

Изучение действия противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы из культуры *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 на окисление L-лизина методом капиллярного электрофореза

И. П. СМЕРНОВА¹, В. М. ШКИНЕВ², А. В. РУДНЕВ³, О. М. КУЗНЕЦОВА¹, Е. В. КАРИМОВА¹, В. С. ОРЛОВА¹

¹ Российский университет дружбы народов, Москва

² ГУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского, Москва

³ Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского, Москва

Antitumor Enzyme L-Lysine- α -Oxidase from *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 and Investigation of Its Action on L-Lysine Oxidation by Capillar Electrophoresis

I. P. SMIRNOVA, V. M. SHKINEV, A. V. RUDNEV, O. M. KUZNETSOVA, E. V. KARIMOVA, V. S. ORLOVA

Russian University of Peoples' Friendship, Moscow

D. I. Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow

V. I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Moscow

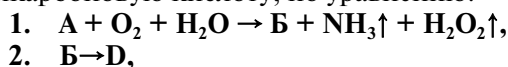
Проведено культивирование продуцента противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы (штамм *Trichoderma harzianum* Rifai F-180), выделение и очистка фермента в промышленных условиях. Впервые разработаны условия и исследовано действие L-лизин- α -оксидазы на окисление L-лизина методом капиллярного электрофореза. Дано описание реакции окислительного дезаминирования L-лизина и идентифицированы положения пиков компонентов реакций на электрофореграммах (ЭФГ). Определена средняя скорость каталитической реакции окисления L-лизина, равная 0,46 ОЕ/мин ($7,7 \times 10^{-3}$ ОЕ/с). Рекомендуется применение противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы как лекарственного препарата для лечения поверхностных опухолей и тканей с относительно высоким содержанием кислорода.

Ключевые слова: противоопухолевый фермент, L-лизин- α -оксидаза, триходерма, капиллярный электрофорез.

Trichoderma harzianum Rifai F-180, an organism producing the antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase was cultivated and the enzyme was isolated and purified under the manufacturing conditions. The effect of L-lysine- α -oxidase on oxidation of L-lysine was investigated for the first time by capillary electrophoresis and the procedure conditions were developed. The reaction of L-lysine oxidative deamination is described and location of the reaction components picks on the electrophoregrams was identified. The average rate of the catalytic reaction of L-lysine oxidation equal to 0.46 RU/min (7.7×10^{-3} RU/sec) was determined. The use of the antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase is recommended as a drug for the treatment of superficial tumors and tissue relative oxygen excess.

Key words: antitumor enzyme, L-lysine- α -oxidase, trichoderma, capillary electrophoresis.

Противоопухолевый фермент L-лизин- α -оксидаза (ЕС 1.4.3.14) катализирует реакцию окислительного дезаминирования L-лизина с образованием α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты, которая спонтанно циклизуется в Δ' -пирролидонкарбоновую кислоту, по уравнению:



где А — L-лизин; В — α -кето- ϵ -аминокапроновая, D — $\leftarrow\Delta'$ -пиперидин-2-карбоновая кислота [1, 2].

Образующаяся Δ' -пирролидонкарбоновая кислота не может (в силу пространственного расположения функциональных групп) выполнять

функции акцептора аминокислоты в реакциях трансаминирования аминокислот.

На кафедре биохимии медицинского факультета Университета дружбы народов был проведён поиск и отбор среди коллекции грибных культур продуцента противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы, выбран отечественный штамм *Trichoderma harzianum* Rifai F-180 и проведён комплекс научных исследований, касающихся физико-химических и биологических свойств данного фермента [3–16].

Целью настоящего исследования было продолжение работ, начатых ранее. Нами впервые проведено исследование окислительного дезаминирования L-лизина противоопухолевым ферментом L-лизин- α -оксидазой гриба *Trichoderma harzianum* Rifai методом капиллярного электрофореза.

© Коллектив авторов, 2014

Адрес для корреспонденции: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6. РУДН

Материал и методы

В работе использовали штамм *Trichoderma harzianum* Rifai, продуцент противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером F-180. Штамм триходермы, культивировали на среде по ранее разработанной методике на оборудовании опытной технологической установки ИБФМ РАН им. Г. К. Скрыбина (г. Пушкино).

По окончании ферментации культуральную жидкость направляли на участок предварительной очистки, где мицелий гриба отделяли фильтрованием под вакуумом на нутч-фильтре. Вес полученной биомассы составил 3,5 кг. Полученный нативный раствор подвергали дополнительному сепарированию на сепараторе типа ОСБ при 9000 об/мин в течение 1 ч при температуре 2–4°C. Затем нативный раствор в объёме 55 л, полученный после отделения биомассы, концентрировали до 1,5 л. На последующем этапе проводили очистку L-лизин- α -оксидазы с использованием сорбентов DEAE-сефацела, сефадексов G-100 и G-200 [7].

Активность L-лизин- α -оксидазы в культуральной жидкости *Trichoderma* рассчитывали по приросту H_2O_2 , количество которой определяли спектрофотометрическим ортодианизидиновым микрометодом [6].

Для оценки чистоты препарата использовали электрофорез в 10% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия, а также капиллярный электрофорез [16]. Исследования проводили на приборе для капиллярного электрофореза «Капель 105» («Люмэкс», Санкт-Петербург, Россия), снабжённом спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны (190–380 нм). В работе использовали кварцевый капилляр с внешним полиимидным защитным покрытием. Размеры капилляра: внутренний диаметр 75 мкм; общая длина капилляра 37,5 см, расстояние до детектора 28 см. Эксперименты проводили при 25°C и длине волны 220 нм с использованием источника высокого напряжения положительной полярности. Маркёр электроосмотического потока (ЭОП) — диметилсульфоксид (ДМСО). Для восстановления активной поверхности капилляра между измерениями его промывали в течение 1 мин тридистиллированной водой, 0,01 М раствором NaOH и разделительным буферным раствором.

Результаты и обсуждение

Известно, что противоопухолевой фермент L-лизин- α -оксидаза катализирует окислительное дезаминирование L-лизина с образованием α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты и перекиси водорода.

Исследование избирательности действия показало, что L-лизин- α -оксидаза действует практически только на L-лизин и лишь в небольшой степени (менее 6% от активности по отношению к L-лизину) на две другие аминокислоты, которые могут рассматриваться как структурные аналоги L-лизина: L-орнитин и L-аргинин [8, 15].

L-лизин- α -оксидаза представляет собой гликопептид с молекулярной массой 120 кДа, состоящий из двух идентичных субъединиц.

Для изучения реакции окислительного дезаминирования L-лизина на первой стадии были идентифицированы положения пиков L-лизина (рис. 1), L-лизин- α -оксидазы (рис. 2), смеси L-лизина с L-лизин- α -оксидазой и Δ^1 -пирролидон-карбоновой кислоты. Положение пика в спектре Δ^1 -пирролидон-карбоновой кислоты соответству-

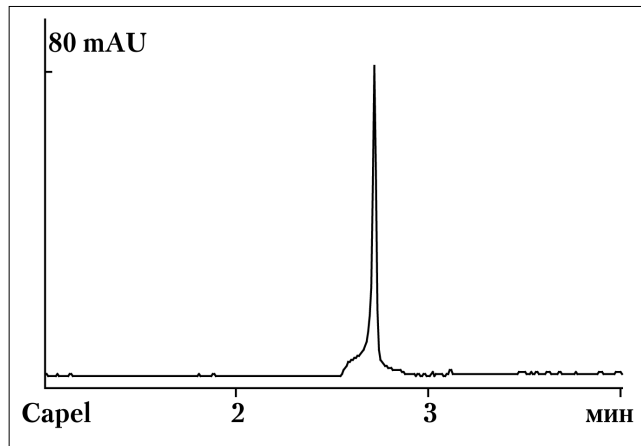


Рис. 1. Электрофореграмма L-лизина.

Ввод пробы L-лизин 20/10 (мБар/сек), ДМСО 5/10. Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 63 мкА. Буфер фосфатный pH 7,4 – 20 мМ. Пик на ЭФГ: 2.71 мин (ДМСО+ L-лизин); L-лизин на ЭФГ выходит вместе с маркёром ЭОП – ДМСО.

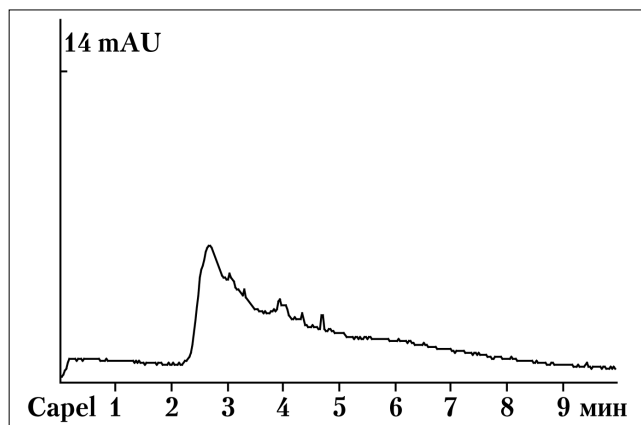


Рис. 2. Электрофореграмма L-лизин- α -оксидазы.

Ввод пробы 30/10 (мБар/сек). Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 64 мкА. Буфер фосфатный pH 7,4 – 20 мМ.

ет положению других аминокислот и не может быть идентифицировано в смеси с L-лизинном. Поэтому можно было предположить, что пик с $t=6,0$ мин соответствует пику фермент-субстратного комплекса (рис. 3).

Электрофореграмма противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы характеризуется широкой полосой, типичной для оксидаз, и объясняется полидисперстностью продукта и наличием нескольких различных функциональных групп.

Нами впервые изучены электрофореграммы смесей L-лизин- α -оксидазы и L-лизина при pH 7,4 и исследована ферментативная реакция (рис. 3–5).

Электрофоретическая подвижность фермент-субстратного комплекса продукта реакции $\mu=-27,2\pm\times 10^{-5}$ см²В⁻¹с⁻¹. На полученных ЭФГ на-

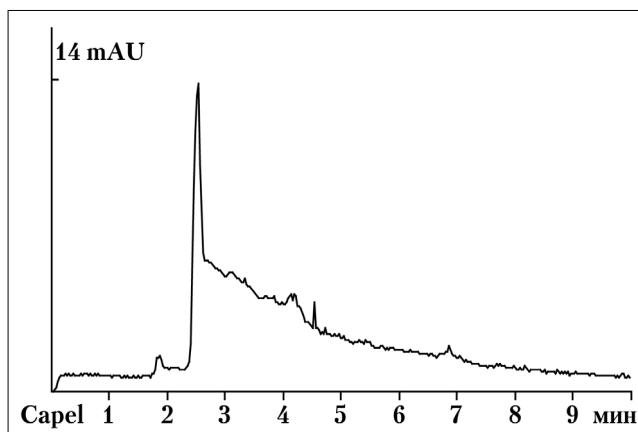


Рис. 3. Электрофореграмма исходной смеси L-лизина (0.002 М) и L-лизин- α -оксидазы.

Ввод пробы 30/10 (мБар/сек) Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 64 мкА. Буфер фосфатный рН 7,4 – 20 мМ. Пики на ЭФГ: 2,5 мин (ДМСО + L-лизин).

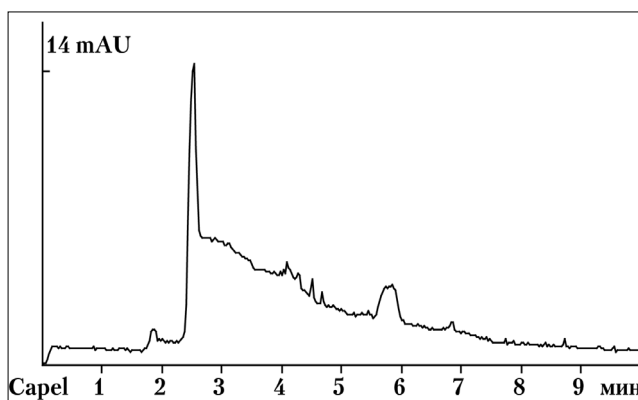


Рис. 4. Электрофореграмма смеси L-лизина (0,002 М) и L-лизин- α -оксидазы через 54 мин после начала реакции.

Ввод пробы 30/10 (мБар/сек) Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 64 мкА. Буфер фосфатный рН 7,4 – 20 мМ. Пики на ЭФГ: 2,5 мин (ДМСО+L-лизин), 6,0 мин (фермент-субстратный комплекс).

блюдается только увеличение площади пика фермент-субстратного комплекса (рис. 6.) Площади пиков L-лизина и L-лизин- α -оксидазы практически не меняются. Из приведённых ЭФГ видно, что пик с $t=6,0$ мин можно отнести к фермент-субстратному комплексу реакции.

В таблице представлена зависимость скорости окисления L-лизина в присутствии L-лизин- α -оксидазы. Как видно площадь пика S зависит от времени прохождения ферментативной реакции.

Высокая специфичность противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы объясняется строгим геометрическим и электронным соответствием структуры субстрата структуре активного центра фермента, на котором субстрат сорбируется и далее претерпевает химические

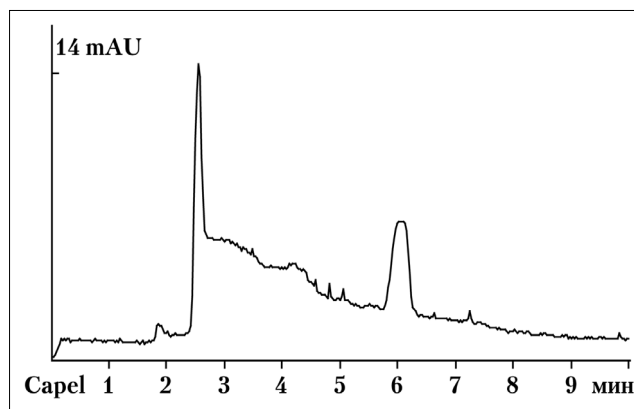


Рис. 5. Электрофореграмма смеси L-лизина (0.002 М) и L-лизин- α -оксидазы через 145 мин после начала реакции.

Ввод пробы 30/10 (мБар/сек). Длина волны 220 нм, температура 25°C, напряжение 15 кВ, ток 64 мкА. Буфер фосфатный рН 7,4 – 20 мМ. Пики на ЭФГ: 2,5 мин (ДМСО+L-лизин), 6,0 мин (продукт реакции).

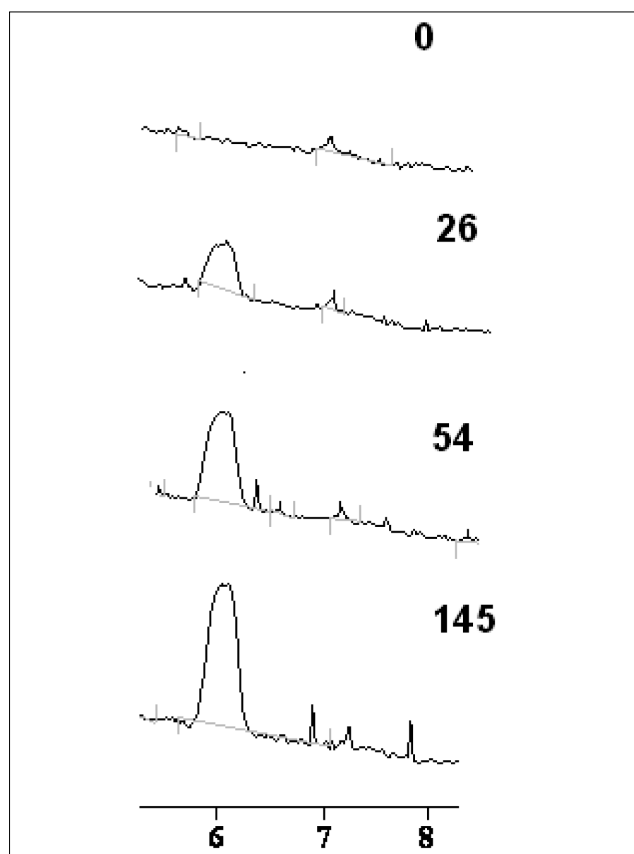


Рис. 6. Изменение пика продукта ферментативной реакции в зависимости от времени (мин).

превращения. Известно [17], что для объяснения эффективности ферментативного катализа химическая реакция разбивается на ряд энергетически более лёгких промежуточных реакций, в которых участвует фермент. Образование первичного фермент-субстратного комплекса даёт

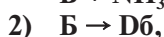
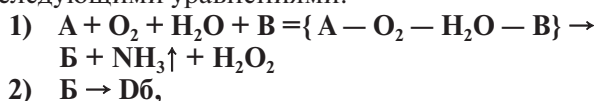
Скорость реакции окисления L-лизина (0.002 М) в присутствии противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы**

Номер фореграммы	Время реакции, мин	Площадь пика, ОЕ*	Скорость, ОЕ/мин
1	0	0	0
2	26	14,5	0,56
3	54	30,0	0,56
4	85	42,5	0,39
5	105	51	0,42
6	145	67,8	0,36

Примечание. * – ОЕ – относительные единицы; ** – реакция исследовалась в фосфатном буфере, pH 7,4, 20 мМ.

выигрыш энергии, достаточный для ускорения процесса в целом.

Таким образом, данная ферментативная реакция при участии L-лизин- α -оксидазы описывается следующими уравнениями:



где $\{A - O_2 - H_2O - B\}$ – фермент-субстратный комплекс; B – α -кето- ϵ -аминокапроновая кислота; D – $\leftarrow\Delta'$ -пиперидин-2-карбоновая кислота [1].

Скорость ферментативной реакции (V) зависит от концентрации L-лизин- α -оксидазы (B) и L-лизина (A) и описывается уравнением Михаэлиса – Ментен.

В данном случае концентрации фермента, кислорода, воды практически постоянны и изменяется (уменьшается) только концентрация субстрата (L-лизина) за счёт его окисления. То есть, скорость реакции прямо пропорциональна концентрации фермента (B) и равна

$$V = Km [B][A] / Km1 + [A],$$

где: Km и Km1 – соответствующие константы реакции.

Заключение

Таким образом, для изучения действия противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы из культуры *Trichoderma harzianum* Rifai на окисление L-лизина может использоваться капиллярный электрофорез.

Можно предположить возможность использования капиллярного электрофореза в поиске и исследовании действия оксидаз других L-аминокислот-продуцентов противоопухолевых ферментов, как метода определения их ферментативной активности.

Из полученных результатов следует также добавить, что наиболее эффективным, как нам представляется, является применение противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы как лекарственного препарата для лечения поверхностных опухолей и тканей с относительно высоким содержанием кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

- Kusakabe H., Kodama K., Kununaka A., Yoshino H., Soda K., Misono H. A new antitumor enzyme L-lysine- α -oxidase from *Trichoderma viride*. J Bio Chem 1980; 255: 3: 976–981.
- Kusakabe H., Kodama K., Machida H., Midorikawa J., Kuninaka A., Misono H., Yoshino H. and Soda K. Occurrence of a novel enzyme, L-lysine- α -oxidase with antitumor activity in cultural extract of *Trichoderma viride*. Agr Biol Chem 1979; 43: 2: 976–981.
- Алексеев С.Б., Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Новый иммуномодулятор из триходермы. Вопр мед хим 1997; 43: 2: 112–115.
- Смирнова И.П., Селищева А.А., Алексеев С.Б., Подборонов В.М. Эффективность антигерпетического действия различных лекарственных форм L-лизин- α -оксидазы. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 1: 9–12.
- Алексеев С.Б., Селищева А.А., Смирнова И.П., Подборонов В.М., Иванова А.А. Перспективы терапии онкологических заболеваний L-лизин- α -оксидазой триходермы. Международ журн иммунореабилит 2010; 12: 2: 164–165.
- Смирнова И.П., Сяткин С.П., Берёзов Т.Т. Спектрофотометрический метод определения L-лизин- α -оксидазы. Вопр мед хим 1984; 1: 133–136.
- Смирнова И.П., Шкинев В.М., Руднев А.В., Шнейдер Ю.А., Кузовников А.Е. Технологии выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы. Биотехнология 2010; 6: 52–60.
- Лаугалене Н.Ф., Веса В.С., Янквичене Р.Н., Пуоджюсте С.П., Суджюене О.Ф., Песлякас И.И., Хадуев С.Х., Берёзов Т.Т. Новый метод очистки L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma*. Вопр мед хим 1990; 4: 88–90.
- Смирнова И.П., Алексеев С.Б. Влияние L-лизин- α -оксидазы на развитие герпетической генитальной инфекции у морских свинок. Бюлл экспер биол мед 1999; 128: 12: 654–656.
- Смирнова И.П., Алексеев С.Б. Биосинтез противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы *Trichoderma* sp. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 5–6: 8–11.
- Смирнова И.П., Шкинев В.М., Руднев А.В., Шнейдер Ю.А., Кузовников А.Е. Технологии выделения и очистки L-лизин- α -оксидазы. Биотехнология 2010; 6: 52–60.
- Подборонов В.М., Кузовников А.Е., Зайцева А.К., Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Исследование противоопухолевой субстанции из триходермы. Антибиотики и химиотер 2011; 56: 9–10: 3–6.
- Подборонов В.М., Кузовников А.Е., Зайцева А.К., Смирнова И.П. Доклинические испытания противоопухолевого фермента L-лизин- α -оксидазы. Антибиотики и химиотер 2010; 55: 9–10: 33–36.
- Шнейдер Ю.А., Хомик А.А., Кишмахова Л.М., Смирнова И.П. Культивирование сапрофитного гриба триходермы и биосинтез L-лизин- α -оксидазы. Вестник РУДН сер агрономия 2010; 4: 49–55.
- Янквич Н.Б., Лаугалене Н.Ф., Веса В.С., Хадуев С.Х., Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Усовершенствованная схема очистки L-лизин- α -оксидазы гриба *Trichoderma* sp. // Вопр мед хим 1989; 2: 84–86.
- Смирнова И.П., Берёзов Т.Т. Биотехнология фермента L-лизин- α -оксидазы из триходермы. Пенза, 2014; 189.
- Энгельгарт Х. Руководство по капиллярному электрофорезу. М.: 1996; 112.