

细胞转录组学和代谢组学整合策略表征突变影响 谷氨酰胺合成酶酶活的关键代谢通路

凌 婷^{1,4#}, 石 京^{1,3#}, 冯婷泽^{1,4}, 裴劭君^{1,4}, 李思悒^{1,2}, 朴海龙^{1,3,4*}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 中国科学院分离分析重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 中国医科大学
附属肿瘤医院胸外科肿瘤研究所, 辽宁省肿瘤医院暨研究所, 辽宁 沈阳 110042; 3. 中国医科大学
生命科学学院生物化学和分子生物学教研室, 辽宁 沈阳 110122; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:谷氨酰胺合成酶(GS)是细胞中唯一可以从头合成谷氨酰胺的酶,在癌症代谢中扮演着重要角色。GS 酶活缺陷突变往往导致严重的代谢疾病甚至是死亡。理解 GS 酶活降低对生理功能的影响可能为靶向治疗提供新的方向,同时对其内在机制的探索可以为治疗干预开辟新的途径。已报道的 GS 酶活缺陷突变包括 R324C(第 324 位精氨酸突变为半胱氨酸)和 R341C(第 341 位精氨酸突变为半胱氨酸)等,本研究新发现了 GS 的另一个酶活缺陷突变位点 K241(第 241 位赖氨酸)。为了探究 GS 酶活缺陷突变带来的影响,本研究利用双组学技术对 GS 的酶活缺陷突变 R324C 和 K241R(第 241 位赖氨酸突变为精氨酸)在肺癌细胞中的功能进行研究,通过对转录组和代谢组数据的整合揭示了 GS 酶活缺陷突变对一些重要生物过程的显著影响。GS 的缺陷突变阻碍了细胞周期和多种氨基酸代谢途径。除了谷氨酰胺合成受到抑制,精氨酸-脯氨酸代谢、甘氨酸-丝氨酸-酪氨酸代谢以及天冬氨酸-谷氨酸-丙氨酸代谢在 GS 突变的细胞中表现出更强的活力,同时,氨酰-tRNA 的生物合成途径也显著被激活。进一步的研究发现,GS 酶活缺陷带来氨基酸代谢的改变源自谷氨酸的重新定向和相关代谢酶的表达变化,同时,氨酰-tRNA 生物合成的激活源自谷氨酰胺在 GS 酶活缺陷细胞中带来的能量应激激活了特定蛋白的表达,如转录因子 4(ATF4)。此外,细胞表型实验表明,GS 酶活缺陷细胞的迁移能力低于野生型细胞。以上结果揭示了 GS 酶活缺陷突变体细胞中的代谢重编程现象,突出了癌细胞代谢的复杂性和适应性。

关键词:谷氨酰胺合成酶突变;转录组学;代谢组学;肺癌;谷氨酰胺

中图分类号:O658 文献标识码:A

Integrative transcriptomics-metabolomics approach to identify metabolic pathways regulated by glutamine synthetase activity

LING Ting^{1,4#}, SHI Jing^{1,3#}, FENG Tingze^{1,4}, PEI Shaojun^{1,4}, LI Siyi^{1,2}, PIAO Hailong^{1,3,4*}

(1. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Cancer Research Institute, Department of Thoracic Surgery, Cancer Hospital of China Medical University, Liaoning Cancer Hospital & Institute, Shenyang 110042, China; 3. Department of Biochemistry & Molecular Biology, School of Life Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Glutamine synthetase (GS), the only enzyme responsible for de novo glutamine synthesis, plays a significant role in cancer progression. As an example of the consequences of GS mutations, the R324C variant causes congenital glutamine deficiency, which results in brain

收稿日期:2024-04-07

共同第一作者。

* 通讯联系人.Tel: (0411) 39787236, E-mail: hpiao@dicp.ac.cn.

基金项目:国家重点研究与发展计划(2022YFA0806503);国家自然科学基金(81972625);大连市科技创新基金(2019J12SN52);辽宁振兴人才计划(XLYC2002035)。

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFA0806503); National Natural Science Foundation of China (No. 81972625); Dalian Science and Technology Innovation Funding (No. 2019J12SN52); Liaoning Revitalization Talents Program (No. XLYC2002035)。

abnormalities and neonatal death. However, the influence of GS-deficient mutations on cancer cells remains relatively unexplored. In this study, we investigated the effects of GS and GS-deficient mutations, including R324C and previously unreported K241R, which serve as models for GS inactivation. This study provided intriguing insights into the intricate relationship between GS mutations and cancer cell metabolism.

Our findings strongly support recent studies that suggest GS deletion leads to the suppression of diverse signaling cascades associated with glutamine metabolism under glutamine-stripping conditions. The affected processes include DNA synthesis, the citric acid cycle, and reactive oxygen species (ROS) detoxification. This suppression originates from the inherent inability of cells to autonomously synthesize glutamine under glutamine-depleted conditions. As a key source of reduced nitrogen, glutamine is crucial for the formation of purine and pyrimidine bases, which are essential building blocks for DNA synthesis. Furthermore, the citric acid cycle is inhibited by the absence of negatively charged glutamate within the mitochondrial matrix, particularly when glutamine is scarce. This deficiency decreases the flux of α -ketoglutarate (α -KG), a principal driver of the citric acid cycle. Intermediate metabolites of the citric acid cycle directly or indirectly contribute to the generation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, a core component of redox homeostasis.

Using the GS_R324C and GS_K241R mutants, we conducted an integrative transcriptomics and metabolomics analysis. The GS mutants with reduced activity activated multiple amino acid biosynthesis pathways, including arginine-proline, glycine-serine-threonine, and alanine-aspartate-glutamate metabolism. This intriguing behavior led us to hypothesize that despite hindrance of the citric acid cycle, abundant intracellular glutamate is redirected through alternative processes, including transamination. Simultaneously, key metabolic enzymes in the amino acid synthesis pathways, such as glutamic-oxaloacetic transaminase 1 (GOT1), glutamic-pyruvic transaminase 2 (GPT2), pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (PYCR1), and phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1), exhibited increased mRNA levels. Additionally, GS deficiency appeared to upregulate the expression of glutamine transporters SLC38A2 and SLC1A5. Thus, restricting extracellular amino acids, such as glutamine, induces a stress response while promoting transcription or translation by a select group of genes, thereby facilitating cellular adaptation. However, similar to GS_WT, both GS_R324C and GS_K241R were modulated by glutamine treatment.

Among GS-activity-dependent behaviors, the increased expression of numerous aminoacyl-tRNA synthetases (ARSs), which are critical for aminoacyl-tRNA biosynthesis, remains poorly understood. Most ARS-encoding genes are transcriptionally induced by activating transcription factor 4 (ATF4), the expression of which increases under oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, hypoxia, and amino acid limitation. In GS-deficient cells, the increased expression of ATF4 was accompanied by pronounced stress caused by glutamine starvation. Thus, ARS up-regulation may predominantly arise from increased ATF4 expression in GS-deficient cells. Additionally, transcriptomic analysis revealed the differential expression of specific genes,

引用本文:凌婷,石京,冯婷泽,裴劭君,李思怿,朴海龙. 细胞转录组学和代谢组学整合策略表征突变影响谷氨酰胺合成酶酶活的关键代谢通路. 色谱, 2025, 43(3):207-219.

LING Ting, SHI Jing, FENG Tingze, PEI Shaojun, LI Siyi, PIAO Hailong. Integrative transcriptomics-metabolomics approach to identify metabolic pathways regulated by glutamine synthetase activity. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(3):207-219.

regardless of GS activity, suggesting that GS is involved in various processes other than glutamine synthesis, including angiogenesis. Although our omics study was limited to H1299 cells, in subsequent experiments, we validated our findings using additional cell lines, including Hepa1-6 and LN-229. To attain a more comprehensive understanding of the impact of the newly identified GS_K241R mutant, our investigation should be extended to various cell types and mouse models.

In summary, we identified and investigated GS-deficient mutations in cancer cells and conducted an integrative transcriptomics-metabolomics analysis with comparisons to wild-type GS. This comprehensive approach provided crucial insights into the intricate pathways modulated by GS activity. Our findings advance the understanding of how GS functions in the context of re-programmed cellular metabolism, particularly during glutamine deprivation. The altered metabolism triggered by elevated glutamate levels arising from GS mutations highlights the remarkable plasticity of cancer cell metabolism. Notably, considering the increasing research focus on GS as a potential therapeutic target in various cancer types, the findings of this study could provide innovative perspectives for drug development and the formulation of clinical treatment strategies.

Key words: glutamine synthetase mutation; transcriptomics; metabolomics; lung cancer; glutamine

谷氨酰胺稳态的维持关系到细胞生理过程的正常进行。大多数癌症细胞的增殖显著地表现出谷氨酰胺成瘾的特征,最近的研究发现不同癌症类型或亚型的代谢过程均发生变化,这进一步印证了癌症是一种代谢疾病这一概念^[1,2]。我们对癌症细胞代谢认知的进步已经改变了肿瘤有氧糖酵解的代谢特征仅仅源于线粒体功能障碍的观念。此外,人们认识到谷氨酰胺是一种多功能生物合成底物,可以通过生成 α -酮戊二酸和柠檬酸参与氧化磷酸化和脂肪酸从头合成途径^[3]。鉴于其多能性,谷氨酰胺在促进癌细胞的生长和存活方面发挥着关键作用^[4]。

除谷氨酰胺外,其他氨基酸也可作为支持三羧酸(TCA)循环的替代能量库^[5,6]。此外,氨基酸在嘌呤和嘧啶(核苷酸结构的重要组成部分)的合成中起着不可或缺的作用^[7-9]。例如丝氨酸在转化成甘氨酸的过程中提供了核苷酸代谢必需的一碳单位^[7]。氨基酸衍生物也积极参与表观遗传调控和翻译后修饰^[10,11],例如氨基酸衍生的乙酰辅酶A是蛋白质乙酰化修饰的直接参与者^[12]。此外,谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸直接参与谷胱甘肽的合成,同时丝氨酸驱动的叶酸循环是磷酸戊糖途径外细胞产生的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的另一条主要途径,而谷胱甘肽和NADPH对于维持氧化还原稳态至关重要^[13,14]。

细胞内的谷氨酰胺可从血液中获得或者通过谷氨酰胺合成酶(GS)催化的从头合成来产生。在肝脏和肾脏中,高表达的GS利用细胞内和细胞外的游离氨来调节酸碱平衡并消除高氨带来的氨中毒现象^[15,16]。在神经系统中,尤其是星形胶质细胞中,GS承担着维持适当谷氨酸水平的责任,从而保护神经元免受兴奋性毒性的影响^[17]。多种癌症中GS表达都显著升高,包括肝癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和肺癌^[16,18-22]。谷氨酰胺是核苷酸产生的重要原料,肿瘤中这种增强的GS表达促进了谷氨酰胺的合成,进而促进了肿瘤的进展^[23]。此外,新兴的研究强调了在特定癌症治疗中GS表达与耐药性之间的相关性,例如在吉非替尼耐药细胞中GS水平降低,而吉非替尼敏感的细胞中GS水平升高,这种差异表明GS在影响癌症耐药性和治疗结果方面具有潜在作用^[21,24]。

尽管如此,对突变引起GS酶活缺陷的报道相对较少,仅在患者病例中报告了少数突变,包括R324C和R341C^[25,26]。此外,对于GS酶活缺陷所产生的生物学效应和生理功能也罕有报道。本研究通过全面整合转录组学和代谢组学分析弥补空缺,目的是揭示GS酶活缺陷突变体R324C和K241R(第241位赖氨酸突变为精氨酸)对肺癌细胞代谢途径的调节和影响,研究结果最终揭示了GS酶活

缺陷突变对氨基酸代谢相关的特定信号通路产生了显著的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

G7100A 毛细管电泳仪、G6224A 飞行时间质谱仪 (TOF-MS) 和 8890-G3542A 气相色谱-质谱仪 (GC-MS) 购自美国 Agilent 公司。毛细管电泳-质谱 (CE-MS) 代谢分析中使用的熔融石英毛细管 (80 cm×50 μm i.d.) 购自日本 HMT 公司。用来进行定量 PCR 反应的 CFX-96 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

人肺癌细胞系 H1299 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库 (CTCC)。人胚肾细胞系 HEK293T、人胶质瘤细胞系 LN-229 和小鼠肝癌细胞系 Hepa1-6 来自美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。完全或不含谷氨酰胺的 RPMI-1640 细胞培养基、完全或不含谷氨酰胺的 DMEM 细胞培养基购自中国美仑生物科技有限公司。细胞培养所用血清 (FBS) 购自美国 GBI 公司, 青霉素/链霉素、 CO_2 细胞加湿培养箱购自美国 Thermo 公司。蛋白酶和磷酸酶抑制剂购自美国 Bimake 公司。RNA 提取所用的 RNAiso Plus 试剂、反转录试剂 PrimeScript™ RT Master Mix 均购自日本 TaKaRa 公司。实时荧光定量 PCR 所用试剂 StepOnePlus 和 SYBR-Green I 均购自瑞士 Roche 公司。磷酸盐溶液 (PBS)、引物购自上海生工生物工程公司。

抗体: 抗 GS 一抗购自美国 BD Biosciences 公司, 抗 Vinculin 抗体、抗 S6 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 抗 pS6 抗体购自美国 Cell Signaling 公司。慢病毒载体 PBOBI 载体和 LentiCRISPR-V2 均来自厦门大学林圣彩实验室。

1.2 细胞培养、质粒构建与细胞侵袭

细胞培养^[27]: H1299 细胞接种在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基中培养。Hepa1-6、HEK293T 和 LN-229 细胞均接种在含有 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中培养。在制备样品时, 用 PBS 洗涤细胞并在不含谷氨酰胺的培养基中培养。

质粒构建^[28]: 将重叠延伸 PCR 产生 GS 的突变体克隆到 PBOBI 载体中。所有质粒的验证均通过 DNA 测序的方法进行。GS 敲除的慢病毒载体的构建: 将单导向 *GLUL* (*sgGLUL*) 序列克隆到 LentiCRISPR-V2 载体中, 具体来说, 利用单酶切连接的方法将退火的单导向 RNA (*sgRNA*) 序列连接到位于

线性化载体 U6 启动子后的 BsmBI 位点上。靶向 *GLUL* 的序列为 Human *GLUL* *sgRNA* (AAGTACAATCGAAGGCCTGC)。

细胞侵袭^[28]: 转染 48 h 后收集含有病毒的上清液, 通过 0.45 μm 滤膜过滤去除细胞碎片, 然后添加到靶细胞培养基中。18 h 后, 用对应的抗生素进行筛选。

1.3 谷氨酰胺合成酶活性检测

GS 催化的 γ -谷氨酰胺羟胺转移实验按照 Haghghat^[29] 的描述进行。简而言之, 用 150 μL 50 mmol/L 咪唑水溶液 (pH 6.8) 重悬细胞后, 将其置于 -80°C 冰箱中, 30 min 后取出样品并置于室温进行解冻, 随后离心, 取上清, 获得细胞裂解液。取 50 μL 细胞裂解液, 用于蛋白质印迹定量, 剩余裂解液与等体积的反应缓冲液 (含 50 mmol/L 咪唑、20 mmol/L Na_2HPO_4 、0.16 mmol/L 二磷酸腺苷 (ADP)、50 mmol/L 谷氨酰胺 (Gln)、25 mmol/L 羟胺、2 mmol/L MnCl_2 的水溶液) 混合并在 37°C 下孵育 45 min。用 400 μL 终止液 (含 2.42% FeCl_3 、1.45% 三氯乙酸和 1.82% HCl 的水溶液) 终止反应。在 540 nm 处测定吸光度。

1.4 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (qPCR)

将细胞接种于 6 cm 培养皿中, 并在含有 10% 血清的 DMEM 或 RPMI-1640 培养基中培养。对于样品制备, 待细胞完全贴壁后用 PBS 洗涤细胞并在无谷氨酰胺的培养基中培养 8 h。如文献^[28]所述, 通过 RNAiso Plus 试剂进行细胞样品的 RNA 抽提, 使用 PrimeScript™ RT Master Mix 通过逆转录反应获得 cDNA。实时荧光定量 PCR 由 StepOnePlus 和用于检测的 DNA 双链特异性试剂 SYBR-Green I 在 CFX-96 仪器中进行。引物序列如表 1 所示。

1.5 基于 CE-MS 的代谢组学分析

使用甲醇 (700 μL) 进行细胞刮取, 使用氯仿 (700 μL) 对样品进行涡旋后加入超纯水 (280 μL) 涡旋并静置 5 min, 在 4°C 下以 15 000 g 离心 15 min, 并将过滤的水相冷冻干燥。随后, 样品通过熔融石英毛细管进行色谱分离, 使用 CE 系统结合 TOF-MS 进行整体代谢物分析。CE-MS 分析方法按照先前建立的步骤^[30] 进行。代谢组学数据根据总峰面积校正标准化后, 使用 MeV 4.8.1 进行热图可视化。采用 SIMCA 软件进行 PLS-DA 分析, 对投影中的可变重要性 (VIP) 值大于 1 的代

表 1 qPCR 所用的引物信息
Table 1 Primers used in quantitative real-time PCR (qPCR) assay

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
GLUL	GCCTCAGGGTGAGAAAGTCC	TCCGTTTACAGGTGTGCCTC
GLNS2	GGCACATGCCAAGCTGGATA	AGTGGCTCTGCTAGGGAGAA
POLE2	TGTTTGTACCTGGTCCAGAGG	TCTTGAAAAGAGCCAGGGT
FEN1	CCCAAAGGCCAGTCATCCCT	GCGGTAGAACATGCCCATCA
MCM4	TCCTTGTCGCGCAGGTACT	TCAAAGTCAAGAGGGATAGCTGA
CCNB1	GACCTGTGTCAAGGCTTTCTCTG	GGTATTTTGGTCTGACTGCTTGC
CCND1	TCTACACGACAACATCCATCCG	TCTGGCATTTTGGAGAGGAAAGTG
CCND3	AGATCAAGCCGCACATGCGGAA	ACGCAAGACAGGTAGCGATCCA
CDC6	GGAGATGTTGCGAAAGCACTGG	GGAATCAGAGGCTCAGAAGGTG
ATF4	TTCTCCAGCGACAAGGCTAAGG	CTCCAACATCCAATCTGTCCCG

谢物进行单因素方差分析从而开展多组间比较。通过基于网络的 MetaboAnalyst ([https:// genap.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/](https://genap.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/)) 进行差异蛋白通路富集分析。

1.6 基于 GC-MS 的代谢分析

对于 GC-MS 样品的准备,提前对接种在 10 cm 培养皿中的细胞进行 8 h 谷氨酰胺饥饿处理,将培养基更换为含 0.2 mmol/L 谷氨酰胺、2 mmol/L ¹⁵NH₄Cl 的 RPIM-1640 培养基。标记 0.5 h 后,用 0.9% NaCl 洗涤细胞,并用液氮淬灭,以进行下一步代谢物提取。使用 80% 甲醇水溶液进行细胞中代谢物的提取,在 4 ℃ 下以 15 000 g 离心 15 min,取上清液进行冷冻干燥。代谢物衍生化按照先前建立的步骤进行^[31]。样品在 DB-624 MS 毛细管柱 (20 m×0.18 mm×1 μm, Agilent Technologies, 美国)上分离,在 70 eV 电子轰击下运行的单四极杆质谱仪中电离;进样口、接口和离子源温度均保持在 230 ℃,四极杆温度保持在 150 ℃;以 1:21 的分流比进样 1 μL 样品;载气氮气流速恒定为 0.95 mL/min,柱温起始于 35 ℃,并以 25 ℃/min 的速率升高直至 240 ℃;在选择离子监测 (SIM) 模式下进行代谢物同位素谱分析。

1.7 RNA 测序和生物信息学分析

RNA 测序由广州锐博生物科技有限公司完成,测序的具体过程见文献[32]。简而言之,对总 RNA 进行清洁和富集后,进行逆转录反应,并在反应中加入 barcode 和适配子序列,制备的 cDNA 库经过质量评估并使用 Illumina 平台 (Illumina, 美国) 测序。采用 DESeq2 软件进行基因差异表达分析。调整后的 *P* 值小于 0.05 且 log₂ Fold change 大于 1 的基因被归类为正差异表达基因。使用 R 编程语言进行通路富集分析。

1.8 Transwell 迁移实验

Transwell 迁移实验按照文献[33]所述进行。将约 3×10⁵ 个细胞接种在带有未包被膜 (24-well insert, BD Biosciences, 美国) 的上室中,室中加入 200 μL 不含血清和谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基。将 700 μL 不含谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基 (含 20% FBS) 倒入下室中。Transwell 板在 37 ℃ 下孵育 10 h。将通过孔迁移的细胞用冷甲醇固定,用结晶紫染色,并在光学显微镜下计数,以确定每个实验组中迁移细胞的数量。

1.9 统计分析

每个实验重复 3 次或以上。除非另有说明,数据表示为平均值±标准误差。使用 *t* 检验 (不配对, 双尾) 进行分析,以比较两个独立样本的差异。通过 *t* 检验分析的数据服从正态分布,我们进行 *F* 检验来比较方差,结果没有显著差异。因此,当使用未配对 *t* 检验时,我们假设方差相等,并且没有样本被排除在分析之外。*P*<0.05 表示有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 GS 酶活关键位点 K241 的鉴定

在之前关于 GS 的苏木化的研究^[34]中,我们发现第 241 位赖氨酸 (K241) 的突变对 GS 的酶活产生了重大影响。为了更加全面地了解 K241R 突变体的酶活,我们在 HEK293T 细胞中过表达不同剂量的 K241R 突变体和野生型 GS 质粒,并对细胞进行了体外酶活检测。值得注意的是,与野生型 GS 相比,K241R 突变体的酶活性明显降低 (图 1a)。为了排除精氨酸引入带来的非特异性影响,我们在 K241 处引入不同氨基酸 (包括丙氨酸和甘氨酸) 突变。正如预期的那样,在突变成其他氨基酸后,K241 位的 GS 突变体依然表现出低于野生型蛋白的酶活,

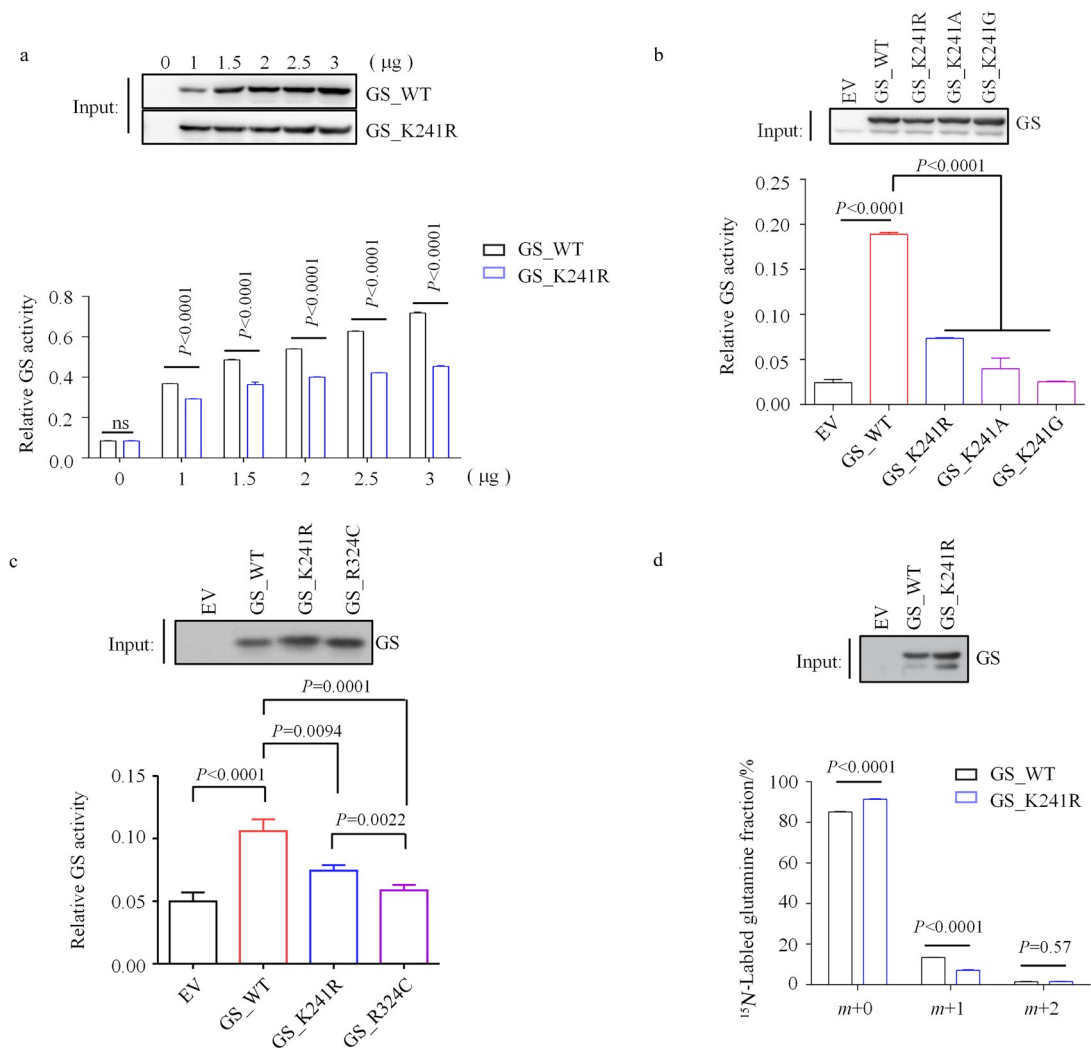


图 1 GS 和突变体 K241R 的酶活

Fig. 1 Enzyme activities of glutamine synthetase (GS) and GS_K241R

a: Enzyme activities of GS (wild type (WT) and mutant K241R), as determined by the accumulation of γ -glutamyl hydroxamate (bottom), and western blot analysis of protein expression (top). b: Enzyme activities of GS_WT, GS_K241R, GS_K241A and GS_K241G, as determined by the accumulation of γ -glutamyl hydroxamate (bottom, $n=3$), and western bolt analysis of protein expression (top). c: Enzyme activities of GS_WT, GS_K241R, and GS_R324C, as determined by the accumulation of γ -glutamyl hydroxamate (bottom, $n=3$), and western blot analysis of protein expression (top). d: Glutamine-producing activities of GS_WT and GS_K241R in GS-knockout H1299 cells ($m+0$: unlabeled glutamine, $m+1$: glutamine labeled with one ^{15}N atom, and $m+2$: glutamine labeled with two ^{15}N atoms), as determined by GC-MS analysis of the ^{15}N -labeled glutamine fractions (bottom), and western blot analysis of protein expression (top).

EV: empty vector; ns: not significant.

这表明 K241 这个位点在协调谷氨酰胺合成活性中可能具有关键作用(图 1b)。此外,与已被报道的 GS 酶活缺陷突变 R324C 相比,K241R 突变 GS 显示出相似的酶活水平(图 1c)。

为了进一步确认 GS 酶活缺陷突变体 K241R 的酶活水平,我们在已经敲除 GS 的肺癌细胞系 H1299 中重新进行了 GS 野生型、突变体 K241R 以及空载体(EV)的引入。单胺氧化酶 A(MAOA)是调节生物体内氨的最重要的酶之一^[35],而以上细胞

系中 MAOA 的 mRNA 水平并无二致(附图 1a,详见 www.chrom-China.com),这说明细胞内氨的产生不存在明显差异。之后,对表达 GS 野生型或突变体 K241R 的细胞在含 ^{15}N 标记的氯化铵、不含谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基中进行了 30 min 的标记后进行 GC-MS 分析。结果显示,在 GS 野生型细胞中,大约 13% 的谷氨酰胺被标记,而 K241R 细胞仅仅只有 6% 的标记量(图 1d)。这种显著的差异再一次验证了 GS 的 K241 处的突变是酶活缺陷突变。

2.2 通过 RNA 测序分析 GS 调控的转录本

为了进一步探究 GS 调控的基因表达,我们对 GS 敲除后的 H1299 细胞进行了 RNA 测序分析(图 2a)。与对照组细胞相比,GS 敲除组细胞中 183 个基因上调,218 个基因下调(图 2b)。使用京都基因

与基因组百科全书(KEGG)数据库进行进一步分析得到了与变化基因相关的生物过程,包括细胞有丝分裂、DNA 合成和细胞凋亡等(图 2c)。

随后,采用标准化富集评分分析发现了一些信号通路在 GS 敲除的细胞中表现出明显的抑制状

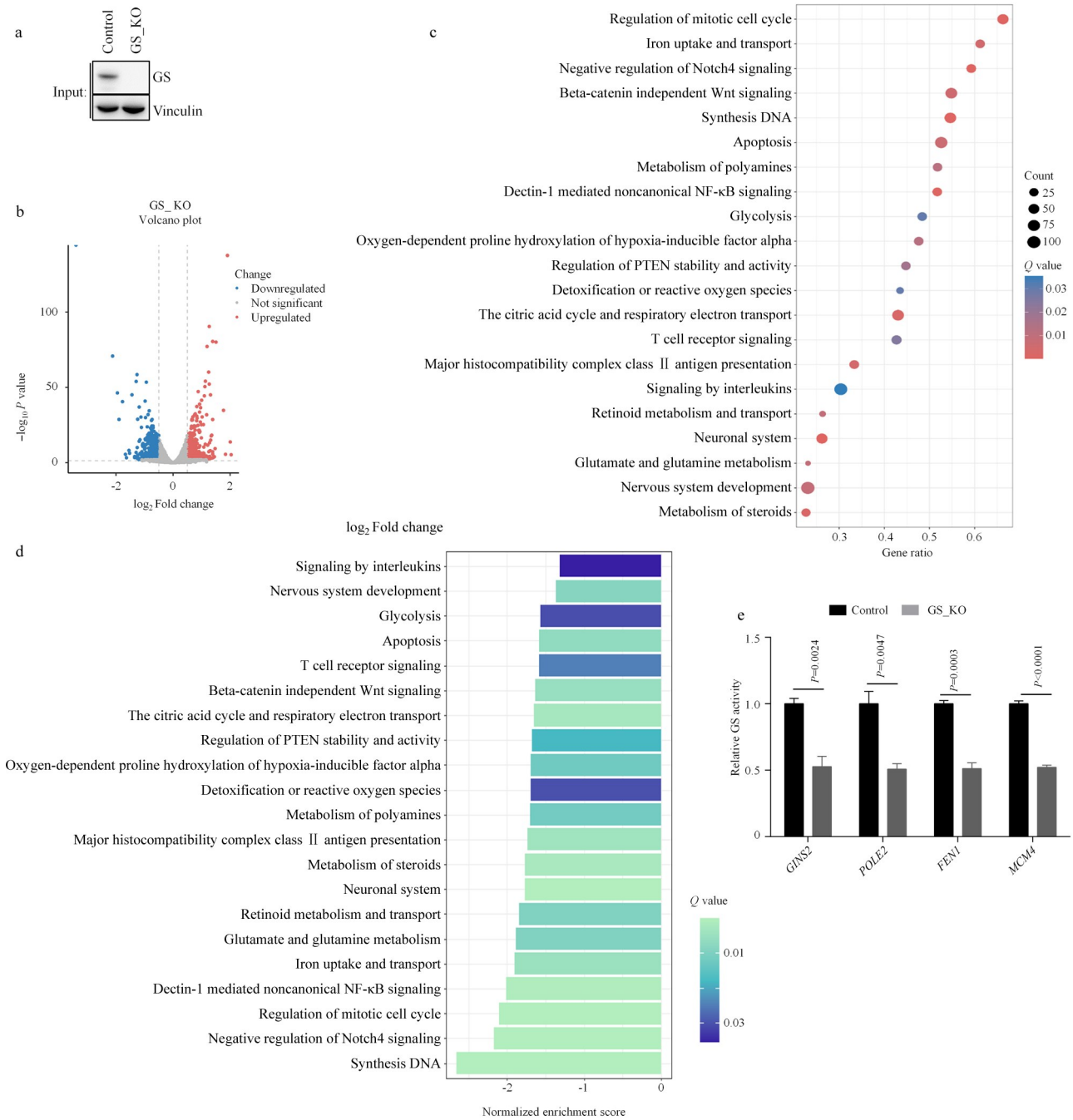


图 2 GS 敲除细胞的 RNA 测序分析

Fig. 2 RNA sequencing analysis of GS-knockout (KO) H1299 cells

a; Western blot analysis of GS-KO H1299 cells. b; Volcano plot of differential mRNA levels in control and GS-KO cells (cut-off criteria: P value <0.05 , $|\log_2$ Fold change >0.5 ; blue and red plots indicate downregulated and upregulated mRNA, respectively). c; Gene set enrichment analysis (GSEA) results for 402 differential mRNA levels. d; Normalized enrichment score (NES) analysis. e; mRNA levels of genes associated with the DNA synthesis pathway.

态,包括与离子的摄取与转运、神经系统发育和糖酵解信号传导相关的途径等(图 2d)。此外,我们在 H1299 中重新进行了 RNA 的提取,并对 DNA 合成相关的基因的转录水平进行了验证,包括 *GLNS2*、*POLE2*、*FEN1* 和 *MCM6*,结果显示这些基因的转录在 GS 酶活缺陷的细胞系中受到抑制(图 2e)。为了验证结果的普适性,在 GS 敲除的人胶质细胞 LN-229 和小鼠肝细胞 Hepa1-6 中,我们对上述 DNA 合成相关的基因同样进行了验证,得到了相同的结论(附图 2a)。

2.3 筛选依赖 GS 酶活性的下游信号途径

高表达的 GS 通过促进谷氨酰胺合成显著促进肿瘤进展。尽管人们不断探索潜在的分子机制,但对 GS 酶活缺陷引起的转录变化仍然了解有限^[36]。为了探究 GS 酶活缺陷对细胞的影响,在 GS 敲除后的 H1299 细胞中重新引入了 GS 野生型以及新发现的酶活缺陷突变体 K241R 和前面提到的新生儿致死突变 R324C(图 3a)。随后,通过 RNA 测序,揭示了不同组间差异表达的基因(图 3b)。此外,通过比较 GS 野生型和不同突变体之间的基因,分别在表达 GS_K241R 和 GS_R324C 的细胞中鉴定了 1 462 个和 1 158 个差异基因(图 3c)。KEGG 分析进一步证实了 GS 酶活缺陷对氨基酸生物合成、DNA 复制和细胞周期相关的基因的表达产生了巨大影响(仅举几例,如图 3d 所示)。此外,调节细胞周期的特定基因(如 *CCNB1*、*CCND1/3* 和 *CDC6*),在表达 GS 酶活缺陷突变的 H1299 细胞中相比表达野生型 GS 的细胞表现出显著的下调(如图 3e 所示)。同时,我们在敲除 GS 的 LN-229 细胞中同样进行了 GS 野生型和突变体回补的稳定细胞系的构建(附图 1c),并对上述细胞周期相关的基因转录水平进行了检测,结果与 H1299 细胞类似(附图 2b)。

2.4 确定 GS 酶活缺陷影响的代谢途径和代谢物

GS 酶活缺陷可能导致新生儿早夭,同时 GS 的异常表达在多发性骨髓瘤和少突胶质细胞瘤中已得到证实^[26,37,38]。为了揭示 GS 酶活缺陷突变引起的代谢变化,本研究利用 CE-MS 对上述提到的 GS 野生型和突变体稳转 H1299 细胞系进行了代谢组学分析,并对得到的代谢物进行了热图展示(附图 3a)。PLS-DA 分析发现,4 个组别(EV、GS_WT、GS_K241R 和 GS_R324C)得到了很好的区分(附图 3b, c)。利用 MetaboAnalyst 软件对主成分中 VIP 值大于 1 的代谢物(附图 3d)进行代谢通路分析,结

果显示精氨酸生物合成和嘌呤代谢等途径在野生型和突变 GS 组中存在显著差异(图 4a)。此外,通过比较 GS 野生型和突变体细胞之间的代谢数据,我们得到了 44 种差异代谢物(图 4b)。上述结果表明 GS 酶活缺陷可以影响包括精氨酸-脯氨酸在内的多种氨基酸代谢途径,我们对其其中的一些代谢物的含量进行了详细表征(图 4c)。

2.5 探索 GS 突变影响代谢途径的机制

生物过程本质上具有复杂性和整体性,通常需要采取多方面的手段来充分揭示疾病发生和进展的复杂机制。采用代谢组学分析和转录组学分析相结合的方法可以提供双重视角,从而更全面地了解 GS 酶活变化对生物过程的影响。双组学整合的研究结果揭示了响应 GS 酶活变化的 4 个途径,即精氨酸-脯氨酸代谢、甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢、天冬氨酸-谷氨酸代谢以及氨酰-tRNA 生物合成(图 5a)。

对氨基酸代谢途径的进一步整合揭示了其中关键的差异表达基因,包括与精氨酸-脯氨酸代谢相关的基因(*PYCR1*、*ODC1*、*SAT1*、*SMOX*),与甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢相关的基因(*DMGDH*、*PHGDH*、*PSAT1*、*SDSL*、*SHMT*)(附图 4b),以及与天冬氨酸-谷氨酸-丙氨酸代谢相关的基因(*ASNS*、*GOT1*、*GPT2*)(附图 4c)。我们在 H1299 和 LN-229 的 GS 稳转细胞系中重新对 ASNS 和 GOT1 的转录水平进行了检测,结果与 RNA 测序的结果吻合(附图 2c)。在谷氨酰胺饥饿条件下 GS 酶活缺陷的细胞的 ASNS 和 GOT1 水平有所提高,这可能是由这两种酶各自的底物天冬酰胺和谷氨酸水平升高所引起的;同时,这种条件下 GS 酶活缺陷细胞多种氨基酸水平的增加和氨酰-tRNA 合成酶(ARS)表达的增加(附图 4d, e),说明尽管在 GS 酶活缺陷细胞中谷氨酰胺的合成受到抑制,但是细胞通过其他氨基酸的补充和 ARS 的上调进行弥补,维持 RNA 翻译并促进 tRNA 依赖性的生物修饰。同时,谷氨酰胺合成的减少激活了 H1299 和 LN-229 中转录因子 4(ATF4)的表达(图 5b)。ATF4 是一种应激诱导的转录因子,负责大多数编码胞质 ARS 基因的转录^[39,40]。概括说来,谷氨酰胺饥饿导致 GS 酶活缺陷细胞中的谷氨酰胺含量明显低于野生型细胞,而谷氨酰胺水平的降低引起了谷氨酸水平的升高和其他代谢物的变化,同时相关基因的表达也受到影响(图 5c)。细胞迁移能力与谷氨酰胺合成能力息息相关,为揭示 GS 酶活缺陷的生理功能,我们对细胞

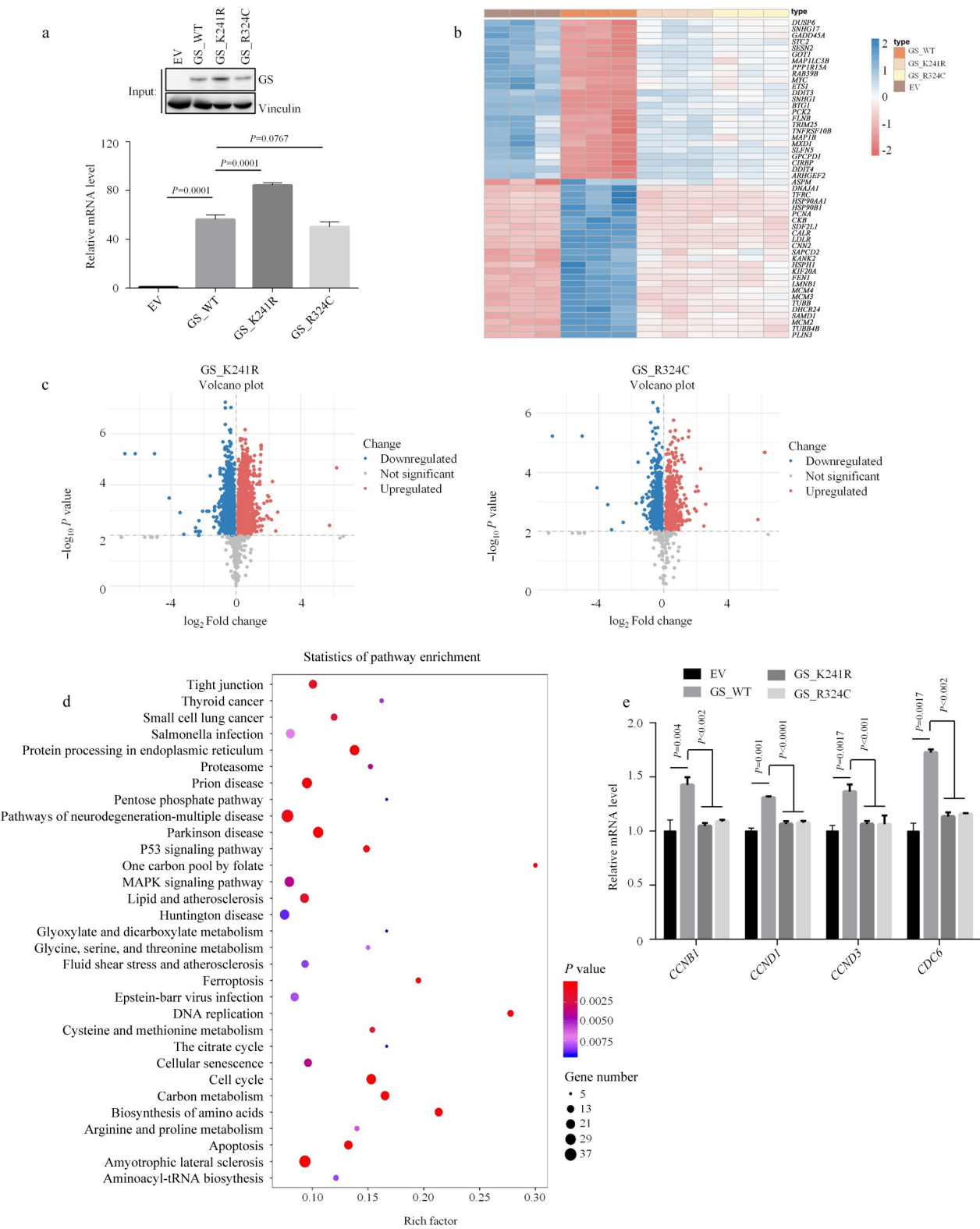


图 3 H1299 细胞中 GS 重新敲入的 RNA 测序分析

Fig. 3 RNA sequencing analysis of GS-reexpressed H1299 cells

a; Western blot analysis (top) and relative mRNA levels (bottom, $n=3$) of GS-KO H1299 cells transfected with GS_WT, GS_K241R, and GS_R324C plasmids. b; Heatmap of gene expression changes in the cells in (a). c; Volcano plot of differential mRNA levels in GS_K241R and GS_R324C cells (cut-off line at P value=0.01; blue and red plots indicate downregulated and upregulated mRNA, respectively). d; Pathway analysis of 1371 differential mRNA levels. e; mRNA levels of genes associated with the cell cycle ($n=3$).

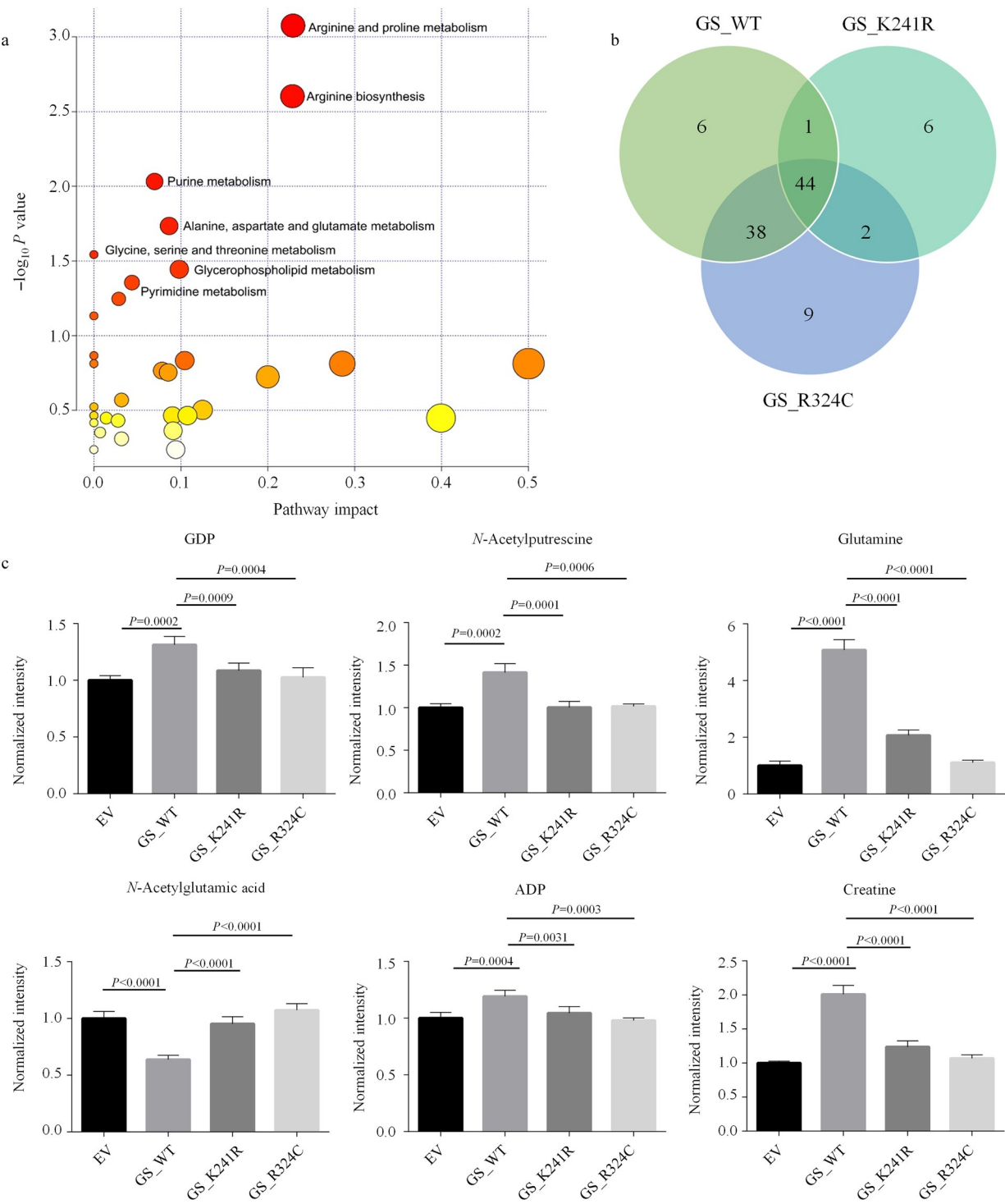


图 4 GS 突变对 H1299 细胞中代谢物和代谢通路的影响

Fig. 4 Effects of GS mutations on metabolites and metabolic pathways in H1299 cells

a: MetaboAnalyst analysis of metabolic pathways using 41 altered metabolites (VIP>1). b: Venn diagram of differential metabolites in GS-KO H1299 cells transfected with GS_WT, GS_K241R, and GS_R324C plasmids using one-way analysis of variance. c: Changes in guanosine diphosphate, *N*-acetylputrescine, glutamine, *N*-acetylglutamic acid, adenosine diphosphate, and creatine in EV, GS_WT, GS_K241R, and GS_R324C H1299 cells ($n=5$; data are expressed as mean $\pm$ SD).

的迁移能力进行了检测,结果显示表达 GS 野生型的细胞表现出更强的迁移能力,而表达 GS 酶活缺

陷突变体 K241R 和 R324C 的细胞其迁移能力明显受到抑制(图 5d)。

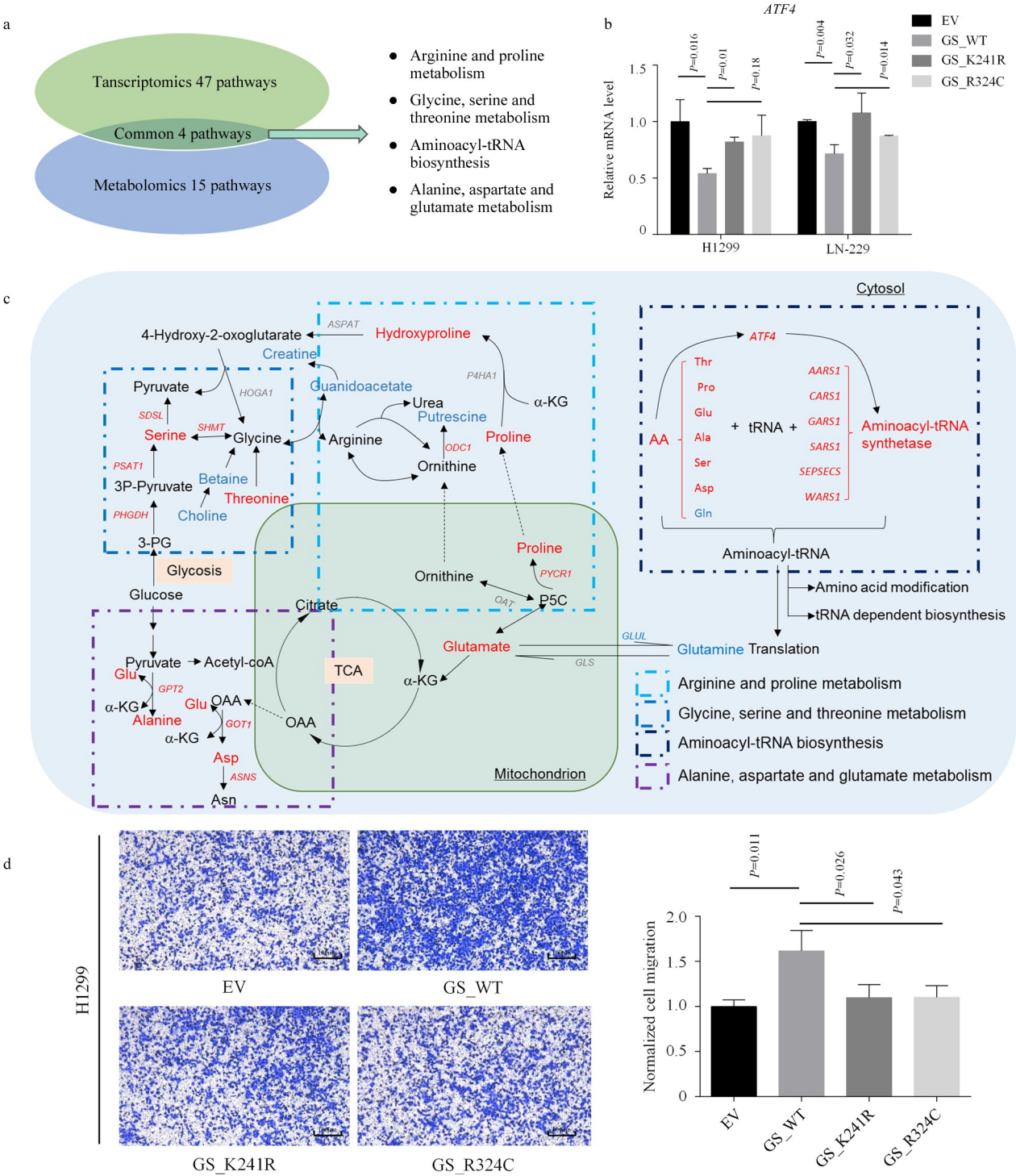


图 5 转录组学-代谢组学整合分析 GS 酶活缺陷突变影响的代谢通路

Fig. 5 Integration of transcriptomics and metabolomics to analyze altered metabolic pathways affected by GS-deficient mutations

a: Venn diagram of altered metabolic pathways in the transcriptomics-metabolomics analysis. b: ATF4 mRNA level in GS-KO H1299 and LN-229 cells transfected with EV, GS_WT, GS_K241R, and GS_R324C plasmids. c: Diagram of integrated metabolites and genes involved in arginine-proline metabolism, glycine-serine-threonine metabolism, aminoacyl-tRNA biosynthesis, and alanine-aspartate-glutamate metabolism (red and blue indicate increased and decreased metabolites or genes, respectively, in GS_K241R and GS_R324C cells compared with GS_WT cells). d: Transwell migration assay. Representative images and data quantification for H1299 cells that migrated through the transwell with ectopic expression of EV, GS_WT, GS_K241R, or GS_R324C (data from three independent experiments). Scale bar: 100 μ m.

2.6 讨论

我们的研究结果从新的角度支持了最近的报道,即在谷氨酰胺剥离条件下,GS 的缺失会导致与谷氨酰胺代谢相关的多种信号级联被抑制^[4,41,42]。这些过程包括 DNA 合成、柠檬酸循环和活性氧(ROS)解毒等。这种抑制源于 GS 酶活缺陷细胞在谷氨酰胺耗尽的条件下细胞无法正常自主合成谷氨酰胺。

利用 GS 的 R324C 和 K241R 突变体,我们进行了转录组学和代谢组学的整合分析。这些酶活性降低的 GS 突变体激活了多种氨基酸生物合成途径,例如精氨酸和脯氨酸代谢,甘氨酸-丝氨酸-苏氨酸代谢和丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢。此外,GS 酶活缺陷似乎会导致谷氨酰胺转运蛋白 SLC38A2 和 SLC1A5 表达上调(附图 2d)。事实上,细胞外氨基酸(例如谷氨酰胺)限制会引发应激反应,促使一组特定的基因转录或翻译上调,从而使细胞适应变化^[43-45]。此外,与野生型 GS 类似,R324C 和 K241R 突变体在谷氨酰胺饥饿处理时蛋白水平都有所提高,这说明 GS 酶活水平的高低似乎并不会影响其受到谷氨酰胺浓度调控的这一特征(附图 1b)。

在 GS 酶活依赖性数据整合分析中,令人困惑的方面在于许多 ARS 的表达增强,而 ARS 是氨基-tRNA 生物合成的关键参与者。据报道,大多数 ARS 编码基因是由 ATF4 转录诱导的,在氧化应激、内质网应激和缺氧以及氨基酸限制的条件下,ATF4 的表达增加^[46]。考虑到 GS 酶活缺陷的细胞中 ATF4 表达增加,再加上这些细胞中谷氨酰胺饥饿会造成更明显的应激,有理由认为 ARS 的上调主要来自 GS 酶活缺陷背景下 ATF4 表达的增加。此外,转录组学数据分析发现,与对照细胞相比,表达野生型或酶活缺失的 GS 蛋白的某些基因都表现出差异表达,证实了 GS 在细胞中的多功能性,例如其在谷氨酰胺合成之外的血管生成中的作用^[31]。我们的组学研究范围仅限于 H1299 细胞,但在随后的实验中,我们使用其他细胞系(包括 Hepa1-6 和 LN-229 细胞)验证了我们的发现,确认了本研究发现的可靠性。为了更全面地理解新发现的 GS 的 K241R 突变影响的信号途径和生理过程,后续我们会将研究范围扩展到更多细胞类型及小鼠模型中,为揭示 GS 的生物学功能提供更多线索。

3 结语

综上,我们发现了影响 GS 酶活的关键突变,并在肺癌细胞中通过转录组学和代谢组学对 GS 及其酶活缺陷突变体影响的信号通路和代谢过程进行了对比与整合,为 GS 以酶活依赖方式调节的复杂途径提供了重要信息。这项研究扩展了我们对 GS 如何在细胞代谢重编程背景下,特别是在谷氨酰胺缺乏时发挥作用的理解。GS 酶活缺陷引起的谷氨酸水平升高引发的代谢重编程提示了癌细胞代谢的高度可塑性。值得注意的是,考虑到 GS 作为各种癌症前瞻性治疗靶点的新兴研究不断涌现^[20,21,36-38,47,48],该研究可能会对靶向 GS 酶活的治疗药物的开发提供创新性的临床治疗参考。

参考文献:

- [1] Gyamfi J, Kim J, Choi J. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1155
- [2] Seyfried T N, Shelton L M. *Nutr Metab*, 2010, 7(1): 7
- [3] Seyfried T N. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3: 43
- [4] Yang L, Moss T, Mangala L S, et al. *Mol Syst Biol*, 2014, 10(5): 728
- [5] Green C R, Wallace M, Divakaruni A S, et al. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(1): 15
- [6] Hensley C T, Wasti A T, DeBerardinis R J. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 3678
- [7] Locasale J W. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(8): 572
- [8] Shuvalov O, Petukhov A, Daks A, et al. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 23955
- [9] Zhang Y, Morar M, Ealick S E. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(23): 3699
- [10] Lieu E L, Nguyen T, Rhyne S, et al. *Exp Mol Med*, 2020, 52(1): 15
- [11] Pegg A E. *IUBMB Life*, 2009, 61(9): 880
- [12] Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro J M, et al. *Cell Metab*, 2015, 21(6): 805
- [13] Fan J, Ye J, Kamphorst J J, et al. *Nature*, 2014, 510(7504): 298
- [14] Chung W J, Lyons S A, Nelson G M, et al. *J Neurosci*, 2005, 25(31): 7101
- [15] Janicki R H, Goldstein L. *Am J Physiol*, 1969, 216(5): 1107
- [16] Wasfy R E, Shams Eldeen A A. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(11): 4769
- [17] Suárez I, Bodega G, Fernández B. *Neurochem Int*, 2002, 41(2/3): 123
- [18] Strohecker A M. *Cancer Discov*, 2013, 3(11): 1272
- [19] Annese T, Tamma R, Ruggieri S, et al. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(3): 381
- [20] Fan S, Wang Y, Zhang Z, et al. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 6008
- [21] Wang L, Peng W, Wu T, et al. *Cell Death Discov*, 2018, 4: 24

[22] Wang Y, Fan S, Lu J, et al. J Cell Biochem, 2017, 118 (8): 2018

[23] Tardito S, Oudin A, Ahmed S U, et al. Nat Cell Biol, 2015, 17(12): 1556

[24] Vettore L, Westbrook R L, Tennant D A. Br J Cancer, 2020, 122(2): 150

[25] Häberle J. NEJM, 2005, 353(18): 1926

[26] Häberle J, Shahbeck N, Ibrahim K, et al. Molecular Genetics and Metabolism, 2011, 103(1): 89

[27] Yan M, Liu J, Xia T, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(8): 887
严敏, 刘静, 夏天, 等. 色谱, 2019, 37(8): 887

[28] Xia T, Chen D, Liu X, et al. Cell Death & Disease, 2022, 13(4): 314

[29] Haghighat N. Neurochem Res, 2005, 30(5): 661

[30] Zeng J, Yin P, Tan Y, et al. J Proteome Res, 2014, 13(7): 3420

[31] Eelen G, Dubois C, Cantelmo A R, et al. Nature, 2018, 561(7721): 63

[32] Xu X, Wang X, Chen Q, et al. J Transl Med, 2023, 21(1): 307

[33] Piao H L, Yuan Y, Wang M, et al. Nat Cell Biol, 2014, 16 (3): 245

[34] Ling T, Li S, Chen H, et al. FASEB J, 2023, 37(12): e23319

[35] Hu S, Deng L, Wang H, et al. Cytotechnology, 2011, 63 (3): 247

[36] MacKerell A, Frieg B, Görg B, et al. PLOS Comput Biol, 2016, 12(2): e1004693

[37] Bolzoni M, Chiu M, Accardi F, et al. Blood, 2016, 128 (5): 667

[38] Chiu M, Taurino G, Bianchi M G, et al. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1099

[39] Shan J, Zhang F, Sharkey J, et al. Nucleic Acids Res, 2016, 44(20): 9719

[40] Sung Y, Yoon I, Han J M, et al. Exp Mol Med, 2022, 54 (5): 553

[41] Yang L. Annu Rev Biomed Eng, 2017, 19: 163

[42] Chen L, Cui H. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 22830

[43] Stretton C, Lipina C, Hyde R, et al. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(6): 978

[44] Gazzola R F, Sala R, Bussolati O, et al. FEBS Lett, 2001, 490(1/2): 11

[45] Amaya M L, Inguva A, Pei S, et al. Blood, 2022, 139(4): 584

[46] Singleton D C, Harris A L. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(12): 1189

[47] Furusawa A, Miyamoto M, Takano M, et al. Carcinogenesis, 2018, 39(6): 758

[48] Yang L, Achreja A, Yeung T L, et al. Cell Metab, 2016, 24 (5): 685