

На правах рукописи

КУЛИКОВА Вероника Алексеевна

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

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2017

Работа выполнена в Научно-исследовательском комплексе «Нанобиотехнологии» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Никифоров Андрей Анатольевич
старший научный сотрудник Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Гамбарян Степан Петрович
главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук», Санкт-Петербург

доктор химических наук, кандидат биологических наук

Буник Виктория Ивановна
ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина

Защита диссертации состоится « ___ » декабря 2017 года в ___ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института цитологии Российской академии наук по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте института по адресу <http://www.cytspb.rssi.ru>.

Адрес электронной почты: cellbio@incras.ru

Факс: 8(812)297-35-41

Автореферат разослан « ___ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Каминская Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

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. 1А). NAD является коферментом в окислительно-восстановительных реакциях ключевых метаболических путей. Помимо участия в окислительно-восстановительном метаболизме, NAD является субстратом для нескольких семейств регуляторных белков, контролирующих важнейшие механизмы жизнедеятельности клетки. Такие ферменты как деацетилазы белков сиртуины, ADP-рибозилтрансферазы и поли-ADP-рибозилполимераза отвечают за NAD-зависимые деацетилирование, моно- и поли-ADP-рибозилирование белков и участвуют 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, из NAD синтезируются вторичные посредники, отвечающие за мобилизацию кальция [7] (Рис. 1Б). В результате описанных выше NAD-зависимых процессов динуклеотид расщепляется, так как все они сопряжены с разрывом N-гликозидной связи между никотинамидом и рибозой. Для эффективного осуществления NAD-зависимых метаболических и сигнальных функций клетке необходимо постоянно поддерживать определенный уровень NAD.

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 [8-10].

Основным способом регуляции уровня NAD в клетках человека является его биосинтез из поступающих с пищей предшественников, таких как Nam и никотиновая кислота (nicotinic acid, NA), известных как витамин B₃, 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 аденилтрансферазами семейства NMNAT до NAD и динуклеотида никотиновой кислоты и аденина (nicotinic acid adenine dinucleotide, NAAD), соответственно. NAAD амидируется ферментом NADS с образованием NAD (Рис. 1Б) [9, 11].

Недавно было показано, что рибозиды никотинамида (nicotinamide riboside, NR) и никотиновой кислоты (nicotinic acid riboside, NAR) также являются ключевыми предшественниками NAD [12]. 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 (Рис. 1Б).

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 (Рис. 1Б).

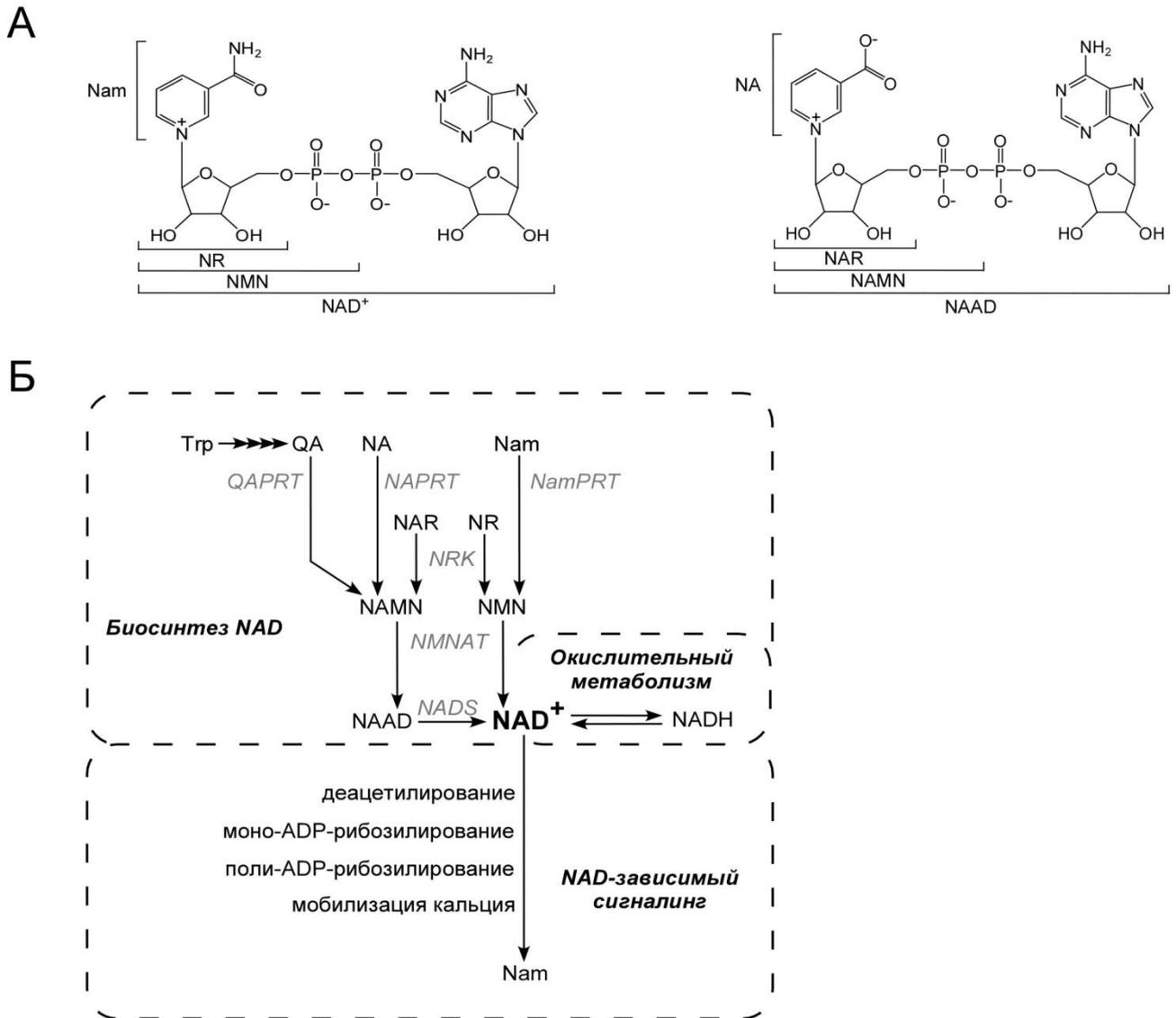


Рисунок 1. Метаболизм NAD в клетках человека. (А) Структура NAD и его основных метаболитов. Nam – никотинамид, NA – никотиновая кислота, NR – рибозид никотинамида, NAR – рибозид никотиновой кислоты, NMN – никотинамид мононуклеотид, NAMN – мононуклеотид никотиновой кислоты, NAAD – динуклеотид никотиновой кислоты и аденина. (Б) Предшественниками синтеза внутриклеточного NAD являются: триптофан (Trp), пиридиновые основания Nam и NA, а также нуклеозиды – NR и NAR. Trp 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 до NAD. NA фосфорибозилтрансферазой NAPRT превращается в NAMN. NAMN аденилируется аденилилтрансферазами семейства NMNAT до NAAD, который затем NAD синтетазой (NADS) амидируется до NAD. Нуклеозиды NR и NAR фосфорилируются киназами семейства NRK, соответственно, до NMN и NAMN. В окислительно-восстановительных реакциях NAD^+ обратимо переходит в восстановленную форму NADH. Деацетилирование, моно- и поли-ADP-рибозилирование белков являются NAD-зависимыми модификациями. Кроме того, из NAD синтезируются вторичные посредники, отвечающие за мобилизацию кальция. В результате данных NAD-зависимых сигнальных процессов от динуклеотида отщепляется Nam.

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 [13-15].

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.

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.

Основные 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.
2. 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.

Научная новизна работы

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 в клетках человека путем дефосфорилирования соответствующих мононуклеотидов NMN и NAMN цитозольными 5'-

нуклеотидазами. Таким образом, мы показали, что синтез нуклеозидов NR и NAR является неотъемлемой частью метаболизма NAD в клетках человека. Кроме того, мы установили, что культивируемые клетки могут выделять в питательную среду нуклеозид NAR, который затем выступает в роли предшественника NAD в соседних клетках, не способных использовать Nam и NA для синтеза NAD. Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что одни клетки человека могут поддерживать эффективный синтез NAD в других клетках. Также, мы показали, что импорт нуклеозидов NR и NAR в клетки человека может осуществляться при помощи нуклеозидных переносчиков семейств ENT и CNT.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты, полученные в данной работе, расширяют представления о механизмах поддержания уровня NAD в клетках человека и взаимопревращения его ключевых предшественников. Установленные в данной работе механизмы 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.

Апробация работы

Работа прошла апробацию на лабораторных семинарах в НИК «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.

Личный вклад автора

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.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 91 странице машинописного текста и иллюстрирована 25 рисунками и 8 таблицами. Список цитируемых литературных источников включает 189 наименований. Нумерация таблиц и рисунков самостоятельная в пределах каждой главы.

Финансовая поддержка работы

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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: мышинные антитела к пептиду FLAG M2 (Sigma), мышинные к SOD2 D10 (Santa Cruz Biotechnology), и вторичные кроличьи антитела к мышам, 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).

Культивирование клеток человека и трансфекция. Клетки человека линии HEK 293 и HepG2 выращивали на поверхности пластиковых культуральных чашек или флаконов в питательной среде DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, 2 mM 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. Мышинные эмбриональные стволовые клетки mESC E14 выращивали в питательной среде KnockOut DMEM с добавлением лейкомиа-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.

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 экспрессии в *E. coli* белков, слитых с 6xHis, последовательности ДНК, кодирующие данные белки, вставляли в экспрессионный вектор pET-24a (Novagen).

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

ЯМР-спектроскопия. Кондиционированную питательную среду, взятую от трансфицированных и нетрансфицированных клеток человека линии HEK 293 или HepG2 и от мышинных 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 лиофилизировали и ресуспендировали в буферном растворе, приготовленном на основе D₂O и содержащем 50 mM NaP_i (pH 6.5) и 1 mM сахарозу, которую использовали в качестве внутреннего стандарта химического сдвига ($\delta(^1\text{H})$, 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 (¹H 700 MHz, Varian, США), оборудованного 5 мм 13C/15N инверсным датчиком с градиентом магнитного поля вдоль оси Z, при 25 °C. Для регистрации ¹H 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 непрекрывающихся сигналов протонов со следующими химическими сдвигами ($\delta(^1\text{H})$): 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.

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 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % ДСН, 0.01 % бромфенол синий, 10 % глицерин и 100 mM 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 Кумасси или с помощью окраски мембраны с использованием антител к белку SOD2.

Иммуноцитохимия. Для фиксации клеток использовали 4 % формальдегид на основе PBS. Для пермеабиллизации 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.

Очистка белков, слитых с 6xHis, при помощи аффинной хроматографии. Компетентные клетки *E. coli* (Rosetta, DE3) трансформировали векторами, кодирующими слитые с 6xHis белки CN-IA, CN-II, CN-III или Sdt1. Экспрессию рекомбинантных белков индуцировали добавлением 0.1 mM изопропил-бета-D-тиогалактопиранозида (ИПТГ) (для CN-II-His, CN-III-His и Sdt1-His) или 0.5 mM ИПТГ (для CN-IA-His). Затем клетки растили в течение 3 часов при температуре 22 °C (для CN-II-His, CN-III-His и Sdt1-His) или при температуре 37 °C (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 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl и 10 mM Имидазол. Осадок клеток, в которых был экспрессирован белок CN-IA-His, ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 10 mM Имидазол, 10 % глицерин и 10 mM 2-меркаптоэтанол. Клетки лизировали добавлением лизоцима в конечной концентрации 1 мг/мл, обрабатывали 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 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl и 1 mM 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 °C.

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 mM Hepes (pH 7.0), 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 1 mM ADP и 100 нг/мл BSA. CN-II-His инкубировали с субстратом в буферном растворе, содержащем 50 mM MES (pH 6.5), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM ATP и 100 нг/мл BSA. CN-III-His инкубировали с субстратом в буферном растворе, содержащем 50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT и 100 нг/мл BSA. Sdt1-His инкубировали с субстратом в буферном растворе, содержащем 50 mM Hepes (pH 7.0), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT и 100 нг/мл BSA. Ферментативные реакции инициировали добавлением белка и проводили в конечном объеме 40 мкл в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем в реакцию 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).

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»). Концентрация 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 CMP, NMN или NAMN в соответствующем буферном растворе (см. «Измерение 5'-нуклеотидазной активности»). Концентрация 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 или NAMN в соответствующем буферном растворе (см. «Измерение 5'-нуклеотидазной активности»). Концентрация белка была 0.125 нг/мл (когда инкубировали с CMP), 0.25 нг/мл (когда инкубировали с NMN) и 1 нг/мл (когда инкубировали с NAMN). Данные были обработаны с использованием SigmaPlot 12.0, K_M и V_{max} были вычислены методом нелинейной регрессии (ligand binding; one-site saturation).

ВЭЖХ. Белки CN-II-His, CN-III-His, Sdt1-His инкубировали с 5 мМ 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 °С) 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 CC 250/3 Nucleosil 100-3 C₁₈ HD (Machery and Nagel) и элюировали с помощью градиента ацетонитрила (буферный раствор А: 10 мМ KP_i (рН 5.0), 2 мМ тетрабутиламмония бромид и 3 % ацетонитрил; буферный раствор Б: 10 мМ KP_i (рН 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Для того чтобы охарактеризовать способность культивируемых клеток человека синтезировать нуклеозиды NR и NAR, нами был оптимизирован метод детекции и количественного анализа метаболитов NAD в питательной среде для культивирования клеток человека при помощи ЯМР-спектроскопии (см. раздел «Материалы и методы»). Пики в ¹H-ЯМР спектрах, соответствующие основаниям Nam и NA и нуклеозидам NR и NAR, хорошо разделялись в диапазоне 8.50 – 9.70 ppm (Рис. 2А). Кроме того, мы показали, что диапазон химических сдвигов, соответствующих исследуемым NAD метаболитам, находится в области ¹H-ЯМР спектра, в которой не наблюдается сигналов от других химических соединений, содержащихся в среде (Рис. 2Б, верхняя панель). 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. Для каждого из исследуемых соединений была установлена минимальная концентрация для идентификации соединения (не менее 200 нМ).

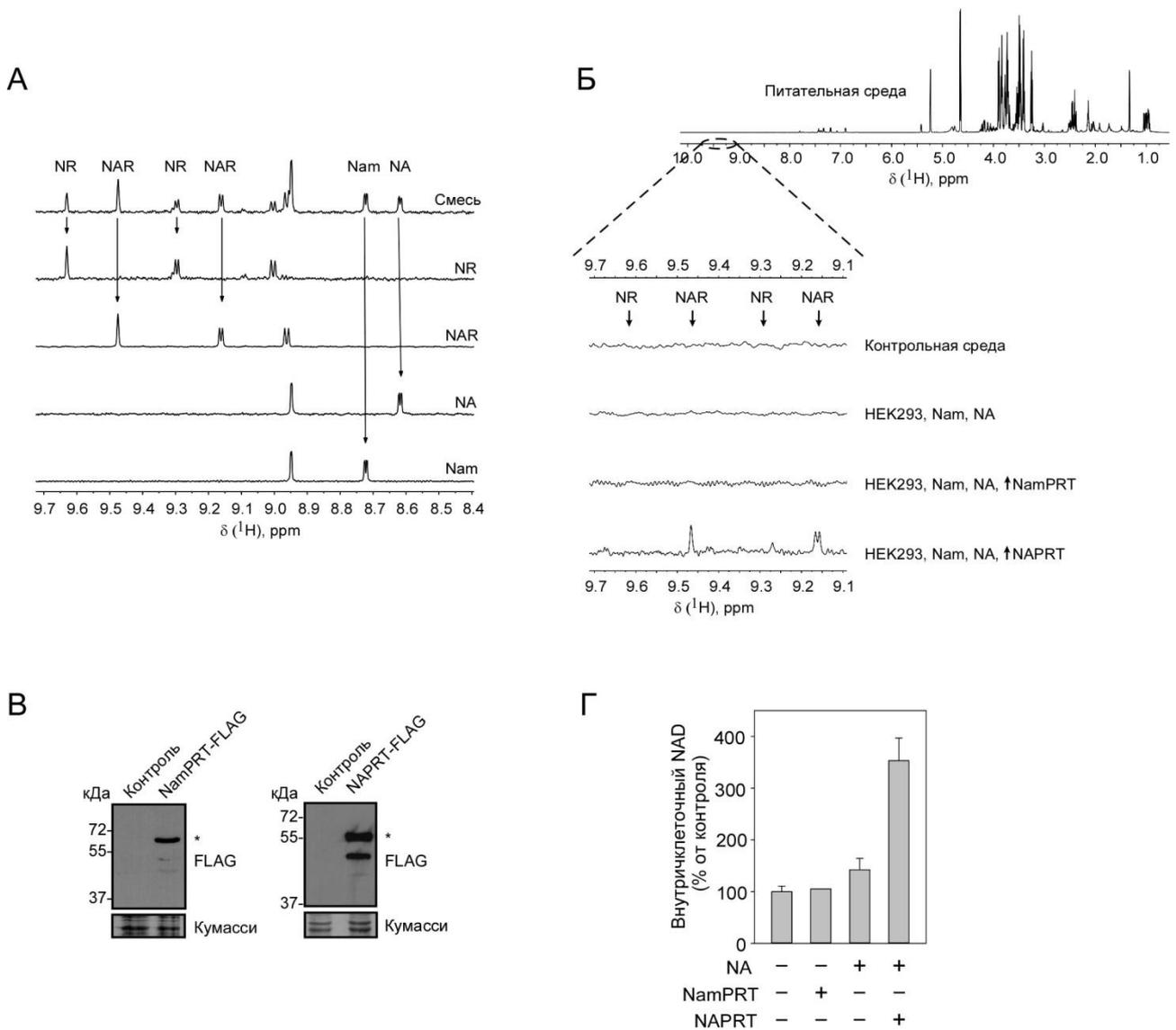


Рисунок 2. Клетки человека HEK 293 конвертируют никотиновую кислоту в рибозид никотиновой кислоты, который затем выходит из клеток в питательную среду. (А) 700 МГц ^1H -ЯМР спектры основных предшественников NAD: Nam, NA, NR и NAR, а также их смеси. Стрелками обозначены пики, которые были выбраны для идентификации и количественного анализа соответствующих метаболитов в смеси. **(Б)** Клетки HEK 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. 700 МГц ^1H -ЯМР спектр кондиционированной питательной среды показан в верхней части рисунка. Участок ЯМР спектра, содержащий пики, соответствующие нуклеозидам NR и NAR (обозначены стрелками), выделен пунктирной линией и увеличен. **(В)** 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. **(Г)** Уровень NAD в клетках, временно экспрессирующих NamPRT и NAPRT. Уровень NAD в нетрансфицированных клетках (контроль) принимали за 100 %. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений.

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 HEK 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 (Рис. 2Б). У дрожжей нуклеозиды NR и NAR образуются из соответствующих мононуклеотидов NMN и NAMN [16]. Мы предположили, что отсутствие нуклеозидов NR и NAR в кондиционированной среде, полученной от клеток человека, выращиваемых в стандартных условиях, может быть вызвано низкой внутриклеточной концентрацией мононуклеотидов NMN и NAMN. Чтобы проверить данную гипотезу, клетки человека линии HEK 293 временно трансфицировали векторами, кодирующими FLAG-слитые фосфорибозилтрансферазы NamPRT или NAPRT (Рис. 2В). NamPRT и NAPRT синтезируют мононуклеотиды NMN и NAMN из оснований Nam и NA, соответственно (Рис. 1Б). Через 3 дня после трансфекции среду собирали и анализировали с помощью ЯМР. В кондиционированной среде от клеток, сверхэкспрессирующих NamPRT, ни NR, ни NAR не были детектированы (Рис. 2Б). Однако сверхэкспрессия NAPRT привела к значительному накоплению нуклеозида NAR в кондиционированной питательной среде (Рис. 2Б, 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. 2Г). Отсутствие влияния сверхэкспрессии NamPRT на уровень динуклеотида в клетках может быть связано с тем, что NamPRT ингибируется NAD [17]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки человека могут конвертировать NA в нуклеозид 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

Далее мы поставили задачу установить молекулярные механизмы синтеза нуклеозидов NR и NAR в клетках человека. Известно, что в клетках дрожжей нуклеозиды NR и NAR могут образовываться путем дефосфорилирования соответствующих мононуклеотидов NMN и NAMN 5'-нуклеотидазами Isn1 и Sdt1 [16]. В данной работе мы оценивали способность цитозольных 5'-нуклеотидаз человека CN-IA, CN-II и CN-III [18, 19] дефосфорилировать мононуклеотиды NMN и NAMN и, таким образом, синтезировать нуклеозиды NR и NAR. В качестве положительного контроля использовали дрожжевой белок Sdt1. Клетки HEK 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. 3А). Цитоплазматическую локализацию сверхэкспрессированных FLAG-слитых 5'-нуклеотидаз подтверждали с помощью метода иммунофлуоресцентного анализа (данные не показаны). Наличие нуклеозидов NR и NAR в среде, полученной после культивирования трансфицированных клеток, анализировали с помощью ЯМР-спектроскопии (Рис. 3Б). Однако нуклеозиды не были обнаружены в исследуемых образцах (данные не показаны), также как и в контрольной среде, полученной от нетрансфицированных клеток (Рис. 2Б).

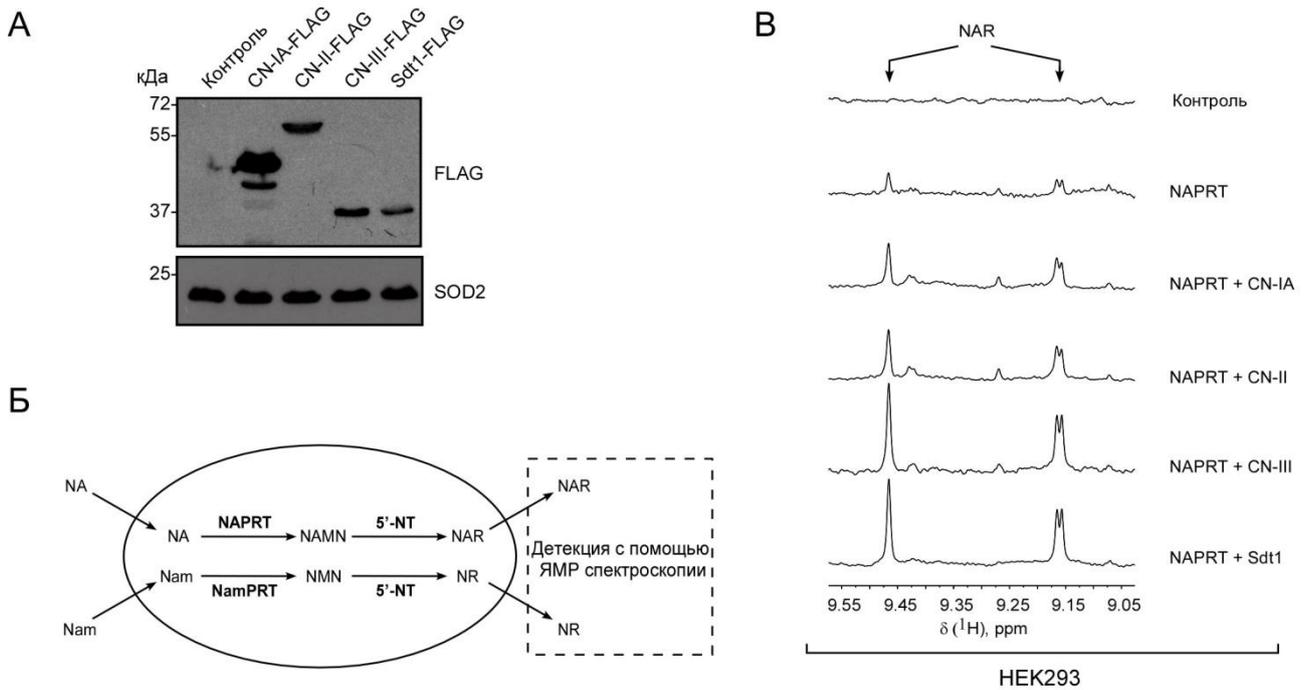


Рисунок 3. Цитозольные 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II и CN-III синтезируют нуклеозид NAR в клетках человека. (А) Клетки HEK 293 временно трансфицировали векторами, кодирующими FLAG-слитые 5'-нуклеотидазы CN-IA, CN-II, CN-III и Sdt1. Сверхэкспрессию FLAG-слитых белков в клетках подтверждали методом иммуноблотинга с использованием специфических антител к пептиду FLAG. Для контроля белковой нагрузки использовали окрашивание антителами к пептиду SOD2. **(Б)** 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. **(В)** Клетки HEK 293 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.

Ранее на Рисунке 2Б 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 клетках HEK 293 (Рис. 3Б). Количество нуклеозида NAR 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. 3В). Мы также проводили ко-экспрессию белка NamPRT с каждой из 5'-нуклеотидаз в клетках HEK 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.

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 [18, 19]. CN-IA имеет высокую аффинность к AMP и аллостерически активируется ADP [20]. CN-II предпочтительно гидролизует IMP и GMP и аллостерически активируется ATP [21, 22]. Пиримидиновая 5'-нуклеотидаза CN-III наиболее эффективно дефосфорилирует мононуклеотиды CMP и UMP до соответствующих нуклеозидов [23]. 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 6xHis. Белки были экспрессированы и выделены из *E. coli* при помощи аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы. Для измерения специфических NMN/NAMN 5'-нуклеотидазных активностей выделенных из *E. coli* рекомбинантных 6xHis-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. 4А).

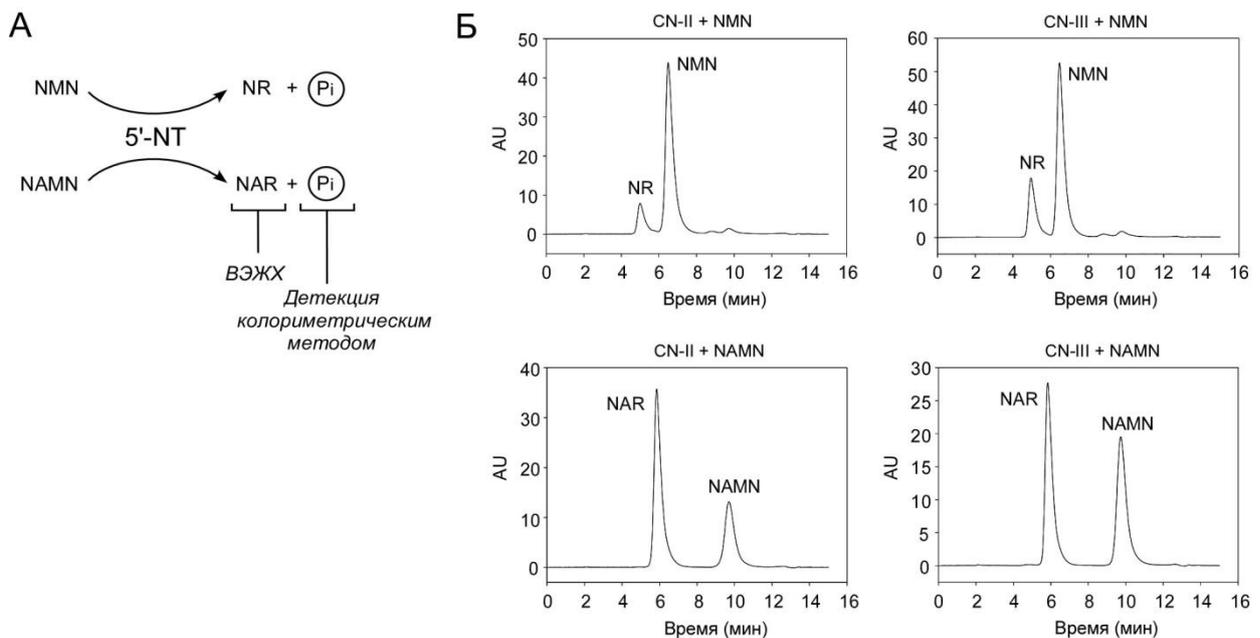


Рисунок 4. 5'-нуклеотидазы CN-II и CN-III дефосфорилируют мононуклеотиды NMN и NAMN с образованием нуклеозидов NR и NAR *in vitro*. (А) Схематическое изображение экспериментального подхода. Для измерения NMN/NAMN 5'-нуклеотидазных активностей выделенных из *E. coli* рекомбинантных 6xHis-слитых 5'-нуклеотидаз (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. (Б) Образование NR и NAR 5'-нуклеотидазами CN-II и CN-III подтверждали с помощью ВЭЖХ. Для этого проводили 5'-нуклеотидазные реакции белков CN-II-His и CN-III-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.

В первую очередь нами были подобраны оптимальные условия ферментативных реакций для изучаемых 5'-нуклеотидаз (температура, значение pH и кофакторы – ADP, ATP). Далее мы проводили сравнительный анализ способности ферментов дефосфорилировать мононуклеотиды AMP, IMP, CMP, NMN и NAMN при 5 мМ концентрации субстратов (Табл. 1). Как и ожидалось, каждая из 5'-нуклеотидаз имела наибольшую активность по отношению к соответствующему предпочтительному субстрату (AMP 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 AMP. 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 CMP и дефосфорилировала AMP, NMN и NAMN с эффективностью примерно 3-6 % от эффективности дефосфорилирования CMP (Табл. 1).

Таблица 1. 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, мкмоль/мин/мг	Относительная активность, %
CN-IA	AMP	148.57±3.74	100.0±2.5
	IMP	64.65±2.67	43.5±1.8
	CMP	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
	CMP	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	CMP	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	CMP	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

Дрожжевая 5'-нуклеотидаза Sdt1, в отличие от изучаемых белков человека, эффективнее дефосфорилировала NMN, чем NAMN (Табл. 1). Образование NR и NAR 5'-нуклеотидазами CN-II и CN-III в реакциях с NMN и NAMN подтверждали с помощью ВЭЖХ (Рис. 4Б).

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. Мы установили кинетические параметры реакций K_M и V_{max} для каждого из белков с NMN, NAMN и с предпочтительным субстратом (Табл. 2). 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 позволяют предположить, что 5'-нуклеотидазы человека CN-II и CN-III дефосфорилируют NMN и NAMN в условиях повышенной концентрации данных 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. 3В). 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. 2). Однако, несмотря на низкую аффинность к NMN и NAMN, Sdt1 является одним из ключевых ферментов, отвечающих за синтез NR и NAR в клетках дрожжей [16].

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

Таблица 2. 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 метода детекции высвободившегося в результате 5'-нуклеотидазной реакции неорганического фосфата (см. Материалы и методы). Значения K_M 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	K_M , 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	СМР	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	СМР	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

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 [17, 24], так как в них отсутствует фосфорибозилтрансфераза никотиновой кислоты NAPRT, которая катализирует образование NAMN из NA (Рис. 1Б). Синтез NAD из Nam – единственного предшественника NAD, который присутствует в стандартной питательной среде, подавляли добавлением в питательную среду ингибитора NamPRT – FK866 [25]. Клетки HepG2 погибали в присутствии FK866, даже если в среду была добавлена NA (Рис. 5А). Временная сверхэкспрессия NAPRT-FLAG полностью восстанавливала выживаемость клеток (Рис. 5А), несмотря на то, что при временной трансфекции лишь небольшой процент клеток экспрессировал NAPRT (Рис. 5Б).

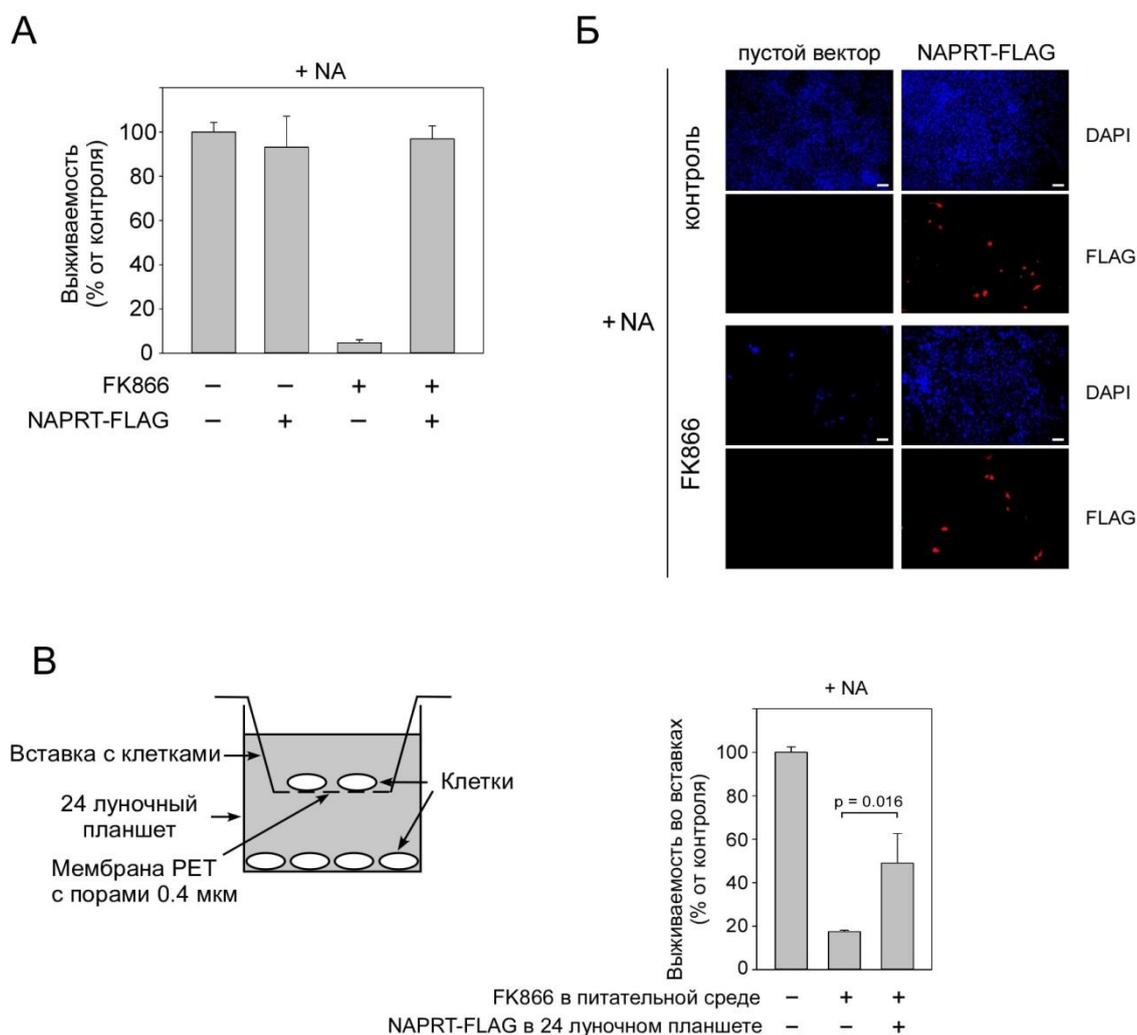


Рисунок 5. Клетки HepG2, экспрессирующие NAPRT, выделяют в питательную среду предшественник NAD, и, таким образом, поддерживают соседние клетки, неспособные использовать Nam и NA для синтеза NAD. Клетки HepG2 выращивали в присутствии NA. Синтез NAD из Nam подавляли добавлением в среду FK866. **(А)** Клетки погибают в присутствии FK866. Сверхэкспрессия NAPRT восстанавливает выживаемость клеток. Выживаемость клеток оценивали с помощью теста МТТ 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)** Клетки, временно трансфицированные вектором, кодирующим FLAG-слитый белок NAPRT или пустой вектор. Ядра клеток

окрашены красителем DAPI. Масштабный отрезок – 100 мкм. **(В)** Одну популяцию клеток выращивали в 24-луночном планшете, а другую популяцию выращивали в этой же питательной среде во вставках для кокультивирования клеток. Клетки, выращиваемые в 24-луночном планшете, трансфицировали вектором, кодирующим белок NAPRT-FLAG, после чего оценивали выживаемость клеток, выращиваемых во вставках для кокультивирования, 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 ко-культивирования, (контроль) принимали за 100 %. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. Значение p вычисляли с помощью t -критерия Стьюдента. PET - полиэстеровая мембрана.

На Рисунке 5Б представлены данные иммунофлуоресцентного анализа клеток HepG2 после временной трансфекции вектором, кодирующим FLAG-слитый белок NAPRT. Обработка контрольных (трансфицированных пустым вектором) клеток ингибитором FK866 приводило к гибели клеток даже в присутствии NA. Однако сверхэкспрессия NAPRT приводила к выживанию не только трансфицированных клеток, но и нетрансфицированных клеток культуры (Рис. 5Б). Выживаемость нетрансфицированных клеток в присутствии FK866 и NA означает, что клетки, экспрессирующие NAPRT-FLAG, выделяют в питательную среду какие-то предшественники NAD, отличные от Nam и NA, которые используются нетрансфицированными клетками для синтеза собственного NAD. Для того, чтобы исключить, что данный эффект наблюдался из-за наличия между клетками физического контакта, мы оптимизировали 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 метаболитами (Рис. 5В, левая панель). Во вставке для ко-культивирования выращивали нетрансфицированные клетки HepG2. Сверхэкспрессия NAPRT в клетках HepG2, выращиваемых в лунке 24-луночного планшета, значительно увеличивала выживаемость нетрансфицированных клеток во вставке после обработки FK866 и NA (Рис. 5В, правая панель). Таким образом, мы исключили возможную роль прямых межклеточных контактов.

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.

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. 6Б). Более того, в кондиционированной среде от клеток HepG2, выращиваемых в присутствии Nam и NA и временно сверхэкспрессирующих NAPRT, было детектировано накопление нуклеозида NAR (Рис. 6В). Однако концентрация нуклеозида NAR в среде была достаточно низкой (около 1.2–1.5 мкМ).

Чтобы установить, достаточно ли такой низкой концентрации нуклеозида, чтобы поддерживать выживаемость клеток, мы инкубировали клетки HepG2 в присутствии FK866 с добавлением в питательную среду NR или NAR в разных концентрациях (10^{-9} - 10^{-4} М). 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. 6Г).

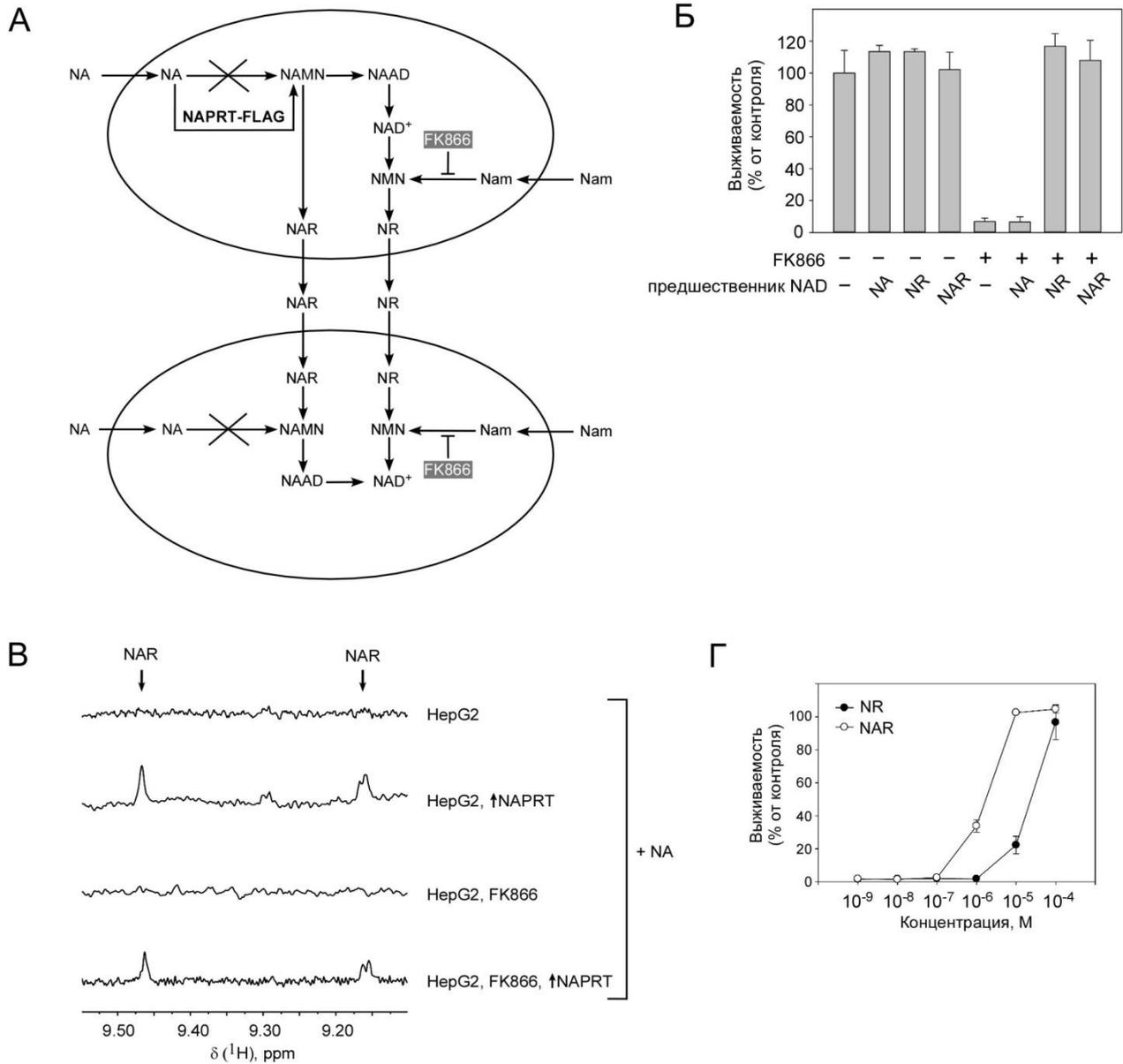


Рисунок 6. Нуклеозид NAR выходит из клеток HepG2 и используется соседними клетками в качестве предшественника NAD. Клетки HepG2 выращивали в присутствии FK866, NA, NR или NAR. **(А)** Предлагаемая модель выхода нуклеозидов NR и/или NAR из клеток HepG2, сверхэкспрессирующих NAPRT-FLAG. **(Б)** Добавленные 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. **(В)** 700 МГц ^1H -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. (Г) 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, неспособных 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 использовали кондиционированную среду от временно трансфицированных NAPRT клеток HEK 293. Кондиционированная среда, полученная от данных клеток, приводила к увеличению уровня выживаемости клеток HepG2, выращиваемых в присутствии FK866 (Рис. 7А).

Кондиционированная среда, полученная от нетрансфицированных клеток HEK 293, не восстанавливала выживаемость, тогда как среда от нетрансфицированных клеток HeLa значительно увеличивала уровень выживаемости клеток HepG2, выращиваемых в присутствии FK866 (Рис. 7Б). Более того, в кондиционированной среде, полученной от клеток HeLa (но не от HEK 293), был обнаружен нуклеозид NAR (Рис. 7В). 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.

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

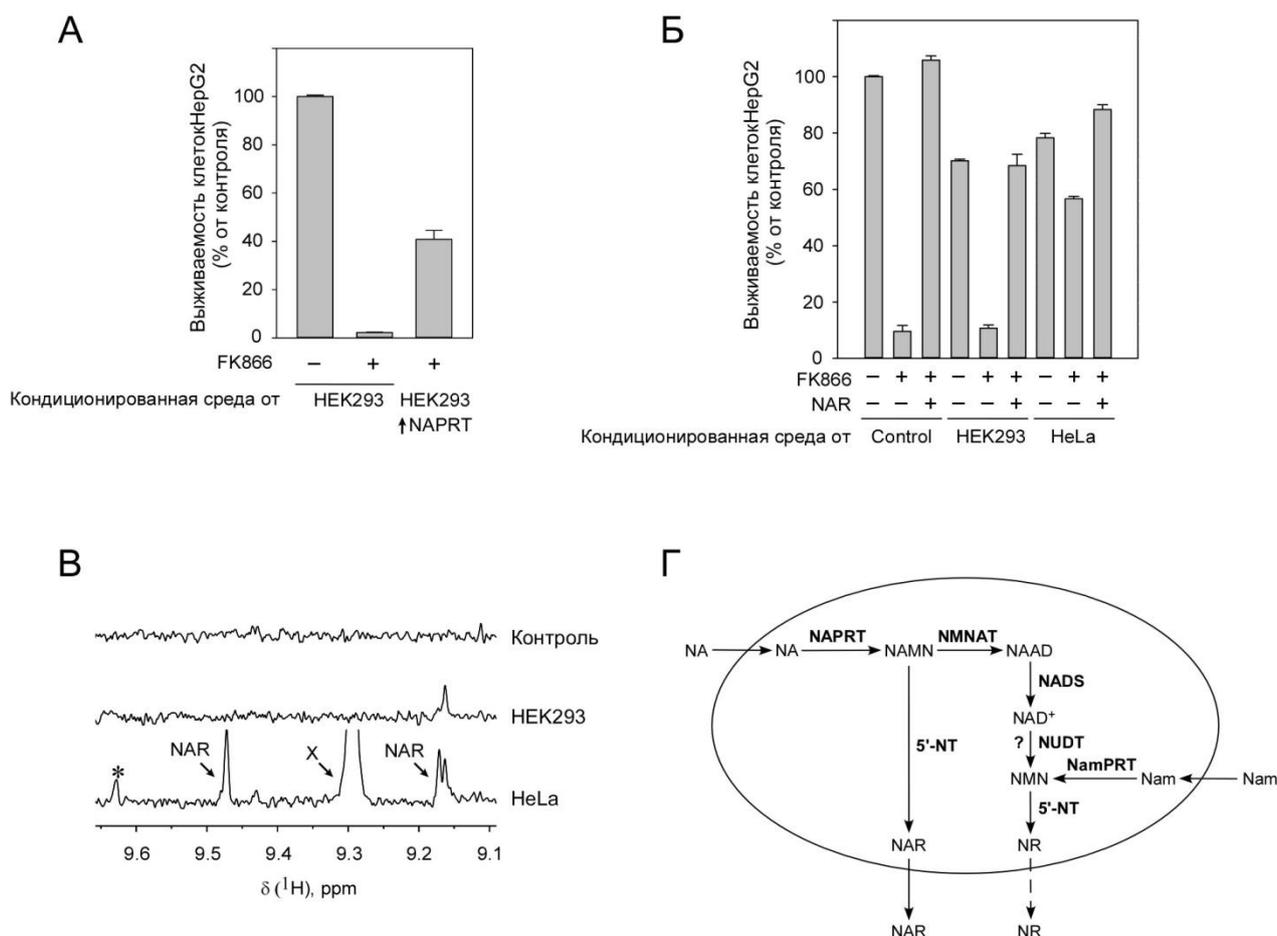


Рисунок 7. Образование нуклеозидов NR и NAR и их выход из клеток человека. (А) Нетрансфицированные клетки HEK 293 или временно трансфицированные вектором, кодирующим NAPRT, выращивали в течение 4 дней в присутствии Nam и NA. Затем среду собирали, перемешивали в соотношении 2:1 со свежей средой, и полученную 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. **(Б)** Проводили эксперимент аналогичный эксперименту, описанному в (А), только в качестве доноров кондиционированной среды для клеток HepG2 использовали нетрансфицированные клетки HeLa и HEK 293. В качестве контроля в среду добавляли нуклеозид NAR. Приведены средние значения и стандартные отклонения для 3-х измерений. **(В)** 700 МГц ^1H -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. **(Г)** Схема образования нуклеозидов NR и NAR из оснований Nam и NA и их выхода из клеток человека.

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

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 [26]. В ENT 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 HEK 293 выращивали в питательной среде ДМЕМ, содержащей 10 % фетальную бычью сыворотку. Чтобы подавить синтез NAD из Nam, в питательную среду добавляли ингибитор NamPRT – FK866 [25]. 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. 8А). Далее мы оценивали выживаемость клеток после добавления различных ингибиторов переносчиков нуклеозидов.

S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI) – ингибитор переносчиков семейства ENT – значительно уменьшал способность NR восстанавливать выживаемость клеток (Рис. 8А). 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 CNT3 [27], никакого эффекта на выживаемость клеток не наблюдалось (Рис. 8А). Phloridzin, добавленный в среду в концентрации 250 мкМ, при которой он ингибирует все белки семейства CNT [27], подавлял вход в клетки NAR, но не NR (Рис. 8А). В меньших концентрациях, при которых Phloridzin ингибирует CNT2 и CNT3, но не CNT1 [27], данный ингибитор не имел никакого эффекта на выживаемость клеток. Gefitinib в концентрации 6 мкМ, при которой он может ингибировать ENT1 и CNT1 [28], но не другие переносчики данных семейств, значительно уменьшал способность NR и NAR восстанавливать уровень внутриклеточного NAD (Рис. 8А).

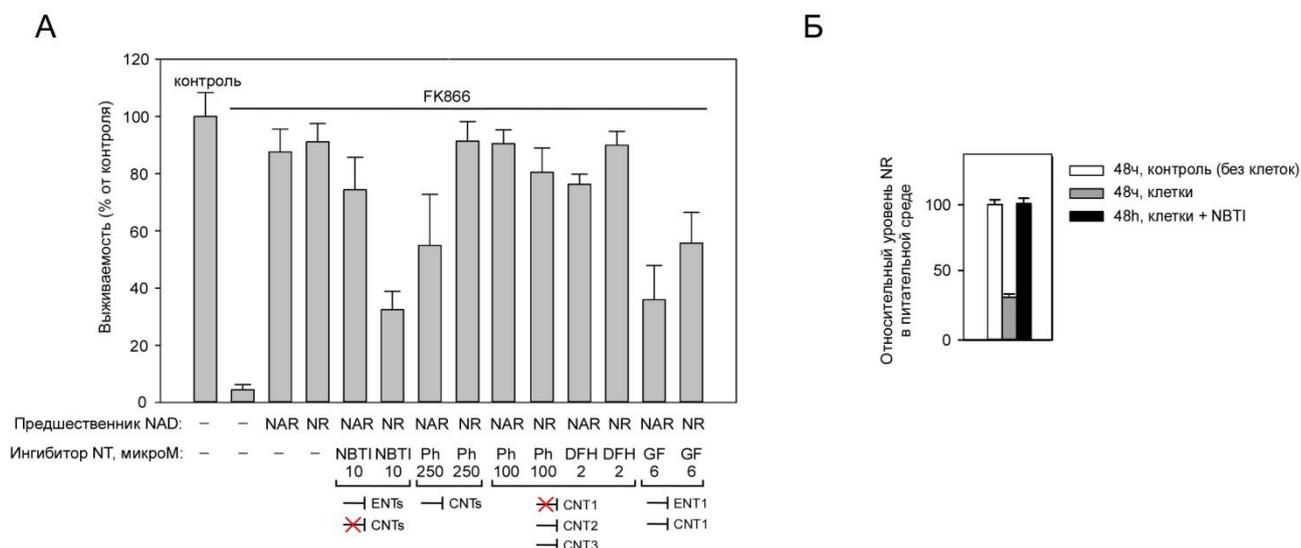


Рисунок 8. Оценка влияния ингибиторов нуклеозидных переносчиков на транспорт NR и NAR в клетки человека HEK 293 и в мышинные эмбриональные стволовые клетки mESC E14. (А) Выживаемость клеток HEK 293 оценивали через 3 дня после добавления FK866, нуклеозидов NR или NAR и ингибиторов нуклеозидного транспорта. 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 CNT, 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 белки ENT1 и CNT1. **(Б)** Нуклеозид NR добавляли в питательную среду, содержащую NBTI (10 мкМ), после чего питательную среду инкубировали с клетками НЕК 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.

Кроме того, используя метод ЯМР-спектроскопии, мы оценивали количество NR в кондиционированной среде через 48 часов после добавления данного нуклеозида и ингибитора NBTI (Рис. 8Б). Количество нуклеозида NR в питательной среде значительно уменьшалось при инкубации среды с клетками НЕК 293. Однако при добавлении ингибитора NBTI количество NR оставалось таким же, как и в образце без клеток (Рис. 8Б). Данное наблюдение подтверждает, что NBTI эффективно подавляет импорт NR в клетки НЕК 293. Схожие результаты были получены на клетках человека линии HeLa, а также на мышинных эмбриональных стволовых клетках mESC E14 (не показано).

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

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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 CN-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.). *ActaNaturae*. 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.

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.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ 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.
3. 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.
5. 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.
7. Fliegert R., Gasser A., and Guse A.H. Regulation of calcium signalling by adenine-based 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. 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.
12. Bieganski 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.
13. 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.
14. 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 diet-induced obesity // *Cell Metab*. - 2012. - Vol. 15. - P. 838-847.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Ipata P.L. and Balestri F. The functional logic of cytosolic 5'-nucleotidases // *Curr Med Chem*. - 2013. - Vol. 20. - P. 4205-4216.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Amici A. and Magni G. Human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase, PN-I // *Arch Biochem Biophys*. - 2002. - Vol. 397. - P. 184-190.
24. 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. **25.** 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. **26.** 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. **27.** 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. **28.** 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.