Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего

образования «Санкт-Петербургский политехнический университет

Петра Великого»

На правах рукописи

Куликова Вероника Алексеевна

МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕКТОЧНЫХ ПУЛОВ РИБОЗИДОВ НИКОТИНАМИДА И НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

03.01.03 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к. б. н., Никифоров Андрей Анатольевич

Санкт-Петербург – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение	5
1.1. Актуальность работы	5
1.2. Цели и задачи исследования	9
1.3. Научная новизна и практическая значимость	9
1.4. Личный вклад соискателя	10
1.5. Положения, выносимые на защиту	10
1.6. Степень достоверности и апробация результатов	10
2. Обзор литературы	14
2.1. История открытия никотинамидадениндинуклеотида (NAD)	14
2.2. Роль NAD в метаболизме клетки	14
2.3. Роль NAD в клеточном сигналинге	17
2.3.1. ADP-рибозилирование белков	18
2.3.2. NAD-зависимое деацетилирование белков	23
2.3.3. Мобилизация кальция	
2.4. Биосинтез NAD	27
2.5. Метаболизм нуклеотидов	29
2.5.1. Цитозольные 5'-нуклеотидазы человека	31
2.5.2 Переносчики нуклеозидов	33
3. Материалы и методы	

3.1. Материалы
3.2. Культивирование клеток человека и трансфекция
3.3. Создание экспрессионных векторов
3.4. Измерение внутриклеточного NAD
3.5. ЯМР-спектроскопия
3.6. Определение концентрации белка, электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг
3.7. Иммуноцитохимия
3.8. Очистка белков, слитых с 6хHis, при помощи аффинной хроматографии40
3.9. Измерение 5'-нуклеотидазной активности40
3.10. Измерение кинетических параметров 5'-нуклеотидазных реакций41
3.11. ВЭЖХ41
4. Результаты и обсуждение
 4.1. Клетки человека конвертируют никотиновую кислоту в рибозид никотиновой кислоты, который затем выходит из клеток в питательную среду
4.1.1. Оптимизация метода детекции и количественного анализа метаболитов NAD в питательной среде методом ЯМР-спектроскопии
4.1.2. Клетки человека выделяют в питательную среду рибозид никотиновой кислоты
4.2. Цитозольные 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II и CN-III синтезируют нуклеозид NAR в клетках человека

4.3. CN-II и CN-III дефосфорилируют мононуклеотиды NMN и NAMN с
образованием нуклеозидов NR и NAR in vitro51
4.4. Нуклеозид NAR, вышедший из одних клеток человека, может выступать в
роли предшественника NAD в других клетках, не способных использовать Nam
и NA для синтеза NAD59
4.5. Импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться
при помощи белков семейств ENT и CNT66
4.5.1. Анализ стабильности нуклеозидов NAR и NR в различных биологических
жидкостях
4.5.2. Изучение механизма импорта нуклеозидов NR и NAR в клетки
человека
5. Заключение
6. Выводы
Список сокращений и условных обозначений76
Список использованной литературы78
Благодарности91

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность работы

Никотинамидадениндинуклеотид (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) состоит из никотинамида (nicotinamide, Nam) и аденина, соединенных между собой цепочкой, состоящей из двух остатков D-рибозы и двух остатков фосфорной кислоты (Рис. 1.1А). Динуклеотиды NAD и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) хорошо известны как коферменты окислительновосстановительных реакций ключевых метаболических путей, в которых они выступают в роли переносчиков электронов и водорода (см. раздел 2.2). Помимо участия в окислительно-восстановительном метаболизме, NAD ДЛЯ является субстратом нескольких семейств регуляторных белков, контролирующих важнейшие механизмы жизнедеятельности клетки. Одним из примеров такого NAD-зависимог сигналинга является деацетилирование различных белковых мишеней, которое катализируется белками семейства Сиртуинов (silent information regulator-2 (Sir2) like proteins - Sirtuins). Сиртуины отщепляют Nam от динуклеотида NAD и переносят ацетильную группу с остатка лизина белка-мишени на освобожденную ADP-рибозу (ADP ribose, ADPR), в результате чего образуется О-ацетил-ADP-рибоза (O-acetyl-ADP ribose, OAcADPR) (Рис. 1.1Б). Другой важнейшей NAD-зависимой посттрансляционной модификацией белков является ADP-рибозилирование. Перенос одной (моно-ADP-рибозилирование) или нескольких (поли-ADP-рибозилирование) молекул ADPR с NAD на акцепторный белок осуществляется ADP-рибозилтрансферазами (ADP-ribosyl transferases, ARTs) и поли-ADP-рибозилполимеразами (poly-ADP-ribosyl polymerases, PARPs), соответственно (Рис. 1.1Б). Данные NAD-зависимые модификации белков играют ключевую роль в регуляции таких жизненно необходимых процессов в клетке, как экспрессия генов, правильное прохождение по клеточному циклу, секреция инсулина, репарация ДНК, апоптоз, старение и многие другие [1-6]. Кроме того, NAD и NADP являются предшественниками метаболитов, участвующих в мобилизации кальция. ADPR циклазы CD38 и CD157 используют NAD и NADP для синтеза вторичных посредников Ca²⁺зависимого сигналинга, таких как ADPR, циклическая ADP-рибоза (cADPR) и никотиновая кислота адениндинуклеотидфосфат (NAADP) [7] (Рис. 1.1Б). В результате

описанных выше NAD-зависимых процессов динуклеотид расщепляется, так как все они сопряжены с разрывом N-гликозидной связи между Nam и ADPR (см. раздел 2.3). Для эффективного осуществления NAD-зависимых метаболических и сигнальных функций клетке необходимо постоянно поддерживать определенный уровень NAD.



Рисунок 1.1. Метаболизм NAD в клетках человека. (A) Структура NAD и его основных метаболитов. Nam – никотинамид, NA – никотиновая кислота, NR – рибозид никотинамида, NAR – рибозид никотиновой кислоты, NMN – никотинамид мононуклеотид, NAMN – мононуклеотид никотиновой кислоты, NAAD – динуклеотид никотиновой кислоты и аденина. (Б) Предшественниками синтеза внутриклеточного NAD являются: триптофан (Trp), пиридиновые основания Nam и NA, а также нуклеозиды – NR и NAR. Тгр в результате нескольких последовательных ферментативных реакций превращается в хинолиновую кислоту (QA), из которой фосфорибозилтрансферазой **QAPRT** синтезируется NAMN. Nam фосфорибозилтрансферазой NamPRT превращается в NMN, который в свою очередь аденилируется аденилилтрансферазой семейства **NMNAT** NAD. NA до фосфорибозилтрансферазой NAPRT превращается в NAMN. NAMN аденилируется аденилилтрансферазой семейства NMNAT до NAAD, который затем NAD синтетазой (NADS) амидируется до NAD. Нуклеозиды NR и NAR фосфорилируются киназами семейства NRK до NMN и NAMN, соответственно. NAD киназа (NADK) фосфорилирует NAD до NADP. Окисленные и восстановленные формы динуклеотидов, $NAD(P)^+$ и NAD(P)H, играют роль переносчиков водорода в окислительновосстановительных реакциях. Деацетилазы белков семейства сиртуины (Sirtuins) катализируют перенос связанной с белком ацетильной группы на ADP-рибозу (ADPR), в результате чего образуется О-ацетил-ADP-рибоза (OAcADPR). Перенос одной (моно-ADP-рибозилирование) или нескольких (поли-ADP-рибозилирование) молекул ADPR с NAD⁺ на акцепторный белок катализируется ADP-рибозилтрансферазами (ARTs) и поли-АДФ-рибозилполимеразами (PARPs), соответственно. ADPR циклазы CD38 и CD157 используют NAD⁺ и NADP⁺ для синтеза вторичных посредников кальцийзависимого сигналинга, таких как ADPR, циклическая ADP-рибоза (cADPR) и динуклеотидфосфат никотиновой кислоты и аденина (NAADP).

На сегодняшний день известно, что нарушения регуляции уровня NAD в клетках могут быть связаны с развитием таких серьезных патологий, как пеллагра, нейродегенеративные заболевания, диабет и рак [8-11].

Основным способом регуляции уровня NAD в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей предшественников, таких как Nam и никотиновая (nicotinic acid. NA). известных B3, кислота как витамин которые фосфорибозилтрансферазами NamPRT и NAPRT превращаются в соответствующие мононуклеотиды - никотинамидмононуклеотид (nicotinamide mononucleotide, NMN) или мононуклеотид никотиновой кислоты (nicotinic acid mononucleotide, NAMN). Далее NMN и NAMN аденилируются аденилилтрансферазами семейства NMNAT до NAD и динуклеотида никотиновой кислоты и аденина (nicotinic acid adenine dinucleotide,

NAAD), соответственно. NAAD амидируется ферментом NADS с образованием NAD [9, 12] (Рис. 1.1Б).

Недавно было показано, что рибозиды никотинамида (nicotinamide riboside, NR) и никотиновой кислоты (nicotinic acid riboside, NAR) также являются ключевыми предшественниками NAD [13]. Нуклеозиды NR и NAR могут поступать в организм с пищей и фосфорилироваться киназами семейства NRK до мононуклеотидов NMN и NAMN, соответственно. Последующие этапы синтеза NAD совпадают с описанными для Nam и NA (Puc. 1.1Б) (см. раздел 2.4).

Существует также кинурениновый путь синтеза NAD из триптофана (Trp). Trp в результате нескольких последовательных ферментативных реакций превращается в хинолиновую кислоту (QA), из которой фосфорибозилтрансферазой QAPRT синтезируется NAMN (Puc. 1.1.Б).

В последние годы появилось много данных, свидетельствующих о том, что экзогенный нуклеозид NR эффективно увеличивает уровень внутриклеточного NAD и предотвращает развитие различных патологий. Так, было показано, что добавление в пищу нуклеозида NR повышает уровень NAD в тканях животных, вследствие чего предотвращает дегенерацию нейронов, приводит к активации митохондриального биогенеза и подавляет развитие митохондриальной миопатии у животных [14-19] (см. раздел 2.4).

Таким образом, нуклеозиды NR и NAR являются потенциальными терапевтическими агентами для лечения различных нейродегенеративных заболеваний и заболеваний, связанных с нарушением метаболизма.

На сегодняшний день неизвестно, поступают ли нуклеозиды NR и NAR в организм только с пищей, или же они могут синтезироваться в клетках из других предшественников NAD. Также практически ничего не известно о взаимодействии внутри- и внеклеточных пулов данных предшественников NAD в клетках человека. Например, не установлено, могут ли нуклеозиды NR и NAR выходить из клеток и выступать в роли предшественников для синтеза NAD в других клетках. Помимо этого открытым остается вопрос о механизмах импорта данных нуклеозидов в клетки человека.

1.2. Цели и задачи исследования

Целью данной работы является установление механизмов образования внутриклеточных пулов таких ключевых метаболитов биосинтеза NAD, как рибозид никотинамида (NR) и рибозид никотиновой кислоты (NAR), определение способности данных нуклеозидов выходить из клеток и выступать в роли предшественников для синтеза NAD в других клетках, а также изучение механизма импорта нуклеозидов NR и NAR в клетки человека.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Охарактеризовать способность культивируемых клеток человека синтезировать нуклеозиды NR и NAR.
- 2. Установить молекулярные механизмы образования нуклеозидов NR и NAR в клетках человека.
- 3. Установить, могут ли нуклеозиды NR и NAR выходить из одних клеток человека и выступать в роли предшественников NAD в других клетках.
- 4. Охарактеризовать механизм импорта нуклеозидов NR и NAR в клетки человека.

1.3. Научная новизна и практическая значимость

В данной работе мы установили, что нуклеозиды NR и NAR могут не только поступать в организм с пищей, но и синтезироваться в клетках из других метаболитов NAD. Мы впервые описали возможный механизм образования нуклеозидов NR и NAR путем дефосфорилирования мононуклеотидов NMN и NAMN 5'-нуклеотидазами человека. Таким образом, мы показали, что синтез нуклеозидов NR и NAR является неотъемлемой частью метаболизма NAD в клетках человека. Кроме того, мы впервые установили, что клетки могут выделять нуклеозид NAR, который выступает в роли предшественника NAD в соседних клетках, не способных использовать Nam и NA для синтеза NAD. Таким образом, мы продемонстрировали, что одни клетки человека могут поддерживать эффективный синтез NAD в других клетках. Кроме того, мы показали, что импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи белков семейств ENT и CNT.

Результаты, полученные в данной работе, расширяют представления о механизмах поддержания уровня NAD в клетках человека и о взаимопревращениях его ключевых предшественников. Понимание механизмов образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов таких ключевых метаболитов NAD, как нуклеозиды NR и NAR, может помочь в поиске новых мишеней для разработки эффективных терапевтических подходов лечения широкого спектра заболеваний. Полученные в работе данные могут быть использованы в курсах лекций для студентов медицинских и биологических ВУЗов.

1.4. Личный вклад соискателя

Автором самостоятельно выполнен основной объем исследований. Анализ образцов при помощи ЯМР-спектроскопии проводили сотрудники НИК «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого Шабалин К.А. и Нериновский К.Б.

1.5. Положения, выносимые на защиту

- 1. Клетки человека синтезируют нуклеозиды NR и NAR, которые могут выходить из клеток и выступать в роли предшественников для синтеза NAD в других клетках.
- Цитозольные 5'-нуклеотидазы CN-II и CN-III синтезируют нуклеозиды NR и NAR в клетках человека путем дефосфорилирования мононуклеотидов NMN и NAMN, соответственно.
- 3. Нуклеозиды NR и NAR импортируются в клетки человека при помощи переносчиков нуклеозидов семейств ENT и CNT.

1.6. Степень достоверности и апробация результатов

Работа апробацию Институте Цитологии PAH, НИК прошла В в «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского политехнического университета имени Петра Великого и на межлабораторном семинаре в Департаменте молекулярной биологии Университета города Берген (Норвегия). Результаты работы были

представлены на международных и отечественных конференциях. Материалы диссертации были опубликованы в 18 печатных изданиях, из них 3 статьи в международных рецензируемых научных журналах.

Статьи в научных журналах:

1. Kulikova V., Shabalin K., Nerinovski K., Dölle C., Niere M., Yakimov A., Redpath P., Khodorkovskiy M., Migaud M., Ziegler M., and Nikiforov A. Generation, release and uptake of the NAD precursor nicotinic acid riboside by human cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015. 290(45): 27124-27137.

2. Nikiforov A., Kulikova V., and Ziegler M. The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2015. 50(4): 284-297.

3. VanLinden M.R., Dölle C., Pettersen I.K.N., Kulikova V.A., Niere M., Agrimi G., Dyrstad S.E., Palmieri F., Nikiforov A.A., Tronstad K.J., and Ziegler M. Subcellular distribution of NAD+ between cytosol and mitochondria determines the metabolic profile of human cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015. 290(46): 27644-27659.

Тезисы конференций:

1. Ливинская В.А., Никифоров А.А. 5'-нуклеотидазы человека СN-II и CN-III дефосфорилируют мононуклеотиды NMN и NAMN *in vitro*. Студенты и молодые ученые инновационной России: материалы работ молодежной конференции. 2013. Стр.149–151.

2. Ливинская В.А., Ходорковский М.А., Циглер М., Никифоров А.А. Изучение механизмов образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов ключевых NAD-метаболитов. Тезисы докладов и сообщений, представленных на всероссийском симпозиуме по биологии клетки в культуре. *Цитология*. 2013. 55(9). Стр.645.

3. Livinskaya V., Afanasyeva A., Dolle C., Niere M., Khodorkovskiy M., Ziegler M., Nikiforov A. Potential role of cytosolic 5'-nucleotidases in human NAD metabolism. *FEBS Journal*. 2013. 280 (Suppl. 1). P. 181.

4. Nikiforov A., Livinskaya V., Shabalin K., Nerinovski K., Doelle C., Niere M., Khodorkovskiy M., Ziegler M. Generation, release and uptake of the NAD precursor nicotinic acid riboside by human cells. The FEBS EMBO 2014 Conference (August 30 – September 4 2014, Paris, France). *FEBS Journal*. 2014. 281 (Suppl. 1). P. 566-567.

5. Livinskaya V., Shabalin K., Nerinovski K., Doelle C., Niere M., Khodorkovskiy M., Ziegler M., Nikiforov A. Vitamin B3-derived ribosides are authentic intermediates of human NAD metabolism. The FEBS EMBO 2014 Conference (August 30 – September 4 2014, Paris, France). *FEBS Journal*. 2014. 281 (Suppl. 1). P. 615.

6. Ливинская В.А., Шабалин К.А., Нериновский К.Б., Ходорковский М.А., Циглер М., Никифоров А.А. Рибозиды никотинамида и никотиновой кислоты – ключевые метаболиты путей биосинтеза NAD в клетках человека. Тезисы докладов и сообщений, представленных на XVII всероссийский симпозиум "Структура и функции клеточного ядра" (Санкт-Петербург, 28–30 октября 2014 г.). *Цитология*. 2014. 56(9). Стр. 668.

7. Kulikova V., Shabalin K., Yakimov A., Nerinovski K., Nikiforov A., Ziegler M. Degradation of extracellular NAD and its metabolites in cultures of human cells. FEBS Congress 2015 "The Biochemical Basis of Life" (July 4 - 9, 2015, Berlin, Germany). *FEBS Journal*. 2015. 282 (Suppl. 1). P. 127.

8. Nikiforov A., Kulikova V., Shabalin K., Nerinovski K., Dölle C., Niere M., Yakimov A., Redpath P., Khodorkovskiy M., Migaud M., and Ziegler M. Generation, release and uptake of the NAD precursor nicotinic acid riboside by human cells. FASEB SRC "NAD Metabolism & Signaling" (August 9 - 14, 2015, Timmendorfer Strand, Germany). Abstract book, Poster N24.

9. Якимов А.П., Куликова В.А., Нериновский К.Б., Никифоров А.А., Шабалин К.А. Разработка методики для измерения количества внеклеточного NAD и его метаболитов методом ЯМР. Тезисы докладов и сообщений, представленных на II Всероссийскую конференцию "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет" (Санкт-Петербург, 20–22 октября 2015 г.). *Цитология*. 2015. 57 (9). Стр. 668.

10. Куликова В.А., Шабалин К.А., Якимов А.П., Нериновский К.Б., Циглер М., Никифоров А.А. NAD и его ключевые метаболиты: механизмы образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов. Тезисы докладов и сообщений,

представленных на II Всероссийскую конференцию "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет" (Санкт-Петербург, 20–22 октября 2015 г.). *Цитология*. 2015. 57 (9). Стр. 637-638.

11. Shabalin K., Nerinovski K., Yakimov A., Kulikova V., Khodorkovskiy M., Ziegler M., Nikiforov A. NAD metabolome analysis in cultured human cells using ¹H NMR spectroscopy. In Proceedings of the 1st Int. Electron. Conf. Metabolomics (1-30 November 2016). Sciforum Electronic Conference Series. 2016. Vol. 1. C002.

12. Куликова В.А., Шабалин К.А., Фирсанов Д.В., Светлова М.П., Якимов А.П., Нериновский К.Б., Ходорковский М.А., Циглер М., Никифоров А.А. Исследование эффективности и механизмов синтеза NAD из различных внеклеточных предшественников в культивируемых клетках человека. Сборник тезисов V молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 18 – 21 сентября 2016 г.). 2016. Стр. 38.

13. Куликова В.А., Шабалин К.А., Якимов А.П., Нериновский К.Б., Ходорковский М.А., Циглер М., Никифоров А.А. Расщепление внеклеточного NAD и его метаболитов в культурах клеток человека. Научные труды «V Съезд биохимиков России» (Сочи – Дагомыс, 4 - 8 октября 2016 г.). *АсtaNaturae*. 2016, Спецвыпуск том 2. Стр. 245.

14. Якимов А.П., Куликова В.А., Нериновский К.Б., Никифоров А.А., Шабалин К.А. Количественная спектроскопия ЯМР в приложениях метаболомики. XVII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 29 февраля – 5 марта 2016 г.). Сборник тезисов. 2016. Стр. 101.

15. V. Kulikova, L. Onopa, M. Svetlova, L. Solovjeva, D. Firsanov, K. Shabalin, K. Nerinovski, P. Redpath, M. E. Migaud, M. Ziegler, A. Nikiforov. Mechanism of nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside import into human cells. FEBS Congress 2017 " From Molecules to Cells and Back" (September 10 - 14, 2017, Jerusalem, Israel). *FEBS Journal*. 2017. 284 (Suppl. 1). P. 370.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. История открытия никотинамидадениндинуклеотида

С начала прошлого функций века изучением структуры И никотинамидадениндинуклеотида (NAD) занимались многие исследователи, в числе которых четыре Нобелевских лауреата. Впервые это низкомолекулярное соединение открыли в 1906 году английские биохимики Артур Гарден и Уильям Джон Янг, которые изучали ферментативные процессы с участием сахаров. Они показали, что после фракционирования дрожжевого экстракта с центрифугирования помошью низкомолекулярная и высокомолекулярная фракции теряли способность к ферментации сахаров, однако, их объединение восстанавливало ферментативную активность. Авторами был сделан вывод о существовании высокомолекулярного фермента и низкомолекулярного кофермента, необходимого для его работы [20]. Кофермент был впервые успешно выделен из дрожжевых экстрактов в конце 1920-х годов шведским биохимиком Ханс фон Эйлер-Хельпин, который определил, что в состав соединения входит сахар, аденин и фосфат [21]. В 1936 году, работая над изучением алкогольного брожения, немецкий биохимик Отто Генрих Варбург установил способность кофермента переносить водород от одной молекулы к другой. Позже Варбург описал, что данное низкомолекулярное соединение является динуклеотидом и состоит из двух мононуклеотидов: аденозинмонофосфата и никотинамидмононуклеотида, содержащего похожий на пиридин никотинамид [22]. Таким образом была впервые описана структура никотинамидадениндинуклеотида (Рис. 1.1А), который в последующие годы был признан универсальным фактором, участвующим в ферментации сахаров и дыхании в различных организмах.

2.2. Роль NAD в метаболизме клетки

NAD является коферментом дегидрогеназ, катализирующих окислительновосстановительные реакции центральных метаболических путей в клетках человека. Ключевые реакции гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и β-окисления жирных кислот сопряжены с обратимым переходом NAD из его окисленной формы (NAD⁺) в восстановленную форму (NADH) (Рис. 2.1А). В процессе окисления различных соединений NAD⁺ принимает электроны и водород и восстанавливается до NADH. При восстановительных реакциях NADH, в свою очередь, окисляется до NAD⁺ (Рис. 2.1Б). Таким образом, NAD играет важнейшую роль в клеточном метаболизме.

Гликолиз является центральным путем катаболизма глюкозы. В реакции, катализируемой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) dehydrogenase, GAPDH), глицеральдегид-3-фосфат окисляется 1.3до бисфосфоглицерата (1,3BPG), при этом NAD⁺ восстанавливается до NADH (Рис. 2.1А). Конечным продуктом гликолиза является пируват, который превращается в лактат с помощью лактатдегидрогеназы (lactate dehydrogenase, LDH) в реакции, сопряженной с NADH NAD^+ . Помимо окислением ДО этого, пируват транспортируется В митохондриальный матрикс, где с помощью NAD-зависимой пируватдегидрогеназы (pyruvate dehydrogenase, PDH) превращается в ацетил-КоА. Данная реакция сопряжена с восстановлением NAD⁺ до NADH (Рис. 2.1А). Катаболизм жирных кислот также сопряжен с восстановлением NAD⁺ до NADH. Жирные кислоты в цитоплазме образованием ацил-КоА, активируются с который транспортируется В митохондриальный матрикс и окисляется до ацетил-КоА. В реакции окисления, NAD-зависимой гидроксиацил-КоА-дегидрогеназой (Hydroxyacylкатализируемой Coenzyme A dehydrogenase, HADH) β-оксиацил-КоА превращается в β-кетоацил-КоА, который затем окисляется до ацетил-КоА (Рис. 2.1А). Ацетил-КоА далее подвергается Кребса, окислению В Цикле Кребса. Реакции Цикла катализируемые изоцитратдегидрогеназой, кетоглутаратдегидрогеназой и малатдегидрогеназой, также сопряжены с восстановлением NAD⁺ до NADH. Образовавшийся в результате гликолиза, окисления жирных кислот и в Цикле Кребса NADH окисляется до NAD⁺ Комплексом I электрон-транспортной цепи с высвобождением электронов [23]. Процесс передачи электронов по дыхательной цепи сопряжен с выкачиванием протонов из митохондриального матрикса в межмембранное пространство, в результате которого создается протонный градиент. Транспорт протонов по градиенту в митохондриальный матрикс с помощью ATP-синтазы сопряжен с оксилительным фосфорилированием ADP до АТР [24] (Рис. 2.1).



Рисунок 2.1. Роль NAD в окислительно-восстановительных реакциях ключевых метаболических путей. (А) В реакции гликолиза, катализируемой глицеральдегид-3фосфатдегидрогеназой (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), NAD^+ NADH. Далее с помощью лактатдегидрогеназы (lactate восстанавливается до dehydrogenase, LDH) пируват превращается в лактат. Данная реакция сопряжена с окислением NADH до NAD⁺. Также пируват транспортируется в митохондриальный матрикс, где с помощью NAD-зависимой пируватдегидрогеназы превращается в ацетил-КоА. Жирные кислоты в цитоплазме превращаются В ацил-КоА, который транспортируется в митохондриальный матрикс и окисляется до ацетил-КоА. В реакции окисления, катализируемой NAD-зависимой гидроксиацилдегидрогеназой (Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, HADH) β-оксиацил-КоА превращается в β-кетоацил-КоА,

который затем окисляется до ацетил-КоА. Ацетил-КоА окисляется в Цикле Кребса. Несколько реакций Цикла Кребса сопряжены с восстановлением NAD⁺ до NADH. Митохондриальный NADH окисляется Комплексом I электрон-транспортной цепи до NAD⁺, и в ходе оксилительного фосфорилирования синтезируется ATP. **(Б)** NAD⁺ принимает электроны и водород и обратимо переходит в восстановленную форму NADH.

В клетке поддерживается высокое значение соотношения NAD⁺ к NADH. От значения этого соотношения зависит активность различных метаболических ферментов и эффективность важнейших метаболических процессов [25, 26]. NADH, образовавшийся в результате окисления глюкозы не может напрямую пройти в митохондриальный матрикс через внутреннюю мембрану митохондрий. Эквиваленты NADH образовавшиеся в ходе гликолиза переходят в митохондрию с помощью малатаспартатного и глицерофосфатного челноков. Данные челноки регулируют соотношение NAD⁺ и NADH в цитозоле и в митохондриальном матриксе [27].

Фосфорилированная форма NAD - никотинамидадениндинуклеотидфосфат (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) также является необходимой для жизнедеятельности клетки молекулой. Роль данного динуклеотида значительно отличается от роли NAD. NADP, в отличие от NAD, преимущественно встречается в клетке в восстановленном виде и необходим для защиты клетки от окислительного стресса [26]. Например, NADPH необходим для образования таких антиоксидантов, как восстановленный глутатион И тиоредоксин, которые защищают клетку от повреждающего действия активных форм кислорода [28-30]. NADPH является коферментом реакций в анаболических процессах, таких как синтез жирных кислот и холестерина [26].

2.3. Роль NAD в клеточном сигналинге

За последние 20 лет понимание биологической роли NAD претерпело значительные изменения. На сегодняшний день известно, что данный динуклеотид, помимо ключевой роли в энергетическом метаболизме клетки, также играет важнейшую роль в клеточном сигналинге [4, 31]. NAD-зависимые деацетилирование и ADPрибозилирование белков участвуют в регуляции таких жизненно-необходимых процессов в клетке, как экспрессия генов, правильное прохождение клетки по клеточному циклу, секреция инсулина, репарация ДНК, апоптоз, старение и многие другие [6, 32, 33]. Кроме того, из NAD и NADP синтезируются метаболиты, участвующие в мобилизации кальция - ADP-рибоза, циклическая ADP-рибоза и NAADP [34].

2.3.1. ADP-рибозилирование белков

АDP-рибозилирование является NAD-зависимой посттрансляционной модификацией белков, в результате которой NAD расщепляется на Nam и ADP-рибозу, и одна (моно-ADP-рибозилирование) или несколько (поли-ADP-рибозилирование) молекул ADP-рибозы переносятся на специфические аминокислоты белка-мишени (Рис. 2.2A). На сегодняшний день показано, что ADP-рибоза ковалентно присоединяется к остаткам глутамата (E), аспартата (D), лизина (K), аргинина (R) или серина (S) [35-39] (Рис.2.2).

Внутриклеточное ADP-рибозилирование катализируется белками семейства PARP (poly-ADP-ribosyl polymerase). Данное семейство включает 17 ферментов [39-41] (Табл. 2.1). Белки PARP1, PARP2, PARP5a и PARP5b являются поли-ADP-рибозилполимеразами и могут присоединять к своим мишеням длинные разветвленные цепочки полимеров ADP-рибозы [42, 43].

Известно, что поли-ADP-рибозилирование играет важнейшую роль в ответе клетки на повреждение ДНК. Наиболее хорошо изучен на сегодняшний день ядерный белок PARP1. Его активность составляет около 90% всей каталитической активности PARP в ответ на повреждение ДНК. PARP1 является молекулярным сенсором одно- и двунитевых разрывов ДНК и играет ключевую роль в репарации данных повреждений [44]. PARP1 связывается с поврежденной ДНК, в результате чего активируется и поли-ADP-рибозилирует себя. [45-48]. гистоны И негистоновые белки хроматина Отрицательный ADP-рибозы заряд полимеров может изменять структуру модифицированных белков и влиять на их способность взаимодействовать с ДНК и другими белками. Так, ADP-рибозилирование гистонов приводит к релаксации хроматина в месте повреждения ДНК, что дает возможность репарационным комплексам подойти к месту повреждения [49, 50]. Кроме того, полимеры ADP-рибозы

могут нековалентно взаимодействовать с репарационными белками, имеющими домен связывания с полимерами, и таким образом, рекрутировать их к месту повреждения [51]



Рисунок 2.2. ADP-рибозилирование белков. (A) ADP-рибозилтрансферазы (ART) и поли-ADP-рибозилполимеразы (PARP) отщепляют Nam от динуклеотида NAD и переносят освобожденную ADP-рибозу на специфические аминокислоты белка-мишени: глутамат (E), аспартат (D), лизин (K), аргинин (R) или серин (S). (Б) Метаболизм ADP-рибозы. Гидролаза ARH1 расщепляет N-гликозидную связь, соединяющую ADP-рибозу с остатком аргинина (R) белка. Гликогидролаза PARG и гидролаза ARH3 расщепляют

О-гликозидную связь в полимерах ADP-рибозы. Ферменты MacroD1, MacroD2 и гликогидролаза TARG1 убирают оставшуюся молекулу ADP-рибозы, присоединенную к остатку глутамата (Е) или аспартата (D). Гидролаза ARH3 также расщепляет N-гликозидную связь, соединяющую ADP-рибозу с остатком серина (S) модифицированного белка. Белок NUDT16 расщепляет фосфодиэфирную связь в ADP-рибозе или в поли-ADP-рибозе, присоединенных к белку. В результате на белке остается ковалентно связанный рибозофосфат (RP), и образуются AMP и AMP, соединенный с рибозофосфатом (AMP-RP).

Помимо участия в ответе клетки на повреждение ДНК, PARP1 играет важнейшую роль в регуляции транскрипции. Установлено, что белок локализуется на промоторах активно-экспрессирующихся генов и ограничивает связывание гистона H1 с ДНК, тем самым поддерживая открытую структуру хроматина, необ для транскрипции [52, 53]. Также PARP1 поли-ADP-рибозилирует различные транскрипционные факторы, тем самым влияя на транскрипционную активность. Например, было показано, что PARP1 модифицирует транскрипционный фактор NELF, который негативно регулирует элонгацию транскрипции PHK-полимеразой II, в результате чего активирует транскрипцию [54].

Большая белков PARP ADP-рибозилтрансферазами, часть являются катализирующими моно-ADP-рибозилирование субстратов (Табл. 2.1). Внутриклеточное моно-ADP-рибозилирование белков важнейшей является регуляторной модификацией. Например, при накоплении в эндоплазматическом ретикулуме (JP) несвернутых белков, так называемом ЭР-стрессе, PARP16 активируется и моно-ADP-рибозилирует киназы IRE1а и PERK. Модификация данных киназ ADP-рибозой увеличивает их активность, в результате чего запускается ответ клетки на ЭР-стресс – увеличение экспрессии шаперонов и подавление трансляции [55, 56]. Также известно, что моно-ADP-рибозилирование серин-треониновой киназы GSK3β белком PARP10 приводит к подавлению её активности [57]. Кроме того, описана роль моно-ADP-рибозилирования в регуляции транскрипции. Белок PARP14 ассоциирован с промоторами генов, транскрипция которых активатора STAT6. зависит OT Индуцированное интерлейкином 4 моно-ADP-рибозилирование гистоновых деацетилаз HDAC2 и HDAC3 белком PARP14 способствует их уходу с промотора и активации STAT6-зависимой транскрипции [58, 59].

Помимо этого, внутриклеточные моно- и поли-ADP-рибозилирование вовлечены в такие клеточные процессы, как апоптоз, прохождение клетки по клеточному циклу, энергетический метаболизм и многие другие [2, 60-63].

В другой классификации белки PARP относят к семейству ADPрибозилтрансфераз, гомологичных дифтерийному токсину (diphtheria toxin-like ADPribosyltransferases, ARTD) [39] (Табл.2.1).

Таблица 2.1. **NAD-зависимые модификации белков.** Использованы источники [64-67].

Белок	Альтернативное	Локализация	Модификация
	название		
PARP1	ARTD1	ядро	поли-ADP-рибозилирование
PARP2	ARTD2	ядро и цитозоль	поли-ADP-рибозилирование
PARP3	ARTD3	ядро и цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP4	ARTD4, vPARP	ядро и цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP5a	ARTD5, TNKS1	цитозоль	поли-ADP-рибозилирование
PARP5b	ARTD6, TNSK2	цитозоль	поли-ADP-рибозилирование
PARP6	ARTD17	цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP7	ARTD14,TIPARP	ядро и цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP8	ARTD16	цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP9	ARTD9, BAL1	ядро и цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP10	ARTD10	ядро и цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP11	ARTD11	ядро и цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP12	ARTD12,	цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP13	ARTD13	цитозоль	-
PARP14	ARTD8, BAL2	ядро и цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
PARP15	ARTD7, BAL3	ядро	моно-ADP-рибозилирование
PARP16	ARTD15	цитозоль	моно-ADP-рибозилирование
ART1	ARTC1	плазматическая	моно-ADP-рибозилирование
		мембрана	
		(эктофермент), ЭР	
ART2	ARTC2	плазматическая	моно-ADP-рибозилирование

		мембрана	
		(эктофермент)	
ART3	ARTC3	плазматическая	моно-ADP-рибозилирование
		мембрана	
		(эктофермент)	
ART4	ARTC4	внеклеточная	моно-ADP-рибозилирование
SIRT1		ядро и цитозоль	деацетилирование
SIRT2		ЦИТОЗОЛЬ	деацетилирование
SIRT3		митохондрия	деацетилирование
SIRT4		митохондрия	моно-ADP-рибозилирование
SIRT5		митохондрия	деацетилирование,
			демалонилирование,
			десукцинилирование
SIRT6		ядро	деацетилирование, моно-ADP-
			рибозилирование,
			деацилирование
SIRT7		ядро	деацетилирование

Помимо внутриклеточного существует также внеклеточное ADP-рибозилирование. Оно катализируются белками семейства ART (ART1-4), которые моно-ADPрибозилируют секретируемые и мембранные белки, в том числе рецепторы. Таким образом, данные ферменты могут регулировать врожденный иммунитет и межклеточные взаимодействия [3, 68]. В другой классификации данные белки относят к семейству ADP-рибозилтрансфераз, гомологичных токсину клостридий (clostridial toxinlike ADP-ribosyltransferases, ARTC) [69] (Табл.2.1).

Монополи-ADP-рибозилирование белков являются обратимыми И модификациями (Рис. 2.2Б). Гликогидролаза PARG (poly-ADP-ribose glycohydrolase) и гидролаза ARH3 (ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3) расщепляют О-гликозидную свзязь в полимерах ADP-рибозы [70-73] (Рис. 2.2Б), в то время как оставшуюся молекулу ADPрибозы, присоединенную к остатку глутамата или аспартата, убирают специальные ферменты - MacroD1 и MacroD2, а также гликогидролаза TARG1 (terminal ADP-ribose protein glycohydrolase1) [74-76] (Рис. 2.2Б). В том случае, если ADP-рибоза присоединена к остатку серина или аргинина акцепторного белка, её убирают гидролазы ARH3 или ARH1, соответственно [77, 78] (Рис. 2.2Б). Также было показано, что белок NUDT16 расщепляет фосфодиэфирную связь в ADP-рибозе или в полимерах, присоединенных к белку. В результате на белке остается ковалентно связанный

рибозофосфат, и образуются АМР и АМР, соединенный с рибозофосфатом [79] (Рис. 2.2Б).

2.3.2. NAD-зависимое деацетилирование белков

Ацетилирование является одной из ключевых регуляторных посттрансляционных модификаций белков. Например. ацетилирование гистонов нейтрализует их положительный заряд и ослабляет взаимодействие с ДНК, способствуя деконденсации хроматина и транскрипции [80]. Реакция ацетилирования катализируется семейством лизинацетилтрансфераз (lysine acetyltransferase, KAT), которые переносят ацетильную группу с ацетил-КоА на остатки лизина белка-мишени [81] (Рис. 2.3А). Данная модификация является обратимой [82]. Удаление ацетильных групп катализируется лизиндеацетилазами (lysine deacetylases, KDAC), которые подразделяются на 4 класса. Деацетилазы I, II и IV классов являются Zn-зависимыми KDAC, в то время как к деацетилазам III класса относят NAD-зависимые KDAC [83] (Рис. 2.3А).

NAD-зависимые лизиндеацетилазы принадлежат к семейству высококонсервативных белков Сиртуинов (silent information regulator-2 (Sir2) like proteins, Sirtuins), которые обнаружены во всех живых организмах от бактерий до человека [84]. Данные ферменты отщепляют Nam от NAD и переносят ацетильную группу с остатка лизина модифицированного белка на ADP-рибозу, в результате чего образуется O-ацетил-ADP-рибоза (O-acetyl-ADP ribose, OAcADPR) [85, 86] (Рис. 2.3Б).

На сегодняшний день в клетках человека охарактеризовано семь членов семейства Сирутинов (SIRT1-7), которые отличаются по своей внутриклеточной локализации и субстратной специфичности [65, 67]. SIRT1,6 и 7 локализованы в ядре, SIRT2 в цитозоле, в то время как SIRT3,4 и 5 – митохондриальные белки [87].



Рисунок 2.3. NAD-зависимое деацетилирование белков. (А) Схема ацетилирования и деацетилирования белка по остатку лизина. Лизинацетилтрансфераза (lysin acetyltransferase, KAT) катализирует реакцию переноса ацетильной группы с ацетил-КоА на остаток лизина белка-мишени. При NAD-независимом деацетилировании Zn-

зависимые лизиндеацетилазы (lysine deacetylases, KDAC) удаляют ацетильную группу с остатка лизина белка. (Б) В случае NAD-зависимого деацетилирования Сиртуины (Sirtuins) отщепляют Nam от динуклеотида NAD и переносят ацетильную группу с остатка лизина белка-субстрата на освобожденную ADP-рибозу, в результате чего образуется O-ацетил-ADP-рибоза (O-acetyl-ADP ribose, OAcADPR).

Впервые NAD-зависимая лизиндеацетилаза была идентифицирована в клетках дрожжей. Белок Sir2 (silent information regulator-2) изначально был описан как компонент гетерохроматина, отвечающий за подавление экспрессии генов на уровне транскрипции и за увеличение продолжительности жизни. Позже был установлен молекулярный механизм регуляции транскрипции белком Sir2, - было показано, что он катализирует NAD-зависимое деацетилирование гистонов H3 и H4, которое приводит к конденсации хроматина и к подавлению транскрипции [88].

Ближайшим гомологом дрожжевого Sir2 в клетках человека является белок SIRT1. Он хорошо известен, как NAD-зависимая деацетилаза гистонов, которая участвует в регуляции транскрипции [88, 89]. SIRT1 взаимодействует с репрессорами транскрипции и рекрутируется к промоторам генов. На промоторах SIRT1 деацетилирует гистоны H3 и H4 и, таким образом, репрессирует транскрипцию генов [90]. Кроме того, SIRT1 взаимодействует с гистоном H1 и деацетилирует его, тем самым формируя факультативный гетерохроматин [91].

Установлено, что помимо гистонов Сиртуины деацетилируют широкий спектр белковых субстратов, включая регуляторные, структурные и каталитически активные белки [92]. NAD-зависимое деацетилирование белков приводит к модуляции их активности, стабильности, локализации, а также способности взаимодействовать с ДНК или другими белками. Таким образом Сиртуины участвуют в регуляции старения, транскипции, прохождения клетки по клеточному циклу, стабильности генома, апоптоза и многих других ключевых процессов в клетке [6, 93].

Важно отметить критическую роль Сиртуинов в регуляции метаболизма клетки. Из-за того, что данные ферменты используют NAD в качестве ко-субстрата, их активность зависит от биоэнергетического статуса клетки, который, помимо всего прочего, определяется концентрацией NAD, а также соотношением NAD⁺/NADH. Так Сиртуины напрямую связывают метаболический статус клетки с сигнальными процессами и, таким образом, участвуют в регуляции ответа клетки на сигналы внешней

среды [4, 94]. Например, SIRT1 деацетилирует ключевой регулятор метаболизма митохондрий PGC-1α, что приводит к увеличению его активности [95]. Помимо этого, мишенями SIRT1 является целый ряд важнейших регуляторных белков, включая FOXO1 и FOXO3, NF-кB, PARP1, p53, протеинкиназу AMPK, и многие другие белки [96]. Цитозольный белок SIRT2 деацетилирует фосфоенолпируваткарбоксикиназу, тем самым активируя её, и усиливает глюконеогенез во время нехватки глюкозы [97]. Кроме того SIRT2 является деацетилазой α-тубулина [98]. Митохондриальный белок SIRT3 ферменты цикла трикарбоновых деацетилирует ключевые кислот. такие как глутаматдегидрогеназа и изоцитратдегидрогеназа и таким образом регулирует метаболизм митохондрий [99].

Помимо деацетилазной активности некоторые Сиртуины обладают и другими каталитическими активностями (Табл. 2.1). Было показано, что SIRT6 является не только деацетилазой, но и ADP-рибозилтрансферазой [100, 101]. Кроме того, SIRT6 может также удалять длинные цепочки ацильных групп жирных кислот с остатков лизина [102]. SIRT5 помимо деацетилирования осуществляет также NAD-зависимое демалонилирование и десукцинилирование субстратов [103, 104]. SIRT4 модулирует активности своих мишеней через ADP-рибозилирование, например, ингибирует глутаматдегидрогеназу [105].

2.3.3. Мобилизация кальция

NAD NADP Также И являются предшественниками ряда метаболитов, участвующих в кальций-зависимом сигналинге. Такие соединения, как никотиновая кислота адениндинуклеотидфосфат (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP), циклическая ADP-рибоза (cyclic ADP-ribose, cADPR) и ADPR являются кальций-мобилизирующими агентами [106-108]. NAADP и cADPR стимулируют высвобождение кальция из внутриклеточных депо. cADPR активирует рианодиновые рецепторы и стимулирует выход кальция из эндоплазматического ретикулума, в то время как NAADP активирует двупоровые кальциевые каналы, обнаруженные в эндолизосомах [109-112]. Кроме того, ADPR может запускать транспорт кальция из внеклеточного пространства путем активации катионного канала TRPM2 на плазматической мембране [110, 113]. Все три молекулы (NAADP, cADPR и ADPR) у

человека синтезируются с помощью двух гликогидролаз - экто-ADP-рибозилциклазы CD38 и его структурного и функционального гомолога CD157 [114]. У млекопитающих никаких других (внутриклеточных) NAD гликогидролаз на сегодняшний день не идентифицировано. Поскольку CD38 является трансмембранным белком II типа с активным сайтом, направленным во внеклеточное пространство, до конца не ясно, образом NAADP И cADPR опосредуют высвобождение каким кальция ИЗ внутриклеточных депо. Кроме того, не ясно, как регулируется присутствие и количество во внеклеточном пространстве субстратов данных экто-ферментов - NAD и NADP. Несколько научных групп показали, что NAD может выходить из клеток различных типов через мембранный белок коннексин 43 [115-117]. Кроме того, есть данные о том, что один из вторичных посредников, cADPR, может входить в клетку через переносчики нуклеозидов [118] или через канал, образованный олигомерным CD38 [119]. Также было показано, что коннексин 43 может иметь две функции – экспортировать NAD и импортировать сADPR в клетку [120]. Недавно было показано, что CD38 может экспрессироваться как трансмембранный белок III типа, активный сайт которого располагается с внутренней стороны мембраны и, таким образом, может синтезировать сADPR в цитозоле [121, 122].

2.4. Биосинтез NAD

В результате всех описанных выше NAD-зависимых сигнальных реакций динуклеотид расщепляется на Nam и ADP-рибозу (Рис. 1.1Б), поэтому для их эффективного осуществления клетке необходимо постоянно поддерживать определенный уровень динуклеотида. Основным способом регуляции уровня NAD в клетке является его биосинтез из поступающих с пищей предшественников: оснований Nam и NA, известных как витамин B3, а также нуклеозидов NR и NAR [9, 123].

На первом этапе биосинтеза NAD из всех предшественников синтезируются мононуклеотиды NMN и NAMN (Рис. 1.1Б). Фосфорибозилтрансфераза NamPRT катализирует реакцию между Nam и фосфорибозилпирофосфатом, в результате которой образуются NMN и пирофосфат (Рис.1.1Б). Еще одним ключевым предшественником NAD является NA, которая фосфорибозилтрансферазой NAPRT превращается в мононуклеотид NAMN [124, 125] (Рис. 1.1Б). Недавно было показано, что нуклеозиды

NR и NAR также являются ключевыми предшественниками NAD. NR и NAR фосфорилируются киназами NRK1 и NRK2 до мононуклеотидов NMN и NAMN [13, 126] (Рис. 1.1Б).

Второй этап биосинтеза NAD является одинаковым для всех известных предшественников. На этом этапе из мононуклеотидов NMN и NAMN образуются динуклеотиды. Ферменты семейства NMNAT катализируют реакцию между NMN и ATP, в результате которой образуется динуклеотид NAD, а из мононуклеотида NAMN и ATP образуется динуклеотид NAAD (Puc 1.1Б). NAAD амидируется до NAD с помощью NAD синтетазы (NADS). Данный фермент использует глутамин в качестве донора NH_2 группы (Puc. 1.1Б).

Анализ внутриклеточной локализации ферментов, вовлеченных в биосинтез NAD, показал, что все они находятся в цитозоле или в ядре, за исключением одного из белков семейства NMNAT – NMNAT3 [127]. Белок NMNAT3 локализован в митохондриальном матриксе и, таким образом, является единственным NAD-биосинтетическим ферментом, который отделен от цитозольно-ядерного пула метаболитов NAD. Синтез NAD в митохондриях млекопитающих, вероятно, зависит от транспорта мононуклеотида NMN из цитозоля. Однако, митохондриальный переносчик для NMN на сегодняшний день не идентифицирован [128].

Кроме того, существует путь синтеза NAD из триптофана (Trp). Trp в результате нескольких последовательных ферментативных реакций превращается в QA, которая фосфорибозилтрансферазой QAPRT превращается в NAMN (Рис. 1.1Б). Далее из NAMN синтезируется NAAD и амидируется до NAD. В процессе синтеза NAD из Trp происходит образование пиридинового кольца, поэтому данный путь называется «*de novo*».

Механизмы транспорта предшественников NAD в клетки человека на сегодняшний день изучены недостаточно хорошо. Установлены переносчики для Trp (SLC7A5 и SLC36A4) и NA (SLC5A8 и SLC22A13) [129-132], однако, каким образом Nam и нуклеозиды NR и NAR импортируются в клетку, до конца не понятно.

Нуклеозид NR предотвращает развитие различных патологий у грызунов

Нарушения регуляции уровня NAD в клетках могут быть связаны с развитием таких серьезных патологий, как пеллагра, нейродегенеративные заболевания, диабет и

рак [8-11]. В последние годы появилось много данных, свидетельствующих о том, что экзогенный нуклеозид NR эффективно увеличивает уровень внутриклеточного NAD и предотвращает развитие различных патологий. На мышиной модели болезни Альцгеймера было показано, что нуклеозид NR стимулирует синтез NAD в нейронах, в результате чего улучшаются когнитивные функции [14]. На крысиной модели индуцированной периферической нейропатии был также показан положительный терапевтический эффект нуклеозида NR [19]. Добавление в питьевую воду нуклеозида NR стимулировало регенерацию печени у крыс, подвергшихся частичной гепатэктомии [18]. Кроме того, было показано, что добавление в пищу нуклеозида NR предотвращает набор веса у мышей, находящихся на диете с высоким содержанием жиров и у мышей, страдающих диабетом 2 типа [15, 17]. Было установлено, что, диета, содержащая нуклеозид NR, приводит к увеличению содержания NAD в печени и мышечной ткани мышей, приводит к активации митохондриального биогенеза и эффективно подавляет развитие митохондриальной миопатии у мышей на ранних и поздних стадиях заболевания [16]. Таким образом, нуклеозид NR является потенциальным агентом для лечения различных нейродегенеративных заболеваний и заболеваний, связанных с нарушением метаболизма.

2.5. Метаболизм нуклеотидов

Предшественниками пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов при синтезе de поvo являются аминокислоты, такие как глутамин, глицин, аспартат, а также такие соединения, как карбамоилфосфат и тетрагидрофолат. В результате нескольких последовательных ферментативных реакций образуется мононуклеотид IMP – центральный пуриновый нуклеотид, из которого уже получаются все остальные пуриновые нуклеотиды и дезоксинуклеотиды. В случае с пиримидинами, de novo синтез приводит к образованию мононуклеотида UMP, из которого уже синтезируются все остальные пиримидиновые нуклеотиды и дезоксинуклеотида IMP.

Такие дезоксинуклеотиды как dADP, dCDP, dGDP и dUDP образуются из соответствующих нуклеозиддифосфатов (NDP) с помощью нуклеозиддифосфатредуктазы во время S-фазы клеточного цикла [134]. dTMP синтезируется посредством метилирования dUMP, после чего фосфорилируется до

dTDP [135]. Все дезоксирибонуклеозиддифосфаты (dNDP) фосфорилуются нуклеозиддифосфаткиназой до трифосфатов (Рис. 2.4).

Другой путь биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов это, так назваемый, «salvage pathway». Нуклеозиды и основания транспортируются в клетку посредством белков-переносчиков [136-138], после чего нуклеозиды фосфорилируются нуклеозидкиназами до мононуклеотидов, а основания превращаются в соответствующие мононуклеотиды с помощью фосфорибозилтрансфераз (Рис. 2.4). В отличие от *de novo* синтеза дезоксинуклеотидов, который может осуществляться только в S-фазу клеточного цикла, большинство ферментов salvage пути активны на протяжении всего клеточного цикла и катализируют синтез дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) для репарации ДНК и для репликации митохондриальной ДНК [133].



Рисунок 2.4. Метаболизм NMP нуклеотидов B клетках человека. нуклеозидмонофосфат, dNMP _ дезоксинуклеозидмонофосфат, NDP нуклеозиддифосфат, dNDP – дезоксинуклеозиддифосфат, NTP – нуклеозидтрифосфат, dNTP дезоксинуклеозидтрифосфат. 1 _ фосфорибозилтрансфераза; 2 нуклеозидкиназа; 3 - нуклеозидмонофосфаткиназа; 4 - нуклеозиддифосфаткиназа; 5 - нуклеотидилтрансфераы; 6 - нуклеозиддифосфатредуктаза; 7 - нуклеазы; 8 - фосфодиэстеразы; 9 – 5'-нуклеотидазы.

В клетках человека описаны 4 дезоксирибонуклеозидкиназы, которые фосфорилируют нуклеозиды и их аналоги до мононуклеотидов: дезоксицитидин киназа (dCK), тимидин киназа 1 (TK1), дезоксигуанозин киназа (dGK) и тимидин киназа 2 (TK2). dCK и TK1 локализованы в цитозоле, в то время как dGK и TK2 являются митохондриальными белками [139]. Кроме того, описано несколько киназ, осуществляющих фосфорилирование вошедших в клетку нуклеозидов, включая аденозинкиназу и уридин-цитидинкиназу [140, 141]. Мононуклеотиды могут превращаться в нуклеозиды с помощью 5'-нуклеотидаз (Рис. 2.4). 5'-нуклеотидазы и нуклеозидкиназы катализируют обратные реакции. В результате работы данных ферментов в клетке сохраняется динамический баланс между фосфорилированием и дефосфорилированием, который позволяет быстро реагировать на изменения метаболических или физических условий увеличением или уменьшением концентрации конкретных нуклеотидов [142].

Мононуклеотиды и их аналоги фосфорилируются до дифосфатной формы с помощью семейства нуклеозидмонофосфаткиназ [143]. А дифосфатные формы нуклеотидов, в свою очередь, фосфорилируются до трифосфатной формы с помощью нуклеозиддифосфаткиназ [144, 145]. Нуклеозидтрифосфаты также могут образовываться в результате гидролиза нуклеиновых кислот нуклеазами (Рис. 2.4). Обратная реакция - дефосфорилирование (d)NDP и (d)NTP до мононуклеотидов, катализируюется фосфодиэстеразами (Рис. 2.4).

Поддержание сбалансированного пула (d)NTP необходимо для правильного синтеза РНК и ДНК. Увеличение уровня нуклеозидтрифосфатов или изменение количества одного (d)NTP по отношению к другим приводит к снижению точности репликации ДНК *in vitro* и связано с различными мутациями и хромосомными абберациями *in vivo* [146, 147].

2.5.1. Цитозольные 5'-нуклеотидазы человека

5'-нуклеотидазы катализируют дефосфорилирование нуклеозидмонофосфатов и регулируют уровни нуклеотидов и нуклеозидов в клетке. У человека охарактеризовано

семь 5'-нуклеотидаз, различающихся по локализации, субстратной специфичности и уровням экспрессии в различных тканях. Пять ферментов локализованы в цитозоле (CN-IA, CN-IB, CN-II, CN-III и CdN), один фермент находится в митохондриальном матриксе (MdN) и еще одна 5'-нуклеотидаза является экто-ферментом (CD73). Из пяти цитозольных 5'-нуклеотидаз четыре фермента дефосфорилируют мононуклеотиды, а один дезоксимононуклеотиды [133, 148, 149].

5'-нуклеотидаза	Локализация	Субстраты	Кофактор
CD73	Плазматическая	AMP, GMP, UMP,	-
	мембрана, эктофермент	СМР и др.	
CN-IA	Цитозоль	AMP, dCMP,	ADP
		dAMP, dGMP,	
		dIMP	
CN-IB	Цитозоль	AMP	ADP
CN-II	Цитозоль	IMP, dIMP, GMP,	ATP
		dGMP	
CN-III	Цитозоль	CMP, UMP, dCMP,	-
		dUMP	
CdN	Цитозоль	3'- и 5'- дезокси-	-
		нуклеотиды	
MdN	Митохондрия	5'-dUMP,	-
		5'-, 3'-dTMP, UMP	

Таблица 2.	2.5	5'-н	уклеотидазы	человека.
------------	-----	------	-------------	-----------

5'-нуклеотидаза CN-IA была впервые описана как AMP-специфичная нуклеотидаза [150]. Уровень экспрессии мPHK данного фермента максимален в скелетных и сердечной мышцах, но CN-IA также экспрессируется в некоторых других тканях [150]. Данная нуклеотидаза является тетрамером и активируется ADP и в меньшей степени GTP [150, 151]. Активность CN-IA зависит от наличия ионов Mg²⁺. Субстратная специфичность CN-IA довольно широкая, однако, наиболее предпочтительными субстратами являются AMP и пиримидиновые дезоксирибонуклеотиды [150, 152]. Данная 5'-нуклеотидаза отвечает за образование внутриклеточного аденозина в условиях ишемии и гипоксии [153-155]. 5'-нуклеотидаза CN-IB является близким гомологом CN-IA, она также дефосфорилирует AMP и активируется ADP [156]. На сегодняшний день данная нуклеотидаза мало изучена.

CN-II экспрессируется практически во всех тканях. Данная нуклеотидаза является активируется ATP. CN-II тетрамером И аллостерически преимущественно дефосфорилирует IMP, dIMP, GMP, dGMP И XMP, a также обладает фосфотрансферазной активностью [157, 158]. Активность CN-II зависит от наличия ионов Mg²⁺ [157]. Данная 5'-нуклеотидаза играет важную роль в регуляции уровня пуриновых нуклеотидов [159, 160].

CN-III единственная 5'-нуклеотидаза функционирующая в виде мономера. Изначально данная нуклеотидаза была описана как 5'-нуклеотидаза эритроцитов. На сегодняшний день известно, что данный фермент широко распространен в тканях, эритроцитах ОН играет критическую роль [161]. **CN-III** однако, только В дефосфорилирует только пиримидиновые мононуклеотиды, такие как СМР, UMP и 5'-нуклеотидаза дезоксимононуклеотиды [162]. Также данная обладает фосфотрансферазной активностью. Как и у других 5'-нуклеотидаз активность CN-III зависит от наличия инонов Mg^{2+} , но не зависит от ATP, ADP и других кофакторов [162].

Наиболее хорошо изучена роль CN-III при созревании эритроцитов. CN-III катаболизирует CMP и UMP, образующиеся в результате деградации PHK [161, 163, 164]. В процессе созревания эритроцитов ядро и митохондрии разрушаются, поэтому энергию, необходимую для функционирования клетки получают с помощью гликолиза. У пациентов, гомозиготных по мутациям в CN-III, развивается гемолитическая анемия. Данное состояние характеризуется гемолизом и массивным накоплением мононуклеотидов CMP и UMP, препятствующих гликолизу в эритроцитах [161].

2.5.2. Переносчики нуклеозидов

человека нуклеозиды проникают в клетки посредством У переносчиков, принадлежащих к двум семействам трансмембранных белков SLC29 и SLC28. В SLC29 семейство входят энергонезависимые уравновешивающие переносчики нуклеозидов (equilibrative nucleoside transporters, ENT), обеспечивают которые диффузию нуклеозидов через плазматическую мембрану и обладают широкой субстратной специфичностью. Белки семейства SLC28 являются концентрирующими переносчиками нуклеозидов (concentrative nucleoside transporters, CNT), которые ко-транспортируют с нуклеозидами катионы натрия и водорода [138, 165].



Рисунок 2.5. Нуклеозидные переносчики семейств ENT и CNT. Концентрирующие переносчики нуклеозидов (concentrative nucleoside transporters, CNT) ко-транспортируют с нуклеозидами катионы натрия и водорода. Энергонезависимые уравновешивающие переносчики нуклеозидов (equilibrative nucleoside transporters, ENT) обеспечивают диффузию нуклеозидов через плазматическую мембрану по градиенту концентрации.

В ЕNT семейство переносчиков входят 4 белка (ENT1-4), тогда как CNT семейство состоит из трех переносчиков (CNT1-3). Данные переносчики играют ключевую роль в импорте в клетки человека нуклеозидов и оснований, которые используются для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Более того, данные переносчики могут модулировать концентрацию аденозина, доступного для рецепторов на поверхности клетки, и, тем самым, участвовать в регуляции многих физиологических процессов от нейропередачи до сердечно-сосудистой деятельности [138, 165].

Переносчик	Локализация	Транспортируемые	Тип
		соединения	транспорта
ENT1	Плазматическая	Пуриновые и	Уравновешивающий
	мембрана	пиримидинове	
		нуклеозиды	
ENT2	Плазматическая	Пуриновые и	Уравновешивающий
	мембрана	пиримидинове	
		нуклеозиды и	
		основания	
ENT3	Лизосомальные и	Пуриновые и	не идентифицирован
	митохондриальные	пиримидинове	
	мембраны	нуклеозиды и	
		некоторые основания	
ENT4	Плазматическая	Аденозин, катионы,	не идентифицирован
	мембрана	моноамины	
CNT1	Плазматическая	Пиримидиновые	Концентрирующий
	мембрана	нуклеозиды и аденозин	(Na ⁺ :нуклеозид, 1:1)
CNT2	Плазматическая	Пуриновые нуклеозиды	Концентрирующий
	мембрана	и уридин	(Na ⁺ :нуклеозид, 1:1)
CNT3	Плазматическая	Пуриновые и	Концентрирующий
	мембрана	пиримидиновые	(Na ⁺ :нуклеозид, 2:1,
		нуклеозиды	H ⁺ : нуклеозид, 1:1)

Таблица 2.3. Переносчики нуклеозидов семейств ENT и CNT.

Семейство уравновешивающих переносчиков нуклеозидов ENT

Белки человека ENT1 и ENT2 присутствуют в большинстве типов клеток и тканей и отвечают за транспорт в клетки широкого спектра пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов, а также оснований [166]. Белок ENT3 также широко распространен в тканях и имеет широкую субстратную специфичность, однако, он функционирует внутри клетки. ENT3 был детектирован в лизосомальных и митохондриальных мембранах [167, 168]. ENT4 локализован на плазматической мембране и транспортирует в клетки аденозин и моноамины в таких органах, как мозг и сердце [169, 170].

S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI) является высокоспецифичным ингибитором переносчика ENT1. NBTI подавляет ENT1-опосредованный транспорт уже при наномолярных концентрациях. ENT2-4 также ингибируются NBTI, однако, необходимы микромолярные концентрации. Менее специфичными ингибиторами ENT являются

ингибиторы тирозиновых и серин/треониновых киназ, такие как Gefitinib и Erlotinib [171].

Ингибиторы нуклеозидных переносчиков семейства ENT используются для модуляции транспорта аденозина и противоопухолевых/противовирусных нуклеозидных аналогов в терапии различных заболеваний [166, 172-175].

Семейство концентрирующих переносчиков нуклеозидов CNT

Bce белка семейства CNT (CNT1-CNT3) транспортируют три через плазматическую мембрану уридин, однако, имеют различную специфичность по отношению к другим субстратам. CNT1 специфичен по отношению к пиримидиновым нуклеозидам, CNT2 к пуриновым, а CNT3 транспортирует и пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды [176-178]. CNT3 более широко распространен в тканях, чем СNT1 и СNT2, кроме того, описана изоформа СNT3, которая экспрессируется и остается активной в эндоплазматическом ретикулуме [179]. CNT1 и CNT2 ко-транспортируют с молекулой нуклеозида катион натрия в соотношении 1:1, в то время как в случае с CNT3 транспорт нуклеозида сопряжен с ко-транспортом двух катионов Na⁺ и одного катиона Н⁺ [180]. Катионы связываются с переносчиками первыми и увеличивают их аффинность к нуклеозидам.

В отличие от переносчиков семейства ENT, для переносчиков CNT известно мало специфичных ингибиторов. Такие вещества как Phloridzin, бензопираноновые производные и родственные соединения ингибируют CNT-опосредованный транспорт при микромолярных концентрациях [181, 182]. Недавно было показано, что два (hienopyrimidine 20-deoxynucleoside (dMeThPmR) соединения И рибонуклеозид (MeThPmR)) являются сильно-связывающимися, селективными, нетранспортируемыми ингибиторами CNT1 [183].
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

Рибозид никотинамида (Biosynth), рибозид никотиновой кислоты (Toronto Research Chemicals). Реагенты для культивирования клеток (Gibco, HyClone, Invitrogen и Биолот). Культуральные чашки флаконы и планшеты (Greiner, Orange Scientific). Для иммуноблотинга использовали следующие антитела: мышиные антитела к пептиду FLAG M2 (Sigma), мышиные к SOD2 D10 (Santa Cruz Biotechnology), и вторичные кроличьи антитела к мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma). Для иммуноцитохимии использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 594 (Invitrogen). Реактивы для усиленной хемилюминесценции (enhanced chemiluminescence, ECL) (GE Healthcare). ДНК-полимеразы, лигазы и рестриктазы (Thermo Scientific и New England Biolabs).

3.2. Культивирование клеток человека и трансфекция

Клетки человека линии НЕК 293 и НерG2 выращивали на поверхности пластиковых культуральных чашек или флаконов в питательной среде ДМЕМ с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина и гентамицина в концентрации 20 мкг/мл при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Клетки человека линии HeLa выращивали в питательной среде Ham's F-12 в аналогичных условиях. Мышиные эмбриональные стволовые клетки mESC E14 выращивали в питательной среде KnockOut DMEM с добавлением лейкемия-ингибирующего фактора (Sigma Aldrich) для подавления спонтанной дифференцировки. FK866 в концентрации 2 мкМ и/или NA, NR или NAR в концентрации 100 мкМ добавляли к клеткам, где указано. Временную трансфекцию клеток осуществляли с использованием реагента Effectene (Qiagen) согласно протоколу производителя или с помощью кальций-фосфатного метода. Эксперименты с ко-культивированием проводили с использованием ThinCert вставок (размер пор 0.4 мкм, Greiner Bio-One). Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ-теста.

3.3. Создание экспрессионных векторов

Для экспрессии в клетках человека белков, слитых с пептидом FLAG, последовательности ДНК, кодирующие данные белки, вставляли в экспрессионный вектор pFLAG-CMV-5a (Sigma). Для экспресии в *E. coli* белков, слитых с 6xHis, последовательности ДНК, кодирующие данные белки, вставляли в экспрессионный вектор pET-24a (Novagen).

3.4. Измерение внутриклеточного NAD

Клетки человека линии НЕК 293 выращивали в 96-луночном планшете. Внутриклеточный NAD измеряли используя NAD+/NADH Cell-Based Assay kit (Cayman Chemical) согласно протоколу производителя.

3.5. ЯМР-спектроскопия

Кондиционированную питательную среду, взятую от трансфицированных и нетрансфицированных клеток человека линии НЕК 293 или HepG2 и от мышиных эмбриональных стволовых клеток mESC E14 собирали и хранили при минус 80 °C. Для осаждения белков образцы инкубировали на льду с двумя объемами ацетонитрила (Biosolve) в течение 30 минут, после чего центрифугировали при 15000 g в течение 30 минут при 4 °C. Надосадочную жидкость лиофилизовали и ресуспендировали в буферном растворе, приготовленном на основе D_2O и содержащем 50 мM NaP_i (pH 6.5) и 1 мМ сахарозу, которую использовали в качестве внутреннего стандарта химического сдвига (δ (¹H), 5.42 ppm) и концентрации. 100 мкМ стандартные растворы Nam, NA, NR и NAR были приготовлены с использованием данного буферного раствора. Образцы хранили при минус 80 °C. Все ЯМР эксперименты проводили с использованием спектрометра DirectDrive System 700 (¹Н 700 MHz, Varian, США), оборудованного 5 мм 13C/15N инверсным датчиком с градиентом магнитного поля вдоль оси Z, при 25 °C. Для регистрации ¹Н спектра использовали импульсную последовательность с подавлением сигнала растворителя PRESAT ИЗ библиотеки стандартных последовательностей (Varian, ChemPack 4.1). Были использованы следующие параметры: время релаксационной задержки 2.0 сек, время регистрации спада свободной индукции 3.9 сек, число сканирований (повторений импульсной последовательности) 13800. Данные ЯМР эксперимента были обработаны с использованием программного обеспечения Varian VNMRJ, версия 4.2 и Mestrelab Mestrenova 8.1. Концентрации метаболитов определяли путем интегрирования соответствующих неперекрывающихся сигналов протонов co следующими химическими сдвигами ($\delta(^{1}H)$): 8.72 ppm для Nam, 8.61 ppm для NA, 9.62 или 9.29 ppm для NR и 9.47 или 9.16 ppm для NAR.

3.6. Определение концентрации белка, электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг

Концентрацию белка определяли с помощью реагента Quick Start Bradford 1xDye Reagent (Bio-Rad) или с помощью набора BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Клеточные лизаты готовили в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 2 % ДСН, 0.01 % бромфенол синий, 10 % глицерин и 100 мМ DTT, при помощи инкубации в течение 10 минут при 95 °C. Электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг проводили по стандартным протоколам. Для иммунодетекции использовали ECL. Использование одинакового количества белка при нанесении образцов на гель подтверждали с помощью окраски геля Кумаси или с помощью окраски мембраны с использованием антител к белку SOD2.

3.7. Иммуноцитохимия

Для фиксации клеток использовали 4 % формальдегид, на основе PBS. Для пермеабилизации использовали 0.5 % Triton X-100 на основе PBS. Для окрашивания ядер использовали краситель DAPI. Изображения получали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Leica DMI6000B (Leica Microsystems) с набором объективов x10, x40 и x100.

3.8. Очистка белков, слитых с 6хНіѕ, при помощи аффинной хроматографии

Компетентные клетки E. coli (Rosetta, DE3) трансформировали векторами, кодирующими слитые с 6хНіѕ белки СN-IA, CN-II, CN-III или Sdt1. Экспрессию рекомбинантных белков индуцировали добавлением 0.1 мМ изопропил-бета-Dтиогалактопиранозида (ИПТГ) (для CN-III-His, CN-III-His и Sdt1-His) или 0.5 мМ ИПТГ (для CN-IA-His). Затем клетки растили в течение 3 часов при температуре 22 °С (для CN-II-His, CN-III-His и Sdt1-His) или при температуре 37 °С (для CN-IA-His) и осаждали центрифугированием. Осадки клеток, в которых были экспрессированы белки CN-II-His, CN-III-His или Sdt1-His, ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 300 мМ NaCl и 10 мМ Имидазол. Осадок клеток, в которых был экспрессирован белок CN-IA-His, ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 300 мМ NaCl, 10 мМ Имидазол, 10 % глицерин и 10 мМ 2меркаптоэтанол. Клетки лизировали добавлением лизоцима в конечной концентрации 1 мг/мл и ообрабатывали ультразвуком и центрифугировали при 15000 g в течение 30 минут при 4 °C. Белки CN-IA-His, CN-II-His, CN-III-His и Sdt1-His очищали с помощью Ni-NTA агарозы (Ni-NTA Agarose, Qiagen) согласно протоколу производителя. Диализ очищенных белков проводили против буферного раствора, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl и 1 мМ DTT. Затем к очищенным белкам добавляли глицерин (в конечной концентрации 10 %) и BSA (в конечной концентрации 250 нг/мл), после чего образцы хранили при минус 80 °С.

3.9. Измерение 5'-нуклеотидазной активности

Ферментативную активность выделенных рекомбинантных белков определяли путем измерения высвобождающегося в ходе 5'-нуклеотидазной реакции неорганического фосфата (P_i). Количество P_i измеряли с помощью набора ATPase Assay kit (Innova Biosciences) согласно протоколу производителя. Коротко, CN-IA-His инкубировали с субстратом в буферном растворе, содержащем 50 мМ Hepes (pH 7.0), 5 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 1 мМ ADP и 100 нг/мл BSA. CN-II-His инкубировали с субстратом в буферном растворе, содержащем 50 мМ MgCl₂, 1 мG MgCl₂, 1 мG MgCl₂, 1

растворе, содержащем 50 мМ Tris (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT и 100 нг/мл BSA. Sdt1-His инкубировали с субстратом в буферном растворе, содержащем 50 мМ Hepes (pH 7.0), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT и 100 нг/мл BSA. Ферментативные реакции инициировали добавлением белка и проводили в конченом объеме 40 мкл в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем в реацию добавляли реагент малахитовый зеленый, и измеряли поглощение при длине волны 650 нм с помощью Nanodrop 2000. Активность представляли в микромолях образовавшегося P_i в минуту на миллиграмм белка (мкмоль/мин/мг).

3.10. Измерение кинетических параметров 5'-нуклеотидазных реакций

CN-II-His инкубировали с различными концентрациями IMP, NMN или NAMN в соответствующем буферном растворе (см. «Измерение 5'-нуклеотидазной активности»). Концентарция белка была 1 нг/мл (когда инкубировали с IMP и NAMN) и 5 нг/мл (когда инкубировали с NMN). CN-III-His инкубировали с различными концентрациями СМР, NMN или NAMN в соответствующем буферном растворе (см. «Измерение 5'нуклеотидазной активности»). Концентарция белка была 0.5 нг/мл (при инкубации с CMP), 5 нг/мл (при инкубации с NMN) и 2.5 нг/мл (при инкубации с NAMN). Sdt1-His инкубировали с различными концентрациями CMP. **NMN** NAMN или в соответствующем буферном растворе (см. «Измерение 5'-нуклеотидазной активности»). Концентарция белка была 0.125 нг/мл (при инкубации с СМР), 0.25 нг/мл (при инкубации с NMN) и 1 нг/мл (при инкубации с NAMN). Данные были обработаны с использованием SigmaPlot 12.0, К_м и V_{max} были вычислены методом нелинейной регрессии (ligand binding; one-site saturation).

3.11. ВЭЖХ

Белки CN-II-His, CN-III-His, Sdt1-His инкубировали с 5мМ NMN или NAMN в соответствующих им буферных растворах (см. «Измерение 5'-нуклеотидазной активности») в течение 50 минут при комнатной температуре. После тепловой инактивации (3 мин, 95 °C) образцы фильтровали и анализировали с помощью ВЭЖХ. Нуклеотиды NMN и NAMN и соответствующие им нуклеозиды NR и NAR разделяли с

помощью обратно-фазовой ВЭЖХ на колонке СС 250/3 Nucleosil 100-3 C_{18} HD (Machery and Nagel) и элюировали с помощью градиента ацетонитрила (буферный раствор А: 10 мМ KP_i (pH 5.0), 2 мМ тетрабутиламмония бромид и 3 % ацетонитрил; буферный раствор Б: 10 мМ KP_i (pH 7.5), 2 мМ тетрабутиламмония бромид и 30 % ацетонитрил). Нуклеотиды и нуклеозиды детектировали при длине волны 259 нм и количественно определяли путем интегрирования соответствующих им пиков.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Клетки человека конвертируют никотиновую кислоту в рибозид никотиновой кислоты, который затем выходит из клеток в питательную среду

4.1.1. Оптимизация метода детекции и количественного анализа метаболитов NAD в питательной среде методом ЯМР-спектроскопии

Нами был разработан метод детекции и количественного анализа основных предшественников NAD (Nam, NA, NR и NAR) в питательной среде для культивирования клеток с использованием ЯМР-спектроскопии. Для этого 1 мМ растворы метаболитов Nam, NA, NR и NAR были приготовлены в натрий-фосфатном буферном растворе на основе D_2O , содержащем 1 мМ сахарозы. Образцы анализировали при помощи Varian Direct Drive NMR System 700 Mhz с последующей обработкой в VNMRJ 4.2, Mestrelab Mnova 8.1. В качестве стандарта химических сдвигов и концентрации использовался сигнал сахарозы с химическим сдвигом 5.42 ppm.

Для оптимизации параметров регистрации спектров ЯМР были выполнены следующие шаги:

- 1. Были получены ¹Н-спектры для всех исследуемых метаболитов. Для идентификации и количественного анализа каждого конкретного метаболита были выбраны несколько характерных пиков.
- 2. Были измерены времена релаксации для каждого ¹Н-сигнала, которые потом использовали для оптимизации релаксационной задержки и других параметров регистрации спектров.

3. Была выбрана подходящая импульсная последовательность с подавлением сигнала растворителя. Это позволило регистрировать спектры ЯМР с максимальной чувствительностью.

Так, для каждого из предшественников NAD (Nam, NA, NR и NAR) были выбраны характеристические сигналы, по положению и интенсивности которых в дальнейшем проводили идентификацию метаболитов и их количественный анализ. На Рисунке 4.1A приведены ЯМР-спектры следующих метаболитов: Nam, NA, NR, и NAR, а также их смеси.



Рисунок 4.1. 1Н-ЯМР спектры основных предшественников NAD и стандартной питательной среды DMEM. (A) 700 МГц ¹Н-ЯМР спектры основных предшественников NAD: Nam, NA, NR и NAR, а также их смеси. Стрелками обозначены пики, которые были выбраны для идентификации и количественного анализа соответствующих метаболитов в смеси. (Б) 700 МГц ¹Н-ЯМР спектр питательной среды. Красной линией выделен участок ЯМР спектра, содержащий пики, соответствующие основным предшественникам NAD (Nam, NA, NR и NAR).

В Таблице 4.1 для каждого из этих метаболитов представлены значения химических сдвигов, мультиплетности сигналов и констант спин-спинового взаимодействия, а также времени спин-решеточной релаксации (T₁).

Название соединения	Химический сдвиг, ppm	Мульти- плетность	Константа спин- спинового взаимодействия, Гц	Время спин- решеточной релаксации T1, сек
	8.94	М		13.73
NAM	8.71	D	5.01	7.97
	8.25	D	7.97	8.52
	7.60	Dd	4.93, 7.99	6.29
	9.64	S		3.02
	9.31	D	6.18	2.21
NR	9.02	D	8.03	5.29
	8.31	Т	7.11, 7.11	2.22
	6.29	D	4.39	1.89
	8.94	D	2.14	12.23
NΔ	8.61	D	4.99	9.41
1111	8.25	D	7.9	10
	7.52	Dd	4.90, 7.91	6.44
	9.47	S		2.93
	9.16	D	6.2	2.06
NAR	8.95	D	7.91	4.92
	8.20	Т	7.03, 7.03	2.38
	6.23	D	4.68	1.89

Таблица 4.1. Спектральные параметры основных предшественников NAD.

Далее данный метод был адаптирован для анализа Nam, NA, NR, и NAR в питательной среде для культивирования клеток человека. Стандартная питательная среда ДМЕМ содержит белки, сахара, аминокислоты, витамины и различные ионы, однако, диапазон химических сдвигов, соответствующих исследуемым NAD метаболитам, находится в области ¹Н-ЯМР спектра, в которой не наблюдается сигналов от других химических соединений, содержащихся в среде (Рис. 4.1Б). Входящие в состав сыворотки белки увеличивают вязкость раствора, и ухудшают базовую линию в ЯМР спектрах, что значительно снижает точность количественного анализа. Нами были подобраны оптимальные условия для приготовления ЯМР-образцов. Белковые фракции 60% помощи ацетонитрила. После лиофилизации. образцы осаждали при ресуспендировали в натрий-фосфатном буферном растворе (с рН в диапазоне от 6,0 до 8,5), приготовленном на D₂O. В серии контрольных экспериментов мы убедились в том, что в процессе приготовления образцов, не происходит потери или неспецифического расщепления изучаемых метаболитов. Для каждого из исследуемых соединений была установлена минимальная концентрация для идентификации соединения (не менее 200 нМ).

4.1.2. Клетки человека выделяют в питательную среду рибозид никотиновой кислоты

Для того чтобы установить, могут ли клетки человека, выращиваемые в присутствии оснований Nam и NA в качестве предшественников NAD, синтезировать и выделять в питательную среду нуклеозиды NR и NAR, клетки НЕК 293 культивировали в присутствии Nam и NA в течение 3-х дней, после чего кондиционированную среду анализировали с помощью ЯМР. Ни NR, ни NAR в кондиционированной среде не были детектированы (Puc. 4.2A).



Рисунок 4.2. Клетки человека НЕК 293 конвертируют никотиновую кислоту в рибозид никотиновой кислоты, который затем выходит из клеток в питательную среду. (А) Клетки НЕК 293 выращивали в питательной среде в присутствии Nam и NA и временно трансфицировали векторами, кодирующими FLAG-слитые белки NamPRT или NAPRT. Через 3 дня после трансфекции среду собирали и анализировали с помощью ЯМР-спектроскопии. (Б) Сверхэкспрессию FLAG-слитых белков NamPRT и NAPRT (обозначены звездочками) в клетках подтверждали методом иммуноблотинга с использованием специфических антител к пептиду FLAG. Для контроля белковой нагрузки использовали окрашивание геля красителем Кумасси. (B) Уровень NAD в экспрессирующих NamPRT и NAPRT. Уровень клетках, временно NAD В нетрансфицированных клетках (контроль) принимали за 100 %. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

Известно, что у дрожжей нуклеозиды NR и NAR образуются из соответствующих мононуклеотидов NMN и NAMN [184]. Мы предположили, что отсутствие нуклеозидов NR NAR кондиционированной среде, полученной от И В клеток человека. выращиваемых в стандартных условиях, может быть вызвано низкой внутриклеточной концентрацией мононуклеотидов NMN и NAMN. Чтобы проверить данную гипотезу, клетки человека линии НЕК 293 временно трансфицировали векторами, кодирующими FLAG-слитые фосфорибозилтрансферазы NamPRT или NAPRT (Рис. 4.2Б). NamPRT и NAPRT синтезируют мононуклеотиды NMN и NAMN из оснований Nam и NA, соответственно (Рис. 4.1Б). Через 3 дня после трансфекции среду собирали и

47

анализировали с помощью ЯМР. В кондиционированной среде ОТ клеток, сверхэкспрессирующих NamPRT, ни NR, ни NAR не были детектированы (Рис. 4.2А). Однако сверхэкспрессия NAPRT привела к значительному накоплению нуклеозида NAR в кондиционированной питательной среде (Рис. 4.2А, нижний спектр). Мы также измеряли концентрацию внутриклеточного NAD в трансфицированных клетках. Уровень NAD в клетках, сверхэкспрессирующих NAPRT, был существенно повышен, в то время как сверхэкспрессия NamPRT не влияла на уровень внутриклеточного NAD (Рис. 4.2В). Отсутствие влияния сверхэкспрессии NamPRT на уровень динуклеотида в клетках может быть связано с тем, что NamPRT ингибируется NAD [185]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки человека могут конвертировать NA в нуклеозид NAR, который затем выходит из клеток в питательную среду.

4.2. Цитозольные 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II и CN-III синтезируют нуклеозид NAR в клетках человека

Далее мы поставили задачу установить молекулярные механизмы образования нуклеозидов NR и NAR в клетках человека. Известно, что в клетках дрожжей NR и NAR могут образовываться путем дефосфорилирования нуклеозиды соответствующих мононуклеотидов NMN и NAMN 5'-нуклеотидазами Isn1 и Sdt1 [184]. В данной работе мы оценивали способность цитозольных 5'-нуклеотидаз человека CN-IA, CN-II и CN-III [133, 148] дефосфорилировать мононуклеотиды NMN и NAMN и, таким образом, синтезировать нуклеозиды NR и NAR. В качестве положительного контроля использовали дрожжевой белок Sdt1. Клетки НЕК 293 и HeLa временно трансфицировали векторами, кодирующими белки CN-IA, CN-II, CN-III или Sdt1, слитые с N-концом пептида FLAG. Временную сверхэкспрессию рекомбинантных белков подтверждали при помощи иммуноблотинга (Рис. 4.3А). Цитоплазматическую локализацию сверхэкспрессированных FLAG-слитых 5'-нуклеотидаз подтверждали с помощью метода иммунофлуоресцентного анализа (Рис. 4.3Б). Наличие нуклеозидов NR и NAR в среде, полученной после культивирования трансфицированных клеток, анализировали с помощью ЯМР-спектроскопии (Рис. 4.3В). Однако нуклеозиды не были обнаружены в исследуемых образцах (данные не показаны), также как и в контрольной среде, полученной от нетрасфицированных клеток (Рис. 4.2А).



Рисунок 4.3. Сверхэкспрессия 5'-нуклеотидаз CN-IA, CN-II и CN-III в клетках человека. (А) Клетки НЕК 293 временно трансфицировали векторами, кодирующими FLAG-слитые 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1. Сверхэкспрессию FLAGслитых белков в клетках подтверждали методом иммуноблотинга с использованием специфических антител к пептиду FLAG. Для контроля белковой нагрузки использовали окрашивание антителами к SOD2. (Б) Клетки HeLa временно трансфицировали векторами, кодирующими FLAG-слитые 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1. локализацию FLAG-слитых белков Цитозольную подтверждали методом иммуноцитохимии. Для детекции FLAG-слитых нуклеотидаз использовали антитела к пептиду FLAG. Для визуализации клеточных ядер использовали краситель DAPI. (B) Схематическое изображение экспериментального подхода. 5'-нуклеотидазы (5'-NT) сверхэкспрессировали или ко-экспрессировали с NamPRT или NAPRT в клетках

человека в присутствии Nam и NA. Выход нуклеозидов NR и NAR в питательную среду детектировали с помощью ЯМР-спектроскопии.

Ранее на Рисунке Рис. 4.2А было продемонстрировано, что сверхэкспрессия белка NAPRT в клетках приводит к накоплению нуклеозида NAR в кондиционированной среде. Далее мы ко-экспрессировали NAPRT с каждой из изучаемых 5'-нуклеотидаз в НЕК 293 И HepG2 (Рис. 4.4). Количество нуклеозида NAR клетках В кондиционированной среде значительно увеличивалось после ко-экспрессии 5'нуклеотидаз CN-II, CN-III или Sdt1 с NAPRT, по сравнению с одиночной экспрессией NAPRT. В случае ко-экспрессии с CN-IA наблюдаемый эффект был менее выражен (Рис. 4.4).



Рисунок 4.4. Цитозольные 5'-нуклеотидазы СN-IA, CN-II и CN-III синтезируют нуклеозид NAR в клетках человека. Клетки НЕК 293 (А) и НерG2 (Б) были трансфицированы вектором, кодирующим белок NAPRT или ко-трансфицированы векторами, кодирующими NAPRT и изучаемые 5'-нуклеотидазы. Через 3 дня после трансфекции среду собирали и анализировали с помощью ЯМР-спектроскопии.

Мы также проводили ко-экспрессию белка NamPRT с каждой из 5'-нуклеотидаз в клетках НЕК 293, однако, в кондиционированной среде нуклеозиды NR или NAR не

удалось детектировать (данные не показаны). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что цитозольные 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II и CN-III синтезируют нуклеозид NAR в клетках человека, в условиях повышенного уровня мононуклеотида NAMN.

4.3. CN-II и CN-III дефосфорилируют мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием нуклеозидов NR и NAR *in vitro*

5'-нуклеотидазы человека CN-IA, CN-II и CN-III имеют довольно широкую субстратную специфичность [133, 148]. СN-IA имеет высокую аффинность к AMP и аллостерически активируется ADP [150]. СN-II предпочтительно гидролизует IMP и GMP и аллостерически активируется ATP [157, 186]. Пиримидиновая 5'-нуклеотидаза CN-III наиболее эффективно дефосфорилирует мононуклеотиды СМР и UMP до соответствующих нуклеозидов [162]. Для того чтобы охарактеризовать способность данных ферментов дефосфорилировать мононуклеотиды NMN и NAMN in vitro, нами были сконструированы прокариотические экспрессионные векторы, кодирующие белки CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1, слитые с N-концом пептида 6хНів. Белки были экспрессированы и выделены из E. coli при помощи аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы (Рис. 4.5А). Для измерения специфических NMN/NAMN 5'-нуклеотидазных активностей выделенных из E. coli рекомбинантных 6хНіѕ-слитых 5'-нуклеотидаз нами был использован колориметрический метод детекции высвободившегося в результате нуклеотидазной реакции неорганического фосфата. Образование NR и NAR в результате данных реакций детектировали с помощью ВЭЖХ (Рис. 4.5Б).



Рисунок 4.5. Изучение NMN/NAMN 5'-нуклеотидазной активности белков CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1 (A) Белки CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1, слитые с N-концом пептида 6хНіз были выделены после экспрессии в *E. coli*. Выделенные белки анализировали после разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. (Б) Схематическое изображение экспериментального подхода. Для измерения NMN/NAMN 5'-нуклеотидазных активностей выделенных из *E. coli* рекомбинантных 6хНіз-слитых 5'-нуклеотидаз (5'-NT) нами был использован колориметрический метод детекции высвободившегося в результате нуклеотидазной реакции неорганического фосфата. Образование NR и NAR в результате данных реакций детектировали с помощью ВЭЖХ.

В первую очередь нами были подобраны оптимальные значения pH ферментативных реакций для изучаемых 5'-нуклеотидаз. Мы установили, что для белков CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1 оптимальными являются pH реакции 7.0, 6.0, 7.5 и 7.0, соответственно (Рис. 4.6).



Рисунок 4.6. Зависимость 5'-нуклеотидазной активности ферментов CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1 от pH реакции. Активность ферментов измеряли с использованием метода детекции высвободившегося в результате 5'-нуклеотидазной реакции неорганического фосфата (см. Материалы и методы). Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

Далее ΜЫ проводили сравнительный анализ способности ферментов дефосфорилировать мононуклеотиды АМР, IMP, CMP, NMN и NAMN при 5 мМ концентрации субстратов (Рис. 4.7, Табл. 4.1). Как и ожидалось, каждая из 5'нуклеотидаз имела наибольшую активность по отношению к соответствующему предпочтительному субстрату (АМР для CN-IA, IMP для CN-II, CMP для CN-III). Помимо AMP 5'-нуклеотидаза CN-IA также эффективно дефосфорилировала нуклеотиды IMP и CMP, но не NMN и NAMN. Активность CN-IA с NMN и NAMN составила менее 1 % от активности белка с АМР. 5'-нуклеотидаза CN-II оказалась наименее специфичной и расщепляла все изучаемые субстраты. Активность CN-II с NAMN составила порядка 50 % от активности CN-II с IMP, в то время как уровень дефосфорилирования NMN был около 7 % от уровня дефосфорилирования IMP. CN-III была наиболее специфичной к СМР и дефосфорилировала АМР, NMN и NAMN с эффективностью примерно 3-6 % от эффективности дефосфорилирования СМР (Рис. 4.7, Табл. 4.2). Дрожжевая 5'-нуклеотидаза Sdt1, в отличие от изучаемых белков человека, эффективнее дефосфорилировала NMN, чем NAMN (Рис. 4.7, Табл. 4.2). Образование NR и NAR 5'-нуклеотидазами CN-II, CN-III и Sdt1 в реакциях с NMN и NAMN подтверждали с помощью ВЭЖХ (Рис. 4.8).



Рисунок 4.7. Субстратная специфичность цитозольных 5'-нуклеотидаз CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1. Изучаемые белки инкубировали с различными мононуклеотидами, взятыми в концентрации 5 мМ. Активность ферментов измеряли с использованием метода детекции высвободившегося в результате 5'-нуклеотидазной реакции неорганического фосфата (см. Материалы и методы). Активность белков с наилучшими субстратами принимали за 100%. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

Таблица 4.2. Субстратная специфичность цитозольных 5'-нуклеотидаз CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1. Приведены 5'-нуклеотидазные активности изучаемых белков с различными мононуклеотидами, взятыми в концентрации 5 мМ. Активность ферментов измеряли с использованием метода детекции высвободившегося в результате 5'нуклеотидазной реакции неорганического фосфата (см. Материалы и методы). Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

5'-NT	Субстрат	Активность,	Относительная
		мкмоль/мин/мг	активность, %
CN-IA	AMP	148.57 ± 3.74	100.0 ± 2.5
	IMP	64.65 ± 2.67	43.5 ± 1.8
	СМР	107.74 ± 1.60	72.5 ± 1.1
	NMN	0.16 ± 0.01	0.1 ± 0.01
	NAMN	0.38 ± 0.03	0.3 ± 0.02
CN-II	IMP	3.25 ± 0.08	100.0 ± 2.5
	AMP	1.62 ± 0.02	50.0 ± 0.6
	СМР	2.34 ± 0.05	72.0 ± 1.5
	NMN	0.23 ± 0.01	7.0 ± 0.3
	NAMN	1.80 ± 0.04	55.5 ± 1.2
CN-III	СМР	9.11±0.23	100.0 ± 2.5
	AMP	0.38 ± 0.02	4.2 ± 0.2
	IMP	0.07 ± 0.01	0.8 ± 0.1
	NMN	0.29 ± 0.01	3.2 ± 0.1
	NAMN	0.59 ± 0.02	6.5 ± 0.2
Sdt1	СМР	20.62 ± 0.43	100.0 ± 2.1
	AMP	1.51 ± 0.09	7.3 ± 0.4
	IMP	1.43 ± 0.03	6.9 ± 0.2
	NMN	7.99 ± 0.25	38.8±1.2
	NAMN	2.27 ± 0.29	11.0 ± 1.4



Рисунок 4.8. 5'-нуклеотидазы СN-II, CN-III и Sdt1 дефосфорилируют мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием нуклеозидов NR и NAR *in vitro*. Образование NR и NAR 5'-нуклеотидазами CN-II, CN-III и Sdt1 подтверждали с помощью ВЭЖХ. Для этого проводили 5'-нуклеотидазные реакции белков CN-II-His, CN-III-His и Sdt1-His с 5 мМ NMN или NAMN, после чего продукты реакции разделяли и анализировали с помощью ВЭЖХ. Нуклеотиды (NMN и NAMN) и нуклеозиды (NR и NAR) детектировали при длине волны 259 нм. AU – единицы поглощения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 5'-нуклеотидазы CN-II, CN-III дефосфорилируют мононуклеотиды NMN и NAMN *in vitro*. Далее мы провели детальное исследование ферментативной кинетики данных реакций (Рис. 4.9).



Рисунок 4.9. Кинетика Михаэлиса-Ментен ферментативных реакций белков СN-II (A), CN-III (Б) и Sdt1 (В) с указанными субстратами. Активность ферментов при различных концентрациях субстратов измеряли с использованием метода детекции высвободившегося в результате 5'-нуклеотидазной реакции неорганического фосфата (см. Материалы и методы). Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

Мы установили кинетические параметры реакций К_М и V_{max} для каждого из белков с NMN, NAMN и с предпочтительным субстратом (Табл. 4.3). Аффинность 5'нуклеотидаз к предпочтительному субстрату была гораздо выше, чем к NMN или NAMN. 5'-нуклеотидазы CN-II и CN-III эффективно дефосфорилируют NMN и NAMN in vitro при миллимолярных концентрациях мононуклеотидов. В клетках концентрация изучаемых мононуклеотидов гораздо ниже. Таким образом, полученные данные 5'-нуклеотидазы **CN-II** позволяют предположить, что человека **CN-III** И дефосфорилируют NMN и NAMN в условиях повышенной концентрации данных

57

мононуклеотидов в клетке. Данное предположение также подтверждается нашими данными о том, что сверхэкспрессия FLAG-слитых белков CN-II и CN-III в клетках человека приводит к образованию NAR только в условиях повышенного синтеза NAMN из NA (Рис. 4.4). Интересно, что значения K_M и V_{max} для реакций дефосфорилирования NMN и NAMN дрожжевым белком Sdt1 очень близки к значениям, полученным для CN-II и CN-III (Табл. 4.3). Однако, несмотря на низкую аффинность к NMN и NAMN, Sdt1 является одним из ключевых ферментов, отвечающих за синтез NR и NAR в клетках дрожжей [184].

Таблица 4.3. Кинетические параметры 5'-нуклеотидазных реакций дефосфорилирования NMN и NAMN белками CN-II, CN-III и Sdt1. Активность ферментов при различных концентрациях субстратов измеряли с использованием высвободившегося в результате 5'-нуклеотидазной метода детекции реакции неорганического фосфата (см. Материалы и методы). Значения К_М и V_{max} были вычислены методом нелинейной регрессии с использованием программы SigmaPlot 12.0. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

5'-NT	Субстрат	К _М , мМ	V _{max} ,
			мкмоль/мин/мг
CN-II	IMP	0.09 ± 0.01	3.27 ± 0.06
	NAMN	3.54 ± 0.62	2.82 ± 0.16
CN-III	CMP	0.03 ± 0.002	9.47 ± 0.08
	NMN	5.08 ± 0.86	0.56 ± 0.04
	NAMN	7.60 ± 0.27	1.46 ± 0.02
Sdt1	CMP	0.13 ± 0.01	20.67 ± 0.33
	NMN	2.28 ± 0.15	10.75 ± 0.22
	NAMN	6.58 ± 1.23	5.17±0.40

Таким образом, CN-II CN-III дефосфорилируют ΜЫ показали, что И мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием нуклеозидов NR и NAR in vitro, однако, эффективного 5'-нуклеотидазам необходимы для катализа миллимолярные концентрации мононуклеотидов.

4.4. Нуклеозид NAR, вышедший из одних клеток человека, может выступать в роли предшественника NAD в других клетках, не способных использовать Nam и NA для синтеза NAD

Итак, мы установили, что клетки человека синтезируют нуклеозид NAR, который затем может выходить из клеток в питательную среду. Для того чтобы выяснить, какое физиологическое значение может иметь выход нуклеозида из клеток, мы использовали экспериментальную модель на основе клеток человека линии HepG2. Известно, что данные клетки не способны синтезировать NAD, используя в качестве предшественника NA [127, 185], так как в них отсутствует фосфорибозилтрансфераза никотиновой кислоты NAPRT, которая катализирует образование NAMN из NA (Рис. 1.1Б). Синтез NAD из Nam –единственного предшественника NAD, который присутствует в стандартной питательной среде,- подавляли добавлением в питательную среду ингибитора NamPRT – FK866 [187]. Клетки НерG2 погибали в присутствии FK866, даже если в среду была добавлена NA (Рис. 4.10А). Временная сверхэкспрессия NAPRT-FLAG полностью восстанавливала выживаемость клеток (Рис. 4.10А), несмотря на то, что при временной трансфекции лишь небольшой процент клеток экспрессировал NAPRT (Рис. 4.11).



Рисунок 4.10. Временная сверхэкспрессия NAPRT в клетках HepG2 восстанавливает выживаемость клеток, выращиваемых в присутствии FK866 и NA. (А) Клетки HepG2 выращивали в присутствии NA. Синтез NAD из Nam подавляли добавлением в среду FK866. Клетки погибали в присутствии FK866. Сверхэкспрессия NAPRT восстанавливала выживаемость клеток. Выживаемость клеток оценивали с

помощью МТТ теста через 7 дней после трансфекции клеток вектором, кодирующим FLAG-слитый белок NAPRT. Выживаемость необработанных нетрансфицированных клеток принимали за 100 %. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. (Б) Сверхэкспрессию FLAG-слитого белка NAPRT (обозначен звездочками) в клетках подтверждали методом иммуноблотинга с использованием специфических антител к пептиду FLAG. Для контроля белковой нагрузки использовали окрашивание геля красителем Кумасси.



Рисунок 4.11. Клетки НерG2, экспрессирующие NAPRT, поддерживают соседние клетки, не способные использовать Nam и NA для синтеза NAD. Клетки HepG2 выращивали в присутствии NA. Синтез NAD из Nam подавляли добавлением в среду FK866. Клетки, временно трансфицировали векторами, кодирующими указанные FLAGслитые белки или пустой вектор. Ядра клеток окрашивали красителем DAPI. Масштабный отрезок – 100 мкм. NMNAT2 - NMN аденилилтрансфераза 2, NADS - NAD синтетаза.

На Рисунке 4.11 представлены данные иммунофлуоресцентного анализа клеток HepG2 после временной трансфекции векторами, кодирующими FLAG-слитые белки, принимающие участие в образовании NAD из NA. Обработка контрольных (трансфицированных пустым вектором) клеток ингибитором FK866 приводило к гибели клеток даже в присутствии NA. Трансфекция клеток векторами, кодирующими NMN аденилилтрансферазу 2 (NMNAT2) или NAD синтетазу (NADS), не влияла на выживаемость клеток. Однако сверхэкспрессия NAPRT приводила к выживанию не только трансфицированных клеток, но и нетрансфицированных клеток культуры (Рис. 4.11). Выживаемость нетрансфицированных клеток в присутствии FK866 и NA означает, что клетки, экспрессирующие NAPRT-FLAG, выделяют в питательную среду какие-то NAD, Nam NA, предшественники отличные ОТ И которые используются нетрансфицированными клетками для синтеза собственного NAD. Для того, чтобы исключить, что данный эффект наблюдался из-за наличия между клетками физического контакта, мы использовали метод ко-культивирования клеток, который позволяет выращивать две различных популяции клеток в одной питательной среде, но при условии отсутствия между ними прямого физического контакта. Клетки одной популяции выращивали в лунке культурального 24-луночного планшета, в которой находилась вставка, на поверхности которой выращивали клетки второй популяции. Клетки, выращиваемые во вставке для ко-культивирования и в лунке культурального планшета, не контактировали друг с другом, но могли обмениваться выходящими из них (Рис. 4.12A). Bo вставке для ко-культивирования метаболитами выращивали нетрансфицированные клетки HepG2. Сверхэкспрессия NAPRT в клетках HepG2, выращиваемых лунке 24-луночного планшета, В значительно увеличивала выживаемость нетрансфицированных клеток во вставке после обработки FK866 и NA (Рис. 4.12Б). Таким образом, мы исключили возможную роль прямых межклеточных контактов.



Рисунок 4.12. Клетки НерG2, экспрессирующие NAPRT, выделяют в питательную среду предшественник NAD, и, таким образом, поддерживают соседние клетки, не способные использовать Nam и NA для синтеза NAD. (А) Клетки НерG2 выращивали в присутствии NA. Синтез NAD из Nam подавляли добавлением в среду FK866. Одну популяцию клеток выращивали в 24-луночном планшете, а другую популяцию выращивали в этой же питательной среде во вставках для ко-культивирования клеток. (Б) Клетки, выращиваемые в 24-луночном планшете, трансфицировали вектором,

кодирующим белок NAPRT-FLAG, после чего оценивали выживаемость клеток, выращиваемых во вставках для ко-култивирования, в присутствии FK866 и NA. Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ теста через 7 дней после трансфекции. Выживаемость необработанных нетрансфицированных клеток, выращиваемых во вставках для культивирования, (контроль) принимали за 100 %. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. Значение *р* вычисляли с помощью t-критерия Стьюдента. PET - полиэстеровая мембрана.

Полученные результаты позволяют предположить, что клетки, экспрессирующие NAPRT-FLAG и синтезирующие NAD из NA, выделяют нуклеозиды NR и/или NAR в питательную среду и снабжают ими клетки, которые неспособны синтезировать NAD из NA (т.к. отсутствует эндогенный белок NAPRT) и Nam (т.к. в среду добавлен ингибитор FK866) (Рис. 6А). В таком случае клетки HepG2 будут выживать в присутствии NR и NAR в качестве единственных доступных предшественников NAD (Рис. 4.13).



Рисунок 4.13. Предлагаемая модель выхода нуклеозидов NR и/или NAR из клеток HepG2, сверхэкспрессирующих NAPRT-FLAG.

В таком случае клетки HepG2 будут выживать в присутствии NR и NAR, в качестве единственных доступных предшественников NAD. Для того чтобы подтвердить данное предположение, мы анализировали выживаемость клеток HepG2 в присутствии FK866

после добавления в питательную среду нуклеозидов NR или NAR. Оба нуклеозида восстанавливали выживаемость клеток до контрольного уровня (Рис. 4.14А). Более того, в кондиционированной среде от клеток HepG2, выращиваемых в присутствии Nam и NA сверхэкспрессирующих NAPRT, было детектировано И временно накопление нуклеозида NAR (Рис. 4.14Б). Однако концентрация нуклеозида NAR в среде была достаточно низкой (около 1.2–1.5 мкМ). Чтобы установить, достаточно ли такой низкой нуклеозида, чтобы концентрации поддерживать выживаемость клеток. ΜЫ инкубировали клетки HepG2 в присутствии FK866 с добавлением в питательную среду NR или NAR в разных концентрациях (10⁻⁹-10⁻⁴ M). Было продемонстрировано, что выживаемость клеток восстанавливается при низких микромолярных концентрациях обоих нуклеозидов. NAR был эффективен уже при концентрации 1 мкМ, а NR при концентрации 10 мкМ (Рис. 4.14В).



Рисунок 4.14. Нуклеозид NAR выходит из клеток HepG2 и используется соседними клетками в качестве предшественника NAD. Клетки HepG2 выращивали в присутствии FK866, NA, NR или NAR. (A) Добавленные в питательную среду нуклеозиды NR и NAR поддерживают синтез NAD и выживаемость клеток в

присутствии FK866. Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ теста через 7 дней после обработки. Выживаемость необработанных клеток (контроль) принимали за 100 %. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. (Б) 700 МГц ¹Н-ЯМР спектры кондиционированной среды, собранной от контрольных (трансфицированных пустым вектором) клеток И от клеток. временно трансфицированных вектором, кодирующим NAPRT. Кондиционированную среду анализировали с помощью ЯМР-спектроскопии через 7 дней после трансфекции. (В) Для поддержания выживаемости клеток, обработанных FK866, достаточно низких микромолярных концентраций нуклеозидов NR и NAR. Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ теста через 7 дней после обработки. Выживаемость необработанных клеток (контроль) принимали за 100 %. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

Таким образом, мы показали, что клетки HepG2, сверхэкспрессирующие NAPRT, конвертируют NA в нуклеозид NAR, который может выходить из клеток и выступать в роли предшественника NAD в других клетках, не способных использовать Nam и NA для синтеза NAD.

Далее, для того чтобы установить, могут ли нетрансфицированные клетки человека синтезировать и выделять в среду нуклеозид NAR, мы культивировали клетки HEK 293 и HeLa в присутствии Nam и NA в течение 4 дней. Затем кондиционированную среду собирали и использовали для культивирования клеток HepG2 в присутствии FK866. В качестве положительного контроля мы использовали кондиционированную среду от клеток HEK 293, временно трансфицированных NAPRT. Кондиционированная среда, полученная от данных клеток, приводила к увеличению уровня выживаемости клеток HepG2, выращиваемых в присутствии FK866 (Рис. 4.15).



Рисунок 4.15. Клетки НЕК 293, экспрессирующие NAPRT, выделяют в питательную среду нуклеозид NAR. Нетрансфицированные клетки НЕК 293 или временно трансфицированные вектором, кодирующим NAPRT, выращивали в течение 4 дней в присутствии Nam и NA. Затем среду собирали, перемешивали в соотношении 2:1 со свежей средой, и полученную смесь использовали для культивирования клеток HepG2 в присутствии или отсутствии FK866. Замену среды клеткам HepG2 проводили каждые 24 часа. Выживаемость клеток HepG2 оценивали через 7 дней.

Кондиционированная среда, полученная от нетрансфицированных клеток НЕК 293 не восстанавливала выживаемость, тогда как среда от клеток HeLa значительно увеличивала уровень выживаемости клеток HepG2, выращиваемых в присутствии FK866 (Рис. 4.16А). Более того, в кондиционированной среде, полученной от клеток HeLa (но не от HEK 293), был обнаружен нуклеозид NAR (Рис. 4.16Б). Возможно, клетки HeLa также выделяют нуклеозид NR, однако, соответствующий ему сигнал был на пределе уровня детекции. Поэтому, для того чтобы сделать вывод о выходе нуклеозида NR из клеток необходимы дальнейшие исследования.



Рисунок 4.16. Нетрансфицированные клетки НеLa выделяют в питательную среду нуклеозид NAR. (A) Нетрансфицированные клетки НЕК 293 или НеLa выращивали в течение 4 дней в присутствии Nam и NA. Затем среду собирали, перемешивали в соотношении 2:1 со свежей средой, и полученную смесь использовали для культивирования клеток HepG2 в присутствии или отсутствии FK866. Замену среды клеткам HepG2 проводили каждые 24 часа. Выживаемость клеток HepG2 оценивали через 7 дней. В качестве контроля в среду добавляли нуклеозид NAR. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. (Б) 700 МГц ¹Н-ЯМР спектры кондиционированной среды, полученной от нетрансфицированных клеток HEK

293 и HeLa. В качестве контроля использовали свежую питательную среду. Звездочкой обозначен пик, предположительно соответствующий нуклеозиду NR. X – неидентифицированный пик.

Таким образом, мы показали, что нуклеозид NAR, вышедший из одних клеток человека, может выступать в роли предшественника NAD в других клетках, не способных использовать Nam и NA для синтеза NAD.

4.5. Импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи белков семейств ENT и CNT

4.5.1. Анализ стабильности нуклеозидов NAR и NR в питательной среде для культивирования клеток

Прежде чем изучать механизм импорта нуклеозидов NR и NAR в клетку, мы выяснили, какова стабильность данных метаболитов в стандартной питательной среде, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (fetal bovine serum, FBS). Для этого NR и NAR инкубировали в питательной среде в течение 24 часов при 37°C. Количество NR и NAR, а также продуктов их расщепления (оснований Nam и NA, соответственно) в образцах определяли с использованием ЯМР-спектроскопии. Мы показали, что при описанных выше условиях NAR оставался стабильным, тогда как около 25% NR расщеплялось до Nam (Puc. 4.17A).



Рисунок 4.17. Расщепление нуклеозидов NR и NAR в питательной среде DMEM, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку. (А) Нуклеозиды NR или NAR добавляли в питательную среду DMEM (без Nam), содержащую 10% фетальную бычью сыворотку (fetal bovine serum, FBS), после чего питательную среду замораживали (контроль) или инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°С. Количество NAD метаболитов в образцах измеряли с использованием ЯМР-спектроскопии. Количество NR и NAR в контрольных образцах принимали за 100%. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. (Б) Нуклеозид NR добавляли в воду (H_2O) или в питательную среду DMEM (без Nam), содержащую 10% FBS (FBS 1 от Gibco, FBS 2 от Biochrom и FBS 3 от Hyclone). Один образец с водой замораживали (контроль), а второй образец с водой и питательные среды инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°С. Количество NAD метаболитов в образцах измеряли с ЯМР-спектроскопии. использованием Количество NR В контрольном образце принимали за 100%. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

Мы протестировали FBS трех разных производителей, и все они давали схожие результаты (Рис. 4.17Б). Интересно, что в контрольном образце, в котором вместо FBS была добавлена вода, уровень расщепления NR был такой же, как и в образцах, содержащих FBS (Рис. 4.17Б). Эти данные свидетельствуют о том, что FBS не содержит ферментативные активности, которые могли бы вносить ощутимый вклад в расщепление изучаемых нуклеозидов.

Тогда, используя аналогичный экспериментальный подход, мы изучили стабильность NR и NAR в водном растворе. Для этого NR и NAR инкубировали в натрий-фосфатном буферном растворе при нейтральном pH в течение 24 часов при 37°C. Мы показали, что NAR остается стабильным, тогда как около 13% NR расщепляется до Nam (Табл. 4.4).

Таблица 4.4. Расщепление нуклеозидов NR и NAR в водном растворе. Нуклеозиды NR и NAR инкубировали в 50 мМ натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7.0) в течение 24 часов при различных температурах. Количество NAD метаболитов в образцах измеряли с использованием ЯМР-спектроскопии. Количество нуклеозидов, добавленных в раствор, (0 ч, контроль) принимали за 100%. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

	Относительное количество метаболитов,				
Условия инкубации	% от контроля				
	NR	Nam	NAR	NA	
0 ч (контроль)	100.0 ± 0.8	0	100.0 ± 0.8	0	
24 ч, 4°С	101.8 ± 0.5	0	100.0 ± 0.5	0	
24 ч, 37°С	87.6 ± 0.9	13.3 ± 1.0	99.4 ± 0.9	0	

Таким образом, мы показали, что NAR является стабильным метаболитом NAD, тогда как NR неспецифически расщепляется в водном растворе.

4.5.2. Изучение механизмов импорта нуклеозидов NR и NAR в клетки человека

У человека нуклеозиды проникают в клетки посредством переносчиков, принадлежащих к двум семействам трансмембранных белков SLC29 и SLC28. В SLC29

семейство входят уравновешивающие переносчики нуклеозидов (equilibrative nucleoside transporters, ENT), которые обеспечивают диффузию нуклеозидов через плазматическую мембрану и обладают широкой субстратной специфичностью. Белки семейства SLC28 являются концентрирующими переносчиками нуклеозидов (concentrative nucleoside transporters, CNT), которые ко-транспортируют с нуклеозидами катионы натрия и водорода [138]. В ЕNT семейство переносчиков входят 4 белка (ENT1-4), тогда как CNT семейство состоит из трех переносчиков (CNT1-3).

Механизм импорта нуклеозидов NR и NAR в клетки человека неизвестен. Для того чтобы проверить гипотезу о том, что переносчики семейства ENT или CNT транспортируют через плазматическую мембрану нуклеозиды NR и NAR, клетки НЕК 293 или HeLa выращивали в питательной среде ДМЕМ, содержащей 10 % фетальную бычью сыворотку. Чтобы подавить синтез NAD из Nam, в питательную среду добавляли ингибитор NamPRT – FK866 [187]. В таких условиях клетки не могли синтезировать NAD и погибали. Добавление в питательную среду нуклеозидов NR или NAR восстанавливало выживаемость клеток до контрольного уровня (Рис. 4.18). Далее мы после добавления различных ингибиторов оценивали выживаемость клеток переносчиков нуклеозидов, характеристики которых представлены в Таблице 4.5.

Таблица 4.5. Ингибиторы нуклеозидных переносчиков ENT1-4 и CNT1-3. Приведены характеристики используемых в работе ингибиторов переносчиков нуклеозидов семейств ENT и CNT. IC50 - концентрация полумаксимального ингибирования [167, 169, 171, 182, 188, 189]. * NBTI и Dipyridamole в концентрации 10 мкМ подавляют способность переносчика ENT3 транспортировать аденозин на 40 % и 70 %, соответственно.

Ингибитор	Переносчик нуклеозидов	IC50
	ENT1	0.4 нМ
S-(4-Nitrobenzyl)-6- thioinosine (NBTI)	ENT2	2.8 мкМ
	ENT3	*
	ENT4	2.3 мкМ
	CNT1	250 мкМ
Phloridzin (Ph)	CNT2	100 мкМ
	CNT3	25 мкМ
	CNT1	40 мкМ
7,8-Dihydroxyflavone (DFH)	CNT2	4 мкМ
	CNT3	2 мкМ
	ENT1	14 мкМ
	ENT2	>300 мкМ
Gefitinib (GF)	CNT1	37 мкМ
	CNT2	>300 мкМ
	CNT3	>300 мкМ



Б



Рисунок 4.18. Оценка влияния ингибиторов нуклеозидных переносчиков на транспорт NR и NAR в клетки НЕК 293 и HeLa. Клетки НЕК 293 (А) или HeLa (Б) выращивали в питательной среде DMEM, содержащей 10 % фетальную бычью сыворотку. Выживаемость клеток оценивали через 3 дня после добавления FK866, нуклеозидов NR или NAR и ингибиторов нуклеозидного транспорта (Табл. 4.5). Показатели выживаемости клеток были нормализованы относительно среднего значения выживаемости необработанных клеток, взятых в качестве контроля. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. NBTI в концентрации 10 мкМ ингибирует все белки семейства ENT. Phloridzin (Ph) в концентрации 250 мкМ ингибирует все белки семейства ENT, а в концентрации 100 мкМ ингибирует CNT2 и

CNT3. 7,8-Dihydroxyflavone (DFH) в концентрации 2 мкМ ингибирует переносчик CNT3. Gefitinib (GF) в концентрации 6 мкМ ингибирует белок ENT1(Табл. 4.5).

S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI) – ингибитор переносчиков семейства ENT – значительно уменьшал способность NR восстанавливать выживаемость клеток НЕК 293 (Рис. 4.18А). Далее мы проверили, влияют ли на восстановление выживаемости ингибиторы переносчиков семейства CNT - Phloridzin и 7,8-Dihydroxyflavone. При добавлении 7,8-Dihydroxyflavone в концентрации 2 мкМ, при которой он ингибирует СNT3 (Табл. 4.5), никакого эффекта на выживаемость клеток не наблюдалось (Рис. 4.18А,Б). Phloridzin, добавленный в среду в концентрации 250 мкМ, при которой он ингибирует все белки семейства CNT (Табл. 4.5), подавлял вход в клетки NAR, но не NR (Рис. 4.18А,Б). В меньших концентрациях, при которых Phloridzin ингибрует CNT2 и CNT3, но не CNT1 (Табл. 4.5), данный ингибитор не имел никого эффекта на выживаемость клеток. Gefitinib в концентрации 6 мкМ, при которой он может ингибировать ENT1 и CNT1, но не другие переносчики данных семейств (Табл. 4.5), значительно уменьшал способность NR NAR И восстанавливать уровень внутриклеточного NAD (Рис. 4.18А,Б).

Полученные данные позволяют заключить, что импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи белков семейства ENT и CNT, причем наиболее вероятными кандидатами являются белки ENT1 и CNT1.

Кроме того, используя метод ЯМР-спектроскопии, мы оценивали количество NR в кондиционированной среде через 48 часов после добавления нуклеозида и ингибитора NBTI (Рис. 4.19А). Количество нуклеозида NR в питательной среде значительно уменьшалось при инкубации среды с клетками НЕК 293. Однако при добавлении ингибитора NBTI количество нуклеозида оставалось таким же, как и в образце без клеток (Рис. 4.19А). Данное наблюдение подтверждает, что NBTI эффективно подавляет импорт NR в клетки НЕК 293. Также, чтобы показать, что данный эффект не является специфичным для клеток НЕК 293, мы провели аналогичный эксперимент с мышиными эмбриональными стволовыми клетками mESC E14. Мы показали, что нуклеозида NR в среде после инкубации с клетками практически не осталось. Это означает, что нуклеозид NR импортировался в клетки. Однако после добавления NBTI к клеткам количество нуклеозида NR осталось таким же, как и в образце без клеток (Рис. 4.19Б). Данные результаты говорят о том, что ингибитор переносчиков семейства ENT
эффективно подавляет импорт NR также и в мышиные эмбриональные стволовые клетки mESC E14.



Рисунок 4.19. Оценка влияния ингибитора NBTI на транспорт NR в клетки человека НЕК 293 и в мышиные эмбриональные стволовые клетки mESC E14. (А) Нуклеозид NR добавляли в питательную среду, содержащую ингибитор нуклеозидного транспорта NBTI, после чего питательную среду инкубировали с клетками HEK 293 или без клеток (контроль) в течение 48 часов. Количество NR в образцах измеряли с использованием ЯМР-спектроскопии. Количество NR в контрольном образце принимали за 100 %. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. (Б) Мышиные эмбриональные стволовые клетки mESC E14 выращивали в питательной среде KnockOut DMEM. 700 МГц ¹Н ЯМР спектры кондиционированной среды, собранной через 24 часа после добавления FK866, нуклеозида NR и NBTI.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было впервые проведено комплексное исследование механизмов образования и взаимодействия внутри- и внеклеточных пулов таких ключевых метаболитов биосинтеза NAD, как рибозид никотинамида (NR) и рибозид никотиновой кислоты (NAR). Для этого нами был оптимизирован метод детекции и количественного анализа метаболитов NAD в питательной среде методом ЯМР-спектроскопии. С использованием данного метода было показано, что культивируемые клетки человека могут конвертировать никотиновую кислоту в рибозид никотиновой кислоты, который затем выходит из клеток в питательную среду. Также, в данной работе был впервые описан возможный механизм образования нуклеозидов NR и NAR в клетках человека. Было продемонстрировано, что сверхэкспрессия цитозольных 5'-нуклеотидаз CN-II и CN-III в клетках приводит к увеличению концентрации нуклеозида NAR в кондиционированной питательной среде, в условиях повышенного уровня NAMN в ферментативной кинетики 5'клетках. Далее было проведено исследование нуклеотидазных реакций с NMN и NAMN и показано, что белки CN-II и CN-III дефосфорилируют NMN и NAMN до нуклеозидов NR и NAR in vitro. Из полученных результатов можно заключить, что 5'-нуклеотидазы человека CN-II и CN-III могут синтезировать нуклеозиды NR и NAR в клетках. Таким образом, было установлено, что нуклеозиды NR и NAR могут не только поступать в организм с пищей, но и синтезироваться в клетках из других метаболитов NAD.

Кроме того, на культурах клеток человека, было продемонстрировано, что вышедший из одних клеток нуклеозид NAR, затем выступает в роли предшественника NAD в соседних клетках, не способных использовать Nam и NA для синтеза NAD. Таким образом, было впервые показано, что одни клетки человека могут поддерживать эффективный синтез NAD в других клетках.

Также с использованием фармакологического подхода было показано, что импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи нуклеозидных переносчиков семейств ENT и CNT.

6. ВЫВОДЫ

1. Клетки человека конвертируют никотиновую кислоту в рибозид никотиновой кислоты (NAR), который затем выходит из клеток в питательную среду.

2. Цитозольные 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II и CN-III синтезируют нуклеозид NAR в клетках человека, в условиях повышенного уровня мононуклеотида NAMN.

3. CN-II и CN-III дефосфорилируют мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием нуклеозидов NR и NAR *in vitro*.

4. Нуклеозид NAR, вышедший из одних клеток человека, может выступать в роли предшественника NAD в других клетках, неспособных использовать никотинамид и никотиновую кислоту для синтеза NAD.

5. Импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи белков семейств ENT и CNT.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

NAD - nicotinamide adenine dinucleotide (никотинамидадениндинуклеотид)

Nam - nicotinamide (никотинамид)

NADP - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (никотинамидадениндинуклеотидфосфат)

ADPR - ADP ribose (ADP-рибоза)

OAcADPR - O-acetyl-ADP ribose (О-ацетил-АДФ-рибоза)

ARTs - ADP-ribosyl transferases (АДФ-рибозилтрансферазы)

PARPs - poly-ADP-ribosyl polymerases (поли-АДФ-рибозилполимеразы)

сADPR - cyclic ADP-ribose (циклическая АДФ-рибоза)

NAADP - nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (никотиновая кислота адениндинуклеотидфосфат)

Trp - tryptophan (триптофан)

QA - quinolinic acid (хинолиновая кислота)

NAMN - nicotinic acid mononucleotide (мононуклеотид никотиновой кислоты)

NA - nicotinic acid (никотиновая кислота)

NMN - nicotinamide mononucleotide (никатинамидмононуклеотид)

NAAD - nicotinic acid adenine dinucleotide (никотиновая кислота адениндинуклеотид)

NAR - nicotinic acid riboside (рибозид никотиновой кислоты)

NR - nicotinamide riboside (рибозид никотинамида)

NADP - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (икотинамидадениндинуклеотидфосфат)

PARP - poly-ADP-ribosyl polymerase (поли-АДФ-рибозилполимераза)

ART - ADP-ribosyl transferase (АДФ-рибозилтрансфераза)

ЭР – эндоплазматический ретикулум

KAT - lysine acetyltransferase (лизинацетилтрансфераза)

KDAC - lysine deacetylases (лизиндеацетилаза)

NMP – nucleoside monophosphate (нуклеозидмонофосфат)

dNMP – deoxynucleoside monophosphate (дезоксинуклеозидмонофосфат)

NDP – nucleoside diphosphate (нуклеозиддифосфат)

dNDP – deoxynucleoside diphosphate (дезоксинуклеозиддифосфат)

NTP – nucleoside triphosphate (нуклеозидтрифосфат)

dNTP – deoxynucleoside triphosphate (дезоксинуклеозидтрифосфат)

ENT - equilibrative nucleoside transporters (уравновешивающие переносчики нуклеозидов)

CNT - concentrative nucleoside transporters (концентрирующие переносчики нуклеозидов)

ARTD - diphtheria toxin-like ADP-ribosyltransferases (АДФ-рибозилтрансферазы, гомологичные дифтерийному токсину)

ARTC - clostridial toxin-like ADP-ribosyltransferases (АДФ-рибозилтрансферазы, гомологичные токсину клостридий)

ATP - adenosine triphosphate (аденозинтрифосфат)

ADP - adenosine diphosphate (аденозиндифосфат)

AMP - adenosine monophosphate (аденозинмонофосфат)

- ЯМР ядерный магнитный резоснанс
- К_М-константа Михаэлиса ферментативной реакции

V_{max} – максимальная скорость ферментативной реакции

FBS - fetal bovine serum (фетальная бычья сыворотка)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Houtkooper R.H., Pirinen E., and Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2012. Vol. 13. P. 225-238.
- 2. Hassa P.O. and Hottiger M.O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases // Frontiers in Bioscience-Landmark. 2008. Vol. 13. P. 3046-3082.
- Koch-Nolte F., Kernstock S., Mueller-Dieckmann C., Weiss M.S., and Haag F. Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases // Frontiers in Bioscience. - 2008. - Vol. 13. - P. 6716-6729.
- 4. Houtkooper R.H., Canto C., Wanders R.J., and Auwerx J. The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways // Endocr Rev. 2010. Vol. 31. P. 194-223.
- Nikiforov A., Kulikova V., and Ziegler M. The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization // Crit Rev Biochem Mol Biol. - 2015. - Vol. 50.
 - P. 284-297.
- 6. Haigis M.C. and Sinclair D.A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance // Annu Rev Pathol. 2010. Vol. 5. P. 253-295.
- Fliegert R., Gasser A., and Guse A.H. Regulation of calcium signalling by adeninebased second messengers // Biochemical Society Transactions. - 2007. - Vol. 35. - P. 109-114.
- 8. Belenky P., Bogan K.L., and Brenner C. NAD+ metabolism in health and disease // Trends Biochem Sci. - 2007. - Vol. 32. - P. 12-19.
- 9. Magni G., Orsomando G., Raffelli N., and Ruggieri S. Enzymology of mammalian NAD metabolism in health and disease // Front Biosci. 2008. Vol. 13. P. 6135-6154.
- 10. Chiarugi A., Dolle C., Felici R., and Ziegler M. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology // Nat Rev Cancer. 2012. Vol. 12. P. 741-752.
- 11. Garrido A. and Djouder N. NAD+ Deficits in Age-Related Diseases and Cancer // Trends Cancer. - 2017. - Vol. 3. - P. 593-610.
- Dolle C., Skoge R.H., Vanlinden M.R., and Ziegler M. NAD biosynthesis in humans-enzymes, metabolites and therapeutic aspects // Curr Top Med Chem. - 2013. - Vol. 13. - P. 2907-2917.
- 13. Bieganowski P. and Brenner C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD+ in fungi and humans // Cell. 2004. Vol. 117. P. 495-502.
- Gong B., Pan Y., Vempati P., Zhao W., Knable L., Ho L., Wang J., Sastre M., Ono K., Sauve A.A., and Pasinetti G.M. Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha regulated beta-secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models // Neurobiol Aging. - 2013. - Vol. 34. - P. 1581-1588.
- 15. Canto C., Houtkooper R.H., Pirinen E., Youn D.Y., Oosterveer M.H., Cen Y., Fernandez-Marcos P.J., Yamamoto H., Andreux P.A., Cettour-Rose P., Gademann K., Rinsch C., Schoonjans K., Sauve A.A., and Auwerx J. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat dietinduced obesity // Cell Metab. - 2012. - Vol. 15. - P. 838-847.

- Khan N.A., Auranen M., Paetau I., Pirinen E., Euro L., Forsstrom S., Pasila L., Velagapudi V., Carroll C.J., Auwerx J., and Suomalainen A. Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3 // EMBO Mol Med. -2014. - Vol. 6. - P. 721-731.
- Trammell S.A., Weidemann B.J., Chadda A., Yorek M.S., Holmes A., Coppey L.J., Obrosov A., Kardon R.H., Yorek M.A., and Brenner C. Nicotinamide Riboside Opposes Type 2 Diabetes and Neuropathy in Mice // Sci Rep. - 2016. - Vol. 6. - P. 26933.
- Mukherjee S., Chellappa K., Moffitt A., Ndungu J., Dellinger R.W., Davis J.G., Agarwal B., and Baur J.A. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis promotes liver regeneration // Hepatology. - 2017. - Vol. 65. - P. 616-630.
- 19. Hamity M.V., White S.R., Walder R.Y., Schmidt M.S., Brenner C., and Hammond D.L. Nicotinamide riboside, a form of vitamin B3 and NAD+ precursor, relieves the nociceptive and aversive dimensions of paclitaxel-induced peripheral neuropathy in female rats // Pain. 2017. Vol. 158. P. 962-972.
- 20. Harden A. and Young W.J. The alcoholic ferment of yeast-juice Part II.-The coferment of yeast-juice // Proceedings of the Royal Society of London. 1906. Vol. 78. P. 369-375.
- 21. Hans E.C. Fermentation of sugars and fermentative enzymes // Nobel Foundation. 1930. Vol.
- 22. Warburg O. and Christian W. Pyridin, the hydrogen-transferring component of the fermentation enzymes (pyridine nucleotide) // Biochemische Zeitschrift. 1936. Vol. 287. P. 291.
- 23. Sazanov L.A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I // Nat Rev Mol Cell Biol. 2015. Vol. 16. P. 375-388.
- 24. Rich P.R. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain // Biochem Soc Trans. 2003. Vol. 31. P. 1095-1105.
- 25. Pollak N., Dolle C., and Ziegler M. The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions // Biochem J. 2007. Vol. 402. P. 205-218.
- Ying W. NAD+/NADH and NADP+/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences // Antioxid Redox Signal. - 2008. - Vol. 10. - P. 179-206.
- McKenna M.C., Waagepetersen H.S., Schousboe A., and Sonnewald U. Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools // Biochem Pharmacol. 2006.
 Vol. 71. P. 399-407.
- 28. Arner E.S. and Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase // Eur J Biochem. 2000. Vol. 267. P. 6102-6109.
- 29. Tribble D.L. and Jones D.P. Oxygen dependence of oxidative stress. Rate of NADPH supply for maintaining the GSH pool during hypoxia // Biochem Pharmacol. 1990. Vol. 39. P. 729-736.
- 30. Agledal L., Niere M., and Ziegler M. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP // Redox Rep. 2010. Vol. 15. P. 2-10.
- 31. Berger F., Ramirez-Hernandez M.H., and Ziegler M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P) // Trends Biochem Sci. 2004. Vol. 29. P. 111-118.

- 32. Hassa P.O. and Hottiger M.O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases // Front Biosci. 2008. Vol. 13. P. 3046-3082.
- Koch-Nolte F., Kernstock S., Mueller-Dieckmann C., Weiss M.S., and Haag F. Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases // Front Biosci. -2008. - Vol. 13. - P. 6716-6729.
- 34. Fliegert R., Gasser A., and Guse A.H. Regulation of calcium signalling by adeninebased second messengers // Biochem Soc Trans. - 2007. - Vol. 35. - P. 109-114.
- 35. Chapman J.D., Gagne J.P., Poirier G.G., and Goodlett D.R. Mapping PARP-1 auto-ADP-ribosylation sites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J Proteome Res. - 2013. - Vol. 12. - P. 1868-1880.
- 36. Daniels C.M., Ong S.E., and Leung A.K. The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation // Mol Cell. 2015. Vol. 58. P. 911-924.
- 37. Leidecker O., Bonfiglio J.J., Colby T., Zhang Q., Atanassov I., Zaja R., Palazzo L., Stockum A., Ahel I., and Matic I. Serine is a new target residue for endogenous ADPribosylation on histones // Nat Chem Biol. - 2016. - Vol. 12. - P. 998-1000.
- 38. Daniels C.M., Ong S.E., and Leung A.K. Phosphoproteomic approach to characterize protein mono- and poly(ADP-ribosyl)ation sites from cells // J Proteome Res. 2014. Vol. 13. P. 3510-3522.
- 39. Palazzo L., Mikoc A., and Ahel I. ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification // FEBS J. 2017. Vol.
- 40. Burkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD+ // FEBS J. 2005. Vol. 272. P. 4576-4589.
- 41. Kraus W.L. PARPs and ADP-Ribosylation: 50 Years ... and Counting // Mol Cell. 2015. Vol. 58. P. 902-910.
- 42. Vyas S., Matic I., Uchima L., Rood J., Zaja R., Hay R.T., Ahel I., and Chang P. Familywide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity // Nat Commun. - 2014. - Vol. 5. - P. 4426.
- 43. Barkauskaite E., Jankevicius G., and Ahel I. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation // Mol Cell. - 2015. - Vol. 58. - P. 935-946.
- 44. De Vos M., Schreiber V., and Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art // Biochem Pharmacol. 2012. Vol. 84. P. 137-146.
- 45. Huambachano O., Herrera F., Rancourt A., and Satoh M.S. Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity // J Biol Chem. 2011. Vol. 286. P. 7149-7160.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., and Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions // Biochem J. - 1999. - Vol. 342 (Pt 2). -P. 249-268.
- 47. Jungmichel S., Rosenthal F., Altmeyer M., Lukas J., Hottiger M.O., and Nielsen M.L. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses // Mol Cell. - 2013. - Vol. 52. - P. 272-285.
- Gagne J.P., Isabelle M., Lo K.S., Bourassa S., Hendzel M.J., Dawson V.L., Dawson T.M., and Poirier G.G. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes // Nucleic Acids Res. 2008. Vol. 36. P. 6959-6976.

- 49. Messner S., Altmeyer M., Zhao H., Pozivil A., Roschitzki B., Gehrig P., Rutishauser D., Huang D., Caflisch A., and Hottiger M.O. PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38. P. 6350-6362.
- 50. Poirier G.G., de Murcia G., Jongstra-Bilen J., Niedergang C., and Mandel P. Poly(ADPribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1982. - Vol. 79. - P. 3423-3427.
- 51. Krietsch J., Rouleau M., Pic E., Ethier C., Dawson T.M., Dawson V.L., Masson J.Y., Poirier G.G., and Gagne J.P. Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)binding proteins // Mol Aspects Med. - 2013. - Vol. 34. - P. 1066-1087.
- 52. Krishnakumar R., Gamble M.J., Frizzell K.M., Berrocal J.G., Kininis M., and Kraus W.L. Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes // Science. 2008. Vol. 319. P. 819-821.
- 53. Muthurajan U.M., Hepler M.R., Hieb A.R., Clark N.J., Kramer M., Yao T., and Luger K. Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone // Proc Natl Acad Sci U S A. 2014. Vol. 111. P. 12752-12757.
- 54. Gibson B.A., Zhang Y., Jiang H., Hussey K.M., Shrimp J.H., Lin H., Schwede F., Yu Y., and Kraus W.L. Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation // Science. 2016. Vol. 353. P. 45-50.
- 55. Jwa M. and Chang P. PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1alpha-mediated unfolded protein response // Nat Cell Biol. 2012. Vol. 14. P. 1223-1230.
- 56. Gardner B.M., Pincus D., Gotthardt K., Gallagher C.M., and Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013. Vol. 5. P. a013169.
- 57. Feijs K.L., Kleine H., Braczynski A., Forst A.H., Herzog N., Verheugd P., Linzen U., Kremmer E., and Luscher B. ARTD10 substrate identification on protein microarrays: regulation of GSK3beta by mono-ADP-ribosylation // Cell Commun Signal. - 2013. -Vol. 11. - P. 5.
- Goenka S., Cho S.H., and Boothby M. Collaborator of Stat6 (CoaSt6)-associated poly(ADP-ribose) polymerase activity modulates Stat6-dependent gene transcription // J Biol Chem. - 2007. - Vol. 282. - P. 18732-18739.
- 59. Mehrotra P., Riley J.P., Patel R., Li F., Voss L., and Goenka S. PARP-14 functions as a transcriptional switch for Stat6-dependent gene activation // J Biol Chem. 2011. Vol. 286. P. 1767-1776.
- 60. Burkle A. and Virag L. Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes // Mol Aspects Med. 2013. Vol. 34. P. 1046-1065.
- 61. Feijs K.L., Verheugd P., and Luscher B. Expanding functions of intracellular resident mono-ADP-ribosylation in cell physiology // FEBS J. 2013. Vol. 280. P. 3519-3529.
- 62. Grimaldi G., Corda D., and Catara G. From toxins to mammalian enzymes: the diversity of mono-ADP-ribosylation // Front Biosci (Landmark Ed). 2015. Vol. 20. P. 389-404.
- 63. Butepage M., Eckei L., Verheugd P., and Luscher B. Intracellular Mono-ADP-Ribosylation in Signaling and Disease // Cells. - 2015. - Vol. 4. - P. 569-595.
- 64. Liu C. and Yu X. ADP-ribosyltransferases and poly ADP-ribosylation // Curr Protein Pept Sci. 2015. Vol. 16. P. 491-501.

- 65. Houtkooper R.H., Pirinen E., and Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan // Nat Rev Mol Cell Biol. 2012. Vol. 13. P. 225-238.
- 66. Bai P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance // Mol Cell. - 2015. - Vol. 58. - P. 947-958.
- 67. Mei Z., Zhang X., Yi J., Huang J., He J., and Tao Y. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer // J Exp Clin Cancer Res. 2016. Vol. 35. P. 182.
- 68. Seman M., Adriouch S., Haag F., and Koch-Nolte F. Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling // Curr Med Chem. 2004. Vol. 11. P. 857-872.
- 69. Hottiger M.O., Hassa P.O., Luscher B., Schuler H., and Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases // Trends Biochem Sci. 2010. Vol. 35. P. 208-219.
- Lin C.Y., Wang J.K., Torri J., Dou L., Sang Q.A., and Dickson R.B. Characterization of a novel, membrane-bound, 80-kDa matrix-degrading protease from human breast cancer cells. Monoclonal antibody production, isolation, and localization // J Biol Chem. - 1997. - Vol. 272. - P. 9147-9152.
- Mashimo M., Kato J., and Moss J. ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 regulates poly (ADP-ribose) degradation and cell death during oxidative stress // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2013. - Vol. 110. - P. 18964-18969.
- 72. Niere M., Mashimo M., Agledal L., Dolle C., Kasamatsu A., Kato J., Moss J., and Ziegler M. ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose) // J Biol Chem. 2012. Vol. 287. P. 16088-16102.
- 73. Slade D., Dunstan M.S., Barkauskaite E., Weston R., Lafite P., Dixon N., Ahel M., Leys D., and Ahel I. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase // Nature. 2011. Vol. 477. P. 616-620.
- 74. Jankevicius G., Hassler M., Golia B., Rybin V., Zacharias M., Timinszky G., and Ladurner A.G. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation // Nat Struct Mol Biol. 2013. Vol. 20. P. 508-514.
- 75. Rosenthal F., Feijs K.L., Frugier E., Bonalli M., Forst A.H., Imhof R., Winkler H.C., Fischer D., Caflisch A., Hassa P.O., Luscher B., and Hottiger M.O. Macrodomaincontaining proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases // Nat Struct Mol Biol. -2013. - Vol. 20. - P. 502-507.
- 76. Sharifi R., Morra R., Appel C.D., Tallis M., Chioza B., Jankevicius G., Simpson M.A., Matic I., Ozkan E., Golia B., Schellenberg M.J., Weston R., Williams J.G., Rossi M.N., Galehdari H., Krahn J., Wan A., Trembath R.C., Crosby A.H., Ahel D., Hay R., Ladurner A.G., Timinszky G., Williams R.S., and Ahel I. Deficiency of terminal ADPribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease // EMBO J. - 2013. - Vol. 32. - P. 1225-1237.
- 77. Fontana P., Bonfiglio J.J., Palazzo L., Bartlett E., Matic I., and Ahel I. Serine ADPribosylation reversal by the hydrolase ARH3 // Elife. - 2017. - Vol. 6.
- Moss J., Stanley S.J., Nightingale M.S., Murtagh J.J., Jr., Monaco L., Mishima K., Chen H.C., Williamson K.C., and Tsai S.C. Molecular and immunological characterization of ADP-ribosylarginine hydrolases // J Biol Chem. - 1992. - Vol. 267. -P. 10481-10488.

- 79. Palazzo L., Thomas B., Jemth A.S., Colby T., Leidecker O., Feijs K.L., Zaja R., Loseva O., Puigvert J.C., Matic I., Helleday T., and Ahel I. Processing of protein ADP-ribosylation by Nudix hydrolases // Biochem J. 2015. Vol. 468. P. 293-301.
- 80. Kaelin W.G., Jr. and McKnight S.L. Influence of metabolism on epigenetics and disease // Cell. - 2013. - Vol. 153. - P. 56-69.
- 81. Roth S.Y., Denu J.M., and Allis C.D. Histone acetyltransferases // Annu Rev Biochem. 2001. Vol. 70. P. 81-120.
- 82. Yang X.J. and Gregoire S. Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein Nepsilon and O-acetylation // EMBO Rep. 2007. Vol. 8. P. 556-562.
- Haberland M., Montgomery R.L., and Olson E.N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy // Nat Rev Genet. - 2009. - Vol. 10. - P. 32-42.
- 84. Brachmann C.B., Sherman J.M., Devine S.E., Cameron E.E., Pillus L., and Boeke J.D. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability // Genes Dev. - 1995. - Vol. 9. - P. 2888-2902.
- 85. Jackson M.D. and Denu J.M. Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of beta -NAD+-dependent histone/protein deacetylases // J Biol Chem. 2002. Vol. 277. P. 18535-18544.
- 86. Tanner K.G., Landry J., Sternglanz R., and Denu J.M. Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2000. - Vol. 97. - P. 14178-14182.
- 87. Michishita E., Park J.Y., Burneskis J.M., Barrett J.C., and Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins // Mol Biol Cell. 2005. Vol. 16. P. 4623-4635.
- Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., and Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase // Nature. - 2000. -Vol. 403. - P. 795-800.
- 89. Landry J., Sutton A., Tafrov S.T., Heller R.C., Stebbins J., Pillus L., and Sternglanz R. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2000. - Vol. 97. - P. 5807-5811.
- 90. Senawong T., Peterson V.J., and Leid M. BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression // Arch Biochem Biophys. 2005. Vol. 434. P. 316-325.
- 91. Vaquero A., Scher M., Lee D., Erdjument-Bromage H., Tempst P., and Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin // Mol Cell. - 2004. - Vol. 16. - P. 93-105.
- 92. Martinez-Redondo P. and Vaquero A. The diversity of histone versus nonhistone sirtuin substrates // Genes Cancer. 2013. Vol. 4. P. 148-163.
- 93. Choudhary C., Weinert B.T., Nishida Y., Verdin E., and Mann M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling // Nat Rev Mol Cell Biol. 2014. Vol. 15. P. 536-550.
- 94. Chang H.C. and Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism // Trends Endocrinol Metab. 2014. Vol. 25. P. 138-145.
- 95. Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., Geny B., Laakso M., Puigserver P., and

Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha // Cell. - 2006. - Vol. 127. - P. 1109-1122.

- 96. Kelly G. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1 // Altern Med Rev. 2010. Vol. 15. P. 245-263.
- 97. Jiang W., Wang S., Xiao M., Lin Y., Zhou L., Lei Q., Xiong Y., Guan K.L., and Zhao S. Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase // Mol Cell. 2011. Vol. 43. P. 33-44.
- 98. North B.J., Marshall B.L., Borra M.T., Denu J.M., and Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD+-dependent tubulin deacetylase // Mol Cell. - 2003. - Vol. 11. - P. 437-444.
- 99. Schlicker C., Gertz M., Papatheodorou P., Kachholz B., Becker C.F., and Steegborn C. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5 // J Mol Biol. - 2008. - Vol. 382. - P. 790-801.
- 100. Michishita E., McCord R.A., Berber E., Kioi M., Padilla-Nash H., Damian M., Cheung P., Kusumoto R., Kawahara T.L., Barrett J.C., Chang H.Y., Bohr V.A., Ried T., Gozani O., and Chua K.F. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin // Nature. 2008. Vol. 452. P. 492-496.
- 101. Mao Z., Hine C., Tian X., Van Meter M., Au M., Vaidya A., Seluanov A., and Gorbunova V. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1 // Science. - 2011. - Vol. 332. - P. 1443-1446.
- 102. Jiang H., Khan S., Wang Y., Charron G., He B., Sebastian C., Du J., Kim R., Ge E., Mostoslavsky R., Hang H.C., Hao Q., and Lin H. SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine // Nature. - 2013. - Vol. 496. - P. 110-113.
- 103. Nishida Y., Rardin M.J., Carrico C., He W., Sahu A.K., Gut P., Najjar R., Fitch M., Hellerstein M., Gibson B.W., and Verdin E. SIRT5 Regulates both Cytosolic and Mitochondrial Protein Malonylation with Glycolysis as a Major Target // Mol Cell. -2015. - Vol. 59. - P. 321-332.
- 104. Du J., Zhou Y., Su X., Yu J.J., Khan S., Jiang H., Kim J., Woo J., Kim J.H., Choi B.H., He B., Chen W., Zhang S., Cerione R.A., Auwerx J., Hao Q., and Lin H. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase // Science. - 2011. -Vol. 334. - P. 806-809.
- 105. Haigis M.C., Mostoslavsky R., Haigis K.M., Fahie K., Christodoulou D.C., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Karow M., Blander G., Wolberger C., Prolla T.A., Weindruch R., Alt F.W., and Guarente L. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells // Cell. - 2006. - Vol. 126. - P. 941-954.
- 106. Gasser A., Glassmeier G., Fliegert R., Langhorst M.F., Meinke S., Hein D., Kruger S., Weber K., Heiner I., Oppenheimer N., Schwarz J.R., and Guse A.H. Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose // J Biol Chem. - 2006. - Vol. 281. - P. 2489-2496.
- Lee H.C., Walseth T.F., Bratt G.T., Hayes R.N., and Clapper D.L. Structural determination of a cyclic metabolite of NAD+ with intracellular Ca2+-mobilizing activity // J Biol Chem. - 1989. - Vol. 264. - P. 1608-1615.

- Lee H.C. and Aarhus R. A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose // J Biol Chem. - 1995. - Vol. 270. - P. 2152-2157.
- 109. Galione A. A primer of NAADP-mediated Ca(2+) signalling: From sea urchin eggs to mammalian cells // Cell Calcium. 2015. Vol. 58. P. 27-47.
- 110. Guse A.H. Calcium mobilizing second messengers derived from NAD // Biochim Biophys Acta. 2015. Vol. 1854. P. 1132-1137.
- Lee H.C. Cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) as messengers for calcium mobilization // J Biol Chem. - 2012. - Vol. 287. -P. 31633-31640.
- Patel S., Marchant J.S., and Brailoiu E. Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals // Cell Calcium. - 2010. - Vol. 47. - P. 480-490.
- 113. Sumoza-Toledo A. and Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling // J Physiol. 2011. Vol. 589. P. 1515-1525.
- 114. Malavasi F., Deaglio S., Funaro A., Ferrero E., Horenstein A.L., Ortolan E., Vaisitti T., and Aydin S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology // Physiol Rev. - 2008. - Vol. 88. - P. 841-886.
- 115. Bruzzone S., Guida L., Zocchi E., Franco L., and De Flora A. Connexin 43 hemi channels mediate Ca2+-regulated transmembrane NAD+ fluxes in intact cells // FASEB J. - 2001. - Vol. 15. - P. 10-12.
- 116. Fruscione F., Scarfi S., Ferraris C., Bruzzone S., Benvenuto F., Guida L., Uccelli A., Salis A., Usai C., Jacchetti E., Ilengo C., Scaglione S., Quarto R., Zocchi E., and De Flora A. Regulation of human mesenchymal stem cell functions by an autocrine loop involving NAD+ release and P2Y11-mediated signaling // Stem Cells Dev. - 2011. -Vol. 20. - P. 1183-1198.
- Verderio C., Bruzzone S., Zocchi E., Fedele E., Schenk U., De Flora A., and Matteoli M. Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signalling and neurotransmitter release in cultured astrocytes // J Neurochem. - 2001. - Vol. 78. - P. 646-657.
- 118. Podesta M., Benvenuto F., Pitto A., Figari O., Bacigalupo A., Bruzzone S., Guida L., Franco L., Paleari L., Bodrato N., Usai C., De Flora A., and Zocchi E. Concentrative uptake of cyclic ADP-ribose generated by BST-1+ stroma stimulates proliferation of human hematopoietic progenitors // J Biol Chem. - 2005. - Vol. 280. - P. 5343-5349.
- 119. Franco L., Guida L., Bruzzone S., Zocchi E., Usai C., and De Flora A. The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes // FASEB J. - 1998. - Vol. 12. - P. 1507-1520.
- 120. Song E.K., Rah S.Y., Lee Y.R., Yoo C.H., Kim Y.R., Yeom J.H., Park K.H., Kim J.S., Kim U.H., and Han M.K. Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca2+-mobilizing activity by NAD+/cyclic ADP-ribose transport // J Biol Chem. - 2011. - Vol. 286. - P. 44480-44490.
- 121. Zhao Y.J., Lam C.M., and Lee H.C. The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations // Sci Signal. 2012. Vol. 5. P. ra67.
- 122. Zhao Y.J., Zhu W.J., Wang X.W., Zhang L.H., and Lee H.C. Determinants of the membrane orientation of a calcium signaling enzyme CD38 // Biochim Biophys Acta. -2015. - Vol. 1853. - P. 2095-2103.

- Bogan K.L. and Brenner C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD+ precursor vitamins in human nutrition // Annu Rev Nutr. 2008. Vol. 28. P. 115-130.
- 124. Preiss J. and Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. II. Enzymatic aspects // J Biol Chem. 1958. Vol. 233. P. 493-500.
- 125. Preiss J. and Handler P. Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide. I. Identification of intermediates // J Biol Chem. 1958. Vol. 233. P. 488-492.
- 126. Tempel W., Rabeh W.M., Bogan K.L., Belenky P., Wojcik M., Seidle H.F., Nedyalkova L., Yang T., Sauve A.A., Park H.W., and Brenner C. Nicotinamide riboside kinase structures reveal new pathways to NAD+ // PLoS Biol. - 2007. - Vol. 5. - P. e263.
- 127. Nikiforov A., Dolle C., Niere M., and Ziegler M. Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation // J Biol Chem. - 2011. - Vol. 286. - P. 21767-21778.
- 128. VanLinden M.R., Dolle C., Pettersen I.K., Kulikova V.A., Niere M., Agrimi G., Dyrstad S.E., Palmieri F., Nikiforov A.A., Tronstad K.J., and Ziegler M. Subcellular Distribution of NAD+ between Cytosol and Mitochondria Determines the Metabolic Profile of Human Cells // J Biol Chem. - 2015. - Vol. 290. - P. 27644-27659.
- 129. Bahn A., Hagos Y., Reuter S., Balen D., Brzica H., Krick W., Burckhardt B.C., Sabolic I., and Burckhardt G. Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (SLC22A13) // J Biol Chem. 2008. Vol. 283. P. 16332-16341.
- 130. Gopal E., Miyauchi S., Martin P.M., Ananth S., Roon P., Smith S.B., and Ganapathy V. Transport of nicotinate and structurally related compounds by human SMCT1 (SLC5A8) and its relevance to drug transport in the mammalian intestinal tract // Pharm Res. - 2007. - Vol. 24. - P. 575-584.
- 131. Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K., Uchino H., Takeda E., and Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98) // J Biol Chem. - 1998. - Vol. 273. - P. 23629-23632.
- Pillai S.M. and Meredith D. SLC36A4 (hPAT4) is a high affinity amino acid transporter when expressed in Xenopus laevis oocytes // J Biol Chem. - 2011. - Vol. 286. - P. 2455-2460.
- 133. Hunsucker S.A., Mitchell B.S., and Spychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism // Pharmacol Ther. 2005. Vol. 107. P. 1-30.
- 134. Jordan A. and Reichard P. Ribonucleotide reductases // Annu Rev Biochem. 1998. Vol. 67. P. 71-98.
- 135. Maley F. and Maley G.F. A tale of two enzymes, deoxycytidylate deaminase and thymidylate synthase // Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1990. Vol. 39. P. 49-80.
- 136. Cass C.E., Young J.D., Baldwin S.A., Cabrita M.A., Graham K.A., Griffiths M., Jennings L.L., Mackey J.R., Ng A.M., Ritzel M.W., Vickers M.F., and Yao S.Y. Nucleoside transporters of mammalian cells // Pharm Biotechnol. - 1999. - Vol. 12. - P. 313-352.
- 137. de Koning H. and Diallinas G. Nucleobase transporters (review) // Mol Membr Biol. 2000. Vol. 17. P. 75-94.

- 138. Young J.D., Yao S.Y., Baldwin J.M., Cass C.E., and Baldwin S.A. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29 // Mol Aspects Med. - 2013. - Vol. 34. - P. 529-547.
- 139. Arner E.S. and Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases // Pharmacol Ther.
 1995. Vol. 67. P. 155-186.
- 140. Spychala J., Datta N.S., Takabayashi K., Datta M., Fox I.H., Gribbin T., and Mitchell B.S. Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1996. - Vol. 93. - P. 1232-1237.
- 141. Van Rompay A.R., Norda A., Linden K., Johansson M., and Karlsson A. Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridinecytidine kinases // Mol Pharmacol. - 2001. - Vol. 59. - P. 1181-1186.
- 142. Bianchi V., Pontis E., and Reichard P. Interrelations between substrate cycles and de novo synthesis of pyrimidine deoxyribonucleoside triphosphates in 3T6 cells // Proc Natl Acad Sci U S A. 1986. Vol. 83. P. 986-990.
- 143. Van Rompay A.R., Johansson M., and Karlsson A. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases // Pharmacol Ther. - 2000. - Vol. 87. - P. 189-198.
- 144. Schneider B., Biondi R., Sarfati R., Agou F., Guerreiro C., Deville-Bonne D., and Veron M. The mechanism of phosphorylation of anti-HIV D4T by nucleoside diphosphate kinase // Mol Pharmacol. 2000. Vol. 57. P. 948-953.
- Hasunuma K., Yabe N., Yoshida Y., Ogura Y., and Hamada T. Putative functions of nucleoside diphosphate kinase in plants and fungi // J Bioenerg Biomembr. - 2003. -Vol. 35. - P. 57-65.
- 146. Kunz B.A. and Kohalmi S.E. Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels // Annu Rev Genet. - 1991. - Vol. 25. - P. 339-359.
- 147. Kunz B.A., Kohalmi S.E., Kunkel T.A., Mathews C.K., McIntosh E.M., and Reidy J.A. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability // Mutat Res. - 1994. - Vol. 318. - P. 1-64.
- 148. Ipata P.L. and Balestri F. The functional logic of cytosolic 5'-nucleotidases // Curr Med Chem. 2013. Vol. 20. P. 4205-4216.
- Bianchi V. and Spychala J. Mammalian 5'-nucleotidases // J Biol Chem. 2003. Vol. 278. - P. 46195-46198.
- Hunsucker S.A., Spychala J., and Mitchell B.S. Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance // J Biol Chem. - 2001. - Vol. 276. - P. 10498-10504.
- Skladanowski A.C. and Newby A.C. Partial purification and properties of an AMPspecific soluble 5'-nucleotidase from pigeon heart // Biochem J. - 1990. - Vol. 268. - P. 117-122.
- Garvey E.P., Lowen G.T., and Almond M.R. Nucleotide and nucleoside analogues as inhibitors of cytosolic 5'-nucleotidase I from heart // Biochemistry. - 1998. - Vol. 37. -P. 9043-9051.
- 153. Skladanowski A.C., Smolenski R.T., Tavenier M., de Jong J.W., Yacoub M.H., and Seymour A.M. Soluble forms of 5'-nucleotidase in rat and human heart // Am J Physiol. - 1996. - Vol. 270. - P. H1493-1500.

- 154. Peart J., Matherne G.P., Cerniway R.J., and Headrick J.P. Cardioprotection with adenosine metabolism inhibitors in ischemic-reperfused mouse heart // Cardiovasc Res. 2001. Vol. 52. P. 120-129.
- Decking U.K., Schlieper G., Kroll K., and Schrader J. Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release // Circ Res. - 1997. - Vol. 81. - P. 154-164.
- 156. Sala-Newby G.B. and Newby A.C. Cloning of a mouse cytosolic 5'-nucleotidase-I identifies a new gene related to human autoimmune infertility-related protein // Biochim Biophys Acta. 2001. Vol. 1521. P. 12-18.
- Spychala J., Madrid-Marina V., and Fox I.H. High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP // J Biol Chem. -1988. - Vol. 263. - P. 18759-18765.
- 158. Banditelli S., Baiocchi C., Pesi R., Allegrini S., Turriani M., Ipata P.L., Camici M., and Tozzi M.G. The phosphotransferase activity of cytosolic 5'-nucleotidase; a purine analog phosphorylating enzyme // Int J Biochem Cell Biol. - 1996. - Vol. 28. - P. 711-720.
- 159. Rampazzo C., Gazziola C., Ferraro P., Gallinaro L., Johansson M., Reichard P., and Bianchi V. Human high-Km 5'-nucleotidase effects of overexpression of the cloned cDNA in cultured human cells // Eur J Biochem. 1999. Vol. 261. P. 689-697.
- 160. Sala-Newby G.B., Freeman N.V., Skladanowski A.C., and Newby A.C. Distinct roles for recombinant cytosolic 5'-nucleotidase-I and -II in AMP and IMP catabolism in COS-7 and H9c2 rat myoblast cell lines // J Biol Chem. - 2000. - Vol. 275. - P. 11666-11671.
- Valentine W.N., Fink K., Paglia D.E., Harris S.R., and Adams W.S. Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency // J Clin Invest. - 1974. - Vol. 54. - P. 866-879.
- 162. Amici A. and Magni G. Human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase, PN-I // Arch Biochem Biophys. 2002. Vol. 397. P. 184-190.
- 163. Dragon S., Hille R., Gotz R., and Baumann R. Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (cAMP)-inducible pyrimidine 5'-nucleotidase and pyrimidine nucleotide metabolism of chick embryonic erythrocytes // Blood. - 1998. - Vol. 91. - P. 3052-3058.
- 164. Rees D.C., Duley J.A., and Marinaki A.M. Pyrimidine 5' nucleotidase deficiency // Br J Haematol. 2003. Vol. 120. P. 375-383.
- 165. Young J.D. The SLC28 (CNT) and SLC29 (ENT) nucleoside transporter families: a 30year collaborative odyssey // Biochem Soc Trans. - 2016. - Vol. 44. - P. 869-876.
- Baldwin S.A., Beal P.R., Yao S.Y., King A.E., Cass C.E., and Young J.D. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29 // Pflugers Arch. 2004. Vol. 447. P. 735-743.
- 167. Baldwin S.A., Yao S.Y., Hyde R.J., Ng A.M., Foppolo S., Barnes K., Ritzel M.W., Cass C.E., and Young J.D. Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes // J Biol Chem. - 2005. - Vol. 280. - P. 15880-15887.
- 168. Govindarajan R., Leung G.P., Zhou M., Tse C.M., Wang J., and Unadkat J.D. Facilitated mitochondrial import of antiviral and anticancer nucleoside drugs by human equilibrative nucleoside transporter-3 // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. -2009. - Vol. 296. - P. G910-922.

- 169. Barnes K., Dobrzynski H., Foppolo S., Beal P.R., Ismat F., Scullion E.R., Sun L., Tellez J., Ritzel M.W., Claycomb W.C., Cass C.E., Young J.D., Billeter-Clark R., Boyett M.R., and Baldwin S.A. Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH // Circ Res. 2006. Vol. 99. P. 510-519.
- 170. Zhou M., Duan H., Engel K., Xia L., and Wang J. Adenosine transport by plasma membrane monoamine transporter: reinvestigation and comparison with organic cations // Drug Metab Dispos. - 2010. - Vol. 38. - P. 1798-1805.
- 171. Damaraju V.L., Scriver T., Mowles D., Kuzma M., Ryan A.J., Cass C.E., and Sawyer M.B. Erlotinib, gefitinib, and vandetanib inhibit human nucleoside transporters and protect cancer cells from gemcitabine cytotoxicity // Clin Cancer Res. 2014. Vol. 20. P. 176-186.
- 172. Damaraju V.L., Sawyer M.B., Mackey J.R., Young J.D., and Cass C.E. Human nucleoside transporters: biomarkers for response to nucleoside drugs // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2009. Vol. 28. P. 450-463.
- McIntosh V.J. and Lasley R.D. Adenosine receptor-mediated cardioprotection: are all 4 subtypes required or redundant? // J Cardiovasc Pharmacol Ther. - 2012. - Vol. 17. - P. 21-33.
- 174. Parkinson F.E., Damaraju V.L., Graham K., Yao S.Y., Baldwin S.A., Cass C.E., and Young J.D. Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain // Curr Top Med Chem. 2011. Vol. 11. P. 948-972.
- King A.E., Ackley M.A., Cass C.E., Young J.D., and Baldwin S.A. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets // Trends Pharmacol Sci. -2006. - Vol. 27. - P. 416-425.
- 176. Ritzel M.W., Yao S.Y., Huang M.Y., Elliott J.F., Cass C.E., and Young J.D. Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na+-nucleoside cotransporter (hCNT1) // Am J Physiol. 1997. Vol. 272. P. C707-714.
- 177. Ritzel M.W., Yao S.Y., Ng A.M., Mackey J.R., Cass C.E., and Young J.D. Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na+/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine // Mol Membr Biol. 1998. Vol. 15. P. 203-211.
- 178. Ritzel M.W., Ng A.M., Yao S.Y., Graham K., Loewen S.K., Smith K.M., Ritzel R.G., Mowles D.A., Carpenter P., Chen X.Z., Karpinski E., Hyde R.J., Baldwin S.A., Cass C.E., and Young J.D. Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na+-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib) // J Biol Chem. -2001. - Vol. 276. - P. 2914-2927.
- 179. Errasti-Murugarren E., Molina-Arcas M., Casado F.J., and Pastor-Anglada M. A splice variant of the SLC28A3 gene encodes a novel human concentrative nucleoside transporter-3 (hCNT3) protein localized in the endoplasmic reticulum // FASEB J. -2009. - Vol. 23. - P. 172-182.
- 180. Smith K.M., Slugoski M.D., Cass C.E., Baldwin S.A., Karpinski E., and Young J.D. Cation coupling properties of human concentrative nucleoside transporters hCNT1, hCNT2 and hCNT3 // Mol Membr Biol. - 2007. - Vol. 24. - P. 53-64.
- 181. Smith K.M., Ng A.M., Yao S.Y., Labedz K.A., Knaus E.E., Wiebe L.I., Cass C.E., Baldwin S.A., Chen X.Z., Karpinski E., and Young J.D. Electrophysiological

characterization of a recombinant human Na+-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in Xenopus oocytes // J Physiol. - 2004. - Vol. 558. - P. 807-823.

- 182. Wang C., Pimple S., and Buolamwini J.K. Interaction of benzopyranone derivatives and related compounds with human concentrative nucleoside transporters 1, 2 and 3 heterologously expressed in porcine PK15 nucleoside transporter deficient cells. Structure-activity relationships and determinants of transporter affinity and selectivity // Biochem Pharmacol. - 2010. - Vol. 79. - P. 307-320.
- 183. Damaraju V.L., Smith K.M., Mowles D., Nowak I., Karpinski E., Young J.D., Robins M.J., and Cass C.E. Interaction of fused-pyrimidine nucleoside analogs with human concentrative nucleoside transporters: High-affinity inhibitors of human concentrative nucleoside transporter 1 // Biochem Pharmacol. 2011. Vol. 81. P. 82-90.
- 184. Bogan K.L., Evans C., Belenky P., Song P., Burant C.F., Kennedy R., and Brenner C. Identification of Isn1 and Sdt1 as glucose- and vitamin-regulated nicotinamide mononucleotide and nicotinic acid mononucleotide [corrected] 5'-nucleotidases responsible for production of nicotinamide riboside and nicotinic acid riboside // J Biol Chem. - 2009. - Vol. 284. - P. 34861-34869.
- 185. Hara N., Yamada K., Shibata T., Osago H., Hashimoto T., and Tsuchiya M. Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells // J Biol Chem. - 2007. - Vol. 282. - P. 24574-24582.
- Ipata P.L. and Tozzi M.G. Recent advances in structure and function of cytosolic IMP-GMP specific 5'-nucleotidase II (cN-II) // Purinergic Signal. - 2006. - Vol. 2. - P. 669-675.
- 187. Hasmann M. and Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis // Cancer Res. - 2003. - Vol. 63. - P. 7436-7442.
- 188. Ward J.L., Sherali A., Mo Z.P., and Tse C.M. Kinetic and pharmacological properties of cloned human equilibrative nucleoside transporters, ENT1 and ENT2, stably expressed in nucleoside transporter-deficient PK15 cells. Ent2 exhibits a low affinity for guanosine and cytidine but a high affinity for inosine // J Biol Chem. - 2000. - Vol. 275. - P. 8375-8381.
- 189. Wang C., Lin W., Playa H., Sun S., Cameron K., and Buolamwini J.K. Dipyridamole analogs as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4) // Biochem Pharmacol. - 2013. - Vol. 86. - P. 1531-1540.

БЛАГОДАРНОСТИ

Во-первых, я хотела бы поблагодарить своего научного руководителя, Андрея Анатольевича Никифорова, за возможность работы над интересными проектами, ценные конструктивные замечания и помощь на всех этапах выполнения диссертации.

Во-вторых, я хотела бы выразить благодарность директору НИК «Нанобиотехнологии» СПбПУ Михаилу Алексеевичу Ходорковскому за обеспечение наилучших условий для работы в лаборатории и за внимание, оказанное моей научной работе.

Кроме того, благодарю Константина Александровича Шабалина и Кирилла Борисовича Нериновского за неоценимую помощь в анализе образцов с использованием ЯМР-спектроскопии.

Также благодарю профессора Матиаса Циглера и его научную группу при Департаменте молекулярной биологии Университета города Берген (Норвегия) за уникальную возможность проходить стажировки в лаборатории и за ценные замечания при обсуждении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 14-04-32117 мол_а, № 14-04-01765 А), Российского научного фонда (проект № 16-14-10240) и государственного задания № 3.8742.2017/БЧ.