

УДК 576.08 +57.084.1 +57.033

©Коллектив авторов

**ВЛИЯНИЕ L-ЛИЗИН-АЛЬФА-ОКСИДАЗЫ
ИЗ *TRICHODERMA* cf. *AUREOVIRIDE* Rifai VKMF-4268D
НА КЛЕТКИ КУЛЬТУРЫ ФЕОХРОМОЦИТОМЫ КРЫСЫ PC12**

***Е.В. Лукашева*^{1*}, *Ю.С. Рыбакова*², *Т.Н. Федорова*², *М.Г. Маклецова*^{2,3},
*А.Ю. Аринбасарова*⁴, *А.Г. Меденцев*⁴, *Т.Т. Березов*^{1,3}**

¹Российский университет дружбы народов,
ул. Миклухо-Маклая, д. 8, 117198 Москва; тел./факс: 8(495)434-04-12;
эл. почта: elena.lash@yandex.ru

²Научный центр неврологии, Москва

³Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича, Москва

⁴Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино

Оксидазы L-аминокислот (L-ААО (L-amino acid oxidases), КФ 1.4.3.2) представляют группу флавопротеинов, катализирующих окислительное дезаминирование L-альфа-аминокислот до соответствующих альфа-кетокислот, NH_3 и H_2O_2 . Чаще всего эти ферменты представляют гомодимеры с молекулярной массой 100-150 кДа, наделённые противовирусной, противогрибковой, антибактериальной и противоопухолевой активностью. Особое место среди ферментов этой группы занимает L-лизин-альфа-оксидаза (ЛО), биологическое действие которой может отличаться от действия других L-ААО, так как этот фермент преимущественно расщепляет незаменимую для человеческого организма аминокислоту L-лизин, практически не действуя на другие аминокислоты. Поскольку молекулярные механизмы цитотоксического действия ЛО к настоящему времени изучены недостаточно, целью работы являлось изучение возможного механизма действия ЛО из *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai VKMF-4268D. В качестве модели использовали культуру клеток феохромоцитомы крысы PC12. Методом проточной цитометрии показана дозо-зависимая гибель клеток под действием ЛО. Увеличение внутриклеточного содержания активных форм кислорода, показанное с помощью 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина, позволяет рассматривать окислительный путь, как один из механизмов проявления цитотоксического действия фермента, что не исключают других ранее доказанных механизмов влияния ЛО на гибель клеток.

Ключевые слова: оксидаза L-аминокислот, L-лизин-альфа-оксидаза, механизм цитотоксичности, феохромоцитома PC12, активные формы кислорода.

ВВЕДЕНИЕ

Оксидазы L-аминокислот (L-ААО (L-amino acid oxidases), КФ 1.4.3.2)) представляют группу флавопротеинов, катализирующих окислительное дезаминирование L-альфа-аминокислот до соответствующих альфа-кетокислот, NH_3 и H_2O_2 . Эти ферменты, как правило, представляют гомодимеры с молекулярной массой 100-150 кДа, наделённые противовирусной, противогрибковой, антибактериальной и противоопухолевой активностью [1-12]. Особое место среди ферментов этой группы

занимают L-лизин-альфа-оксидазы (ЛО), высокоспецифичные по отношению к незаменимой аминокислоте L-лизину [1, 4, 5, 8-12]. Начало исследования ЛО, как потенциального противоопухолевого средства, базировалось на предположении, что удаление такого эссенциального фактора роста, как L-лизин, будет вызывать цитотоксический эффект [1]. Однако было обнаружено, что одновременное добавление ЛО и каталазы к культуре клеток существенно, но не полностью, снижает цитотоксическое действие ЛО [3, 4]. В связи с этим, представляло

* - адресат для переписки

интерес исследовать вклад катализируемой ЛО реакции в процесс генерации активных форм кислорода (АФК) в клетках. В качестве объекта исследования была выбрана культура клеток феохромоцитомы крысы PC12, и целью данной работы является исследование влияния очищенного ферментного препарата ЛО из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D на выживаемость опухолевых клеток PC12 и установление связи этого влияния с уровнем внутриклеточных АФК.

МЕТОДИКА

ЛО с удельной активностью 98 Е/мг белка выделена из культуры гриба *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D и очищена до гомогенного (по данным электрофореза) состояния по методу [13].

В качестве объекта исследования выбрана культура клеток феохромоцитомы крысы PC12 как модель для изучения механизма цитотоксичности ЛО (клетки PC12 любезно предоставлены И.А. Гривенниковым, заведующим лабораторией молекулярной генетики соматических клеток Института молекулярной генетики РАН). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 25 мМ NEPERES и 24 мМ бикарбоната натрия ("ПанЭко", Россия), с добавлением 2 мМ L-глутамин ("ПанЭко"), 20 мкг/мл гентамицина ("ПанЭко") и 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("ПанЭко") при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе ("Series Shel Lab", США). Среду меняли каждые 2 дня, клетки пересеивали 2 раза в неделю. Количество клеток считали в камере Горяева на микроскопе "Биомед" (Россия). При проведении эксперимента клетки высевали в 24-луночные планшеты и оставляли на сутки для прикрепления к подложке, после чего добавляли ЛО в различных концентрациях. В контрольные пробы ЛО не вносили.

Определение доли мёртвых клеток в исследуемой популяции проводили путём окраски йодидом пропидия (ИП) с $\lambda_{ex} = 485$ нм, $\lambda_{em} = 610$ нм ("Invitrogen", США). Для снятия клеток с подложек добавляли 3 мл 0,05% раствора трипсин-ЭДТА ("ПанЭко") и инкубировали 5 мин, далее трисин-ЭДТА ингибировали с помощью 2 мл культуральной среды с сывороткой. Клетки собирали в микропробирки объёмом 1,5 мл, центрифугировали 10 мин при 300 g, сливали супернатант, добавляли 1 мл раствора йодида пропидия (1 мкМ) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, "ПанЭко") и оставляли на 1-2 мин при комнатной температуре. Пробы анализировали на проточном цитометре FACS Calibur ("Becton, Dickinson

and Company", США), данные обрабатывали с помощью программы CellQuest Pro™.

Уровень АФК оценивали с помощью флуоресцентного зонда – 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH₂-DA) ("Biotium", США) при длине волны $\lambda_{em} = 530$ нм (возбуждение при $\lambda_{ex} = 485$ нм). Клетки снимали с подложки и собирали в пробирки объёмом 1,5 мл и центрифугировали 10 мин при 300 g. Супернатант декантировали, добавляли 1 мл 10 мкМ раствора DCFH₂-DA в ФСБ и оставляли на 30 мин в темноте при 37°C. За 1 мин до измерения вносили 10 мкМ ИП и анализировали на проточном цитометре. Данные обрабатывали в программе CellQuest Pro (BD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ЛО на культуру клеток PC12 исследовали, определяя долю мёртвых клеток в исследуемой популяции с помощью ИП, не способного проникать через мембрану нативной клетки и накапливающегося только в погибших клетках, имеющих мембранные дефекты, где он связывается с нуклеиновыми кислотами, встраиваясь между основаниями. После конъюгации с нуклеиновыми кислотами его флуоресценция возрастает в 20-30 раз, а максимум флуоресценции сдвигается на ~15 нм. Предварительные эксперименты показали, что длительная инкубация клеток PC12 в присутствии ЛО приводила к их полной гибели, например, при концентрации ЛО 8,4 нМ клетки в культуре полностью погибали через сутки, в то время как при меньших концентрациях ЛО клетки продолжали развиваться, их количество увеличивалось, а гибель происходила позже. В результате на 3-и сутки инкубации наблюдалось более высокое количество мёртвых клеток при более низких концентрациях ЛО, чем при более высоких. Поэтому, для дальнейших экспериментов был использован более короткий интервал инкубации клеток с ЛО, равный 3 ч, и диапазон концентраций фермента 8,4 нМ - 0,84 мкМ. После инкубации в течение 3 ч клеток PC12 в присутствии ЛО в концентрациях, не превышающих 0,84 нМ, количество погибших клеток не отличалось от контроля (рис. 1). При концентрациях ЛО 0,42 мкМ и 0,84 нМ гибель клеток составляла 14% и 22%, соответственно, а при 4,2 нМ и 0,84 мкМ порядка 75-80%, что существенно превышало количество погибших клеток в контроле. Таким образом, было установлено, что ЛО оказывает дозо-зависимый цитотоксический эффект на клетки PC12 (с величиной EC₅₀=1,85 нМ).

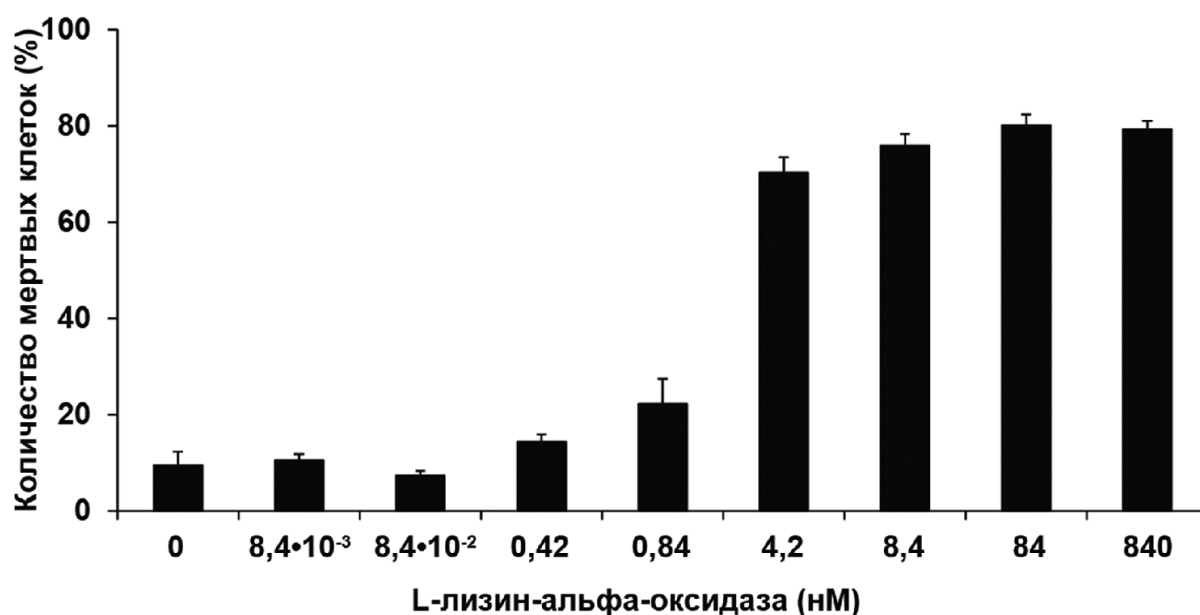


Рисунок 1. Гибель клеток линии PC12 при различных концентрациях L-лизин-альфа-оксидазы (инкубация в течение 3 ч).

В связи с тем, что при концентрациях ЛО выше 0,84 нМ происходила почти полная гибель клеток, для дальнейших исследований были выбраны значения 0,42 и 0,84 нМ. На рисунке 2 представлена динамика цитотоксического действия ЛО. Можно видеть, что в присутствии указанных концентраций ЛО гибель клеток начиналась после 60 мин инкубации, когда количество мёртвых клеток составляло 8,7% (против 6,1% в контроле),

а через 180 мин – достигала 19,5% (контроль – 9,5%).

Для установления возможного механизма этого эффекта было исследовано влияние ЛО на уровень внутриклеточных АФК. Уровень свободных радикалов в клетках определяли с помощью флуоресцентного красителя DCFH₂-DA, молекула которого является гидрофобной, не заряженной и не флуоресцирующей, легко проникающей

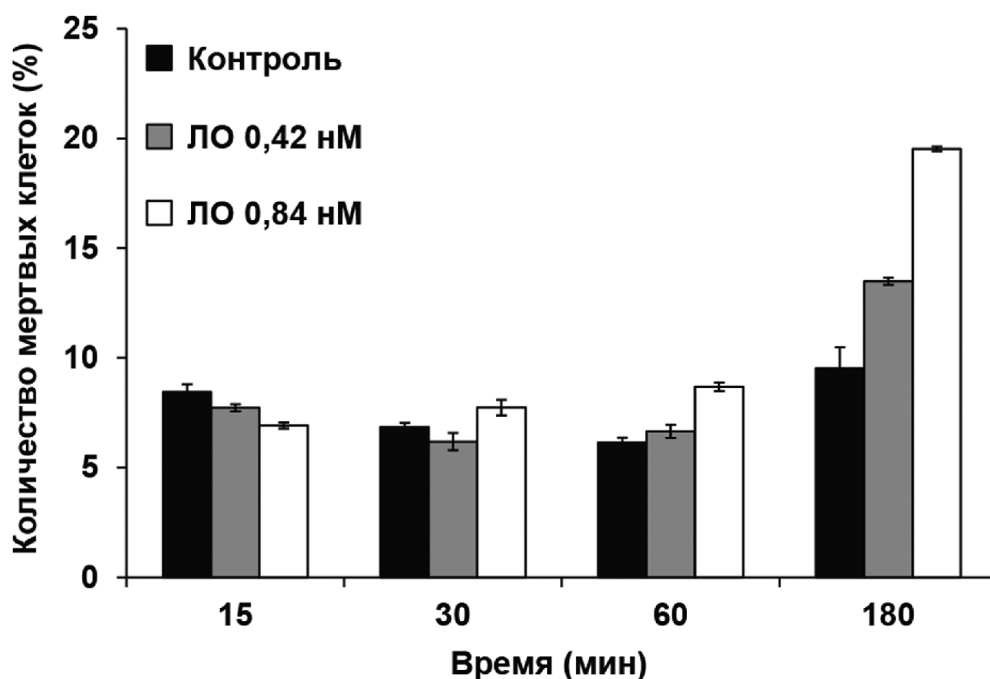


Рисунок 2. Динамика гибели клеток линии PC12 в присутствии L-лизин-альфа-оксидазы.

через цитоплазматическую мембрану клетки. В цитоплазме внутриклеточные эстеразы отщепляют ацетильные группы метки, превращая её в 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH₂), молекулу, несущую отрицательный заряд, что затрудняет обратный выход красителя из клетки. Таким образом, DCFH₂ накапливается в клетках, где он может окисляться при взаимодействии с АФК до флуоресцирующего продукта дихлорфлуоресцеина.

Предварительно, для выяснения чувствительности клеток к воздействию H₂O₂ клетки инкубировали в присутствии 5 мМ H₂O₂ в течение двух часов. Максимальный уровень АФК в клетках наблюдался через 15 мин, в то время как максимальная гибель клеток – только через 2 ч. Клетки РС-12 инкубировали в присутствии ЛО в течение 15, 30, 60 и 180 мин, затем измеряли уровень АФК. Как следует из сравнения рисунков 2 и 3, динамика изменения уровня АФК в клетках отличалась от динамики накопления мертвых клеток в культуре РС12. Через 15 мин уровень АФК увеличивался в 3 и 8 раз по сравнению с контролем при концентрациях ЛО 0,42 и 0,84 нМ соответственно, и затем продолжал расти. Через 60 мин инкубации с ЛО наблюдали максимальные количества АФК, превышающие контроль в 6,5 и 15,3 раза (рис. 3). Далее уровень АФК в клетках снижался. Таким образом, можно сделать заключение, что гибели клеток предшествует сильное увеличение

уровня АФК, которое развивается в среде как результат лизиноксидазной реакции, протекающей с накоплением H₂O₂.

Следует отметить значительно более интенсивную генерацию АФК в клетках РС12 в присутствии исследуемой нами ЛО из *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D в концентрациях 0,42 и 0,84 нМ, чем генерация АФК в клетках *Aureus Escherichia coli* BCRC10675 и *Staphylococcus aureus* BCRC10780 в присутствии на 5 порядков более высоких концентраций L-ААО (6 мкМ) из другого штамма того же рода – *Trichoderma harzianum* ETS 323 [14]. Сравнить цитотоксическую активность двух этих ферментов довольно сложно, поскольку эксперименты были проведены с использованием различных клеточных линий; следует учитывать также разную, до некоторой степени, специфичность двух ферментов: L-ААО из *Trichoderma harzianum* ETS 323 отличается от преимущественно действующей на L-лизин ЛО, проявляя максимальную активность по отношению к гидрофобной аминокислоте L-фенилаланину.

Субъединицы ЛО имеют молекулярную массу 60 кДа и, вероятно, не проникают внутрь клеток. Но реакция расщепления внеклеточного L-лизина оказывается такой интенсивной, а внеклеточное увеличение уровня АФК таким значительным, что и внутри клеток наблюдается быстрое нарастание уровня АФК. Сопоставление

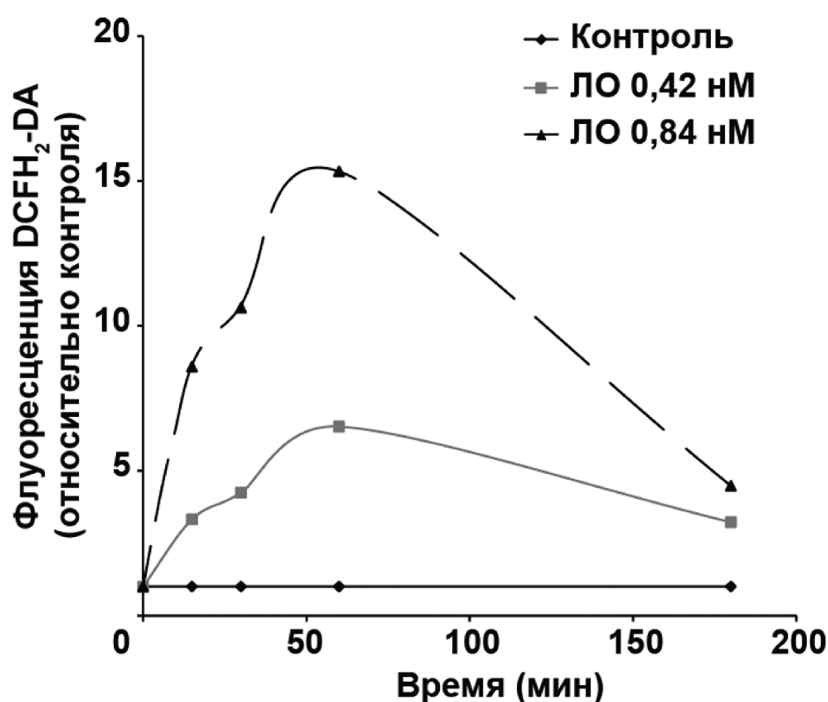


Рисунок 3. Динамика содержания АФК в клетках линии РС12 в присутствии L-лизин-альфа-оксидазы.

динамики накопления АФК в клетках с динамикой увеличения количества мёртвых клеток указывает на то, что гибель клеток следует за ростом АФК. Причем, как уровень АФК, так и количество мёртвых клеток возрастают с ростом концентрации ЛО. Suhr и Kim [15], которые исследовали оксидазу L-ААО из яда малайской гадюки, выдвинули предположение о том, что поскольку L-ААО является гликопротеином, важный вклад в индукцию клеточной смерти вносит взаимодействие её углеводного фрагмента с поверхностью клеток и создание высоких локальных концентраций H_2O_2 , который тут же переносится в клетку, не подвергаясь действию внеклеточной каталазы; более того, авторы не исключают возможную интернализацию L-ААО клеткой. Ande с соавторами [16] предприняли попытку установить роль углеводного компонента L-ААО из того же источника в проникновении этого фермента в клетки и проявлении цитотоксического эффекта по отношению к клеточной линии Yurcat за счёт осуществления каталитической реакции внутри клеток; однако выводы авторов не представляются бесспорно подтвержденными экспериментальными данными, а цитотоксические свойства фермента после дегликозилирования не изменяются. Несмотря на отсутствие уверенности в возможности проникновения в клетки L-ААО, к которым принадлежит и ЛО, в настоящей работе на примере клеток РС12 показано, что под действием ЛО происходит достоверный рост внутриклеточных концентраций АФК, который влечёт за собой клеточную смерть. Это позволяет сделать вывод, что наряду с удалением важной для развития клетки аминокислоты L-лизина, механизм цитотоксического действия ЛО может включать окислительный путь. Поскольку АФК проявляют широкий спектр внутриклеточных эффектов, они могут вмешиваться и в такие процессы, как синтез нуклеиновых кислот, и объяснять, например, такие факты, как преобладание торможения синтеза ДНК под действием ЛО из *Trichoderma harzianum* Rifai по сравнению с торможением синтеза белков [17] и фрагментацию ДНК [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате проведённой работы можно сделать выводы о вероятной чувствительности клеток феохромоцитомы крысы РС12 к воздействию ЛО и том, что в молекулярных механизмах цитотоксичности ЛО определённую

роль играет повышение внутриклеточного уровня АФК. Однако, поскольку в ряде работ, результаты которых обобщены в обзоре [2], было показано, что удаление H_2O_2 из среды культивирования клеток в присутствии L-ААО путём добавления каталазы снижает способность этих ферментов вызывать гибель клеток (опухолевых или бактериальных) лишь частично, можно говорить о том, что полученные результаты не исключают других ранее доказанных для L-ААО механизмов влияния и ЛО на гибель клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Misono H., Soda K. (1980) J. Biol. Chem., **255**, 976–981.
2. Лукашева Е.В., Ефремова А.А., Трещалина Е.М., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г., Березов Т.Т. (2012) Биомед. химия, **58**, 372–384.
3. Yu Z., Qiao H. (2012) Appl. Biochem. Biotechnol., **167**, 1–13.
4. Лукашева Е.В., Березов Т.Т. (2002) Биохимия, **67**, 1394–1401.
5. Butzke D., Hurwitz R., Thiede B., Goedert S., Rudel T. (2005) Toxicon, **46**(5), 479–489.
6. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Soda K. (1980) Agr. Biol. Chem., **44**(2), 387–392.
7. Treshalina H.M., Lukasheva E.V., Sedakova L.A. (2000) Applied Biochem. Biotechnol., **84**, 267–273.
8. Chen W.M., Lin C.Y., Sheu S.Y. (2001) Enzyme and Microb. Technol., **46**, 487–493.
9. Berezov T.T., Lukasheva E.V. (1988) Biochem. International, **17**(3), 529–534.
10. Kitani Y., Kikuchi N., Zhang G.-H., Ishizaki S., Shimakura K., Shiomi K., Nagashima Y. (2008) Comp. Biochem. Physiol. B; **149**, 394–400.
11. Ko K.C., Wang B., Tai P.C., Derby C.D. (2008) Antimicrob. Agents Chemother., **52**(12), 4455–4462.
12. Nagashima Y., Tsukamoto C., Kitani Y., Ishizaki S., Nagai H., Yanagimoto T. (2009) Comp. Biochem. Physiol. B, **154**(1), 55–61.
13. Аринбасарова А.Ю., Ашин В.В., Макрушин К.В., Меденцев А.Г., Лукашева Е.В., Березов Т.Т. (2012) Микробиология, **81**, 594–599.
14. Yang C.-A., Cheng C.-H., Liu S.-Y., Lo C.-T., Lee J.-W., Peng K.-C. (2011) FEBS J., **278**, 3381–3394.
15. Suhr S.M., Kim D.S. (1996) Biochem. Biophys. Res. Comm., **224**, 134–139.
16. Ande R., Kommoju P.R., Draxl S., Murkovic M., Macheroux P., Ghisla S., Ferrando-May E. (2006) Apoptosis, **11**, 1439–1451.
17. Жукова О.С., Хадуев С.Х., Добрынин Я.В., Смирнова И.П., Лукашева Е.В., Березов Т.Т. (1985) Эксперим. онкология, **7**(6), 42–44.

Поступила: 27. 06. 2013.

EFFECT OF L-LYSINE ALPHA-OXIDASE FROM
TRICHODERMA cf. *AUREOVIRIDE* Rifai BKMF-4268D
ON PHEOCHROMOCYTOMA PC12 CELL LINE

*E.V. Lukasheva*¹, *Yu.S. Ribakova*², *T.N. Fedorova*², *M.G. Makletsova*^{2,3}, *A.Yu. Arinbasarova*⁴,
*A.G. Medentzev*⁴, *T.T. Berezov*^{1,3}

¹Friendship University of Russia,
8 Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198 Russia; tel./fax: (095)-495-434-04-12;
e-mail: elena.lash@yandex.ru

²Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

³Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

⁴G.K. Scryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

L-Amino acid oxidases (L-AAO, EC 1.4.3.2) comprise a group of flavoproteins, catalyzing oxidative deamination of L-alpha amino acids to the corresponding alpha-keto acids, NH₃ and H₂O₂. In most cases these enzymes present homodimeric molecules with a molecular mass of 100-150 kDa, which were shown to possess antiviral, antifungal and antitumor activity. L-lysine alpha-oxidase (LO) holds an outstanding place among this group of enzymes and its biological role may differ significantly from the other L-AAO, because it cleaves an essential amino acid – L-lysine without significant action on the other amino acids. Although much research has examined LO effects in the organism, the molecular basis of these effects is yet to be identified. To fill this gap, the present work addressed one of hypothetical mechanisms of LO biological action using the enzyme from *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai BKMF-4268D and rat pheochromocytoma PC-12 as a model cell line. Using flow cytometry a dose-dependent cytotoxicity of LO was shown. The significant growth of intracellular reactive oxygen species levels, detected by 2,7-dichlorodihydrofluorescein assay, implies generation of peroxide as one of the molecular mechanisms of LO cytotoxic action, although this does not rule out other probable ways of LO action in the organism.

Key words: L-amino acid oxidase, L-lysine alpha-oxidase, mechanism of cytotoxicity, PC12 cell line, reactive oxygen species (ROS).