

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Артюхов Артем Викторович

**Разработка способов направленной регуляции
дегидрогеназ 2-оксокислот млекопитающих и особенности
такой регуляции в клетках с разным типом метаболизма**

03.01.08 – Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в отделе биокинетики НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:	<i>Бунник-Фаренвальд Виктория-Лариса Ивановна,</i> <i>доктор химических наук</i>
Официальные оппоненты:	<i>Мирошников Константин Анатольевич,</i> <i>доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.</i> <i>Зверева Мария Эмильевна,</i> <i>доктор химических наук, заместитель декана по научной работе, профессор кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.</i> <i>Никифоров Андрей Анатольевич,</i> <i>кандидат биологических наук, заведующий лабораторией клеточного метаболизма и сигналинга Института цитологии РАН.</i>

Защита диссертации состоится 25 мая 2022 года в 15:00 на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/450679133/>

Автореферат разослан «18» апреля 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Шаповалова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время поиск низкомолекулярных регуляторов метаболизма является одной из актуальных проблем биоинженерии. Направленные воздействия на отдельные биохимические реакции позволяют исследовать комплексные ответы метаболической сети на изменения в ее определенных узлах, что может применяться для решения различных задач в медицине, биотехнологии и системной биологии. Представители семейства дегидрогеназ 2-оксокислот функционируют в таких узловых точках метаболизма, имеющих ключевое значение для регуляции метаболизма в целом. Используя в качестве кофермента тиаминдифосфат – дифосфорилированную форму тиамина, или витамина В1, – данные ферменты связывают ключевые пути метаболизма углеводов и аминокислот. На сегодняшний день семейство включает в себя три хорошо охарактеризованных представителя, а именно пируватдегидрогеназу, 2-оксоглутаратдегидрогеназу и дегидрогеназу разветвленных 2-оксокислот, однако благодаря развитию методов высокопроизводительного секвенирования и масс-спектрометрии белков, появляется все больше данных также о существовании их различных изоферментов и изоформ. Ввиду ключевого положения дегидрогеназ 2-оксокислот в метаболизме, разные уровни экспрессии отдельных представителей семейства в значительной степени определяют специфичность метаболизма отдельных клеток, тканей и даже целых организмов. В результате, при направленной регуляции определенных дегидрогеназ 2-оксокислот можно ожидать значительные эффекты на метаболизм изучаемых объектов, в том числе присущие лишь отдельным тканям и клеткам.

Для фармакологической регуляции комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот в настоящее время используют структурные аналоги их коферментов, тиамина или липоевой кислоты. Однако такие соединения действуют независимо от субстратной специфичности комплексов. В то же

время синтетические аналоги 2-оксокислот, у которых карбоксильная группа замещена фосфоновой или фосфиновой, предоставляют возможность селективно и эффективно ингибировать отдельных представителей семейства дегидрогеназ 2-оксокислот. В отличие от генетических манипуляций, влияние на метаболизм *in vivo* с помощью таких субстратных аналогов может легко контролироваться по времени введения и является обратимым. Это позволяет проводить краткосрочные исследования, не связанные с изменением экспрессии генов, а также комбинировать фармакологическую регуляцию дегидрогеназ 2-оксокислот с патологическими воздействиями.

Степень разработанности темы исследования

При постановке целей и задач данной работы учитывались существующие литературные данные, в основном описывающие механизм действия сукцинилфосфоната в качестве специфического ингибитора 2-оксоглутаратдегидрогеназы различных организмов, а также фосфиновых и фосфоновых аналогов пирувата как ингибиторов пируватдегидрогеназ растений и бактерий. Так, сукцинилфосфонат и его производные, эффективно ингибирующие 2-оксоглутаратдегидрогеназу животных, уже были исследованы на разных животных и растительных моделях, где были показаны различные метаболические и физиологические ответы. Такие ответы, однако, сильно зависели от исходного состояния метаболической сети в тканях/клетках и могли отличаться, например, для клеточных линий с разной экспрессией 2-оксоглутаратдегидрогеназы, разных тканей животных, а также животных моделей различных патологий и контрольных животных.

Ингибирование же пируватдегидрогеназы синтетическими аналогами пирувата приводило к снижению жизнеспособности растений, вследствие чего аналоги пирувата предлагались в качестве гербицидов и антибактериальных препаратов, однако исследований их действия на животных практически не проводилось. Специфические ингибиторы дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот в литературе не упоминаются.

При этом, за последние пятнадцать лет стали появляться все больше данных об изоферментах дегидрогеназ 2-оксокислот. В частности, белковые продукты идентифицированных в геномах животных генов *OGDHL* и *DHTKD1* могут отличаться от основного изофермента 2-оксоглутаратдегидрогеназы, кодируемого геном *OGDH*, по кинетическим свойствам, и как следствие, физиологической роли. Такие изоферменты могут в разной степени экспрессироваться в различных тканях и/или клетках, что осложняет исследования регуляции дегидрогеназ 2-оксокислот *in vivo*.

Цель и задачи работы

Цель данной работы заключается в разработке способов направленной фармакологической регуляции полиферментных комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот разной субстратной специфичности у млекопитающих, с учетом клеточной и тканевой специфичности таковой регуляции. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать способы фракционирования тканей мозга, печени и сердца животных для получения препаратов, обогащенных полиферментными комплексами дегидрогеназ 2-оксокислот различной субстратной специфичности.
2. Определить синтетические аналоги дикарбоновых 2-оксокислот для специфического ингибирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы и 2-оксоадипатдегидрогеназы тканей животных и охарактеризовать их действие в клетках и тканях.
3. Среди синтетических аналогов пирувата выявить наиболее эффективные ингибиторы пируватдегидрогеназы *in vitro* и охарактеризовать их действие *in vivo*.
4. Оценить возможность специфического ингибирования дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот синтетическими аналогами разветвленных 2-оксокислот.

5. Использовать специфические ингибиторы 2-оксоглутаратдегидрогеназы, 2-оксоадипатдегидрогеназы и пируватдегидрогеназы, для выявления последствий регуляции данных ферментов для физиологии клеток с разными типами метаболизма
6. Охарактеризовать краткосрочные и отложенные последствия действия специфических регуляторов дегидрогеназ 2-оксокислот на метаболизм экспериментальных животных с учетом его тканеспецифичности.

Объект и предмет исследования

Объектом данного исследования являются дегидрогеназы 2-оксокислот животных, функционирующие в ключевых точках метаболизма. Благодаря их положению на пересечении различных метаболических путей, регуляторные воздействия на данные ферменты приводят к глобальным метаболическим перестройкам, что может быть использовано для инженерии метаболизма. Предметом исследования являются направленные воздействия на дегидрогеназы 2-оксокислот с помощью их синтетических регуляторов, с целью создания биологических объектов с измененными метаболическими характеристиками или коррекции патологий.

Научная новизна

В работе было изучено влияние новых фосфоновых аналогов 2-оксокислот, глутарилфосфоната и адипоилфосфоната на активности различных ферментов *in vitro*. Проведенное сравнительное исследование действия сукцинилфосфоната, глутарилфосфоната и адипоилфосфоната показало специфичность действия сукцинилфосфоната и адипоилфосфоната в качестве ингибиторов 2-оксоглутаратдегидрогеназы и ее изофермента, 2-оксоадипатдегидрогеназы, соответственно. Кроме того, фосфоновые и фосфиновые аналоги пирувата были впервые применены для регуляции пируватдегидрогеназы животных. Впервые охарактеризовано действие фосфоновых аналогов разветвленных 2-оксокислот на дегидрогеназу

разветвленных 2-оксокислот.

С помощью ингибиторов 2-оксоглутаратдегидрогеназы, 2-оксоадипатдегидрогеназы и пируватдегидрогеназы охарактеризованы метаболические последствия их ингибирования в клеточных культурах с разной экспрессией генов, кодирующих ферменты-мишени и ассоциированные с ними белки. Впервые показано, что ингибирование 2-оксоглутаратдегидрогеназы мозга приводит к изменениям редокс-метаболизма, а одним из индикаторов ингибирования 2-оксоадипатдегидрогеназы мозга является изменение уровня триптофана. При ингибировании пируватдегидрогеназы в мозге животных выявлено усиление деградации аминокислот и сопряженные изменения активности глутаминсинтазы, показана специфичность такой регуляции в разных анатомических отделах головного мозга животных.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы имеют как теоретическую, так и практическую значимость для биоинженерии. Полученные данные исследований *in vitro* расширяют представления о специфичности действия сукцинилфосфоната в качестве ингибитора 2-оксоглутаратдегидрогеназы животных. Исследование новых фосфиновых аналогов, глутарилфосфоната и адипоилфосфоната, позволило предложить способы направленной фармакологической регуляции активностей изофермента 2-оксоглутаратдегидрогеназы, 2-оксоадипатдегидрогеназы, в тканях и клетках животных. Фосфиновые и фосфиновые аналоги пирувата были показаны в качестве эффективных и специфических ингибиторов пируватдегидрогеназы животных. Продемонстрирована возможность ингибирования дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот фосфиновыми аналогами разветвленных 2-оксокислот.

Проведенная работа позволяет практическое использование фосфиновых и фосфиновых аналогов 2-оксокислот для инженерии метаболизма ввиду

узловой роли в нем дегидрогеназ 2-оксокислот. В частности, такие соединения могут применяться в медицине для диагностики и терапии в персонализированной онкологии и использоваться для моделирования симптомов нейродегенеративных заболеваний. Решение таких задач с использованием методов системной биологии актуально для биоинженерии метаболических потоков в клетках.

В ходе выполнения данного исследования были также оптимизированы и разработаны методы анализа сложных биологических образцов с целью количественного определения отдельных метаболитов в качестве индикаторов функции дегидрогеназ 2-оксокислот и метаболизма в целом.

Методология и методы исследования

Для определения эффективности и специфичности действия синтетических аналогов 2-оксокислот *in vitro* и клеточной и тканевой специфичности их эффектов *in vivo* использовались передовые для современного метода развития биоинженерии методы энзимологии, биохимии, аналитической химии и клеточной биологии, дополненные биоинформатическим анализом баз данных белковых последовательностей и экспрессии генов. Основные методы работы включают: частичную очистку комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот с помощью селективного осаждения; определение активностей дегидрогеназ 2-оксокислот и ассоциированных ферментов и кинетический анализ их ингибирования фосфиновыми и фосфоновыми аналогами 2-оксокислот с помощью микропланшетных ридеров; получение экстрактов клеток и тканей для измерения уровней метаболитов, активностей ферментов и относительного содержания белков; определение метаболитов в экстрактах с помощью как высокопроизводительных (газовая хроматография, совмещенная с масс-спектрометрией, ионообменная хроматография) так и энзиматических (спектрофотометрических и флуориметрических) методов; определение экспрессии белков интереса в тканях с помощью иммуноблоттинга; оценка

восстановительного потенциала клеток; поиск последовательностей белковых гомологов целевого белка и их филогенетический анализ; экстракция данных по экспрессии генов интереса из транскриптомных и протеомных баз данных и их обработка; статистический анализ экспериментальных данных с использованием имеющегося программного обеспечения.

Положения, выносимые на защиту

1. Среди исследованных аналогов 2-оксокислот, сукцинилфосфонат, адипоилфосфонат, ацетилфосфинат и метиловый эфир изобутирилфосфоната являются наиболее эффективными ингибиторами 2-оксоглутаратдегидрогеназы, 2-оксоадипатдегидрогеназы, пируватдегидрогеназы и дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот *in vitro*, соответственно.
2. В культурах клеток животных метаболическим индикатором ингибирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы является падение уровня адипата. Маркерами ингибирования 2-оксоадипатдегидрогеназы являются падения уровней глутарата и глюкозы, более выраженные в клетках с низкой экспрессией гена *DHDKD1* (C6). При ингибировании пируватдегидрогеназы наблюдается рост уровня пирувата и снижение уровней интермедиатов цикла Кребса и ассоциированных с ними аминокислот.
3. В мозге животных ингибирование 2-оксоглутаратдегидрогеназы приводит к изменению уровней NAD^+ , глутамата, цитруллина и редокс-потенциала глутатиона, ингибирование 2-оксоадипатдегидрогеназы вызывает изменение уровня триптофана.
4. При ингибировании пируватдегидрогеназы изменение содержания аминокислот и активности глутаминсинтазы зависят от анатомического отдела головного мозга.

Личный вклад автора в проведении исследования

Основные результаты работы получены самим автором. Личный вклад заключается в дизайне и проведении экспериментов; статистической обработке полученных результатов; анализе полученных результатов в свете известных из литературы данных; представлении результатов на научных конференциях и публикациях в рецензируемых научных журналах.

Проведенное исследование требовало кооперации с различными научными группами. Синтез фосфоновых и фосфиновых аналогов 2-оксокислот проводился сотрудниками Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Хроматографическое разделение аминокислот для их количественного анализа осуществлялось сотрудниками отдела хроматографического анализа НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа с экспериментальными животными проводилась совместно с сотрудниками биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Приготовление гомогенатов и экстрактов тканей животных проводилось совместно с другими сотрудниками отдела биокинетики НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Эксперименты с клеточными культурами проводились при участии сотрудников Университетской клиники Лейпцигского университета (Германия), Медицинского Института Люблина (Польша) и Института молекулярной физиологии растений имени Макса Планка (Германия).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликованы 15 печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science (в том числе, 5 статей в журналах квартиля Q1) и Scopus.

Связь с государственными программами

Диссертационная работа выполнена при поддержке грантов РФФИ

«Аспиранты» № 19-34-90157 (Руководитель Буник-Фаренвальд В.И.), «Итал_т» № 18-54-7812 (Руководитель Буник-Фаренвальд В.И.), «Итал_т» № 20-54-7804 (Руководитель Граф А.В.) и грантов РФ № 14-15-00133 (Руководитель Буник-Фаренвальд В.И.), № 18-14-00116 (Руководитель Буник-Фаренвальд В.И.).

Апробация результатов

Результаты данной работы были представлены в рамках защиты научно-квалификационной работы во время обучения в аспирантуре факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ в 2021 г., а также на различных российских и международных конференциях: Международная конференция для студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 2021, 2020 и 2018 и 2017 г.; Международный симпозиум «Российское наследие Александра фон Гумбольдта», Москва, 2019 г.; European Congress of Neuropsychopharmacology, онлайн, 2020 г. и Копенгаген (Дания), 2019 г.; I Студенческий биохимический форум МГУ, Москва, 2018 г.; XIX Tetrahedron Symposium, Рива дель Гарда (Италия), 2018 г.; Keystone Symposia Conference: Rare and Undiagnosed Diseases: Discovery and Models of Precision Therapy, Бостон (США), 2017 г.; XIII Human Proteome Organization World Congress, Мадрид (Испания), 2014 г.

Структура и объем работы

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, основных выводов и результатов, списка публикаций и списка цитируемой литературы, содержащего 438 ссылок, и дополнительных материалов. Работа изложена на 170 страницах текста, содержит 7 таблиц и 33 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Список сокращений

АФ – адилоилфосфонат; АцФН – ацетилфосфинат; АцФМе₂ – диметилловый эфир ацетилфосфоната; ГФ – глутарилфосфонат; КДГРК – комплекс дегидрогеназы разветвлённых 2-оксокислот; ОАДГ – 2-оксоадипатдегидрогеназа, 2-оксоадипатдегидрогеназный; ОАДК – 2-оксоадипатдегидрогеназный комплекс; ОГДГ – 2-оксоглутаратдегидрогеназа, 2-оксоглутаратдегидрогеназный; ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс; ПДГ – пируватдегидрогеназа, пируватдегидрогеназный; ПДГК – пируватдегидрогеназный комплекс; СФ – сукцинилфосфонат; ТМАФ – триметилловый эфир адилоилфосфоната; ТЭАФ – триэтилловый эфир адилоилфосфоната; ТЭСФ – триэтилловый эфир сукцинилфосфоната.

Регуляция дегидрогеназ 2-оксокислот фосфоновыми и фосфиновыми аналогами субстратов

Дегидрогеназы 2-оксокислот являются семейством тиаминдифосфат-зависимых ферментов, которые в составе полиферментных комплексов, катализирующих реакции окислительного декарбоксилирования 2-оксокислот, связывают ключевые пути метаболизма углеводов и аминокислот. На сегодняшний день семейство включает три хорошо охарактеризованных представителя (Рис. 1). Пируватдегидрогеназа (ПДГ) в составе пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГК) связывает гликолиз, цикл Кребса и распад аминокислот группы пирувата. 2-Оксоглутаратдегидрогеназа (ОГДГ) в составе 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (ОГДК) катализирует необратимую стадию в цикле Кребса и связывает его с распадом аминокислот группы глутамата. Дегидрогеназа разветвленных 2-оксокислот в составе соответствующего комплекса (КДГРК) участвует в распаде разветвленных аминокислот: валина, лейцина и изолейцина.

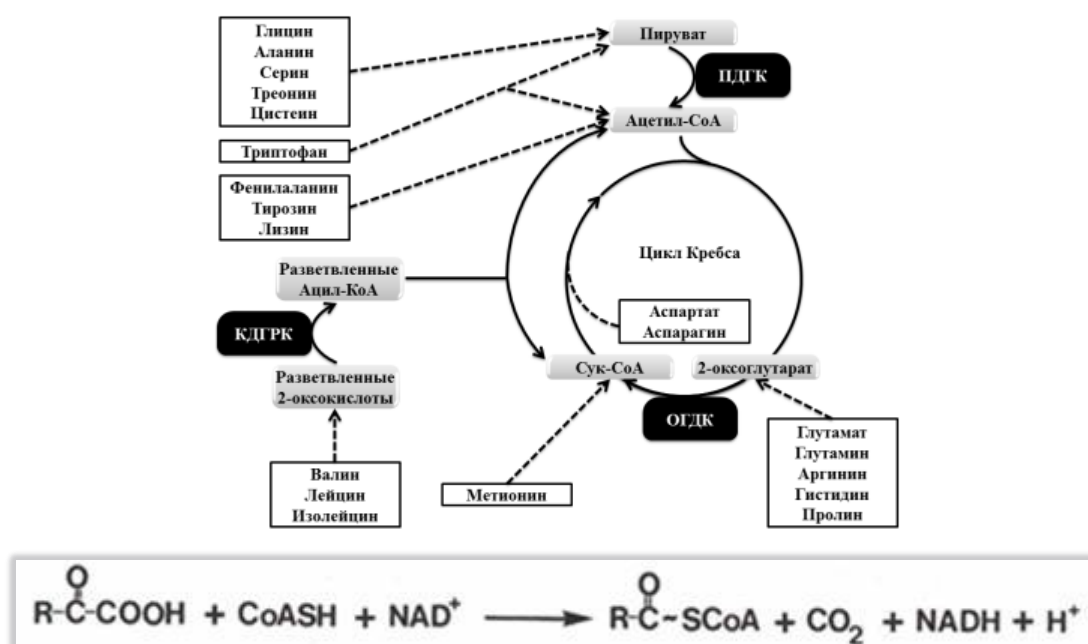


Рис. 1. Метаболическая роль охарактеризованных представителей комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот в цикле Кребса и в деградации аминокислот и общая реакция, катализируемая ими. ПДГК – пируватдегидрогеназный комплекс, ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, КДГРК – комплекс дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот. Сук-СoA – сукцинил-СoA.

В последнее время в связи с развитием методов высокопроизводительного секвенирования появляется все больше данных о наличии изоферментов дегидрогеназ 2-оксокислот. В случае ОГДГ было показано наличие трех гомологичных генов в геноме человека: помимо ранее известного гена *OGDH*, были выявлены гены *OGDHL* и *DHTKD1*. Ввиду высокой схожести последовательностей продукт гена *OGDHL* предположительно катализирует ту же реакцию, что и *OGDH*. Специфичность же продукта гена *DHTKD1* должна отличаться от предыдущих двух в сторону связывания больших субстратов. Считается, что данный белок является 2-оксоадипатдегидрогеназой (ОАДГ), катализируя в составе соответствующего комплекса (ОАДК) схожую с ОГДК реакцию с 2-оксоадипатом – продуктом деградации лизина и триптофана (Рис. 2). Экспрессия указанных изоферментов имеет клеточную и тканевую специфичность, что ввиду узловой роли дегидрогеназ 2-оксокислот в метаболизме определяет специфичность метаболизма в целом.

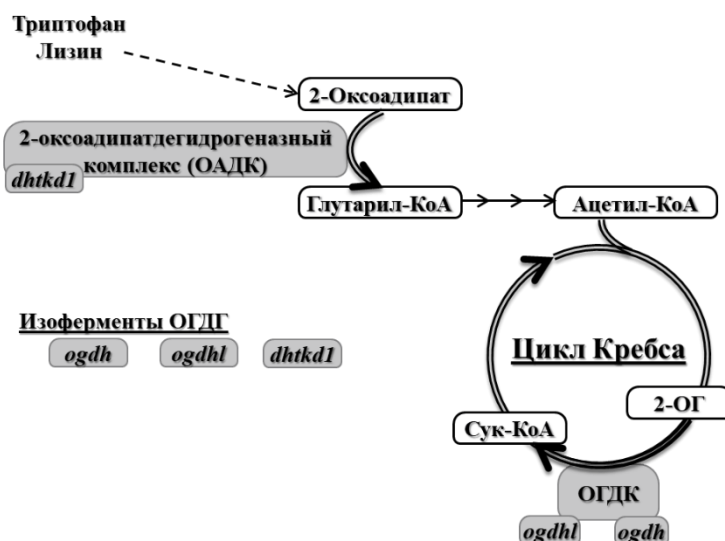


Рис. 2. Метаболическая роль изоферментов 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ), кодируемых генами *OGDH*, *OGDHL* и *DHTKD1*. ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс. Сук-СоА – сукцинил-СоА.

В качестве специфических регуляторов дегидрогеназ 2-оксокислот могут применяться синтетические аналоги их 2-оксокислотных субстратов, в которых карбоксильная группа замещена фосфоновой или фосфиновой (Рис. 3). Связываясь в активном центре ферментов, данные соединения формируют аналоги переходного состояния, за счет чего являются эффективными и специфичными ингибиторами дегидрогеназ 2-оксокислот и могут использоваться *in vivo*.

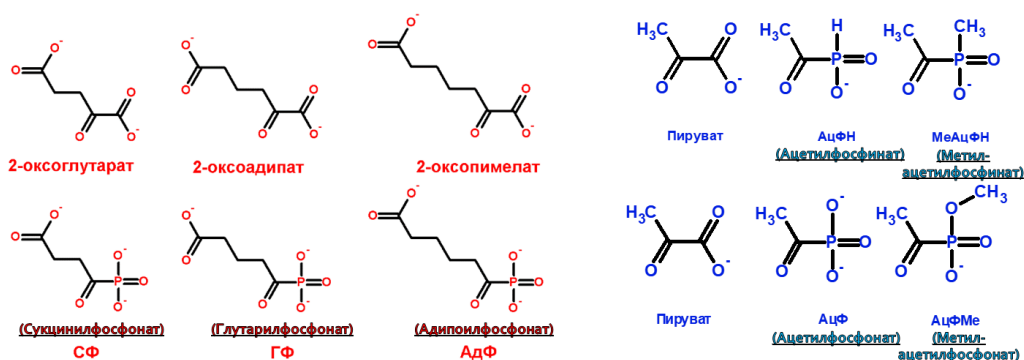


Рис. 3. Структуры 2-оксокислотных субстратов дегидрогеназ 2-оксокислот и их фосфоновых и фосфиновых аналогов. Дикарбоновые 2-оксокислоты и их фосфоновые аналоги показаны красным, пируват и его фосфиновые и фосфоновые аналоги – синим.

Кинетика насыщения ОГДК и ОАДК животных 2-оксосубстратами и ингибирования их фосфоновыми аналогами

Для исследования действия фосфовых и фосфиновых аналогов 2-оксокислот *in vitro*, из тканей крыс были получены препараты, обогащенные дегидрогеназами 2-оксокислот. В случае ОГДК и ОАДК были взяты печень, где, согласно результатам вестерн-блоттинга, имеется наибольшая экспрессия гена *DHTKD1*, и сердце, где экспрессия *DHTKD1* на 2 порядка ниже, а экспрессия *OGDH* схожа с таковой в печени (Рис. 4А). В обоих препаратах насыщение ОГДГ реакции 2-оксоглутаратом схоже и подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен (Рис. 4В,С,Е).

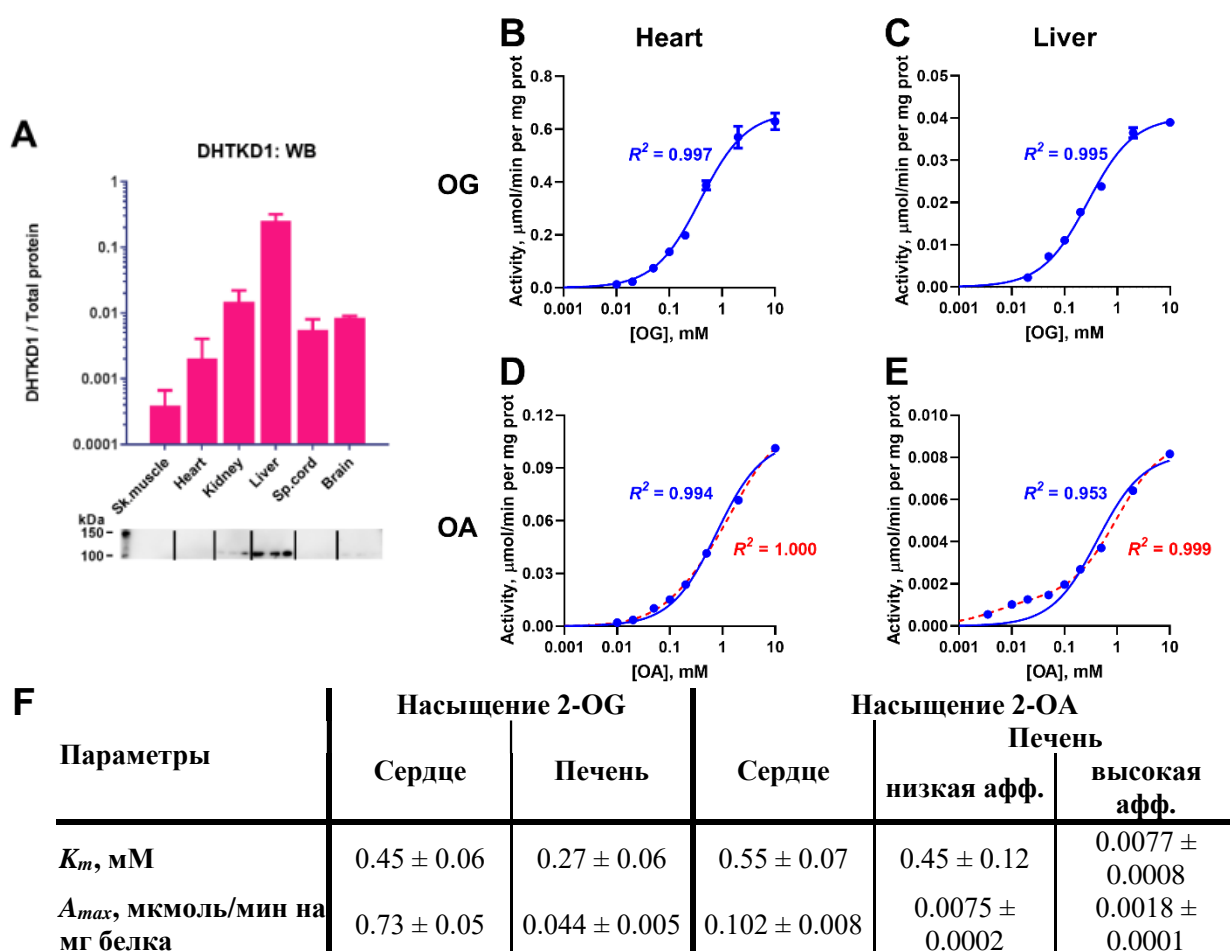


Рис. 4. Кинетический анализ насыщения ОГДГ и ОАДГ 2-оксосубстратами. (А) Представленность белка DHTKD1 в разных тканях, определенное с помощью вестерн-блоттинга. (В-Е) Насыщение препаратов, обогащенных ОГДК и ОАДК из сердца (В, D) и печени (С, Е) 2-оксоглутаратом (В, С) и 2-оксоадипатом (D, Е). Экспериментальные данные аппроксимированы уравнением Михаэлиса-Ментен (синие линии) или суммой двух уравнений (красные линии). (F) Параметры аппроксимаций данных на (В-Е).

Однако насыщение ОАДГ реакции 2-оксоадипатом в двух препаратах различается. В препарате из сердца, где имеется только ОГДГ, экспериментальные данные также хорошо аппроксимируются уравнением Михаэлиса-Ментен (Рис. 4D). В печени же имеются два типа активных центров, связывающих 2-оксоадипат: высокоаффинные, опосредованные *DHTKD1*-кодируемым белком, и низкоаффинные, относящиеся к ОГДГ (Рис. 4E,F).

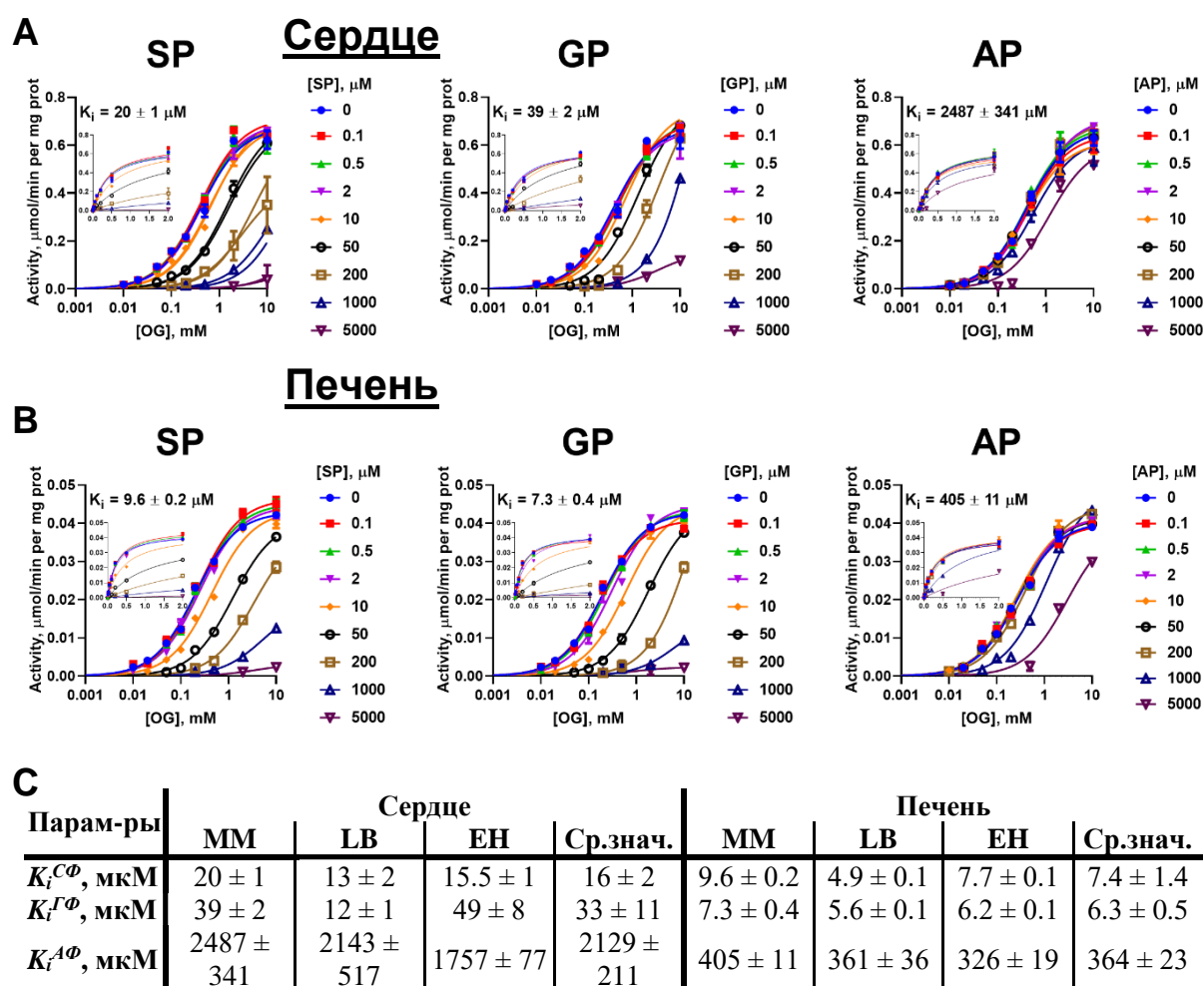


Рис. 5. Кинетический анализ ингибирования ОГДГ реакции, фосфоновыми аналогами 2-оксокислотных субстратов. (А, В) Зависимости специфической активности в препаратах, катализируемых ферментными препаратами из сердца (А) и печени (В) крысы, от концентрации 2-оксоглутарата (ОГ) в присутствии разных концентраций СФ, ГФ или АФ, аппроксимированные уравнениями Михаэлиса-Ментен. (С) Значения K_i , полученные с использованием линейной аппроксимации зависимостей $K_m^{\text{eff}}/A_{\text{max}}^{\text{eff}}$ от концентраций ингибиторов в трех типах координат, Михаэлиса-Ментен (ММ), Лайнуивера-Берка (LB) и Иди-Хофсти (ЕН).

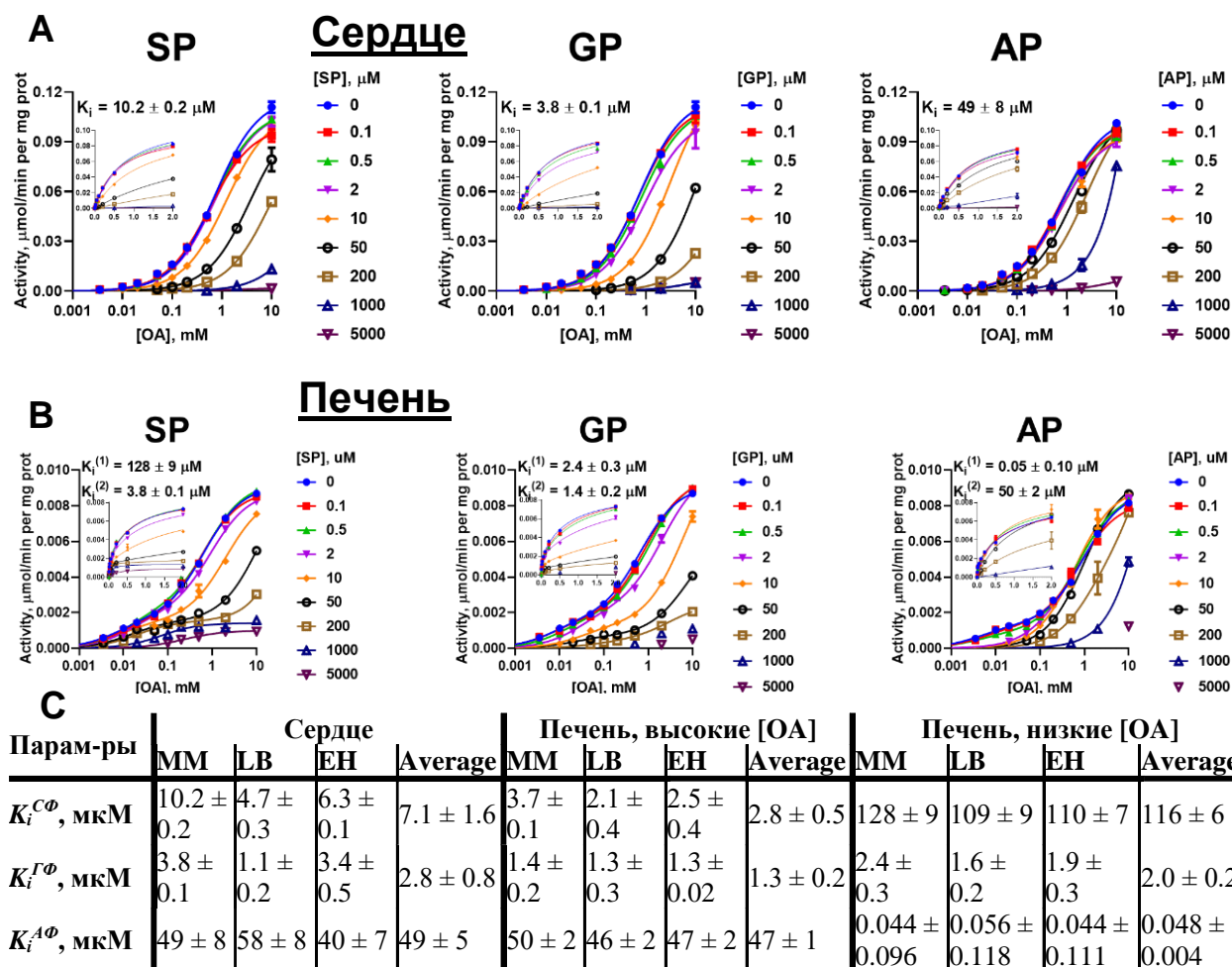


Рис. 6. Кинетический анализ ингибирования ОАДГ реакции, фосфоновыми аналогами 2-оксокислотных субстратов. (А, В) Зависимости специфической активности в препаратах, катализируемых ферментными препаратами из сердца (А) и печени (В) крысы, от концентрации 2-оксоадипата (ОА) в присутствии разных концентраций СФ, ГФ или АФ, аппроксимированные уравнениями Михаэлиса-Ментен (А) или суммой двух уравнений Михаэлиса-Ментен (В). (С) Значения K_i , рассчитанные в трех типах координат, Михаэлиса-Ментен (ММ), Лайнуивера-Берка (LB) и Иди-Хофсти (EH). В случае препарата из печени, точки с высокими (0,1-10 мМ) и низкими (0-50 мкМ) концентрациями ОА анализировались отдельно.

Кинетика ингибирования ОГДГ реакции в препаратах, обогащенных дегидрогеназами 2-оксокислот, из сердца и печени, фосфоновыми аналогами 2-оксокислот также схожа. Все три исследуемых аналога: сукцинилфосфонат (СФ), глутарилфосфонат (ГФ) и адипоилфосфонат (АФ) являются конкурентными ингибиторами ОГДК (Рис. 5А,В), однако значение K_i для АФ на 2 порядка ниже, чем СФ и ГФ (Рис. 5С). Схожая ситуация наблюдается и

для ОАДГ реакции в препарате из сердца (Рис. 6А), которая катализируется ОГДК, однако в препарате из печени, где имеются 2 типа активных центров, связывающих 2-оксоадипат (Рис. 4), АФ оказывается наиболее эффективным ингибитором ОАДГ реакции с $K_i \sim 50$ нМ (Рис. 6В,С).

Ингибирование ПДГК и КДГРК синтетическими аналогами пирувата и разветвленных 2-оксокислот

Среди исследованных аналогов пирувата наиболее эффективным ингибитором ПДГК *in vitro* оказывается ацетилфосфинат (АцФН) (Рис. 7А), однако его ингибирующая способность сильно зависит от преинкубации с ферментом (Рис. 7В). Поэтому ингибирование ПДГК фосфоновыми и фосфиновыми аналогами пирувата является частично необратимым. Среди исследованных аналогов разветвленных 2-оксокислот наиболее эффективным ингибитором КДГРК оказывается метиловый эфир изобутирилфосфоната (Рис. 7С).

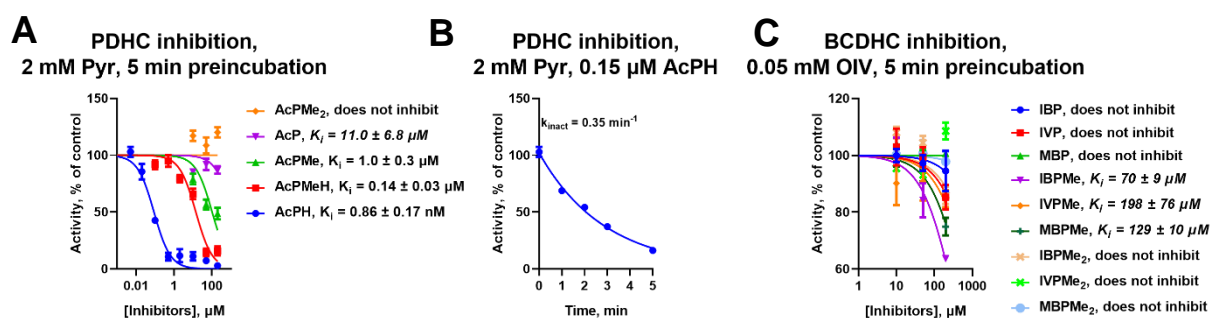


Рис. 7. Ингибирование ПДГК и КДГРК фосфоновыми аналогами 2-оксокислотных субстратов. (А) Эффекты аналогов пирувата на активность ПДГК из мозга крысы при 2 мМ пирувата после 5 мин преинкубации. (В) Эффект времени преинкубации на ингибирующий эффект 0,15 мкМ АцФН на активность ПДГК из сердца крысы. (С) Эффекты разветвленных аналогов на активность КДГРК из печени крысы при 0,05 мМ 2-оксоизовалерата после 5 мин преинкубации.

Эффекты ингибирования дегидрогеназ 2-оксокислот в клеточных линиях

Дальнейшие исследования действия ингибиторов дегидрогеназ 2-оксокислот проводились *in vivo* на клеточных линиях. Для изучения эффектов ингибирования ОГДГ и ОАДГ реакций были выбраны клеточная линия С6 с низкой экспрессией гена *DHDKD1* и MCF-7 – с высокой экспрессией (Рис. 8А). В результате инкубации клеток с СФ, ГФ и АФ наблюдали изменения уровней метаболитов (Рис. 8В,С). Действие СФ отличались от действия ГФ и АФ, причем эта разница была выше в клеточной линии с низкой экспрессией ОАДГ. Общими для всех трех аналогов эффектами являлись падение содержания глутарата и адипата, однако в случае адипата наиболее выраженные изменения наблюдаются от СФ в клетках линии MCF-7 (Рис. 8D). Поскольку уровень адипата является маркером окисления жирных кислот, его изменения согласуются с литературными данными о связи ОГДК и метаболизма жирных кислот. Глутарат же наиболее сильно меняется от АФ в клетках линии С6 (Рис. 8Е). Данные изменения согласуются с изменением уровня глюкозы (Рис. 8F). Уровень триптофана достоверно не менялся от АФ как в клетках линии С6, так и в MCF-7 (Рис. 8G).

Эффекты ингибирования ПДГК изучались на клеточных линиях глиобластомы U87, T98G и LN405. Несмотря на разную экспрессию в них генов, кодирующих компоненты ПДГК, изменения метаболитов после инкубации с АцФН были схожи (Рис. 9). Так, снижались уровни пирувата и аминокислот, распадающихся через пируват (серин, глицин, аланин, треонин), а уровни интермедиатов цикла Кребса (цитрат, 2-оксоглутарат, фумарат, малат) и связанного с ним глутамата, наоборот, повышались.

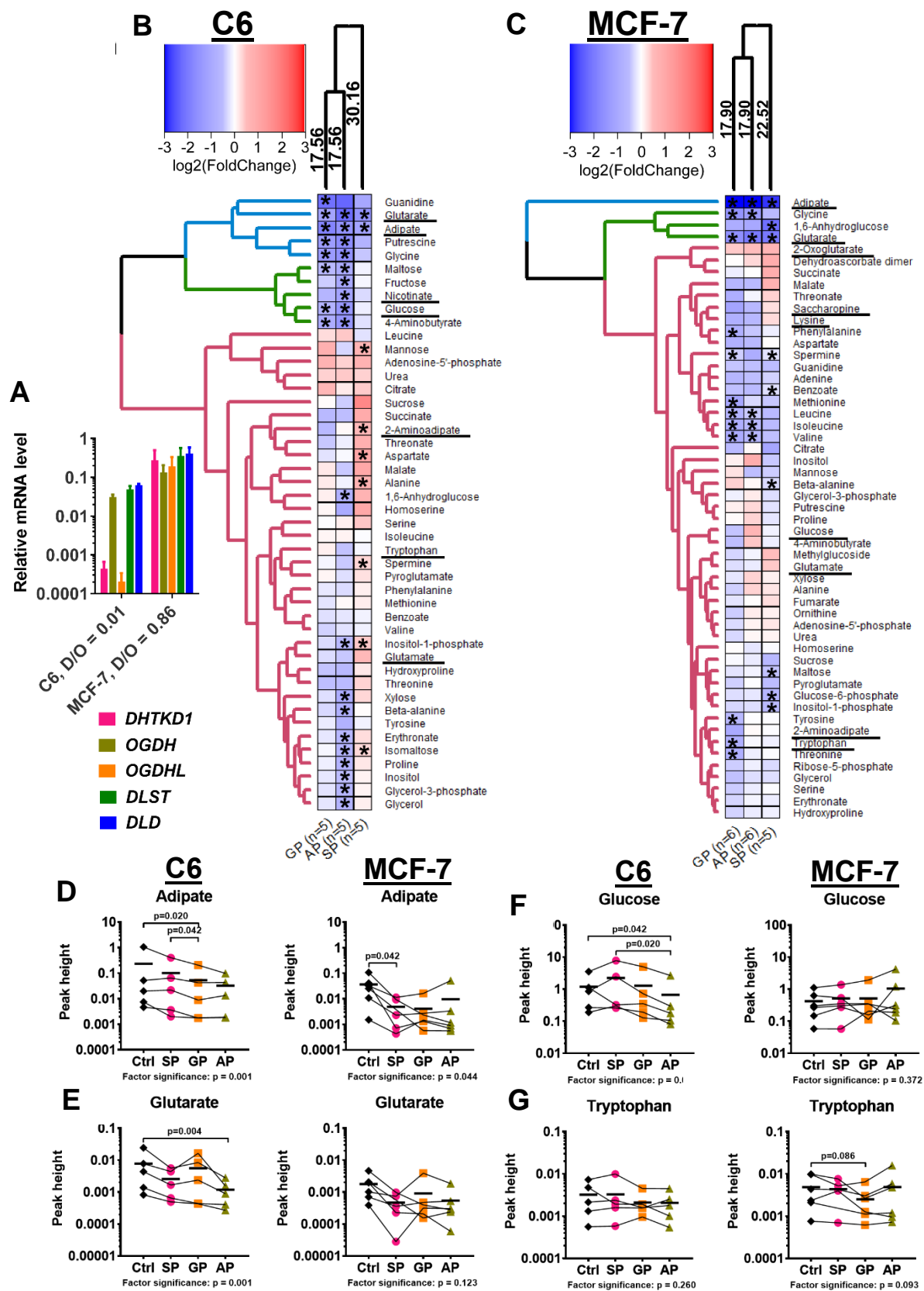


Рис. 8. Эффекты СФ, ГФ и АФ на клеточный метаболизм. (А) Относительные уровни мРНК генов, кодирующих компоненты ОГДК и ОАДК в клеточных линиях С6 и МСF-7. D/O показывает соотношения между экспрессией гена *DHTKD1* и суммарной экспрессией *OGDH* + *OGDHL*. (В, С) Относительные изменения метаболитов в клетках линий С6 (В) и МСF-7 (С) после 5 ч инкубации в минимальной среде с СФ, ГФ или АФ. * указывают достоверные ($p \leq 0,05$) отличия согласно тесту Стьюдента. (D-G) Сравнение эффектов СФ, ГФ и АФ на уровни адипата (D), глутарата (E), глюкозы (F) и триптофана (G). Достоверность отличий указана согласно тесту Фридмана и post hoc тесту Данна.

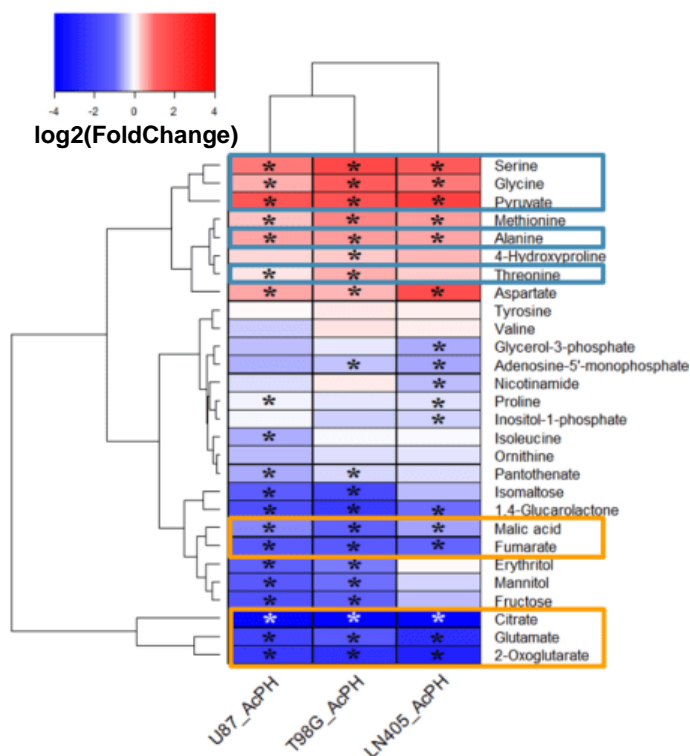


Рис. 9. Эффекты АцФН на клеточный метаболизм. Показаны относительные изменения метаболома в клетках линий U87, T98G и LN405 после 5 ч инкубации в минимальной среде с АцФН. * указывают достоверные ($p \leq 0,05$) отличия согласно одностороннему тесту Стьюдента.

Биохимические последствия регуляции дегидрогеназ 2-оксокислот в мозге животных

Действие фосфоновых аналогов 2-оксокислот в качестве ингибиторов дегидрогеназ 2-оксокислот на уровне тканей животных исследовалось спустя 24 часа после их интраназального введения. В коре больших полушарий головного мозга СФ и его этерифицированное производное (ТЭСФ), лучше проникающее внутрь клеток, в низкой дозе (0,02 ммоль/кг) вызывали компенсаторную перестройку метаболизма (Рис. 10А): увеличение активностей ОГДК, малатдегидрогеназы и малик-фермента и снижение активностей ПДГК и глутаминсинтазы (Рис. 10В-Е). Это сопровождалось ростом уровней NAD^+ и глутамата и падением уровней окисленного глутатиона и цитруллина (Рис. 10Г-М).

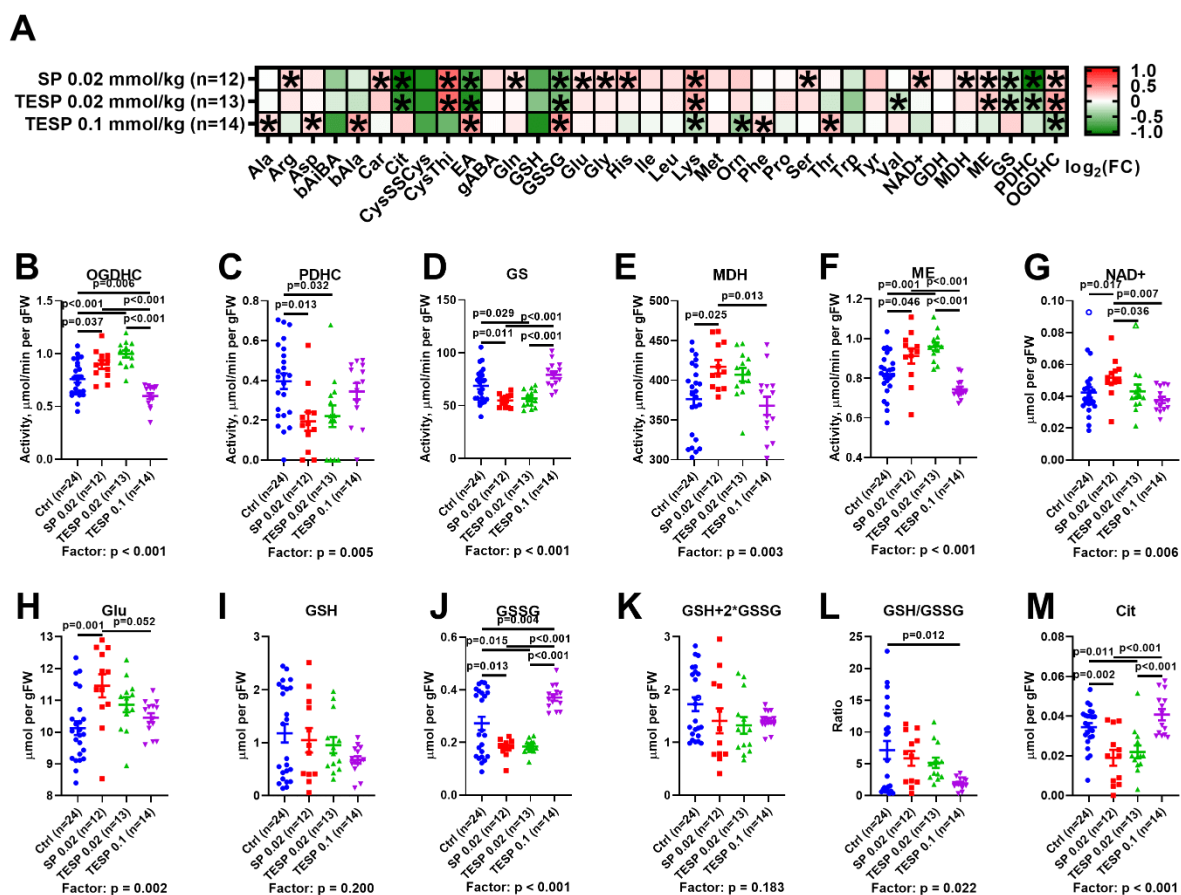


Рис. 10. Влияние ингибирования ОГДГ на биохимические параметры в коре головного мозга крыс. (А) Изменения уровней аминокислот и ассоциированных соединений, а также активностей ОГДК, ПДГК и их метаболических партнеров; * указывают на достоверные ($p \leq 0,05$) отличия от необработанных животных согласно дисперсионному анализу и post hoc тесту Тьюки. (В-М) Изменения отдельных параметров, указанные в абсолютных величинах; значения p -value под графиками определяют значимость фактора обработки в дисперсионном анализе, а на графиках – значимость отличий между группами согласно post hoc тесту Тьюки.

Большая часть указанных эффектов пропадала при усилении ингибирования путем введения животным большей дозы ТЭСФ (0,1 ммоль/кг). В случае активности ОГДК и уровня окисленного глутатиона, наблюдаемые обратные изменения метаболических параметров при увеличении дозы ТЭСФ с 0,02 до 0,1 ммоль/кг превышали те, что наблюдались при введении низких доз СФ и ТЭСФ. При этом, введение высокой дозы ТЭСФ снижает соотношение между восстановленной и окисленной формами глутатиона. Таким образом, ингибирование ОГДК в головном мозге крыс

сопровождается нарушением редокс-баланса, чему предшествуют компенсаторные изменения активностей ОГДК, ПДГК, их метаболических партнеров и ассоциированных метаболитов.

Специфические ингибиторы ОАДК, АФ и его триэтиловый (ТЭАФ) и триметиловый (ТМАФ) эфиры, при интраназальном введении в дозе 0,02 ммоль/кг оказывают менее выраженные эффекты в коре больших полушарий головного мозга, действуя на метаболизм лишь определенных аминокислот (Рис. 11А-С). В случае АФ и ТЭАФ специфическими эффектами являются рост уровня β -аминоизобутирата и падение уровней ансерина и триптофана (Рис. 11С). Эффекты введения ТМАФ более выражены: помимо компенсаторных изменений активностей ОГДК, глутаминсинтазы и малик-фермента и роста восстановительного потенциала глутатиона, 0,02 ммоль/кг ТМАФ специфически повышает уровень триптофана, деградирующего через ОАДГ реакцию (Рис. 11С). Увеличение дозы ТМАФ до 0,1 ммоль/кг приводит к росту уровней многих аминокислот, в частности, маркера ингибирования ОГДГ, глутамата, но не триптофана, сопряженному с падением активности глутаминсинтазы (Рис. 11В,С).

Ингибирование ПДГ диметиловым эфиром ацетилфосфоната (АцФМe_2) приводит к падению уровней многих аминокислот и других метаболитов соединений в коре больших полушарий головного мозга (Рис. 12А). Наиболее значимыми изменениями являются падение уровней NAD^+ (Рис. 12В), восстановительного потенциала глутатиона (Рис. 12С-Е), а также уровней этаноламина и глицина (Рис. 12F,G) в качестве соединений, деградирующих через пируват. Наблюдаемое снижение аминокислот сопровождается ростом активности глутаминсинтазы (Рис. 12Н), что предположительно позволяет быстрее утилизировать образующийся при деградации аминокислот аммоний. Наблюдаемые метаболические изменения при ингибировании ПДГ были менее выражены в мозжечке по сравнению с корой больших полушарий (Рис. 12А). В частности, введение АцФМe_2 также достоверно снижало уровень этаноламина (Рис. 12F), но не влияло на уровень глицина (Рис. 12G);

увеличение активности глутаминсинтазы в мозжечке также не достигало статистической значимости (Рис. 12Н).

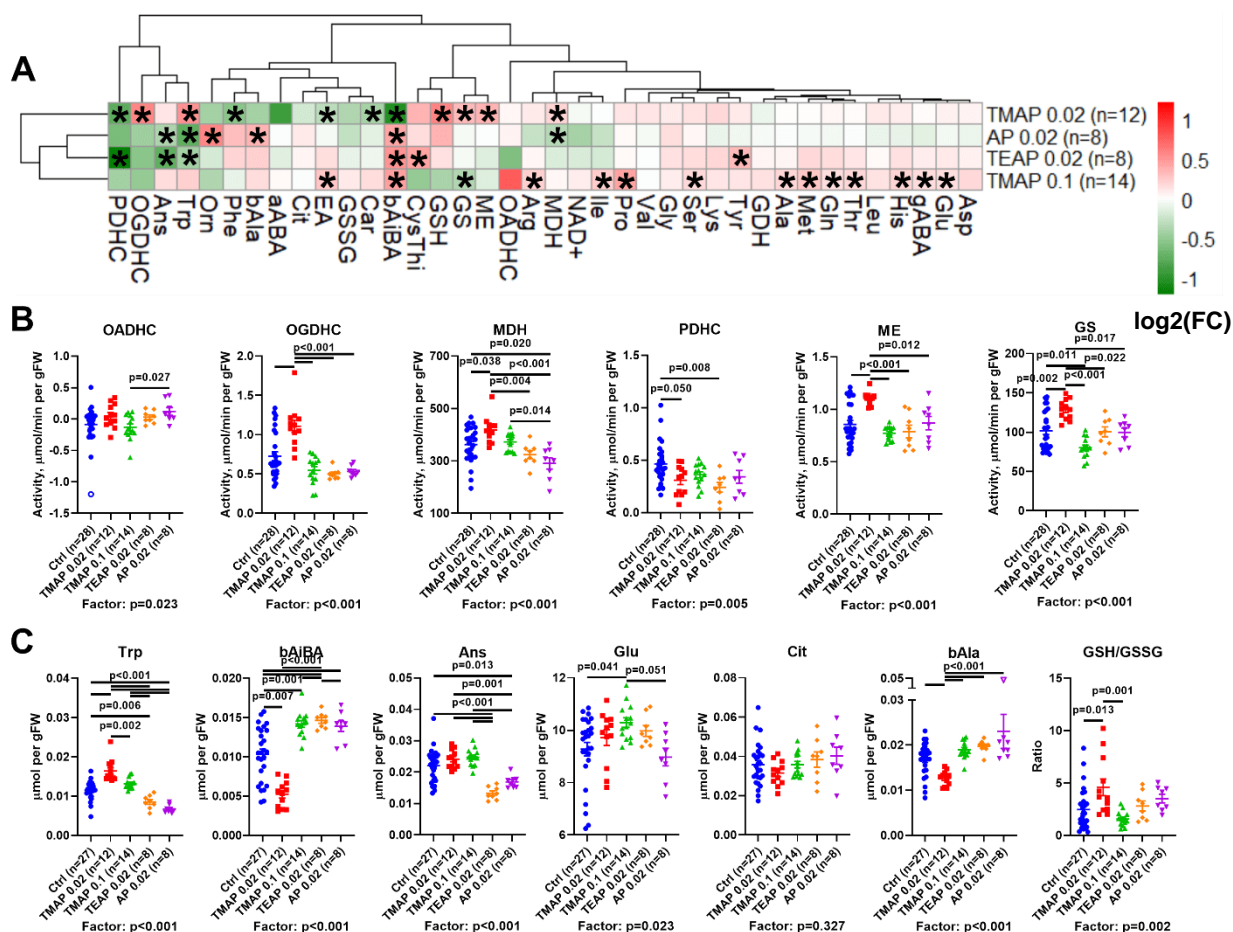


Рис. 11. Влияние ингибирования ОАДК на биохимические параметры в коре головного мозга крыс. (А) Изменения уровней аминокислот и ассоциированных соединений, а также активностей ОГДК, ПДГК и их метаболических партнеров; * указывают на достоверные ($p \leq 0,05$) отличия от необработанных животных согласно дисперсионному анализу и post hoc тесту Тьюки. (В-С) Изменения отдельных параметров, указанные в абсолютных величинах; значения p-value под графиками определяют значимость фактора обработки в дисперсионном анализе, а на графиках – значимость отличий между группами согласно post hoc тесту Тьюки.

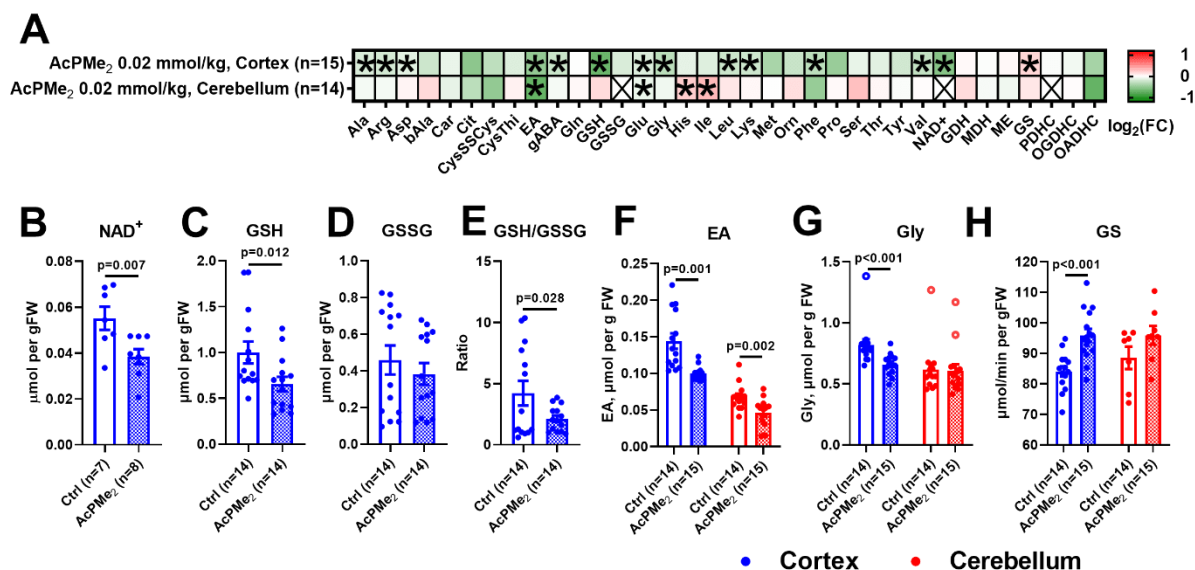


Рис. 12. Тканеспецифичность эффектов ингибирования ПДГК на биохимические параметры в мозге крыс. (А) Изменения уровней аминокислот и ассоциированных соединений, а также активностей ОГДК, ПДГК и их метаболических партнеров. * указывают на достоверные ($p \leq 0,05$) отличия от необработанных животных согласно тесту Стьюдента. (В) Изменения отдельных параметров, указанные в абсолютных величинах; значения p -value на графиках определяют значимость отличий между группами согласно тесту Стьюдента.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Показана специфичность действия сукцинилфосфоната в качестве ингибитора 2-оксоглутаратдегидрогеназы ($K_i \sim 10^{-5}$ М) и адиоилфосфоната в качестве ингибитора 2-оксоадипатдегидрогеназы ($K_i = 5 \cdot 10^{-8}$ М) *in vitro*.
2. Среди синтетических аналогов пирувата наиболее эффективным ингибитором пируватдегидрогеназы является ацетилфосфинат, а метиловый эфир изобутирилфосфоната наиболее эффективно ингибирует дегидрогеназу разветвленных 2-оксокислот.
3. Наиболее значимым эффектом ингибирования 2-оксоглутаратдегидрогеназы в культурах клеток животных является

падение уровня адипата, более выраженное в клетках с высокой экспрессией гена *OGDH* (MCF-7).

4. Маркером ингибирования 2-оксоадипатдегидрогеназы в культурах клеток животных является снижение уровней глутарата и глюкозы, наиболее выраженное в клетках с низкой экспрессией гена *DHTRD1* (C6).

5. При ингибировании пируватдегидрогеназы в культурах клеток животных наблюдается рост уровня пирувата и снижение уровней интермедиатов цикла Кребса и ассоциированных с ними аминокислот.

6. При интраназальном введении селективных ингибиторов 2-оксоглутаратдегидрогеназы наблюдаются бифазные изменения уровней NAD^+ , глутамата и цитруллина в мозге животных.

7. Интраназальное введение специфических ингибиторов 2-оксоадипатдегидрогеназы вызывает бифазные изменения уровня триптофана в мозге животных.

8. Ингибирование пируватдегидрогеназы в мозге животных вызывает снижение содержания аминокислот и NAD^+ и увеличение активности глутаминсинтазы, зависящее от анатомического отдела мозга.

9. Общим эффектом при ингибировании 2-оксоглутаратдегидрогеназы и пируватдегидрогеназы в мозге животных является падение восстановительного потенциала глутатиона, в соответствии с ключевой ролью данных дегидрогеназ в выработке энергии в цикле трикарбоновых кислот.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI¹

- 1) Ташлицкий В.Н., Артюхов А.В., Федорова Н.В., Суконников М.А., Ксенофонтов А.Л., Буник В.И., Баратова Л.А. Определение 2-оксокислот в экстрактах мозга крыс с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии // Биохимия. 2022. Т. 87, № 4. С. 497-507. IF WoS = **2.487** (0,69/0,2).
- 2) Graf A.V., Maslova M.V., Artiukhov A.V., Ksenofontov A.L., Aleshin V.A., Bunik V.I. Acute prenatal hypoxia in rats affects physiology and brain metabolism in the offspring, dependent on sex and gestational age // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, № 5. P. 2579. IF WoS = **5.923** (0,94/0,15).
- 3) Artiukhov A.V., Graf A.V., Kazantsev A.V., Boyko A.I., Aleshin V.A., Ksenofontov A.L., Bunik V.I. Increasing inhibition of the rat brain 2-oxoglutarate dehydrogenase decreases glutathione redox state, elevating anxiety and perturbing stress adaptation // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15, № 2. P. 182. IF WoS = **5.863** (1,06/0,55).
- 4) Artiukhov A.V., Kolesanova E.F., Boyko A.I., Chashnikova A.A., Gnedoy S.N., Kaehne T., Ivanova D.A., Kolesnichenko A.V., Aleshin V.A., Bunik V.I. Preparation of affinity purified antibodies against ϵ -glutaryllysine residues in proteins for investigation of glutarylated proteins in animal tissues // Biomolecules. 2021. Vol. 11, № 8. P. 1168. IF WoS = **4.879** (0,94/0,15).
- 5) Aleshin V.A., Artiukhov A.V., Kaehne T., Graf A.V., Bunik V.I. Daytime dependence of the activity of the rat brain pyruvate dehydrogenase corresponds to the mitochondrial sirtuin 3 level and acetylation of brain proteins, all regulated by thiamine administration decreasing phosphorylation

¹ В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах

- of PDHA Ser293 // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, № 15. P. 8006. IF WoS = **5.923** (1,12/0,15).
- 6) Aleshin V.A., Graf A.V., **Artiukhov A.V.**, Boyko A.I., Ksenofontov A.L., Maslova M.V., Nogues I., di Salvo M.L., Bunik V.I. Physiological and biochemical markers of the sex-specific sensitivity to epileptogenic factors, delayed consequences of seizures and their response to vitamins B1 and B6 in a rat model // Pharmaceuticals. 2021. Vol. 14, № 8. P. 737. IF WoS = **5.863** (1,44/0,2).
 - 7) Boyko A., Tsepkova P., Aleshin V., **Artiukhov A.**, Mkrtchyan G., Ksenofontov A., Baratova L., Ryabov S., Graf A., Bunik V. Severe spinal cord injury in rats induces chronic changes in the spinal cord and cerebral cortex metabolism, adjusted by thiamine that improves locomotor performance // Frontiers in Molecular Neuroscience. 2021. Vol. 14. P. 620593. IF WoS = **5.639** (1,38/0,2).
 - 8) **Artiukhov A.V.**, Kazantsev A.V., Lukashev N.V., Bellinzoni M., Bunik V. Selective inhibition of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases by the phosphonate analogs of their 2-oxo acid substrates // Frontiers in Chemistry. 2021. Vol. 8. P. 596187. IF WoS = **5.221** (1,06/0,65).
 - 9) **Artiukhov A.V.**, Pometun A.A., Zubanova S.A., Tishkov V.I., Bunik V.I. Advantages of formate dehydrogenase reaction for efficient NAD⁺ quantification in biological samples // Analytical Biochemistry. 2020. Vol. 603. P. 113797. IF WoS = **3.365** (0,31/0,15).
 - 10) Бойко А.И., **Артюхов А.В.**, Кэне Т., ди Сальво М.Л., Бонаккорси ди Патти М.К., Контестабиле Р., Трамонти А., Буник В.И. Идентифицированные в животных тканях изоформы 2-оксоадипатдегидрогеназы, кодируемой геном DHTKD1, не образуются при экспрессии DHTKD1 человека в бактериальной или дрожжевой системах // Биохимия. 2020. Т. 85, № 8. С. 1080-1090. IF WoS = **2.487** (0,63/0,1).

- 11) **Artiukhov A.V.**, Grabarska A., Gumbarewicz E., Aleshin V.A., Kähne T., Obata T., Kazantsev A.V., Lukashev N.V., Stepulak A., Fernie A.R., Bunik V.I. Synthetic analogues of 2-oxo acids discriminate metabolic contribution of the 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in mammalian cells and tissues // Scientific Reports. 2020. Vol. 10, № 1. P. 1886. IF WoS = **4.379** (1,38/0,7).
- 12) Меженская О.А., Алешин В.А., Кэне Т., **Артюхов А.В.**, Буник В.И. Регуляция малатдегидрогеназ и глутаматдегидрогеназы мозга животных тиаминном in vitro и in vivo // Биохимия. 2020. Т. 85, № 1. С. 34-48. IF WoS = **2.487** (0,81/0,1).
- 13) **Артюхов А.В.**, Граф А.В., Буник В.И. Направленная регуляция полиферментных комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот с помощью фосфоновых и фосфиновых аналогов 2-оксокислот // Биохимия. 2016. Т. 81, № 12. С. 1791-1816. IF WoS = **2.487** (1,50/0,6).
- 14) Aleshin V.A., **Artiukhov A.V.**, Oppermann H., Kazantsev A.V., Lukashev N.V., Bunik V.I. Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays // Cells. 2015. Vol. 4, № 3. P. 427-451. IF WoS = **6.600** (1,56/0,3).
- 15) Bunik V.I., **Artiukhov A.**, Kazantsev A., Goncalves R., Daloso D., Oppermann H., Kulakovskaya E., Lukashev N., Fernie A., Brand M., Gaunitz F. Specific inhibition by synthetic analogs of pyruvate reveals that the pyruvate dehydrogenase reaction is essential for metabolism and viability of glioblastoma cells // Oncotarget. 2015. Vol. 6, № 37. P. 40036-40052. IF WoS = **5.008** (1,06/0,3).

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Завилейский Л.Г., Карлина И.С., Буник В.И., Артюхов А.В., Алешин В.А., Уласов И.В., Граф А.В. Сравнение паттернов сукцинилирования белков и их изменений при ингибировании продукции сукцинил-КоА в здоровой ткани мозга крысы и клетках глиобластомы // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021». 2021. Москва, Россия.
- 2) Артюхов А.В., Бойко А.И., Алешин В.А., Граф А.В. Роль 2-оксоглутаратдегидрогеназы в редокс-статусе мозга крысы в норме и при патологии // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020». 2020. Москва, Россия,
- 3) Artukhov A., Graf A., Kazantsev A., Lukashev N., Bunik V. P.139 Chemical models of dysfunctions of the brain 2-oxo acid dehydrogenases in vivo // European Neuropsychopharmacology. 2020. Vol. 40, № Suppl 1. P. S84-S85.
- 4) Aleshin V., Kaehne T., Mkrtchyan G., Artukhov A., Graf A., Maslova M., Bunik V. P.252 Regulation of glutamate dehydrogenase in the brain by acetylation and thiamine // European Neuropsychopharmacology. 2019. Vol. 29, № Suppl 6. P. S191-S192.
- 5) Данилова Е.Ю., Артюхов А.В., Граф А.В., Ксенофонтов А.Л., Казанцев А.В., Цепкова П.М., Зарубина С.А., Пометун А.А., Лукашев Н.В., Буник В.И. В мозге взрослых крыс, подвергнутых пренатальной гипоксии, увеличен уровень триптофана и ослаблены гомеостатические механизмы // Материалы I Студенческого биохимического форума. 2018. Москва, Россия.
- 6) Бойко А.И., Цепкова П.М., Артюхов А.В., Алешин В.А., Казанцев А.В., Ксенофонтов А.Л., Рябов С.И., Лукашев Н.В., Граф А.В., Буник В.И. Долгосрочные эффекты регуляторов дегидрогеназ 2-оксокислот

на метаболизм в коре больших полушарий головного мозга крыс после травмы спинного мозга // Материалы I Студенческого биохимического форума. 2018. Москва, Россия.

- 7) Чашникова А.А., **Артюхов А.В.**, Алешин В.А., Кэне Т., Буник В.И. Исследование регуляции глутаматдегидрогеназы животных путем ацилирования // Материалы I Студенческого биохимического форума. 2018. Москва, Россия.
- 8) **Артюхов А.В.**, Данилова Е.Ю., Зарубина С.А., Пометун А.А., Тишков В.И. Разработка энзиматического метода количественного определения НАД⁺ и НАДФ⁺ в биологических экстрактах с помощью флуориметрической детекции // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018». 2018. Москва, Россия.
- 9) **Артюхов А.В.** Регуляция метаболизма с помощью фосфоновых аналогов 2-оксокислот // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2017». 2017. Москва, Россия.