

Метаболизм клеточной линии HepG2 при пролонгированном наблюдении до и после нокаута по гену ТОММ34

Научный руководитель – Поверенная Екатерина Владимировна

Курбатов Илья Юрьевич

Аспирант

НИИ биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, Москва, Россия

E-mail: kurbatild@gmail.com

Клеточные линии незаменимы при проведении практически любых современных исследований в области наук о жизни. И хотя они имеют заслуженную репутацию биологически стабильных в продолжительном периоде времени объектов, аккумулируется все больше данных, свидетельствующих, что эта стабильность локальна и границы ее колеблются при переходе от задачи к задаче. Отсутствие четких и общепринятых процедур контроля молекулярной сохранности клеточных линий ставит под вопрос воспроизводимость получаемых омикс-данных и, тем самым, снижает доверие к результатам экспериментов.

Мы провели лонгитудинальный эксперимент по наблюдению за метаболизмом одной из наиболее популярных в фармакологических и токсикологических исследованиях клеточной линии гепатобластомы человека HepG2. В рамках исследования с учетом скорости деления клеток данной культуры (~48-56 часов) были выбраны пять временных точек - 0, 5, 10, 15 и 20 дней культивирования для профилирования метаболизма. Сертифицированные клетки HepG2 (гепатобластома человека, SCC249, приобретены у Merck, Дармштадт, Германия) были предварительно культивированы пару пассажей для минимизации стрессовых воздействий. В качестве используемого метода профилирования использовали GC*GC-MS, идентификацию проводили с помощью программы ChromaTOF Tile (v. 1.01, LECO Corporation). В результате было идентифицировано 110 метаболитов, изменение содержания которых можно выделить в 3 тренда.

В продолжение исследований циклических изменений нами была проведена работа по изучению границ изменений метаболизма на примере нокаутированной по гену ТОММ34 клеточной линии HepG2 культивируемых в аналогичных условиях. Для каждого образца клеточной линии (как для дикого типа, так и для нокаутированного по гену ТОММ34), все операции и используемые реагенты были максимально унифицированы, чтобы свести к минимуму возможные технические ошибки. В дополнение был использован разработанный принцип нормализации, позволяющий в лучшей мере корректироваться на количество биоматериала.

По итогу были выявлены изменения в относительном содержании метаболитов нокаутированной клеточной линии. Уменьшение количества идентификаций в т.ч. связано с отсутствием в исследуемых профилях сахаров и их конъюгатов, участвующих в числе прочего в пентозофосфатном пути и метаболизме галактозы. Данное наблюдение хорошо согласуется с литературными данными, поскольку нокаут данного гена подавляет производство энергии митохондриями. Проведенная работа демонстрирует вариабельность метаболического профиля клеточной культуры HepG2 на протяжении длительного периода непрерывного культивирования. Надо отметить, что наблюдаемые изменения происходят в течение рекомендованного времени культивирования клеток HepG2. В случае нокаута гена ТОММ34 выявлены новые данные о функции, кодируемого этим геном белка.