

Модуляция активности дыхательной цепи митохондрий при хемогенетической генерации пирувата в матриксе митохондрий клеток

Научный руководитель – Браже Надежда Александровна

Приходько Дарья Алексеевна

Студент (бакалавр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: prikhodko.da@phystech.edu

Одной из особенностей метаболизма раковых клеток является эффект Варбурга: активация аэробного гликолиза и снижение интенсивности окислительного фосфорилирования за счёт ограничения поступления пирувата в цикл трикарбоновых кислот в митохондриальном матриксе. В связи с этим реактивация митохондриального дыхания в раковых клетках - потенциальная терапевтическая мишень для онкологических заболеваний. Хемогенетический инструмент Grubraw (дегидрогеназа D-аминокислот) [1] служит источником пирувата в матриксе митохондрий за счёт катализа реакции дезаминирования D-аланина. Таким образом, экзогенное внесение D-аланина позволяет, минуя ограничение транспортных белков, генерировать пируват внутри матрикса митохондрий и точно активировать дыхательную цепь.

В данной работе мы использовали микроспектроскопию комбинационного рассеяния (КР) для определения сайта входа электронов в ЭТЦ в ходе работы Grubraw в матриксе митохондрий клеток культуры HeLa Kyoto. Клетки, содержащие хемогенетический конструктор Grubraw с флуоресцентным белком GFP, были предоставлены Екатериной Потехиной и Диной Басс, и вся работа была выполнена совместно с ними и Жанной Бочковой под руководством чл-корр РАН Белоусовым В.В. (Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России). В исследовании использовали следующие группы: экспериментальная группа - клетки HeLa Kyoto, экспрессирующие активную форму фермента Grubraw, и контрольная группа - клетки HeLa Kyoto, экспрессирующие неактивную форму фермента Grubraw. К клеткам последовательно вносили ингибиторы комплексов I и II ЭТЦ (ротенон и малонат), таким образом блокируя транспорт электронов на пул хинонов, затем вносили D-аланин, чтобы активировать Grubraw-зависимое образование пирувата и $FADH_2$, в последнюю очередь вносили ингибитор третьего комплекса ЭТЦ антимицин А. Степень восстановления цитохромов ЭТЦ оценивали по относительной интенсивности их характерных пиков, нормированных на интенсивность липидного пика: (I_{750}/I_{1450}) для цитохромов с типа и (I_{1127}/I_{1450}) для цитохромов b типа. Мы показали, что во всех случаях внесение D-аланина к клеткам с активной формой Grubraw приводило к статистически значимым изменениям в редокс-состоянии цитохромов с и b типов по сравнению с контрольными клетками, содержащими нефункциональную форму фермента.

Полученные данные подтверждают, что образующийся пируват - новый источник электронов - поставляет электроны в ЭТЦ митохондрий и, таким образом, влияет на активность окислительного фосфорилирования. Это открывает перспективы для использования Grubraw в стратегиях, направленных на метаболическое перепрограммирование митохондрий.

Источники и литература

- 1) Potekhina E. S., Ivanenko A. V., Mamaev A. A., Kolesov D. A., Karinaeva A. E., et al. Grubraw, a chemogenetic generator of mitochondrial pyruvate, reveals new mechanisms of mitochondrial metabolic control that underlie the Warburg effect // bioRxiv. 2023. Preprint.