

## ОБЗОРЫ

## REVIEWS

## Нарушенный метаболизм метионина в злокачественных клетках — потенциальная мишень для противоопухолевой терапии

*В.С. Покровский<sup>1</sup>, Д.Ж. Давыдов<sup>1</sup>, Н.В. Ануфриева<sup>2</sup>, Д.Д. Жданов<sup>3</sup>, С.В. Ревтович<sup>2</sup>, Е.А. Морозова<sup>2</sup>, Т.В. Демидкина<sup>2</sup>, Е.М. Трещалина<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория комбинированной терапии опухолей, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 154478

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, ул. Вавилова, д. 32, Москва, Российская Федерация, 119991

<sup>3</sup> ФГБУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Погодинская ул., д. 10, стр. 8, Москва, Российская Федерация, 119121

## Pathological Metabolism of Methionine in Malignant Cells Is a Potential Target for the Antitumor Therapy

*VS Pokrovskii<sup>1</sup>, DZh Davydov<sup>1</sup>, NV Anufrieva<sup>2</sup>, DD Zhdanov<sup>3</sup>, SV Revtovich<sup>2</sup>, EA Morozova<sup>2</sup>, TV Demidkina<sup>2</sup>, EM Treshchalina<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> NN Blokhin Russian Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

<sup>2</sup> VA Engelhardt Institute of Molecular Biology, 32 Vavilova str., Moscow, Russian Federation, 119991

<sup>3</sup> VN Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 10 bld. 8 Pogodinskaya str., Moscow, Russian Federation, 119121

## РЕФЕРАТ

В обзоре представлен клеточный метаболизм метионина, а также известные данные о механизмах развития метиониновой зависимости в злокачественных клетках. Рассмотрены возможности использования безметиониновой диеты для контроля опухолевого роста у больных с различными формами рака. Приведены и оценены сведения о метионин- $\gamma$ -лиаза — ферменте, обеспечивающем удаление метионина из плазмы и рассмотрена ее роль в качестве потенциального противоопухолевого фермента. Обобщены сведения о цитотоксической активности данного фермента, полученного из различных источников, и сведения о моделях опухолей и клеточных культурах, проявляющих метиониновую зависимость.

**Ключевые слова:** метионин- $\gamma$ -лиаза, метионин, метиониновая зависимость, злокачественные клетки, рак, противоопухолевые ферменты, противоопухолевая терапия.

**Получено:** 16 декабря 2016 г.

**Принято в печать:** 6 марта 2017 г.

*Для переписки:* Вадим Сергеевич Покровский, д-р мед. наук, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 154478; тел.: 8(499)324-14-09; e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

*Для цитирования:* Покровский В.С., Давыдов Д.Ж., Ануфриева Н.В. и др. Нарушенный метаболизм метионина в злокачественных клетках — потенциальная мишень для противоопухолевой терапии. Клиническая онкогематология. 2017;10(3):324–32.

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-3-324-332

## ABSTRACT

This review presents the characteristics of the cellular metabolism of methionine, as well as known data on the mechanisms of the development of methionine dependence in malignant cells. The possibilities of using a non-methionine diet for the control of the tumor growth in patients with various forms of cancer are considered. The information about methionine  $\gamma$ -lyase, an enzyme providing elimination of methionine from plasma, is provided. Its role as a potential antitumor enzyme is disclosed. Data on cytotoxic activity of the enzyme, obtained from various sources, and information on tumor models and cell cultures, showing methionine dependence are summarised.

**Keywords:** methionine  $\gamma$ -lyase, methionine, methionine dependency, cancer cells, cancer, anticancer enzymes, antitumor therapy.

**Received:** December 16, 2016

**Accepted:** March 6, 2017

*For correspondence:* Vadim Sergeevich Pokrovskii, DSci, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: 8(499)324-14-09; e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

*For citation:* Pokrovskii VS, Davydov DZh, Anufrieva NV, et al. Pathological Metabolism of Methionine in Malignant Cells Is a Potential Target for the Antitumor Therapy. Clinical oncohematology. 2017;10(3):324–32 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-3-324-332

## ВВЕДЕНИЕ

L-метионин — незаменимая серосодержащая алифатическая  $\alpha$ -аминокислота. L-метионин необходим для синтеза витаминов, антиоксидантов, коферментов, полиаминов и ряда других молекул, необходимых для нормального функционирования клетки [1–3]. L-метионин является первой аминокислотой, которая используется в процессе синтеза белков. Биосинтез белка всегда начинается с антикодона AUG информационной РНК, кодирующего именно эту аминокислоту [4]. Известно, что различные опухолевые клетки обладают чувствительностью к дефициту метионина.

В данном обзоре описаны пути метаболизма метионина в клетке и апробированные к настоящему времени подходы к терапии злокачественных новообразований, основанные на их абсолютной зависимости в экзогенном метионине.

## РОЛЬ МЕТИОНИНА В КЛЕТОЧНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ

Особая роль метионина во внутриклеточном метаболизме связана с наличием в его молекуле подвижной метильной группы, которая может быть перенесена на другие макромолекулы в процессе трансметилирования. Реакция трансметилирования играет ключевую роль в синтезе холина из этаноламина, фосфатидилхолина из фосфатилэтанолamina, адреналина из норадреналина и др. Метильная группа в составе метионина имеет прочную связь с атомом серы, поэтому ее непосредственным донором в процессах

трансметилирования служит S-аденозилметионин (SAM). Снижение его внутриклеточного уровня приводит к ослаблению и даже потере жизнеспособности клетки [5].

В клеточном метаболизме часть метионина используется для биосинтеза белка, в то время как другая часть по пути *de novo* «methylation cycle» превращается в SAM при участии метионаденазилтрансферазы (рис. 1). В молекуле SAM метионин связан с C5'-атомом углерода рибозы аденозина. Атом серы в молекуле SAM положительно заряжен, что обуславливает высокую реакционную способность метильной группы этого соединения в реакциях трансметилирования. В процессе метилирования ДНК, белков и других макромолекул, катализируемых метилтрансферазами, SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH) [6]. При участии метилтрансферазы SAM используется в реакции образования карнитина из  $\gamma$ -аминоасляной кислоты (ГАМК), фосфатидилхолинов из кефалинов, участвует в процессах метаболизма гормонов и медиаторов, а также в обезвреживании экзогенных соединений, в т. ч. фенолов, алифатических аминов, азотсодержащих гетероциклических соединений [7, 8].

В дальнейшем SAH превращается в гомоцистеин, который метаболизируется путем метилирования или транссульфирования. В процессе метилирования гомоцистеин превращается в метионин. Донором метильной группы в этом случае выступает N<sup>5</sup>-метил-N<sub>4</sub>-фолат. В большинстве тканей это происходит при участии метионинсинтетазы, в печени также при участии бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансферазы. В процессе транссульфирования из гомоцистеина образуется цистатионин — непосредственный предшественник

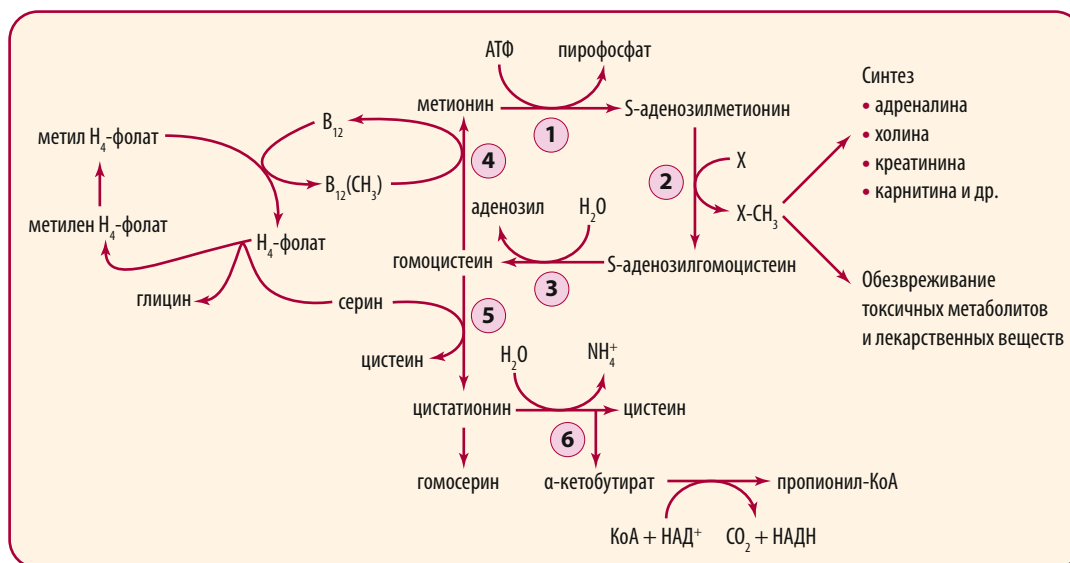


Рис. 1. Метаболизм метионина в клетке:

1 — метионаденазилтрансфераза; 2 — S-аденозилметионинметилтрансфераза; 3 — S-аденозилгомоцистеиназа; 4 — метионин-синтаза (регенерация метионина); 5 — цистатионин- $\gamma$ -синтетаза (синтез цистеина); 6 — цистатионин- $\gamma$ -лиаза  
 АТФ — аденозинтрифосфат; НАД<sup>+</sup> — окисленный никотинамидадениндинуклеотид; НАДН — восстановленный никотинамидадениндинуклеотид.

Fig. 1. Cell methionine metabolism:

1 — methionineadenosyltransferase; 2 — S-adenosylmethioninemethyltransferase; 3 — S-adenosylhomocysteinase; 4 — methionine-synthase (methionine regeneration); 5 — cystathionine  $\gamma$ -synthetase (cysteine synthesis); 6 — cystathionine  $\gamma$ -lyase  
 АТФ — adenosine triphosphate; НАД<sup>+</sup> — nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form; НАДН — nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form.

цистеина. Цистеин, в свою очередь, используется для синтеза антиоксиданта глутатиона [9].

Помимо цикла метилирования SAM также используется для синтеза полиаминов в цикле реутилизационного пути («salvage pathway»). Из декарбокисилированной формы SAM и путресцина (метаболита орнитина) образуются спермин, спермидин и другие полиамины [10]. Побочным продуктом синтеза полиаминов является метилтиоаденозин (МТА). В ходе реакций реутилизационного пути МТА превращается в 4-метилтио-2-оксобутират (МТОВ), последовательно проходя ряд промежуточных стадий (метилтиорибозы-фосфата, метилтиорibuлозы-фосфата и др.) [11]. МТОВ является непосредственным предшественником метионина в реутилизационном пути и может превращаться в метионал — индуктор апоптоза [12]. Совместно с метилтрансферазой SAM участвует в реакции образования карнитина из ГАМК [11].

В табл. 1 перечислены гены, кодирующие ключевые ферменты путей биосинтеза метионина *de novo* и реутилизационного пути.

Нормальные клетки способны к синтезу метионина из гомоцистеина с использованием метилтетрагидрофолата и бетаина в качестве доноров метильных групп при участии метионинсинтетазы [13]. У человека фермент кодируется геном *MTP* (5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин метилтрансфераза). У человека и животных функция данного фермента зависит от содержания внутри клеток кофактора — витамина  $B_{12}$  (кобаламина), концентрация которого коррелирует с активностью фермента, в то время как метионинсинтетаза растений и бактериальных клеток встречается и в кобаламин-независимых формах ферментов [14].

## МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ МЕТИОНИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Метиониновая зависимость — общая для ряда опухолевых клеток особенность метаболизма, связанная с повышенной чувствительностью к дефициту метионина [15]. Впервые метиониновая зависимость опухолевых клеток была обнаружена в 1959 г. при изучении динамики опухолевого роста карциносаркомы Уокера-256 у крыс с пониженным содержанием метионина в рационе [16]. Последующие исследования метилирования тРНК подтвердили зависимость пролиферации клеток карциносаркомы Уокера-256 от уровня метионина [17]. В отличие от нормальных опухолевые клетки были не способны пролиферировать в среде, в которой метионин был заменен на гомоцистеин [18]. Неспособность опухолевых клеток поддерживать достаточный уровень метилирования в безметиониновой среде с гомоцистеином доказывает необходимость в экзогенном метионине [19]. Ограничение поступления метионина в метионин-зависимые опухолевые клетки может приводить к остановке клеточного цикла в поздней фазе  $S/G_2$  как *in vitro*, так и *in vivo* [20, 21]. Остановка клеточного цикла в фазе  $S/G_2$  повышает вероятность гибели и чувствительность клетки к цитотоксическим препаратам [22].

В последующих исследованиях показано, что различные культуры клеток являются метионин-зависимыми [22–24]. Более того, метиониновая зависимость была выявлена в первичной культуре опухолей, взятых у пациентов [25]. Среди широко распространенных и детально изученных культур клеток зависимостью

Таблица 1. Гены, кодирующие ключевые ферменты метаболизма метионина

Ген	Фермент	Локус	Код	Функция
MTR	Метионин–синтаза	1q43	U73338, NM 000254	Синтез метионина <i>de novo</i>
MTRR	5-метилтетрагидрофолат-гомосерин редуктаза	5p15.31	AF025794	
BHMT	Бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансфераза	5p13.1-q15	BC012616, NM 001713	Метилирование ДНК и синтез SAM
BHMT2	Бетаин-гомоцистеин-S-метилтрансфераза 2	5q13	NM 017614	
MAT1A	$\alpha$ -метионин-аденозилтрансфераза I	10q22	NM000429	Метилирование ДНК и синтез SAM
MAT2A	$\alpha$ -метионин-аденозилтрансфераза II	2p11.2	NM005911	
MAT2B	$\beta$ -метионин-аденозилтрансфераза II	5q34-q35	AF182814, NM013283	Путь реутилизации метионина и синтеза полиаминов
DNMT1	ДНК–(цитозин-5-)-метилтрансфераза 1	19p13.2	X63692, NM001379	
DNMT3A	$\alpha$ -ДНК–(цитозин-5-)-метилтрансфераза 3	2p23	NM022552	Детоксикация оксидов серы
DNMT3B	$\beta$ -ДНК–(цитозин-5-)-метилтрансфераза 3	20q11.2	NM018960	
AHCY	Аденозилгомоцистеиназа	20q11.22	M61832, NM000687	Детоксикация оксидов серы
GNMT	Глицин-метилтрансфераза	6p12	AF101475, NM018960	
AMD1	Аденозинметионин декарбоксилаза 1	6q21	M88006	Путь реутилизации метионина и синтеза полиаминов
MRI1	Метилтиорибоза-1-фосфат изомеразы	19p13.13	NM032285	
MTAP	Метилтиоаденозин фосфорилаза	9p21	AB062485, NM002451	Детоксикация оксидов серы
ENOPH1	E-1 енолаза-фосфатаза	4q21.3	NM021204	
SRM	Аминопропилтрансфераза	1p36-p22	BC033106, NM003132	Детоксикация оксидов серы
SMS	Спермин синтетаза	Xp22.1	AD001528, NM004595	
SAT1	Спермидин N(1)-ацетилтрансфераза	Xp22.1	M55580, NM002970	Детоксикация оксидов серы
SAT2	Полиамин N-ацетилтрансфераза	17p13.2	AF348524	
MSRA	Метионин сульфоксид редуктаза A	8p23.1	BC054033, NM012331	Детоксикация оксидов серы
MSRB2	Метионин сульфоксид редуктаза B2	10p12	AF122004, NM012228	
MSRB3	Метионин сульфоксид редуктаза B3	12q14.3	BX640871, NM198080	

от метионина обладают линии клеток рака простаты PC-3, рака легкого SKLU-1 и аденокарциномы легкого A549, фибросаркомы HT1080, острого лимфобластного лейкоза CCRF-HSB-2, саркомы Уокера-256 крыс, глиобластомы D-54 и SWB77, медуллобластомы Daou и меланомы MeWo [26–31].

Клетки глиобластомы часто характеризуются высоким накоплением метионина по сравнению с нормальными тканями, что позволяет использовать меченый L-[<sup>11</sup>C-метил]-метионин для визуализации опухоли при позитронно-эмиссионной томографии [32]. Повышенная потребность в метионине, вероятно, связана с активацией реакций трансметилирования и, возможно, приводит к подавлению ключевых генов, регулирующих рост опухолевых клеток и апоптоз, путем гиперметилирования [6, 33].

Механизм развития метиониновой зависимости опухолевых клеток до сих пор остается мало изученным. В опухолевых клетках, чувствительных к дефициту L-метионина, наблюдается сниженный уровень метионинсинтетазы [34], что приводит к метиониновой зависимости. Следовательно, метиониновую зависимость можно рассматривать как метаболический дефект, блокирующий способность к росту и пролиферации в среде, содержащей пониженную концентрацию L-метионина [35, 36]. Однако наиболее значимым фактором в развитии этой зависимости считается сниженная экспрессия гена метилтиоаденозинфосфорилазы (MTAP) — первого фермента метаболизма МТА в цепи последовательных реакций реутилизационного пути метаболизма метионина [37]. Снижение экспрессии гена *MTAP* описано для целого ряда линий опухолевых клеток, включая глиомы, остеосаркомы, меланому, немелкоклеточный рак легкого, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз [38–43].

*MTAP* расположен в хромосоме 9p21 в непосредственной близости от гена опухолевого супрессора p16, делеция которого характерна для многих опухолевых клеток [44, 45]. Изолированная делеция *MTAP* выявлена в клетках немелкоклеточного рака легкого и астроцитомы [39, 46]. Введение *MTAP* в культуру клеток рака молочной железы MCF7 угнетало их рост и способность формировать опухоль у иммунодефицитных мышей SCID [47]. Было показано, что одновременная делеция гена *MTAP*, гена-супрессора p16, а также гена-супрессора p15 характерна для ряда опухолей: хондросаркомы [48, 49], рака пищевода [26, 50], рака желудка [51, 52], глиобластомы [53–56], острого лимфобластного лейкоза [40, 57–59], острого миелобластного лейкоза [60], немелкоклеточного рака легкого [39], мантийноклеточной лимфомы [61], диффузной В-крупноклеточной лимфомы [62], мезотелиомы [7, 63], нейробластомы [64], рака поджелудочной железы [65, 66, 67], саркомы Юинга [68], рака мочевого пузыря [54], меланомы [69], плоскоклеточного рака головы и шеи [70]. В исследованиях с большой выборкой частота обнаружения делеций *MTAP* составила 22 % для рака поджелудочной железы ( $n = 114$ ) [50], 11–28 % для острого лимфобластного лейкоза ( $n = 284$  [58],  $n = 140$  [59],  $n = 227$  [71]), 18 % для немелкоклеточного рака легкого ( $n = 50$ ) [67], 12 %

для мантийноклеточной лимфомы ( $n = 52$ ) [61], 67 % для мезотелиомы плевры ( $n = 95$ ) [63], 8–30 % для рака поджелудочной железы ( $n = 300$  [65],  $n = 73$  [66]), 41 % для меланомы ( $n = 75$ ) [69].

Однако делеция *MTAP* — очевидно, не единственная причина метиониновой зависимости. Показано, что трансфекция геном *MTAP* не улучшает рост клеток MCF7 на среде с пониженным содержанием метионина [72]. Кроме того, ингибирование *MTAP* метилтио-DADMe-иммуцилина-A (MTDIA) угнетало развитие ксенотрансплантатов рака легкого у бестимусных мышей [73]. Делеция *MTAP* может приводить к увеличению активности орнитиндекарбоксилазы — фермента, лимитирующего скорость образования стимуляторов цитопролиферации и полиаминов [74]. В клетках MCF7 и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при отсутствии *MTAP* отмечается повышенная активность орнитиндекарбоксилазы, которая подавляется добавлением *MTAP* [74].

На клетках гепатоцеллюлярного рака было показано, что метиониновая зависимость также связана со сниженной активностью метионинсинтетазы (MTR) [75]. Полиморфизм гена *MTR* A2756G обнаружен у больных раком молочной железы и может сопровождаться повышением риска развития заболевания у носителей инактивирующих мутаций *BRCA1* и *BRCA2* [76]. Однако ранее было обнаружено, что активность MTR в здоровых клетках и опухолевых с метиониновой зависимостью может быть одинаковой [77]. Согласно данным метаанализа результатов клинических исследований с общим числом наблюдений 18953 М. Lu и соавт. [78], связь полиморфизма *MTR* A2756G с развитием рака молочной железы характерна только для европейской популяции. В большинстве исследований показано, что аллель G встречается реже, чем аллель A, и сопровождается более низким уровнем гомоцистеина в плазме [80]. У носителей аллеля G низкий уровень хромосомных aberrаций совпадает с более высоким шансом на длительную продолжительность жизни [79, 80]. При раке молочной железы мутация A2756G может не только стимулировать синтез метионина *de novo*, но и вносить вклад в формирование метиониновой зависимости [81].

Для реакции, катализируемой MTR, требуется кофермент — витамин B<sub>12</sub> (кобаламин) и 5-метилтетрагидрофолат (5-MTHF) в качестве донора метильной группы [82]. 5-MTHF синтезируется в ходе фолатного цикла под действием метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) при участии кофермента витамина B<sub>2</sub> (рибофлавин). Следовательно, развитию метиониновой зависимости опухолевых клеток также могут способствовать нарушения метаболизма фолатов. *MTHFR* с мутацией C677T существенно увеличивал метиониновую зависимость клеток рака молочной железы [81]. Однако на культуре клеток карциносаркомы Уокера показано, что 5-MTHF не влияет на метиониновую зависимость [83]. На примере клеток меланомы, лейкоза и глиомы GaMg дискутируется спорный механизм развития метиониновой зависимости через нарушение метаболизма кобаламина со снижением активности MTR [84–86].

## ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЦИОНА СО СНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ МЕТИОНИНА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Поскольку метионин является незаменимой аминокислотой, ограничение его потребления с пищей может быть использовано для контроля роста метионин-зависимых клеток. При снижении поступления метионина постепенно уменьшается активность пути транссульфирования и временно увеличивается уровень гомоцистеина, необходимого для синтеза метионина *de novo* [87]. У крыс Wistar с рабдомиосаркомой при пониженном содержании метионина в рационе наблюдалось угнетение метастазирования в легкие [88]. Ограничение потребления метионина, гомоцистеина и холина увеличивало продолжительность жизни мышей с саркомой Йошида в 2,5 раза [21]. На моделях индуцированных азоксиметаном опухолей у крыс F344 рацион с пониженным содержанием метионина снижал на 80 % число предраковых очагов в криптах толстой кишки [89]. Рацион с дефицитом метионина тормозил рост опухоли в модели перитонеального карциноматоза после трансплантации клеток рака желудка MNK45 и MNK74 мышам NOD-SCID. В качестве одной из причин полученного эффекта авторы считают угнетение метилирования промотора гена E-кадгерина [90].

Экспериментальные результаты использования безметионинового рациона для торможения роста опухоли свидетельствуют о перспективности этого подхода, но длительный дефицит метионина и его предшественников может оказаться летальным [91]. Ограничение содержания метионина в рационе на 40 % у самцов крыс Wistar уменьшает концентрацию активных форм кислорода в головном мозге и митохондриях почек без снижения массы тела, в то время как 80%-е сокращение уровня метионина приводит к существенной потере массы тела [92].

Помимо непосредственного противоопухолевого эффекта уменьшение потребления метионина может повышать чувствительность опухолевых клеток к цитотоксическим препаратам. Для культуры клеток рака молочной железы MCF7, резистентной к доксорубину, показаны изменение потенциала трансметилирования и активация пути транссульфирования, приводящего к превращению метионина в цистеин [93]. Безметиониновый рацион повышает эффективность нимустина гидрохлорида [94], а также цисплатина на моделях ксенотрансплантатов рака молочной железы MX-1 [95].

Ограничение метионина в рационе после значительной задержки приводит к снижению его концентрации в плазме. По данным I фазы клинических исследований, снижение концентрации метионина в плазме на 58 % наблюдалось спустя 2 нед. после ограничения его в рационе у пациентов с различными диссеминированными опухолями. Достигнутое снижение концентрации не ухудшало качества жизни пациентов на протяжении 18 нед. [96]. Показано, что перевод пациентов на полное парентеральное питание без метионина в течение 8 дней повышает эффективность 5-фторурацила при раке желудка [97].

Ограничение потребления метионина также охарактеризовано как рациональное у пациентов, получающих лечение 5-фторурацилом и оксалиплатином (FOLFOX) при диссеминированном раке толстой кишки [98]. Обсуждается возможность снижения риска прогрессирования рака простаты при длительном потреблении продуктов с низким содержанием метионина [99]. «Мягкое» уменьшение содержания метионина в рационе может быть достигнуто при ограничении животных белков в пище [100]. Однако даже использование диеты с включением исключительно растительных продуктов для поддержания низкого уровня метионина в плазме требует тщательного подбора продуктов питания. Так, некоторые орехи и бобовые содержат достаточно высокую концентрацию метионина, которая может существенно повысить его уровень в плазме при соблюдении диеты.

## МЕТИОНИН- $\gamma$ -ЛИАЗА

Снижение уровня метионина в плазме путем ограничения потребления с пищей недостаточно для ингибирования роста новообразования, поскольку метионин может быть получен в процессе расщепления собственных белков организма или из гомоцистеина. С учетом этого для быстрого снижения концентрации метионина в плазме целесообразно использовать ферменты, расщепляющие метионин, в частности метионин- $\gamma$ -лиазу (метиониназа, L-метионин- $\gamma$ -деметиолаза, L-метионин-метанэтиол-лиаза, MGL).

MGL (КФ 4.4.1.11) принадлежит к  $\gamma$ -семейству пиридоксальфосфат-5'-зависимых ферментов [101]. MGL катализирует превращение L-метионина в  $\alpha$ -кетобутират, метантиол и аммиак в реакции  $\alpha$ - $\gamma$ -элиминирования. Антипролиферативное действие MGL связывают с разрушением необходимого для злокачественного роста L-метионина и, соответственно, с недостатком органической серы и лабильной метильной группы SAM, необходимой для реакций постсинтетического метилирования нуклеиновых кислот и белков [102–107].

Примерами такой активности служат данные, полученные с MGL *Clostridium sporogenes in vitro* на клетках мышинной мастоцитомы P815 и *in vivo* на саркоме Уокера-256 крыс [108], а с MGL из *Pseudomonas putida* — на линиях опухолей системы крови CEM, Molt4, Molt16, K562, HL60 [108, 109]. Цитотоксичность MGL из *Aspergillus flavipes* продемонстрирована на культурах клеток рака простаты PC-3, печени HepG2 и молочной железы MCF7 [110]. MGL из *Idiomarina* цитотоксична в отношении клеток острого T-лимфобластного лейкоза CEM-C7, MOLT-4 и острого миелобластного лейкоза MV4-11, MOLM-13: концентрация 50%-го ингибирования ( $IC_{50}$ ) составила 1,7, 0,3, 0,64 и 0,03 ЕД/мл соответственно [111]. На культурах клеток опухолей человека K562, PC-3, LnCap, MCF7, SKOV-3 и мышинного лимфоаденоза L5178у в прямом сравнительном эксперименте была оценена цитотоксичность MGL из различных источников: *C. sporogenes*, *C. tetani* и *Citrobacter freundii*. Наиболее чувствительными были культуры клеток K562, PC-3 и MCF7:  $IC_{50}$  = 0,4–1,3, 0,1–0,4 и 0,04–3,2 ЕД/мл соответственно

[14]. Показано, что MGL останавливает клеточный цикл в поздней S-фазе или в G<sub>2</sub> и в дальнейшем инициирует апоптоз опухолевой клетки [20, 21, 112, 113].

В ряде исследований под контролем цитотоксичности продемонстрирован синергизм MGL и известных противоопухолевых препаратов. Например, на культуре клеток CCRF-CEM рекомбинантная MGL повышает цитотоксичность 5-фторурацила и его комбинации с фолиевой кислотой [114].

В условиях *in vivo* доказана способность MGL из *P. putida* снижать уровень метионина в плазме [115, 116]. Эффективность фермента (дикого типа или рекомбинантного) из *P. putida* показана на широком спектре перевиваемых солидных опухолей животных и человека: саркоме Йошида, мелкоклеточном раке легкого NCL-H460 и Ma44, медуллобластоме Daou, нейробластоме LAN-1 и NMB-7, раке толстой кишки HCT116, HCT15, HT29, Colo205 и SW620, фибросаркоме HT1080, плоскоклеточном раке KB3-1, KB8-5 [117–121]. На модели саркомы Уокера-256 у крыс Wistar MGL более эффективно замедляла опухолевый рост по сравнению с безметиониновой диетой [108].

На ксенотрансплантатах рака толстой кишки человека Colo205 и SW620, а также рака молочной железы человека MX-t показан синергизм комбинации рекомбинантной MGL с цисплатином [120, 122]. На модели рака легкого Льюис мышей обнаружен потенцирующий эффект MGL при совместном применении с 5-фторурацилом [121]. На ксенотрансплантатах нейробластомы и глиобластомы человека эффективными были комбинации MGL с винкристином, темозоломидом или кармустином [117, 123].

Доклиническое токсикологическое изучение продемонстрировало, что MGL практически не имеет гематологической токсичности (за исключением снижения показателей красной крови I–II степени) и обладает слабыми антигенными свойствами [121].

В рамках пилотного клинического исследования I фазы в 1995 г. была подтверждена безопасность применения MGL *P. putida* у пациентов с метастатическим раком молочной железы на фоне значительного снижения концентрации метионина в сыворотке. Внутривенная 2-часовая инфузия (5000 или 10 000 ед.), а также 10-часовая инфузия 20 000 ед. не сопровождалась какими-либо признаками токсичности у пациентов. Снижение сывороточного уровня метионина было зафиксировано спустя 30 мин после начала инфузии и сохранялось в течение 4 ч после ее завершения. Максимальное снижение метионина составило 35 и 19 % от начального его уровня у пациентов, получивших 5000 или 10 000 ед. MGL. При 10-часовой инфузии отмечалось снижение сывороточного уровня метионина в 200 раз — с 23,1 до 0,1 мкмоль/л. Однако дальнейшее изучение применения MGL *P. putida* у пациентов было приостановлено в связи с невысоким противоопухолевым эффектом [124].

Для повышения эффективности терапии необходим отбор максимально чувствительных вариантов опухолей. Последние включают мезотелиому плевры, а также ряд опухолей кроветворной и лимфоидной тканей. Определенные преимущества с точки зрения фармакокинетики и динамики снижения концентрации метионина может дать изучение пре-

паратов MGL из других источников, например *C. tetani*, *C. freundii* и *C. sporogenes* [125].

---

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метионин выполняет в организме ряд ключевых функций: он участвует в синтезе белков, полиаминов, метилировании ДНК и др. Ограничение поступления метионина может быть перспективным подходом к подавлению опухолевого роста, особенно для клеток с установленной метиониновой зависимостью. Последняя обусловлена повышенной потребностью в метионине вследствие нарушения путей синтеза *de novo* или реутилизационного пути. Она может быть связана с делециями, полиморфизмом или нарушением экспрессии генов, кодирующих процессы синтеза метионина, что приводит к невозможности восполнения его внутриклеточного содержания.

Одним из наиболее перспективных способов контроля роста опухоли может быть использование ферментов, снижающих концентрацию определенных аминокислот в плазме, в частности аспарагина, аргинина, фенилаланина, а также метионина [126, 127]. В последние годы изучены и выделены новые противоопухолевые ферменты с улучшенным профилем токсичности [128, 129], с минимальной перекрестной иммунореактивностью [130], а также получены конъюгаты ферментов с пептидами [131] или ферменты с точечными аминокислотными заменами в активном центре либо антигенных эпитопах [132]. Особое внимание уделяется изучению эффективности схем комбинированной терапии с включением ферментных препаратов [133–135].

Привлекательность биохимической неполноценности опухолевых клеток в контексте метаболизма метионина дает основания использовать относительно простые биохимические тесты для определения потенциала клинического использования MGL. На основании данных *in vitro* можно предположить перспективность использования MGL в опухолях с высоким уровнем метиониновой зависимости, в частности при мезотелиоме плевры и некоторых опухолях кроветворной и лимфоидной тканей.

---

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

---

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Президента РФ № МД-1780.2017.7 и грантом РФФИ № 15-04-03523-а.

---

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** В.С. Покровский, Е.А. Морозова.  
**Сбор и обработка данных:** Д.Ж. Давыдов.

**Предоставление материалов исследования:** Д.Ж. Давыдов, Н.В. Ануфриева.

**Анализ и интерпретация данных:** Д.Ж. Давыдов, Д.Д. Жданов.

**Подготовка рукописи:** Д.Ж. Давыдов.

**Окончательное одобрение рукописи:** В.С. Покровский, Е.М. Трещалина, Т.В. Демидкина, Е.А. Морозова.

**Административная поддержка:** Е.М. Трещалина, Т.В. Демидкина.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Thomas D, Surdin-Kerjan Y. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(4):503–32.
2. Ravanel S, Gaki B, Job D, Douce R. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(13):7805–12. doi: 10.1073/pnas.95.13.7805.
3. Sekowska A, Kung H, Danchin A, et al. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2000;2(2):145–77.
4. Guedes RL, Prosdociimi F, Fernandes GR, et al. Amino acids biosynthesis and nitrogen assimilation pathways: A great genomic deletion during eukaryotes. *BMC Genom*. 2011;12(Suppl 4):S2. doi: 10.1186/1471-2164-12-S4-S2.
5. Satishchandran C, Taylor JC, Markham GD, et al. Novel *Escherichia coli* K-12 mutants impaired in S-adenosylmethionine synthesis. *J Bacteriol*. 1990;172(8):4489–96. doi: 10.1128/jb.172.8.4489-4496.1990.
6. Zingg JM. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1997;18(5):869–82. doi: 10.1093/carcin/18.5.869.
7. Krasinskas A, Bartlett DL, Cieply K, et al. CDKN2A and MTAP deletions in peritoneal mesotheliomas are correlated with loss of p16 protein expression and poor survival. *Mod Pathol*. 2010;23(4):531–8. doi: 10.1038/modpathol.2009.186.
8. Roje S. S-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 2006;67(15):1686–1698. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.04.019.
9. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*. 1998;111(112):1–14. doi: 10.1016/s0009-2797(97)00146-4.
10. Thomas T, Tomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(2):244–58. doi: 10.1007/PL00000852.
11. Pirkov I, Norbeck J, Gustafsson L, et al. A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J*. 2008;275(16):4111–20. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06552.x.
12. Quash G, Roch AM, Chantepie J, et al. Methional derived from 4-methylthio-2-oxobutanoate is a cellular mediator of apoptosis in BAF3 lymphoid cells. *Biochem J*. 1995;305(3):1017–25. doi: 10.1042/bj3051017.
13. Bassila C, Ghemrawi R, Flayac J, et al. Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863(1):103–12. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.10.016.
14. Морозова Е.А., Куликова В.В., Яшин Д.В. и др. Кинетические характеристики и цитотоксическая активность рекомбинантных препаратов метионин-гамма-лиазы *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* и *Citrobacter freundii*. *Acta Naturae*. 2013;5:54–60. [Morozova EA, Kulikova VV, Yashin DV, et al. Kinetic parameters and cytotoxic activity of recombinant methionine  $\gamma$ -lyase from *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Citrobacter freundii*. *Acta Naturae*. 2013;5:54–60. (In Russ)]
15. Cavuoto P, Fenech MF. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(6):726–36. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.01.004.
16. Sugimura T, Birnbaum SM, Winitz M, et al. Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1959;81(2):448–55. doi: 10.1016/0003-9861(59)90225-5.
17. Buch L, Streeter D, Halpern RM, et al. Inhibition of transfer ribonucleic acid methylase activity from several human tumors by nicotinamide and nicotinamide analogs. *Biochemistry*. 1972;11(3):393–7. doi: 10.1021/bi00753a015.
18. Halpern BC, Clark BR, Hardy DN, et al. The effect of replacement of methionine by homocysteine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974;71(4):1133–6. doi: 10.1073/pnas.71.4.1133.
19. Judde JG, Ellis M, Frost P, et al. Biochemical analysis of the role of transmethylation in the methionine dependence of tumor cells. *Cancer Res*. 1989;49(17):4859–65.
20. Hoffman RM, Jacobsen J. Reversible growth arrest in simian virus 40-transformed human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(12):7306–10. doi: 10.1073/pnas.77.12.7306.
21. Guo H, Lishko VK, Herrera H, et al. Therapeutic tumor-specific cell cycle block induced by methionine starvation in vivo. *Cancer Res*. 1993;53(23):5676–9.
22. Breillout F, Antoine E, Poupon MF. Methionine dependency of malignant tumors: a possible approach for therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(20):1628–32. doi: 10.1093/jnci/82.20.1628.
23. Lu S, Epner DE. Molecular mechanisms of cell cycle block by methionine restriction in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer*. 2000;38(1):123–30. doi: 10.1207/S15327914NC381\_17.
24. Poirson-Bichat F, Goncalves RA, Miccoli L, et al. Methionine depletion enhances the antitumoral efficacy of cytotoxic agents in drug-resistant human tumor xenografts. *Cancer Res*. 2000;6(2):643–53.
25. Guo H, Herrera H, Groce A, et al. Expression of the biochemical defect of methionine dependence in fresh patient tumors in primary histoculture. *Cancer Res*. 1993;53(11):2479–83.
26. Kim DH, Muto M, Kuwahara Y, et al. Array-based comparative genomic hybridization of circulating esophageal tumor cells. *Oncol Rep*. 2006;16(5):1053–9. doi: 10.3892/or.16.5.1053.
27. Poirson-Bichat F, Gonfalone G, Bras-Gone RA, et al. Growth of methionine dependent human prostate cancer (PC-3) is inhibited by ethionine combined with methionine starvation. *Br J Cancer*. 1997;75(11):1605–12. doi: 10.1038/bjc.1997.274.
28. Jo YK, Park MH, Choi H, et al. Enhancement of the Antitumor Effect of Methotrexate on Colorectal Cancer Cells via Lactate Calcium Salt Targeting Methionine Metabolism / *Nutr Cancer*. 2017;69(4):663–73. doi: 10.1080/01635581.2017.1299879.
29. Kreis W, Goodenow M. Methionine requirement and replacement by homocysteine in tissue cultures of selected rodent and human malignant and normal cells. *Cancer Res*. 1978;38(8):2259–62.
30. Kennelly JC, Blair JA, Pheasant AE. Metabolism of 5-methyltetrahydrofolate by rats bearing the Walker 256 carcinosarcoma. *Br J Cancer*. 1982;46(3):440–3. doi: 10.1038/bjc.1982.222.
31. Watkins D. Cobalamin metabolism in methionine-dependent human tumour and leukemia cell lines. *Clin Investig Med*. 1998;21(3):151–8.
32. Bergstrom M, Ericson K, Hagenfeldt L, et al. PET study of methionine accumulation in glioma and normal brain tissue: competition with branched chain amino acids. *J Comput Assist Tomogr*. 1987;11(2):208–13. doi: 10.1097/00004728-198703000-00002.
33. Stern PH, Hoffman RM. Elevated overall rates of transmethylation in cell lines from diverse human tumors. *In Vitro*. 1984;20(8):663–73. doi: 10.1007/bf02619617.
34. Hoffman RM. Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer. *Anticancer Res*. 1985;5(1):1–30.
35. Давыдов Д.Ж., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В. и др. Динамика содержания метионина в плазме крови мышей после введения метионин-гамма-лиазы. *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;16(Suppl 1):28–9. [Davydov DZh, Morozova EA, Anufrieva NV, et al. The changes in plasma methionin concentrations in mice after methionine-gamma-lyase injection. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*. 2017;16(Suppl 1):28–9. (In Russ)]
36. Hoffman RM. Altered methionine metabolism, DNA methylation and oncogene expression in carcinogenesis: a review and synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1983;738(1–2):49–87. doi: 10.1016/0304-419x(84)90019-2.
37. de Oliveira SF, Ganzinelli M, Chila R, et al. Characterization of MTAP Gene Expression in Breast Cancer Patients and Cell Lines. *PLoS One*. 2016;11(1):e0145647. doi: 10.1371/journal.pone.0145647.
38. Nobori T, Karras JG, Della Ragione F, et al. Absence of methylthioadenosine phosphorylase in human gliomas. *Cancer Res*. 1991;51(12):3193–7.
39. Schmid M, Malicki D, Nobori T, et al. Homozygous deletions of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) are more frequent than p16INK4A (CDKN2) homozygous deletions in primary non-small cell lung cancer (NSCLC). *Oncogene*. 1998;17(20):2669–75. doi: 10.1038/sj.onc.1202205.
40. M'soka TJ, Nishioka J, Taga A, et al. Detection of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) and p16 gene deletion in T cell acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR assay. *Leukemia*. 2000;14(5):935–40. doi: 10.1038/sj.leu.2401771.
41. Garcia-Castellano JM, Villanueva A, Healey JH, et al. Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are common in osteosarcoma. *Clin Cancer Res*. 2002;8(3):782–7.
42. Behrmann I, Wallner S, Komyod W, et al. Characterization of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am J Pathol*. 2003;162(2):683–90. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63695-4.
43. Komatsu A, Nagasaki K, Fujimori M, et al. Identification of novel deletion polymorphisms in breast cancer. *Int J Oncol*. 2008;33(2):261–70.
44. Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994;368(6473):753–6. doi: 10.1038/368753a0.
45. Nobori T, Takabayashi K, Tran P, et al. Genomic cloning of methylthioadenosine phosphorylase: a purine metabolic enzyme deficient in multiple different cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;93(12):6203–8. doi: 10.1073/pnas.93.12.6203.
46. Brat DJ, James CD, Jedlicka AE, et al. Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas. *Am J Pathol*. 1999;154(5):1431–8. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65397-7.
47. Christopher SA, Diegelman P, Porter CW, et al. Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer Res*. 2002;62(22):6639–44.
48. Jagasia AA, Block JA, Diaz MO, et al. Partial deletions of the CDKN2A and MTS2 putative tumor suppressor genes in a myxoid chondrosarcoma. *Cancer Lett*. 1996;105(1):77–90. doi: 10.1016/0304-3835(96)04273-5.

49. Jagasia AA, Block JA, Qureshi A, et al. Chromosome 9 related aberration and deletions of the CDKN2 and MTS2 putative tumor suppressor genes in human chondrosarcomas. *Cancer Lett.* 1996;105(1):91–103. doi: 10.1016/0304-3835(96)04274-7.
50. Powel EL, Leoni LM, Canto MI, et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in gastroesophageal carcinogenesis: evidence of homozygous deletion in esophageal noninvasive precursor lesions and therapeutic implications. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(11):1497–504. doi: 10.1097/01.pas.0000170349.47680.e8.
51. Kim J, Kim MA, Min SY, et al. Downregulation of methylthioadenosine phosphorylase by homozygous deletion in gastric carcinoma. *Genes Chromos Cancer.* 2011;50(6):421–33. doi: 10.1002/gcc.20867.
52. Huang H-Y, Li S-H, Yu S-C, et al. Homozygous deletion of MTAP gene as a poor prognosticator in gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res.* 2009;15(22):6963–72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1511.
53. Suzuki T, Maruno M, Wada K, et al. Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system. *Brain Tumor Pathol.* 2004;21(1):27–34. doi: 10.1007/bf02482174.
54. Zhang H, Chen ZH, Savarese TM, et al. Codeletion of the genes for p16INK4 methylthioadenosine phosphorylase, interferon-alpha1, interferon-beta1, and other 9p21 markers in human malignant cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 1996;86(1):22–8. doi: 10.1016/0165-4608(95)00157-3.
55. Perry A, Nobory T, Ru N, et al. Detection of p16 gene deletions in gliomas: comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) versus quantitative PCR. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(9):999–1008. doi: 10.1097/00005072-199709000-00005.
56. Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr.* 1993;123(2):269–74.
57. Efferth DE, Miyachi H, Drexler HG, Gebhart E. Methionine phosphorylase as target for chemoselective treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemic cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28(1):47–56. doi: 10.1006/bcmd.2002.0483.
58. Bertin R, Acquaviva C, Mirebeau D, et al. CDKN2A, CDKN2B and MTAP gene dosage permits precise characterization of mono- and bi-allelic 9p21 deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromos Cancer.* 2003;37(1):44–57. doi: 10.1002/gcc.10188.
59. Usvasalo A, Ninomiya S, Raty R, et al. Focal 9p instability in hematologic neoplasias revealed by comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism microarray analyses. *Genes Chromos Cancer.* 2010;49(4):309–18. doi: 10.1002/gcc.20741.
60. Kamath A, Tara H, Xiang B, et al. Double-minute MYC amplification and deletion of MTAP, CDKN2A, CDKN2B and ELAVL2 in an acute myeloid leukemia characterized by oligonucleotide-array comparative genomic hybridization. *J Cancer Genet Cytogenet.* 2008;183(2):117–20. doi: 10.1016/j.cancergen.2008.02.011.
61. Marce S, Balague O, Colomo L, et al. Lack of methylthioadenosine phosphorylase expression in mantle cell lymphoma is associated with shorter survival: implications for a potential targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12(12):3754–61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2780.
62. Dreyling MH, Roulston D, Bohlander SK, et al. Codeletion of CDKN2 and MTAP genes in a subset of non-Hodgkin's lymphoma may be associated with histologic transformation from low-grade to diffuse large-cell lymphoma. *Genes Chromos Cancer.* 1998;22(1):72–8. doi: 10.1002/(sici)1098-2264(199805)22:1:72::aid-gcc10>3.3.co;2-g.
63. Illei PB, Busch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Cancer Res.* 2003;9(6):2108–13.
64. Mora J, Alaminos M, de Torres C, et al. Comprehensive analysis of the 9p21 region in neuroblastoma suggests a role for genes mapping to 9p21–23 in the biology of favorable stage 4 tumours. *Br J Cancer.* 2004;91(6):1112–8. doi: 10.1038/sj.bjc.6602094.
65. Hustinx SR, Hruban RH, Leoni LM, et al. Homozygous deletion of the MTAP gene in invasive adenocarcinoma of the pancreas and in periampullary cancer: a potential new target for therapy. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(1):83–6. doi: 10.4161/cbt.4.1.1380.
66. Hustinx SR, Leoni ML, Yeo CJ, et al. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expressions in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol.* 2005;18(7):959–63. doi: 10.1038/modpathol.3800377.
67. Chen ZH, Zhang H, Savarese TM. Gene deletion chemoselectivity: codeletion of the genes for p16 (INK4), methylthioadenosine phosphorylase, and the alpha- and beta-interferons in human pancreatic cell carcinoma lines and its implications for. *Cancer Res.* 1996;56(5):1083–90.
68. Brownhill SC, Taylor C, Burchill SA. Chromosome 9p21 gene copy number and prognostic significance of p16 in ESFT. *Br J Cancer.* 2007;96(12):1914–23. doi: 10.1038/sj.bjc.6603819.
69. Conway C, Beswick S, Elliott F. Deletion at chromosome arm 9p in relation to BRAF and NRAS mutation and prognostic significance for primary melanoma. *Genes Chromos Cancer.* 2010;49(5):425–38. doi: 10.1002/gcc.20753.
70. Worsham MJ, Chem KM, Tiwari N, et al. Fine-mapping loss of gene architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a) and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otol Head Neck Surg.* 2006;132(4):409–15. doi: 10.1001/archotol.132.4.409.
71. Mirebeau D, Acquaviva C, Suci S, et al. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica.* 2006;91(7):881–5.
72. Tang B, Li YN, Kruger WD. Defects in methylthioadenosine phosphorylase is associated with but not responsible for methionine-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* 2000;60(19):5.
73. Basu I, Locker J, Cassera MB, et al. Growth and metastases of human lung cancer are inhibited in mouse xenografts by a transition state analogue of 5'-methylthioadenosine. *J Biol Chem.* 2010;286(6):4902–11. doi: 10.1074/jbc.M110.198374.
74. Subhi AL, Diegelman P, Porter CW, et al. Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites. *J Biol Chem.* 2003;278(50):49868–73. doi: 10.1074/jbc.M308451200.
75. Kenyon SH, Waterfield CJ, Timbrell JA, et al. Methionine synthase activity and sulphur amino acid levels in the rat liver tumor cells HTS and Phi-1. *J Biochem Pharmacol.* 2002;63(3):381–91. doi: 10.1016/s0006-2952(01)00874-7.
76. Ma E, Iwasaki M, Junko I, et al. Dietary intake of folate, vitamin B6, and vitamin B12, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC Cancer.* 2009;24(9):122. doi: 10.1186/1471-2407-9-122.
77. Stern PH, Wallace CD, Hoffman RM. Altered methionine metabolism occurs in all members of a set of diverse human tumor cell lines. *J Cell Physiol.* 1984;119(1):29–34. doi: 10.1002/jcp.1041190106.
78. Lu M, Wang F, Qiu J. Methionine synthase A2756G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 18,953 subjects. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(1):213–7. doi: 10.1007/s10549-010-0755-9.
79. Linnebank M, Fliessbach K, Kolsch H, et al. The methionine synthase polymorphism c.2756A>G (D919G) is relevant for disease-free longevity. *Int J Mol Med.* 2005;16(4):759–61.
80. Dhillon V, Thomas P, Fenech M. Effect of common polymorphisms in folate uptake and metabolism genes on frequency of micronucleated lymphocytes in a South Australian cohort. *Mutat Res.* 2009;665(1–2):1–6. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.02.007.
81. Beetstra S, Suthers G, Dhillon V, et al. Methionine-dependence phenotype in the de novo pathway in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with and without breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2008;17(10):2565–71. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0140.
82. Drennan CL, Huang S, Drummond J, et al. How a protein binds B12: A 3.0 Å X-ray structure of B12-binding domains of methionine synthase. *Science.* 1994;266(5191):1669–74. doi: 10.1126/science.7992050.
83. Tisdale MJ. Methionine metabolism in Walker carcinosarcoma in vitro. *Eur J Cancer.* 1980;16(3):407–14. doi: 10.1016/0014-2964(80)90360-6.
84. Liteplo RG, Hipwell SE, Rosenblatt DS, et al. Changes in cobalamin metabolism are associated with the altered methionine auxotrophy of highly growth autonomous human melanoma. *J Cell Physiol.* 1991;149(2):332–8. doi: 10.1002/jcp.1041490222.
85. Fiskerstrand T, Christensen B, Tysnes OB, et al. Development and reversion of methionine dependence in a human glioma cell line: relation to homocysteine remethylation and cobalamin status. *Cancer Res.* 1994;54(18):4899–906.
86. Watkins D. Cobalamin metabolism in methionine-dependent human tumour and leukemia cell lines. *Clin Invest Med.* 1998;21(3):151–8.
87. Tang B, Mustafa A, Gupta S, et al. Methionine-deficient diet induces post-transcriptional down-regulation of cystathionine beta-synthase. *Nutrition.* 2009;26(11–12):170–5. doi: 10.1016/j.nut.2009.10.006.
88. Breillout F, Hadida F, Echinard-Garin P, et al. Decreased rat rhabdomyosarcoma pulmonary metastases in response to low methionine diet. *Anticancer Res.* 1987;7(4b):861–7.
89. Komninou D, Leutzinger Y, Reddy BS, et al. Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutr Cancer.* 2006;54(2):202–8. doi: 10.1207/s15327914nc5402\_6.
90. Graziosi L, Mencarelli A, Renga B, et al. Epigenetic modulation by methionine deficiency attenuates the potential for gastric cancer cell dissemination. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(1):39–49. doi: 10.1007/s11605-012-1996-1.
91. Theuer RC. Effect of essential amino acid restriction on the growth of female C57BL mice and their implanted BW10232 adenocarcinomas. *J Nutr.* 1971;101(2):223–32.
92. Caro P, Gomez J, Sanchez I, et al. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuven Res.* 2009;12(6):421–34. doi: 10.1089/rej.2009.0902.
93. Ryu CS, Kwak HC, Lee KS, et al. Sulfur amino acid metabolism in doxorubicin-resistant breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;15:255(1):94–102. doi: 10.1016/j.taap.2011.06.004.
94. Goseki N, Endo M. Thiol depletion and chemosensitization on nimustine hydrochloride by methionine-depleting total parenteral nutrition. *Tohoku J Exp Med.* 1990;161(3):227–39. doi: 10.1620/tjem.161.227.
95. Hoshiya Y, Guo H, Kubota T, et al. Human tumors are methionine dependent in vivo. *Anticancer Res.* 1995;15(3):717–8.
96. Epne DE, Morrow S, Wilcox M, Houghton JL. Nutrient intake and nutritional indexes in adults with metastatic cancer on a phase I clinical trial of dietary methionine restriction. *Nutr Cancer.* 2002;42(2):158–66. doi: 10.1207/S15327914NC422\_2.



- 97.** Goseki N, Yamazaki S, Shimoju K, et al. Synergistic effect of methionine-depleting total parenteral nutrition with 5-fluorouracil on human gastric cancer: a randomized, prospective clinical trial. *Jpn J Cancer Res.* 1995;86(5):484–9. doi: 10.1111/j.1349-7006.1995.tb03082.x.
- 98.** Durando X, Farges MC, Buc E, et al. Dietary methionine restriction with FOLFOLX regimen as first line therapy of metastatic colorectal cancer: a feasibility study. *Oncology.* 2008;73(3–4):205–9. doi: 10.1159/000313700.
- 99.** Ornish D, Weidner G, Fair WR, et al. Intensive lifestyle changes may affect the progression of prostate cancer. *J Urol.* 2005;174(3):1065–70. doi: 10.1097/01.ju.0000169487.49018.73.
- 100.** McCarty M, Barroso-Aranda J, Contreras F, et al. The low-methionine content of vegan diets may make methionine restriction feasible as a life extension strategy. *Med Hypotheses.* 2009;72(2):125–8. doi: 10.1016/j.mehy.2008.07.044.
- 101.** Kack H, Sandmark J, Gibson K, et al. Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *J Mol Biol.* 1999;291:857–76. doi: 10.1006/jmbi.1999.2997.
- 102.** Fernandes HS, Silva Teixeira CS, Fernandes PA, et al. Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections. *Expert Opin Ther Pat.* 2017;27(3):283–97. doi: 10.1080/13543776.2017.1254194.
- 103.** Gay F, Aguera K, Senechal K, et al. Methionine tumor starvation by erythrocyte-encapsulated methionine gamma-lyase activity controlled with per os vitamin B6. *Cancer Med.* 2017. doi: 10.1002/cam4.1086.
- 104.** Покровский В.С., Трещалина Е.М. Ферментные препараты в онкогематологии: актуальные направления экспериментальных исследований и перспективы клинического применения. *Клиническая онкогематология.* 2014;7(1):28–38. [Pokrovskiy VS, Treshchalina YeM. Enzymes in oncohematology: relevant directions of experimental studies and prospects of clinical use. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2014;7(1):28–38. (In Russ)]
- 105.** Манухов И.В., Мамаева Д.В., Морозова Е.А. и др. L-метионин-гамма-лиаза *Citrobacter freundii*: клонирование гена и кинетические параметры фермента. *Биохимия.* 2006;71(4):454–63. [Manukhov IV, Mamaeva DV, Morozova EA, et al. L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Citrobacter freundii*: cloning of the gene and kinetic parameters of the enzyme. *Biokhimiya.* 2006;71(4):454–63. (In Russ)]
- 106.** Cellarier E, Durando X, Vasson MP, et al. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2003;29(6):489–99. doi: 10.1016/s0305-7372(03)00118-x.
- 107.** Tan Y, Xu M, Hoffman RM. Broad selective efficacy of recombinant methioninase and polyethylene glycol-modified recombinant methioninase on cancer cells in vitro. *Anticancer Res.* 2010;30:1041–6.
- 108.** Kreis W, Hession C. Isolation and purification of L-methionine-alpha-deamino-gamma-mercaptomethane-lyase (L-methioninase) from *Clostridium sporogenes*. *Cancer Res.* 1973;33:1862–5.
- 109.** Hori H, Takabayashi K, Orvis L, et al. Gene cloning and characterization of *Pseudomonas putida* L-methionine-alpha-deamino-gamma-mercaptomethane-lyase. *Cancer Res.* 1996;56(9):2116–22.
- 110.** El-Sayed SA, Shouman HM, Nassrat HM. Pharmacokinetics, immunogenicity and anticancer efficiency of *Aspergillus flavipes* L-methioninase. *Enzyme Microb Technol.* 2012;51(4):200–10. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.06.004.
- 111.** Huang K-Y, Hu H-Y, Tang Y-L, et al. High-level expression, purification and large-scale production of L-methionine  $\gamma$ -Lyase from *Ideomarina* as a novel anti-leucemic drug. *Mar Drugs.* 2015;13(8):5492–507. doi: 10.3390/md13085492.
- 112.** Yano S, Li S, Han Q, et al. Selective methioninase-induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCL imaging confers chemosensitivity. *Oncotarget.* 2014;5(18):8729–36. doi: 10.18632/oncotarget.2369.
- 113.** Nagahama T, Goseki N, Endo M. Doxorubicin and vincristine with methionine depletion contributed to survival in the Yoshida sarcoma bearing rats. *Anticancer Res.* 1998;18(1):25–31.
- 114.** Machrover D, Zittoun J, Broet Ph, et al. Cytotoxic synergism of methioninase in combination with 5-fluorouracil and folinic acid. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(7):867–76. doi: 10.1016/s0006-2952(01)00560-3.
- 115.** Smiraglia DJ. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet.* 2001;10(13):1413–9. doi: 10.1093/hmg/10.13.1413.
- 116.** Jeanblanc M, Mousli M, Hopfner R, et al. The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene.* 2005;24(49):7337–45. doi: 10.1038/sj.onc.1208878.
- 117.** Hu J, Cheung NK. Methionine depletion with recombinant methioninase: In vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drug. *Int J Cancer.* 2009;124(7):1700–6. doi: 10.1002/ijc.24104.
- 118.** Kokkinakis DM, Schold H, Hori H, et al. Effect of long-term depletion of plasma methionine on the growth and survival of human brain tumor xenografts in athymic mice. *Nutr Cancer.* 1997;29(3):195–204. doi: 10.1080/01635589709514624.
- 119.** Tan Y, Xu M, Guo H, et al. Anticancer efficacy of methioninase in vivo. *Anticancer Res.* 1996;16(6C):3931–6.
- 120.** Tan Y, Sun X, Xu M, et al. Efficacy of recombinant methioninase in combination with cisplatin on human colon tumors in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):2157–63.
- 121.** Yoshioka T, Wada T, Uchida N, et al. Anticancer efficacy in vivo and in vitro, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant methioninase. *Cancer Res.* 1998;58(12):2583–7.
- 122.** Hoshiya Y, Kubota T, Matsuzaki SW, et al. Methionine starvation modulates the efficacy of cisplatin on human breast cancer in nude mice. *Anticancer Res.* 1996;16(6B):3515–7.
- 123.** Kokkinakis DM, Hoffman RM, Frenkel EP, et al. Synergy between methionine stress and chemotherapy in the treatment of brain tumor xenografts in athymic mice. *Cancer Res.* 2001;61(10):4017–23.
- 124.** Tan Y, Zavala JSr, Xu M, et al. Serum methionine depletion without side effects by methioninase in metastatic breast cancer patients. *Anticancer Res.* 1996;16(6):3937–42.
- 125.** Morozova EA, Anufrieva NV, Davydov DZ, et al. Plasma methionine depletion and pharmacokinetic properties in mice of methionine  $\gamma$ -lyase from *Citrobacter freundii*, *Clostridium tetani* and *Clostridium sporogenes*. *Biomed Pharmacother.* 2017;88:978–84. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.127.
- 126.** Покровский В.С., Лесная Н.А., Трещалина Е.М. и др. Перспективы разработки новых ферментных противоопухолевых препаратов. *Вопросы онкологии.* 2011;57(2):155–64. [Pokrovskii VS, Lesnaya NA, Treshchalina EM, et al. Perspectives in the development of new enzyme anticancer treatments. *Voprosy onkologii.* 2011;57(2):155–64. (In Russ)]
- 127.** Покровская М.В., Покровский В.С., Соколов Н.Н. Дифференциальная среда для выявления штаммов бактерий-продуцентов L-аспарагиназ. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2011;47(2):183–6. [Pokrovskaya MV, Pokrovskii VS, Sokolov NN, et al. Differential medium for revealing bacterial producer strains of L-asparaginases. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.* 2011;47(2):183–6. (In Russ)]
- 128.** Pokrovskii VS, Pokrovskaya MV, Aleksandrova SS, et al. Physicochemical properties and antiproliferative activity of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. *Appl Biochem Microbiol.* 2013;49(1):18–22. doi: 10.1134/s000368381301016x.
- 129.** Pokrovskaya MV, Pokrovskiy VS, Aleksandrova SS, et al. Recombinant intracellular *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase with low L-glutaminase activity and antiproliferative effect. *Biochem (Moscow) Suppl. Series B: Biomed Chem.* 2012;6(2):123–31. doi: 10.1134/s1990750812020096.
- 130.** Sidoruk KV, Bogush VG, Pokrovsky VS, et al. Creation of a producer, optimization of expression, and purification of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. *Bull Exp Biol Med.* 2011;152(2):219–23. doi: 10.1007/s10517-011-1493-7.
- 131.** Pokrovsky VS, Pokrovskaya MV, Aleksandrova SS, et al. Comparative immunogenicity and structural analysis of epitopes of different bacterial L-asparaginases. *BMC Cancer.* 2016;16(1):89. doi: 10.1186/s12885-016-2125-4.
- 132.** Sannikova EP, Bulushova NV, Cheperegin SE, et al. The modified heparin-binding L-asparaginase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Biotechnol.* 2016;58(8–9):528–39. doi: 10.1007/s12033-016-9950-1.
- 133.** Pokrovskaya MV, Aleksandrova SS, Pokrovsky VS, et al. Identification of functional regions in the *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase by site-directed mutagenesis. *Mol Biotechnol.* 2015;57(3):251–64. doi: 10.1007/s12033-014-9819-0.
- 134.** Покровский В.С., Лукашева Е.В., Трещалина Е.М. и др. Экспериментальная оценка синергизма цисплатина с L-лизин- $\alpha$ -оксидазой. *Вопросы онкологии.* 2014;60(1):90–3. [Pokrovskii VS, Lukasheva EV, Treshchalina EM, et al. Experimental evaluation of synergism of cisplatin with L-lysine- $\alpha$ -oxidase. *Voprosy onkologii.* 2014;60(1):90–3. (In Russ)]
- 135.** Покровский В.С., Трещалина Е.М., Трещалин И.Д. и др. Оценка противоопухолевой эффективности комбинации L-лизин- $\alpha$ -оксидазы и иринотекана в эксперименте. *Онкология.* 2012;2:58–61. [Pokrovskii VS, Treshchalina EM, Treshchalin ID, et al. Evaluation of the antitumor efficacy of a combination of L-lysine  $\alpha$ -oxidase and irinotecan in the experiment. *Onkologiya.* 2012;2:58–61. (In Russ)]