

Enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania  
w leczeniu chorób nowotworowych krwi.

Przedmiotem wynalazku jest enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor*, mający zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych krwi.

Lakazę występującą w postaci kilku izoenzymów, tworzących multimeryczne kompleksy o masie cząsteczkowej monomeru w zakresie od ok. 50 do 110 kDa, otrzymuje się głównie przez izolację z grzybów wyższych, a jednym z najefektywniejszych producentów tego enzymu są grzyby białej zgnilizny drewna.

Znane są liczne publikacje opisujące szereg zastosowań lakazy.

R.A. Blanchette, T.A. Burnes, M.M. Erdmans, M. Akhtar, w *Holzforchung* Nr 46/1992, ss.109-115 opisali zastosowanie lakazy w procesach wybielania pulpy drzewnej w przemyśle papierniczym i drzewnym. Zastosowanie lakazy do wybielania tkanin znane jest z publikacji C. Raghukumar, *Mycol. Res.* 104/2000, ss.1222-1226, czy też do degradacji szkodliwych dla środowiska barwników tekstylnych, np. z publikacji E. Rodriguez, M.A. Pickard, D.R. Vazquez, 1999, *Curr. Microbiol.* 38/1999, ss. 27-32.

Inne wykorzystanie lakazy w procesach klarowania wina, piwa i soków znane jest z publikacji M. Servili, G. De Stefano, P. Piacquadio, V. Sciancalepore, *Am. J. Enol. Vitic.* 51/2000, ss. 357-361.

Znana jest też metoda monitorowania zawartości związków fenolowych w naturalnych rezerwuarach wodnych przy użyciu elektrody zawierającej im mobilizowaną lakazę, co przedstawili w swojej pracy w 2002 roku Freire R.S. Duran, N. Kubota, L.T., *Talanta* Nr 54, ss. 681-686.

Ostatnie doniesienia naukowe wskazują na nowe aspekty działania tego enzymu.

Autorzy Hu i inni wykazali działanie lakazy m.in. jako inhibitora odwrotnej transkryptazy HIV oraz jej aktywność antyproliferacyjną wobec komórek HepG2 i MCF7, publikacja z 2011 roku w *Phytomedicine* 15, 18(5), ss. 374-379.

Jak dotychczas, nie znane jest wykorzystanie grzybowego białka enzymatycznego jakim jest lakaza w leczeniu nowotworów krwi.

Istotą wynalazku jest enzym lakaza wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* do zastosowania w leczeniu chorób nowotworowych krwi, którego cytotoksyczne działanie na ludzkie komórki nowotworowe, wykazano nieoczekiwanie, w wyniku przeprowadzonych badań.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach, nie wyczerpując bynajmniej wszystkich możliwych sposobów jego zastosowania.

#### Przykład 1. Otrzymywanie lakazy i namnażanie linii komórkowych zakupionych z Kolekcji Hodowli Komórkowych.

Do opisywanych poniżej przykładów wykorzystano szczep *Cerrena unicolor* (nr 139) pochodzący z kolekcji grzybów Zakładu Biochemii UMCS w Lublinie. Szczep był przechowywany na pożywce agarowej w temp. 4°C. Do namnażania używano podłoża Lindeberg-Holm, pH 5,5. Hodowle fermentorowe grzyba prowadzono przez okres 14 dni w 28°C, w bioreaktorach (BioFlo III, New Brunswick Scientific, Edison, USA) zawierających 2 litry podłoża Lindeberg-Holm. Po oddzieleniu grzybni, podłoża pohodowlane wykorzystywano do otrzymywania preparatów lakazy.

W tym celu supernatant z płynu hodowlanego zateżono w układzie ultrafiltracji Pellicon 2. Następnie białka rozdzielono metodą chromatografii anionowymiennej na kolumnie wypełnionej złożem DEAE-Sepharose i zrównoważonej 20 mM buforem Tris-HCl o pH=6,5. Białka z kolumny eluowano liniowym gradientem NaCl w zakresie stężeń od 0,1-0,5M przy szybkości przepływu 1 ml/min.

Fracje białkowe wykazujące aktywność lakazy zebrano i odsolono na kolumnie Sephadex G-50. Otrzymaną mieszaninę izoform lakazy liofilizowano stosując 12 FREEZONE System (Labconco, USA) i wykorzystywano do dalszych badań jako preparat lakazy.

Do niżej opisanych przykładów badań wykorzystano promielocyty linii komórkowej HL-60 zakupione w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowej, pochodzące z krwi obwodowej chorej na ostrą białaczkę promielocytową.

Komórki te namnożono, zawieszając w ilości  $1 \times 10^6$  komórek/ml w pożywce zawierającej 89% RPMI1640 (Biochrom, Niemcy), 10% FBS (Biochrom, Niemcy) i 1% roztworu antybiotyków Penicillin – Streptomycin – Neomycin Solution Stabilized (Sigma-Aldrich Co, USA). Linia inkubowana była w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  i przy 95% wilgotności, maksymalna gęstość hodowli nie przekraczała  $2 \times 10^6$  komórek/1ml pożywki. Zmiana pożywki hodowlanej przeprowadzana była co 48 godzin w stosunku 1:5 (pożywka:hodowla). Czas podwojenia liczby komórek wynosił 40 godzin.

Komórki linii Jurkat nabyte zostały w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowej. Limfocyty T linii Jurkat wyizolowane zostały z krwi obwodowej osobnika z ostrą białaczkę limfoblastyczną T-komórkową. Również komórki tej linii namnażano poprzez zawieszenie  $1 \times 10^6$  komórek/ml w pożywce zawierającej 89% RPMI1640, 10% FBS i 1% roztworu antybiotyków. Linię inkubowano w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  i przy 95% wilgotności w maksymalnej gęstości nie przekraczającej  $3 \times 10^6$  komórek na 1 ml pożywki. Zmianę medium przeprowadzano co 48 godzin w stosunku 1:2 (pożywka:hodowla), czas podwojenia liczby komórek wynosił 25-35 godzin.

Z kolei linię komórkową K562 będącą erytroleukemiczną linią komórek multipotencjalnych, zdolnych do różnicowania w kierunku erytrocytów, megakariocytów, a także w mniejszym stopniu w kierunku monocytów, zakupiono z Niemieckiej Kolekcji Drobnoustrojów i Hodowli Komórkowych. Komórki te pozyskane były z wysięku opłucnowego

chorego na przewlekłą białaczkę szpikową w fazie zaostrzenia blastycznego.

Komórki K562 namnożono, zawieszając w ilości  $0,5 \times 10^6$  komórek/ml w pożywce, zawierającej 89% RPMI1640, 10% FBS i 1% roztworu antybiotyków. Komórki inkubowano w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  i przy 95% wilgotności w maksymalnej gęstości komórek nie przekraczającej  $1,5 \times 10^6$  komórek/ml pożywki. Zmianę pożywki hodowlanej wykonywano co 48 godzin w stosunku 1:5 (pożywka:hodowla). Czas podwojenia liczby komórek wynosił 30-40 godzin.

Linia komórkowa RPMI8226 została zakupiona w Niemieckiej Kolekcji Drobnoustrojów. Komórki RPMI8226 stanowiące limfocyty B, pozyskane były z krwi obwodowej chorego ze zdiagnozowanym szpiczakiem plazmocytowym.

Komórki tej linii namnażano zawieszając w ilości  $0,5 \times 10^6$  komórek/ml w pożywce, zawierającej 89% RPMI1640, 10% FBS i 1% roztworu antybiotyków. Komórki poddane były inkubacji w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  i przy 95% wilgotności. Maksymalna gęstość hodowli nie przekraczała  $1 \times 10^6$  komórek/ml pożywki. Zmiana medium hodowlanego przeprowadzana była co 48 godzin w stosunku 1:5 (pożywka:hodowla). Czas podwojenia liczby komórek wynosił 60-70 godzin.

Przykład 2. Badanie właściwości cytotoksycznych lakazy wyizolowanej z *Cerrena unicolor* na komórki linii HL-60 metodą XTT.

Do badań użyto zestawu In vitro Toxicology Assay Kit, XTT based (Sigma-Aldrich Co, USA) służącego do spektrofotometrycznej oceny żywych komórek w oparciu o aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej.

Metoda ta polega na reakcji redukcji żółtej soli tetrazolowej XTT do pochodnej formazanu o kolorze pomarańczowym, katalizowanej przez mitochondrialną dehydrogenazę. Wzrost lub spadek ilości żywych komórek w stosunku do komórek kontrolnych koreluje z ilością wytworzonego formazanu, wskazując na stopień cytotoksyczności zastosowanej lakazy. Odzwierciedleniem zmiany zabarwienia są zmiany absorbancji zawiesiny

komórek OD mierzone spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm, długość fali referencyjnej wynosi 620 nm.

Komórki HL-60 zawieszono w medium, odwirowano i po zlanii supernatantu, osad zawieszono w pożywce X-VIVO bez czerwieni fenolowej i genatamycyny (Lonza, Szwajcaria) w gęstości  $5 \times 10^5$ /ml. Komórki w objętości 100  $\mu$ l ( $5 \times 10^4$  komórek/dołek) zostały naniesione na płytkę 96-dołkową. Do zawiesiny komórek dodano preparat lakazy w pożywce X-VIVO bez czerwieni fenolowej i gentamycyny w ilościach od 100  $\mu$ g do 0,001  $\mu$ g. Kontrolę negatywną stanowiły żywe komórki oraz kontrolę pozytywną - komórki traktowane 100-krotnie rozcieńczonym tritonem. Do wszystkich próbek i kontroli dodano po 25  $\mu$ l odczynnika XTT. Wszystkie próby badane i kontrolne poddano inkubacji w czasie 24 i 48 godzin, w temperaturze 37°C przy 5% stężeniu CO<sub>2</sub>, po czym oznaczono OD roztworu.

Odsetek cytotoksyczności został wyliczony według wzoru:

% cytotoksyczności =  $[1 - (OD_s - OD_b) / (OD_c - OD_b)] \times 100\%$ , gdzie:

OD<sub>s</sub> – absorbancja próby badanej, OD<sub>b</sub> – absorbancja kontroli pozytywnej,

OD<sub>c</sub> – absorbancja kontroli negatywnej.

Wyniki badań wyrażone jako odsetek cytotoksyczności lakazy w stosunku do komórek linii HL-60 zostały przedstawione w tabeli 1 oraz w postaci wykresu cytotoksyczności oznaczonego na rysunku jako fig. 1.

Tabela 1.

Ilość preparatu lakazy [ $\mu$ g]	% cytotoksyczności w odniesieniu do kontroli negatywnej, po czasie inkubacji	
	24h	48h
100	100,00	100,00
10	85,63	87,00
1	81,55	67,51
0,1	8,53	6,94
0,01	7,21	1,34
0,001	1,11	0,32

Uzyskane wyniki wskazują na silne cytotoksyczne działanie preparatu lakazy wobec komórek linii HL-60.

Przykład 3. Badanie właściwości cytotoksycznych lakazy wyizolowanej z *Cerreña unicolor* na komórki linii Jurkat.

Test XTT z udziałem lakazy przeprowadzono na komórkach linii Jurkat, według sposobu opisanego w przykł. 2.

Wyliczone ze wzoru podanego w przykł. 2 wyniki badań, wyrażone zostały jako odsetek cytotoksyczności lakazy w stosunku do komórek linii Jurkat i przedstawione w tabeli 2 oraz w postaci wykresu cytotoksyczności oznaczonego na rysunku jako fig. 2.

Tabela 2.

Ilość preparatu lakazy [µg]	% cytotoksyczności w odniesieniu do kontroli negatywnej, po czasie inkubacji	
	24h	48h
100	100,00	100,00
10	100,00	99,85
1	99,28	100,00
0,75	40,39	40,35
0,5	35,22	49,46
0,1	24,00	44,36
0,01	15,14	33,80
0,001	0,00	17,91

Uzyskane wyniki wskazują na silne cytotoksyczne działanie preparatu lakazy wobec komórek linii Jurkat.

Przykład 4. Badanie właściwości cytotoksycznych lakazy wyizolowanej z *Cerreña unicolor* na komórki linii K562.

Na komórkach linii K562 wykonano test XTT z udziałem lakazy, w warunkach opisanych w przykł. 2.

Wyniki badań, wyliczone jak w przykł. 2, wyrażone zostały jako odsetek cytotoksyczności lakazy w stosunku do komórek linii K562 i przedstawione w tabeli 3 oraz w postaci wykresu cytotoksyczności oznaczonego na rysunku jako fig. 3.

Tabela 3.

Ilość preparatu lakazy [µg]	% cytotoksyczności w odniesieniu do kontroli negatywnej, po czasie inkubacji	
	24h	48h
100	100,00	100,00
10	100,00	100,00
1	61,78	59,80
0,1	0,00	0,00
0,01	0,00	0,00
0,001	0,00	0,00

Uzyskane wyniki wskazują na silne cytotoksyczne działanie preparatu lakazy wobec komórek linii K562.

Przykład 5. Badanie właściwości cytotoksycznych lakazy wyizolowanej z *Cerrena unicolor* na komórki linii RPMI8226.

W warunkach opisanych w przykł. 2, wykonano test XTT z udziałem lakazy na komórkach linii RPMI8226.

Wg znanego wzoru, wyliczono % cytotoksyczności i wyniki badań przedstawiono w tabeli 4 oraz na rysunku w postaci wykresu cytotoksyczności oznaczonego jako fig. 4.

Tabela 4.

Ilość preparatu lakazy [µg]	% cytotoksyczności w odniesieniu do kontroli negatywnej, po czasie inkubacji	
	24h	48h
100	100,00	100,00
10	100,00	100,00
1	63,84	66,96
0,75	36,77	30,20
0,5	21,97	17,59
0,1	0,00	1,03
0,01	0,00	0,00
0,001	0,00	0,00

Uzyskane wyniki wskazują na silne cytotoksyczne działanie preparatu lakazy wobec komórek linii RPMI8226 .

Przykład 6. Cytometryczna ocena apoptozy komórek linii Jurkat po działaniu preparatem lakazy

Do badań użyto zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich Co, USA), pozwalającego za pomocą białka - aneksyny V (AnnV) sprzężonego z izocyjaniną fluoresceiny (FITC), oznaczyć fosfatydyloserynę, która we wczesnym etapie apoptozy komórki, przemieszcza się na zewnętrzną powierzchnię błony komórkowej.

W zestawie używa się także jodku propidyny (PI), który przy zaburzonej integralności błony martwiczych komórek wiąże się z ich DNA i w połączeniu z białkiem AnnV, pozwala na rozróżnienie komórek znajdujących się we wczesnej fazie apoptozy (AnnV pozytywne, PI ujemne), komórek martwiczych (AnnV pozytywne, PI pozytywne) oraz komórek żywych (AnnV negatywne, PI ujemne).

Komórki linii Jurkat, zawieszono w pożywce hodowlanej zostały odwirowane i po oddzieleniu supernatantu, pellet o gęstości  $5 \times 10^5$ /ml zawieszono w pożywce X-VIVO bez czerwieni fenolowej i genatamycyny. Komórki w objętości  $100 \mu\text{l}$  ( $5 \times 10^4$  komórek/dołek) zostały naniesione na płytkę 96-dołkową. Do zawiesiny komórek dodano lakazy w końcowych stężeniach od  $100 \mu\text{g}$  do  $0,001 \mu\text{g}$ .

Kontrolę negatywną stanowiły żywe komórki, zaś kontrolę pozytywną - komórki traktowane 100-krotnie rozcieńczonym tritonem.

Komórki poddano 48-godzinnej inkubacji w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przy 5% stężeniu  $\text{CO}_2$ . Po okresie inkubacji komórki zostały zebrane z dołków, wypłukane w roztworze PBS (Biochrom, Niemcy) i odwirowane. Do komórek zawieszonych w buforze wiążącym dodano  $5 \mu\text{l}$  AnnV i  $10 \mu\text{l}$  PI. Po 10 min inkubacji, zmierzono fluorescencję, używając cytometru przepływowego.

Wyniki analizy przedstawione zostały w formie wykresu punktowego „dot-plot” na rysunku jako fig. 5, gdzie A oznacza „dot-plot” kontroli negatywnej, B – wykres punktowy dla komórek linii Jurkat poddanych działaniu  $100 \mu\text{g}$  preparatu lakazy, natomiast C – wykres „dot-plot” dla komórek linii Jurkat poddanych działaniu  $10 \mu\text{g}$  preparatu lakazy.

Każdy z wykresów został podzielony na 4 kwadranty: na kwadrancie R2 widoczna jest nekroza komórek ( $\text{AnnV}^-$ ,  $\text{PI}^+$ ), na kwadrancie R3 – późna apoptoza komórek ( $\text{AnnV}^+$ ,  $\text{PI}^+$ ), kwadrant R4 przedstawia żywe komórki ( $\text{AnnV}^-$ ,  $\text{PI}^-$ ), zaś kwadrant R5 – wczesną apoptozę komórek ( $\text{AnnV}^+$ ,  $\text{PI}^-$ ).

Wyniki badania przedstawiono również w tabeli 5, jako odsetek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych komórek linii Jurkat poddanych działaniu lakazy, w odniesieniu do kontroli negatywnej.

Tabela 5.

Ilość preparatu lakazy [ $\mu\text{g}$ ]	Żywe komórki [%]	Apoptoza [%]	Nekroza [%]
100	2,21	95,67	2,13
10	3,25	95,86	0,88
1	0,82	97,99	1,18
0,75	1,24	97,05	1,71
0,5	1,65	96,76	1,59
0,1	0,68	98,90	0,42
0,01	7,96	90,24	1,81
0,001	8,86	88,98	2,16
Kontrola	99,93	0,05	0,02

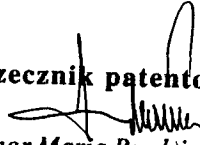
Uzyskane wyniki wskazują na wzrost ilości komórek apoptotycznych po działaniu preparatem lakazy na komórki linii Jurkat.

Przykład 7. Mikroskopowa ocena działania cytotoksycznego lakazy na komórki nowotworowe linii Jurkat oraz RPMI1640.

Komórki nowotworowe linii Jurkat oraz RPMI1640 inkubowano z preparatem lakazy o stężeniu potwierdzonym przy użyciu testów z przykładu 3 i 5 przez 48 godz., po czym oddzielone od podłoża hodowlanego utrwalono przy użyciu 2,5% aldehydu glutarowego, odwirowano i przepłukano 0,1 M buforem fosforanowym. Po usunięciu buforu, preparaty poddano procedurze dehydratacji poprzez wielokrotne rozcieńczenia acetonem i suszeniu. Następnie preparaty napyłano złotem i oglądano przy użyciu mikroskopu skaningowego, porównując

z preparatami kontrolnymi. Zaobserwowano wyraźne zmiany w strukturze i kształcie komórek nowotworowych poddanych działaniu lakazy.

Obrazy mikroskopowe zamieszczono na rysunku jako fig. 6 – komórki kontrolne linii Jurkat; fig.7 – komórki Jurkat po inkubacji z lakazą; fig.8 - komórki kontrolne linii RPMI1640; fig. 9 – komórki linii RPMI1640 po inkubacji z lakazą.

  
Rzecznik patentowy  
mgr Maria Brodzicka