

Влияние рекомбинантной метионин- γ -лиазы на биохимические процессы в культуре эукариотических клеток

Научный руководитель – Сольев Павел Николаевич

Каверина Александра Павловна

Студент (магистр)

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, Россия

E-mail: kaverina.a@list.ru

Каверина А.П.¹, Земская А.С.¹, Ревтович С.В.¹, Морозова Е.С.¹, Ануфриева Н.В.¹, Сольев П.Н.¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия.
kaverina.a@list.ru

Многие типы рака имеют метаболический дефект – зависимость от экзогенного метионина, что обуславливает иную от здоровых клеток активность ферментов биосинтеза серосодержащих аминокислот.

Фермент метионин- γ -лиаза (МГЛ) катализирует расщепление серосодержащих аминокислот до аммиака, тиолов и кетокислот в некоторых бактериях, простейших и растениях, а именно реакции γ -элиминирования L-метионина и β -элиминирования L-цистеина и их S-замещенных производных.

Объектами исследований в нашей лаборатории являются рекомбинантные формы фермента МГЛ V358 и МГЛ C115H, имеющие различную субстратную специфичность ввиду структурных модификаций в аминокислотном составе.

Таким образом, каталитическую активность МГЛ возможно использовать в лечении метионин-зависимых типов рака (изучалось на МГЛ V358). МГЛ также возможно использовать в комбинированной терапии рака в качестве компонента фармацевтической пары: в реакции β -элиминирования фермент превращает сульфоксиды S-алк(ен)илзамещенного L-цистеина в противоопухолевые агенты тиосульфиды (изучалось на МГЛ C115H).

Данных по сравнительной активности MGL в отношении нераковых клеток недостаточно для внедрения этих методов терапии, и такое сравнение стало целью нашей работы. Задачами проекта было: 1) рассмотреть цитотоксичность форм MGL и её комбинации с субстратами; 2) оценить активацию генов биосинтеза и метаболизма глутатиона в клетках с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (qPCR). 3) оценить уровень восстановленной формы глутатиона с использованием проточной цитофлуориметрии при добавлении к клеткам МГЛ V358.

С помощью МТТ теста подтвердилось отсутствие цитотоксического эффекта МГЛ V358 и МГЛ C115H на клеточных линиях Нек293Т (клетки почки эмбриона человека с эпителиальной морфологией) и НерG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), максимальная активность тестируемого образца фермента составила 11,8 ед/мл.

Глутатион – серосодержащий трипептид, на биохимические пути которого может влиять внеклеточное присутствие МГЛ. Глутатион не только защищает клетку от токсичных свободных радикалов, но и в целом определяет окислительно-восстановительные характеристики внутриклеточной среды.

Рассматривалась экспрессия следующих генов:

- HO-1, кодирующий фермент гемоксигеназу-1;
- NQO1, кодирующий цитозольный фермент НАДФ(Н)-хиноноксидоредуктазу;
- GCLC, кодирующий каталитическую субъединицу глутамат-цистеинлигазы;
- GCLM, кодирующий регуляторную субъединицу глутамат-цистеинлигазы;

- GS, кодирующий глутаминсинтетазу.

При действии метионина, МГЛ или МГЛ+L-Met происходит незначительное снижение экспрессии генов, кодирующих ферменты NQO1, GCLC и GCLM в клетках линии НерG2. Небольшое снижение экспрессии также наблюдалось и для гена, кодирующего фермент HO-1, однако в высокой концентрации МГЛ уровень его экспрессии не меняется. Также было показано, что МГЛ+ L-Met специфично повышает экспрессию гена глутаминсинтетазы, в то время как значения экспрессии при действии только фермента или только метионина не отличаются от контрольных. Экспрессии генов, кодирующих непосредственно биосинтез глутатиона, не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии ответа клетки на окислительный стресс при воздействии МГЛ отдельно или в комбинации с субстратом даже при высокой активности фермента.

По результатам цитометрического анализа можно сделать вывод, что добавление к клеткам метионин- γ -лиазы повышает уровень GSH только при активности 11,8 единиц белка на одну лунку. В концентрации 2,36 ед./лунка фермент не влияет на уровень GSH. Добавление фермента в сочетании с природным субстратом метионином повышает содержание GSH вне зависимости от количества единиц активности фермента.

Таким образом, МГЛ V358 и МГЛ C115H не являются токсичными и не проявляют влияния на окислительно-восстановительную регуляцию внутриклеточной среды, что доказывает безопасность применения MGL в противораковой терапии. Сульфоксиды, являющиеся субстратами МГЛ, не оказывают токсического воздействия без добавления фермента, а токсическое действие тиосульфидов, по-видимому, вызывает апоптотическую гибель клеток.

Работа поддержана грантом РНФ №20-74-10121-П.