

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ имени А. Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

Алешин Василий Алексеевич

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ-МИШЕНЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ
МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ
И АНТАГОНИСТОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ
МЕТАБОЛИЗМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.01.08 «Биоинженерия»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Буник-Фаренвальд Виктория-Лариса Ивановна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
1 ВВЕДЕНИЕ.....	5
1.1 Актуальность.....	5
1.2 Степень разработанности темы.....	6
1.3 Цель и задачи.....	7
1.4 Научная новизна.....	7
1.5 Теоретическая и практическая значимость.....	8
1.6 Методология и методы исследования.....	9
1.7 Объект и предмет исследования.....	9
1.8 Положения, выносимые на защиту	10
1.9 Степень достоверности.....	10
1.10 Связь с государственными программами	10
1.11 Личный вклад.....	11
1.12 Публикации.....	11
1.13 Апробация работы.....	15
1.14 Структура и объем диссертации.....	15
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
2.1 ТИАМИН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ В ЖИВОТНОЙ КЛЕТКЕ.....	16
2.1.1 Природные производные тиамина.....	16
2.1.2 Метаболизм тиамина у млекопитающих.....	19
2.1.3 Клеточный транспорт тиамина и его производных.....	22
2.2 СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ И АНТАГОНИСТЫ ТИАМИНА	24
2.2.1 Фармакологические формы тиамина с улучшенной биодоступностью.....	24
2.2.2 Синтетические и природные антагонисты тиамина.....	26
2.3 РОЛЬ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ЦЕНТРАЛЬНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ	30
2.3.1 Коферментная роль тиаминадифосфата.....	30
2.3.2 Некоферментная функция тиамина и его производных.....	31
2.4 МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ.....	34
2.4.1 Тиамин и патологии нервной системы.....	34
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
3.1 РЕАКТИВЫ И БИОМАТЕРИАЛЫ.....	39
3.1.1 Коммерческие.....	39
3.1.2 Полученные в ходе выполнения данной работы.....	39
3.1.2.1 Тиаминтрифосфат.....	39
3.1.2.2 Митохондрии мозга крысы и его отделов	41
3.1.2.3 Митохондрии печени крысы	42
3.2 ЭКСПЕРИМЕНТЫ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК.....	43
3.2.1 Культивирование клеток.....	43
3.2.2 Модели тиаминового дефицита	44
3.2.3 Измерение клеточной жизнеспособности.....	44
3.3 ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ЖИВОТНЫХ.....	45
3.3.1 Содержание крыс.....	45
3.3.2 Исследование действия тиамина в мозге крыс утром и вечером.....	46
3.3.3 Модель тяжелой травмы спинного мозга.....	46
3.3.4 Модель эпилепсии, индуцируемой пентилентетразолом.....	47
3.4 ПРОБОПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ.....	48

3.4.1	Приготовление метанол-уксусных экстрактов клеток.....	48
3.4.2	Приготовление метанол-уксусных экстрактов коры мозга крыс.....	48
3.4.3	Приготовление лизатов клеток.....	48
3.4.4	Приготовление гомогенатов коры мозга.....	49
3.4.5	Приготовление образцов для масс-спектрометрии и вестерн-блота.....	49
3.4.6	Обессоливание образцов.....	49
3.4.7	Ацетилирование <i>in vitro</i>	49
3.5	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ.....	50
3.5.1	Электрофорез для проведения вестерн-блота.....	50
3.5.2	Электрофорез и окраска кумасси для масс-спектрометрии.....	51
3.6	ВЕСТЕРН-БЛОТ.....	51
3.6.1	Полусухой перенос белков.....	51
3.6.2	Блокировка и инкубация с антителами.....	51
3.7	ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ.....	52
3.7.1	2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс.....	52
3.7.2	Пируватдегидрогеназный комплекс.....	53
3.7.3	Глутаминсинтетаза.....	53
3.7.4	Глутаматдегидрогеназа.....	53
3.7.5	НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа.....	54
3.7.6	НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа.....	54
3.7.7	Малатдегидрогеназа.....	54
3.7.8	НАДФ-зависимый малик-фермент.....	54
3.7.9	Пиридоксалькиназа.....	54
3.7.10	Глутамат-оксалоацетат и глутамат-пируват трансаминазы.....	55
3.7.11	ГАМК-трансаминаза.....	57
3.8	ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОБЩЕГО БЕЛКА.....	58
3.9	ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА.....	58
3.10	АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....	59
3.10.1	Анализ пептидов с помощью программ Skyline и PEAKS Studio.....	60
3.11	КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ.....	61
3.12	СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.....	62
4	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	63
4.1	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФОСФАТАЗ СЕМЕЙСТВА DING КАК ПОМЕНЦИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ТИАМИНФОСФАТОВ.....	63
4.2	МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПИРИДОКСАЛЬКИНАЗЫ.....	66
4.2.1	Взаимодействие ПЛК с тиамином, его производными и антагонистами.....	66
4.2.2	Влияние тиамина на активность и суточную регуляцию форилирования пиридоксалькиназы мозга <i>in vivo</i>	69
4.3.	ТИАМИН СНИЖАЕТ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ Ser293 PDHA1 ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ.....	72
4.4	МЕХАНИЗМЫ ТИАМИН-ЗАВИСИМОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ.....	74
4.4.1	Тиамин регулирует ацетилирование глутаматдегидрогеназы <i>in vivo</i>	74
4.4.2	Изучение механизмов регуляции глутаматдегидрогеназы быка тиамином и его производными с помощью рентгеноструктурного анализа.....	81
4.5	МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНА В НЕРВНОЙ ТКАНИ В МОДЕЛЯХ НЕЙРОПАТОЛОГИЙ	85
4.5.1	Глутаматдегидрогеназа как мишень действия тиамина при травме спинного мозга.....	85

4.5.2	Совместное введение тиамина и пиридоксала снижает активность пиридоксалькиназы в модели эпилепсии.....	89
4.6	ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ И АНТАГОНИСТОВ В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ.....	92
4.6.1	Перестройка метаболизма 2-оксоглутарата/глутамата лежит в основе зависимой от тиамина и p53/p21 регуляции жизнеспособности клеток A549.....	92
4.6.2	Действия тиамина или окситиамина на ОГДК и ГДГ клеток глиобластомы.....	99
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
6	ВЫВОДЫ.....	103
7	БЛАГОДАРНОСТИ.....	104
8	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ХТТ – (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксамид)

АК – аденилаткиназа

АТДФ – аденилированный тиаминдифосфат

АТТФ – аденилированный тиаминтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГДГ – глутаматдегидрогеназа

ГОТ – глутамат:оксалоацетат аминотрансфераза

ГПТ – глутамат:пируват аминотрансфераза

Децилтиазолий – (3-децилоксикарбонилметил-4-метил-5-(2-гидроксиэтил)тиазолий

МДГ – малатдегидрогеназа

МС – масс-спектрометрия

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид (окисленный)

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)

2-ОГ – 2-оксоглутарат

ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс

ПДГ – пируватдегидрогеназа

ПДК – пируватдегидрогеназный комплекс

ПЛК – пиридоксалькиназа

ПНФО – пиридоксин-5'-фосфат оксидаза

ТД – тиаминовый дефицит

ТДФ – тиаминдифосфат

ТМФ – тиаминмонофосфат

ТТФ – тиаминтрифосфат

ЦНС – центральная нервная система

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

МОПС – 3-(N-морфолино)-пропансульфонат

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан

ДТТ – дитиотреитол

ПЛ – печатный лист (16 страниц формата А4)

1. ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность

Тиамин (витамин В1) – это высокоактивное природное соединение, дифосфорилированная форма которого (кофермент тиаминдифосфат, ТДФ) является эффективным стимулятором окислительного метаболизма глюкозы. Значение данного метаболического пути для поддержания гомеостаза биосистем и отсутствие у тиаминных побочных эффектов определяют перспективы использования тиаминных производных для решения связанных с инженерией метаболизма проблем биотехнологии и медицины. Высокие дозы тиаминных и его фармакологических форм применяются в медицине для терапии патологий нервной системы и сердечно-сосудистых заболеваний. Однако эти дозы многократно превышают потребности человека в ТДФ как коферменте. Многочисленные данные указывают на существование мишеней действия тиаминных и его производных, отличных от ТДФ-зависимых ферментов, но механизм такого действия недостаточно изучен. Подобная некоферментная функция тиаминных и некоферментные производные тиаминных: тиаминтрифосфат (ТТФ) и аденилированный ТТФ – встречаются у представителей всех царств живых организмов. Таким образом, исследование новых механизмов действия тиаминных и его производных весьма актуально для биоинженерии метаболизма.

Эффективное использование тиаминных в качестве метаболического регулятора в биоинженерии и медицине невозможно без знания молекулярных механизмов и белковых мишеней действия тиаминных. Актуальны и исследования метаболизма тиаминных, включая механизмы его транспорта, позволяющие оценить взаимное влияние тиаминных и лекарственных препаратов при их одновременном приеме. Побочное действие медикаментозного лечения пациентов может приводить к дефициту у них тиаминных, тем самым способствуя развитию нейродегенеративных заболеваний. Таким образом, высокая актуальность поиска новых мишеней тиаминных и его производных определяется необходимостью идентификации молекулярных механизмов положительного действия тиаминных при ряде патологий и возможных побочных эффектов медикаментозного лечения,

приводящего к дефициту тиамина. Идентификация новых регулируемых тиамином белков и механизмов его действия может расширить список мишеней для биоинженерии и создания лекарственных средств на основе тиамина.

2. Степень разработанности темы

Мишени и механизмы действия тиамина, его производных и антагонистов у млекопитающих определены главным образом в области коферментного действия ТДФ. Также установлены наиболее очевидные аспекты метаболизма и транспорта тиамина. Однако открываются не только дополнительные транспортеры тиамина и производных, но и новые мишени их действия, с которыми данные соединения связываются по некоферментному типу, отличному от необходимого для катализа связывания кофермента ТДФ. Так, *in vitro* получены данные о регуляции тиамином и производными активностей ферментов: трансаминаз [1], глутаматдегидрогеназы, пиридоксалькиназы, малатдегидрогеназ [2] и сигнальных белков: p53, [3], PARP1 [4], прионного белка [5, 6]. Предполагается роль тиамина в регуляции посттрансляционных модификаций белков *in vivo*: ацетилирования и фосфорилирования [2], а также ТДФ-зависимое фосфорилирование белков [7]. Эти и другие данные литературы указывают на существование дополнительных к коферментному действию некоферментных механизмов регуляции метаболизма тиамином и его производными, таких как аллостерическое действие данных соединений, в том числе в качестве регуляторов посттрансляционных модификаций белков. Расшифровка такой многоуровневой регуляции метаболизма является актуальной задачей биоинженерии и медицины и соответствует развитию нового направления «мультиомиксных» технологий в рамках системной биологии.

3. Цель и задачи

Цель работы заключается в молекулярной характеристике некоферментных механизмов метаболической регуляции тиамином с учетом метаболизма

природных производных и антагонистов тиамин у млекопитающих. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. На основе данных геномики и протеомики определить потенциальные фосфатазы фосфорилированных производных тиамин.
2. С использованием природных производных и структурных аналогов тиамин исследовать детерминанты связывания тиамин и производных с пиридоксалькиназой.
3. На примере взаимодействующих с тиамином по некоферментному типу ферментов, пиридоксалькиназы и глутаматдегидрогеназы, охарактеризовать молекулярные механизмы некоферментного действия тиамин на активность, регуляторные свойства и посттрансляционные модификации ферментов *in vitro* и *in vivo*.
4. Охарактеризовать регуляторное действие тиамин, его производных и антагонистов на установленные *in vitro* и *in vivo* белковые мишени в моделях раковых клеток.

4. Научная новизна

Обнаружена специфическая элюция тиамином с тиамин-содержащей сефарозы фосфатаз семейства DING и структурное сходство этих фосфатаз с тиамин/ТМФ-связывающим белком бактерий, свидетельствующие о потенциальной активности данных фосфатаз в качестве ТМФ-аз.

С помощью кинетических исследований взаимодействия производных и аналогов тиамин с пиридоксалькиназой впервые охарактеризованы структурные детерминанты регуляции пиридоксалькиназы тиаминовыми соединениями.

Охарактеризована суточная регуляция активности ферментов мозга: пиридоксалькиназы, пируватдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы – и ее изменения при введении тиамин. Установлено влияние введения животным тиамин на уровень (де)фосфорилирования S213 и S285 пиридоксалькиназы, S293 пируватдегидрогеназы и ацетилирование K503 глутаматдегидрогеназы; выявлена зависимость регуляторных эффектов тиамин от времени суток.

Получены приоритетные данные относительно механизмов регуляции связывания GTP, ADP и лейцина глутаматдегидрогеназой при ацетилировании ее остатков лизина K503, K84, K545, K200.

В животных моделях нейропатологий охарактеризованы молекулярные механизмы защитного действия тиамин через белки, участвующие в тиаминовой регуляции некоферментного типа, такие как пиридоксалькиназа, глутаматдегидрогеназа, p53 и сиртуин 5.

Впервые охарактеризовано критическое для жизнеспособности раковых клеток аденокарциномы A549 сопряжение молекулярных механизмов коферментного и некоферментного действия тиамина. Показано, что взаимодействие ТДФ с сигнальным путем p53-p21 опосредовано уровнем холофермента 2-оксоглутаратдегидрогеназы, определяющим переключение потоков субстратов в метаболическом узле взаимопревращений 2-оксоглутарата и глутамата. Коферментное и некоферментное действие тиамина в данном метаболическом узле также охарактеризовано в клетках глиобластомы U87 и T98G при сравнении тиамина и его антагониста окситиамина.

Таким образом, охарактеризованы новые молекулярные механизмы и мишени некоферментного действия тиамина. Показано сопряжение некоферментного и коферментного типов тиаминовой регуляции, в том числе через посттрансляционные модификации белков и путем воздействия на транскрипцию генов, зависящих от p53.

5. Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая (фундаментальная) значимость работы заключается в расшифровке молекулярных механизмов и идентификации новых мишеней некоферментного действия тиамина у млекопитающих. Практическая значимость определяется возможностью использования идентифицированных белков-мишеней тиамина для решения проблем регуляции метаболизма в биоинженерии и для разработки лекарственных препаратов и оптимальных терапий в медицине. Так, полученные в данной работе знания открывают новые возможности не только для создания лекарств, имитирующих или нарушающих охарактеризованные в

работе механизмы, но и для предотвращения негативных взаимодействий имеющихся лекарственных препаратов с поступлением в клетки тиамина. Медицинская значимость проведенного исследования также определяется ролью тиамина в таких социально значимых патологиях, как болезнь Альцгеймера, травматические повреждения мозга и рак.

6. Методология и методы исследования

Для определения новых мишеней и молекулярных механизмов действия тиаминовых соединений использованы передовые методы биоинженерии, биохимии, молекулярной биологии и кристаллографии, дополненные статистическим и биоинформатическим анализом. Основные методы данной работы включают: анализ ферментативных активностей, масс-спектрометрический анализ белков и их посттрансляционных модификаций, вестерн-блоттинг, рентгеноструктурный анализ, аффинную хроматографию, биоинформатические методы анализа структур и последовательностей, статистический анализ. Использованные модели и методы подробно описаны в публикациях по теме диссертации [8-10].

7. Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются клетки, ткани и белковые мишени действия тиамина и его производных у млекопитающих. Предметом исследования являются молекулярные механизмы регуляции метаболизма млекопитающих тиамином, его производными и антагонистами.

8. Положения, выносимые на защиту

1. Взаимодействие фосфатов тиаминна с пиридоксалькиназой усиливается с увеличением количества фосфатных групп. Взаимодействие тиаминна с пиридоксалькиназой происходит в центре, отличном от центра связывания тиаминфосфатов, и имитируется антагонистами тиаминна – ампролиумом и пиритиамином.
2. Ацетилирование остатков лизина глутаматдегидрогеназы быка регулирует связывание GTP (через K503), ADP (K84 и K545) и лейцина (K200) в соответствующих аллостерических центрах.
3. Глутаматдегидрогеназа, пиридоксалькиназа и пируватдегидрогеназа мозга крыс регулируются ацетилированием или фосфорилированием в зависимости от времени суток и/или введения высокой дозы тиаминна. Тиаминовая регуляция глутаматдегидрогеназы и пиридоксалькиназы вносит вклад в нейропротекторное действие тиаминна в животных моделях нейропатологий.
4. Сопряжение некоферментного и коферментного действия тиаминна участвует в критическом для жизнеспособности раковых клеток переключении метаболизма в узле глутамата/2-оксоглутарата, контролируемом онкосупрессором p53.

9. Степень достоверности

Достоверность результатов определяется применением статистических критериев и проверок при анализе, процедурой независимого рецензирования публикаций по теме диссертации, согласованностью с независимыми исследованиями в данной области.

10. Связь с государственными программами

Диссертационная работа выполнена при поддержке грантов РФФИ «Аспиранты» № 19-34-90138 (Руководитель Бунник-Фаренвальд В.И.), «Итал_т» № 18-54-7812 (Руководитель Бунник-Фаренвальд В.И.), «Итал_т» № 20-54-7804

(Руководитель Граф А.В.), «Мол_а» № 18-34-00235 (Руководитель Алешин В.А.) и грантов РФФИ № 14-15-00133 (Руководитель Буник-Фаренвальд В.И.) № 18-14-00116 (Руководитель Буник-Фаренвальд В.И.).

11. Личный вклад

Соискателем были получены основные результаты представленной работы. Интерпретация результатов и подготовка их к публикации также составляют личный вклад. Соискатель непосредственно участвовал в экспериментах, проводимых в кооперации со специализированными на определенных методах исследовательскими группами. Так, аффинная хроматография была выполнена в сотрудничестве с группой д.б.н. Пархоменко Ю.М. (Институт Биохимии имени Палладина, Киев, Украина); масс-спектрометрический анализ проводился в сотрудничестве с профессором Кэне Т. (Университет Отто-фон-Герике, Магдебург, Германия); клеточные эксперименты были проведены в сотрудничестве с профессором Карлссон А. (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция), и профессором Гауницем Ф. (Лейпцигский университет, Лейпциг, Германия), рентгеноструктурный анализ проводился в сотрудничестве с доктором Беллинцони М. (Институт Пастера, Париж, Франция). В работе использовались животные модели, разработанные группами к.б.н. Граф А.В. (МГУ, Москва, Россия) (эпилепсия) и к.б.н. Рябова С.И. (Кардиологический научно-производственный комплекс, Москва, Россия) (травма спинного мозга).

12. Публикации¹

По материалам диссертации опубликовано 16 экспериментальных и 2 обзорные статьи в журналах, индексируемых в RSCI, WoS или Scopus.

1. Graf AV, Maslova MV, Artiukhov AV, Ksenofontov AL, **Aleshin VA**, Bunik VI. (2022) Acute Prenatal Hypoxia in Rats Affects Physiology and Brain Metabolism in the Offspring, Dependent on Sex and Gestational Age // International Journal of Molecular Sciences. 23(5):2579. IF WoS = **5.923** – (0,94/0,2).

В скобках дан объем публикации и вклад автора в печатных листах (ПЛ).

2. Artiukhov AV, Graf AV, Kazantsev AV, Boyko AI, **Aleshin VA**, Ksenofontov AL, Bunik VI. (2022) Increasing Inhibition of the Rat Brain 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Decreases Glutathione Redox State, Elevating Anxiety and Perturbing Stress Adaptation // *Pharmaceuticals*. 15(2):182. IF WoS = **5.863** – (1,06/0,15).
3. Bunik V, **Aleshin V**, Nogues I, Kähne T, Parroni A, Contestabile R, di Salvo M, Graf A, Tramonti A (2022) Thiamine-dependent regulation of mammalian brain pyridoxal kinase in vitro and in vivo // *J Neurochem*. 161, 20-39 IF WoS = **5.372** – (1,25/0,45).
4. Kolesanova EF, Boyko AI, Chashnikova AA, Gnedoy SN, Kaehne T, Ivanova DA, Kolesnichenko AV, **Aleshin VA**, Artiukhov AV & Bunik VI (2021) Preparation of affinity purified antibodies against ϵ -glutaryllysine residues in proteins for investigation of glutarylated proteins in animal tissues // *Biomolecules*. 11(8):1168. IF WoS = **4.879** – (0,94/0,08).
5. **Aleshin VA**, Artiukhov AV, Kaehne T, Graf AV & Bunik VI (2021) Daytime dependence of the activity of the rat brain pyruvate dehydrogenase corresponds to the mitochondrial sirtuin 3 level and acetylation of brain proteins, all regulated by thiamine administration decreasing phosphorylation of PDHA Ser293 // *Int J Mol Sci*. 22(15):8006. IF WoS = **5.923** – (1,12/0,45).
6. **Aleshin VA**, Graf AV, Artiukhov AV, Boyko AI, Ksenofontov AL, Maslova MV, Nogues I, di Salvo ML & Bunik VI (2021) Physiological and Biochemical Markers of the Sex-Specific Sensitivity to Epileptogenic Factors, Delayed Consequences of Seizures and Their Response to Vitamins B1 and B6 in a Rat Model // *Pharmaceuticals*. 14(8):737. IF WoS = **5.863** – (1,44/0,6).
7. **Aleshin VA**, Zhou X, Krishnan S, Karlsson A, Bunik VI. (2021) Interplay Between Thiamine and p53/p21 Axes Affects Antiproliferative Action of Cisplatin in Lung Adenocarcinoma Cells by Changing Metabolism of 2-Oxoglutarate/Glutamate // *Front Genet*. 12:658446. IF WoS = **4.599** – (0,8/0,35).
8. Boyko A, Tsepkova P, **Aleshin V**, Artiukhov A, Mkrtchyan G, Ksenofontov A, Baratova L, Ryabov S, Graf A & Bunik V (2021) Severe spinal cord injury in rats

- induces chronic changes in the spinal cord and cerebral cortex metabolism, adjusted by thiamine that improves locomotor performance // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 14:620593. IF WoS = **5.639** – (1,38/0,3).
9. Bunik VI, **Aleshin VA**, Zhou X, Krishnan S, Karlsson A. (2020) Regulation of Thiamine (Vitamin B1)-Dependent Metabolism in Mammals by p53 // *Biochemistry (Mosc)*. 85(7):801-807. IF WoS = **2.487** – (0,44/0,2).
 10. **Aleshin VA**, Mezhenka OA, Parkhomenko YM, Kaehne T, Bunik VI. (2020) Thiamine Mono- and Diphosphate Phosphatases in Bovine Brain Synaptosomes // *Biochemistry (Mosc)*. 85(3):378-386. IF WoS = **2.487** – (0,56/0,25).
 11. Bunik VI, **Aleshin VA**, Zhou X, Tabakov VY, Karlsson A. (2020) Activation of Mitochondrial 2-Oxoglutarate Dehydrogenase by Cocarboxylase in Human Lung Adenocarcinoma Cells A549 Is p53/p21-Dependent and Impairs Cellular Redox State, Mimicking the Cisplatin Action // *Int J Mol Sci*. 21(11):3759. IF WoS = **5.923** – (1,44/0,6).
 12. Artiukhov AV, Grabarska A, Gumbarewicz E, **Aleshin VA**, Kähne T, Obata T, Kazantsev AV, Lukashev NV, Stepulak A, Fernie AR & Bunik VI (2020) Synthetic analogues of 2-oxo acids discriminate metabolic contribution of the 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in mammalian cells and tissues // *Scientific Reports*. 10(1):1886. IF WoS = **4.379** – (1,38/0,15).
 13. **Aleshin VA**, Mkrtchyan GV, Kaehne T, Graf AV, Maslova MV, Bunik VI. (2020) Diurnal regulation of the function of the rat brain glutamate dehydrogenase by acetylation and its dependence on thiamine administration // *J Neurochem*. 153(1):80-102 IF WoS = **5.372** – (1,44/0,5).
 14. Mezhenka OA, **Aleshin VA**, Kaehne T, Artiukhov AV & Bunik VI (2020) Regulation of malate dehydrogenases and glutamate dehydrogenase of mammalian brain by thiamine in vitro and in vivo // *Biochemistry (Mosc)*. 85(1):27-39. IF WoS = **2.487** – (0,81/0,3).
 15. Itkis Y, Krylova T, Pechatnikova NL, De Grassi A, Tabakov VY, Pierri CL, **Aleshin V**, Boyko A, Bunik VI, Zakharova EY. (2019) A novel variant m.641A>T in the mitochondrial MT-TF gene is associated with epileptic encephalopathy in

- adolescent // Mitochondrion. 47:10-17. IF WoS = **4.160** – (0,5/0,05).
16. **Aleshin VA**, Artiukhov AV, Oppermann H, Kazantsev AV, Lukashev NV & Bunik VI (2015) Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays // Cells. 4(3):427-51. IF WoS = **6.600** – (1,56/0,5).
 17. **Aleshin VA**, Mkrtchyan GV, Bunik VI. (2019) Mechanisms of Non-coenzyme Action of Thiamine: Protein Targets and Medical Significance // Biochemistry (Mosc). 84(8):829-850. IF WoS = **2.487** – (1,38/0,6).
 18. Bunik V, **Aleshin V** (2017) Analysis of the Protein Binding Sites for Thiamin and Its Derivatives to Elucidate the Molecular Mechanisms of the Noncoenzyme Action of Thiamin (Vitamin B1) // Studies in Natural Products Chemistry. 53:375-429. *Scopus CiteScore* = **1.6** – (3,4/1,1).

13. Аprobация работы

Основные результаты диссертации защищены в 2021 году в рамках научно-квалификационной работы, подготовленной соискателем при обучении в аспирантуре факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ. Результаты работы докладывались соискателем на ученом совете НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ в 2015, 2016, 2018 и 2019 г, и на российских и международных конференциях: «The 33rd ECNP Congress», 2020, онлайн (постер), «Международный симпозиум “Российское наследие Александра фон Гумбольдта”», Москва, 2019 (доклад), «The 32nd ECNP Congress», 2019, Копенгаген, Дания (постер), «EMBO at Basel Life 2018», 2018, Базель, Швейцария (постер), «Конференция молодых ученых ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России», 2016, Москва (доклад), «XXVIII зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии"», 2016, Москва (постер), «The 8th International Conference on Thiamine: From Catalysis to Pathology», 2014, Льеж, Бельгия (постер; доклад в качестве победителя конкурса постеров), «Международная научная

конференция студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов”», 2016, 2015, 2014, Москва (доклады).

14. Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 204 ссылки. Работа изложена на 118 страницах текста, содержит 15 таблиц и 28 рисунков.

Тиамин стабилен в кислой среде, но при $pH > 7$ усиливается его окисление и/или гидролиз [12]. В зависимости от условий можно наблюдать окисление тиамин до тиаминдисульфида, тиохрома, а также 4'-окситиамина или 2-окситиамина, которые являются антагонистами тиамин. Небольшое количество этих форм, в частности дифосфорилированного 4'-оксиТДФ, присутствует в крови даже здоровых людей; их уровень увеличивается при окислительном стрессе, например при хронической болезни почек [13]. Однако окислительный стресс приводит к снижению общего пула тиаминовых соединений, например при радиационном поражении [14]. С другой стороны, реакционная способность тиамин может обеспечивать антиоксидантные свойства его высоких доз, например при реакции с активными формами кислорода и азота [15]. Таким образом, природные производные тиамин у млекопитающих представлены тиамин, его фосфорными и аденилированными производными, а также небольшим количеством окисленных форм тиамин.

Из всех производных тиамин лучше всего охарактеризована функция ТДФ в качестве кофермента, незаменимого для метаболизма углерода. Однако у ТДФ и других производных тиамин имеется и так называемая некоферментная функция, значение которой недостаточно охарактеризовано. При этом все производные тиамин (Рис. 1) имеются у представителей всех царств живых организмов. При расшифровке функции производных тиамин и механизма их действия, при поиске их мишеней важно учитывать локализацию этих соединений в клетках и тканях. В клетке млекопитающих содержатся все известные формы тиаминовых соединений (Рис. 1), основной из которых, как правило, является ТДФ (около 90% от общего количества), но в тканях некоторых животных концентрация ТТФ превышает концентрацию ТДФ, например, в скелетных мышцах свиньи, курицы, в электрическом органе угря *E. electricus* [16]. В плазме крови и цереброспинальной жидкости содержатся преимущественно тиамин и ТМФ [16-18], способные миновать гематоэнцефалический барьер [19].

В разных тканях количество ТДФ варьирует в пределах 20-150 пикомоль на мг белка, что соответствует концентрации 4-30 мкМ ТДФ в клетках. Содержание тиамина – не более 5 пикомоль на мг белка (1 мкМ), ТМФ – от 2 до 15 пикомоль на мг белка (0,4-3 мкМ) [16]. Содержание ТТФ находится в пределах 3 пикомоль на мг белка (0,6 мкМ) и не превышает 1% от общего пула тиамина [16]. Концентрация АТТФ не превышает 0,3 пикомоля на мг белка (0,06 мкМ) в мозге [16, 18], но в некоторых клетках, например линии глиобластомы LN-18, концентрация АТТФ достигает 20 пикомоль на мг белка (4 мкМ) [16].

Регуляция уровня ТДФ, основного компонента тиаминового пула, контролируется у бактерий, грибов и растений с помощью ТДФ-рибопереключателя. РНК генов метаболизма и транспорта тиамина содержат консервативную нуклеотидную последовательность в 5'-нетранслируемой области, способную специфично связывать ТДФ, влияя на трансляцию, а у представителей эукариот и на альтернативный сплайсинг [20]. У животных, нет подобного ТДФ-рибопереключателя, но есть механизмы контроля метаболизма тиамина через некодирующие РНК. Так, микроРНК miR-155 регулирует экспрессию мембранного транспортера тиамина SLC19A2, тиаминдифосфокиназы (Рис. 1) и митохондриального ТДФ-транспортера SLC25A19 [21]. Также ТДФ регулирует активность p53 у животных, связываясь с этим транскрипционным фактором конкурентно по отношению к ДНК [3]. p53 активирует экспрессию транспортера тиамина SLC19A2 [22], поэтому он может быть белковым «сенсором» ТДФ у млекопитающих, подобно ТДФ-рибопереключателю других организмов. В данном случае p53 является одной из некоферментных мишеней ТДФ.

Таким образом, концентрация любого из компонентов тиаминового пула (Рис. 1), в том числе ТТФ и АТТФ, может значительно варьировать и достигать нескольких мкМ, а концентрация ТДФ имеет порядок 10^{-4} М. Такие концентрации ТДФ на порядок выше тех, что необходимы для насыщения ТДФ-зависимых ферментов [23]. Вполне возможно, такой избыток связан с

реализацией некоферментных функций тиамина и производных при более высоких, чем требуемые для коферментного действия, концентрациях.

2.1.2. Метаболизм тиамина у млекопитающих

Белки метаболизма тиамина могут контролировать изменения локальных концентраций его производных, поэтому знать эти ферменты необходимо для понимания механизмов действия тиамина. К сожалению, на молекулярном уровне идентифицированы далеко не все ферменты млекопитающих, осуществляющие установленные взаимные превращения тиаминовых соединений (Рис. 1).

Цитоплазматическая тиаминдифосфокиназа (ген *TPK1*) катализирует превращение тиамина в ТДФ (ЕС 2.7.6.2, Реакция 1, Рис. 1). Мутации данного фермента приводят к синдрому Лея и различным энцефалопатиям у людей, с характерным симптомом – лактатным и/или 2-оксоглутаратным ацидозом, возникающим при нарушении ТДФ-зависимого катаболизма пирувата и 2-оксоглутарата [24, 25].

ТДФ подвержен гидролизу со стороны ТДФ-фосфатаз (ТДФ-аз) с образованием ТМФ (Реакция 2, Рис. 1). Как минимум некоторые из фосфатаз являются исключительно фосфатазами ТДФ, но не гидролизуют ТМФ [26]. Подобная специфичность характерна для ферментов апираз. Связывание и гидролиз ТДФ показаны для апиразы *L. pneumophila* [27]. У людей имеется восемь генов апираз (*ENTPDI-8*), и можно предположить роль апираз в качестве не идентифицированных на молекулярном уровне ТДФ-аз [26, 28].

ТМФ может образовываться не только из ТДФ, но и из тиамина с использованием различных доноров фосфата (Реакция 3, Рис. 1) – креатинфосфата или β-глицерофосфата [29]. Реакцию катализирует щелочная фосфатаза кишечника (ген *ALPI*) [29].

Трансмембранная кислая фосфатаза простаты (ген *ACPP*) обладает активностью в качестве ТМФ-азы (Реакция 4, Рис.1). Ее локализация вне клетки согласуется с циркуляцией ТМФ в плазме крови. Фосфатаза

необходима для обезболивающего действия в спинном мозге – ТМФ и его лекарственного производного бенфотиамина [30, 31]. Также считается, что для ресинтеза ТДФ из ТМФ необходим гидролиз последнего до тиамина (Реакция 4, Рис.1).

ТТФ может синтезироваться из АТР и ТДФ. Фермент, соответствующий такой реакции, называли ТДФ-фосфорилтрансфераза или ТТФ-синтаза. Реакция была показана в препарате из спинного мозга свиньи [32], но сам фермент не был идентифицирован на молекулярном уровне. Позже установили, что очищенная из аналогичного препарата мозга быка ТДФ-фосфорилтрансфераза катализирует реакцию синтеза ТТФ, но продукт остается связанным с белком [33]. На молекулярном уровне ТДФ-фосфорилтрансфераза (ТТФ-синтаза) не идентифицирована даже у бактерий, которым характерно накопление ТТФ при стрессе [34].

Аденилаткиназа (АК) переносит *in vitro* фосфат с ADP на ТДФ с образованием ТТФ [17] (Реакция 5, Рис. 1), но биологическое значение этого процесса неоднозначно. С одной стороны, мутация изофермента *AKI* с заменой Arg128Trp в АТР-сайте показало увеличение продукции ТТФ [35]. С другой стороны, нокаут *AKI* не влияет на уровень ТТФ [36]. Условия синтеза ТТФ *AKI* также не физиологичны: pH-оптимум около 10 [37], $K_m^{ТТФ} = 0,83 \text{ мМ}$ при концентрации свободного ТДФ в клетке около 0,1 мМ [38]. И все же у млекопитающих найдено целых девять генов АК (*AKI-9*). Показана корреляция общей активности аденилаткиназ и уровня ТТФ в мышцах крысы [39]. Таким образом, синтез ТТФ может осуществляться одним из изоферментов АК, отличным от *AKI*.

Синтез ТТФ – из ТДФ и фосфата (*Pi*) – (Реакция 6, Рис. 1) показан в митохондриях мозга в присутствии субстратов дыхательной цепи, останавливается ингибиторами F₁F₀-АТР-синтазы и разобщителями [40]. У *E. coli* накопление ТТФ происходит независимо от наличия гена/плазмиды F₁F₀-АТР-синтазы [41]. Тем не менее, авторы не смогли продемонстрировать

синтез ТТФ *in vitro* очищенной F₁F₀-АТР-синтазой, хотя полученный ими фермент мог синтезировать АТР.

Низкая концентрация ТТФ в большинстве клеток поддерживается с помощью тиаминтрифосфатаз (ТТФ-аз) (Реакция 7, Рис. 1). Существуют две формы – растворимая и мембранная ТТФ-азы, но только растворимая ТТФ-аза идентифицирована на молекулярном уровне (ЕС 3.6.1.28, ген *THTPA*). Она имеет k_{cat}/K_m в диапазоне 10^6 – 10^7 сек⁻¹·моль⁻¹ и обладает высокой ТТФ-специфичностью [42].

Синтез АТТФ осуществляется ТДФ-аденилтрансферазой (Реакция 8, Рис. 1) [16], но не известно, является ли субстратом АДФ или АТР. Низкая концентрация АТТФ, предположительно поддерживается с помощью его гидролиза с образованием ТДФ (Реакция 9, Рис. 1). Гидролаза АТТФ локализована в мембране *E. coli* [18]. Помимо АТТФ, идентифицировано дифосфорное производное тиамин и аденозина – АТДФ [18], которое предположительно является побочным продуктом синтеза АТТФ (Реакция 10, Рис. 1).

Помимо киназ и фосфатаз производных тиамин (Рис. 1), известны ферменты деградации тиамин – тиаминазы, идентифицированные в основном у бактерий [43, 44]. Тиаминазы были выделены из тканей, например, рыб [45], и предположительно идентичны белкам из семейства серпинов [11], но существование тиаминаз не доказано у млекопитающих. Однако у мышей показана быстрая деградация тиамин с использованием [³⁵S]-изотопа до 5-(2-гидроксиэтил)-4-метилтиазола или 4-метилтиазол-5-уксусной кислоты [46, 47]. Очевидно, введение высоких доз тиамин приводит в значительной степени не только к насыщению организма им и фосфатами, но и сопровождается процессом деградации и выведения излишков тиамин, с временным накоплением продуктов распада. Не исключено, что такие метаболиты могут иметь физиологическое значение. Так, седативный препарат, агонист GABA_A рецептора, хлорметиазол (геминейрин, 5-(2-

хлорэтил)-4-метилтиазол), является структурным аналогом тиазолового фрагмента тиамин.

Таким образом, у млекопитающих идентифицированы далеко не все ферменты метаболизма тиамин, однако учитывая метаболическое значение тиамин и его производных, эти ферменты являются потенциальными мишенями терапевтической регуляции и требуют идентификации на молекулярном уровне.

2.1.3. Клеточный транспорт тиамин и его производных

Транспорт через мембраны заряженных тиамин или его фосфорных производных, требует наличия белковых транспортеров. Контроль их экспрессии позволяет тканеспецифично регулировать метаболизм [22, 28].

У млекопитающих хорошо охарактеризованы два основных клеточных транспортера тиамин – SLC19A2 ($K_m = 2,5 \cdot 10^{-6}$ М) и SLC19A3 ($K_m = 2,7 \cdot 10^{-8}$ М) (Рис. 2) [48, 49]. Мутации гена *SLC19A2* вызывают развитие необратимой ранней потери слуха [50]. Мутации *SLC19A3* вызывают неврологические симптомы, подобные синдрому Лея [51, 52]. Полиморфизм в предполагаемом транспортере тиамин SLC35F3 ассоциирован с меньшим содержанием тиамин в эритроцитах и гипертензией [53]. Также возможен транспорт тиамин через плазматические переносчики органических катионов (семейство транспортеров OCT) – SLC22A1 (OCT1) и SLC22A2 (OCT2) с K_m около 10-60 мкМ (Рис. 2) [54-56].

Для транспорта в митохондрии синтезируемого в цитоплазме ТДФ служит SLC25A19 (Рис. 2). Его мутации приводят к дисфункции митохондриальных ТДФ-зависимых ферментов. Их фенотипические проявления: микроцефалия и билатеральный некроз [57]. Существует и мембранный транспортер ТДФ – SLC44A4 (Рис. 2). Он относится к семейству холиновых транспортеров и экспрессируется преимущественно в клетках эпителия кишечника [58].

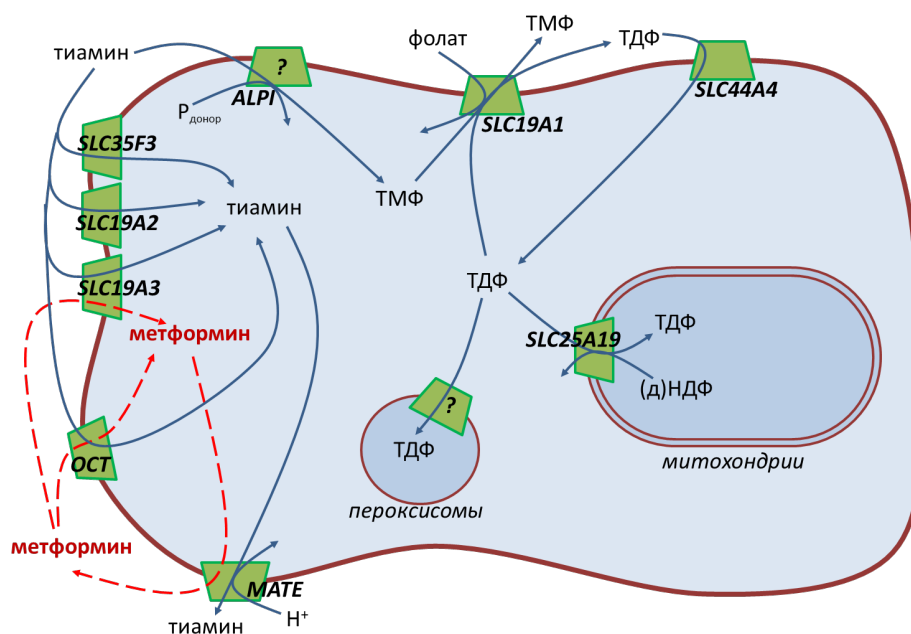


Рис. 2. Механизмы клеточного транспорта (производных) тиамин. Транспортеры показаны зеленым. Транспорт тиамин и его производных показан синими сплошными стрелками, транспорт метформин показан красными пунктирными стрелками [11].

Транспорт фолата в клетку в обмен на ТМФ и ТДФ может осуществляться через SLC19A1 (Рис. 2) [59]. В экспорте тиамин могут участвовать и белки множественной лекарственной устойчивости MATE1 (SLC47A1) и MATE2-K (SLC47A2) (Рис. 2). K_m тиамин для этих транспортеров составляют 3,5 мкМ и 3,9 мкМ, соответственно [56, 60], что подтверждает физиологическое значение их как транспортеров тиамин.

Транспорт тиамин нарушается при злокачественной трансформации. Так, в клетках и опухолях рака молочной железы [61], желудка [62] и прямой кишки [63] снижается экспрессия SLC19A3. Это вызвано эпигенетическими механизмами: деацетилированием гистонов и гиперметилованием ДНК в промоторной области *SLC19A3* [62, 63]. В независимом исследовании установили увеличение экспрессии SLC19A2, SLC25A19 и тиамидифосфокиназы в опухолях молочной железы [64]. Совместно эти три белка могут обеспечить повышение транспорта тиамин, его конверсию в ТДФ и транспорт в митохондрии. В клетках N2A нейробластомы показано увеличение экспрессии SLC25A19 и суммарного уровня тиаминовых соединений, по сравнению с астроцитами [65]. Таким образом, данные об

изменении транспорта тиамина при онкотрансформации противоречивы и, очевидно, зависят от типа рака.

Важно отметить, что изменения экспрессии генов, связанные с регуляцией генов тиамина, могут не иметь отношения к ТДФ-зависимым ферментам. Так, в клетках рака молочной железы индуцированная гиперэкспрессия SLC19A3 ассоциирована с уменьшением экспрессии фактора TFF1 и ингибитора диссоциации GDP Rho-белков, а также увеличением экспрессии цитохрома P450 CYP4B1; депривация клеток от тиамина имела обратный эффект на эти мишени [66]. Подобные результаты показывают, что регуляция тиамином жизнедеятельности раковых клеток не обязательно в первую очередь связана с коферментной функцией ТДФ.

2.2. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ И АНТАГОНИСТЫ ТИАМИНА*

2.2.1. Фармакологические формы тиамина с улучшенной биодоступностью

Гиповитаминоз тиамина распространен и в наши дни, причем в развитых странах он встречается не столько из-за недостатка в пище, сколько из-за последствий некоторых медикаментозных воздействий, диализа, при возраст-ассоциированных заболеваниях. Современные способы устранения дефицита витамина B1, как правило, основаны на использовании его (B1) фармакологических производных с повышенной биодоступностью (Рис. 3). Дисульфидные производные сульбутиамин и фурсултиамин являются аналогами природного дисульфида аллитиамина (Рис. 3) [67]. Отсутствие заряда и гидрофобность определяет хорошую мембранную проницаемость данных веществ. После проникновения в клетки дисульфиды восстанавливаются за счет клеточных тиолов и превращаются в тиамин.

** При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Mkrtchyan GV, Bunik VI. (2019) Mechanisms of Non-coenzyme Action of Thiamine: Protein Targets and Medical Significance. Biochemistry (Mosc). 84(8):829-850 (вклад 0,6/1,38 ПЛ). Bunik V, Aleshin V (2017) Analysis of the Protein Binding Sites for Thiamin and Its Derivatives to Elucidate the Molecular Mechanisms of the Noncoenzyme Action of Thiamin (Vitamin B1). Studies in Natural Products Chemistry 53:375-429 (вклад 1,1/3,4 ПЛ).*

S-Ацилпроизводные, такие как бенфотиамин (Рис. 3), составляют другой класс фармакоформ тиамина. Им также характерно наличие открытого тиазольевого кольца тиамина. Интересно, что по структуре бенфотиамин скорее соответствует ТМФ из-за наличия фосфата. Действие бенфотиамина, как правило, сравнивают с действием тиамина в различных исследованиях [68, 69]. Учитывая структурные особенности бенфотиамина, различие их эффектов (которое нельзя ожидать, исходя лишь из коферментной функции) вполне оправдано [68]. Так, фосфатаза простаты АСРР, экспрессируемая в нейронах спинальных ганглиев, дефосфорилирует и бенфотиамин, и ТМФ [30, 31]. Именно роль этой ТМФ-азы может обуславливать действие бенфотиамина при нейропатической боли и воспалении, которое зависит от кислой фосфатазы [30, 31].

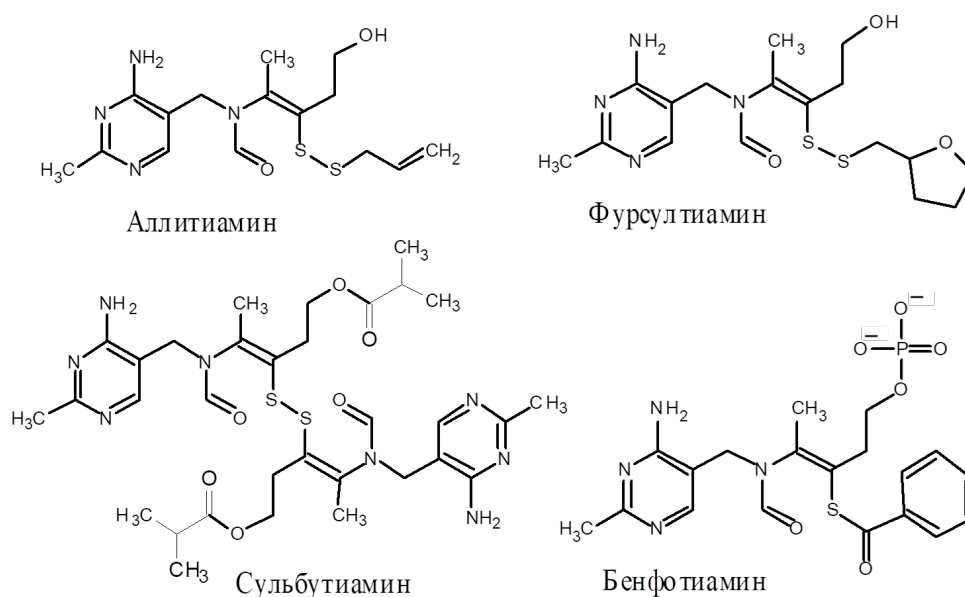


Рис. 3. Наиболее известные фармакологические формы тиамина [11].

Например, накопление β -амилоида при дефиците витамина В1 можно объяснить нарушениями функции ТДФ-зависимых ферментов [70]. Однако снижение бенфотиамином количества β -амилоида и улучшение когнитивной функции происходит без увеличения в мозге уровня ТДФ, т. е. независимо от ТДФ, что указывает на некоферментное действие бенфотиамина [71]. Бенфотиамин может уменьшать β -амилоидные бляшки в культуре клеток НЕК293 с гиперэкспрессией предшественника β -амилоида [72]. В обоих

рассмотренных независимых исследованиях наблюдали снижение активности киназы гликогенсинтазы GSK3- β . Более того, в животной модели стресса, при котором наблюдается увеличение GSK3- β , введение бенфотиамина или тиамин снижает экспрессию GSK3- β , предотвращает снижение нейрогенеза в гиппокампе и улучшает когнитивную функцию [73, 74]. Все это сопровождается ростом содержания тиамин, но не ТДФ в мозге. Отсутствие корреляции уровня ТДФ в мозге и положительных эффектов бенфотиамина указывает на преимущественно некоферментный характер действия бенфотиамина в мозге.

2.2.2. Синтетические и природные антигонисты тиамин

Антагонисты тиамин – это его структурные аналоги, блокирующие процессы, зависящие от тиамин. В качестве антагонистов рассматриваются в первую очередь блокаторы коферментной функции ТДФ. Наиболее известны антагонисты: 4'-окситиамин, пиритиамин и ампролиум (Рис. 4). Их действие сильно отличается по молекулярному механизму [23]. Ампролиум подавляет транспорт тиамин, способствуя его дефициту в клетках. В мышинных моделях показано относительно медленное развитие тиаминного дефицита от ампролиума, по сравнению с другим антагонистом – пиритиамином [75]. Пиритиамин (Рис. 4) транспортируется в клетку и подавляет тиаминдифосфокиназу (ген *TPK1*), препятствуя фосфорилированию тиамин до ТДФ (Рис. 1) и вызывая дефицит ТДФ [23]. Показано также использование тиаминдифосфокиназой пиритиамина с образованием пиритДФ, но с низкой эффективностью [23, 28]. 4'-Окситиамин тоже транспортируется в клетку и является хорошим субстратом тиаминдифосфокиназы, синтезирующей 4'-окситДФ. Это вещество эффективно блокирует ТДФ-зависимые ферменты. Потенциально, аналоги тиамин и его производных могут выполнять и функции, не связанные с коферментной функцией тиамин.



Рис. 4. Структурные формулы метформина и наиболее известных антагонистов тиамина [11].

Функция ТДФ-зависимых белков затрагивает основные метаболические пути, поэтому зачастую можно интерпретировать влияние антагонистов тиамина как опосредованный эффект нарушения коферментной роли ТДФ. Однако существуют примеры, явно указывающие на ошибочность такого суждения. Так, 4'-окситиамин способствовал росту кальций-зависимого высвобождения ацетилхолина в синаптической щели [76], тогда как ингибирование ТДФ-зависимой пируватдегидрогеназы (ПДГ) должно уменьшать уровень ацетилхолина, синтезируемого из ацетил-КоА. Такое действие 4'-окситиамина аналогично наблюдаемому усилению ацетилхолинергической неротрансмиссии тиамином [77, 78]. Таким образом, эффект 4'-окситиамина похож на действие тиамина, что соответствует их структурному сходству, но не коферментной функции ТДФ.

Обнаружено, что 4'-окситиамин и его фосфопроизводные присутствуют *in vivo* даже здоровых людей [13], а у различных организмов имеются ферменты детоксификации 4'-оксиТДФ [79, 80]. У бактерий, дрожжей и растений найдена гидролаза семейства NUDIX, специфичная к 4'-окси- и 2-оксоТДФ [80]. Ортологи этой NUDIX-гидролазы есть у рыб, амфибий и некоторых других хордовых, но у млекопитающих такие NUDIX-гидролазы не найдены. Предполагается, что 4'-оксиТДФ образуется под действием окислительного стресса из ТДФ [79-81]. Этот путь подтверждается накоплением в крови человека 4'-оксиТДФ при хронической болезни почек, вызывающей сильный окислительный стресс [13]. Таким образом, 4'-

оксиТДФ и другие производные 4'-окситиамина являются природными биологическими соединениями. Низкая их концентрация в организме, по-видимому, поддерживается секрецией в желчь и мочу при участии, например, транспортеров тиамина из семейства MATE [56, 60] или других экспортеров (Рис. 2). Возможно, секреция 4'-окситиамина из организма человека, например, в ЖКТ обеспечивает его восстановление микробиотой, у которой имеются тиаминазы, NUDIX-гидролазы и другие механизмы реутилизации тиамина.

Однако микробиота может, наоборот, способствовать синтезу антагонистов тиамина. Так, антибиотик метронидазол (Рис. 5) имитирует тиазольный фрагмент тиамина, поэтому тиаминаза I бактерий синтезирует из него соответствующий аналог витамина B1 (Рис. 5). Такой аналог ингибирует тиаминдифосфокиназу и оказывает антимикробный эффект по месту синтеза – в бактериях [82]. Однако обнаружен пример индуцированной метронидазолом энцефалопатии, вызванной дефицитом тиамина у пациента при приеме метронидазола [83]. Замена антибиотика и прием высокой дозы тиамина помогли пациенту. По-видимому, антагонист тиамина (Рис. 5) накапливался у него в токсических дозах. Данный пример иллюстрирует важное значение микробиоты в метаболизме тиамина.

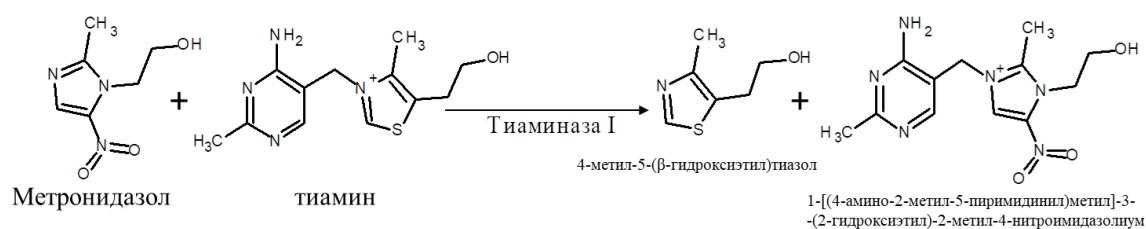


Рис. 5. Образование антагониста тиамина микробиотой при приеме метронидазола.

Транспорт ксенобиотиков через общие с тиамином переносчики также может вызывать побочные эффекты лекарственных препаратов. Примером является действие широко применяемого для лечения диабета лекарства – метформина (Рис. 4). Метформин конкурирует с тиамином за ряд клеточных транспортеров (Рис. 2), что, по-видимому, связано с катионной формой обоих веществ (Рис. 1, Рис. 4). Так, метформин транспортируется через SLC19A3,

ОСТ1, ОСТ2, и такой конкурентный транспорт нарушает поступление тиамина в клетки [54-56, 84, 85]. Прием метформина осуществляется ежедневно, приводя к накоплению метформина и нарушению транспорта и снижению содержания тиамина в тканях. Гиповитаминоз тиамина может усугублять вызванные диабетом метаболические патологии, провоцируя развитие, например, нейродегенеративных заболеваний.

Действительно, в клинических исследованиях отмечались симптомы тиаминового дефицита на фоне использования метформина [86, 87] и другого бигуанида буформина [88]. Так, прием пациентом 2 г метформина вместо рекомендованного 1 г в день на фоне диеты с низким содержанием тиамина и гемодиализа из-за болезни почек привели к острой энцефалопатии и симптомам, свойственным болезни Паркинсона – с развитием тиаминового дефицита [86]. Отмена метформина нормализовала уровень тиамина и способствовала исчезновению неврологических симптомов [86]. В другом исследовании пациент 10 лет принимал по 0,5 г метформина дважды в день, и введение высокой дозы тиамина помогло ему избавиться от развившегося тремора – типичного симптома болезни Паркинсона [87]. Метформин – это самое назначаемое лекарство при диабете второго типа, и может быть одним из факторов распространения тиаминового дефицита среди больных диабетом [89].

Примечательно, что молекулярные мишени действия метформина недостаточно охарактеризованы. Роль метформина как антидиабетика имеет сходство с действием тиамина, для которого показан антидиабетический эффект [90]. То есть, по механизму действия на транспортеры метформин является антагонистом тиамина, но оба они обладают схожим физиологическим действием как лекарства от диабета второго типа. Это указывает на возможность действия тиамина и метформина на одни мишени, очевидно не связанные с коферментным действием ТДФ.

2.3. РОЛЬ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ЦЕНТРАЛЬНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ*

2.3.1. Коферментная роль тиаминадифосфата

Данная функция напрямую связана с работой ферментов, использующих ТДФ в качестве кофермента. Из них наиболее важными у млекопитающих являются транскетолаза, пируватдегидрогеназа (ПДГ) и 2-оксоглутаратдегидрогеназа (ОГДГ). Транскетолаза катализирует обратимое превращение углеводов в пентозофосфатном пути, это цитоплазматический фермент, активный в виде димера. В геноме человека три паралогичных гена транскетолазы: *TKT*, *TKTL1* и *TKTL2*. Экспрессия *TKTL1* повышена при различных типах рака; данные о связывании ТДФ и транскетолазной активности у *TKTL1* противоречивы [91-93]. ПДГ и ОГДГ функционируют в составе гигантских митохондриальных полиферментных комплексов (ПДК и ОГДК, соответственно). Так, диаметр ПДК млекопитающих – более 50 нм – соответствует расстоянию между кристами митохондрий и превышает размер целой рибосомы [94]. Химические реакции, катализируемые такими наномашинами, очень важны для метаболизма клеток и тщательно регулируются, что подробно рассмотрено в монографии [94] и ряде обзоров [23, 95].

В настоящее время активно ведется изучение и других ТДФ-зависимых ферментов млекопитающих – при исследовании рака и в связи с возникновением редких заболеваний. Это, например, изоформы ОГДГ (ген *OGDH*), которые кодируются генами *OGDHL* и *DHDKD1* и являются тканеспецифическими компонентами ОГДК с измененной регуляцией и/или субстратной специфичностью [94]. ТДФ является коферментом

* При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Mkrtchyan GV, Bunik VI. (2019) Mechanisms of Non-coenzyme Action of Thiamine: Protein Targets and Medical Significance. *Biochemistry (Mosc)*. 84(8):829-850 (вклад 0,6/1,38 ПЛ). Bunik V, Aleshin V (2017) Analysis of the Protein Binding Sites for Thiamin and Its Derivatives to Elucidate the Molecular Mechanisms of the Noncoenzyme Action of Thiamin (Vitamin B1). *Studies in Natural Products Chemistry* 53:375-429 (вклад 1,1/3,4 ПЛ).

митохондриального комплекса дегидрогеназ разветвленных 2-оксокислот (ключевой фермент катаболизма разветвленных аминокислот [94]) и ферментов α -окисления: пероксисомальной 2-гидроксифитаноил-КоА-лиазы (ген *HACLI*) и ее паралога, функционирующего в ЭПР (ген *ILVBL* или *HACLI2*) – единственного ТДФ-зависимого фермента млекопитающих, содержащего предполагаемый трансмембранный домен [96]. Значение этих ТДФ-зависимых ферментов периферических метаболических путей для различных тканей и органов и при развитии заболеваний еще предстоит выяснить.

2.3.2. Некоферментная функция тиамина и его производных

Знания о некоферментном связывании тиамина у животных сводятся в первую очередь к структурным исследованиям белков метаболизма – растворимой ТДФ-азы и тиаминдифосфокиназы. Однако в ряде независимых биохимических экспериментов были установлены и другие мишени некоферментного связывания тиамина и его производных. Фрагментарность полученных данных компенсируется значением выявленных мишеней и указывает на необходимость дальнейших исследований функции тиамина.

Транскрипционный фактор p53 образует комплекс с ТДФ – *in vitro* и *in vivo* [3]. При этом ингибируется ДНК-связывающая активность p53, подавляется экспрессия прямых мишеней p53. Тиамин и ТМФ связываются с p53 хуже, указывая на роль дифосфата ТДФ в связывании, но сравнение ADP и NAD^+ указывает на предпочтительное связывание ТДФ, по сравнению с нуклеотидами [3]. Таким образом, некоферментное связывание ТДФ напрямую регулирует функцию онкосупрессора p53. Зависимость действия p53 от тиамина наблюдали в экспериментах на культурах нейронов, где добавление тиамина снижало уровень p53 и Mdm2 [97]. В независимом исследовании инкубация клеток нейронального и глиального происхождения с пиритиамином и 4'-окситиамином вызывала индуцируемый p53 апоптоз [98]. Временной характер развития апоптоза указывал на значение дифосфатной группы (окси/пири)ТДФ для взаимодействия с p53 [28].

Известна и функция p53 как регулятора транспорта тиамин: p53 активирует экспрессию SLC19A2 [22] и подавляет экспрессию SLC19A1 [99], которые транспортируют тиамин в клетку и ТМФ/ТДФ из клетки, соответственно [100, 101]. Тем самым, p53 поддерживает насыщение клеток тиамином/ТМФ/ТДФ, а рассмотренное взаимодействие ТДФ с p53 обеспечивает механизм обратной связи для поддержания нормального уровня ТДФ в клетке.

Тиамин взаимодействует с мембранным прионным белком (ген *PRNP*) [5, 6]. Константа диссоциации комплекса рекомбинантного PRNP с тиамином, ТМФ или ТДФ варьирует в пределах 0,06 – 0,07 мМ, то есть связывание не зависит от наличия фосфатов тиамин [5]. Предположительно, PRNP способствует сорбции тиамин и ТМФ в примембранном слое вне клетки для улучшения клеточного транспорта тиамин [5, 6, 28]. Что касается фосфатов тиамин, то они могут разрушаться мембранными фосфатазами из числа апираз (ТДФ, ТТФ) или, например, мембранной формой АСРР, рассмотренной выше.

Тиамин связывается с рецептором TAS2R1 из группы рецепторов горечи, сопряжённых с G-белками [102]. В независимом исследовании тиамин был охарактеризован как агонист неидентифицированного рецептора из группы TAS2R [103]. Наличие рецепторов дополняет данные о действии тиамин в ацетилхолиновой нейротрансмиссии и опыты с 4'-окситиамином и кальций-зависимым высвобождением синаптического ацетилхолин [76-78], которое как раз может происходить за счет активации рецепторов TAS2R. Активация рецепторов группы TAS2R может инициировать сигнальный каскад, приводящий к открытию кальциевых каналов, усиливая выброс ацетилхолин. Таким образом, изучение рецепторов горечи в различных тканях важно с точки зрения некоферментной функции тиамин в ацетилхолинергической нейротрансмиссии.

NAD⁺-зависимая поли(ADP-рибозо)-полимераза 1 (*PARP1*) ингибируется АТТФ *in vitro* вплоть до полного ингибирования при 10 мкМ

АТТФ [4]. Такая концентрация сопоставима с концентрацией АТТФ у клеток глиобластомы [16]. Тиамин, ТДФ, ТТФ и даже АТДФ (дифосфат) не влияли на активность PARP1 при концентрации 20 мкМ [4]. Структурная модель комплекса, полученная на основании структуры PARP1 с NAD^+ , объясняет селективность ингибирования PARP1 – длина молекулы АТДФ делает невозможным связывание аналогично АТТФ [4]. Можно предположить, что АТТФ является физиологическим регулятором поли-ADP-рибозилирования, вовлеченного в стресс-ответ на повреждения ДНК. Существуют и независимые данные, ставящие под сомнение регуляцию PARP1 АТТФ [104].

Исследование связывания белков мозга на аффинном тиамин-содержащем носителе выявило высокую представленность пиридоксалькиназы (ПЛК), глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и малатдегидрогеназы (МДГ) среди связавшихся белков [2, 105]. Анализ взаимодействия очищенных ферментов с тиамин и его производными, биоинформатический поиск структурных элементов для связывания подтвердили регуляцию ПЛК, ГДГ и МДГ тиаминовыми соединениями [2]. В частности, регуляция ГДГ АТТФ и ТТФ [2] хорошо согласуется с синтезом ТТФ в ответ на аминокислотное голодание у бактерий. Некоферментное взаимодействие с ТДФ было показано и для аспаратаминотрансферазы (глутамат-оксалоацетат трансминазы ГОТ) и аланинаминотрансферазы (глутамат-пируват трансминазы – ГПТ) [1]. Активность этих аминотрансфераз зависит от кофермента пиридоксаль-5'-фосфата, синтезируемого ПЛК. В результате такого комплексного действия тиамина и его производных на МДГ, ГДГ, ПЛК и аминотрансферазы, а также ПДГ и ОГДГ, становится возможной регуляция, обеспечивающая оптимальные перестройки сети реакций метаболизма аминокислот и 2-оксокислот [2]. Краткосрочная регуляция активности ферментов *in vivo* при связывании тиаминовых соединений может дополняться долгосрочным эффектом пост-трансляционных модификаций и транскрипционной активностью p53 [3] и микроРНК miR-155 [21].

Таким образом, многочисленные данные о некоферментном связывании тиамин и производных позволяют заключить, что биологическая роль тиамин не ограничивается регуляцией ферментов, использующих ТДФ в качестве кофермента. Тиамин вовлечен в более широкий спектр механизмов регуляции метаболизма. Эти механизмы включают аллостерическую регуляцию белков непосредственно тиаминовыми соединениями и опосредованными сигнальными каскадами, долгосрочными механизмами регуляции функции и экспрессии белков.

2.4. МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТИАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ*

2.4.1. Тиамин и патологии нервной системы

Значение тиамин для медицины в первую очередь связано с его ролью в нервной ткани. Нейротропное действие тиамин известно с 80-х годов XIX века, когда началось систематическое исследование болезни «бери-бери». В результате, в 1926 году тиамин стал первым из выделенных в чистом виде витаминов с расшифрованной молекулярной структурой, хотя механизм его каталитического действия в качестве кофермента (ТДФ) был установлен гораздо позднее [106]. Глубокий дефицит тиамин связан с коферментной функцией – у животных ее нарушение вызывает судороги, паралич и смерть.

** При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Mkrtchyan GV, Bunik VI. (2019) Mechanisms of Non-coenzyme Action of Thiamine: Protein Targets and Medical Significance. Biochemistry (Mosc). 84(8):829-850 (вклад 0,6/1,38 ПЛ). Bunik V, Aleshin V (2017) Analysis of the Protein Binding Sites for Thiamin and Its Derivatives to Elucidate the Molecular Mechanisms of the Noncoenzyme Action of Thiamin (Vitamin B1). Studies in Natural Products Chemistry 53:375-429 (вклад 1,1/3,4 ПЛ).*

Одной из патологий, вызываемых более мягким дефицитом тиамин, является синдром Вернике-Корсакова, при котором характерны нарушение сознания, глазодвигательные нарушения, атаксия, психические расстройства

[107]. Такой синдром часто наблюдается у алкоголиков, но в последнее время его все чаще обнаруживают в новых условиях, вызывающих скрытый дефицит тиамина. Такое состояние может возникать вследствие применения диуретиков и других лекарственных препаратов (в частности метформина), при радиотерапии и хирургических вмешательствах.

Существенно сложнее, чем дефицит тиамина, диагностируется предшествующее ему состояние с менее выраженным снижением уровня тиамина – гиповитаминоз. Симптомами гиповитаминоза витамина В1 являются ухудшение памяти, отсутствие двигательной и мыслительной активности, апатия. Установлена связь между гиповитаминозом тиамина и депрессивными состояниями во взрослой популяции Китая [108]. Большое количество данных свидетельствует о связи гиповитаминоза витамина В1 с нейродегенеративными заболеваниями, в том числе болезнями Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона [23, 28, 109]. Показано значительное снижение активностей ТДФ-зависимых ферментов центрального метаболизма у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и корреляция между снижением функции ОГДК и потерей когнитивных способностей [110]. При этом высокие дозы В1 приводят к улучшению когнитивных и локомоторных функций у пациентов, страдающих нейродегенеративными заболеваниями [111, 112]. Важно, что длительное введение высоких доз тиамина (100 мг два раза в неделю, внутримышечно) не способствовало появлению побочных эффектов [112], хотя известны фатальные реакции при внутривенном введении тиамина [113]. В экспериментах на животных введение высоких доз тиамина непосредственно в мозг или спинномозговую жидкость могло вызывать конвульсии, однако для людей такие побочные эффекты тиамина не описаны [113].

Помимо обычного недостатка В1 в рационе, причиной дефицита тиамина может быть частое употребление в пищу сырой рыбы. По этой причине дефицит тиамина может возникать у целых популяций людей при соответствующей культуре питания [114], а также у хищных домашних и

содержащихся на фермах или в зоопарках животных, например кошек, тюленей, лис [115-117]. Причина такого явления кроется в том, что в сырой рыбе, а также моллюсках, содержится тиаминаза [45].

Удивительно, что сами рыбы и моллюски, например атлантический лосось, угорь, съедобные мидии, могут страдать от тиаминного дефицита [118]. Как показало большое исследование атлантических рыб, моллюсков и птиц, у шести из семи исследованных видов был выявлен дефицит В1 на уровне целых популяций, способствуя резкому сокращению их численности вплоть до исчезновения [118]. Причиной подобных экологических проблем может являться загрязнение окружающей среды ксенобиотиками, являющимися потенциальными источниками антивитаминов (Рис. 5).

Таким образом, дефицит тиамина может играть важную экологическую роль в т.ч. в дикой природе, в хозяйственной деятельности человека, а главное, люди столкнулись с распространением ранее неизвестных случаев дефицита тиамина в связи с развитием медицинских технологий, а также загрязнением окружающей среды ксенобиотиками, что требует глубокого изучения путей метаболизма, транспорта и механизмов действия тиамина в организме человека, но также и других живых организмов.

Увеличение продолжительности жизни вносит дополнительный вклад в проблему гиповитаминоза витамина В1, так как известно снижение его уровня и уровня ТДФ при старении [16]. Последнее может быть отягощающим фактором при возрастных патологиях мозга, включая нейродегенеративные заболевания.

Традиционно, положительное действие тиамина на нервную систему объясняют улучшением энергетического метаболизма мозга за счет коферментной функции ТДФ. Однако некоторые результаты исследований не укладываются в представление о том, что ключевая роль В1 в нервной ткани определяется лишь коферментной ролью ТДФ. Положительный эффект тиамина и/или его лекарственных форм часто не сопровождается увеличением

ТДФ в мозге [71, 109, 119], указывая на существование иных механизмов действия тиамина.

При болезни Альцгеймера понижен уровень тиамина в плазме крови [120], причем измерение в крови уровней тиамина и его производных имеет диагностическое значение [121]. Наблюдают сопутствующее существенное увеличение активностей ТМФ-азы и ТДФ-азы, в отсутствие изменения тиаминдифосфокиназной активности [122]. Ключевая роль ТМФ-азы и ТДФ-азы в нарушении тиаминового метаболизма при болезни Альцгеймера подтверждается исчезновением корреляции уровней ТМФ и ТДФ в плазме крови больных [122]. Данные о патогенезе болезни Альцгеймера позволяют положить, что дефицит тиамина, возникающий из-за нарушения метаболизма тиамина может быть одной из причин болезни, запуская окислительный и ЭПР-стресс, а также активацию аутофагии [107].

При травмах головного мозга, для которых характерно развитие воспалительных процессов и дисфункция антиоксидантной системы, показано положительное действие тиамина [123]. Так, введение высокой дозы тиамина восстанавливает уменьшенные в результате травмы головного мозга активности митохондриальных ферментов и дыхание митохондрий [123]. Важную роль может играть некоферментное действие тиамина на ферменты метаболизма глутамата – ГДГ, глутаминсинтетазу, трансаминазы и ПЛК [1, 2]. Регуляция метаболизма глутамата может не только снижать его нейротоксичность, но и способствовать синтезу глутатиона из глутамата. С другой стороны, активация p53 при травме может повышать экспрессию SLC19A2 и уменьшать экспрессию SLC19A1, повышая содержание тиамина в клетках (Рис. 2). В таких условиях введение дополнительного тиамина в организм увеличит уровень тиаминовых соединений, необходимого для улучшения метаболизма, в травмированной ткани. Позже связывание накопившегося ТДФ с p53 ослабит запущенный травмой сигнальный каскад. Таким образом, нейропатологии, связанные как со старением, так и с травмами мозга, могут быть спровоцированы или усиливаться недостатком витамина

В1. Применение высоких доз тиаминa или его фармакологических форм может иметь положительный эффект даже после диагностирования болезни. Важную роль в нейропротекторном действии тиаминa при патологиях нервной ткани могут иметь некоферментные мишени тиаминa и его производных. Исследованию этих мишеней и механизмов метаболического действия тиаминa, его производных и антагонистов у млекопитающих и посвящена данная работа.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. РЕАКТИВЫ И БИОМАТЕРИАЛЫ

3.1.1. Коммерческие

Наиболее важные реактивы: тиамин – «Serva», Германия; пиридоксаль – «PanReas AppliChem», Испания; пиридоксин-5'-фосфат – синтезирован итальянскими партнерами [124] из пиридоксаль-5'-фосфата («Sigma-Aldrich», США); пентилентетразол (ПТЗ), тиаминдифосфат (ТДФ), ингибиторы протеаз, буферы и прочие реактивы для анализа ферментативных активностей – «Sigma-Aldrich», США. Использованные специальные коммерческие наборы и прочие реактивы приводятся в разделах, где указаны составы растворов и конкретные методики. Растворы готовили на воде стандарта Milli-Q, использованные в работе соли были наивысшей степени чистоты. Первичные антитела, использованные в работе, представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Использованные в работе антитела и рабочие разведения.

Антиген	Источник	Разведение	Фирма	Номер
Ацетил-лизины	кролик	1000	CST	9814
Сукцинил-лизин	кролик	2000	PTM Biolabs	PTM-401
Сиртуин 3	кролик	2000	CST	5490
Сиртуин 5	кролик	2000	CST	8782
p53 (human)	кролик	1000	Santa Cruz	sc-126
p53 (mouse)	мышь	400	Thermo Fisher	MA5-12453
AcK379-p53	кролик	500	CST	PA5-17287
Phos-S392-p53	кролик	400	Thermo Fisher	44-640G
GOT2	кролик	400	Sigma	HPA018139
Актин бета	кролик	3000	CST	8457
VDAC	кролик	3000	CST	4661
II антикроличьи	коза	3000	CST	7074
II антимишьяные	коза	3000	Имтек	P-GAM Iss

3.1.2. Полученные в ходе выполнения данной работы

3.1.2.1 Тиаминтрифосфат

ТТФ синтезировался по методу Беттендорффа, согласно информации, описанной в патенте (WO2003024980A1) и статье [125], с изменениями.

Представлен протокол синтеза из 0,5 г ТДФ (при синтезе из 1 г ТДФ все реактивы необходимо удвоить).

1) В стеклянном стакане смешиваются до полного растворения 1,1 ммоль (0,5 г) ТДФ, 775 мкл H_2O , 1,25 ммоль H_3PO_4 (83 мкл 85% конц. раствора), 4,5 ммоль (1,09 мл) трибутиламина. Раствор переносится в стеклянную двухлитровую колбу.

2) Добавляется 200 мл DMSO, затем добавляется 6 г DCC, растворенных в пиридине. Всего необходимо использовать 180 мл пиридина. Использовать только стеклянную посуду.

Комментарий: мной было выбрано соотношение DCC:ТДФ 25:1 (в патенте 80:1), поскольку при первой неудачной попытке синтеза выпали кристаллы DCC вместо ТДФ. Соотношение 25:1 уступает лишь по скорости синтеза, согласно опубликованным данным [125].

3) Колбу плотно закрыть стеклянной пробкой и перемешивать на качалке при комнатной температуре до утра (на 20-22 ч).

4) Добавить 600 мл диэтилового эфира, закрыть пробкой и интенсивно перемешать до полного смешивания раствора. Продолжить перемешивание на качалке еще 35 мин (осадок выпадает неохотно и очень мелкий).

5) Поставить колбу в холодильник (+4 °C) на 20-30 мин.

6) Используя водоструйный насос и стеклянный фильтр «Пор 40» (минимальные доступные поры) с бумажным фильтром, собрать осадок, аккуратно помогая себе шпателем.

Комментарий: Осадок (1) мелкодисперсный и (2) на воздухе желтеет, поэтому лучше не взбалтывать колбу, а собрать продукт под конец и смыть остатки минимальным объемом отфильтрованного раствора.

7) Осадок на фильтре промывается диэтиловым эфиром. Это ускоряет его пожелтение, поэтому далее осадок необходимо быстро собрать и растворить в минимальном объеме (например 800мкл) воды. Для стабилизации тиазолиевого кольца я добавлял не более 100 мкл 0,5М HCl.

8) На промытую водой (pH ~4) колонку (~1x2см) с ионообменной смолой DOWEX 50W-X8 наносится полученный желтый раствор. При этом около 3 мм смолы сверху из коричнево-оранжевой становятся бежевой. В дальнейшем цвет смолы не меняется. Смола необходима для очистки от трибутиламина. Выход ТТФ в самой реакции практически 100% [125].

9) Элюцию проводить водой (pH 4), собирая образцы в эппендорфы по 1 мл незамедлительно с момента нанесения пробы. Детекцию проводить по 286нм (пик поглощения всех тиаминовых соединений).

10) Собранные элюаты имели большой объем, основная часть (13 мл) была собрана и сконцентрирована упариванием без нагревания до ~800 мкл.

11) Добавление 96% этанола 1:1 по объему вызывает выпадение ТТФ в осадок, но концентрация его должна быть очень высокой. Часть ТТФ все равно останется в растворенном виде, но этот способ может быть использован для очистки от сопутствующего фосфата. Смесь перемешивается и оставляется в холодильнике на 2-3 часа.

Комментарий: ТТФ выпадает в виде белых кристаллов, но спонтанно может превратиться в слегка желтоватую жидкость тяжелее смеси вода-спирт.

12) ТТФ отделяется от излишков раствора и высушивается без нагрева. Практический выход ТТФ составлял лишь 20-25% от теоретического, что связано с большими потерями при очистке. Анализ ЯМР по фосфору показал, что чистота ТТФ составила 95% (с примесью ТДФ). Через два года хранения в ТТФ образовалась примесь фосфата, а соотношение ТТФ:ТДФ было равно 75%:25%. ЯМР по водороду не выявил других органических примесей.

3.1.2.2 Митохондрии мозга крысы и его отделов

Митохондрии были получены из цельных мозгов крыс согласно опубликованным методикам [2, 126]. После декапитации извлеченные на холоде (лед) мозги были взвешены и сразу перенесены в холодный буфер для выделения митохондрий (0,32 М сахараза, 0,5 мМ ЭГТА, 0,5 мМ ЭДТА и 0,05 М Трис-HCl, pH 7,4, ингибиторы протеаз 1 мМ бензамидин и 1 мМ PMSF,

добавленные перед забоем). Буфер использовался из расчета 20 мл на 1 г ткани. Мозги гомогенизировались в стеклянном гомогенизаторе Поттера на льду при 800 об/мин, 6-7 минут с использованием роторной мешалки Stirrer DLS, VELP Scientifica (Узмате-Велате, Италия). Полученные гомогенаты центрифугировались при 4°C (центрифуга Eppendorf 5810R). Центрифугирование при 1330 g, 10 мин., способствовало осаждению ядер и обломков клеток, супернатант центрифугировали повторно – при 18514 g, 15 мин. Полученный осадок был суспендирован в буфере для выделения митохондрий из расчета 15 мл на 1 г исходной ткани и подвергался двукратной промывке (18514g, 15 мин.). После второго этапа промывки полученный осадок – препарат митохондрий.

На последнем этапе препарат митохондрий был суспендирован в минимальном объеме буфера для озвучивания (1 мМ ТДФ, 1 мМ CaCl₂, 13 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, калий-фосфатный буфер, 0,1 М, pH 7,0 и 25% глицерин). В состав буфера для озвучивания были добавлены ингибиторы протеаз: 0,16 мкМ апротинин, 3,3 мкМ бестатин, 2 мкМ лейпептин, 1,4 мкМ пепстатин А. Часть полученной митохондриальной суспензии замораживалась, другая подвергалась озвучиванию на низком уровне мощности 7 циклами из 60-секундного озвучивания и 60 секундной паузы в ультразвуковом дезинтеграторе Bioruptor (Diagenode, Льеж, Бельгия) в ледяной бане. Озвученная суспензия центрифугировалась при 20000g 40 мин. 4°C. Полученный супернатант – экстракт белков митохондрий.

3.1.2.3 Митохондрии печени крысы

Выделение митохондриальной фракции из печени крыс аналогична выделению из мозга (пункт 3.1.2.2), но с некоторыми модификациями. Измельченная печень гомогенизировалась с использованием стеклянного гомогенизатора в буфере из 0,25 М сахарозы, 0,001 М ЭДТА, 1 мМ бензамидина и 1 мМ PMSF, 0,02 М Трис-HCl, pH 7,4.

Гомогенат подвергался дифференциальному центрифугированию согласно опубликованной методике (Johnson and Lardy, 1967). Ядра и обломки клеток осаждали 10 мин. при 600 g 4°C. Митохондрии осаждали 10 минут при 8500 g 4°C, также с двухкратной отмывкой.

3.2. ЭКСПЕРИМЕНТЫ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК*

3.2.1. Культивирование клеток

При исследовании линии немелкоклеточного рака легкого A549 эпителиальной аденокарциномы человека (ATCC® CCL-185TM) и клеток эпителия почечных протоков зеленой мартышки (*Cercopithecus Aethiops*) Vero (Российская коллекция клеточных культур, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM) (Thermo Fischer Scientific, 21855), которая содержала 1 г/л глюкозы, 1 мМ пируват, 4 мМ GlutaMAX™, 10% сыворотки (Gibco, 10270), 100 Ед/мл пенициллина. и 0,1 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, 15140) при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. Нокдаун p21 поддерживали пурамицином в концентрации 0,2 мкг/мл.

** При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Artiukhov AV, Oppermann H, Kazantsev AV, Lukashev NV & Bunik VI (2015) Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays. Cells, 4(3):427-51 (вклад 0,3/1,625 ПЛ). Bunik VI, Aleshin VA, Zhou X, Tabakov VY, Karlsson A. (2020) Activation of Mitochondrial 2-Oxoglutarate Dehydrogenase by Cocarboxylase in Human Lung Adenocarcinoma Cells A549 Is p53/p21-Dependent and Impairs Cellular Redox State, Mimicking the Cisplatin Action. Int J Mol Sci. 21(11):3759. (вклад 0,6/1,44 ПЛ). Bunik VI, Aleshin VA, Zhou X, Krishnan S, Karlsson A. (2020) Regulation of Thiamine (Vitamin B1)-Dependent Metabolism in Mammals by p53. Biochemistry (Mosc). 85(7):801-807 (вклад 0,2/0,44 ПЛ). Aleshin VA, Zhou X, Krishnan S, Karlsson A, Bunik VI. (2021) Interplay Between Thiamine and p53/p21 Axes Affects Antiproliferative Action of Cisplatin in Lung Adenocarcinoma Cells by Changing Metabolism of 2-Oxoglutarate/Glutamate. Front Genet. 12:658446 (вклад 0,35/0,8 ПЛ).*

При исследовании линий глиобластомы человека T98G и U87, полученных из Американской коллекции типовых культур (LGC Standards GmbH; Везель, Германия). Клетки выращивали в среде DMEM (4,5 г/л глюкозы, с добавлением 10% сыворотки, 2 mM GlutaMAX™ и антибиотиков).

3.2.2. Модели тиаминового дефицита

Для модели тиаминового дефицита (ТД) с использованием окситиамина клетки U87 или T98G сеяли на 96-луночные микропланшеты – с плотностью 25 тысяч клеток/мл, по 200 мкл на лунку, либо на 10 см чашки для культур – с плотностью 100 тысяч клеток/мл, 10 мл на чашку, в среде DMEM (4,5 г/л глюкозы, с добавлением 10% сыворотки, 2 mM GlutaMAX™ и антибиотиков). Через 24 ч клеточную среду заменяли на равное количество среды с окситиамином (0,05 или 5 mM) или тиамина – для сравнения.

Для модели истинного ТД использовалась самодельная среда DMEM без тиамина, аналогичная DMEM, используемой для роста клеток A549. Для контроля использовали ту же самодельную среду DMEM с добавлением 4 мг/л гидрохлорида тиамина, как в коммерческой среде DMEM. Развитие ТД в клетках A549 производили путем их посева в среду DMEM без тиамина, с последующим семидневным ростом в такой среде. За 7 дней среду меняли дважды: после прикрепления клеток и на четвертый день.

3.2.3. Измерение клеточной жизнеспособности

Жизнеспособность клеток A549 и Vero определяли с помощью набора для пролиферации клеток (Roche, 11465015001). Вкратце, смешивали 50 мкл реагента с ХТТ и 1 мкл реагента для переноса электронов; 50 мкл такой смеси добавляли в каждую лунку с клетками, содержащую 100 мкл культуральной среды. Планшет инкубировали 2 ч при 37°C с 5% CO₂ во влажной атмосфере. Оптическую плотность мерили при 450 нм и 650 нм (используется как длина сравнения, плотность вычитается). В качестве фона использовали лунки без клеток, но с культуральной средой.

Для клеток T98G и U87 использовали реагент CellTiterBlue в соответствии с рекомендациями производителя. После инкубации клеток с веществами к клеткам со свежезамененной средой (100 мкл) добавляли реагент CellTiterBlue, инкубацию проводили в течение 90 мин при 37°C. Расчеты жизнеспособности клеток проводили аналогично методу с ХТТ.

3.3. ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ЖИВОТНЫХ*

Эксперименты с крысами проводились сотрудниками кафедры Физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ и были утверждены комитетом по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол № 69-о от 09.06.2016), либо сотрудниками Российского Кардиологического Научно-Производственного Комплекса (протокол № 3 комитета по биоэтике РКНПК от 23.03.2016).

3.3.1. Содержание крыс

Исследования проводили на крысах линии Вистар (RRID: RGD_13508588), из Государственного научно-исследовательского центра Института медико-биологических проблем РАН (ИМБП), - самцах и самках массой от 250 до 350 г. Животных содержали в клетках при 21 ± 2 °C, относительной влажности $53 \pm 5\%$, со свободным доступом к воде, пище

* При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Tsepikova PM, Artiukhov AV, Boyko AI, Aleshin VA, Mkrtchyan GM, Zvyagintseva MA, Ryabov SI, Ksenofontov AL, Baratova LA, Graf AV & Bunik VI (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in rat brain. *Biochemistry (Moscow)*, 82(6):723-36 (вклад 0,06/0,25). Aleshin VA, Mkrtchyan GV, Kaehne T, Graf AV, Maslova MV, Bunik VI. (2020) Diurnal regulation of the function of the rat brain glutamate dehydrogenase by acetylation and its dependence on thiamine administration. *J Neurochem*. 153(1):80-102 (вклад 0,5/1,44 ПЛ). Boyko A, Tsepikova P, Aleshin V, Artiukhov A, Mkrtchyan G, Ksenofontov A, Baratova L, Ryabov S, Graf A & Bunik V (2021) Severe spinal cord injury in rats induces chronic changes in the spinal cord and cerebral cortex metabolism, adjusted by thiamine that improves locomotor performance. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14:620593 (вклад 0,3/1,38 ПЛ). Aleshin VA, Graf AV, Artiukhov AV, Boyko AI, Ksenofontov AL, Maslova MV, Nogues I, di Salvo ML & Bunik VI (2021) Physiological and Biochemical Markers of the Sex-Specific Sensitivity to Epileptogenic Factors, Delayed Consequences of Seizures and Their Response to Vitamins B1 and B6 in a Rat Model. *Pharmaceuticals* 14(8):737 (вклад 0,6/1,44 ПЛ). Aleshin VA, Artiukhov AV, Kaehne T, Graf AV & Bunik VI (2021) Daytime dependence of the activity of the rat brain pyruvate dehydrogenase corresponds to the mitochondrial sirtuin 3 level and acetylation of brain proteins, all regulated by thiamine administration decreasing phosphorylation of PDHA Ser293. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):8006 (вклад 0,45/1,12 ПЛ). Bunik V, Aleshin V, Nogues I, Kähne T, Parroni A, Contestabile R, di Salvo M, Graf A, Tramonti A (2022) Thiamine-dependent regulation of mammalian brain pyridoxal kinase in vitro and in vivo. *J Neurochem* (вклад 0,5/1,44 ПЛ).

(стандартный гранулированный корм для грызунов labratorkorm.ru) и циклом день/ночь 12/12 ч (свет включался в 9 часов утра). Период адаптации к условиям содержания составлял две недели. Возраст на момент исследования составлял 2,5–3 месяца. Животные распределялись по группам случайным образом. Поскольку использование анестетиков несовместимо с нашим исследованием биохимических изменений мозга, животных умерщвляли с помощью гильотины (OpenScience, Москва, Россия), в соответствии с международными рекомендациями [127]. После каждого использования гильотину тщательно промывали водой и спиртом, чтобы запах крови не мог вызвать стресс у другого животного.

Для модели спинномозговой травмы использовались крысы линии Спрег-Доули, приобретенные из питомника лабораторных животных Института биоорганической химии (Пушино, Россия). Условия содержания соответствовали вышеописанным.

3.3.2. Исследование действия тиамина в мозге крыс утром и вечером

Для исследования использовали 36 самцов крыс линии Вистар, по 12 животных в трех независимых сериях. Каждая серия состояла из 4 групп животных (по 3 крысы), которым внутрибрюшинно вводили тиамин (400 мг/кг, рН 6,7-6,9, подведенный NaOH) или физиологический раствор (0.9% хлорид натрия) утром (с 10 до 12 часов) или вечером (с 17 до 19 часов). Смертность была нулевой. Через 24 часа после введения веществ проводили декапитацию, мозги незамедлительно извлекали, разделяли по отделам (кора, ствол, мозжечок) и замораживали в жидком азоте.

3.3.3. Модель тяжелой травмы спинного мозга

Травма спинного мозга была проведена сотрудниками РКНПК – падением грузика массой 10 г с высоты 2,5 см на открытый спинной мозг в девятом грудном сегменте. В качестве контроля использовалась операция ламинэктомии (с повреждением костной ткани), в которой спинной мозг не был поврежден. Разрез зашивался и обрабатывался антисептиком. Уход за

животными производился 8 недель. Тиамин в дозе 400 мг/кг вводили в первые сутки после травмы – один раз. В исследовании участвовала 81 крыса, 5 крыс из которых умерли в послеоперационный период, что нормально для данной модели. Через восемь недель крысы были убиты путем декапитации, мозги были извлечены и заморожены в жидком азоте.

3.3.4. Модель эпилепсии, индуцируемой пентилентетразолом

В связи с гендерным характером эпилепсии в работе использовали самцов и самок крыс – 87 животных, по 8-12 на группу. Судороги вызывали внутрибрюшинным введением ПТЗ по 25 мг/кг в физиологическом растворе. После введения тяжесть приступов оценивали визуально по модифицированной шкале Расина в течение 15 мин. В зависимости от силы приступа ПТЗ вводили повторно (еще 25 мг/кг). Процедуру повторяли не более трех раз – суммарная доза не превышала 75 мг/кг. Общее время наблюдения за приступом составляло 45 минут.

Витамины В1 (тиамин, 100 мг на кг) и В6 (пиридоксаль, 100 мг на кг) вводили внутрибрюшинно за 24 часа до первого введения ПТЗ и после завершения 45-минутного наблюдения. Контрольным животным вводили эквивалентные объемы физиологического раствора. При исследовании зависимости действия витаминов от времени, проведенном только на самках крыс (по 5-6 на группу), отдельные экспериментальные группы получали витамины с различными интервалами до первого введения ПТЗ: за 24, или 2, или 0,5 часа, и после завершения 45-минутного наблюдения за приступами. При кратковременном (за 0,5 ч) введении витаминов две из пяти крыс погибли в результате эпилептического приступа (что соответствует максимальному баллу по шкале Расина). Подобный эффект может быть связан с эффектом витамина В6, для некоторых форм которого показано действие в качестве проконвульсанта [128].

3.4. ПРОБОПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

3.4.1. Приготовление метанол-уксусных экстрактов клеток

Экстракция метаболитов из клеток проводилась с использованием холодного водного раствора метанола и уксусной кислоты – 40% и 0,12%, соответственно. Монослой клеток, дважды отмытых холодным PBS, ставили на лед, добавляли метанол-уксусную смесь и инкубировали в течение 30 минут на низком уровне вращения. Остатки клеток собирали вместе с лизатами с помощью скребка в охлажденные 1,5 мл эппендорфы. Смесь центрифугировали при 3220g и 4°C, супернатанты использовали для определения метаболитов, например глутатиона.

3.4.2. Приготовление метанол-уксусных экстрактов коры головного мозга крыс

Для экстракции метаболитов кору больших полушарий головного мозга гомогенизировали на льду в 4 мл 100% метанола, используя Ultra-Turrax T10 basic (IKA; Германия) в течение двух минут. 1 мл гомогената смешивали с 1,5 мл 0,2% водного раствора уксусной кислоты. Конечная концентрация метанола и уксусной кислоты – 40% и 0,12%, соответственно. Инкубация на льду в течение 30 минут проводилась на качалке (New Brunswick Excella E24, Германия). Далее смесь центрифугировали при 3220g и 4°C на центрифуге (Hitachi CT15RW, Япония). Супернатанты использовали для определения метаболитов.

3.4.3. Приготовление лизатов клеток

Все операции проводили на льду. Для лизиса 6-луночные чашки или 10 см чашки Петри промывали 2 раза холодным буфером PBS. Добавляли буфер для лизиса, содержащий 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5; 150 мМ NaCl; 1% NP-40 и коктейли из ингибиторов протеаз и фосфатаз (cOmplete и PhosSTOP, Roche, Базель, Швейцария). Клетки ставили на 30 минут с низким уровнем вращения. После инкубации остатки клеток соскребали и переносились в охлажденные 1,5 мл эппендорфы.

3.4.4. Приготовление гомогенатов коры мозга

Гомогенаты коры мозга были получены согласно опубликованной методике (Graf et al., 2013). В состав буфера гомогенизации входили: 50 мМ МОПС, pH 7,0, 1 мМ ДТТ, 0,2 мМ ЭГТА и 20% глицерин, ингибиторы протеаз 0,8 мкМ апротинин, 1 мМ AEBSF, 15 мкМ E-64, 50 мкМ бестатин, 20 мкМ лейпептин и 10 мкМ пепстатин А. Буфер гомогенизации использовался из расчета 2,5 мл буфера на 1 г ткани. Для гомогенизации пользовались прибором Ultra-Turrax T10 basic (IKA; Германия).

3.4.5. Приготовление образцов для масс-спектрометрии и вестерн-блота

Для электрофореза готовили 4-кратный буфер для образцов (Таблица 2).

Таблица 2. Состав 4-кратного буфера для образцов.

Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Объём/масса компонента на 10 мл
Tris, pH=6,8	1 М	0,25 М	2,5 мл
Глицерин	100 %	40 %	4 мл
SDS	Сухой	8 %	0,8 г
β-меркаптоэтанол	100 %	20 %	2 мл
Бромфеноловый синий	Сухой	0,04 %	4 мг
Вода	100 %	до 10 мл	

Для приготовления 120 мкл образца коры мозга берут 6 мкл гомогената, их разводят, используя воду и 30 мкл 4-кратного буфера (Таблица 2). Образцы инкубируются при 95°C в течение 5 мин.

3.4.6. Обессоливание белков

Для обессоливания использовали колонку HiTrap™ Desalting 5 мл (GE Healthcare, Упсала, Швеция) и буфер 100 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Элюцию проводили по инструкции производителя.

3.4.7. Ацетилирование *in vitro*

Ацетилирование ГДГ *in vitro* проводилось путем инкубации препарата с 2,5 мМ ацетил-КоА и 5 мМ никотинамидом. Белковый препарат смешивали с 4-кратным буфером ацетилирования (50 мМ Трис-HCl, pH 9,0, 10% глицерин, 50 мМ NaCl, 4 мМ MgCl₂ и 0,5 мМ ДТТ) в пропорции 3:1. Контрольный

препарат инкубировался с никотинамидом без ацетил-КоА. Инкубацию проводили при 37°C в течение 2-3 часов с периодическим отбором проб, начиная с 0 часов, которые разводились в 100 раз в 50 мМ буфере МОПС, pH 7,0. Все манипуляции, за исключением самой инкубации, проводились на льду.

3.5. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

3.5.1. Электрофорез для проведения вестерн-блота

При электрофорезе использовали 10% разделяющий гель (Таблица 3).

Таблица 3. Состав 10%-ного разделяющего геля в расчете на два 1,5 мм геля.

Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Объем добавленного компонента
Вода	100 %		6,53 мл
2,2,2-трихлорэтанол	100 %		81,3 мкл
Tris, pH=8,8	1,5 М	0,371 М	4 мл
Акриламид + + N,N'- метиленбисакриламид	30 % 0,8 %	9,87 % 0,263 %	5,33 мл
SDS	10 %	0,1 %	0,16 мл
TEMED	100 %	0,1 %	16 мкл
Персульфат аммония	10 %	0,1 %	0,16 мл

После застывания геля заливается концентрирующий гель (Таблица 4).

Таблица 4. Состав концентрирующего геля в расчете на 2 геля толщиной 1,5 мм.

Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Объем добавленного компонента
Вода	100 %		3,39 мл
Tris, pH=6,8	0,5 М	0,143 М	1,8 мл
Акриламид + + N,N'- метиленбисакриламид	30 % 0,8 %	4,71 % 0,126 %	1 мл
SDS	10 %	0,1 %	60 мкл
TEMED	100 %	0,1 %	6 мкл
Персульфат аммония	10 %	0,1 %	120 мкл

При проведении электрофореза используется холодный электродный буфер (Таблица 5) – свежий буфер заливаем в центр камеры, а снаружи можно залить свежий или недавно использованный электродный буфер.

Таблица 5. Состав электродного буфера.

Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Объём/масса добавленного компонента на 1 л
Tris	Сухой	25 mM	3,03 г
Глицин	Сухой	0,192 M	14,41 г
SDS	10 %	0,1 %	10 мл
Вода	100 %	до 1 л	

Электрофорез проводится при напряжении 140 В и силе тока 45 мА для двух гелей или 30 мА для одного – 1,5 часа.

Гели с 2,2,2-трихлорэтанолом обрабатываем ультрафиолетом (5 мин), что позволяет модифицировать триптофаны белков, заставляя их флуоресцировать. Флуоресценция снимается на камере ChemiDocMP (BioRad, Германия) в режиме Stain-free.

3.5.2. Электрофорез и окраска кумасси для масс-спектрометрии

Электрофорез для проведения масс-спектрометрии проводится без добавления 2,2,2-трихлорэтанола. Вместо этого, полученный гель окрашивался синим красителем Кумасси при нагревании в течение 10 минут в растворе с 5% уксусной кислотой и 20% метанолом. Лишняя краска отмывалась аналогичным раствором – 5% уксусной кислоты и 20% метанола.

3.6. ВЕСТЕРН-БЛОТ

3.6.1. Полусухой перенос белков

Гели переносили на 0,45 мкм PVDF мембрану (Amersham™, GE Healthcare, Life science, Англия или ThermoFisher, США). Мембрана 30 с. активируется в метаноле, отмывается 2 минуты в воде и уравнивается несколько минут с раствором для переноса (ThermoFisher, США).

Гели также инкубируются в буфере для переноса не менее 5 минут. Для переноса использовалась камера PowerBlotter (ThermoFisher, США) и запрограммированные стандартные программы переноса.

3.6.2. Блокировка и инкубация с антителами

Мембрана блокировалась в растворе TBS с 0,1% Tween-20 (TBST) с 5% обезжиренным молоком (Nestle, Швейцария) или БСА в течение часа. При

необходимости мембрана отмывалась от блокирующего буфера в TBST (три раза по 5 минут). Инкубация с первичными антителами проводилась в соответствии с разведениями, указанными в Таблице 1. Антитела разводили в 5% растворе БСА в TBST, для определения сиртуинов, актина, VDAC вместо БСА можно использовать растворы молока. Инкубацию проводили 1,5 часа на шейкере при комнатной температуре, либо в течение ночи при +4°C, затем первичные антитела отмывали TBST и использовали соответствующие вторичные антитела из Таблицы 1.

Снятие сигнала хемилюминесценции производили с использованием различных ECL-субстратов от Thermo Fisher или BioRad и камеры ChemiDocMP (BioRad, Германия). Анализ изображений производили с помощью программы ImageLab 7.1 (BioRad, Германия).

3.7. ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТЕЙ ФЕРМЕНТОВ

Активности ферментов определяли в гомогенатах и клеточных лизатах. При подборе количества образца следили, чтобы скорость реакции была минимум в 3 раза выше фоновой реакции, которая измерялась без одного из субстратов, как правило 2-оксокислоты, а также чтобы скорость реакции за вычетом фона росла линейно от количества препарата фермента.

Гомогенаты озвучивали на низком уровне мощности на ультразвуковом дезинтеграторе Bioruptor (Diagenode, Льеж, Бельгия), 7 циклов по 30 + 30 сек, в ледяной бане, после чего смешивали их с 4-кратным раствором лизис-буфера (50 mM Трис-HCl pH 7,4, 1% NP-40, 0,25% дезоксихолат натрия и 0.15 mM NaCl) и инкубировали от 30 минут на льду. Активности в клеточных лизатах измеряли без дополнительных обработок.

3.7.1. 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс

Активность ОГДК определялась по восстановлению НАД⁺ – спектрофотометрически по поглощению при 340 нм. Состав реакционной смеси: 50 mM МОПС pH 7.0, 1 mM ДТТ, 1 mM ТДФ, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM КоА, 2,5 mM НАД⁺ и 2 mM 2-оксоглутарат (не при измерении фона).

3.7.2. Пируватдегидрогеназный комплекс

Активность ПДК определялась по изменению поглощения формазана (500 нм) в течение 5 минут в буфере следующего состава: 50 мМ K_2HPO_4 , pH=7,5, 5 мМ L-карнитин, 0,2 мМ ТДФ, 1 мМ MgCl_2 , 1 мг/мл БСА, 0,1 мМ КоА, 2,5 мМ НАД⁺, 6,5 мкМ феназинметасульфат, 0,6 мМ иодонитротетразолий и 2 мМ пируват (отсутствует при измерении фона).

3.7.3. Глутаминсинтетаза

Активность глутаминсинтазы определяли по поглощению γ -глутамилгидроксамата в комплексе с Fe^{3+} в кислых условиях (540 нм), согласно методу [129], оптимизированному для измерений на микропланшетах. Вкратце, 20 мкл образца смешивали с 80 мкл реакционной смеси, содержащей 250 мМ имидазоловый буфер, pH 6,8; 250 мМ L-глутамин, pH 6,8, 250 мМ гидрохлорид гидроксилamina; 1,6 мМ ADP, 250 мМ гидрокарсенат натрия, 10 мМ MnCl_2 в соотношении компонентов буфера 2:2:1:1:1:1 и инкубировали 15-30 мин при 37°C. В качестве фона использовали смесь с 4 объемами имидазола, но без глутамина. После инкубации добавляли 200 мкл стоп-раствора (2,42% FeCl_3 , 1,45% трихлоруксусной кислоты в 1,83М HCl). Оптическую плотность измеряли в супернатанте при 540 нм. При проведении реакции в эппендорфах смесь центрифугировали 15 мин при 3300 g для осаждения белка.

3.7.4. Глутаматдегидрогеназа

Активность ГДГ детектировалась спектрофотометрически (340 нм) в двух направлениях: (1) реакция аминирования 2-оксоглутарата и (2) реакция окисления глутамата. Конкретные условия проведения реакции указаны в подписях к рисункам. Скорость фоновой реакции измеряли в среде без 2-оксоглутарата/глутамата.

Состав среды реакции включал:

(1) 0,2 мМ НАДН, 50 мМ NH_4Cl , 100 мМ Трис-HCl, pH 7,5 и 2-оксоглутарат (2.5 мМ если не указано иное),

(2) 1,5 мМ НАД⁺, 100 мМ Трис-НCl, рН 8,1 и глутамат (1 мМ если не указано иное).

3.7.5. НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа

Активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) детектировалась спектрофотометрически (340 нм) по продукции НАДН. Состав среды реакции: 50 мМ HEPES, рН 7,24, 0,72 мМ НАД⁺, 18 мМ никотинамид, 0,32 мМ MnCl₂, 1 мМ ADP и 7,2 мМ DL-изоцитрат (не в фоне).

3.7.6. НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа

Активность НАДФ-зависимой ИЦДГ детектировалась спектрофотометрически при 340 нм по продукции НАДФН. Состав среды реакции включал: 50 мМ Трис-НCl, рН 7,5, 4 мМ DL-изоцитрат, 0,5 мМ НАДФ⁺, 3,5 мМ MgCl₂. Фон измерялся без изоцитрата.

3.7.7. Малатдегидрогеназа

Активность малатдегидрогеназы (МДГ) детектировалась спектрофотометрически при 340 нм по исчерпанию НАДН. Состав среды реакции включал: 0,14 мМ НАДН, 0,3 мМ оксалоацетат и 100 мМ Трис-НCl, рН 7,5. Фон измерялся без оксалоацетата. Оксалоацетат быстро разлагается, поэтому его растворяют и готовят смесь непосредственно перед измерением.

3.7.8. НАДФ-зависимый малик-фермент

Активность малик-фермента детектировалась спектрофотометрически по образованию НАДФН (340 нм). Состав среды реакции: 0,4 мМ НАДФ⁺, 4 мМ MgCl₂ и 100 мМ Трис-НCl, рН 7,5 и 5 мМ малат (не при измерении фона).

3.7.9. Пиридоксалькиназа

Активность рекомбинантной ПЛК мерили спектрофотометрически. Состав смеси реакции: 75 мМ NaBES, рН 7,3, 0,125 мМ пиридоксаль, 0,1 мМ MgATP, если не написано иное. Реакцию начинали добавлением ПЛК и следили за поглощением продукта – пиридоксальфосфата (ПЛФ) при 388 нм.

В гомогенатах коры активность ПЛК измеряли иначе. Сначала 2-8 мкл гомогената добавляли к 200 мкл реакционной смеси (50 мМ KH_2PO_4 , pH 6,0; 0,1 мМ ZnSO_4 ; 0,2 мМ пиридоксаль; 2 мМ Na_2ATP). Смесь инкубировали в темноте при 37°C в течение 90 минут с последующим охлаждением планшета на льду в течение 5 минут и немедленным добавлением холодного раствора 6 мМ гидроксиламина до конечной концентрации 1 мМ. В качестве фона использовали аналогично обработанные препараты со средой без АТР. Флуоресценцию (ex365 нм|em450 нм) измеряли через 150 с после добавления гидроксиламина, сигнал измеряли в течение 5 минут. Расчет скорости реакции ПЛК проводили, как описано [130].

3.7.10. Глутамат-оксалоацетат и глутамат-пируват трансминазы

Активность этих трансминаз измеряли двумя способами. Первый метод был разработан с использованием сопряженных ферментов (Таблица 6). Активности измерялись в 100 мМ Na-K-фосфатном буфере, pH 7,4, для приготовления 100 мл которого берется 3 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и 0,218 г KH_2PO_4 . В состав реакционной смеси для измерения глутамат-оксалоацетат трансминазы (ГОТ) также входили: 0,1 мМ НАДН, 40 мМ DL-аспартат, 2 мМ 2-оксоглутарат и МДГ в разведении 1:3600 (Reanal, 10 мг/0,53 мл). Перед добавлением МДГ необходимо подвести pH до 7,4.

Для измерения ГОТ озвученный гомогенат коры мозга крысы с добавленным буфером RIPA разводили в 25 раз в 50 мМ буфере MOPS pH 7. В реакции рутинно использовали 3 мкл такого разведенного препарата, реакцию измеряли в течение 150 секунд.

В состав реакционной смеси для измерения глутамат-пируват трансминазы (ГПТ) помимо Na-K-фосфатного буфера входили: 0,1 мМ НАДН, 40 мМ DL-аланин, 2 мМ 2-оксоглутарат и лактатдегидрогеназа в разведении 1:2000 (Sigma-Aldrich).

Для измерения ГПТ использовали 2 мкл озвученного гомогената коры мозга крысы с буфером RIPA. Реакцию измеряли в течение 10 мин. Начальный интервал (120 секунд) исключали.

Таблица 6. Способ приготовления 100 мл смесей для измерения активностей ГОТ и ГПТ.

Компонент	ГОТ		ГПТ	
	Фон	реакция	фон	реакция
0,1М NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4 *	до 25 мл	до 25 мл	до 25 мл	до 25 мл
0,4 М 2-оксоглутарат	Нет	0,125 мл	0,125 мл	0,125 мл
20 мМ НАДН	0,125 мл	0,125 мл	0,125 мл	0,125 мл
DL-Ala	Нет	нет	нет	0,0891 г
DL-Asp	0,1331 г	0,1331 г	нет	нет
МДГ	7 мкл	7 мкл	нет	нет
ЛДГ	Нет	нет	12,5 мкл	12,5 мкл

* (3,0084 г Na₂HPO₄*12 H₂O и 0,2177 г KH₂PO₄ на 100 мл 100 мМ буфера)

Второй метод основывался на методике Рейтмана и Франкеля [131] с 2,4-динитрофенилгидразином (DNPH), оптимизированного для микропланшетного анализа. Для данного метода требуются растворы, приготовление которых описано в Таблице 7.

Таблица 7. Состав и способ приготовления растворов, необходимых для измерения активностей ГОТ и ГПТ с DNPH.

Раствор	Объем	Способ приготовления
100 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4	100 мл	3 г Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O и 0,218 г KH ₂ PO ₄ (pH сразу 7,4)
4М NaOH	50 мл	8 г NaOH
1М HCl	50 мл	4,163 мл конц. HCl
1 мМ DNPH	50 мл	0,01 г DNPH растворяется сперва в минимальном объеме DMSO, затем в 1М HCl. Р-р должен сохранять светло-желтую окраску. Избегать света.
200 мМ DL-Ala и 2 мМ 2-оксоглутарат, pH 7,4	15 мл	0,267 г DL-Ala + 75 мкл 0,4 М 2-оксоглутарата растворить в ~15 мл 100 мМ NaH ₂ PO ₄
200 мМ DL-Asp и 2 мМ 2-оксоглутарат, pH 7,4	15 мл	0,4 г DL-Asp + 75 мкл 0,4 М 2-оксоглутарата растворить в <15 мл 100 мМ NaH ₂ PO ₄ с добавлением большого количества NaOH, проконтролировать pH 7,4

Также для калибровки необходимо приготовить растворы 2 мМ пирувата (для ГПТ) или оксалоацетата (для ГОТ) в NaH₂PO₄ буфере.

При измерении в микропланшетах необходимо соблюдать следующую последовательность действий:

- 1) Раскапать калибровочные растворы, используя для ГПТ раствор 2 мМ пирувата (0-50 мкл) и смеси Ala + 2мМ оксоглутарат (100-50 мкл) – суммарно по 100 мкл на лунку. Для ГОТ используются растворы оксалоацетата и Asp + оксоглутарат, соответственно. Использование

калибровки обязательно для каждого микропланшета (достаточно занять 6 из 96 лунок, тогда остальные 90 лунок подойдут для измерения, например, ГПТ в 15 разных образцах).

- 2) Только в лунки, где будет измеряться реакция, раскапать 5 мкл гомогената (для ГПТ). Для измерения ГОТ используется 5 мкл разведенного в 50 раз гомогената.
- 3) В те же лунки раскапать 95 мкл раствора Ala + 2мМ оксоглутарат (или Asp + оксоглутарат в зависимости от измеряемой реакции).
- 4) Инкубация 30 мин при 37 °С (перемешивание с крышкой).
- 5) В те же лунки раскапать 100 мкл DNPH (в HCl).
- 6) Без задержек и спешки в оставшиеся лунки, где будет измеряться фон, добавить идентичные объемы гомогената, затем DNPH (в HCl), и только затем раствора с аминокислотой и оксоглутаратом (в результате фермент инактивируется кислотой до добавления субстратов).
- 7) Ждать 20 минут при комнатной температуре, без доступа света (реакция DNPH).
- 8) Добавить 100 мкл NaOH и подождать 30 минут при слабом перемешивании (окраска при 505нм должна перестать усиливаться).
- 9) Измерить поглощение света 505нм (возможный диапазон 490-530 нм [131]), рассчитать активность по калибровке.

Метод с DNPH также успешно тестировался для измерения активности трансаминазы разветвленных 2-оксокислот, уровень которой в мозге сопоставим с уровнем ГПТ, но вместо пары пируват–аланин используется пара разветвленная 2-оксокислота – разветвленная аминокислота (2-оксо-3-метил-пентаноат/ 2-оксо-4-метил-пентаноат/ 2-оксо-3-метил-бутаноат – Ile/ Leu/ Val, соответственно).

3.7.11. ГАМК-трансаминаза

Активность трансаминазы ГАМК в мозге крысы измеряли по опубликованному методу [132], оптимизированному для микропланшетного анализа. К 10 мкл гомогената коры мозга крыс (после озвучивания и

добавления RIPA-буфера) добавляли 190 мкл субстратной смеси: Трис-НСl, 100 мМ, рН 8,1; 2-оксоглутарат, 2 мМ; НАД⁺, 1 мМ; меркаптоэтанол, 20 мМ; ГАМК, 3 мМ. Для измерения фонового поглощения использовали аналогичную смесь без ГАМК, которую точно так же добавляли к 10 мкл гомогената. Приготовление субстратной смеси описано в Таблице 8.

Измерение активности ГАМК-трансаминазы требует 30 мин преинкубации, которую для удобства проводили непосредственно в термостатируемом при 25°C приборе Tecan Sunrise с периодическим перемешиванием и измерением оптической плотности при 340 нм.

Время измерения активности вместе с инкубацией составляло 3200 сек. Для анализа активности брали линейный участок реакции (1800-3200 сек).

Таблица 8. Способ приготовления 50 мл среды для ГАМК-трансаминазы.

Компонент	Конечная концентрация	Объем добавки на 50 мл
100 мМ Tris-HCl, рН 8,1	~100 мМ	до 50 мл
0,4 М 2-оксоглутарат	2 мМ	250 мкл
0,25М НАД ⁺	1 мМ	200 мкл
Меркаптоэтанол (конц.)	20 мМ	70,5 мкл
0,3М ГАМК	3 мМ (отсутствует в фоне)	0 мкл *

** отлить 24,75 мл р-ра измерения фона и добавить к ним 250 мкл 0,3М р-ра ГАМК.*

3.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ОБЩЕГО БЕЛКА

Для определения концентрации общего белка использовали набор реагентов Pierce™ BCA фирмы Thermo Scientific (#23225, США) или аналогичные наборы. Измерялась оптическая плотность при 562 нм, которая линейно возрастает с увеличением концентрации белка.

3.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА

Для измерения глутатиона (свободных тиолов) использовали спектрофотометрический метод с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ), учитывая, что GSH является основным тиолом в клетке. Реакционная смесь содержала 0,4 М трис-НСl буфер, рН 8,7 и 0,15 мМ раствор ДТНБ. Для реакции использовали стоковый 6 мМ водный раствор ДТНБ. Реакцию начинали добавлением препарата с глутатионом. Измеряли поглощение при 412 нм после инкубации смеси в темноте при 25°C в течение 3–5 мин. Фоновое

поглощение измеряли в реакционной смеси без добавления экстракта. Клеточное содержание глутатиона нормировали на белок.

3.10. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Хроматографию на тиамин-N-4-азобензоил-ε-гидразидсефарозе 4В (тиамин-сефарозе) проводили по опубликованному протоколу [133]. Вкратце, экстракт ацетонового порошка мозга наносили на колонку с тиамин-сефарозой, уравновешенную буфером Кребса–Рингера: 24,9 мМ NaHCO₃, 2,34 мМ KH₂PO₄, 118 мМ NaCl, 4,6 мМ KCl, 1,19 мМ MgSO₄, 2,42 мМ CaCl₂, и 10 мМ глюкозы, pH 7,4). Не связавшиеся белки удаляли в этом же буфере, что контролировалось по оптической плотности элюата при 280 нм до установления базовой линии. Связавшиеся белки элюировали буфером 5 мМ раствором тиамина, pH 7,4, или 10 мМ раствором тиамина, pH 5,6 в буфере Кребса–Рингера. Для дальнейшей последовательной элюции использовали 10 мМ Трис-HCl, pH 7,4, содержащий либо 1М NaCl (первая стадия – элюция прочно связавшихся белков), либо 2 М мочевины (вторая стадия). Белки, элюированные с тиамин-сефарозы, подвергали электрофорезу с последующей масс-спектрометрией (МС), как описано ранее [2]. МС анализ проводился на базе лаборатории наших партнеров из университета Отто-фон-Гёрике (Магдебург, Германия).

Ввиду недостаточной аннотации белков быка в базе UniProtKB/TrEMBL идентификацию пептидов осуществляли по базе данных UniProtKB/SwissProt, используя программное обеспечение «Biotools Software for Protein Analysis» (Bruker, Германия). В связи с отсутствием многих белков быка в курируемой базе UniProtKB/SwissProt, поиск пептидов проводили по всем организмам. Результаты автоматического поиска проверяли и уточняли вручную, осуществляя поиск белков быка и других млекопитающих, гомологичных идентифицированным фосфатазам. В частности, для поиска последовательностей DING-белков пользовались сервисом blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) – tblastn с параметрами по умолчанию.

3.10.1. Анализ пептидов с помощью программ Skyline и PEAKS Studio

С помощью МС определяли белки в гомогенатах коры мозга крыс с целью качественного анализа ПТМ, относительного количественного анализа изменения уровня пептидов (Таблица 9) и соответствующих им белков в результате экспериментального воздействия *in vivo* или *in vitro*.

Таблица 9. Пептиды, использованные для относительной количественной оценки с помощью масс-спектрометрии. В зависимости от количества остатков лизина, аргинина и гистидина в пептиде, определяли несколько заряженных вариантов предшественников (2+, 3+ или 4+) с массой моноизотопного предшественника и C13-изотопомепными вариантами ([M + 1] и [M + 2]) для повышения точности количественной оценки [8, 134].

	Пептид	Характеристика	C13-изотопный вариант предшественника		
			monoisotopic	[M+1]	[M+2]
PDXK	MoxRKPDG <u>S</u> TVTQR	S213 дефосфо	464,5735+++	464,9077+++	465,2415+++
	AEAGEGQKP <u>S</u> PAQLELR	S285 дефосфо	594,3111+++	594,6454+++	594,9796+++
	ANNVNKYDYVLTGYTR	Пепт. #1	945,9709++	946,4723++	946,9737++
	MoxGPDTVVITSSDLPSPK	Пепт. #2	630,9830+++	631,3173+++	631,6515+++
	GSDYLMoxALGSQR	Пепт. #3	880,4428++	880,9442++	881,4452++
ACTB	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	Пепт. #1	657,3114++	657,8128++	658,3134++
			977,5358++	978,0373++	978,5387++
			652,0263+++	652,3606+++	652,6949+++
	DLYANTVLSGGTTMoxYPGIADR	Пепт. #2	1116,0361++	1116,5375++	1117,0386++
	QEYDESGPSIVHR	Пепт. #3	758,8550++	759,3564++	759,8577++
Tubb3			506,2391+++	506,5734+++	506,9076+++
	PSGNYVGDSDLQLER	Пепт. #1	825,3919++	825,8934++	826,3947++
	EVDEQMoxLAIQSK	Пепт. #2	703,8452++	704,3467++	704,8474++
	ISVYYNEASSHK	Пепт. #3	699,3384++	699,8399++	700,3412++
			466,5614+++	466,8957+++	467,2299+++
GDH	ISGASEKDIVHSGLAYTMoxER	K503	1090,5362++	1091,0377++	1091,5388++
			727,3599+++	727,6942+++	728,0283+++
			545,7718++++	546,0225++++	546,2730++++
	ISGASEKacDIVHSGLAYTMoxER	Ац-K503	1111,5415++	1112,0430++	1112,5441++
			741,3634+++	741,6977+++	742,0318+++
	GASIVEDKLVEDLKTR	K84	591,6633+++	591,9976+++	592,3318+++
			443,9993++++	444,2500++++	444,5007++++
	GASIVEDKacLVEDLKTR	Ац-K84	907,9965++	908,4980++	908,9994++
			605,6668+++	606,0011+++	606,3353+++
	AGVKacINPK	Ац-K187	434,7662++	435,2676++	435,7689++
	DDGSWEVIEGYR	Пепт. #1	713,3177++	713,8192++	714,3205++
	DSNYHLLMoxSVQESLER	Пепт. #2	968,9571++	969,4585++	969,9595++
			646,3072+++	646,6414+++	646,9754+++

ох – окисление (M), ас – ацетилирование (K).

Для качественного анализа применяли программу PEAKS Studio после предварительной автоматической обработки данных в «Biotools Software for Protein Analysis» (Bruker, Германия). С помощью PEAKS Studio среди найденных автоматически пептидов проводилась дополнительная фильтрация пептидов интереса на предмет правильного трипсинолиза, суммарного заряда и модификаций. Зная точное время выхода конкретного пептида в конкретном образце, в программе Skyline производили поиск пика, соответствующего

данному пептиду. В результате производился относительный количественный анализ пептидов, либо уровней ацилирования того или иного сайта ПТМ.

3.11. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Эксперименты проводились в рамках командировки в лабораторию структурной микробиологии Института Пастера (Париж, Франция). Основной целью проекта было получить кристалл ГДГ с ТТФ или другим тиаминовым производным. Рост кристаллов осуществлялся методом висячей капли, как описано [135]. Кристаллы ГДГ быка выращивали с использованием соответствующего коммерческого очищенного белка (G7882, Sigma, США) при 18°C и при 4°C. При подборе условий также варьировали состав буферов кристаллизации, используя коммерческие наборы (до 700 различных условий в рамках одного скрининга) и наборы лигандов, связывающихся с ГДГ – дополнительные лиганды могут способствовать стабилизации белка, помочь связыванию других лигандов (ТТФ) и улучшить разрешение кристалла. Рост кристаллов занимал от 14 дней, но большая часть из них начинала образовываться лишь через месяц, достигая достаточного размера по истечении двух месяцев. Анализ дифракции кристаллов проводился при 100 К с использованием синхротронных ускорителей либо в ESRF (Гренобль, Франция), либо в SOLEIL (Saint-Aubin, Франция). Данные обрабатывались с помощью autoPROC [136] или автономного XDS [137] и масштабировались с помощью SCALA/AIMLESS из пакета CCP4 [138]. Кристаллические структуры были решены путем молекулярного замещения с использованием имеющихся координат ГДГ. Затем все модели были вручную перестроены с помощью COOT [139]. Рисунки были созданы и визуализированы с помощью PyMol (Schrödinger, LLC.).

3.12. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Все эксперименты проводились минимум в трех повторях, как технических, так и независимо воспроизведенных экспериментов. Для животных экспериментов использовали минимум по три животных в каждой

группе. Если не указано иное, данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Для статистического анализа использовалась программа Prism 7.0 («GraphPad», США). Для анализа статистической достоверности различий между двумя группами использовался непараметрический критерий Манна-Уитни. Проверка нормальности выборок осуществлялась по критерию Д'Агостино-Пирсона. Для анализа эффектов в группах, где использовались несколько факторов воздействия, применялся двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Достоверными считались различия с $p < 0,05$. Различия с $0,05 < p < 0,1$ рассматривались как тенденции.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Идентификация фосфатаз семейства DING как потенциальных ферментов метаболизма тиаминфосфатов*

Большинство киназ и фосфатаз из метаболизма тиамина млекопитающих не определены на молекулярном уровне. Однако такие фосфатазы могут иметь большое значение в развитии болезни Альцгеймера, где наблюдается положительная корреляция между степенью прогрессии заболевания и активностью фосфатаз производных тиамина [122]. Мы исследовали белки синаптосомальной фракции мозга быка, связывающиеся с модифицированной тиамином сефарозой, с последующим направленным поиском фосфатаз. Использование препарата из мозга быка связано с потребностью в большом количестве препарата нервной ткани.

Для идентификации фосфатаз, специфичных к производным тиамина, мы использовали аффинную хроматографию на сефарозе, модифицированной тиамином, с последующей масс-спектрометрией элюатов раствором тиамина (рН 5,6 или 7,4), 1М NaCl и 2М мочевиной. Элюируемая тиамином (рН 5,6) фракция содержит более сотни белков, наиболее представленными из которых являются МДГ и ГДГ, которым характерен высокий уровень экспрессии.

Поиск тиамин-зависимых фосфатаз среди полученных протеомов проводили с использованием следующих критериев: найденные пептиды должны принадлежать белкам, аннотированным как фосфатазы, их содержание в не связавшихся с тиамин-сефарозой фракциях должно быть мало, по сравнению с содержанием в элюатах с тиамин-сефарозы, а элюция должна определяться аффинной семейства DING: фосфатаза *L. P. aeruginosa* и X-DING-CD4 (тиаминовой) стадией. Этим критериям удовлетворяли

* При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Mezhenka OA, Parkhomenko YM, Kaehne T, Bunik VI. (2020) *Biochemistry (Mosc)*. Thiamine Mono- and Diphosphate Phosphatases in Bovine Brain Synaptosomes. 85(3):378-386 (вклад 0,25/0,56 ПЛ). Mezhenka OA, Aleshin VA, Kaehne T, Artiukhov AV & Bunik VI (2020) *Regulation of malate dehydrogenases and glutamate dehydrogenase of mammalian brain by thiamine in vitro and in vivo. Biochemistry (Moscow)*, 85(1):27-39 (вклад 0,3/0,81 ПЛ).

фосфатазы из человека (Таблица 10), гомологичные отсутствующим в базах данных DING-фосфатазам быка (поиск проводился по Swiss-Prot против всех организмов и уточнялся, используя базу UniProtKB/TrEMBL).

Таблица 10. Представленность фосфатаз в элюатах с тиамин-сефарозы по данным МС. Суммированы результаты определения фосфатаз во фракции не связавшихся с тиамин-сефарозой белков (Не св.), в кислой (pH 5,6) элюции тиаминном и последующих – NaCl и мочевиной. При слабощелочной (pH 7,4) элюции тиаминном и следовавших после этого элюциях NaCl и мочевиной данные белки не определялись. Покрытие идентифицированными МС пептидами указанных в таблице белков представлено в % общей длины пептидов от длины последовательности данного белка [140].

Белок (ID)	Покрытие пептидами, %, в элюатах с тиамин-сефарозы			
	Не св.	Тиамин (pH 5.6)	NaCl	Мочевина
Фосфатаза L (P35482)	-	11	-	6
X-DING-CD4 (R4H484)	4	9	-	4
HPBP (P85173)	12	2	6	7

В процессе поиска мы столкнулись с проблемой идентификации в геномах млекопитающих DING-белков, представителем которых была бактериальная фосфатаза L [141-144]. Из семейства данных белков лишь последовательности белков человека HPBP [145, 146] и X-DING-CD4 [147, 148] определены достоверно (Таблица 10). Профиль элюции фосфатазы X-DING-CD4 совпадал с таковым для щелочной фосфатазы L (Таблица 10), указывая на принадлежность пептидов одному и тому же ортологичному белку DING из генома быка.

Пептиды фосфат-связывающего белка HPBP, напротив, не совпадают с пептидами X-DING-CD4 и фосфатазы L при выравнивании их последовательностей (Рис. 6). Имеются и существенные отличия профилей элюции HPBP и фосфатазы L или X-DING-CD4 (Таблица 10). Эти результаты свидетельствуют о присутствии минимум двух DING белков в элюатах с тиамин-сефарозы.

X-DING-CD4	1	-----MADINGGGATLPQPLYQTSG-VLTAGFAPYIGVSGSGKGL
HPBP	1	-----DINGGGATLPQKLYLTPD-VLTAGFAPYIGVSGSGKGI
Aph L	1	MFKRSLIAASLSVAALVSAQAMAVTGGGASLPAELYKGSADSLPANFSYAVTGSCTGKN
X-DING-CD4	40	AFLNNDYSQFGTG-TKNVHWAGSDSKLTSTELSTYASTKQAAWGKLIQVPSVATSVAIPF
HPBP	38	AFLNRYNQFGTDTTKNVHWAGSDSKLTATELATYAADKEPGWGKLIQVPSVATSVAIPF
Aph L	61	AFLTNNSSLFGT--TGTVHYAGSDSVLSGSELTYNNSNYNGTYGELIQIPSVATSVTVPY
X-DING-CD4	99	NKAGSNAVDLSVDQLCGVFSGRITTWNPATGRICNIVVYRNEASGGTTELFTRFLTA
HPBP	98	RKAGANAVDLSVKELCGVFSGRITADWSGITGAGRSGPIQVYRAESSGGTTELFTRFLNAK
Aph L	119	RKDCNTTINLTSAQLCDAFSGAKTTWGQLLGTDDSTPIRIVYRTGSSGGTTELFTRHINSI
X-DING-CD4	159	CVNESKKEVVTTFNFADESGVP---AGAVPAV--TSQGVMTKLN---AGDGRITYMSPDY
HPBP	158	CTTEPGTFAVTTTFANSYSLGLTFLAGAVAAT--GSDGVMAALNDTTVAEGRITYISPDPF
Aph L	179	CPTR---FATNSTFTNAR---LPAAGTLPSNWVCVAATSTVSTVKATNGSLGYVSPDA
X-DING-CD4	210	AAPTLAGLDDATKVAKV-----AGVSPAPDNVSAAIAAV-FVPAAANVALQNAWV
HPBP	216	AAPTLAGLDDATKVAKVGVVNGVAVEGKSPAAANVSAAISVV-PLPAAADRENEDVWV
Aph L	232	V-----NINSNAEVSERV-----NCNLPTQANVSTALGSVAEPANAADRADPSKWV
X-DING-CD4	259	PVFMAAADANDPSVVPYSTGFPILGFTNLIFSQ-----
HPBP	275	PVFGATT---GGGVVAYEDSGYPILGFTNLIFSQYANATQTGOVRDFFTKHYGTSANND
Aph L	277	PVET-----NPSAGYSIVGVTFNFEVGGQYKDAVSSTDVRAFIKHYGCTTN-
X-DING-CD4		-----
HPBP	332	AAIEANAFVPLPSNWKAAVRAFLT-ASNALSIGNTNVCNGKGRBQ
Aph L	324	AAVAANHGFPLTPAWKSATVSAFYTGTSNLAIGNTNVCNTKGRP-

Рис. 6. Множественное выравнивание последовательностей (Clustal Omega) белков, найденных при аффинной хроматографии, принадлежащих семейству DING. Найденные уникальные пептиды отмечены зелеными рамками [140].

Таким образом, поиск бычьих ортологов человеческих DING белков показал наличие минимум двух различных DING-белков во фракции синапсом мозга. Ортолог фосфатазы X-DING-CD4 человека эффективно и специфично элюируется кислым раствором тиамин. Ортолог фосфат-связывающего белка HPBP обнаруживается среди прочно связанных белков, а также среди белков, не связавшихся с аффинным носителем. В связи с данными об активности в отношении ТДФ щелочной фосфатазы [149] и наличия активности щелочной фосфатазы у HPBP [150] дальнейшее исследование участия HPBP в метаболизме фосфатов тиамин представляется перспективным.

Используя сервис PDBeFold и структуру единственного закристаллизованного DING-белка млекопитающих HPBP в качестве модели, была обнаружена структурная гомология DING-белков со

связывающим тиамин/ТМФ белком ThiB *E. coli*. Структурное выравнивание (Рис. 7) показывает не только сходство белков, но и совпадение центров связывания фосфата и фосфатной группы ТМФ.

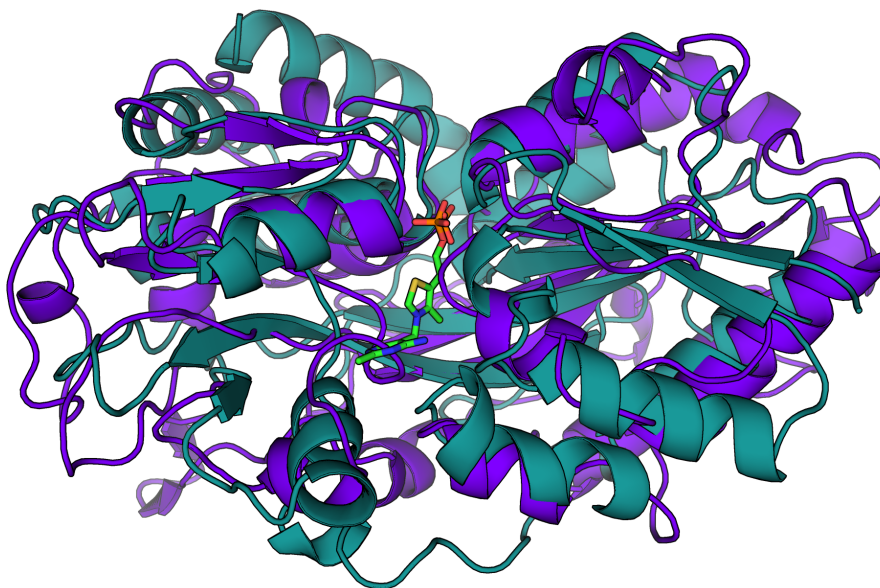


Рис. 7. Структурное выравнивание человеческого фосфат-связывающего белка HPBP (PDB: 2v3q, белок показан фиолетовым) и бактериального тиамин-связывающего белка ThiB (PDB: 2qru, белок показан бирюзовым) с фосфатом и ТМФ (зеленые атомы углерода), соответственно [140].

Таким образом, DING-фосфатазы мозга быка, гомологичные щелочной фосфатазе *L. P.aeruginosa*, связываются с модифицированной тиамином сефарозой и специфически элюируются тиамином, а также имеют структурное сходство с тиамин/ТМФ-связывающим белком из *E.coli*. К сожалению, последовательности DING-фосфатаз млекопитающих до сих пор не идентифицированы в геномах, что мешает их дальнейшему изучению.

4.2. МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПИРИДОКСАЛЬКИНАЗЫ*

4.2.1. Взаимодействие ПЛК с тиамином, его производными и антагонистами

В совместной работе нашей группы с итальянскими специалистами по энзимологии ПЛК было показано, что ПЛК ингибируется тиамином и ТДФ,

* При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Bunik V, Aleshin V, Nogues I, Kähne T, Parroni A, Contestabile R, di Salvo M, Graf A, Tramonti A (2022) Thiamine-dependent regulation of mammalian brain pyridoxal kinase in vitro and in vivo. *J Neurochem* (вклад 0,5/1,44 ПЛ).

которые конкурируют за сайты связывания с пиридоксалем и АТР, соответственно [2]. Продолжая это исследование, был проведен скрининг относительной эффективности ингибирования ПЛК различными производными и антагонистами тиамин (в реакции ПЛК с MgАТР) с целью определения структурных детерминант тиаминных соединений, способствующих ингибированию фермента (Рис. 8). Значения IC_{50} , определенные из кривых ингибирования, представлены в Таблице 11.

ТТФ является лучшим ингибитором ПЛК из фосфатов тиамин, которым характерен коэффициент Хилла $h > 1$. Тиамину же характерен $h < 1$, что согласуется с ранее полученными данными о различии ингибирования ПЛК тиамин и ТДФ [2]. (Рис. 8а). Сравнение с неорганическим пирофосфатом (Рис. 8а) показывает, что пирофосфатная группа, присутствующая в ТДФ и ТТФ, важна для ингибирования ПЛК. Сильнейшим природным ингибитором ПЛК из числа производных тиамин оказался ТТФ, его IC_{50} при полунасыщении АТР (0,45 мМ, Таблица 11) сравнима с $K_m^{ATP} = 0,42$ мМ для идентичного препарата рекомбинантного фермента [151].

Для сравнения, в Таблице 11 также показаны IC_{50} ингибирования тиамин и природными тиаминфосфатами другого пиридоксальфосфат-зависимого фермента – человеческой пиридоксин-5'-фосфат оксидазы (ПНФО) - при полунасыщении ПНФО пиридоксин-5'-фосфатом. Отсутствие ингибирования ПНФО тиамин и на порядок более высокие константы ингибирования ТДФ и ТТФ подтверждают специфичность регуляторного связывания соединений тиамин с ПЛК (Рис. 8а).

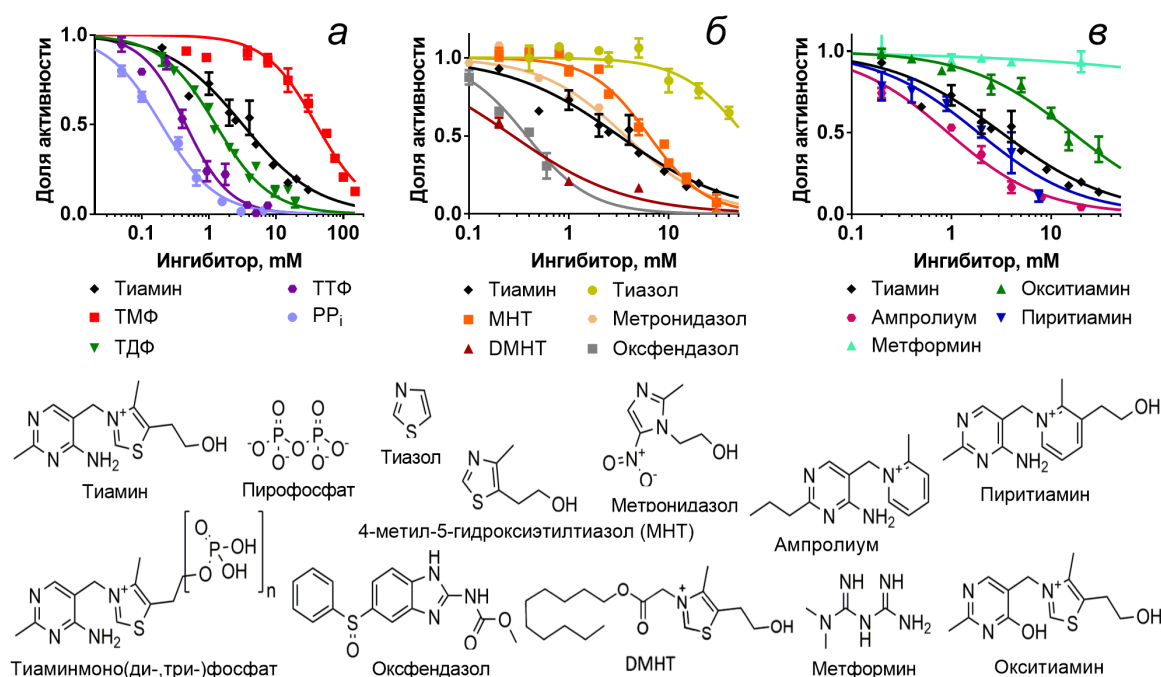


Рис. 8. Ингибирование ПЛК тиаминем, его производными и схожими соединениями. а – Роль фосфорных производных тиамина, сравнение с пирофосфатом (PPi). б – Сравнение эффекта тиамина, его структурных элементов и похожих веществ: 4-метил-5-гидроксиэтил тиазол (MHT/ сульфурол), 3-децилоксикарбонилметил-4-метил-5-гидроксиэтил тиазол (DMHT), метронидазол и оксфендазол. в – Сравнение эффекта тиамина и его антагонистов. Реакция измерялась в среде с буфером NaBES (75 мМ, рН 7,3), MgATP (0,125 мМ) и пиридоксалем (0,1 мМ), с концентрацией ПЛК 1,8-3,5 мкМ. Все данные получены минимум в трех повторностях и представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Параметры аппроксимации ингибирования суммированы в Таблице 11 [134].

Таблица 11. Параметры аппроксимации ингибирования ПЛК тиаминем, его производными и схожими соединениями, сравнение с эффектом производных тиамина на ПНФО. Представлены лучшие значения оптимизации $\pm$ стандартная ошибка. *н.о.* – не определено. Отличие коэффициента Хилла (h) от 1 проверялось, используя F-тест (# – 0,05 < p < 0,1; * – p < 0,05) [134].

Подгруппы	Вещество	ПЛК		ПНФО	
		IC ₅₀ , мМ	h	IC ₅₀ , мМ	h
Тиамин и фосфаты	Тиамин	3,2 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,1#	> 100	-
	ТМФ	40 $\pm$ 3	1,1 $\pm$ 0,1	57 $\pm$ 7	0,8 $\pm$ 0,1
	ТДФ	1,3 $\pm$ 0,07	1,1 $\pm$ 0,1	10 $\pm$ 1	1,0 $\pm$ 0,1
	ТТФ	0,45 $\pm$ 0,04	1,3 $\pm$ 0,2*	26 $\pm$ 48	1,1 $\pm$ 0,2
	PPi	0,2 $\pm$ 0,01	1,1 $\pm$ 0,1	<i>н.о.</i>	
Антагонисты тиамина	Окситиамин	16,3 $\pm$ 2	0,8 $\pm$ 0,1		
	Пиритиамин	1,9 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,2		
	Ампролиум	0,93 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1		
	Метформин	> 100	-		
Структурные аналоги гетероциклов тиамина	Тиазол	59 $\pm$ 14	1,3 $\pm$ 0,4		
	MHT	6,3 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,1*		
	Метронидазол	3,7 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,2		
	Оксфендазол	0,38 $\pm$ 0,03	1,4 $\pm$ 0,2#		
	DMHT	0,27 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,1		

По сравнению с электронейтральным тиазолом, 4-метил-5-гидроксиэтилтиазолом (МНТ) и метронидазолом (их суммарный заряд равен нулю), DMНТ, несущий, как и тиамин, положительный заряд, является хорошим ингибитором. Наличие у DMНТ гидрофобной части, делает его даже лучшим ингибитором, чем тиамин (Рис. 8б, Таблица 11). Таким образом, как положительный заряд тиазольевого кольца, так и гидрофобные взаимодействия важны для связывания тиаминовых соединений с ПЛК.

Среди антагонистов тиамина наиболее эффективный ингибитор ПЛК – ампролиум, чей аминопиримидиновый гетероцикл содержит небольшой ацильный фрагмент (Рис. 2в). Пиритиамин также ингибирует ПЛК лучше обычного тиамина. Коэффициент Хилла ампролиума и других антагонистов ниже $h < 1$, подобно тиамину, в отличие от, например ТТФ, у которого достоверно $h > 1$ (Таблица 11). Ингибирование ПЛК окситиамином значительно менее эффективно, чем ингибирование тиамином (Рис. 8 в, Таблица 11), что указывает на важность аминогруппы тиамина для связывания с ПЛК.

Таким образом, из двух ферментов, продуцирующих ПЛФ в головном мозге, ПЛК ингибируется тиамином и его фосфорными производными более эффективно, чем ПНФО. Из фосфорных производных тиамина наиболее эффективным ингибитором ПЛК является ТТФ. Из антагонистов тиамина наиболее эффективен ампролиум. Данное исследование показывает, что при создании моделей тиаминowego дефицита с помощью ампролиума и пиритиамина следует учитывать возможность побочных эффектов ингибирования ПЛК.

4.2.2. Влияние тиамина на активность и суточную регуляцию фосфорилирования пиридоксалькиназы мозга *in vivo*

Хотя уровни ПЛФ в мозге зависят как от ПЛК, так и от ПНФО, каждый из этих ферментов поддерживает определенные мишени и связанные нейрональные функции [152], и ПЛК не может заменять ПНФО [153, 154]. Поскольку ранее была показана связь тиамина с ацетилированием,

вовлеченным в регуляцию суточных ритмов [2], действие тиамин на активность ПЛК мозга исследовали *in vivo* при введении вещества (400 мг/кг) самцам крыс утром и вечером. Обнаружили изменение активности ПЛК, но не активности ПНФО через 24 часа после введения тиамин (Рис. 9а,б). Зависимость от времени суток регуляции активности ПЛК тиамином наблюдали без изменения уровня белка ПЛК (Рис. 9а,в). Взаимодействие факторов времени и тиамин (ANOVA, $p=0,01$) приводит к различию в активности ПЛК утром и вечером у крыс, получавших тиамин (Рис. 9а). Таким образом, из двух продуцентов ПЛФ в головном мозге только ПЛК демонстрирует дневные функциональные различия, выявленные после введения тиамин. Кроме того, в зависимости от введения тиамин имела место суточная регуляция уровня пептидов, содержащих фосфорилируемые остатки Ser285 и Ser213 (Рис. 9г,д).

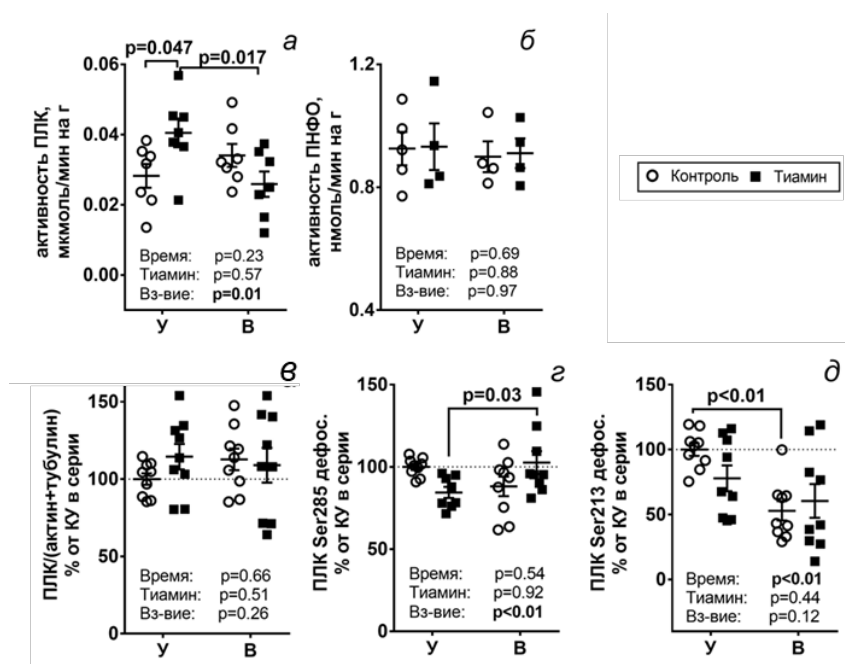


Рис. 9. Изменение активности и регуляции белков, продуцирующих ПЛФ, в коре мозга крысы в зависимости от введения тиамин утром (У) и вечером (В). а – активность ПЛК; б – активность ПНФО; в – уровень белка ПЛК; г – уровень пептида, содержащего Ser285 ПЛК; д – уровень пептида, содержащего Ser213 ПЛК. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA представлены в нижней части графиков. Достоверные ($p<0,05$) согласно тесту Тьюки различия между группами показаны на графиках [134].

Ser213 локализован в небольшой петле на расстоянии 30Å от активного центра (длина димера ПЛК около 80Å). Непосредственное влияние Ser213 на активный центр невозможно. При фосфорилировании P-Ser213 приобретет отрицательный заряд и вступит во взаимодействие с соседними, расположенными подряд остатками аргинина Arg206-Arg208 (Рис. 10а). Это изменит укладку как самой содержащей Ser213 петли, так и может повлиять на передачу сигнала внутри фермента [155]. Возможно также влияние фосфорилирования Ser213 на межбелковые взаимодействия, например, с киназами, часто поддерживаемые заряженными кластерами аминокислотных остатков [156].

Ser285 расположен рядом с Arg283, участвующим в солевом мостике с Asp227, который в свою очередь, соседствует с остатками Val226 и Ala228, непосредственно участвующими в связывании АТФ в активном центре ПЛК. Очевидно, фосфорилирование Ser285 может влиять на активный центр через солевой мостик R283-D227, поэтому именно фосфорилирование Ser285 может регулировать активность ПЛК, что наблюдается при введении тиамина в зависимости от времени суток (Рис. 9).

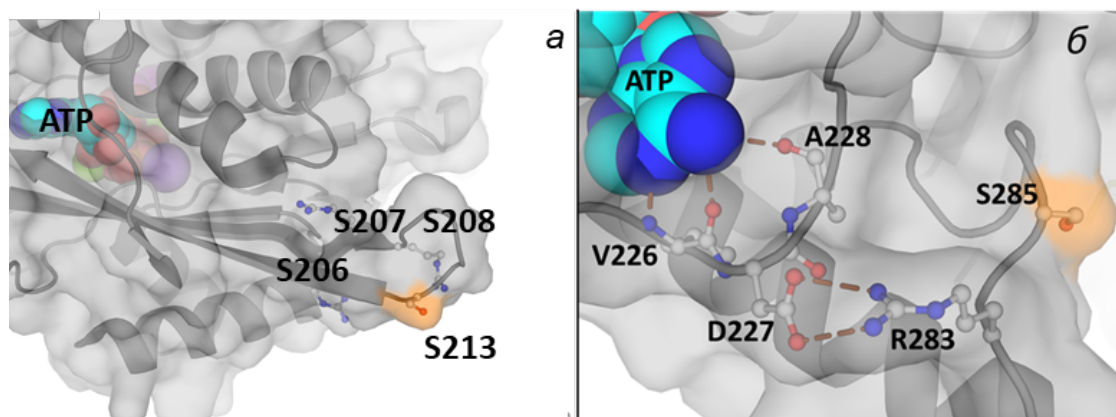


Рис. 10. Расположение сайтов фосфорилирования ПЛК – Ser213 (а) и Ser285 (б) относительно активного центра. Поверхность фосфорилируемых остатков серинов показана оранжевым. Атомы АТФ в активном центре показаны шариками [134].

Таким образом, нами впервые было показано действие однократного введения тиамина на активность ПЛК мозга, зависимое от времени суток. Действие тиамина было специфично по отношению к ПЛК, но не затрагивало

ПНФО. Полученные данные указывают на влияние тиамина на фосфорилирование ПЛК.

4.3. Тиамин снижает фосфорилирование Ser293 PDHA1 и влияет на суточную регуляцию активности пируватдегидрогеназы*

ТДФ является коферментом ПДГ – ключевого фермента, регулирующего поток пирувата в цикл Кребса, и донора ацетил-КоА для ацетилирования белков. Важнейшую роль в регуляции комплекса пируватдегидрогеназы (ПДК) играет фосфорилирование, которое регулируется специальными киназами и фосфатазами [157].

В модели с введением тиамина утром и вечером была обнаружена суточная регуляция активности ПДК в мозге контрольных животных ($p = 0,03$), зависевшая от тиамина (Рис. 11 а). Дисперсионный анализ ANOVA указывает на взаимодействие ($p = 0,05$) между факторами времени и тиамина. Помимо регуляции активности ПДК, обнаружили изменения фосфорилирования Ser293 PDHA1, который является главным регуляторным остатком ПДК – его фосфорилирование вызывает почти полное ингибирование комплекса [157]. Введение тиамина снижает фосфорилирование Ser293 PDHA1, в особенности утром (Рис. 11 б). Сравнение уровня белка PDHA1 вне зависимости от введения тиамина с помощью двухфакторного дисперсионного анализа показывает 20%-ное ($p = 0,02$) увеличение экспрессии PDHA1 вечером (Рис. 11 в). Остальные измеренные параметры ПДК, в том числе уровни основных мозговых киназы

** При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Artiukhov AV, Kaehne T, Graf AV & Bunik VI (2021) Daytime dependence of the activity of the rat brain pyruvate dehydrogenase corresponds to the mitochondrial sirtuin 3 level and acetylation of brain proteins, all regulated by thiamine administration decreasing phosphorylation of PDHA Ser293. International Journal of Molecular Sciences, 22(15):8006 (вклад 0,45/1,12 ПЛ).*

и фосфатазы ПДК (PDK2 и PDP1, соответственно [158]) не менялись (Рис. 11).

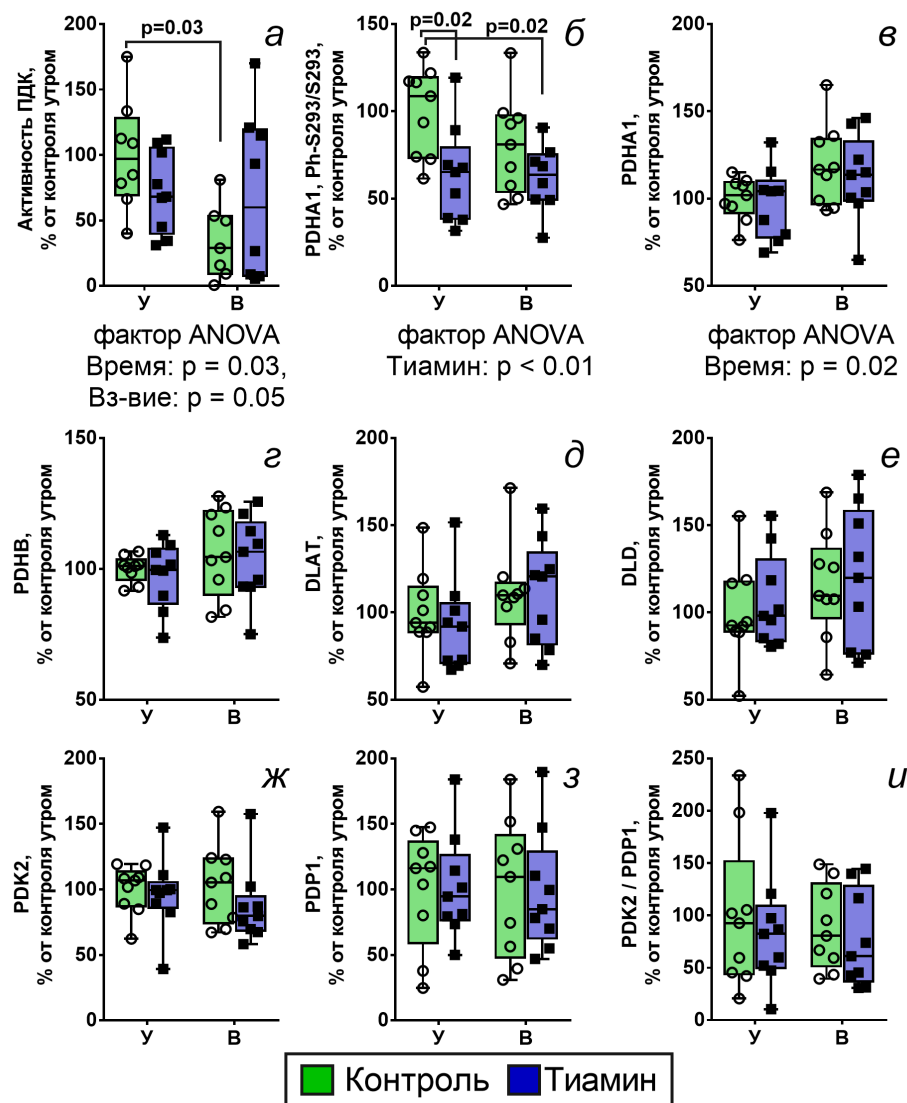


Рис. 11. Влияние тиамина на суточную регуляцию ПДК. А – активность ПДК при насыщении субстратов; б – фосфорилирование Ser293 PDHA1; в-и – уровни белка компонентов ПДК. У - утро, В - вечер. Статистическую достоверность оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорным тестом Тьюки. Р-значения достоверных различий между исследуемыми группами указаны на графиках. Значимые ($p \leq 0,05$) Р-значения факторов и их взаимодействия указаны под графиками [159].

Согласно независимым данным, ТДФ может ингибировать киназы ПДК *in vitro* и в клеточных культурах [160]. Таким образом, введение тиамина крысам могло вызвать наблюдаемое снижение фосфорилирования Ser293 ПДК в мозге без изменения экспрессии компонентов ПДК. В результате, тиамин оказывает эффект на ПДК на пост-трансляционном уровне, через

фосфорилирование. ПДК в свою очередь может оказывать влияние на эпигенетику через ацетилирование, например, гистонов [161].

4.4. Механизмы тиамин-зависимой регуляции глутаматдегидрогеназы*

Показанная ранее связь между тиамином и ацетилированием белков [2] и влияние тиамина на активность и фосфорилирование Ser293 ПДК (Рис. 11) предполагают, что тиамин может влиять на ацетилирование белков. Глутаматдегидрогеназа (ГДГ) – один из преимущественно митохондриальных ферментов, который регулируется ацетилированием. ГДГ также была в числе белков, связывающихся с тиамин-модифицированным сорбентом [2]. Поэтому мы исследовали влияние введения тиамина крысам на регуляцию ГДГ ацетилированием.

4.4.1. Тиамин регулирует ацетилирование глутаматдегидрогеназы in vivo

В модели регулируемых ацетилированием белков суточных изменений исследовали влияние введения тиамина на активность, регуляторные свойства и ацетилирование ГДГ в мозге крыс. Известно, что ацетилирование белков играет важную роль в регуляции суточных ритмов и само меняется в зависимости от времени суток [162, 163].

Несмотря на то, что тиамин не оказывал значимого эффекта на активность ГДГ ни утром, ни вечером, в результате его введения появлялась зависимость активности ГДГ от времени суток (~15%, $p < 0,03$), которая отсутствовала у контрольных животных (Рис. 12а). При этом исчезало

** При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Mkrtchyan GV, Kaehne T, Graf AV, Maslova MV, Bunik VI. (2020) Diurnal regulation of the function of the rat brain glutamate dehydrogenase by acetylation and its dependence on thiamine administration. J Neurochem. 153(1):80-102 (вклад 0,5/1,44 П.Л).*

суточное изменение ацетилирования ГДГ по остатку лизина K503 (Рис. 12б). Помимо K503 детектировали ацетилирование остатков K84 и K187, по которым не выявили достоверных отличий между группами.

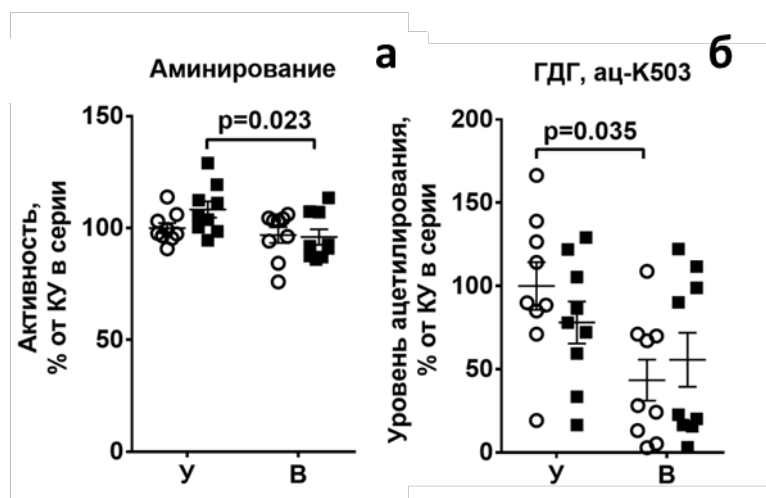


Рис. 12. Введение тиамина влияет на активность ГДГ и ацетилирование остатка лизина K503 зависимо от времени суток. **а** – Активность ГДГ в реакции аминирования с 2,5 мМ 2-оксоглутаратом и 0,2 мМ НАДН. 100% = $1,7 \pm 0,1$ мкмоль НАДН/мин на г ткани. **б** – уровень ацетилирования K503. Результаты нормированы на контрольную группу утренних крыс (У – утро, В – вечер). Данные представлены как средние $\pm$ SEM. Достоверные отличия, определенные по данным апостериорного теста Тьюки показаны на графиках [8].

Поскольку присутствие эндогенных лигандов в гомогенатах тканей, в том числе GTP и ADP, может оказывать эффект на ГДГ в этих препаратах, мы исследовали кинетические свойства ГДГ мозга крыс в полученных сериях животных после удаления низкомолекулярных лигандов с помощью обессоливания (раздел 3.4.6 Материалов и методов). Поскольку уровень ацетилирования ГДГ *in vivo* различается в исследованных образцах (Рис. 12), то и реактивность ГДГ к ацетилированию *in vitro* должна различаться. Чем больше исходный уровень ацетилирования того или иного сайта ГДГ, тем слабее эффект от ацетилирования *in vitro* в данном сайте. Расположение сайтов ацетилирования определяет различия в их значимости для активности и регуляторных свойств ГДГ. В связи с этим, мы также оценили влияние ацетилирования *in vitro* на регуляторные свойства ГДГ в обессоленных образцах, чтобы сравнить эффект от ацетилирования *in vitro* на константы связывания 2-оксоглутарата, GTP и ADP (Рис. 13).

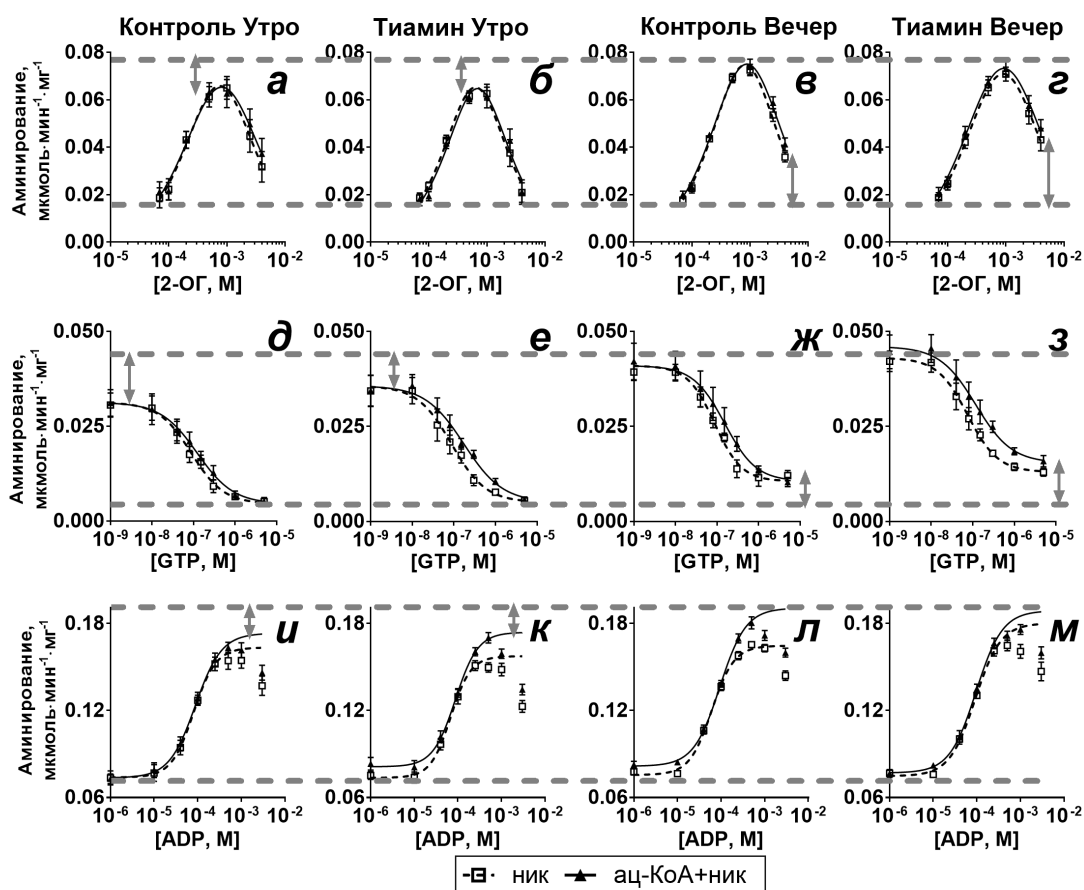


Рис. 13. Влияние времени суток, введения тиаминa *in vivo* и ацетилирования *in vitro* на насыщение ГДГ мозга крыс лигандами: 2-оксоглутаратом (а-г), GTP (д-з), ADP (и-м). Гомогенаты коры мозга крыс были слиты по три животных в рамках четырех представленных групп. Образцы трех независимых серий не объединялись, число независимых повторов $n=3$. Препарат обессоленных на препаративной колонке HiTrap-desalting гомогенатов инкубировался час при 37°C в контрольной среде (с 5 мМ никотинамидом (ник)) или среде ацетилирования (с 5 мМ ник и 2,5 мМ ац-КоА). Ингибирование GTP и активация ADP были измерены при насыщении субстратов. Серые пунктирные линии на графике показывают диапазон суточных изменений ответа ГДГ на регуляторы. Серые стрелки показывают сдвиги ответов ГДГ к регуляторам утром и вечером [8].

Анализ всех кривых насыщения ГДГ 2-оксоглутаратом (Рис. 13 а-г) показывает увеличение эффективной максимальной скорости реакции (при 1 мМ 2-оксоглутарате) вечером, по сравнению с соответствующими утренними значениями, что также сопровождается менее эффективным субстратным ингибированием вечером ($p = 0,01$) фактора времени суток в отношении K_i^{OG} (Таблица 12). У крыс, получавших тиамин, ГДГ в гомогенатах мозга вечером характеризуется в 4 раза более высокими значениями K_i^{OG} , по сравнению с утром (Таблица 12). Таким образом, введение тиаминa приводит к достоверному эффекту времени суток на ингибирование ГДГ 2-

оксоглутаратом. Изменение насыщения ГДГ 2-оксоглутаратом при ацетилировании *in vitro* подтверждает достоверность ($p=0,02$) фактора «ацетилирование» для K_i^{OG} (Таблица 12).

Кинетические кривые ингибирования ГДГ GTP демонстрируют общий сдвиг активности ГДГ в сторону более высоких значений вечером, по сравнению с утром (серые стрелки на Рис. 13 д-з). Согласно статистической значимости фактора времени суток (Таблица 12), более высокая активность ГДГ вечером, по сравнению с утром, связана с уменьшением ингибирования 2-оксоглутаратом ($p = 0,01$ для K_i^{OG}), а не GTP ($p > 0,1$ для параметров ингибирования GTP). Однако дневные и тиамин-зависимые различия в ингибировании ГДГ GTP проявляются после ацетилирования *in vitro* (Таблица 12). У контрольных животных ацетилирование оказывает более выраженное влияние на IC_{50}^{GTP} вечером, по сравнению с утром (Таблица 12). Это хорошо согласуется с 50% снижением вечером ацетилирования GTP-связывающего K503 (рис. 12 г). В целом, последовательный переход к более высоким значениям IC_{50}^{GTP} после инкубации фермента с ацетил-КоА (рис. 13 д-з) и значимость фактора «ацетилирования» для IC_{50}^{GTP} ($p = 0,02$, Таблица 12) подтверждают ослабление ингибирования ферментов GTP после ацетилирования.

Как и в случае с другими регуляторами ГДГ, кривые насыщения ADP показывают суточный сдвиг в активации ГДГ ADP, который максимален вечером (серые стрелки на Рис. 13 и-м). Это наблюдение соответствует значимости фактора времени суток ($p = 0,05$) в отношении амплитуды активации ADP (Таблица 12). Ацетилирование *in vitro* подтверждает суточные изменения насыщения ГДГ ADP. И EC_{50}^{ADP} , и амплитуда ADP-активации существенно изменяются от ацетилирования вечером, но не утром (Таблица 12). Наиболее выражен эффект ацетилирования *in vitro* вечером у контрольных крыс (увеличение EC_{50}^{ADP} в 1,5 раза и увеличение на 20% амплитуды активации ADP, Таблица 12), что соответствует самому низкому уровню ацетилирования K503 (Рис. 12 г-д).

Таблица 12. Зависимость кинетических параметров ГДГ мозга крыс от времени суток, введения тиаминa *in vivo* и ацетилирования *in vitro*. Параметры кинетических зависимостей даны как наилучшее значение аппроксимации $\pm$ SEM в соответствии с Рис. 13. Данные получены с использованием трех независимых серий животных и соответствующих экспериментов по ацетилированию *in vitro* (n=3). Статистически достоверные ($p<0.05$) различия выделены жирным шрифтом и показаны на сером фоне. Пары различающихся групп показаны с помощью одинаковых индексов (a-g). Сравнение параметров аппроксимации проводилось с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с тестом Тьюки (достоверные различия показаны как *a,b,c*). Кривые аппроксимации также сравнивали с использованием F-теста на предмет эффекта ацетилирования *in vitro* (достоверные различия показаны как *d,e,f,g*) [8].

Группа	Р-значение ANOVA		Контроль утро		Тиамин утро		Контроль вечер		Тиамин вечер	
60 минут инкубации с:	фактор “ацетилирование”	фактор “время суток”	нам	Ац-СоА+ нам	нам	Ац-СоА+ нам	нам	Ац-СоА+ нам	нам	Ац-СоА+ нам
$V_{\max}^{\text{ОГ}}$, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	0,50	0,16	0,16 $\pm 0,02$	0,13 $\pm 0,01$	0,26 $\pm 0,03$	0,25 $\pm 0,04$	0,21 $\pm 0,01$	0,17 $\pm 0,01$	0,14 $\pm 0,01$	0,13 $\pm 0,01$
$K_m^{\text{ОГ}}$, мМ	0,53	0,45	0,55 $\pm 0,09$	0,39 $\pm 0,05$	0,94 $\pm 0,16$	0,99 $\pm 0,19$	0,76 $\pm 0,05$	0,54 $\pm 0,03$	0,46 $\pm 0,04$	0,38 $\pm 0,03$
$K_i^{\text{ОГ}}$, мМ	0,02	0,01	1,0 $\pm 0,18$	1,7 $\pm 0,25$	0,4^a $\pm 0,07$	0,5^b $\pm 0,10$	0,9 $\pm 0,06$	1,5 $\pm 0,09$	1,8^a $\pm 0,17$	2,3^b $\pm 0,18$
IC_{50}^{GTP} , нМ	0,02	0,63	87 ± 15	126 ± 23	88^d ± 16	178^d ± 37	93^e ± 13	151^e ± 27	75 ± 12	118 ± 36
Амплитуда ингибирования GTP, $\mu\text{кмоль}/\text{мин}/\text{мг}$	0,03	0,12	0,027 $\pm 0,001$	0,027^c $\pm 0,001$	0,03 $\pm 0,001$	0,031 $\pm 0,001$	0,029 $\pm 0,001$	0,031^c $\pm 0,001$	0,03 $\pm 0,001$	0,031 $\pm 0,001$
EC_{50}^{ADP} , мкМ	0,23	0,74	80 ± 15	88 ± 22	68 ± 8	88 ± 14	61^f ± 4	93^f ± 13	78 ± 11	81 ± 18
Амплитуда активации ADP, $\mu\text{кмоль}/\text{мин}/\text{мг}$	0,05	0,05	0,09 $\pm 0,01$	0,1 $\pm 0,01$	0,08 $\pm 0,01$	0,09 $\pm 0,01$	0,09^g $\pm 0,01$	0,11^g $\pm 0,01$	0,1 $\pm 0,01$	0,11 $\pm 0,01$

Таким образом, наши исследования (Рис. 13, Таблица 12) указывают на суточные изменения в восприимчивости ГДГ мозга к ацетилированию *in vitro* и ее регуляторам. Введение тиаминa *in vivo* влияет на эту способность ГДГ к регуляции.

Схематично полученные данные суммированы на Рисунке 14. Так, ГДГ в головном мозге крысы более ацетилирована утром, чем вечером. Тиамин снижает ацетилирование ГДГ утром и увеличивает – вечером. Активность ГДГ выше вечером как с введением тиаминa, так и без него, но в контрольных группах это происходит из-за более высокой активации ADP, а в группах с тиамином – из-за более низкого ингибирования 2-оксоглутаратом (Рис. 14).

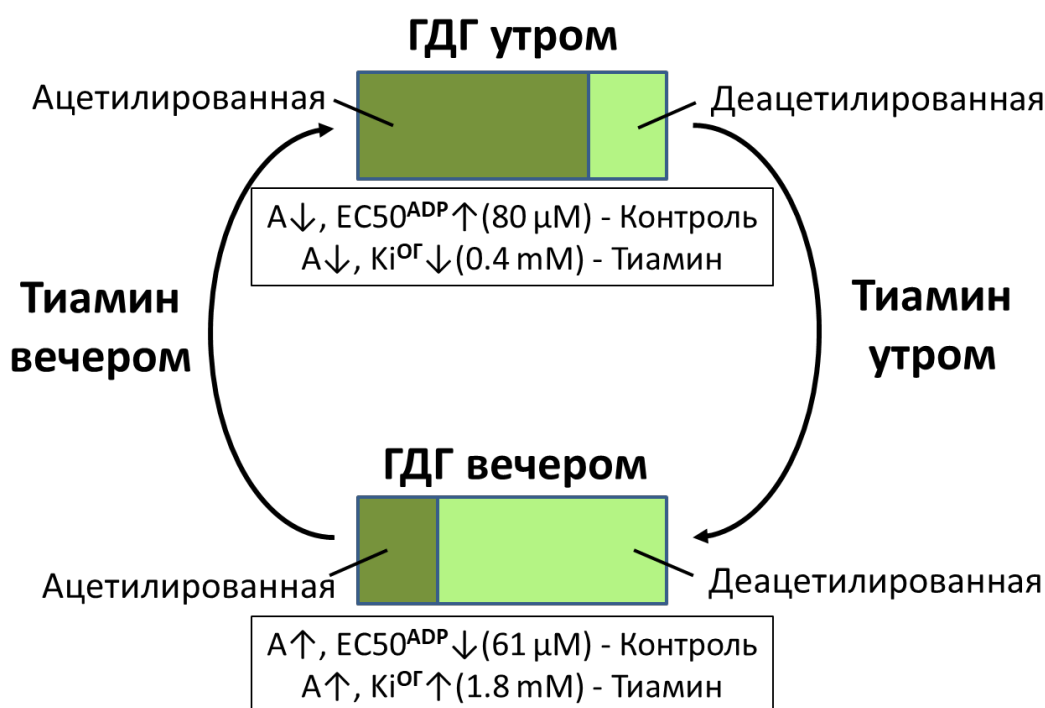


Рис. 14. Схема суточной регуляции ГДГ головного мозга крыс ацетилированием и тиамином. Показаны основные меняющиеся параметры аппроксимации зависимостей, изображенных на Рис. 13, активность ГДГ – «А». ОГ – 2-оксоглутарат. Данные о более высоком ацетилировании ГДГ утром, чем вечером – согласно Рис. 12 [8].

Согласно структурным данным, среди остатков лизина, непосредственно участвующих в связывании глутамата и 2-оксоглутарата имеется два ацетилируемых сайта – K171 и K183 (Рис. 15). Из них ацетилирование K171 нарушит (за счет стерического фактора и нейтрализации заряда) связывание глутамата/2-оксоглутарата. Влияние ацетилирования K183 не так однозначно. Поскольку связывание аминокислотной группы глутамата может быть затруднено при наличии положительного заряда на K183 (Рис. 15 б), теоретически, его

ацетилирование может улучшать связывание глутамата. В ходе наших МС-исследований ГДГ мозга крыс, в отдельных случаях удавалось детектировать пептид, содержащий ацетилированный K183 (данные не представлены), что говорит о биологической значимости ацетилирования K183 ГДГ в мозге, но низкий уровень детекции не позволял провести количественную оценку, в отличие от ацетилирования K503, K187 и K84. Из последних, к регуляции связывания 2-оксоглутарата может иметь отношение близко расположенный K187 (Рис. 16).

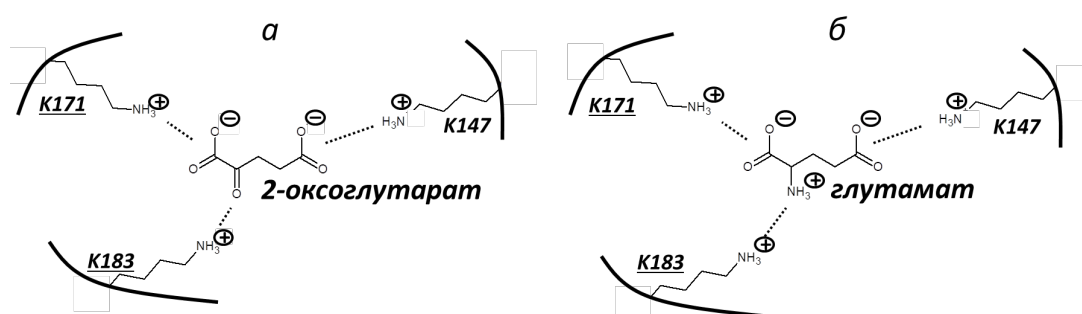


Рис. 15. Предполагаемый механизм регуляции связывания 2-оксоглутарата (а) или глутамата (б) с ГДГ путем ацетилирования остатков лизина в активном центре. Боковые цепи остатков лизина показаны в соответствии со структурами 1HWY (а) и 3ETD или 6DHD (б). Ацетилируемые лизины подчеркнуты [8].

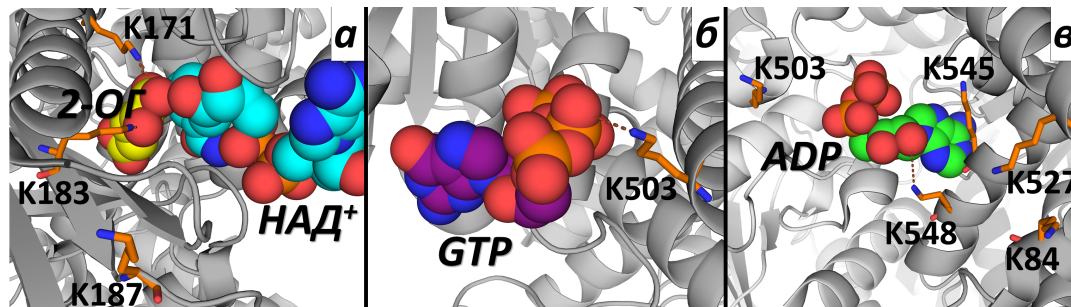


Рис. 16. Известные лиганд-связывающие центры ГДГ с показанными ацетилируемыми остатками лизина. Атомы углерода ацетилируемых остатков лизина показаны оранжевым, 2-оксоглутарата (2-ОГ) — желтым, НАД — циановым, GTP — фиолетовым, ADP — зеленым, неуглеродные атомы покрашены по стандартной цветовой схеме. а — субстрат-связывающий центр (PDB ID: 1HWY), б — GTP-связывающий центр (PDB ID: 3HWZ), в — ADP-связывающий центр (PDB ID: 1NQT) [8].

Таким образом, мы показали участие тиамина *in vivo* в регуляции ацетилирования ГДГ в зависимости от времени суток в мозге крыс. Механизм регуляции активности и кинетических свойств ГДГ мозга в отношении 2-оксоглутарата, ADP и GTP включает ацетилирование остатков ГДГ K503, и, возможно, K187. Для уточнения роли ацетилирования других остатков, в частности

при регуляции связывания ADP, нами был проведен собственный рентгеноструктурный анализ (РСА) ГДГ быка.

4.4.2. Изучение механизмов регуляции глутаматдегидрогеназы быка тиамином и его производными с помощью рентгеноструктурного анализа

Существует немало структур ГДГ с GTP, но, например, с ADP доступна лишь модель с невысоким разрешением (3,5Å). Для лучшего понимания механизма регуляции ГДГ ацетилированием мы провели рентгеноструктурный анализ (РСА) ГДГ быка с лигандами: ADP, ТТФ и другими. РСА ГДГ с ТТФ помог бы установить сайт связывания производных тиамин с ГДГ. Было проведено несколько серий экспериментов по кристаллизации ГДГ совместно с тиамином или его производными – ТДФ или ТТФ в различных условиях. Работа велась при непосредственном участии соискателя на всех стадиях, в рамках совместного проекта в лаборатории структурной микробиологии института Пастера (Париж, Франция) и дистанционно. Рост кристаллов занимал от 14 дней, но большая часть из них начинала образовываться лишь через месяц, достигая достаточного размера по истечении двух месяцев. Удалось получить 16 наборов данных (датасетов) с хорошим разрешением (Таблица 13). К сожалению, ни в одном из полученных наборов данных не удалось обнаружить ТТФ (главное исследуемое тиаминное производное при кристаллизации с ГДГ), тиамин или ТДФ. Возможная причина – длительное время роста кристаллов ГДГ, за которое происходит значительный гидролиз ТТФ. Нельзя исключить и деградацию тиамин (а также ТТФ и ТДФ) в условиях кристаллизации: тиамин и его производные окисляются кислородом, а в случае pH более 7,5 (верно для части условий при скрининге) происходит раскрытие тиазольевого кольца.

Таблица 13. Главные наборы данных, полученные при кристаллизации ГДГ.

Данные №	Лиганды при кристаллизации	Кристаллографическая группа	Параметры кристаллической ячейки	Разрешение, Å	Связанные Лиганды
3	Тиамин	P4 ₁ 2 ₁ 2	123,409 123,409 587,326 90 90 90	2,81	–
4	НАДФН+Glu+ GDP-βS	P 2 ₁	122,797 102,572 170,319 90,00 101,98 90,00	2,49	NADPH + Glu + GDP-βS
5	ТТФ+GTP	P4 ₁ 2 ₁ 2	121,804 121,804 581,175 90 90 90	4,20	–
6	ТТФ	P 2 ₁	99,410 153,379 122,836 90,00 109,68 90,00	3,54	–
10	Leu+ТТФ+ADP	P1	87,435 92,440 119,399 99,089 106,729 110,036	3,29	ADP + Leu
11	Leu+ТТФ+ADP	P1	89,043 90,343 114,649 99,42 105,46 108,95	3,63	ADP
12	Leu+ТТФ+ADP	P 2 ₁	90,834 178,575 123,818 90,00 104,00 90,00	2,44	ADP + Leu + K
13	Leu+ТТФ+ НАДФ	P1	87,644 92,171 119,750 99,349 106,727 109,726	2,50	–
14	Leu+ТДФ	P1	85,340 90,652 117,525 99,690 106,603 109,759	3,34	–
15	ТТФ+ADP	P1	86,750 92,140 118,940 99,307 106,432 109,971	3,00	ADP
16	Leu+ТТФ	P1	90,672 92,319 116,801 100,040 105,329 109,475	3,38	–
18	ТТФ+ADP	P4 ₁ 2 ₁ 2	123,679 123,679 592,217 90 90 90	3,20	ADP
19	ТТФ+ADP	P1	87,503 92,004 119,045 99,538 106,641 110,231	2,68	ADP
20	ТТФ+ADP	P1	90,620 93,524 117,658 100,954 104,979 109,257	3,29	ADP
21	Leu+ТТФ	P1	87,597 92,457 119,440 99,808 106,818 109,622	2,55	–
22	ТТФ+ADP	P1	87,488 91,985 119,530 99,338 106,733 109,733	2,25	ADP

Несмотря на то, что локализовать место связывания тиамина или его производных в структуре ГДГ не удалось, получены косвенные данные о взаимодействии тиаминовых соединений с ГДГ. Так, при кристаллизации ГДГ в присутствии тиамина и ТДФ впервые получены кристаллы данного белка с кристаллографической группой P4₁ 2₁ 2 (Таблица 13) – это новый вариант кристаллографической группы, дополняющий два ранее известных для ГДГ

млекопитающих варианта. Кроме того, лишь в отсутствие тиамина или его производных в среде кристаллизации были получены кристаллы ГДГ в так называемой закрытой конформации (кристалл с НАДФН, глутаматом и негидролизуемым аналогом гуанозинового нуклеотида, GDP- β S, см. Таблицу 13, набор данных №4), тогда как кристаллы, сформированные в присутствии тиаминовых соединений, имели открытую конформацию ГДГ. Таким образом, наличие тиамина или его производных в условиях кристаллизации стабилизирует открытую конформацию ГДГ и может способствовать росту кристаллов ГДГ с кристаллографической группой $P4_1 2_1 2$ (Таблица 13). Эти результаты согласуются со связыванием тиамина и/или производных с ГДГ, показанным кинетическими методами [2].

Наши данные позволили существенно улучшить разрешение кристалла ГДГ с ADP – с 3,5 Å (1NQT и 6DHK) до 2,25 Å (Таблица 13, набор данных №22). Важно, что для ГДГ млекопитающих, которая характеризуется наличием так называемых «антенн», в принципе не известно кристаллов с разрешением менее 2,3 Å (6DHQ). Полученные нами кристаллы позволили улучшить понимание молекулярных механизмов связывания ADP с ГДГ. Структура этого комплекса была использована в нашей работе для изучения механизмов влияния ацетилирования ГДГ на связывание ADP (Рис. 17).

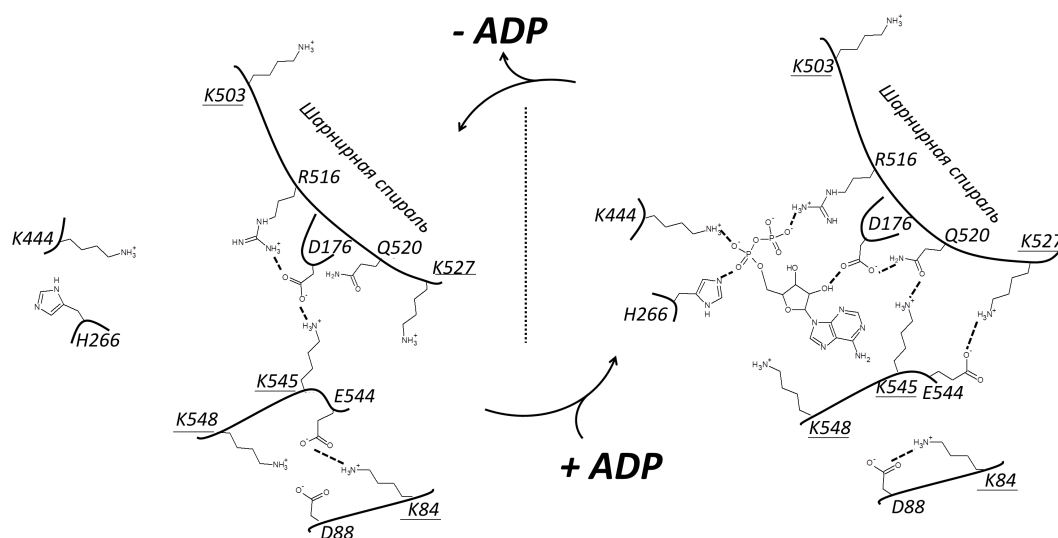


Рис. 17. Механизм связывания ADP с ГДГ. Регулируемые ацетилированием остатки лизина подчеркнуты. Боковые цепи остатков и их взаимодействия показаны в соответствии со структурами 3ETD (без ADP) и нашими данными (с ADP) [8].

Так, оказалось, что ацетилируемый остаток K548 не взаимодействует с ADP. Однако при связывании ADP происходит встраивание остатка Q520 в солевой мостик между K545 и D176, что, по-видимому, происходит из-за участия т.н. «шарнирной спирали» ГДГ в связывании ADP (например, через остаток R516). Наши данные указывают на участие D176 в связывании 2'-гидроксила ADP (Рис. 17), и таким образом, ацетилирование K545 может нарушать связывание ADP за счет дестабилизации солевого мостика K545-Q520-D176. Схема включает взаимодействие H266 с α -фосфатом ADP, но этот же остаток может участвовать в связывании фосфатов GTP в GTP-центре ГДГ, что видно на примере структур 3ETD и нашего набора данных №4 с GDP- β S в GTP-центре. Таким образом, за счет H266 может осуществляться прямое взаимодействие аллостерических центров активатора ADP и ингибитора GTP, стабилизирующих открытую и закрытую конформации фермента, соответственно. В регуляции связывания ADP и взаимодействии его со связыванием GTP может участвовать остаток GTP-связывающего центра K503 (Рис. 16).

Нами впервые закристаллизован лейцин в структуре ГДГ млекопитающих (Таблица 13, набор данных №12). Сайт связывания совпал с предположенным ранее вариантом [164], но реальные данные с разрешением 2,44 Å позволяют установить роль всех участвующих в связывании лейцина остатков. Наибольший интерес представляет регуляция связывания лейцина ацетилированием. Оказалось, что связывание лейцина в ГДГ зависит от ацетилирования остатка K200, стабилизирующего С-конец ГДГ, участвующий в образовании кармана для связывания лейцина (Рис. 18). Полученная информация о связывании лейцина ГДГ имеет большое значение для будущих исследований.

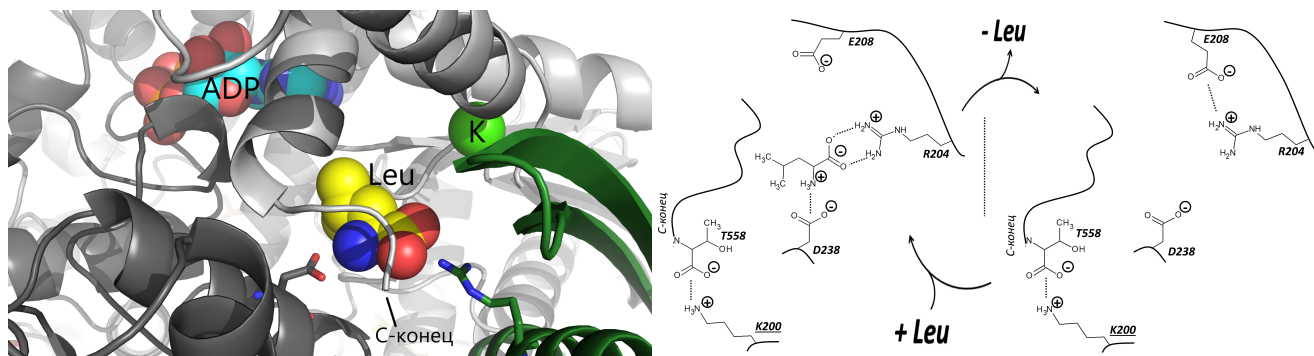


Рис. 18. Модель ГДГ в комплексе с ADP, лейцином и калием и схема связывания лейцина. Все лиганды показаны с помощью шариков, также показаны остатки, принимающие участие в связывании лейцина (Leu). Три разные цепи ГДГ, составляющие вместе сайт связывания лейцина, показаны зеленым, светло- и темно-серым. Схема связывания лейцина: ацетилируемый лизин K200 связывает С-концевую карбокси-группу T558 ГДГ.

4.5. Механизмы защитного действия тиамина в нервной ткани в моделях нейропатологий

4.5.1. Глутаматдегидрогеназа как мишень действия тиамина при травме спинного мозга

Тяжелая травма спинного мозга, как и черепно-мозговая травма, вызывает долгосрочные последствия, включающие снижение когнитивных функций и депрессивное поведение, которые, как известно, сопровождают нейродегенеративные процессы в ЦНС [165-169]. Нейровоспаление может объединять разные типы повреждения ЦНС и вызывать психические расстройства, поскольку все эти явления связаны с активацией микроглии [170-173] и нарушением регуляции цитокинов [174-177]. Воспаление тесно связано с нарушением функции митохондрий, как и сам иммунный ответ. Однако модели травмы спинного мозга менее охарактеризованы, чем модели, например, черепно-мозговой травмы, а большинство исследований спинномозговой травмы сосредоточено на функции лишь спинного мозга. При этом нарушения обмена веществ в удаленной от зоны травмы области ЦНС остаются без внимания. В

** При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Boyko A, Tsepkova P, Aleshin V, Artiukhov A, Mkrtchyan G, Ksenofontov A, Baratova L, Ryabov S, Graf A & Bunik V (2021) Severe spinal cord injury in rats induces chronic changes in the spinal cord and cerebral cortex metabolism, adjusted by thiamine that improves locomotor performance. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14:620593 (вклад 0,3/1,38 ПЛТ).*

нашей работе исследованы долгосрочные изменения регуляции метаболизма, вызванные спинномозговой травмой, не только в спинном мозге, но и в коре головного мозга крыс. Мы предположили, что нарушение метаболизма головного мозга после тяжелой травмы ЦНС в спинном мозге в значительной степени способствует хроническим последствиям травмы, а фармакологическая коррекция метаболизма с помощью тиамина может облегчить эти последствия. ГДГ является одним из ключевых ферментов метаболизма мозга, участвуя в метаболизме нейромедиаторов: глутамата и ГАМК. Учитывая обнаруженную роль тиамина при влиянии на ГДГ, в том числе через ацетилирование, мы исследовали регуляцию ГДГ и в данной модели.

Оказалось, что последствия травмы (через 8 недель после повреждения спинного мозга) сопровождаются тенденцией ($p = 0,08$) к снижению ГДГ на 20% в спинном мозге, где активность ГДГ характеризуется средними значениями $2,3 \pm 0,2$ и $1,8 \pm 0,1$ мкмоль/мин на грамм ткани у животных с ламинэктомией и травмой, соответственно (Рис. 19 а). Схожим образом, активность ГДГ снижена на 20% ($p = 0,07$) и в коре головного мозга – с $1,3 \pm 0,1$ до $1,1 \pm 0,1$ мкмоль/мин на грамм ткани в группе травмы, по сравнению с ламинэктомией (Рис. 19 а). Таким образом, небольшие долговременные последствия для метаболизма мозга (на уровне ГДГ) наблюдаются даже через 8 недель после травмы, причем не только в поврежденном спинном, но и в головном мозге, что говорит об общей регуляции ГДГ в ЦНС в целом при травматическом повреждении.

В то же время наблюдали, что однократное введение высокой (400 мг/кг) дозы тиамина в течение 24 часов после травмы приводило к более высокому уровню активности ГДГ ($p \leq 0,05$) в обоих отделах ЦНС через 8 недель после спинномозговой травмы (Рис. 19 а). Тиамин специфично повышал активность ГДГ у крыс с травмой, но не повышал активность ГДГ у крыс с ламинэктомией (Рис. 19 а). Эту специфичность подтверждает и достоверное ($p \leq 0,001$) взаимодействие факторов травмы и тиамина при двухфакторном дисперсионном анализе данных, представленных на Рис. 19 а, как в спинном, так и в головном мозге. Такая

специфичность действия тиамин говорит о его непосредственном участии в механизмах ответа на травматическое повреждение в нервной ткани.

Для анализа механизма действия тиамин оценивали его участие в регуляторном ацетилировании ГДГ у животных с травмой спинного мозга. Исследование проводилось на образцах коры головного мозга, где эффект тиамин на активность ГДГ проявлялся сильнее (Рис. 19). Действительно, действие тиамин в мозге крыс после травмы сопряжено с увеличением ацетилирования остатка K503 ГДГ (Рис. 19 б). Уровень белка ГДГ и ацетилирование другого лизина K415 не менялся. (Рис. 19 б). Поскольку K503 расположен в сайте связывания GTP, индуцированное тиамином повышение ацетилирования K503 представляет молекулярный механизм, способный увеличить активность ГДГ у животных с травмой спинного мозга за счет ослабления ингибирования GTP (Рис. 19).

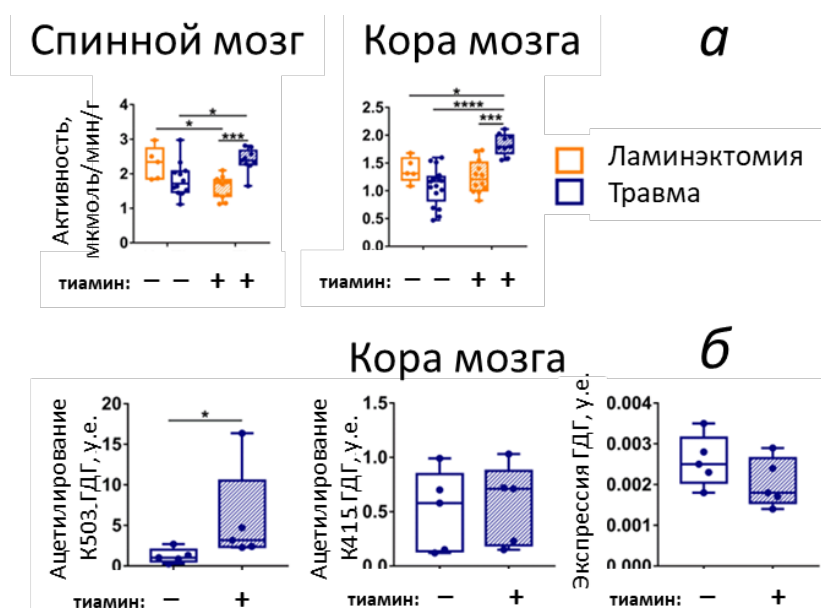


Рис. 19. Регуляция ГДГ при послеоперационном введении тиамин при спинномозговой травме и ламинэктомии у крыс. (а) активность ГДГ в спинном мозге и коре головного мозга; (б) ацетилирование остатков ГДГ K503, K415 и экспрессия ГДГ в коре мозга крыс с после травмы. Статистическая значимость оценивалась с помощью критерия Манна-Уитни. Р-значения указаны согласно обозначениям: * $\leq 0,05$, *** $\leq 0,001$, **** $< 0,0001$. Тиамин (400 мг/кг) вводился внутривенно в течение 24 ч после операции. Каждая точка на графике соответствует отдельному животному [10].

Долговременная регуляция ГДГ в коре головного мозга после спинномозговой травмы указывает на существенные изменения в энергетическом метаболизме, контролируемом в том числе транскрипционным фактором p53, который, например, увеличивается после церебральной ишемии, усиливая апоптоз

нейронов [178]. Мы измерили уровень p53 и его ацетилированной формы в экспериментальных группах крыс, а также оценили уровень основных митохондриальных деацилаз – сиртуина 3 и сиртуина 5.

Как видно из Рисунка 20, ламинэктомия вызывает снижение общего и ацетилированного по K380 p53, по сравнению с контрольными крысами. Введение тиаминa ослабляет этот эффект (Рис. 20 а). У животных с травмой спинного мозга введение тиаминa вызывает пропорциональное снижение ацетилированного и общего p53 (Рис. 20 а). Пропорциональность следует из постоянства соотношения ацетил-p53/p53 (Рис. 20 а), хотя лишь для уровня ацетил-p53 снижение, индуцированное тиамином, достигает статистической значимости (Рис. 20 а).

Постоянство уровня ацетилирования p53 и отсутствие изменений в уровне деацетилазы сиртуина 3 (данные не показаны) указывают на стабилизацию системы ацетилирования через 8 недель после травмы. Однако различия между группами наблюдаются в уровне десукцинилазы/деглутарилазы сиртуина 5 (Рис. 20 б). Главный из наблюдаемых эффектов заключается в том, что введение тиаминa не влияет на уровень сиртуина 5 у контрольных животных и животных с ламинэктомией, но специфично увеличивает сиртуин 5 у животных с травмой спинного мозга (Рис. 20 б).

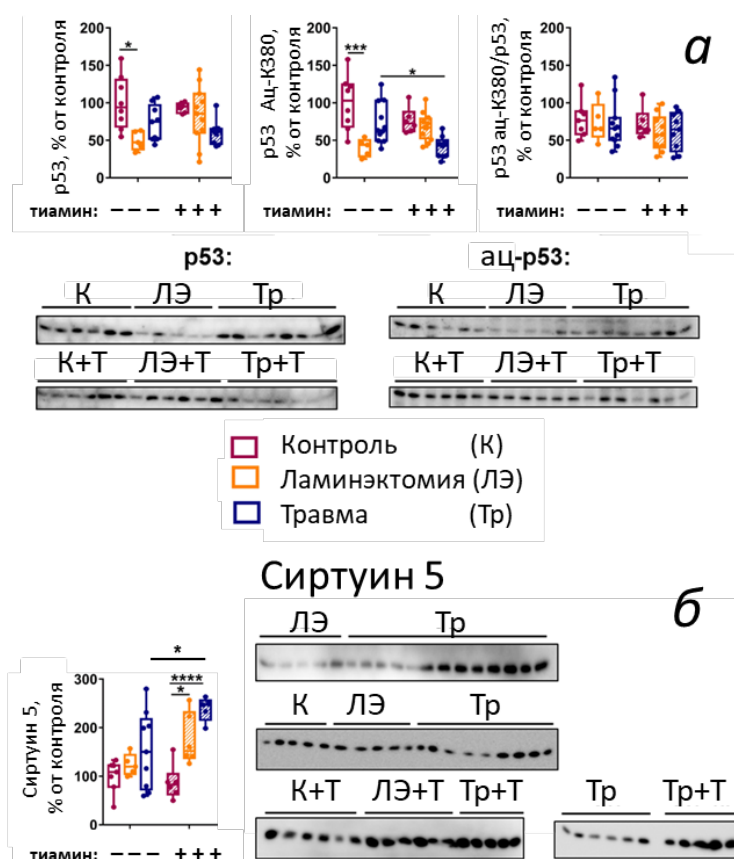


Рис. 20. Эффект тиамина на экспрессию общего или ацетилированного p53 (а) и сиртуина 5 (б) в коре головного мозга крыс. Данные для различных групп животных выражены в процентах от значений, определенных для неоперированных крыс (контроль). Статистическая значимость оценивалась с помощью ANOVA и теста Тьюки. Р-значения указаны согласно обозначениям: * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$, *** $\leq 0,001$, **** $< 0,0001$. Каждая точка на графике соответствует данным, полученным от одного животного [10].

Учитывая данные о нейропротекторном действии сиртуина 5 в условиях ишемии головного мозга [179] и роль сиртуина 5 в гомеостатических перестройках, связанных с хроническим воспалением после травмы спинного мозга [180], выявленный рост сиртуина 5 в результате введения тиамина после травмы спинного мозга в нашей модели может быть частью нейропротекторного действия тиамина.

4.5.2. Совместное введение тиамина и пиридоксала снижает активность пиридоксалькиназы в модели эпилепсии*

* При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Graf AV, Artiukhov AV, Boyko AI, Ksenofontov AL, Maslova MV, Nogues I, di Salvo ML & Bunik VI (2021) Physiological and Biochemical Markers of the Sex-Specific Sensitivity to Epileptogenic Factors, Delayed Consequences of Seizures and Their Response to Vitamins B1 and B6 in a Rat Model. *Pharmaceuticals* 14(8):737 (1,44/0,6). (вклад 0,6/1,44 ПЛ).

Возможность витамина В1 регулировать активность ПЛК, фермента метаболизма витамина В6, *in vivo* может применяться для коррекции связанных с В1 и/или В6 патологий. Ряд эпилепсий, называемых витамин-зависимыми, относится к редким нарушениям, вызванным мутациями в генах метаболизма витаминов В1 и В6 [181-183].

Хотя роль витаминов в эпилепсии остается плохо изученной, ряд ферментов, участвующих в метаболизме глутамата и ГАМК, меняется при эпилепсии. К ним относятся не только известные мишени витамина В6 (трансаминазы и декарбоксилазы), но и ферменты, регулируемые витаминами В1, например, глутаматдегидрогеназа (ГДГ), глутаминсинтетаза и другие. Субклинический гиповитаминоз В1 или В6 может возникать у пациентов, получающих лечение широко используемыми лекарствами, включая противосудорожные препараты [184-186], потенциально способствуя развитию немоногенной эпилепсии. Следовательно, при нарушении метаболизма витаминов, приобретенном или вызванном генетическими дефектами, прием витаминов В1 и/или В6 может смягчить эпилептические припадки и их долгосрочные последствия.

Эффект совместного введения тиамина и пиридоксала (В1 + В6) на последствия эпилептического приступа исследовали на модели с использованием пентилентетразола (ПТЗ). Связываясь с одним из сайтов хлоридного канала рецептора ГАМК-А, ПТЗ вызывает дисбаланс между возбуждающими и тормозными путями нейротрансмиссии [187-190]. Витамины В1 и В6 вводили совместно, поскольку ожидали, что комбинация витаминов окажет лучший эффект. Введение производилось за 0,5-24 часа до эпилептического приступа и сразу после него. Анализ биохимических последствий производился через 24 часа после приступа.

Влияние введения витаминов В1 и В6 на силу эпилептического приступа проявляется в первую очередь у самок. Было обнаружено ингибирование ПЛК при введении витаминов за 24 часа до приступа ($p < 0,07$), бывшее сильнее ($p = 0,05$) при сравнении животных с краткосрочным (за 0,5 ч) и заблаговременным (за 24 ч) введением витаминов (Рис. 21). При краткосрочном введении ПЛК за 0,5 ч до ПТЗ

приступ усилился, вызвав смерть от эпилепсии у 2 из 5 животных, поэтому группу с краткосрочным введением решено было не увеличивать. Защитное действие витаминов при приступе наблюдалось при введении витаминов за 24 часа, но не за 2 или 0,5 часа до ПТЗ. Это соответствует снижению активности ПЛК при заблаговременном (24 ч) введении витаминов, которое достоверно ниже, чем активность ПЛК после краткосрочного введения витаминов (Рис. 21).

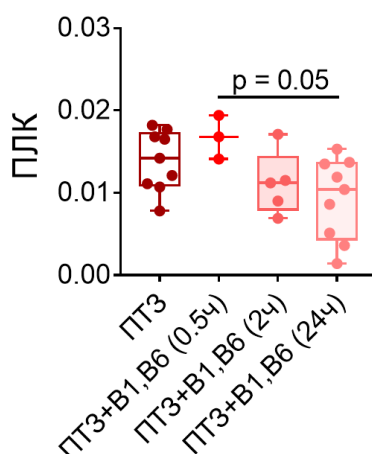


Рис. 21. Влияние введения витаминов B1 и B6 в зависимости от времени перед эпилептическим приступом на активность ПЛК (мкмоль/мин/г ткани) коры мозга крыс через 24 часа после индуцированного ПТЗ приступа. Каждая точка на графике соответствует данным, полученным от одного животного. Параметры активности дегидрогеназ глутамата, малата, 2-оксоглутарата, пирувата, 2-оксоадипата, трансаминаз аланина и аспартата, пиридоксинфосфатоксидазы не показаны – отличий в их активности между группами выявлено не было. Статистический анализ выполнен с помощью однофакторной ANOVA с тестом Тьюки [9].

Таким образом, полученные данные о регуляции активности ПЛК тиамином и его производными *in vitro* и *in vivo* позволили предположить положительный эффект тиамин в эпилепсии. В животной модели эпилептического приступа обнаружена регуляция активности ПЛК мозга крыс при введении тиамин и пиридоксаль, изменение которой соответствовало защитному действию витаминов у самок крыс. Механизм такого действия нуждается в дальнейшем изучении, но, учитывая данные о регуляции ПЛК тиамином, он может включать как прямое связывание тиамин или его фосфо-производных, так и фосфорилирование ПЛК.

4.6. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ТИАМИНА, ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ И АНТАГОНИСТОВ В КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ*

В связи с показанным связыванием ТДФ и p53 и ролью p53 для регуляции энергетического метаболизма и в качестве онкосупрессора, мы исследовали действие тиамина, окситиамина и ТДФ в раковых клеточных линиях.

4.6.1. Перестройка метаболизма 2-оксoglутарата/глутамата лежит в основе зависимой от тиамина и p53/p21 регуляции жизнеспособности клеток A549

Некоферментное действие тиамина важно при регуляции клеточного метаболизма. Так, ТДФ способен напрямую взаимодействовать с ключевым регулятором транскрипции p53 и подавлять его активность [3]. Чтобы установить зависимость эффекта тиамина или ТДФ на жизнеспособность и клеточный метаболизм от p53 и сигнального пути p53-p21, мы использовали линии аденокарциномы легкого A549 – контрольную и с конститутивным нокдауном p21 (A549^{WT} и A549^{p21-}, соответственно).

В клетках A549^{p21-} экспрессия p21 снижена на 60% (Рис. 22 а). При культивировании в стандартной среде уровень p53 не отличается от клеток дикого типа (Рис. 22 б). Скорость роста и морфология клеток A549^{p21-} несколько отличается от клеток A549^{WT}, но что более важно, наблюдается разница в устойчивости к цисплатину (Рис. 22).

Известна потребность в p21 для противоопухолевого действия цисплатина [191], в соответствии с чем, эффект от 5 мкМ цисплатина на жизнеспособность клеток A549^{p21-} составлял лишь $11 \pm 1\%$, тогда как жизнеспособность A549^{WT} в тех же условиях падала на $42 \pm 2\%$ (Рис. 22 д).

* При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Bunik VI, Aleshin VA, Zhou X, Tabakov VY, Karlsson A. (2020) Activation of Mitochondrial 2-Oxoglutarate Dehydrogenase by Cocarboxylase in Human Lung Adenocarcinoma Cells A549 Is p53/p21-Dependent and Impairs Cellular Redox State, Mimicking the Cisplatin Action. *Int J Mol Sci.* 21(11):3759. (вклад 0,6/1,44 ПЛ). Bunik VI, Aleshin VA, Zhou X, Krishnan S, Karlsson A. (2020) Regulation of Thiamine (Vitamin B1)-Dependent Metabolism in Mammals by p53. *Biochemistry (Mosc).* 85(7):801-807 (вклад 0,2/0,44 ПЛ). Aleshin VA, Zhou X, Krishnan S, Karlsson A, Bunik VI. (2021) Interplay Between Thiamine and p53/p21 Axes Affects Antiproliferative Action of Cisplatin in Lung Adenocarcinoma Cells by Changing Metabolism of 2-Oxoglutarate/Glutamate. *Front Genet.* 12:658446 (вклад 0,35/0,8 ПЛ).

Однако такой «защитный» эффект нокдауна p21 от цисплатина не наблюдается в условиях тиаминового дефицита (Рис. 22 е), когда жизнеспособность как клеток A549^{WT}, так и A549^{p21-}, составляет лишь половину от жизнеспособности клеток с нормальным уровнем тиамина в среде (Рис. 22 е). В результате нокдаун p21 снижает чувствительность клеток A549 к цисплатину в среде с добавлением тиамина, но повышает ее в условиях тиаминового дефицита (Рис. 22 д,е).

Удлиненная форма клеток A549^{p21-}, по сравнению с A549^{WT} (Рис. 22 ж) похожа на эпителиально-мезенхимальный переход, снижающий чувствительность к цисплатину [192-196], что также наблюдается в наших экспериментах (Рис. 22 д).

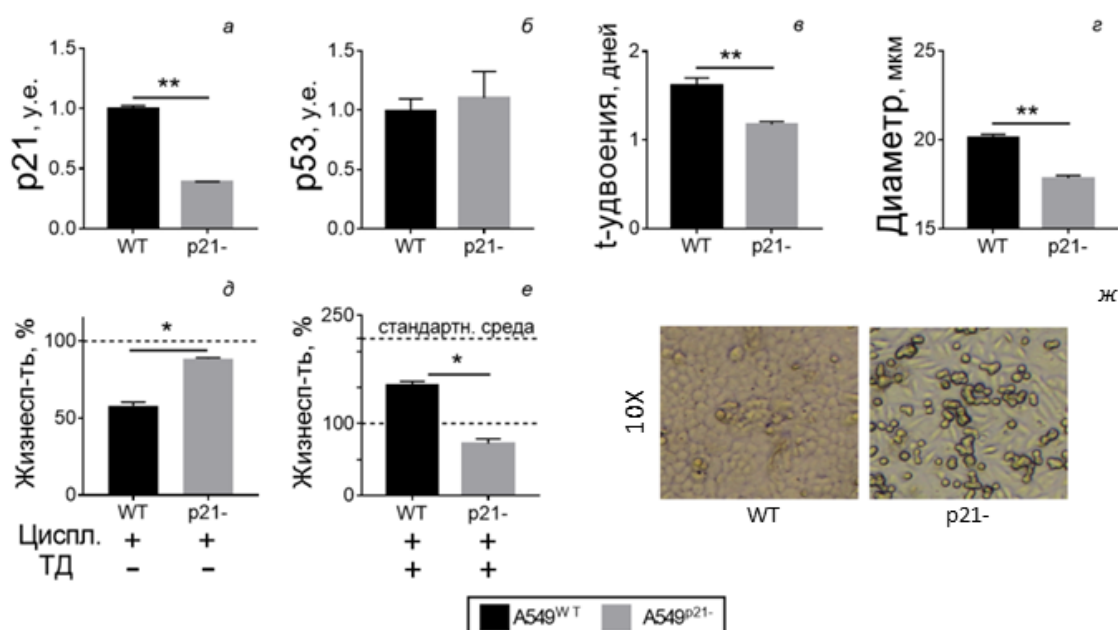


Рис. 22. Изменения в клетках A549 при нокдауне p21. **а** – экспрессия мРНК p21, **б** – уровень белка p53, **в** – время удвоения в логарифмической фазе роста, **г** – диаметр открепленных клеток, **д** – жизнеспособность клеток после 24 часов инкубации с 5 мкМ цисплатином в стандартной среде, **е** – жизнеспособность клеток после 24 часов инкубации с 5 мкМ цисплатином в среде с дефицитом тиамина (ТД), **ж** – морфология клеток A549^{WT} и A549^{p21-}, стандартная среда, 6 дней. Жизнеспособность оценивалась по активности НАД(Ф)Н:ХТТ редуктазы и нормировалась на контроль без цисплатина в стандартной (**д**) и ТД среде (**е**). Значения представлены как среднее $\pm$ SEM по трем независимым экспериментам. Статистическая значимость определена по критерию Манна-Уитни [100, 197].

Влияние ТДФ на клетки и на p53 изучали, варьируя уровень ТДФ. Использовали клетки с нормальным уровнем тиамина/ТДФ, клетки, выращенные в условиях тиаминового дефицита (ТД) и с повышенным содержанием ТДФ. Для ускоренной доставки последнего через соответствующие транспортеры клетки A549 инкубировали непосредственно с ТДФ.

В качестве индикатора насыщения клеток ТДФ использовали насыщение ТДФ-зависимого ОГДК (Рис. 23), который прочно связывает ТДФ, не теряя кофермент при очистке [198]. При этом клетки A549^{wt} и A549^{p21-} обладали разной способностью насыщаться ТДФ при инкубации с 5 мМ ТДФ в нормальной среде (Рис. 23). Так, лишь в A549^{wt} уровень холофермента ОГДК существенно возрастает от добавления внешнего ТДФ, что коррелирует с их способностью использовать добавленный ТДФ для повышения жизнеспособности (ХТТ-тест) при тиаминном дефиците (Рис. 23). То есть, клетки A549^{wt} способны лучше, чем клетки A549^{p21-}, усваивать ТДФ и использовать его для перестройки метаболизма как в норме, так и в условиях тиаминного дефицита.

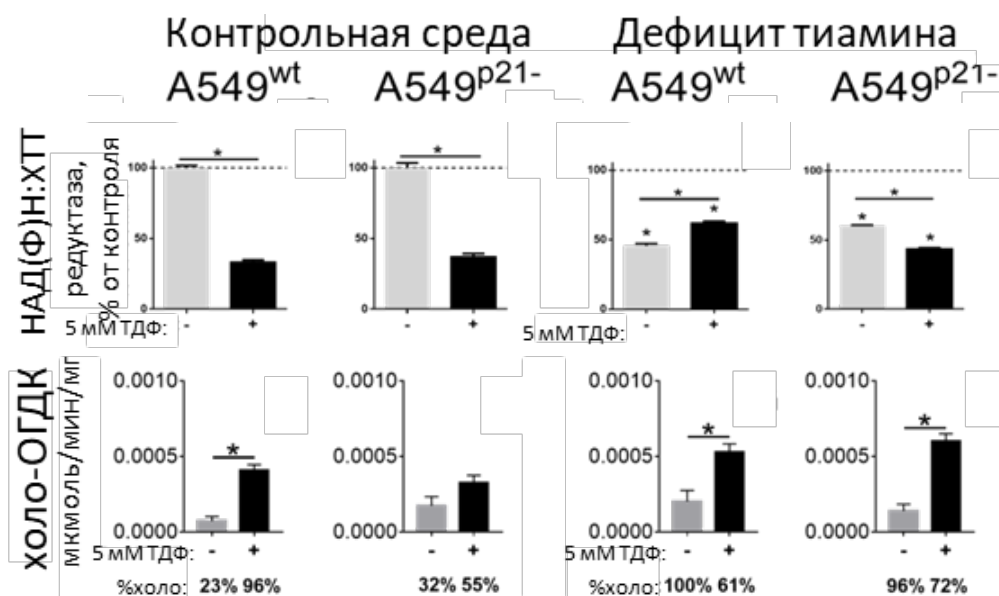


Рис. 23. Влияние нокдауна p21 на способность ОГДК к насыщению ТДФ и клеточную изменение жизнеспособности клеток в зависимости от уровня ТДФ. Жизнеспособность измеряли по НАД(Ф)Н:ХТТ-редуктазе. Клетки культивировали в среде DMEM с 4 мг/л тиамин (контроль) или без тиамин (дефицит тиамин). Через 24 ч среду меняли на среду без (серые столбцы) или с 5 мМ ТДФ (черные столбцы). Данные по крайней мере трех независимых экспериментов представлены как средние значения $\pm$ SEM. * - $p < 0,05$ [100].

Физиологические и морфологические различия клеток A549^{WT} и A549^{p21-} сопровождаются значительными метаболическими изменениями (Рис. 24). Выбор ферментов, представленных на рисунке, основан на результатах наших коллег, которые связывают подавление p21 с нарушением транспорта дикарбоксилатов в митохондрии [199, 200].

Из тестируемых ферментов, ГДГ больше всего подвержена влиянию нокдауна p21, демонстрируя 6-кратное снижение активности в клетках A549^{p21-}, по сравнению с клетками A549^{WT} (Рис. 24 а). Снижение активности ГДГ, продуцирующей 2-оксоглутарат из глутамата, сопровождается значительным снижением активности метаболически связанных дегидрогеназ, таких как НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (ИЦДГ, кодируется генами *IDH1* и *IDH2*) и дегидрогеназы малата: декарбоксилирующий НАДФ-зависимый яблочный (малик) фермент (МФ, кодируется генами *ME1*, *ME2* и *ME3*) и НАД-зависимая малатдегидрогеназа (МДГ, кодируется *MDH1* и *MDH2*) (Рис. 24).

Измеренные активности МДГ, ИЦДГ и МФ в клеточных лизатах характеризуют общее влияние нокдауна p21 на реакции превращения соответствующих метаболитов. Снижение общей активности МДГ и ИЦДГ после нокдауна p21 указывает на то, что клетки A549^{p21-} обладают меньшей пропускной способностью малат-аспартатного челночного пути. Этот путь основан на обмене малата на 2-оксоглутарат, который является продуктом реакций ИЦДГ, ГДГ и ГОТ. Наше исследование показывает, что нокдаун p21 сильно влияет на пути производства 2-оксоглутарата не только из изоцитрата, но и глутамата (Рис. 24).

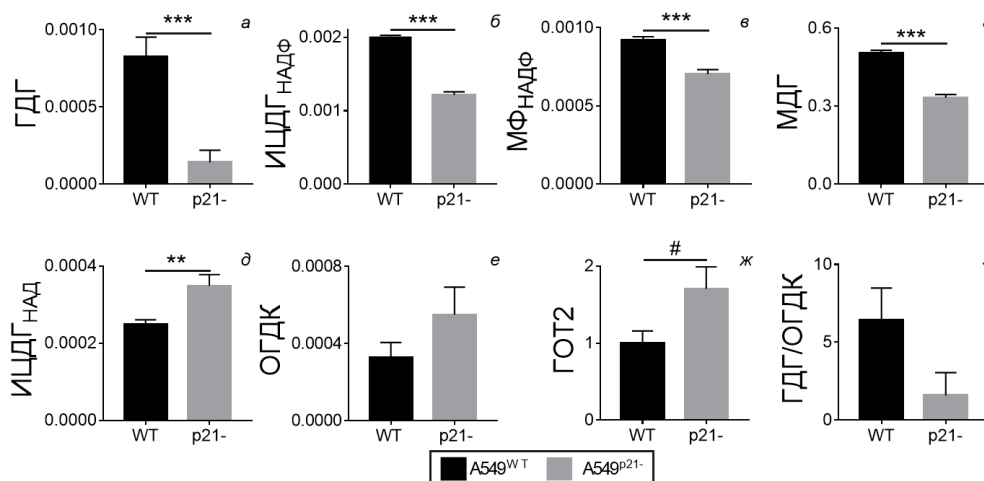


Рис. 24. Влияние нокдауна p21 на уровни ферментов цикла Кребса и связанных ферментов в клетках A549. а-е - активности указаны на оси Y в мкмоль•мин⁻¹•мг⁻¹; ж - уровень митохондриальной ГОТ (ГОТ2), у. е.; з - отношение активностей ГДГ к общей ОГДК, характеризующее поток глутамата в цикл Кребса. Значения представлены как среднее ± SEM по трем независимым культурам. Статистическая значимость определялась по критерию Манна-Уитни (# - 0,05 < p < 0,1; * - p < 0,05) [197].

Поскольку дефицит тиамина инвертировал чувствительность клеток A549^{WT} и A549^{p21-} к цисплатину (Рис. 22), был изучен метаболический ответ клеток на дефицит тиамина (Рис. 25). В условиях дефицита тиамина клетки A549^{WT} не показывают значительных изменений ГДГ, ГОТ2 или холо-ОГДК (Рис. 25 а-в), но адаптируются, используя связанные ферменты. Активность обеспечивающей ОГДК 2-оксоглутаратом НАД-зависимой ИЦДГ удваивается в клетках A549^{WT} в условиях дефицита тиамина (Рис. 25 д), как и активность НАДФ-зависимых МФ и ИЦДГ, по сравнению с контролем (Рис. 25).

Нокдаун p21 сильно влияет на подобную адаптацию метаболизма клеток к дефициту тиамина. Хотя активность ГДГ и ОГДК в клетках A549^{p21-} не меняется при дефиците тиамина, как и в клетках A549^{WT}, уровень ГОТ2 увеличивается в 5 раз, а вот активность НАД-зависимой ИЦДГ перестает реагировать на тиаминный дефицит в клетках A549^{p21-} (Рис. 25). Наряду с этим наблюдаются небольшие, но статистически значимые увеличения НАДФ-зависимых МФ и ИЦДГ – они меньше, чем в A549^{WT}.

В целом, при дефиците тиамина клетки A549^{p21-} компенсируют свою более низкую, по сравнению с A549^{WT}, активацию ферментов-источников НАД(Ф)Н за счет усиления трансаминирования глутамата. Неспособность клеток A549^{p21-} активировать продуценты НАД(Ф)Н так же сильно, как и A549^{WT} при дефиците тиамина, совпадает с более высокой чувствительностью A549^{p21-} к цисплатину при тиаминном дефиците, по сравнению с A549^{WT} (Рис. 22).

Различия метаболического ответа клеток A549^{WT} и A549^{p21-} на дефицит тиамина соответствуют их способности активировать p53. Так, при дефиците тиамина лишь клетки A549^{WT} значительно увеличивают уровень p53 (Рис. 25 и).

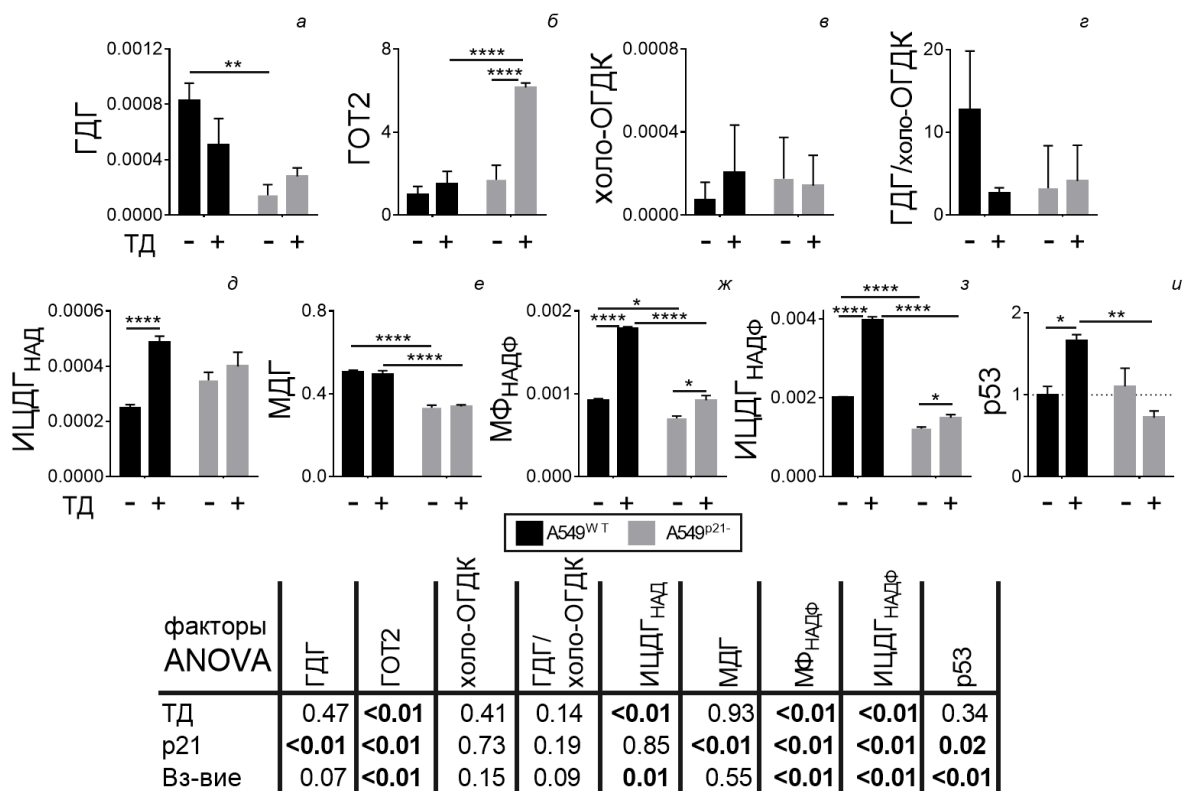


Рис. 25. Изменения уровней ферментов и p53 в клетках A549^{WT} и A549^{p21-}, вызванные дефицитом тиаминa. а, в, д-з - активности ферментов, указаны на оси Y как мкмоль•мин⁻¹•мг⁻¹; б - уровень белка ГОТ2, у.е.; г - отношение активностей ГДГ и эндогенного холо-ОГДК, оценивающее поток глутамата в цикл Кребса; и - уровень белка p53, у. е. Клетки с дефицитом тиаминa (ТД) выращивали в течение 7 дней в среде, не содержащей тиаминa. Данные получены из трех независимых культур клеток. Значения представлены как среднее $\pm$ SEM. Статистическая значимость определялась двухфакторным дисперсионным анализом с апостериорным критерием Тьюки. Р-значения факторов и их взаимодействия представлены в таблице [197].

Зависимые от p53/p21 изменения метаболизма при дефиците тиаминa в клетках A549 (Рис. 25) предполагают, что контроль со стороны p53 изменяется при нокдауне p21. Мы проанализировали корреляции уровней ферментов и p53, в клетках с разным уровнем ТДФ/тиаминa: контрольных, дефицитных по тиамину и инкубированных с ТДФ клетках A549^{WT} и A549^{p21-}.

В клетках A549^{WT} активности НАДФ-зависимых МФ и ИЦДГ, известных мишеней регуляции со стороны p53 – ME1 и ME2 [201, 202], IDH1, IDH2 [203], сильно коррелируют ($p < 0,01$) с уровнем p53 (Рис. 25, Таблица 14). Активности ОГДК (общей и холо-), МДГ и НАД-зависимой ИЦДГ (гены IDH3A, IDH3B и IDH3G) демонстрируют менее значимые положительные корреляции с уровнем p53 (Рис. 26, Таблица 14). Положительные корреляции между ферментами в клетках A549^{WT} (Таблица 14, верхний правый угол) подтверждают существование

общего p53-зависимого контроля дегидрогеназ малата и изоцитрата, которые показывают значительную взаимную скоррелированность между собой, а также ОГДК. Напротив, уровни ГДГ и ГОТ2, которые не коррелируют с экспрессией p53, показывают низкий уровень взаимозависимости с другими ферментами.

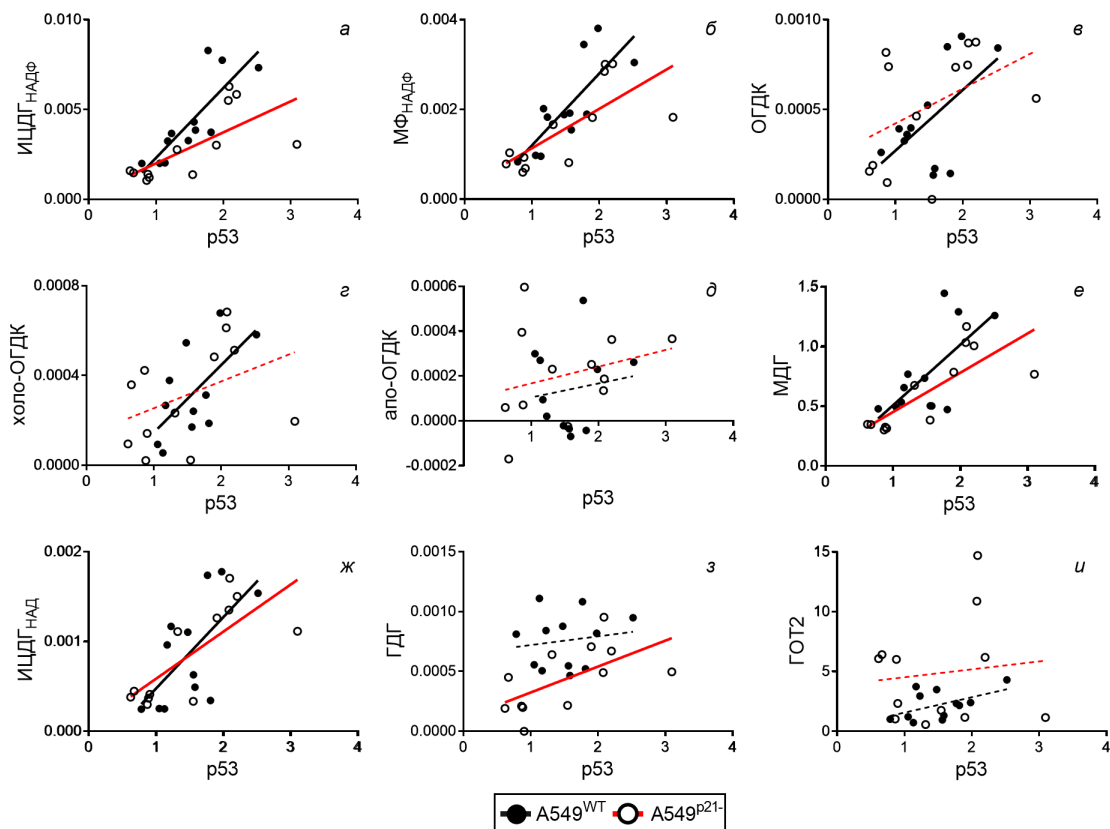


Рис. 26. Изменение корреляций между p53 и исследуемыми ферментами в клетках A549^{WT} и A549^{p21-/-}. Уровни белка p53 (горизонтальные оси) скоррелированы с активностями или экспрессией ферментов, указанными на графиках (вертикальные оси). а-з - активность фермента выражена в мкмоль·мин⁻¹·мг⁻¹; уровни белка митохондриальной аспартатаминотрансферазы (ГОТ2) и p53 указаны в условных единицах. Линейные регрессии корреляций Пирсона представлены черными (A549^{WT}) или красными (A549^{p21-/-}) линиями, которые являются сплошными (p<0,05) или пунктирными (p>0,05) в зависимости от P-значений корреляций. Каждая точка – отдельная культура клеток из трех независимых экспериментов [197].

Несмотря на нокдаун p21, в клетках A549^{p21-/-} положительные корреляции между p53 и активностями НАДФ-зависимых ИЦДГ и МФ остаются высокими (Рис. 26), а корреляции p53 с МДГ и НАД-зависимой ИЦДГ даже усиливаются (Таблица 14, нижний левый угол). Однако нокдаун p21 перестраивает корреляции ГДГ и ОГДК с экспрессией p53. Так, активность ГДГ, но не ОГДК, коррелирует с экспрессией p53 в клетках A549^{p21-/-}. Обратное наблюдается в клетках A549^{WT}, где активность ГДГ не коррелирует с p53, в отличие от активности ОГДК. Также, активности ферментов цикла Кребса ОГДК и НАД-зависимой ИЦДГ образуют

взаимно скоррелированный кластер: в клетках A549^{WT} – с ГОТ2, а в клетках A549^{p21-} – с ГДГ (Таблица 14).

Таким образом, при различном уровне ТДФ в клетках A549, нокдаун p21 перестраивает корреляции между p53 и активностями ОГДК и ГДГ, регулируя распределение глутамата между трансаминированием или окислением в цикле Кребса.

Таблица 14. Корреляция между уровнями p53 и изученными ферментами в клеточных линиях A549^{WT} (верхний правый угол) и A549^{p21-} (нижний левый угол) при различных уровнях тиамина/ТДФ. Каждая ячейка таблицы показывает соответствующие коэффициенты корреляции Пирсона (вверху) и Р-значения (внизу). Значимые корреляции (p<0,05) выделены жирным шрифтом. Нормальность проверена, используя тест Д'Агостино и Пирсона [197].

A549 ^{WT} A549 ^{p21-}	p53	NADP- ИЦДГ	МФ	NAD- ИЦДГ	МДГ	ГДГ	ГОТ2	ОГДК (apo+holo)	ОГДК (holo)	ОГДК (apo)
p53		0,82 0,00	0,79 0,00	0,64 0,03	0,67 0,02	0,15 0,64	0,51 0,09	0,57 0,05	0,64 0,03	0,14 0,68
NADP- ИЦДГ	0,68 0,01		0,97 0,00	0,88 0,00	0,92 0,00	0,35 0,27	0,43 0,16	0,8 0,00	0,66 0,03	0,48 0,13
МФ	0,73 0,01	0,99 0,00		0,93 0,00	0,91 0,00	0,29 0,37	0,54 0,07	0,81 0,00	0,75 0,01	0,41 0,22
NAD- ИЦДГ	0,76 0,00	0,94 0,00	0,96 0,00		0,94 0,00	0,44 0,15	0,68 0,02	0,88 0,00	0,84 0,00	0,42 0,2
МДГ	0,78 0,00	0,97 0,00	0,98 0,00	0,98 0,00		0,58 0,05	0,53 0,08	0,95 0,00	0,71 0,01	0,66 0,03
ГДГ	0,6 0,04	0,8 0,00	0,83 0,00	0,9 0,00	0,86 0,00		0,14 0,67	0,62 0,03	0,31 0,35	0,63 0,04
ГОТ2	0,12 0,72	0,66 0,02	0,6 0,04	0,45 0,14	0,55 0,07	0,42 0,17		0,54 0,07	0,71 0,01	0,01 0,99
ОГДК (apo+holo)	0,45 0,14	0,62 0,03	0,6 0,04	0,65 0,02	0,63 0,03	0,46 0,13	0,19 0,55		0,74 0,01	0,7 0,02
ОГДК (holo)	0,4 0,20	0,78 0,00	0,77 0,00	0,75 0,01	0,77 0,00	0,73 0,01	0,56 0,06	0,78 0,00		0,04 0,9
ОГДК (apo)	0,28 0,39	0,12 0,72	0,1 0,76	0,2 0,53	0,15 0,64	-0,08 0,81	-0,31 0,32	0,72 0,01	0,12 0,7	

4.6.2. Действие тиамина или окситиамина на ОГДК и ГДГ клеток глиобластомы*

Инкубация клеток глиобластомы T98G и U87 с антагонистом В1 окситиамином

* При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Aleshin VA, Artiukhov AV, Oppermann H, Kazantsev AV, Lukashev NV & Bunik VI (2015) Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays. *Cells*, 4(3):427-51 (вклад 0,3/1,625 ПЛ).

контринтуитивно увеличивает активность клеточной НАД(Ф)Н:резазуриноксидоредуктазы, обычно используемую как маркер жизнеспособности клеток, тогда как аналогичные концентрации тиамина не вызывают повышения (Рис. 27).

Различие не связано с уровнем белка в клетках, поскольку его изменения (не более 20%, данные не показаны) совпадали для тиамина и окситиамина.

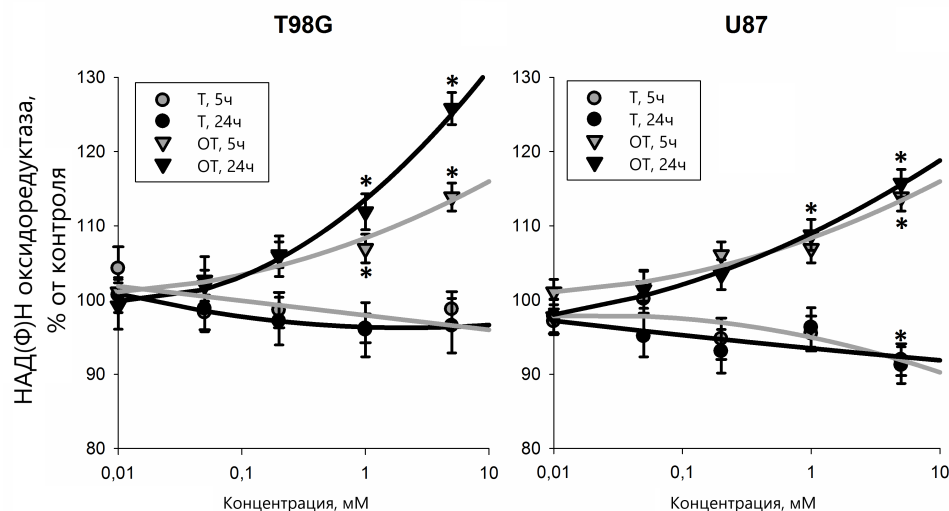


Рис. 27. Зависимость НАД(Ф)Н:резазурин-оксидоредуктазной активности клеток T98G и U87 от концентрации тиамина (Т) или окситиамина (ОТ). Время инкубации (5 ч или 24 ч) указано на графиках. Изменения относительно контрольных значений представлены как среднее $\pm$ SEM, %. Значимые отличия от контроля (*, $p < 0,05$) определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным тестом Тьюки [204].

В отличие от тиамина, не изменявшего активность ОГДК, антикоферментное действие окситиамина привело к значительным изменениям активности ТДФ-зависимого ОГДК *in vivo* в клетках T98G и U87 (Рис. 28). Высокая (5 мМ) концентрация окситиамина вызывала снижение ОГДК в обеих линиях клеток, но на разном временном интервале, а низкая (0,05 мМ) концентрация окситиамина способствовала небольшому компенсаторному увеличению активности ОГДК в лизатах клеток (Рис. 28).

В отличие от ОГДК, использующей ТДФ как кофермент, влияние на ГДГ у тиамина и окситиамина было одинаковым, то есть, не зависело от коферментного действия тиамина/окситиамина (Рис. 28). При этом ответ на добавление тиамина или окситиамина имел высокую клеточную специфичность. Так, активность ГДГ в клетках U87 при добавлении и тиамина, и окситиамина подавлялась приблизительно вдвое, а в клетках T98G – значительно увеличивалась (Рис. 28).

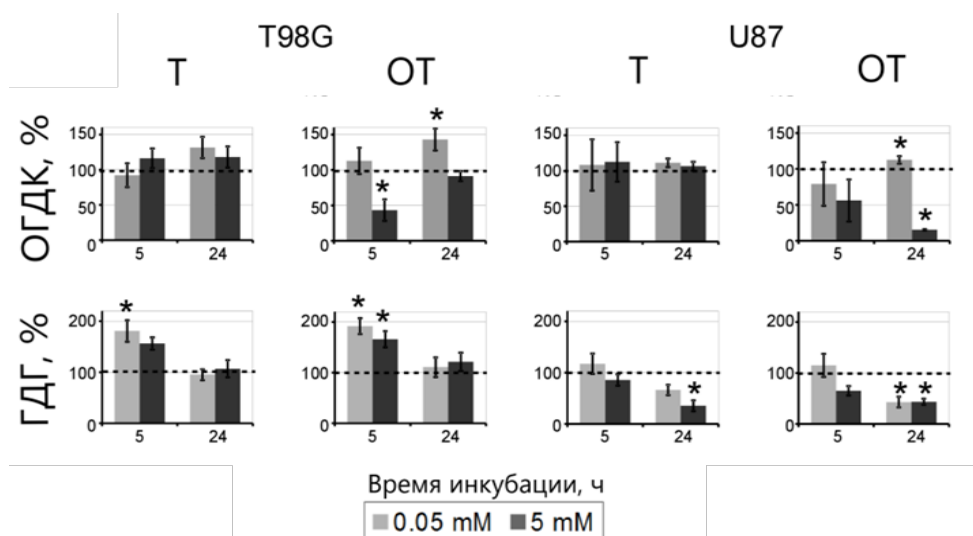


Рис. 28. Зависимость изменения активностей ОГДК и ГДГ при инкубации клеток Т98G и U87 с тиамином (Т) и окситиамином (ОТ) от времени инкубации и концентрации веществ. Изменения показаны как среднее $\pm$ SEM, %. Значимые отличия от контроля (*, $p < 0,05$) при фиксированном времени инкубации (5 или 24 ч) определяли с помощью ANOVA и теста Тьюки [204].

Биохимические различия между линиями клеток Т98G и U87 были хорошо видны при анализе активностей ферментов во время инкубации клеток в контрольной среде (Таблица 15). Поэтому естественно, что эти неодинаковые с точки зрения метаболизма ГДГ и ОГДК линии имели клеточно-специфический ответ при обработке тиамином/окситиамином (Рис. 28).

Таблица 15. Общая активность ГДГ и ОГДК в клетках Т98G и U87 во время инкубации в контрольной среде культивирования. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM. Значимые различия ($p < 0,05$) между 5 и 24 часами (а - Т98G 5 часов против Т98G 24 часа; б - U87 5 часов против U87 24 часа) или между клетками в одно и то же время роста (в - Т98G 5 часов против U87 5 часов; г - Т98G 24 ч против 24 ч U87) определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа и теста Тьюки. Статистически значимое повышение активности во время инкубации выделено жирным шрифтом.

Cell line	T98G		U87	
Time in medium	5 h	24 h	5 h	24 h
OGDH , $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ (б,г)	0,05 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,01
GDH , $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ (б)	0,02 $\pm$ 0,003	0,03 $\pm$ 0,003	0,03 $\pm$ 0,002	0,05 $\pm$ 0,012

Сравнение действия тиаминa и окситиаминa на клетки глиобластомы U87 и Т98G показало, что действие этих структурно похожих соединений – витамина В1 и его антивитамина, с точки зрения коферментной функции – может быть одинаковым в отношении некоферментных мишеней, таких как ГДГ, но

различаться при реализации коферментного действия, например в отношении ОГДК. Как коферментное, так и некоферментное действие тиамин, его производных и антагонистов может иметь важное физиологическое значение *in vivo*.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе охарактеризованы новые молекулярные механизмы некоферментного действия тиамин или его производных. Эти механизмы имеют не только глубокое фундаментальное значение, но могут быть использованы для улучшения лечения болезней мозга, а также при лечении некоторых типов рака.

Большое количество полученных уникальных данных имеет фундаментальное и прикладное значение, в том числе и для исследователей, не занимающихся изучением тиамин. Вместе с тем, современные глобальные вызовы, такие как неожиданное распространение гиповитаминоза витамина В1 в природе и у пациентов, в том числе в развитых странах, усиливают необходимость изучения проблем и молекулярных механизмов, связанных с ролью витамина В1 в организме.

6. ВЫВОДЫ

1. С помощью биоинформатического анализа идентифицированных масс-спектрометрией белков мозга животных, элюируемых с тиамин-содержащей сефарозы, показано, что фосфатазы семейства DING имеют структурное сходство с тиамин/ТДФ-связывающим белком бактерий и могут участвовать в метаболизме тиаминфосфатов млекопитающих.
2. Антагонисты тиамина ампролиум и пиритиамин, применяемые для создания моделей тиаминового дефицита, ингибируют пиридоксалькиназу. Среди фосфатов тиамина наиболее сильный ингибитор – тиаминтрифосфат.
3. С использованием кинетических исследований и полученных структур комплексов глутаматдегидрогеназы быка с ADP (разрешение 2,25 Å) и лейцином (разрешение 2,44 Å) охарактеризованы молекулярные механизмы регуляции глутаматдегидрогеназы путем ацетилирования остатков лизина в центрах связывания лейцина (K200), GTP (K503) и ADP (K84 и K545).
4. Показана суточная регуляция тиамин-зависимых ферментов пост-трансляционными модификациями *in vivo*: ацетилированием (K503 глутаматдегидрогеназы) и фосфорилированием (S213 и S285 пиридоксалькиназы и S293 пируватдегидрогеназы) – и изменение такой регуляции при введении высоких доз тиамина. Регуляция этих мишеней тиамином вносит вклад в защитное действие тиамина в моделях нейропатологий.
5. В раковых клетках некоферментное действие тиамина/ТДФ имеет большое значение для антираковой терапии. Взаимодействие ТДФ с сигнальным путем p53-p21 в клетках аденокарциномы A549 приводит к переключению потоков субстратов в метаболическом узле взаимопревращений 2-оксоглутарата и глутамата, критическом для жизнеспособности данных клеток; окситиамин может имитировать действие тиамина на глутаматдегидрогеназу в клетках глиобластомы T98G и U87.

7. БЛАГОДАРНОСТИ

Я выражаю свою искреннюю благодарность моему научному руководителю, профессору Буник-Фаренвальд Виктории Ивановне за руководство, обучение, долгую плодотворную совместную работу и всестороннюю поддержку.

Также я благодарю коллег по лаборатории: Артема Артюхова, Александру Бойко, Гарика Мкртчяна – за атмосферу дружбы и взаимопомощи и слаженную совместную работу, а также коллег по отделу биокинетики под руководством профессора Швядаса Витаутаса-Юозаса Каятоно – за готовность поддержать словом и делом.

Благодарю коллег из НИИ ФХБ Белозерского, с кафедры физиологии человека и животных Биофака, с химического факультета Университета имени М.В. Ломоносова – в первую очередь Граф Анастасию Викторовну и Казанцева Алексея Витальевича – за сдержанность, доброжелательность и плодотворную совместную работу.

С уважением хотел бы поблагодарить российских и международных партнеров: Профессора Тило Кэне из Университета Отто-фон-Гёрике (Магдебург, Германия) – за его надежность, помощь и обучение анализу данных масс-спектрометрии; Профессора Анну Карлссон и всех сотрудников её группы в отделе Лабораторной медицины Каролинского института (Стокгольм, Швеция) – за предоставленную возможность совместной работы, всестороннюю поддержку и гостеприимство; Профессора Педро Алзари, Марко Беллинзони, Эдуардо Бруч и других сотрудников Лаборатории Структурной Микробиологии института Пастера (Париж, Франция) – за возможность совместной работы даже в условиях пандемии, открытость, гибкость, обучение новым методам и доверие; а также координатора по научному и академическому сотрудничеству посольства Франции в России, Себастьяна Бройяра – за помощь при организации поездки в институт Пастера по стипендии «Остроградский 2020» в условиях коронавирусных ограничений; Профессора Франка Гауница и Генри Оперманна из Лейпцигского университета (Лейпциг, Германия) – за обучение работе с клеточными культурами и поддержку;

Профессора Роберто Контестабиле, Мартино ди Сальво, Ангелу Трамонти и других сотрудников из Университета Сапиенсы Рима и Итальянского национального исследовательского совета – за предоставленные рекомбинантные ПЛК и ПНФО, гостеприимство и открытость;

Меженскую Ольгу Александровну, сотрудника института биохимии им. А.В.Палладина НАН (Киев, Украина) – за совместную работу с результатами аффинной хроматографии на тиамин-сефарозе;

Рябова Сергея Ивановича, сотрудника ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России (Москва) – за образцы мозга крыс, подвергшихся спинно-мозговой травме.

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров, С.А. and Е.В. Донеско, *Эффект тиамина и его метаболитов на активность аминотрансфераз аспартата и аланина в организме белых крыс и в крови доноров*. Физиологический Журнал, 1989. **35**: p. 94-96.
2. Mkrtchyan, G., et al., *Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12583.
3. McLure, K.G., M. Takagi, and M.B. Kastan, *NAD⁺ modulates p53 DNA binding specificity and function*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(22): p. 9958-67.
4. Tanaka, T., et al., *Adenosine thiamine triphosphate (AThTP) inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2011. **57**(2): p. 192-6.
5. Perez-Pineiro, R., et al., *The prion protein binds thiamine*. FEBS J, 2011. **278**(21): p. 4002-14.
6. Pagadala, N.S., et al., *Molecular docking of thiamine reveals similarity in binding properties between the prion protein and other thiamine-binding proteins*. J Mol Model, 2013. **19**(12): p. 5225-35.
7. Nghiem, H.O., L. Bettendorff, and J.P. Changeux, *Specific phosphorylation of Torpedo 43K rapsyn by endogenous kinase(s) with thiamine triphosphate as the phosphate donor*. The FASEB Journal, 2000. **14**(3): p. 543-554.
8. Aleshin, V.A., et al., *Diurnal regulation of the function of the rat brain glutamate dehydrogenase by acetylation and its dependence on thiamine administration*. J Neurochem, 2020. **153**(1): p. 80-102.
9. Aleshin, V.A., et al., *Physiological and Biochemical Markers of the Sex-Specific Sensitivity to Epileptogenic Factors, Delayed Consequences of Seizures and Their Response to Vitamins B1 and B6 in a Rat Model*. Pharmaceuticals, 2021. **14**(8).
10. Boyko, A., et al., *Severe Spinal Cord Injury in Rats Induces Chronic Changes in the Spinal Cord and Cerebral Cortex Metabolism, Adjusted by Thiamine That Improves Locomotor Performance*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2021. **14**.
11. Aleshin, V.A., G.V. Mkrtchyan, and V.I. Bunik, *Mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin: protein targets and medical significance*. Biochemistry (Mosc), 2019. **84**(8).
12. Schnellbaecher, A., et al., *Vitamins in cell culture media: Stability and stabilization strategies*. Biotechnology and Bioengineering, 2019. **116**(6): p. 1537-1555.
13. Zhang, F., et al., *The uremic toxin oxythiamine causes functional thiamine deficiency in end-stage renal disease by inhibiting transketolase activity*. Kidney Int, 2016. **90**(2): p. 396-403.

14. Parkhomenko, Y.M., et al., *Metovitan prevents accumulation of thiamin diphosphate oxygenized form in rat tissues under irradiation*. Biotechnologia Acta, 2015. **8**(4): p. 63-70.
15. Stepuro, II, et al., *Oxidation of thiamine on reaction with nitrogen dioxide generated by ferric myoglobin and hemoglobin in the presence of nitrite and hydrogen peroxide*. Biochemistry (Mosc), 2012. **77**(1): p. 41-55.
16. Gangolf, M., et al., *Thiamine status in humans and content of phosphorylated thiamine derivatives in biopsies and cultured cells*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13616.
17. Bettendorff, L. and P. Wins, *Thiamine derivatives in excitable tissues: Metabolism, Deficiency and neurodegenerative diseases*. Rec. Res. Devel. Neurochem., 1999. **2**: p. 37-62.
18. Frederich, M., et al., *Thiaminylated adenine nucleotides. Chemical synthesis, structural characterization and natural occurrence*. FEBS J, 2009. **276**(12): p. 3256-68.
19. Rindi, G., et al., *Three thiamine analogues differently alter thiamine transport and metabolism in nervous tissue: an in vivo kinetic study using rats*. Metab Brain Dis, 2003. **18**(4): p. 245-63.
20. Bocobza, S.E., et al., *Orchestration of thiamin biosynthesis and central metabolism by combined action of the thiamin pyrophosphate riboswitch and the circadian clock in Arabidopsis*. Plant Cell, 2013. **25**(1): p. 288-307.
21. Kim, S., et al., *Bioinformatic and metabolomic analysis reveals miR-155 regulates thiamine level in breast cancer*. Cancer Lett, 2015. **357**(2): p. 488-97.
22. Lo, P.K., et al., *Identification of a mouse thiamine transporter gene as a direct transcriptional target for p53*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37186-93.
23. Bunik, V.I., A. Tylicki, and N.V. Lukashev, *Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models*. FEBS J, 2013. **280**(24): p. 6412-42.
24. Mayr, J.A., et al., *Thiamine pyrophosphokinase deficiency in encephalopathic children with defects in the pyruvate oxidation pathway*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(6): p. 806-12.
25. Banka, S., et al., *Expanding the clinical and molecular spectrum of thiamine pyrophosphokinase deficiency: a treatable neurological disorder caused by TPK1 mutations*. Mol Genet Metab, 2014. **113**(4): p. 301-6.
26. Sano, S., et al., *Thiamine pyrophosphatase and nucleoside diphosphatase in rat brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **118**(1): p. 292-8.
27. Zebisch, M., et al., *New crystal forms of NTPDase1 from the bacterium Legionella pneumophila*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2013. **69**(Pt 3): p. 257-62.
28. Bunik, V.I. and V.A. Aleshin, *Analysis of the Protein Binding Sites for Thiamin and Its Derivatives to Elucidate the Molecular Mechanisms of the Noncoenzyme Action of Thiamin (Vitamin B1)*. Studies in Natural Products Chemistry, 2017. **53**: p. 375-429.

29. Rindi, G., et al., *Intestinal alkaline phosphatase can transphosphorylate thiamin to thiamin monophosphate during intestinal transport in the rat*. Arch Physiol Biochem, 1995. **103**(1): p. 33-8.
30. Zylka, M.J., et al., *Prostatic acid phosphatase is an ectonucleotidase and suppresses pain by generating adenosine*. Neuron, 2008. **60**(1): p. 111-22.
31. Hurt, J.K., et al., *Prostatic acid phosphatase is required for the antinociceptive effects of thiamine and benfotiamine*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48562.
32. Eckert, T. and W. Moebus, *[on the Atp Thiaminediphosphate Phosphotransferase Activity in Nerve Tissue. A Contribution on the Mechanism of Nerve Impulse Conduction]*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1964. **338**: p. 286-8.
33. Nishino, K., et al., *Enzyme system involved in the synthesis of thiamin triphosphate. I. Purification and characterization of protein-bound thiamin diphosphate: ATP phosphoryltransferase*. J Biol Chem, 1983. **258**(19): p. 11871-8.
34. Gigliobianco, T., et al., *Adenylate kinase-independent thiamine triphosphate accumulation under severe energy stress in Escherichia coli*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 16.
35. Shioda, T., et al., *Thiamin-triphosphate-synthesizing activity of mutant cytosolic adenylate kinases: significance of Arg-128 for substrate specificity*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1161**(2-3): p. 230-4.
36. Makarchikov, A.F., et al., *Adenylate kinase 1 knockout mice have normal thiamine triphosphate levels*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(2): p. 117-21.
37. Shikata, H., et al., *Cytosolic adenylate kinase catalyzes the synthesis of thiamin triphosphate from thiamin diphosphate*. Biochem Int, 1989. **18**(5): p. 933-41.
38. Bettendorff, L., P. Wins, and M. Lesourd, *Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1222**(1): p. 1-6.
39. Bettendorff, L., et al., *Thiamine triphosphate: a ubiquitous molecule in search of a physiological role*. Metab Brain Dis, 2014. **29**(4): p. 1069-82.
40. Gangolf, M., et al., *Thiamine triphosphate synthesis in rat brain occurs in mitochondria and is coupled to the respiratory chain*. J Biol Chem, 2010. **285**(1): p. 583-94.
41. Gigliobianco, T., et al., *An alternative role of FoF1-ATP synthase in Escherichia coli: synthesis of thiamine triphosphate*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1071.
42. Makarchikov, A.F. and I.P. Chernikevich, *Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1117**(3): p. 326-32.
43. Jenkins, A.H., et al., *A new thiamin salvage pathway*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(8): p. 492-7.
44. Murata, K., *Actions of two types of thiaminase on thiamin and its analogues*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **378**: p. 146-56.
45. Bos, M. and A. Kozik, *Some molecular and enzymatic properties of a homogeneous preparation of thiaminase I purified from carp liver*. J Protein Chem, 2000. **19**(2): p. 75-84.

46. Matsuo, T. and Z. Suzuoki, *The occurrence of 4-methylthiazole-5-acetic acid as a thiamine metabolite in rabbit, dog, man and rat*. J Biochem, 1969. **65**(6): p. 953-60.
47. Петров, С.А., *Метаболизм тиамина в органах и тканях мыши in vivo и in vitro*. Физиологический Журнал, 1992. **38**: p. 79-75.
48. Dutta, B., et al., *Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 31925-9.
49. Said, H.M., et al., *Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G491-8.
50. Akin, L., et al., *Does early treatment prevent deafness in thiamine-responsive megaloblastic anaemia syndrome?* J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2011. **3**(1): p. 36-9.
51. Ortigoza-Escobar, J.D., et al., *Free-thiamine is a potential biomarker of thiamine transporter-2 deficiency: a treatable cause of Leigh syndrome*. Brain, 2016. **139**(Pt 1): p. 31-8.
52. Alfadhel, M., *Early Infantile Leigh-like SLC19A3 Gene Defects Have a Poor Prognosis: Report and Review*. J Cent Nerv Syst Dis, 2017. **9**: p. 1179573517737521.
53. Zhang, K., et al., *Genetic implication of a novel thiamine transporter in human hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(15): p. 1542-55.
54. Lemos, C., et al., *Thiamine is a substrate of organic cation transporters in Caco-2 cells*. Eur J Pharmacol, 2012. **682**(1-3): p. 37-42.
55. Chen, L., et al., *OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(27): p. 9983-8.
56. Kato, K., et al., *Investigation of endogenous compounds for assessing the drug interactions in the urinary excretion involving multidrug and toxin extrusion proteins*. Pharm Res, 2014. **31**(1): p. 136-47.
57. Subramanian, V.S., et al., *Mitochondrial uptake of thiamin pyrophosphate: physiological and cell biological aspects*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73503.
58. Nabokina, S.M., et al., *Molecular identification and functional characterization of the human colonic thiamine pyrophosphate transporter*. J Biol Chem, 2014. **289**(7): p. 4405-16.
59. Zhao, R., et al., *Impact of the reduced folate carrier on the accumulation of active thiamin metabolites in murine leukemia cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1114-8.
60. Tanihara, Y., et al., *Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters*. Biochem Pharmacol, 2007. **74**(2): p. 359-71.
61. Liu, S., et al., *Down-regulation of thiamine transporter THTR2 gene expression in breast cancer and its association with resistance to apoptosis*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(9): p. 665-73.
62. Liu, X., et al., *Promoter hypermethylation mediates downregulation of thiamine receptor SLC19A3 in gastric cancer*. Tumour Biol, 2009. **30**(5-6): p. 242-8.

63. Ikehata, M., K. Ueda, and S. Iwakawa, *Different involvement of DNA methylation and histone deacetylation in the expression of solute-carrier transporters in 4 colon cancer cell lines*. Biol Pharm Bull, 2012. **35**(3): p. 301-7.
64. Zastre, J.A., et al., *Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism*. Cancer Metab, 2013. **1**(1): p. 16.
65. Mkrtchyan, G., et al., *Cellular thiamine status is coupled to function of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase*. Neurochem Int, 2016. **101**: p. 66-75.
66. Liu, S., et al., *Thiamine transporter gene expression and exogenous thiamine modulate the expression of genes involved in drug and prostaglandin metabolism in breast cancer cells*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(8): p. 477-87.
67. Lonsdale, D., *Thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide: a little known therapeutic agent*. Med Sci Monit, 2004. **10**(9): p. RA199-203.
68. Tapias, V., et al., *Benfotiamine treatment activates the Nrf2/ARE pathway and is neuroprotective in a transgenic mouse model of tauopathy*. Hum Mol Genet, 2018. **27**(16): p. 2874-2892.
69. Gibson, G.E., et al., *Vitamin B1 (thiamine) and dementia*. Ann N Y Acad Sci, 2016. **1367**(1): p. 21-30.
70. Mouton-Liger, F., et al., *PKR downregulation prevents neurodegeneration and beta-amyloid production in a thiamine-deficient model*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1594.
71. Pan, X., et al., *Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice*. Brain, 2010. **133**(Pt 5): p. 1342-51.
72. Sun, X.J., et al., *Benfotiamine prevents increased beta-amyloid production in HEK cells induced by high glucose*. Neurosci Bull, 2012. **28**(5): p. 561-6.
73. Markova, N., et al., *Thiamine and benfotiamine improve cognition and ameliorate GSK-3beta-associated stress-induced behaviours in mice*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2017. **75**: p. 148-156.
74. Vignisse, J., et al., *Thiamine and benfotiamine prevent stress-induced suppression of hippocampal neurogenesis in mice exposed to predation without affecting brain thiamine diphosphate levels*. Mol Cell Neurosci, 2017. **82**: p. 126-136.
75. Moraes, J.O., et al., *Amprolium exposure alters mice behavior and metabolism in vivo*. Animal Models and Experimental Medicine, 2018. **1**(4): p. 272-281.
76. Hirsch, J.A. and J. Parrott, *New considerations on the neuromodulatory role of thiamine*. Pharmacology, 2012. **89**(1-2): p. 111-6.
77. von Muralt, A., *The role of thiamine (vitamin B1) in nerve excitation*. Exp Cell Res, 1958. **14**: p. 72-79.
78. Minz, B., *Sur la liberation de la vitamine B1 par le trone isole de nerf pneumogastrique soumis a l'excitation electrique*. C.R.Soc.Biol., 1938. **127**: p. 1251-1253.
79. Fukui, S., et al., *Formation of "Thiaminosuccinic Acid" as an Intermediate in the Transformation of Oxythiamine to Thiamine by a Thiamineless Mutant of Escherichia Coli*. J Biol Chem, 1965. **240**: p. 1315-21.

80. Goyer, A., et al., *A cross-kingdom Nudix enzyme that pre-empts damage in thiamin metabolism*. Biochem J, 2013. **454**(3): p. 533-42.
81. Linster, C.L., E. Van Schaftingen, and A.D. Hanson, *Metabolite damage and its repair or pre-emption*. Nat Chem Biol, 2013. **9**(2): p. 72-80.
82. Agyei-Owusu, K. and F.J. Leeper, *Thiamin diphosphate in biological chemistry: analogues of thiamin diphosphate in studies of enzymes and riboswitches*. FEBS J, 2009. **276**(11): p. 2905-16.
83. Iwadate, D., et al., *Thiamine deficiency in metronidazole-induced encephalopathy: A metabolic correlation?* J Neurol Sci, 2017. **379**: p. 324-326.
84. Liang, X., et al., *Metformin Is a Substrate and Inhibitor of the Human Thiamine Transporter, THTR-2 (SLC19A3)*. Mol Pharm, 2015. **12**(12): p. 4301-10.
85. Kimura, N., et al., *Metformin is a superior substrate for renal organic cation transporter OCT2 rather than hepatic OCT1*. Drug Metab Pharmacokinet, 2005. **20**(5): p. 379-86.
86. McGarvey, C., et al., *Metformin-induced encephalopathy: the role of thiamine*. Intern Med J, 2018. **48**(2): p. 194-197.
87. Costantini, A., *High-dose thiamine and essential tremor*. BMJ Case Rep, 2018. **2018**.
88. Godo, S., et al., *The Dramatic Recovery of a Patient with Biguanide-associated Severe Lactic Acidosis Following Thiamine Supplementation*. Intern Med, 2017. **56**(4): p. 455-459.
89. Page, G.L., D. Laight, and M.H. Cummings, *Thiamine deficiency in diabetes mellitus and the impact of thiamine replacement on glucose metabolism and vascular disease*. Int J Clin Pract, 2011. **65**(6): p. 684-90.
90. Abdullah, K.M., et al., *Insight into the In Vitro Antiglycation and In Vivo Antidiabetic Effects of Thiamine: Implications of Vitamin B1 in Controlling Diabetes*. ACS Omega, 2021. **6**(19): p. 12605-12614.
91. Coy, J.F., et al., *Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer*. Clin Lab, 2005. **51**(5-6): p. 257-73.
92. Langbein, S., et al., *Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted*. Br J Cancer, 2006. **94**(4): p. 578-85.
93. Meshalkina, L.E., et al., *Is transketolase-like protein, TKTL1, transketolase?* Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(3): p. 387-90.
94. Bunik, V., *Vitamin-Dependent Multienzyme Complexes of 2-Oxo Acid Dehydrogenases: Structure, Function, Regulation and Medical Implications*. 2017: Nova Science Publishers.
95. Bunik, V.I., et al., *Phosphonate analogues of alpha-ketoglutarate inhibit the activity of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex isolated from brain and in cultured cells*. Biochemistry, 2005. **44**(31): p. 10552-61.
96. Kitamura, T., N. Seki, and A. Kihara, *Phytosphingosine degradation pathway includes fatty acid alpha-oxidation reactions in the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(13): p. E2616-E2623.

97. Yang, Z., et al., [*The expression of p53, MDM2 and Ref1 gene in cultured retina neurons of SD rats treated with vitamin B1 and/or elevated pressure*]. Yan Ke Xue Bao, 2004. **20**(4): p. 259-63.
98. Chorny, S., Y. Parkhomenko, and N. Chorna, *Thiamine antagonists trigger p53-dependent apoptosis in differentiated SH-SY5Y cells*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10632.
99. Ding, B.C., et al., *Repression of human reduced folate carrier gene expression by wild type p53*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8713-9.
100. Bunik, V.I., et al., *Activation of Mitochondrial 2-Oxoglutarate Dehydrogenase by Cocarboxylase in Human Lung Adenocarcinoma Cells A549 Is p53/p21-Dependent and Impairs Cellular Redox State, Mimicking the Cisplatin Action*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
101. Bunik, V.I., et al., *Regulation of Thiamine (Vitamin B1)-Dependent Metabolism in Mammals by p53*. Biochemistry (Mosc), 2020. **85**(7): p. 801-807.
102. Pulkkinen, V., et al., *The bitter taste receptor (TAS2R) agonists denatonium and chloroquine display distinct patterns of relaxation of the guinea pig trachea*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **303**(11): p. L956-66.
103. Lossow, K., et al., *Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans*. J Biol Chem, 2016. **291**(29): p. 15358-77.
104. Hofer, A., et al., *Chemoselective Dimerization of Phosphates*. Organic Letters, 2016. **18**(13): p. 3222-3225.
105. Mezheritska, O.A., et al., *Regulation of Malate Dehydrogenases and Glutamate Dehydrogenase of Mammalian Brain by Thiamine in vitro and in vivo*. Biochemistry (Mosc), 2020. **85**(1): p. 27-39.
106. Carpenter, K.J., *The discovery of thiamin*. Ann Nutr Metab, 2012. **61**(3): p. 219-23.
107. Liu, D., Z. Ke, and J. Luo, *Thiamine Deficiency and Neurodegeneration: the Interplay Among Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy*. Mol Neurobiol, 2017. **54**(7): p. 5440-5448.
108. Zhang, G., et al., *Thiamine Nutritional Status and Depressive Symptoms Are Inversely Associated among Older Chinese Adults*. The Journal of Nutrition, 2013. **143**(1): p. 53-58.
109. Bunik, V.I., *Benefits of Thiamin (Vitamin B1) Administration in Neurodegenerative Diseases may be Due to Both the Coenzyme and Non-coenzyme Roles of Thiamin*. Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism, 2014. **04**(06).
110. Gibson, G.E., et al., *The alpha-ketoglutarate-dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration*. Mol Neurobiol, 2005. **31**(1-3): p. 43-63.
111. Costantini, A., et al., *High-dose thiamine improves the symptoms of Friedreich's ataxia*. BMJ Case Rep, 2013. **2013**.
112. Costantini, A. and R. Fancellu, *An open-label pilot study with high-dose thiamine in Parkinson's disease*. Neural Regen Res, 2016. **11**(3): p. 406-7.

113. Snodgrass, S.R., *Vitamin neurotoxicity*. Molecular Neurobiology, 1992. **6**(1): p. 41-73.
114. Vimokesant, S.L., et al., *Effects of betel nut and fermented fish on the thiamin status of northeastern Thais*. Am J Clin Nutr, 1975. **28**(12): p. 1458-63.
115. Moon, S.-J., M.-H. Kang, and H.-M. Park, *Clinical signs, MRI features, and outcomes of two cats with thiamine deficiency secondary to diet change*. Journal of Veterinary Science, 2013. **14**(4).
116. Croft, L., et al., *Clinical evaluation and biochemical analyses of thiamine deficiency in Pacific harbor seals (Phoca vitulina) maintained at a zoological facility*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2013. **243**(8): p. 1179-1189.
117. Yudkin, W.H., *Thiaminase, the Chastek-Paralysis Factor*. Physiological Reviews, 1949. **29**(4): p. 389-402.
118. Balk, L., et al., *Widespread episodic thiamine deficiency in Northern Hemisphere wildlife*. Scientific Reports, 2016. **6**(1).
119. Lonsdale, D., *A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives*. Evid Based Complement Alternat Med, 2006. **3**(1): p. 49-59.
120. Gold, M., R.A. Hauser, and M.F. Chen, *Plasma thiamine deficiency associated with Alzheimer's disease but not Parkinson's disease*. Metab Brain Dis, 1998. **13**(1): p. 43-53.
121. Pan, X., et al., *Measurement of Blood Thiamine Metabolites for Alzheimer's Disease Diagnosis*. EBioMedicine, 2016. **3**: p. 155-62.
122. Pan, X., et al., *Enhanced Activities of Blood Thiamine Diphosphatase and Monophosphatase in Alzheimer's Disease*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0167273.
123. Mkrtchyan, G.V., et al., *Thiamine preserves mitochondrial function in a rat model of traumatic brain injury, preventing inactivation of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex*. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2018. **1859**(9): p. 925-931.
124. Barile, A., et al., *Allosteric feedback inhibition of pyridoxine 5' -phosphate oxidase from Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2019. **294**(43): p. 15593-15603.
125. Bettendorff, L., et al., *A general method for the chemical synthesis of γ -³²P-labeled or unlabeled nucleoside 5' -triphosphates and thiamine triphosphate*. Analytical Biochemistry, 2003. **322**(2): p. 190-197.
126. Araujo, W.L., et al., *On the role of the mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in amino acid metabolism*. Amino Acids, 2013. **44**(2): p. 683-700.
127. Leary, S., et al., *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition*. 2020, American Veterinary Medical Association: Schaumburg, IL, USA, 2020.
128. Ebadi, M., D.E. Metzler, and W.R. Christenson, *Convulsant activity of pyridoxal sulphate and phosphonoethyl pyridoxal: Antagonism by GABA and its synthetic analogues*. Neuropharmacology, 1983. **22**(7): p. 865-873.

129. Levintow, L., *The glutamyltransferase activity of normal and neoplastic tissues*. J Natl Cancer Inst, 1954. **15**(2): p. 347-52.
130. Sussmane, S. and J. Koontz, *A Fluorometric Assay for Pyridoxal Kinase Applicable to Crude Cell Extracts*. Analytical Biochemistry, 1995. **225**(1): p. 109-112.
131. Reitman, S. and S. Frankel, *A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases*. American Journal of Clinical Pathology, 1957. **28**(1): p. 56-63.
132. Boer, T.D. and J. Bruinvels, *Assay and Properties of 4-Aminobutyric-2-Oxoglutaric Acid Transaminase and Succinic Semialdehyde Dehydrogenase in Rat Brain Tissue*. Journal of Neurochemistry, 1977. **28**(3): p. 471-478.
133. Mezheritska, O.A., et al., *Regulation of malate dehydrogenases and glutamate dehydrogenase in animal brain with thiamine in vitro and in vivo*. Biochemistry (Mosc), 2020. **85**(1).
134. Bunik, V., et al., *Thiamine-dependent regulation of mammalian brain pyridoxal kinase in vitro and in vivo*. J Neurochem, 2022. **161**(1): p. 20-39.
135. Wagner, T., et al., *Functional plasticity and allosteric regulation of alpha-ketoglutarate decarboxylase in central mycobacterial metabolism*. Chem Biol, 2011. **18**(8): p. 1011-20.
136. Vonrhein, C., et al., *Data processing and analysis with the autoPROC toolbox*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2011. **67**(4): p. 293-302.
137. Kabsch, W., *Xds*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2010. **66**(2): p. 125-132.
138. Winn, M.D., et al., *Overview of the CCP4 suite and current developments*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2011. **67**(4): p. 235-242.
139. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2010. **66**(4): p. 486-501.
140. Aleshin, V.A., et al., *Thiamine Mono- and Diphosphate Phosphatases in Bovine Brain Synaptosomes*. Biochemistry (Mosc), 2020. **85**(3): p. 378-386.
141. Berna, A., et al., *DING proteins; novel members of a prokaryotic phosphate-binding protein superfamily which extends into the eukaryotic kingdom*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(2): p. 170-5.
142. Collombet, J.M., et al., *Eukaryotic DING proteins are endogenous: an immunohistological study in mouse tissues*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9099.
143. Cherrier, T., et al., *Human-Phosphate-Binding-Protein inhibits HIV-1 gene transcription and replication*. Virol J, 2011. **8**: p. 352.
144. Sachdeva, R., et al., *Human X-DING-CD4 mediates resistance to HIV-1 infection through novel paracrine-like signaling*. FEBS J, 2015. **282**(5): p. 937-50.
145. Diemer, H., et al., *Tandem use of X-ray crystallography and mass spectrometry to obtain ab initio the complete and exact amino acids sequence of HPBP, a human 38-kDa apolipoprotein*. Proteins, 2008. **71**(4): p. 1708-20.
146. Morales, R., et al., *Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein*. Structure, 2006. **14**(3): p. 601-9.

147. Lesner, A., et al., *Identification of X-DING-CD4, a new member of human DING protein family that is secreted by HIV-1 resistant CD4(+) T cells and has anti-viral activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **389**(2): p. 284-9.
148. Ivanova, A., et al., *Native X-DING-CD4 protein secreted by HIV-1 resistant CD4+ T cells blocks activity of IL-8 promoter in human endothelial cells infected with enteric bacteria*. Innate Immun, 2012. **18**(4): p. 571-579.
149. Vovk, A.I., L.V. Babii, and I.V. Murav'eva, *[Relative reactivity of thiamine monophosphate and thiamine diphosphate upon interaction with alkaline phosphatase]*. Ukr Biokhim Zh (1999), 2002. **74**(1): p. 93-6.
150. Porzio, E., et al., *Comparison of the DING protein from the archaeon Sulfolobus solfataricus with human phosphate-binding protein and Pseudomonas fluorescence DING counterparts*. Extremophiles, 2018. **22**(2): p. 177-188.
151. di Salvo, M.L., S. Hunt, and V. Schirch, *Expression, purification, and kinetic constants for human and Escherichia coli pyridoxal kinases*. Protein Expression and Purification, 2004. **36**(2): p. 300-306.
152. Kwak, S.E., et al., *Pyridoxine 5'-phosphate oxidase, not pyridoxal kinase, involves in long-term potentiation induction in the rat dentate gyrus*. Hippocampus, 2009. **19**(1): p. 45-56.
153. Mascolo, E., et al., *Pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (Sgll/PNPO) is important for DNA integrity and glucose homeostasis maintenance in Drosophila*. J Cell Physiol, 2020. **235**(1): p. 504-512.
154. Huang, S., et al., *Direct and indirect effects of RNA interference against pyridoxal kinase and pyridoxine 5'-phosphate oxidase genes in Bombyx mori*. Gene, 2016. **587**(1): p. 48-52.
155. van den Heuvel, R.H.H., et al., *Structural Studies on the Synchronization of Catalytic Centers in Glutamate Synthase*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(27): p. 24579-24583.
156. Frank, R.A.W., et al., *The Molecular Origins of Specificity in the Assembly of a Multienzyme Complex*. Structure, 2005. **13**(8): p. 1119-1130.
157. Bunik, V., *Vitamin-dependent multienzyme complexes of 2-oxo acid dehydrogenases : structure, function, regulation and medical implications*. Biochemistry Research Trends. 2017: Nova science publisher. 219 pages.
158. Jha, M.K., S. Jeon, and K. Suk, *Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the Nervous System: Their Principal Functions in Neuronal-glia Metabolic Interaction and Neuro-metabolic Disorders*. Curr Neuropharmacol, 2012. **10**(4): p. 393-403.
159. Aleshin, V.A., et al., *Daytime Dependence of the Activity of the Rat Brain Pyruvate Dehydrogenase Corresponds to the Mitochondrial Sirtuin 3 Level and Acetylation of Brain Proteins, All Regulated by Thiamine Administration Decreasing Phosphorylation of PDHA Ser293*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(15).
160. Jonus, H.C., et al., *Thiamine mimetics sulbutiamine and benfotiamine as a nutraceutical approach to anticancer therapy*. Biomed Pharmacother, 2020. **121**: p. 109648.

161. Eguchi, K. and K. Nakayama, *Prolonged hypoxia decreases nuclear pyruvate dehydrogenase complex and regulates the gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2019. **520**(1): p. 128-135.
162. Reinke, H. and G. Asher, *Crosstalk between metabolism and circadian clocks*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(4): p. 227-241.
163. Rey, G. and A.B. Reddy, *Connecting cellular metabolism to circadian clocks*. Trends in Cell Biology, 2013. **23**(5): p. 234-241.
164. Tomita, T., T. Kuzuyama, and M. Nishiyama, *Structural basis for leucine-induced allosteric activation of glutamate dehydrogenase*. J Biol Chem, 2011. **286**(43): p. 37406-13.
165. Davidoff, G.N., E.J. Roth, and J.S. Richards, *Cognitive deficits in spinal cord injury: epidemiology and outcome*. Arch Phys Med Rehabil, 1992. **73**(3): p. 275-84.
166. Verweij, B., et al., *Mitochondrial dysfunction after experimental and human brain injury and its possible reversal with a selective N-type calcium channel antagonist (SNX-III)*. Neurological Research, 2016. **19**(3): p. 334-339.
167. Robertson, C.L., *Mitochondrial Dysfunction Contributes to Cell Death Following Traumatic Brain Injury in Adult and Immature Animals*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2004. **36**(4): p. 363-368.
168. Wu, G.A. and K.M. Bogie, *Effects of conventional and alternating cushion weight-shifting in persons with spinal cord injury*. Journal of Rehabilitation Research and Development, 2014. **51**(8): p. 1265-1276.
169. Labombarda, F. and I. Jure, *Spinal cord injury drives chronic brain changes*. Neural Regeneration Research, 2017. **12**(7).
170. Chitnis, T. and H.L. Weiner, *CNS inflammation and neurodegeneration*. Journal of Clinical Investigation, 2017. **127**(10): p. 3577-3587.
171. Baufeld, C., et al., *Differential contribution of microglia and monocytes in neurodegenerative diseases*. Journal of Neural Transmission, 2017. **125**(5): p. 809-826.
172. Kinney, J.W., et al., *Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease*. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions, 2018. **4**(1): p. 575-590.
173. Pavlov, D., et al., *Enhanced conditioning of adverse memories in the mouse modified swim test is associated with neuroinflammatory changes – Effects that are susceptible to antidepressants*. Neurobiology of Learning and Memory, 2020. **172**.
174. Allison, D.J. and D.S. Ditor, *Targeting inflammation to influence mood following spinal cord injury: a randomized clinical trial*. Journal of Neuroinflammation, 2015. **12**(1).
175. Maldonado-Bouchard, S., et al., *Inflammation is increased with anxiety- and depression-like signs in a rat model of spinal cord injury*. Brain, Behavior, and Immunity, 2016. **51**: p. 176-195.
176. do Espírito Santo, C.C., et al., *Spinal cord injury by clip-compression induces anxiety and depression-like behaviours in female rats: The role of the inflammatory response*. Brain, Behavior, and Immunity, 2019. **78**: p. 91-104.

177. Wadhawan, A., et al., *Traumatic Brain Injury and Suicidal Behavior: A Review*. Journal of Alzheimer's Disease, 2019. **68**(4): p. 1339-1370.
178. Cai, H., et al., *Acetylation of the Pro-Apoptotic Factor, p53 in the Hippocampus following Cerebral Ischemia and Modulation by Estrogen*. PLoS ONE, 2011. **6**(10).
179. Morris-Blanco, K.C., et al., *Protein Kinase C Epsilon Promotes Cerebral Ischemic Tolerance Via Modulation of Mitochondrial Sirt5*. Scientific Reports, 2016. **6**(1).
180. Vachharajani, V. and C.E. McCall, *Sirtuins: potential therapeutic targets for regulating acute inflammatory response?* Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2020. **24**(5): p. 489-497.
181. Barile, A., et al., *Molecular characterization of pyridoxine 5'-phosphate oxidase and its pathogenic forms associated with neonatal epileptic encephalopathy*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 13621.
182. di Salvo, M.L., et al., *Pyridoxine-5'-phosphate oxidase (Pnpo) deficiency: Clinical and biochemical alterations associated with the C.347g>A (P..Arg116gln) mutation*. Mol Genet Metab, 2017. **122**(1-2): p. 135-142.
183. Bugiardini, E., et al., *Utility of Whole Blood Thiamine Pyrophosphate Evaluation in TPK1-Related Diseases*. Journal of Clinical Medicine, 2019. **8**(7).
184. Chiang, E.-P., et al., *Inflammation causes tissue-specific depletion of vitamin B6*. Arthritis Research & Therapy, 2005. **7**(6).
185. Botez, M.I., et al., *Thiamine and folate treatment of chronic epileptic patients: a controlled study with the Wechsler IQ scale*. Epilepsy Research, 1993. **16**(2): p. 157-163.
186. Vora, B., et al., *Drug–nutrient interactions: discovering prescription drug inhibitors of the thiamine transporter ThTR-2 (SLC19A3)*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2020. **111**(1): p. 110-121.
187. Velisek, L., et al., *Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1992. **346**(5): p. 588-591.
188. Squires, R.F., et al., *Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain*. Life Sci, 1984. **35**(14): p. 1439-44.
189. Huang, R.Q., et al., *Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 986-95.
190. Kalueff, A.V., *Mapping convulsants' binding to the GABA-A receptor chloride ionophore: a proposed model for channel binding sites*. Neurochem Int, 2007. **50**(1): p. 61-8.
191. Shamloo, B. and S. Usluer, *p21 in Cancer Research*. Cancers (Basel), 2019. **11**(8).
192. Deng, Z., et al., *Next-Generation Sequencing Analysis of mRNA Profile in Cisplatin-Resistant Gastric Cancer Cell Line SGC7901*. Med Sci Monit, 2019. **25**: p. 2386-2396.

193. Bahar, E., et al., *Establishment of Acquired Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines Characterized by Enriched Metastatic Properties with Increased Twist Expression*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(20).
194. Brum, M.C., et al., *Osteopontin-c isoform inhibition modulates ovarian cancer cell cisplatin resistance, viability and plasticity*. Oncology Reports, 2020. **45**(2): p. 652-664.
195. Chen, C.-Y., et al., *Adaptation to Endoplasmic Reticulum Stress Enhances Resistance of Oral Cancer Cells to Cisplatin by Up-Regulating Polymerase η and Increasing DNA Repair Efficiency*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **22**(1).
196. Siraj, A.K., et al., *Krupple-Like Factor 5 is a Potential Therapeutic Target and Prognostic Marker in Epithelial Ovarian Cancer*. Frontiers in Pharmacology, 2020. **11**.
197. Aleshin, V.A., et al., *Interplay Between Thiamine and p53/p21 Axes Affects Antiproliferative Action of Cisplatin in Lung Adenocarcinoma Cells by Changing Metabolism of 2-Oxoglutarate/Glutamate*. Frontiers in Genetics, 2021. **12**.
198. Bunik, V.I., G. Raddatz, and S.A. Strumilo, *Translating enzymology into metabolic regulation: the case of the 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex*. Curr Chem Biol, 2013. **7**: p. 74-93.
199. Zhou, X., et al., *The mitochondrial carrier SLC25A10 regulates cancer cell growth*. Oncotarget, 2015. **6**(11): p. 9271-83.
200. Zhou, X., et al., *Inhibition of glutamate oxaloacetate transaminase 1 in cancer cell lines results in altered metabolism with increased dependency of glucose*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 559.
201. Jiang, P., et al., *Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence*. Nature, 2013. **493**(7434): p. 689-693.
202. Woo, S.H., et al., *Down-regulation of malic enzyme 1 and 2: Sensitizing head and neck squamous cell carcinoma cells to therapy-induced senescence*. Head & Neck, 2016. **38**(S1): p. E934-E940.
203. Kil, I.S., et al., *Regulation of replicative senescence by NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase*. Free Radical Biology and Medicine, 2006. **40**(1): p. 110-119.
204. Aleshin, V.A., et al., *Mitochondrial Impairment May Increase Cellular NAD(P)H: Resazurin Oxidoreductase Activity, Perturbing the NAD(P)H-Based Viability Assays*. Cells, 2015. **4**(3): p. 427-51.