εσωτερικό υδατικό διαμέρισμα που μοιάζει με το φυσικό περιβάλλον των ενζύμων, εντός των κυττάρων. Έτσι τα ένζυμα εμφανίζουν αυξημένη σταθερότητα εντός των λιποσωμάτων. Παράλληλα οι οπτικές ιδιότητες των λιποσωμάτων (είναι διαπερατά στο φως) και η δυνατότητα ρύθμισης του μεγέθους τους τα καθιστά κατάλληλα για τη χρήση τους σε συστήματα βιοαισθητήρων.

7.2.1. Ενθυλάκωση GOx και AChE σε λιποσώματα

Περαιτέρω είναι δυνατό να εξεταστεί η εισαγωγή της ακετυλχολινεστεράσης αλλά και της οξειδάσης της γλυκόζης στο εσωτερικό των λιποσωμάτων. Η πειραματική διαδικασία για την ενθυλάκωση της AChE είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω. Είναι απαραίτητο να μελετηθούν λεπτομερώς οι βέλτιστες συνθήκες ενθυλάκωσης της οξειδάσης της γλυκόζης σε αυτά τα υλικά. Συγκεκριμένα πρέπει να εξεταστούν η σύσταση και η συγκέντρωση των λιπιδίων που σχηματίζουν το λιπόσωμα, ο αριθμός των κύκλων τήξης και ψύξης καθώς και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος. Το μέγεθος των λιποσωμάτων μπορεί να προσδιοριστεί με δυναμική σκέδαση φωτός. Το ποσοστό της GOx που εγκλωβίζεται στα λιποσώματα μπορεί να υπολογιστεί με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Trinder⁴⁴. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, κατά την αντίδραση της GOx με γλυκόζη παράγεται υπεροξείδιο και μέσω του αντιδραστηρίου trinder (4-αμινοαντιπυρίνη, 4-φαίνυλο-σουλφονικό οξύ, Horse Radish peroxidase) μετράται η απορρόφηση του παραγόμενου υπεροξειδίου στα 505nm. Το ένζυμο που δεν εισέρχεται στο λιπόσωμα και βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα, είναι δυνατό να απομακρυνθεί είτε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού είτε εισάγοντας στο διάλυμα πρωτεάσες που αποικοδομούν το ένζυμο.

7.2.2. Σταθεροποίηση λιποσωμάτων

α) Πολυαιθυλενογλυκόλη

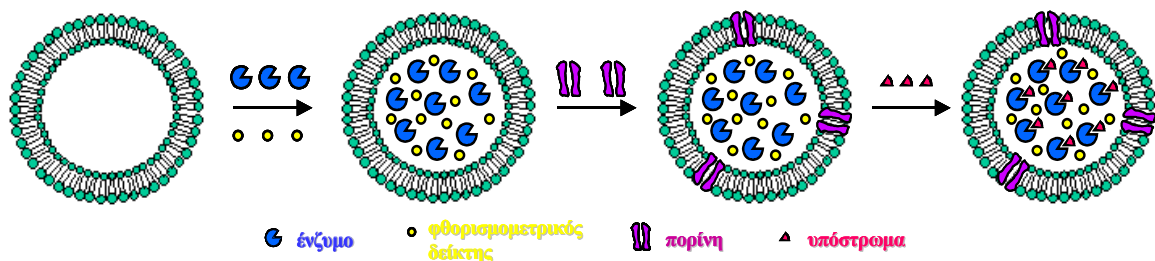
Όταν τα λιποσώματα βρίσκονται σε διάλυμα πολλές φορές εμφανίζουν την τάση να συσσωματώνονται με αποτέλεσμα να καθιζάνουν. Για το λόγο αυτό, συχνά προστίθενται πολικά μόρια στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης ώστε τα λιποσώματα να εμφανίζουν ομοιόμορφη κατανομή σε υδατικά διαλύματα. Εισάγοντας πολυαιθυλενογλυκόλη στη διπλοστοιβάδα των λιποσωμάτων έχει βρεθεί ότι αυξάνεται σημαντικά ο χρόνος κυκλοφορίας τους στο αίμα⁴⁵. Επομένως τα λιποσώματα μπορούν να τροποποιηθούν επιφανειακά με πολυαιθυλενογλυκόλη ώστε να περιοριστεί η καταβύθιση τους.

β) Μεθακρυλικό

Η μεμβράνη των λιποσωμάτων δεν είναι πολύ σταθερή. Για να αποφευχθεί η απώλεια του εγκλωβισμένου ενζύμου προτείνεται η σταθεροποίηση της με πολυμερή. Τα πολυμερή αυτά σχηματίζονται από υδρόφοβα μονομερή που ενσωματώνονται στη μεμβράνη των λιποσωμάτων και σχηματίζουν πιο σταθερές και συμπαγείς διπλοστοιβάδες. Συγκεκριμένα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υδρόφοβο μονομερές μεθακρυλικό που πολυμερίζεται στο εσωτερικό της μεμβράνης των λιποσωμάτων με ακτινοβολία UV⁴⁶. Με τη διαδικασία αυτή σχηματίζεται ένα δισδιάστατο πολυμερικό πλέγμα στο εσωτερικό της μεμβράνης που συμβάλλει στη σταθεροποίηση της.

7.2.3. Εισαγωγή πορινών στα λιποσώματα

Στη μεμβράνη των λιποσωμάτων υπάρχει δυνατότητα παγίδευσης πορινών για τη ρύθμιση της εισαγωγής ή απομάκρυνσης του υποστρώματος (εικόνα 9). Οι πορίνες είναι σταθερές πρωτεΐνες που εντοπίζονται στις μεμβράνες των βακτηρίων και λειτουργούν ως κανάλια εισαγωγής και απομάκρυνσης υδρόφιλων μορίων μικρού μοριακού βάρους (μέχρι 400Da.). Ορισμένες πορίνες παρουσιάζουν εξειδίκευση επιτρέποντας τη διέλευση συγκεκριμένων μορίων ή ομάδων μορίων.



Εικόνα 9. Η εισαγωγή πορινών στη μεμβράνη των λιποσωμάτων επιτρέπει τη διέλευση των υποστρωμάτων των ενζύμων.

Η πορίνη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα είναι η OmpF. Η πορίνη αυτή απομονώνεται από την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων *Escherichia coli*⁴⁷.

7.2.4. Φθορισμομετρική ανίχνευση

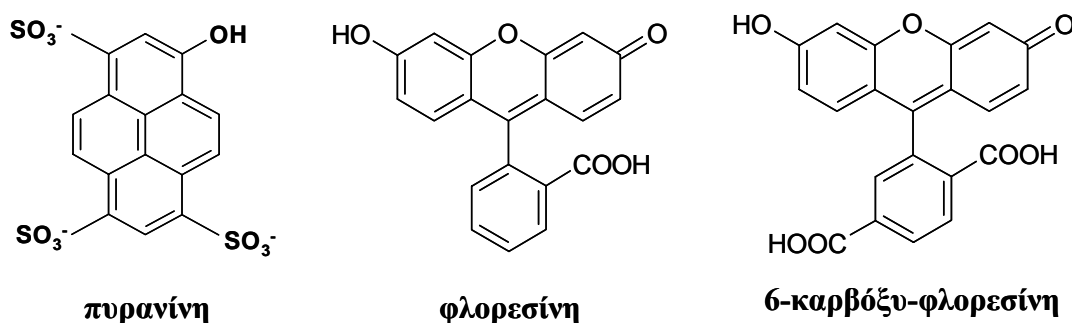
Οι φθορισμομετρικές μέθοδοι εμφανίζουν πολύ μεγάλη ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης. Για το λόγο αυτό η ανίχνευση του ενζύμου στο εσωτερικό

των λιποσωμάτων είναι βέλτιστο να πραγματοποιηθεί μέσω φθορισμομετρικών δεικτών ή φθορισμομετρικών υποστρωμάτων. Η ανάπτυξη ενός ευαίσθητου συστήματος φθορισμομετρικής ανίχνευσης, όπου το ένζυμο θα είναι σταθεροποιημένο μέσα σε λιποσώματα μπορεί να οδηγήσει σε ένα βιοαισθητήρα με αυξημένη σταθερότητα και βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά.

α) Φθορισμομετρικοί δείκτες

Είναι δυνατό να εξεταστούν διάφοροι φθορισμομετρικοί δείκτες για να βρεθεί ο καταλληλότερος και πιο ευαίσθητος στα συστήματα λιποσώματος-ενζύμου. Οι δείκτες αυτοί είναι ευαίσθητοι σε μεταβολές του pH. Αρχικά μπορεί να μελετηθεί η πυρανίνη που χαρακτηριστικό της είναι ότι δε διαπερνά τις μεμβράνες και είναι αρκετά ευδιάλυτη στο νερό. Γι' αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των μεταβολών του pH στο εσωτερικό των βακτηρίων *E.coli*⁴⁸.

Παράλληλα είναι δυνατόν να εξεταστεί ο φθορισμομετρικός δείκτης φλορεσίνη (fluorescein) που είναι ευαίσθητος σε μεταβολές του pH μεταξύ 6.0-7.2. Η φλορεσίνη περιέχει μια υδροξυλομάδα και μία καρβοξυλομάδα που είναι πλήρως ιονισμένες σε pH = 9.0 (διανιόν). Σε χαμηλότερα pH η φαινόλη πρωτονιώνεται και προκύπτει το μονοανιόν. Οι δύο αυτές μορφές της φλορεσίνης φθορίζουν. Επίσης μπορεί να εξεταστεί και το παράγωγο 6-καρβοξυ-φλορεσίνη που έχει επιπλέον αρνητικό φορτίο και δε διαπερνά τις μεμβράνες τόσο εύκολα όσο η φλορεσίνη.



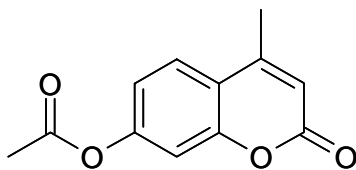
Εικόνα 10. Δομές φθορίζοντων δεικτών.

Τέλος μπορούν να μελετηθούν τα φθορίζοντα παράγωγα της κονκαναβαλίνης A, όπως είναι αυτό με τη φλορεσίνη. Η κονκαναβαλίνη A έχει την ιδιότητα να δεσμεύει σάκχαρα. Έτσι η παρουσία σακχάρων στην επιφάνεια των ενζύμων, όπως για

παράδειγμα στην γλυκοπρωτεΐνη GOx, παρέχει τη δυνατότητα άμεσης πρόσδεσης του φθορισμομετρικού δείκτη πάνω στο ένζυμο.

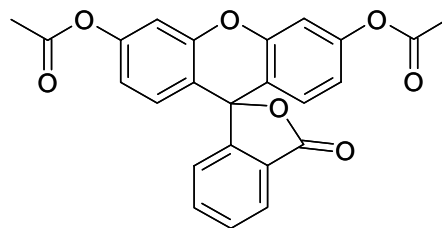
β) Φθορισμομετρικά υποστρώματα

Μία εναλλακτική μέθοδος παρακολούθησης της ενζυμικής αντίδρασης είναι να χρησιμοποιηθούν φθορίζοντα υποστρώματα που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τη μεμβράνη των λιποσωμάτων. Το υπόστρωμα είναι δυνατό να περνάει στο εσωτερικό του λιποσώματος όπου βρίσκεται το ένζυμο. Εκεί μπορεί να αντιδρά με το ένζυμο και να παράγεται ένα επίσης φθορίζον προϊόν το οποίο θα εκπέμπει ακτινοβολία σε διαφορετικό μήκος κύματος από το υπόστρωμα. Έτσι, σταδιακά θα παρατηρείται μείωση στην ένταση του φθορισμού του αντιδρώντος υποστρώματος και αύξηση στην ένταση του φθορισμού του σχηματιζόμενου προϊόντος. Ορισμένα υποστρώματα της ακετυλχολινεστεράσης με αυτές τις ιδιότητες είναι η διακετόξυ-φλορεσίνη (fluorescein diacetate), και η 7-ακετόξυ-4-μεθυλοκουμαρίνη (7-acetoxy-4-



7-ακετόξυ-4-μεθυλοκουμαρίνη

methyl coumarin) (εικόνα 11).



Διακετόξυ-φλορεσίνη

Εικόνα 11. Δομές φθορίζοντων υποστρωμάτων της ακετυλχολινεστεράσης.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Hulanicki, S. Glab and F. Ingman, IUPAC Discussion paper, Commission, V.I., July 1989.
- ² Théveton D.R., Toth K., Durst R.A. and Wilson G.S., *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, 16, 121.
- ³ Théveton D.R., Toth K., Durst R.A. and Wilson G.S., *Pure & Appl. Chem.*, **1999**, 71, 2333.
- ⁴ Weetall H.H., *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, 14, 237.
- ⁵ Perdomo J., Sundermeier C., Hinkers H., Martvnez M.O., Seifert W. and Knoll M., *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, 14, 27.
- ⁶ Copeland R.A., *Enzymes-A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, Wiley-VCH, Inc., **1996**.
- ⁷ Stryer L., Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **1997**.
- ⁸ Fágáin C.Ó., *Biochimica et Biophysica Acta*, **1995**, 1252, 1.
- ⁹ Illanes A., *Electr. J. Biotechn.*, **1999**, 2, 7.
- ¹⁰ Drauz K. and Waldmann H., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Inc., **2002**, Vol 1, 2nd edition.
- ¹¹ Klibanov A.M, *Trends in Biotechn.*, **1997**, 15, 97.
- ¹² Fersht A., *Structure and Mechanism in Protein Science-A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W.H. Freeman and Company, **1999**, New York.
- ¹³ Lee B. and Vasmatzis G., *Cur. Opin. Biotechn.*, **1997**, 8, 423.
- ¹⁴ Querol E., Perez-Pons J.A. and Mozo-Villarias A., *Prot. Eng.*, **1996**, 9, 265.
- ¹⁵ Fágáin C.Ó., *Enzyme and Microbial Technology*, **2003**, 33, 137.
- ¹⁶ Chaniotakis N.A., *Anal. Bioanal. Chem.*, submitted.
- ¹⁷ Dimakis V.T., Gavalas V.G. and Chaniotakis N.A., *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 467, 217.
- ¹⁸ Gibson T.D., Hulbert J.N., Parker S.M., Woodward J.R. and Higgins I.J., *Biosens Bioelectron*, **1992**, 7, 701.
- ¹⁹ Gavalas V.G. and Chaniotakis N.A., *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 427, 271.
- ²⁰ Eggins B.R., *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, **2002**.
- ²¹ Zhou H-X, Dill K.A., *Biochemistry*, **2001**, 40(38), 11289.
- ²² Klimov D.K., Newfield D. and Thirumalai D., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, 99, 8019.
- ²³ Gavalas V.G, Chaniotakis N.A, (2000) *Anal. Chim. Acta* 404:67-73
- ²⁴ Gavalas V.G, Chaniotakis N.A., *Microchim. Acta*, **2001**, 136, 211.
- ²⁵ Sotiropoulou S., Fournier D. and Chaniotakis N.A., *Anal. Chem.*, submitted.
- ²⁶ Sotiropoulou S., Gavalas V., Vamvakaki V. and Chaniotakis N.A., *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 18, 211.
- ²⁷ Gavalas V.G., Chaniotakis N.A., *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 409, 131.
- ²⁸ Sotiropoulou S., Chaniotakis N.A., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 375(1):103.

-
- ²⁹ Tsang S.C., Davis J.J., Green M., Hill A., Leung Y.C. and Sadler P.J., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1803
- ³⁰ Tsang S.C., Guo Z., Chen Y.K., Green M., Hill A., Hambley T.W. and Sadler P.J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 2198.
- ³¹ Thomas J.M., *Nature*, **1994**, 368, 289.
- ³² Takahashi H., Li B., Sasaki T., Miyazaki C., Kajino T. and Inagaki S., *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 3301.
- ³³ Eggers D.K, Valentine J.S, (2001) *Protein Sci.* 10:250-261
- ³⁴ Lei C., Shin Y., Liu J. and Ackerman E.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 11242.
- ³⁵ Walde P. and Ichikawa S., *Biomolecular Engineering*, **2001**, 18, 143.
- ³⁶ Drummond D.C., Zignani M. and Leroux J.C., *Progress in Lipid Research*, **2000**, 39, 409.
- ³⁷ Han X., Li G. and Lin K., *Biochemistry*, **1998**, 37, 10730.
- ³⁸ Nasseau M., Boublik Y., Meier W., Winterhalter M. and Fournier D., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, 75, 615.
- ³⁹ Zardeneta G. and Horowitz P.M., *Analytical Biochemistry*, **1994**, 223, 1.
- ⁴⁰ Khan G.F, Wernet W., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2682.
- ⁴¹ Chaise B., Winterhalter M. and Didier F., *BioTechniques*, **2003**, 34, 1158.
- ⁴² Colletier J.P., Chaise B., Winterhalter M. and Didier F., *BMC Biotechnology*, **2002**, 2, 9.
- ⁴³ Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr. and Featherstone R.M., *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88.
- ⁴⁴ Appleton A., Gibson T.D. and Woodward J.R., *Sensors & Actuators B*, **1997**, 43, 65.
- ⁴⁵ Papahadjopoulos D., Allen T.M., Gabizon A., Mayhew E., Matthay K., Huang S.K., Lee K.D., Woodle M.C., Lasic D.D., Redemann C. and Martin F.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, 11460.
- ⁴⁶ Graff A., Winterhalter M. and Meier W., *Langmuir*, **2001**, 17, 919.
- ⁴⁷ Saint N., Windmer C., Luckey M., Schirmer T. and Rosenbuch J.P., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 20676.
- ⁴⁸ Damiano E., Bassilana M., Rigaud J.L. and Leblanc G., *FEBS Letters*, **1984**, 166, 120.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2001-2004:** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ν. Χανιωτάκη, με θέμα «NANOΔΟΜΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ».
- 1997-2001:** Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βαθμός πτυχίου 8.08 (Λίαν καλώς).
- 1993-1996:** Τέταρτο Γενικό Λύκειο Χανίων, Βαθμός απολυτηρίου 18 και 1/10.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ερευνητική Εμπειρία

- 03-09/2003:** Πανεπιστήμιο Kentucky. Lexington. Αμερική. Εργαστήριο Αναλυτικής Βιοχημείας. Μελέτη της απομόνωσης της Glucose Binding Protein (GBP) και ανάπτυξη GBP αισθητήρα. Υπεύθυνη Καθηγήτρια κ. S. Daunert.
- 2000-2001:** Διπλωματική εργασία στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ν. Χανιωτάκη, με θέμα «Μελέτη βελτιστοποίησης βιοαισθητήρων βασισμένων στα ένζυμα Τυροσινάση και Οξειδάση της Γλυκόζης». Βαθμός διπλωματικής 10/10.

Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα

- 2003-2004:** Πρόγραμμα Ηράκλειτος του Υπουργείου Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων («Σταθεροποίηση βιομορίων σε

νανοδομές για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων”, Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. ΙΙ).

2001-2003: Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα SAFEGARD (“Sensor Arrays for Environmental, Generic and Routine Detection of Pesticides”, European Commission Research Contract No.QLK3-CT-2000-000481).

Διδακτική Εμπειρία

01-12/2001: Βοηθός στα Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας Ι και ΙΙ. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνος κ. Ι. Σαριδάκης.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Novel Carbon Materials in Biosensor Systems. S. Sotiropoulou, V. Gavalas, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosensors & Bioelectronics*, **2003**, 18, 211-215.
2. Stabilization of Enzymes in Nanoporous Materials for Biosensor Applications. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosensors & Bioelectronics*, **2004**, 20, 18, 1674-1679.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Γραπτές Ανακοινώσεις

1. Recombinant Acetylcholinesterase enzyme-based activated carbon biosensor for detection of organophosphorus pesticides. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, “7th World Congress on BIOSENSORS”, Kyoto, Japan, **2002**.
2. Lowering the Detection Limit of the Acetylcholinesterase-based Pesticide Biosensor. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, D. Fournier, N. A. Chaniotakis, “EUROANALYSIS 2002”, Dortmund, Germany **2002**.

3. Detection of pesticides using a Genetically Engineered AChE-based Biosensor. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, D. Fournier, N. A. Chaniotakis, “19th National Chemistry Conference”, Iraklion, Crete, Greece, **2002**.
4. Pesticide Biosensor for Direct Environmental Analysis. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, D. Fournier, N. A. Chaniotakis, “3rd Aegean Analytical Chemistry Days”, Lesvos, Greece, **2002**.

Προφορικές Ανακοινώσεις

1. Atto - molar Detection of Organophosphorus Pesticides using a Recombinant Acetylcholinesterase – based Biosensor. N.A.Chaniotakis, S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, D. Fournier, “PITTCON 2003”, Orlando, Florida, USA, **2003**.

ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Καλή (Cambridge First Certificate)

Υπολογιστές

Γνώση και χρήση Η/Υ σε περιβάλλον Windows '98 και 2000.

Προγράμματα Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint), Origin, Corel.