

УДК 577.1

РЕГУЛЯЦИЯ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗ И ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МОЗГА ЖИВОТНЫХ ТИАМИНОМ *in vitro* И *in vivo**

© 2020 О.А. Меженская¹, В.А. Алешин^{2,3}, Т. Кэне⁴,
А.В. Артюхов^{2,3}, В.И. Буник^{2,3**,***}

¹ Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, 01601 Киев, Украина

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии
и биоинформатики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

³ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

⁴ Институт экспериментальной медицины
Университета им. Отто фон Гюрке, 39120 Магдебург, Германия

Поступила в редакцию 05.08.2019

После доработки 24.09.2019

Принята к публикации 24.09.2019

Для исследования механизмов некоферментного взаимодействия тиамина и его дифосфата (ТДФ) с белками мозга ацетоновый экстракт синапсом мозга быка или гомогенат коры мозга крысы подвергали аффинной хроматографии на модифицированной тиамином сефарозе (тиамин-сефарозе). В последовательных элюатах тиамином (при pH 7,4 или 5,6), хлоридом натрия и мочевиной характеризовали представленность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и изоферментов малатдегидрогеназ (МДГ) методом масс-спектрометрии, а также изменение активностей данных ферментов в присутствии тиамина и/или ТДФ. Активация малатдегидрогеназной реакции тиамином максимальна после элюции белков синапсомальной фракции кислым раствором тиамина, не приводящей к высвобождению МДГ1. Влияние экзогенного тиамина или ТДФ на активность ГДГ зависит от присутствия эндогенных регуляторов фермента. Так, тиамин и/или ТДФ активируют ГДГ мозга в элюатах с тиамин-сефарозы, но ингибируют фермент в наносимых на тиамин-сефарозу препаратах. Установлено, что ТДФ ингибирует ГДГ, активированную АДФ. Активация ГДГ тиамином (но не ТДФ) снижена при ее элюции NaCl и мочевиной после применения кислого раствора тиамина по сравнению с аналогичными фракциями после элюции слабощелочным раствором тиамина. Одновременное повышение содержания МДГ2 и общей активности ГДГ в данных фракциях свидетельствует о роли известного взаимодействия ГДГ с МДГ2 в стабилизации активности ГДГ и регуляции ГДГ тиамином. Биологический потенциал регуляции ГДГ мозга тиамином подтвержден в экспериментах *in vivo*, установивших изменение регуляторных свойств ГДГ мозга после введения крысам высокой дозы тиамина. Биоинформатический анализ наборов элюируемых тиамином с тиамин-сефарозы белков показал специфическое обогащение их аннотации терминами «фосфобелок», «ацетилирование» и «метилирование». Связь тиамина с посттрансляционными модификациями в мозге может вносить вклад в механизмы нейропротекторного действия высоких доз тиамина, включающие регуляцию окисления основного возбуждающего нейромедиатора мозга – глутамата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиамин, малатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, тиамин-сефароза, фосфобелок, ацетилирование, метилирование.

DOI: 10.31857/S0320972520010030

Тиамин (витамин В1) является одним из основных витаминов группы В, широко применяемых в медицинской практике в силу своего нейротропного эффекта и стимулирующего

влияния на центральный метаболизм глюкозы [1–3]. В основном такое действие приписывают дифосфорилированному производному тиамина – тиаминдифосфату (ТДФ), который являет-

Принятые сокращения: ГДГ – глутаматдегидрогеназа; МДГ – малатдегидрогеназа; ОПИ – общий поток ионов; ТДФ – тиаминдифосфат; тиамин-сефароза – сефароза, модифицированная тиамином.

* Статья посвящается 80-летию кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (см. том 84, вып. 11, 2019).

** Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

*** Адресат для корреспонденции.

ся необходимым коферментом таких ферментов центрального метаболизма, как транскетолаза и дегидрогеназы 2-оксокислот. Однако в последнее время, в т.ч. в связи с угрожающими темпами роста нейродегенеративных заболеваний, все большее внимание привлекают и другие, так называемые некоферментные, механизмы действия тиамин и его природных производных [4–7]. В качестве эффекторов не только ТДФ-зависимых, но и сопряженных с ними ферментов тиаминовые соединения могут обеспечить системную регуляцию метаболизма за счет воздействия на множественные белки-мишени. Такое плейотропное действие тиаминовых соединений лучше объясняет ряд экспериментальных результатов по регуляции данными соединениями продукции ацетилхолина, которые плохо согласуются с чисто коферментным действием ТДФ [5, 6]. Следует отметить, что плейотропный характер действия генов [8] и белковых регуляторов метаболизма (например, таких белков, как транскрипционные регуляторы р53 или Nrf-2 [9]) хорошо известен, однако для низкомолекулярных регуляторов такая множественность мишеней действия традиционно рассматривается лишь как источник побочных эффектов [10]. Тем не менее в последнее время возрастает внимание к возможности повышения эффективности терапии при использовании лекарств, эффекты которых опосредованы множественным действием на несколько мишеней [11]. В этой связи изучение молекулярных механизмов аналогичной регуляции природными низкомолекулярными соединениями, включая витамины, вызывает особый интерес [6, 12].

Данная работа развивает описанный ранее подход для исследования множественных мишеней действия тиамин, использующий аффинную хроматографию фракций мозга на носителе, содержащем ковалентно связанный тиамин, с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков в элюате [6]. По сравнению с предыдущим исследованием, в котором связанные с модифицированной тиамином сефарозой (тиамин-сефарозой) белки мозга крысы (так называемый тиаминовый протеом) элюировались неспецифическими агентами, в настоящей работе охарактеризована аффинная рН-зависимая элюция белков с тиамин-сефарозы тиамином, использован иной способ модификации носителя тиамином, исключающий множественную ориентацию «наживки» на носителе, и проведено сравнительное исследование профилей элюции с тиамин-сефарозы белков синаптосомальной фракции и полного гомогената мозга быка и крысы. В результате получены

новые данные о путях и молекулярных механизмах некоферментного действия тиамин и его природных производных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Использованы реактивы следующих производителей: ТДФ, 2-оксоглутарат (динатриевая соль), NADH (динатриевая соль), ADP, GTP, CHAPS, ингибиторы протеаз AEBSF, аprotинин, бестатин, E-64, лейпептин, пепстатин А – «Sigma», США; тиамин, полиэтиленгликоль-6000, глюкоза, Tris-HCl – «Serva», Германия; глицерол – «Biomedicals, LLC», США; NAD⁺ – «Gerbu», Германия. В части экспериментов применяли бикарбонатный физиологический раствор Кребса–Рингера, содержащий 118 мМ NaCl, 2,34 мМ KН₂PO₄, 4,6 мМ KCl, 1,19 мМ MgSO₄, 2,42 мМ CaCl₂, 24,9 мМ NaHCO₃ и 10 мМ глюкозы, рН 7,4. Растворы готовили на деионизированной воде стандарта Milli-Q, использованные в работе соли были наивысшей степени чистоты.

Эксперименты с животными. Для получения белков из мозга крыс использовали белых крыс линии Wistar, содержащихся на стандартном рационе в виварии МГУ им. М.В. Ломоносова с постоянным доступом к воде и пище при световом цикле 12/12 ч (световая фаза с 9:00 до 21:00 по местному времени), температуре (21 ± 2) °С и относительной влажности воздуха (53 ± 5)%. Крыс умерщвляли методом декапитации с помощью гильотины. Мозги быков возрастом 1,5–3 года были получены на бойне (г. Киев).

Аффинной хроматографии подвергали гомогенаты коры мозга самок крыс линии Wistar массой 250–300 г; действие высоких доз тиамин исследовали на самцах линии Wistar массой 300–350 г (возраст 3–4 мес.). Экспериментальным животным вводили тиамин из расчета 400 мг/кг веса (водный раствор 200 мг/мл тиамин гидрохлорида, рН после добавления NaOH составлял 6,7–6,9) внутрибрюшинно в вечернее время (17:00–19:00). Крысам контрольной группы вводили аналогичный объем 0,9%-ного раствора NaCl. Для инъекций использовали инсулиновые шприцы в соответствии с опубликованными рекомендациями [13]. Через 24 ч после инъекций проводили декапитацию животных.

Аффинная хроматография. Ацетоновый порошок из частично очищенной фракции митохондрий мозга быка получали согласно ранее описанной методике [14] и хранили сухим при –70 °С. Экстракцию белков ацетонового порошка проводили буфером Кребса–Рингера соглас-

но ранее описанному протоколу [6]. Гомогенат коры мозга крыс получали в соответствии с ранее опубликованным протоколом [15].

В хроматографии использовали аффинный сорбент тиамин-N-4-азобензоил-ε-гидразидсефарозу 4В (тиамин-сефароза), синтезированный по методу Клящицкого с соавт. [16]. Экстракт ацетонового порошка мозга или полный гомогенат коры мозга наносили на колонку с тиаминсефарозой, предварительно уравновешенную буфером Кребса–Рингера. Скорость потока в ходе нанесения образцов и последующего промывания носителя составляла 0,2 мл/мин. Удаление несвязавшихся или слабосвязавшихся белков контролировали по снижению оптической плотности элюата при 280 нм до базовой линии.

Связавшиеся с тиамин-сефарозой белки элюировали в несколько стадий. Первая стадия – элюция 5 или 10 мМ тиамин, рН 7,4 или 5,6. Для дальнейшей ступенчатой элюции использовали 10 мМ Tris-HCl, рН 7,4, содержащий 1 М NaCl или 2 М мочевины, как описано ранее [6]. Замену буфера на 10 мМ Tris-HCl, рН 7,4, проводили одновременно с концентрированием элюатов с помощью центрифужных фильтров Amicon Ultra 15 с мембраной, непроницаемой для белков массой свыше 30 кДа. Сорбент регенерировали промыванием 8 М мочевиной и деионизированной водой и хранили в 0,02%-ном растворе азида натрия.

Измерение ферментативных активностей. Активность NADH-зависимых дегидрогеназ – малатдегидрогеназы (МДГ) и глутаматдегидрогеназы (ГДГ) – измеряли по поглощению NADH при 340 нм. Характеристику профилей элюции проводили путем измерения активностей ферментов при насыщающих концентрациях субстратов. Для исследования влияния тиамина или ТДФ на активности ферментов использовали специфические для каждого фермента условия максимизации эффектов [6]. Детали использованных условий приведены в подписях к рисункам и таблицам.

Частичную очистку ГДГ мозга крысы для исследования совместных эффектов ТДФ и ADP проводили следующим образом. Экстракцию белков осажденной из гомогената мозга мембранной фракции осуществляли путем обработки ультразвуком и добавления детергента CHAPS (1%). Из полученного в результате центрифугирования (40 мин, 11 000 g, 4 °С) супернатанта удаляли фракцию полиферментных комплексов добавлением 0,16 объема 35%-ного полиэтиленгликоля при рН 6,15 с последующим центрифугированием (15 мин, 18 500 g, 4 °С). Полученный супернатант содержал частично очищенную из мозга крысы ГДГ.

Для кинетической характеристики использовали ГДГ и МДГ в составе объединенных гомогенатов мозга исследуемой группы крыс в рамках одной экспериментальной серии (по три животных в контрольной группе и группе крыс, которым вводили тиамин). Эксперименты на животных повторяли в трех независимых сериях – общее число животных составило 18 крыс. Гомогенаты мозга готовили согласно ранее описанному протоколу [15], нерастворимую фракцию осаждали центрифугированием (30 мин, 20 000 g, 4 °С). Для удаления содержащихся в гомогенатах мозга низкомолекулярных соединений – регуляторов исследуемых ферментов – супернатант подвергали быстрой гель-фильтрации на колонке HiTrap™ Desalting, 5 мл («GE Healthcare», Швеция) согласно протоколу производителя. Белки элюировали 100 мМ Tris-HCl, рН 7,5. Данные кинетических экспериментов ($n = 3$) объединяли и аппроксимировали в программе GraphPad Prism v. 8.0 с использованием встроенных моделей. Для аппроксимации насыщения 2-оксоглутаратом и глутаматом применяли модель полного субстратного ингибирования: $v = V_{\max} \cdot [S]/(K_m + [S](1 + [S]/K_i))$, где v – скорость реакции при данной концентрации субстрата $[S]$, V_{\max} – максимальная скорость реакции, K_m – константа Михаэлиса, K_i – константа субстратного ингибирования. Насыщение ГДГ ингибитором (GTP) или активаторами (ADP и лейцин) характеризуется кооперативными взаимодействиями субъединиц. Поэтому данные зависимости аппроксимировали с помощью модели логистической регрессии с четырьмя параметрами («four parameter logistic regression», 4PL), учитывающей отличие коэффициента Хилла от единицы.

Измерение концентрации белка в образцах. Концентрацию белка определяли по методу Лоури с соавт. [17].

Характеристика тиамин-зависимых протеомов исследуемых образцов. Элюированные с тиаминсефарозы белки, составляющие так называемый тиамин-зависимый протеом наносимых на аффинную колонку биологических образцов, разделяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с последующей идентификацией методом масс-спектрометрии (LC-MS/MS) после трипсинолиза, как описано ранее [6]. Для идентификации полученных пептидов использовали базы данных NCBI. Ввиду отсутствия аннотаций для части белков быка, для более полной идентификации этих белков проводили поиск по последовательностям базы данных SwissProt для всех организмов. Белки крысы идентифицировали с использованием последовательностей базы данных SwissProt для крысы.

Биоинформатический анализ элюированных с тиамин-сефарозы протеомов проводили с помощью программы DAVID v. 6.8, как описано ранее [6].

Определение относительного содержания пептидов ГДГ и МДГ в образцах. Содержание исследуемых белков в частично очищенных препаратах оценивали с помощью полуколичественного метода, основанного на пропорциональности количества белка в препарате числу идентифицированных при масс-спектрометрии пептидов [18]. Для сравнения разных образцов в геле использовали отношение числа идентифицированных пептидов исследуемого фермента к общему потоку ионов (ОПИ) при масс-спектрометрическом анализе соответствующей пробы, поскольку ОПИ пропорционален общему уровню определяемых в пробе пептидов. Значения ОПИ получали с помощью аналитической платформы Skyline [19]. Для удобства представления нормализованных данных использовали параметр ОПИ с коэффициентом 10^{-10} (ОПИ · 10^{-10}).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аффинная хроматография на тиамин-сефарозе синаптосомальной фракции мозга быка. В табл. 1 представлено сравнение активности и числа пептидов ГДГ из синаптосомальной фракции мозга быка на разных стадиях аффин-

ной хроматографии в зависимости от значения рН (7,4 или 5,6) на первой, аффинной, стадии элюции. По данным масс-спектрометрии видно, что в обоих случаях ГДГ хорошо элюируется мочевиной: в данном элюате обнаруживается значительное число пептидов ГДГ даже в том случае, когда фермент плохо элюируется на предыдущих стадиях (табл. 1). Однако при элюции мочевиной после первичной элюции кислым (рН 5,6) раствором тиамин удельная и общая активности ГДГ на порядок и более превышают таковые в элюате мочевиной после первичной элюции слабощелочным (рН 7,4) раствором тиамин. Кроме того, при первичной элюции кислым раствором тиамин распределение общей активности ГДГ, элюируемой на трех стадиях, хорошо согласуется с представленностью фермента в элюатах по данным масс-спектрометрии, т.е. более высокая общая активность соответствует большему числу уникальных пептидов ГДГ во фракции. Напротив, при первичной элюции ГДГ слабощелочным раствором тиамин (рН 7,4) ее активность, измеряемая в получаемом на этой стадии элюате, составляет основную долю общей активности ГДГ, элюируемой с тиамин-сефарозы. При этом удельная активность ГДГ на стадии элюции слабощелочным раствором тиамин вдвое превышает таковую при первичной элюции кислым раствором тиамин. Однако по данным масс-спектрометрии фракция, полученная при элюции слабощелоч-

Таблица 1. Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и уникальные для ГДГ пептиды в элюатах с тиамин-сефарозы при аффинной хроматографии ацетонового экстракта синаптосом мозга быка

Белковая фракция	Удельная активность ГДГ		Общая активность ГДГ		Число пептидов ГДГ
	нмоль/мин на 1 мг белка	%	нмоль/мин	%	
Первая стадия элюции: 10 мМ тиамин, рН 7,4					
Ацетоновый экстракт	19 ± 2	100	780 ± 60	100	8
10 мМ тиамин	12 ± 2	64	300 ± 50	39	1
1 М NaCl	14 ± 4	75	36 ± 2	5	1
2 М мочевины	2 ± 1	11	5 ± 1	2	4
Первая стадия элюции: 10 мМ тиамин, рН 5,6					
Ацетоновый экстракт	14 ± 1	100	600 ± 50	100	8
10 мМ тиамин	6 ± 2	43	150 ± 50	25	6
1 М NaCl	16 ± 5	114	80 ± 30	14	4
2 М мочевины	21 ± 6	150	230 ± 70	39	6

Примечание. Активность ГДГ определяли после замены элюирующего раствора на 10 мМ Tris-HCl (рН 7,4) при насыщении субстратами в среде следующего состава: 100 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 2,5 мМ 2-оксоглутарат, 0,2 мМ NADH, 50 мМ NH₄Cl. Относительные активности указаны в процентах от уровней в исходных препаратах.

ным раствором тиамин, содержит значительно меньшее количество ГДГ (обнаруживается лишь один характерный пептид ГДГ), чем аналогичная фракция, полученная в ходе элюции кислым раствором тиамин (шесть пептидов ГДГ) (табл. 1). Таким образом, аффинная элюция белка ГДГ с тиамин-сефарозы значительно эффективнее происходит при рН 5,6, чем при рН 7,4, однако удельная и общая активности ГДГ, элюируемой тиамин с тиамин-сефарозы, выше после элюции при рН 7,4, чем при рН 5,6 (табл. 1).

В табл. 2 представлено аналогичное сравнение активности и числа пептидов изоферментов МДГ при аффинной хроматографии с тиамин-сефарозы. Следует учесть, что малатдегидрогеназная реакция катализируется цитоплазматическим (МДГ1) и митохондриальным (МДГ2) изоферментами, на которые тиамин влияет по-разному [6]. Элюция кислым (рН 5,6) раствором тиамин в значительной степени снижает скорость малатдегидрогеназной реакции. В этих условиях активность МДГ во фракции, полученной в ходе аффинной элюции тиамин, составляет < 10% от общей активности МДГ, нанесенной на тиамин-сефарозу, тогда как при элюции слабощелочным раствором тиамин наблюдается существенное (1,5–2,5-кратное) повышение как удельной, так и общей активности МДГ в элюате по сравнению с исходными значениями. Тем не менее данные масс-спектрометрии элюированных тиамин фракций показывают, что кислый раствор тиамин преимущественно элюирует с тиамин-сефарозы МДГ2, а слабощелочной раствор – МДГ1 (табл. 2). Соответственно, МДГ1 элюируется NaCl и мочевиной только в том случае, когда ее аффинная

элюция тиамин не была эффективной, т.е. при рН 5,6. Напротив, МДГ2 элюируется NaCl и мочевиной после аффинной элюции тиамин при обоих значениях рН. Таким образом, при рН 7,4 раствор тиамин элюирует с тиамин-сефарозы практически всю МДГ1, тогда как при рН 5,6 элюция раствором тиамин эффективна лишь в отношении МДГ2 (табл. 2). Зависимость профилей элюции изоферментов МДГ с тиамин-сефарозы от рН аффинной элюции тиамин согласуется с разной чувствительностью структуры и функции данных изоферментов к изменениям рН [20, 21]. Повышение концентрации тиамин при аффинной элюции приводит к увеличению активности МДГ в полученной на этой стадии фракции и, как следствие, к снижению активности МДГ при последующей элюции раствором NaCl (рис. 1). Данный результат свидетельствует о специфичности тиамин, а не только кислого значения рН, в качестве элюирующего фактора. Однако суммарная активность МДГ во фракции, элюируемой мочевиной, не зависит от концентрации тиамин на первой стадии элюции (рис. 1). Это свидетельствует об ином типе связывания с тиамин-сефарозой изоферментов МДГ, элюируемых мочевиной (преимущественно МДГ2, табл. 2), по сравнению с изоферментами МДГ, элюируемые тиамин и NaCl.

Известно, что ГДГ и МДГ2 взаимодействуют с образованием комплекса, имеющего существенное функциональное значение, в т.ч. для действия низкомолекулярных регуляторов на активность обоих ферментов [22–24]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что образование такого комплекса может стабилизировать активность ГДГ при элюции с тиамин-

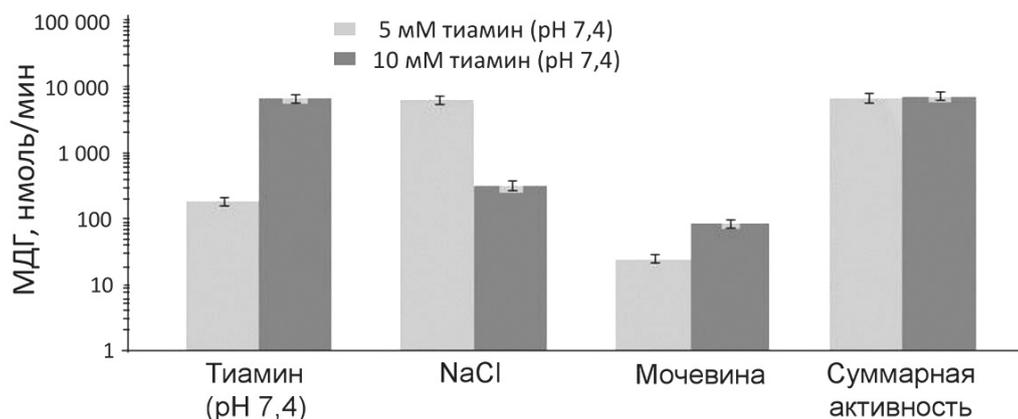


Рис. 1. Зависимость общей активности малатдегидрогеназы (МДГ) во фракциях, получаемых при аффинной хроматографии синапсомальной фракции мозга быка на тиамин-сефарозе, от концентрации тиамин в элюирующем растворе (рН 7,4) на первой стадии элюции. Усреднены результаты не менее двух независимых хроматографий при элюции 5 и 10 мМ тиамин

Таблица 2. Активность малатдегидрогеназы (МДГ) и уникальные для цитоплазматического (МДГ1) и митохондриального (МДГ2) изоферментов пептиды в элюатах с тиамин-сефарозы при аффинной хроматографии ацетонового экстракта синапсом мозга быка

Белковая фракция	Удельная активность МДГ		Общая активность МДГ		Число пептидов МДГ	
	нмоль/мин на 1 мг белка	%	нмоль/мин	%	МДГ1	МДГ2
Первая стадия элюции: 10 мМ тиамин, рН 7,4						
Ацетоновый экстракт	190 ± 10	100	8000 ± 400	100	2	3
10 мМ тиамин	460 ± 5	280	11 900 ± 100	150	2	1
1 М NaCl	350 ± 130	210	890 ± 340	11	0	2
2 М мочевины	60 ± 20	36	150 ± 50	2	0	2
Первая стадия элюции: 10 мМ тиамин, рН 5,6						
Ацетоновый экстракт	160 ± 3	100	6600 ± 300	100	2	3
10 мМ тиамин	16 ± 1	10	390 ± 20	6	0	4
1 М NaCl	30 ± 6	20	170 ± 30	3	3	5
2 М мочевины	30 ± 5	18	30 ± 5	1	1	5

Примечание. Активность МДГ определяли после замены элюирующего раствора на 10 мМ Tris-HCl (рН 7,4) при насыщенных субстратами в среде следующего состава: 20 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,2), 0,3 мМ оксалоацетат, 0,14 мМ NADH. Относительные активности указаны в процентах от уровней в исходных препаратах.

сефарозы NaCl и мочевиной. Так, общая и удельная активность ГДГ в данных фракциях выше при повышенном содержании МДГ2, которое наблюдается после проведения первой стадии элюции при рН 5,6 (табл. 1 и 2). Опосредованное ГДГ взаимодействие МДГ2 с тиамин-сефарозой может определять коэлюцию данных ферментов мочевиной и иной характер взаимодействия с носителем МДГ2, элюируемой с тиамин-сефарозы мочевиной (рис. 1).

Аффинная хроматография на тиамин-сефарозе гомогенатов коры мозга крысы. О зависимости элюируемых с тиамин-сефарозы активностей ГДГ и МДГ от белкового состава анализируемой фракции свидетельствует и разница профилей элюции этих активностей при нанесении на тиамин-сефарозу разных препаратов белков мозга. Так, по сравнению с активностями ГДГ и МДГ в синапсомальной фракции белков мозга, в элюате раствором тиамин (рН 7,4) данной фракции с тиамин-сефарозы удельная активность ГДГ падала (табл. 1), а МДГ – возрастала более чем в 2 раза (табл. 2). Напротив, по сравнению с активностями ГДГ и МДГ в гомогенате мозга, аффинная элюция данного препарата с тиамин-сефарозы слабощелочным раствором тиамин приводила к значительному (в 3 раза) увеличению удельной активности ГДГ при небольшом росте малатдегидрогеназной активности (с 8 до 11 нмоль/мин на 1 мг белка) (табл. 3). Кроме того, максимальная элюция

ГДГ и МДГ2 при хроматографии гомогенатов мозга наблюдалась под действием NaCl (9 пептидов ГДГ и 3 пептида МДГ2), причем именно в данной фракции удельные активности этих взаимодействующих между собой ферментов были наиболее высокими (табл. 3). Данные особенности элюции зависели от типа наносимой на тиамин-сефарозу белковой фракции. Так, при аффинной хроматографии синапсомальной фракции мозга быка в аналогичных условиях, т.е. после аффинной элюции тиамин при рН 7,4, ГДГ лучше всего элюировалась мочевиной (табл. 1), а МДГ2 хорошо отделялась от МДГ1 (табл. 2). Таким образом, как взаимодействие ГДГ и/или изоферментов МДГ с тиамин-сефарозой, так и коэлюция ГДГ с МДГ2 могут существенно зависеть от состава образца, подвергаемого аффинной хроматографии, отличающегося наборами белков и их низкомолекулярных лигандов.

Регуляция активности ГДГ и МДГ тиаминными соединениями *in vitro*. Влияние тиаминных соединений на ГДГ и МДГ исследовали с учетом полученных ранее данных о действующих концентрациях и условиях максимизации влияния этих соединений на исследуемые ферменты [6]. В сравнительных экспериментах использовали фиксированные концентрации тиамин (0,05 мМ) и ТДФ (1 мМ), соотношение которых имитирует таковое *in vivo*. На рис. 2 показано влияние тиамин и/или ТДФ на актив-

ность ГДГ мозга в исходных препаратах и в элюатах с тиамин-сефарозы. Видно, что в исходных препаратах тиамин и ТДФ ингибируют активность ГДГ, тогда как после хроматографии наблюдается активация фермента данными соединениями. Аналогичную разницу в воздействии ТДФ на ГДГ наблюдали ранее в условиях насыщения субстратами очищенного фермента (1,2-кратная активация ТДФ) и фермента в составе митохондриального экстракта (1,3-кратное ингибирование ТДФ) [6]. Значительно более выраженное влияние ТДФ на активность ГДГ, обна-

руженное в данной работе при аффинной хроматографии препаратов мозга (рис. 2), свидетельствует о роли концентрации белка и/или содержащихся в исходных препаратах ГДГ мозга эндогенных факторов, удаляемых в ходе аффинной хроматографии, в регуляции активности фермента под действием ТДФ. Например, можно ожидать, что содержание АДФ – активатора ГДГ – существенно выше в гомогенате мозга, чем в ацетоновом экстракте синапсомальной фракции мозга. Как видно из рис. 3, ТДФ препятствует активации ГДГ под действием АДФ.

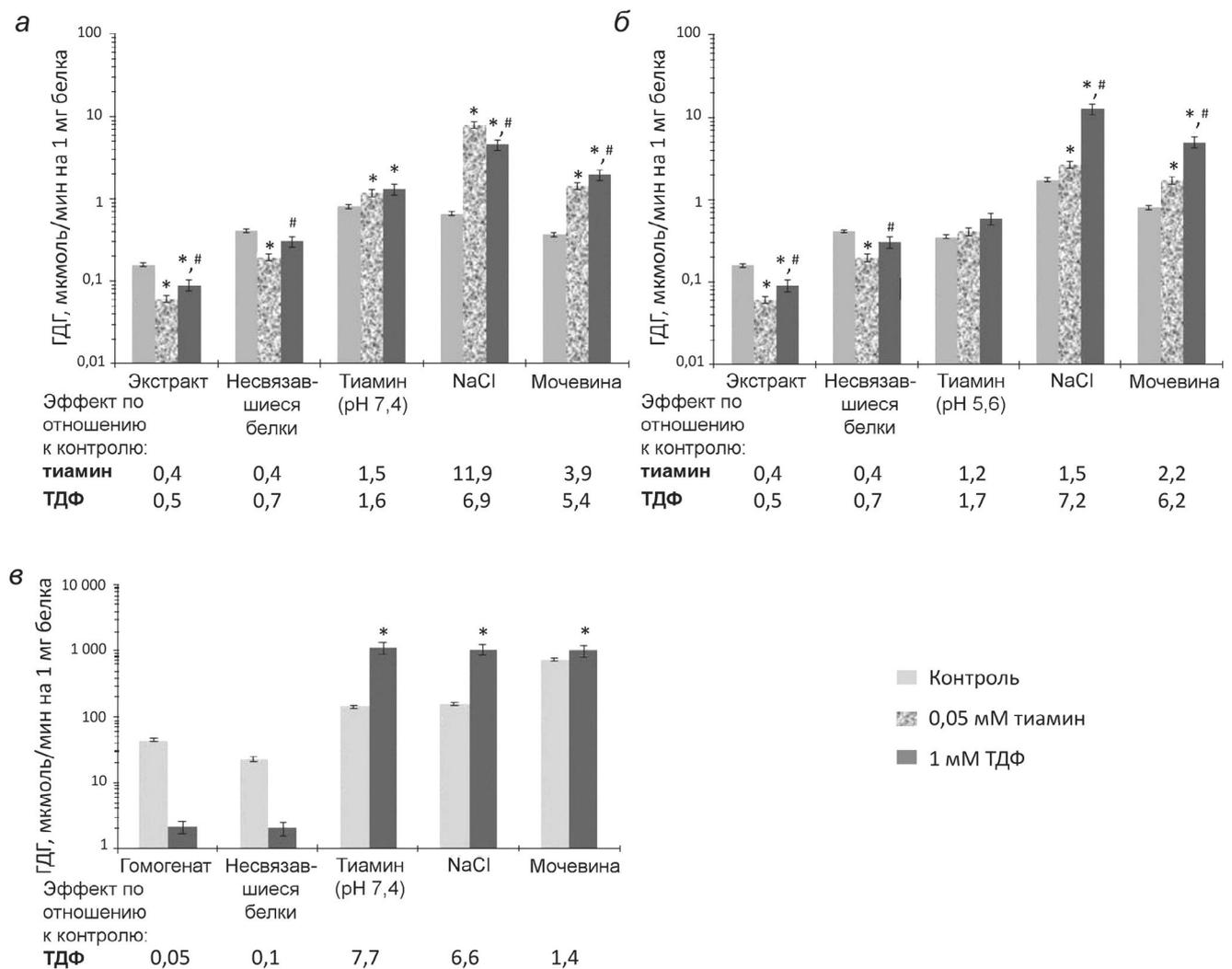


Рис. 2. Влияние тиамина и/или тиаминдифосфата (ТДФ) на активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) из мозга быка или крысы в элюатах с тиамин-сефарозы. При аффинной хроматографии ацетонового экстракта синапсом мозга быка на первой стадии элюции применяли 10 мМ раствор тиамина, рН 7,4 (а) или рН 5,6 (б); в – при аффинной хроматографии гомогената коры мозга крысы на первой стадии элюции применяли 10 мМ раствор тиамина, рН 7,4. Во всех случаях элюированные белки переводили в 10 мМ Tris-HCl (рН 7,4) с помощью ультрафильтрации. Эффекты тиамина и ТДФ измеряли при ненасыщающей концентрации NADH в среде следующего состава: 100 мМ Tris-HCl (рН 7,5), 2,5 мМ 2-оксоглутарат, 0,02 мМ NADH, 50 мМ NH₄Cl. Приведены усредненные результаты по 2–4 независимым экспериментам; *, # *p* < 0,05 (достоверные отличия от контрольной активности и от активности в присутствии 0,05 мМ тиамина соответственно, согласно *t*-тесту Стьюдента)

Таким образом, ингибирующее действие ТДФ в подвергаемых аффинной хроматографии препаратах может быть связано с выраженностью активирующего влияния ADP на ГДГ. Меньшее ингибирование фермента в составе синаптосомальной фракции мозга ТДФ (рис. 2, а) соответствует ожидаемому снижению содержания ADP в данном препарате по сравнению с полным гомогенатом мозга, в котором влияние ТДФ на активность ГДГ существенно более выражено (рис. 2, в). С другой стороны, активация ТДФ после аффинной хроматографии могла бы быть связана с облегченной диссоциацией GTP – высокоэффективного ингибитора ГДГ. Однако в модельных экспериментах с очищенной ГДГ нами не было выявлено снижение ингибирования фермента GTP под действием ТДФ или тиамин в использованном интервале условий (до 1 мМ ТДФ или тиамин при 1 мкМ GTP и варьировании концентрации 2-оксоглутарата в интервале 0,1–10,0 мМ). Помимо влияния эндогенных регуляторов, при интерпретации результатов разных воздействий ТДФ на активность ГДГ синаптосом и гомогената мозга (рис. 2) нельзя исключить и разницу регуляции синаптосомальной и общей ГДГ мозга тиаминными соединениями – например, за счет специфических для синаптосом посттрансляционных модификаций или альтернативного сплайсинга фермента.

Следует отметить, что при меньшем ингибирующем эффекте ТДФ в исходном препарате ГДГ меньшей оказалась и активация ТДФ ГДГ, элюируемой раствором тиамин, pH 7,4 (рис. 2). Так, в частично очищенном препарате из мозга

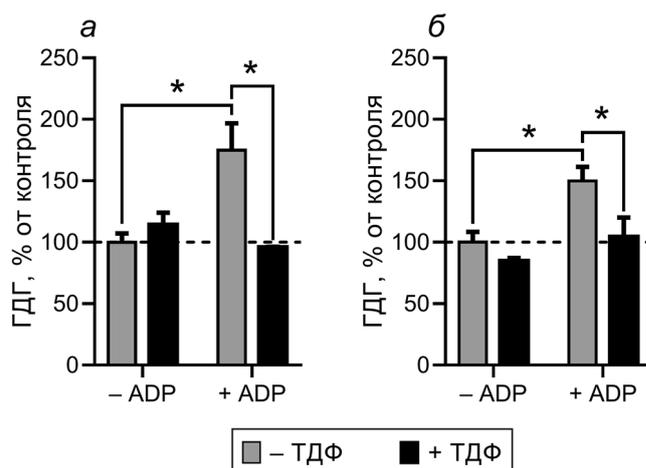


Рис. 3. Взаимозависимость влияния тиаминдифосфата (ТДФ) и ADP на активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ). Активность измеряли в буфере Кребса–Рингера (pH 7,4) в условиях насыщения субстратами (2,5 мМ 2-оксоглутарат, 0,2 мМ NADH, 50 мМ NH₄Cl). ADP и ТДФ использовали в концентрациях 1,7 и 1 мМ соответственно. Эксперименты проводили с коммерческим препаратом фермента, очищенного из печени быка (а), и частично очищенным ферментом из мозга крысы (б). **p* < 0,05 (достоверные отличия согласно двухфакторному дисперсионному анализу с *post hoc*-тестом Сидака)

быка наблюдается 2-кратное ингибирование ГДГ под действием ТДФ, которое сменяется 1,5-кратной активацией в элюате раствором тиамин, pH 7,4 (рис. 2, а). В то же время в гомогенате коры мозга крысы добавление ТДФ приводит к 20-кратному ингибированию ГДГ, а при аффинной элюции белков данного препарата тиамин (pH 7,4) наблюдается 8-кратная активация

Таблица 3. Активность и уникальные пептиды глутаматдегидрогеназы (ГДГ), цитоплазматического (МДГ1) и митохондриального (МДГ2) изоферментов малатдегидрогеназы (МДГ) в элюатах с тиамин-сефарозы при аффинной хроматографии гомогената коры мозга крысы

Белковая фракция	ГДГ					МДГ					
	удельная активность		общая активность		число пептидов	удельная активность		общая активность		число пептидов	
	нмоль/мин на 1 мг белка	%	нмоль/мин	%		нмоль/мин на 1 мг белка	%	нмоль/мин	%	МДГ1	МДГ2
Гомогенат	5 ± 0	100	4600 ± 400	100	н.о.	8 ± 0	100	7100 ± 350	100	н.о.	н.о.
10 мМ тиамин	17 ± 3	340	2900 ± 500	64	7	11 ± 1	138	1900 ± 100	26	1	1
1 М NaCl	19 ± 1	356	1600 ± 60	34	9	26 ± 5	325	2200 ± 400	31	1	3
2 М мочевины	19 ± 5	370	1300 ± 260	28	4	15 ± 5	188	1100 ± 400	15	1	1

Примечание. Активности ферментов определяли после замены элюирующего раствора на 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) в средах следующего состава: для ГДГ – 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 мМ 2-оксоглутарат, 0,2 мМ NADH, 50 мМ NH₄Cl; для МДГ – 20 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,2), 0,3 мМ оксалоацетат, 0,14 мМ NADH. Относительные активности указаны в процентах от уровней в исходных препаратах; н.о. – не определяли.

ГДГ под действием ТДФ (рис. 2, *в*, гомогенат и тиамин, pH 7,4). Полученные результаты свидетельствуют о том, что аллостерические эффекты ТДФ, как ингибирующий, так и активирующий, сильнее выражены в отношении ГДГ полного гомогената мозга крысы, чем в отношении ГДГ после ацетоновой экстракции синаптосомальной фракции мозга быка (рис. 2).

Из рис. 2 также видно, что при хроматографии ацетонового экстракта активирующий эффект ТДФ на ГДГ значительно выше после элюции NaCl и мочевиной (5–7-кратная активация) по сравнению с эффектом, наблюдающимся на стадии аффинной элюции тиамином (1,5–1,7-кратная активация). При этом в отсут-

ствии ТДФ уровень активности ГДГ, аффинно элюируемой тиамином, ниже уровня активированной ТДФ ГДГ (рис. 2). Таким образом, низкая активация данной фракции ГДГ ТДФ не может быть обусловлена активированным состоянием элюированной тиамином ГДГ за счет прочного связывания тиамин ферментом. Аналогичный (1,2-кратный) уровень активации фермента ТДФ в условиях насыщения ГДГ 2-оксоглутаратом и аммонием при низкой концентрации NADH наблюдали и ранее [6] при исследовании очищенного фермента или ГДГ в составе митохондриального экстракта. В отличие от аффинной хроматографии синаптосомальной фракции мозга, при хроматографии

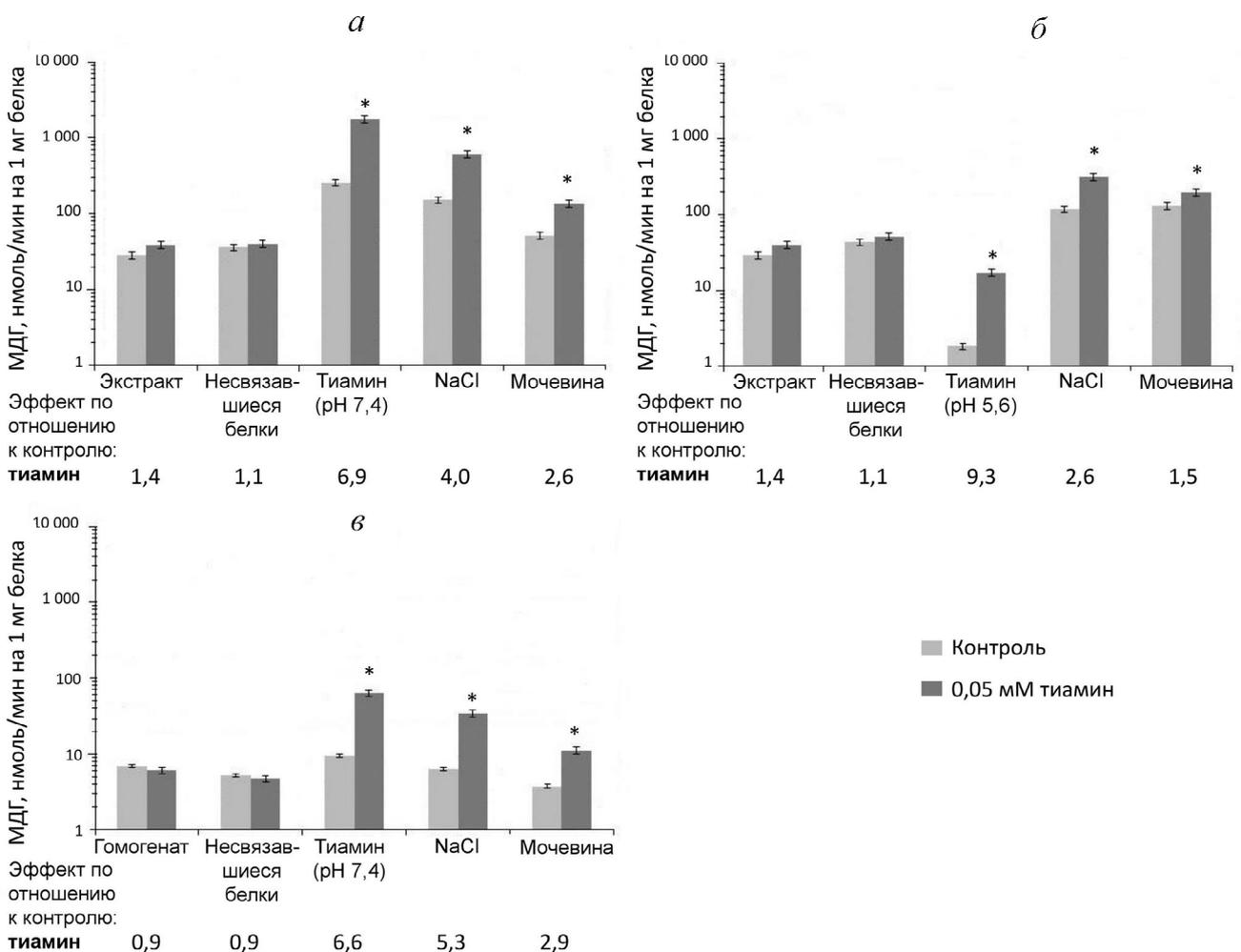


Рис. 4. Влияние тиамин (0,05 мМ) на малатдегидрогеназную активность (МДГ) мозга быка и крысы в элюатах с тиамин-сефарозы. При аффинной хроматографии ацетонового экстракта синаптосом мозга быка на первой стадии элюции применяли 10 мМ раствор тиамин, pH 7,4 (*а*) или pH 5,6 (*б*); *в* – при аффинной хроматографии гомогената коры мозга крысы на первой стадии элюции применяли 10 мМ раствор тиамин, pH 7,4. Во всех случаях элюированные белки переводили в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) с помощью ультрафильтрации. Эффект тиамин измеряли при ненасыщающей концентрации оксалоацетата в среде следующего состава: буфер Кребса–Рингера (pH 7,4), 0,01 мМ оксалоацетат, 0,14 мМ NADH. Приведены усредненные результаты по 2–5 независимым экспериментам; * $p < 0,05$ (достоверные отличия активности в присутствии тиамин от контрольной активности согласно t -тесту Стьюдента)

гомогената мозга максимальная (8-кратная) активация ТДФ ГДГ наблюдается именно во фракции, элюируемой тиаминном (рис. 2, в). Поскольку в этом случае тиамин элюирует подавляющую часть ГДГ (64% от общей активности в исходном препарате, табл. 1), можно заключить, что выраженный активирующий эффект ТДФ определяется концентрацией ГДГ и/или ее гетерологических комплексов. Исследование действия тиаминна на ГДГ синаптосомальной фракции, элюируемую NaCl и мочевиной (рис. 2, а, б), подтверждает данное предположение. В отличие от действия ТДФ, которое не зависит от значения pH при предшествующей аффинной элюции тиаминном, активация ГДГ тиаминном в элюатах NaCl и мочевиной значительна (до 12-кратной) лишь после проведения элюции тиаминном при pH 7,4 (рис. 2, а). В этих же условиях активность ГДГ, элюируемой NaCl и мочевиной, составляет значительно меньшую часть ее общей активности, чем после проведения аффинной элюции тиаминном при pH 5,6. В последнем случае, как показано выше, в элюатах содержится больше МДГ2 (табл. 2). Одновременное присутствие в элюате ГДГ и МДГ2 создает лучшие условия для образования комплекса ГДГ и МДГ2. Тем не менее удельная и общая активности МДГ, а также активация МДГ тиаминном в этом случае существенно ниже по сравнению с теми, что наблюдаются в элюатах NaCl и мочевиной после аффинной элюции тиаминном при pH 7,4 (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что после хроматографии на тиамин-сефарозе активация ГДГ тиаминном не выражена в условиях, способствующих образованию комплекса ГДГ с МДГ2, т.е. после аффинной элюции при pH 5,6. Напротив, активация ГДГ тиаминном максимальна в условиях низкой общей активности ГДГ и пониженного содержания МДГ2 при элюции растворами NaCl и мочевины, т.е. после аффинной элюции при pH 7,4 (табл. 1 и 2). В связи с этим можно предположить, что тиамин, аналогично МДГ2, стабилизирует ГДГ в последующих элюатах с помощью NaCl и мочевины, способных вызывать частичную диссоциацию и/или денатурацию ГДГ.

Стимулирующее влияние тиаминна на активность МДГ исследованных препаратов белков мозга характеризуется менее сложными закономерностями, чем действие тиаминна на активность ГДГ. Тиамин не влияет на активность МДГ исходных препаратов. При хроматографии как синаптосомальной фракции мозга, так и гомогената мозга максимальное влияние тиаминна на активность МДГ наблюдается во фракции, аффинно элюированной тиаминном. При после-

дующей элюции NaCl и особенно мочевиной данный эффект тиаминна значительно снижается (рис. 4). Очевидно, неспецифическая элюция растворами NaCl или мочевины приводит к частичной потере аллостерической регуляции МДГ под действием тиаминна.

Отсутствие влияния тиаминна на активность исходных препаратов МДГ может быть связано с ранее охарактеризованной разнонаправленностью действия тиаминна (ингибирование МДГ1 и активация МДГ2) на данные изоферменты [6]. Действительно, из рис. 4, а и табл. 2 видно, что повышение активности МДГ тиаминном максимально (9-кратное) во фракциях с преимущественным содержанием МДГ2 (после аффинной элюции кислым раствором тиаминна, табл. 2), а коэлюция МДГ1 и МДГ2 (при элюции слабощелочным раствором тиаминна, табл. 2) несколько снижает активацию МДГ тиаминном (до 7-кратной). Таким образом, во фракции, содержащей обе изоформы фермента, активация тиаминном МДГ2 может уменьшаться за счет ингибирования тиаминном МДГ1 [6]. Однако следует также учесть, что, согласно измерению ферментативной активности, существенная часть МДГ не связывается с тиамин-сефарозой даже при нанесении на колонку значительно меньшего количества белка, содержащегося в ацетоновом экстракте синаптосом, по сравнению с полным гомогенатом мозга (рис. 4). Поэтому можно предположить, что с тиамин-сефарозой взаимодействуют лишь определенные изоформы МДГ1 и МДГ2 — например, отличающиеся уровнем посттрансляционных модификаций.

Исследование влияния высоких доз вводимого крысам тиаминна на регуляторные свойства ГДГ и МДГ в составе гомогенатов мозга. Как показано выше, регуляция активности ферментов тиаминном и его производными может отличаться в зависимости от препарата фермента (рис. 2 и 4) [6]. Так, в гомогенатах или синаптосомальной фракции мозга ГДГ ингибируется тиаминном, а на МДГ тиамин не оказывает влияния. Однако после аффинной хроматографии наблюдается активация ГДГ и МДГ (рис. 2 и 4), причем скорость катализируемой МДГ реакции растет даже в тех случаях, когда в препарате присутствуют оба изофермента МДГ (табл. 1 и 3), один из которых (МДГ1) ингибируется тиаминном [6]. Ввиду такой неоднозначности регуляции тиаминными соединениями *in vitro* мы оценили ее биологическое значение путем исследования регуляторных свойств ферментов мозга крысы после введения животным высокой дозы тиаминна. Для этого содержащие ГДГ и МДГ гомогенаты коры мозга экспериментальных и контрольных крыс

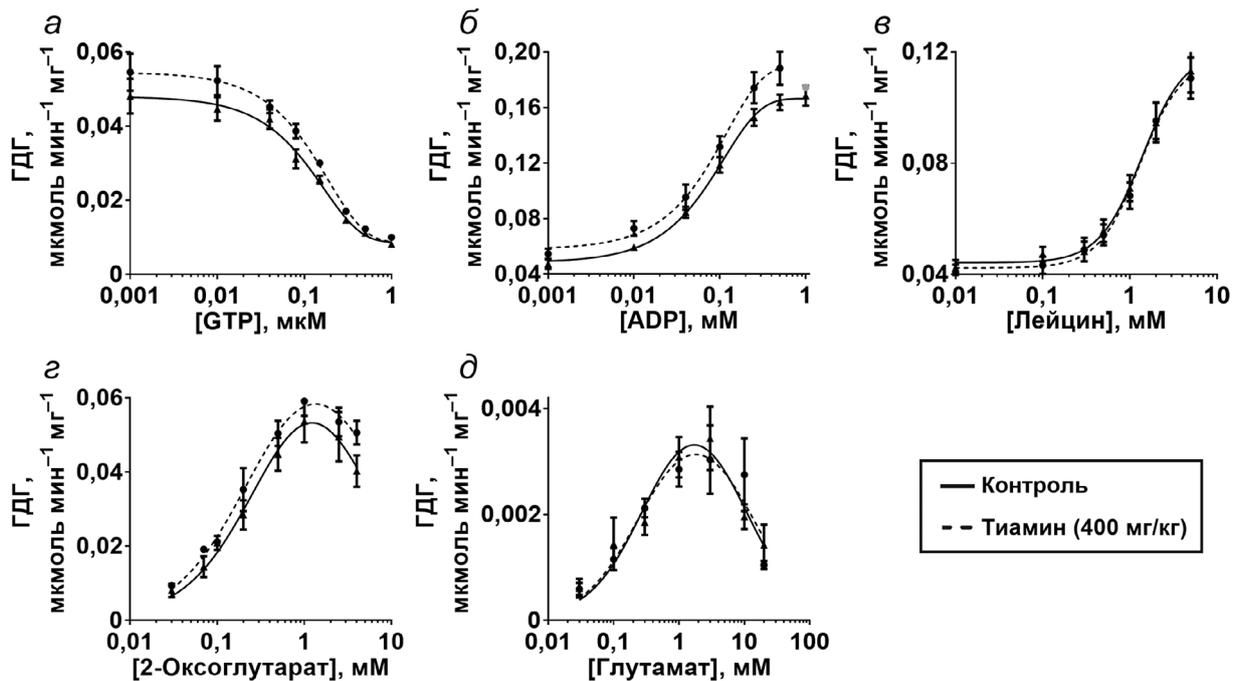


Рис. 5. Влияние введения животным тиамина (400 мг/кг) на регуляторные свойства глутаматдегидрогеназы (ГДГ) мозга крысы. Исследована зависимость активности фермента от аллостерических регуляторов: GTP (а), ADP (б), лейцина (в) и субстратов 2-оксоглутарата (з) и глутамата (д). Для построения кинетических зависимостей усреднены данные трех независимых экспериментов. Аппроксимации проводили в программе GraphPad Prism v. 8.0 с использованием встроенных моделей (см. разд. «Методы исследования»). Параметры аппроксимаций приведены в табл. 4

были освобождены от низкомолекулярных лигандов путем быстрой гель-фильтрации, не приводящей к существенному разведению гомогената.

Кинетические зависимости активности ГДГ от ее основных низкомолекулярных регуляторов: аллостерических эффекторов, GTP, ADP и лейцина, а также субстратов разных направлений реакции, 2-оксоглутарата или глутамата, — представлены на рис. 5. Сравнение кинетических кривых показывает, что введенный животным тиамин увеличивает амплитуду ингибирования GTP (рис. 5, а) и максимум эффективной скорости катализируемой ГДГ реакции, достигаемой в фазе активации фермента под действием ADP (рис. 5, б) и 2-оксоглутарата (рис. 5, з). При этом введение тиамина *in vivo* не меняет регуляцию ГДГ мозга лейцином (рис. 5, в) и глутаматом (рис. 5, д). Поэтому увеличение наблюдаемой амплитуды ответа ГДГ на GTP, ADP и 2-оксоглутарат не связано с ростом экспрессии фермента, что подтверждает и количественный анализ пептидов ГДГ, детектируемых в исследованных гомогенатах с помощью масс-спектрометрии. Следует отметить, что из указанных выше сопряженных изменений регуляции ГДГ после введения животным тиамина лишь изменение амплитуды ингибирования фермента под

действием GTP показало статистическую достоверность (табл. 4). По-видимому, это связано со сложностью дифференциации приведенных зависимостей в случаях, когда активация сменяется ингибированием при высоких концентрациях ADP (после введения тиамина) и 2-оксоглутарата. Тем не менее характерные для насыщения 2-оксоглутаратом значения K_m^{OG} и K_i^{OG} (табл. 4) хорошо согласуются с наблюдаемым на рис. 5, з снижением субстратного ингибирования, а сопряженный характер данных изменений соответствует известной связи механизмов регуляции ГДГ с помощью GTP и ADP с субстратным ингибированием фермента [25]. Поскольку ряд остатков регуляторных центров ГДГ, включая остаток лизина в центре связывания GTP, подвергаются посттрансляционному ацилированию [25], можно предположить, что введение животным тиамина приводит к изменению регуляторных свойств ГДГ (рис. 5, табл. 4) за счет изменения уровня таких посттрансляционных модификаций. Например, конформационные изменения при связывании тиамина и/или его производных с ГДГ *in vivo* могут менять доступность тех или иных остатков фермента ацилированию или деацилированию.

Аналогичный анализ влияния высокой дозы тиамина на регуляторные свойства МДГ в со-

ставе гомогенатов мозга после гель-фильтрации не выявил существенных изменений в зависимостях скорости малатдегидрогеназной реакции от насыщения субстратами: оксалоацетатом (0,01–1,00 мМ) и малатом (0,1–10,0 мМ). Таким образом, если тиамин активирует лишь небольшую часть взаимодействующих с тиамин-сефарозой изоформ МДГ, то введение животным тиамин-содержащего носителя не меняет представленность данных изоформ в гомогенате мозга.

Сравнительный анализ элюируемых с тиамин-сефарозы протеомов. По сравнению с предыдущим использованием аффинной хроматографии на носителях, модифицированных тиамин-содержащей или аналогом его функциональной (тиазолиевой) части, в данной работе применялась модификация носителя тиамин-содержащим, исключая конформацию и/или количество присоединенных к линкеру молекул «наживки». Для возможного повышения специфичности элюции с тиамин-содержащего носителя мы также использовали раствор тиамин-содержащего носителя в качестве аффинного элюента. Наконец, для определения дополнительных путей некоферментного действия тиамин-содержащего носителя мы также использовали раствор тиамин-содержащего носителя в качестве аффинного элюента. Наконец, для определения дополнительных путей некоферментного действия тиамин-содержащего носителя мы также использовали раствор тиамин-содержащего носителя в качестве аффинного элюента. Наконец, для определения дополнительных путей некоферментного действия тиамин-содержащего носителя мы также использовали раствор тиамин-содержащего носителя в качестве аффинного элюента.

ный гомогенат мозга крысы. Биоинформатический анализ идентифицированных в данной работе совокупностей белков, элюируемых при хроматографии синаптосомальной фракции мозга быка или гомогената мозга крысы, представлен в табл. 5. Сравнение с предыдущими результатами аналогичного анализа тиамин-зависимых протеомов синаптосомальной фракции мозга крысы [6] показало, что введение аффинной элюции тиамин-содержащим элюируемым с тиамин-сефарозы белков. В нашем предыдущем исследовании [6], в котором элюция тиамин-содержащим элюируемым с тиамин-сефарозы белков синаптосомальной фракции мозга крысы не использовалась, термин «ацетилирование» имел существенно большую степень обогащения ($P = 10^{-17}$, согласно результатам анализа тиамин-связывающего протеома программой DAVID), чем термин «фосфобелки» ($P = 10^{-6}$). При аффинной же элюции тиамин-содержащим элюируемым с тиамин-сефарозы белков синаптосомальной фракции мозга быка оба термина характеризуются сходной степенью обогащения ($P = 10^{-35} - 10^{-36}$), а в случае аффинной хроматографии полных гомогенатов мозга крысы термин «фосфобелки» даже приобретает большую значимость ($P = 10^{-76}$), чем термин «ацетилирова-

Таблица 4. Кинетические параметры регуляции ГДГ мозга контрольных крыс и крыс после введения высокой дозы тиамин

Параметры	Контроль	Тиамин
IC_{50}^{GTP} , мкМ	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Амплитуда ингибирования GTP, мкмоль/мин на мг	0,042 ± 0,003	0,048 ± 0,003
Коэффициент Хилла (GTP)	-1,4 ± 0,3	-1,3 ± 0,2
EC_{50}^{ADP} , мМ	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,07
Амплитуда активации ADP, мкмоль/мин на мг	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,04
Коэффициент Хилла (ADP)	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,4
EC_{50}^{Leu} , мМ	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1
Амплитуда активации лейцином, мкмоль/мин на мг	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Коэффициент Хилла (лейцин)	1,8 ± 0,6	1,8 ± 0,6
V_{max}^{OG} , мкмоль/мин на мг	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,01
K_m^{OG} , мМ	0,36 ± 0,16	0,25 ± 0,07
K_i^{OG} , мМ	4,2 ± 2,4	7,1 ± 3,1
V_{max}^{Glu} , мкмоль/мин на мг	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001
K_m^{Glu} , мМ	0,33 ± 0,16	0,26 ± 0,13
K_i^{Glu} , мМ	9,0 ± 4,5	12,7 ± 6,8

Примечание. Представлены результаты нелинейной регрессии в программе GraphPad Prism v. 8.0 (см. «Методы исследования») кинетических зависимостей, приведенных на рис. 5. Верхние индексы параметров насыщения ГДГ указывают лиганд, в случае 2-оксoglutarата – OG. Жирным шрифтом выделены определенные с помощью *F*-критерия достоверные отличия между кинетическими параметрами аппроксимированных зависимостей ГДГ из мозга крыс контрольной группы и крыс, которым вводили тиамин.

Таблица 5. Главные термины аннотации протеомов, элюируемых с тиамин-сефарозы тиаминном или неспецифическими агентами (NaCl и мочевиной)

Элюция тиаминном			Элюция NaCl + мочевиной		
термин аннотации	число белков	<i>P</i> обогащения	термин аннотации	число белков	<i>P</i> обогащения
Бык (<i>n</i> = 115)			Бык (<i>n</i> = 136)		
1) Фосфобелки	83	2,0E-39	1) Фосфобелки	96	1,3E-46
2) Ацетилирование	68	3,6E-38	2) Кератин	25	1,4E-36
3) Кератин	23	6,5E-34	3) Промежуточные филаменты	26	4,5E-35
4) Цитоплазма	56	1,1E-23	4) Ацетилирование	69	1,3E-34
5) Метилирование	25	5,2E-17	5) Цитоплазма	62	2,3E-25
			6) Метилирование	23	1,8E-13
Крыса (<i>n</i> = 183)			Крыса (<i>n</i> = 202)		
1) Фосфобелки	153	6,5E-76	1) Фосфобелки	173	1,0E-82
2) Ацетилирование	105	3,4E-61	2) Ацетилирование	120	2,9E-69
3) Метилирование	48	7,2E-34	3) Метилирование	58	1,9E-42
4) Цитоплазма	84	3,9E-29	4) Цитоплазма	95	5,9E-32

Примечание. Показаны репрезентативные результаты биоинформатического анализа с помощью программы DAVID (v. 6.8) наборов белков, элюируемых при аффинной хроматографии ацетонового экстракта синапсом мозга быка (два независимых определения) и полных гомогенатов коры мозга крысы (три независимых определения); *n* – общее количество белков в анализируемых протеомах; *P* обогащения – значение *P*, характеризующее вероятность встречаемости соответствующего термина аннотации в анализируемой выборке из *n* белков по сравнению со случайной встречаемостью данного термина в соответствующем геноме.

ние» ($P = 10^{-61}$) (табл. 5). Тем не менее о специфичности термина «ацетилирование» в качестве характеристики тиамин-зависимого протеома синапсом мозга быка говорит сравнение представленности основных терминов белковой аннотации на аффинной и неспецифической стадиях элюции. В элюате синаптосомальной фракции мозга быка раствором тиамина термины «фосфобелки» и «ацетилирование» обогащены одинаково ($P = 10^{-35} - 10^{-36}$), тогда как в элюатах неспецифическими агентами (NaCl и мочевины) относительное обогащение термина «ацетилирование» снижается со второй до четвертой позиции при росте обогащения термина «фосфобелки» ($P = 10^{-46}$). Таким образом, по сравнению с элюцией неспецифическими агентами, аффинная элюция тиамином связавшихся с тиамин-сефарозой синаптосомальных белков увеличила относительную представленность белков, аннотируемых как «фосфобелки», подтвердив специфичность термина «ацетилирование» в качестве характеристики данного протеома. Оба термина характеризуют тиамин-зависимые протеомы мозга независимо от вида использованного животного (бык или крыса) или препарата, подвергнутого аффинной хроматографии (синаптосомальная фракция или гомогенат моз-

га) (табл. 5) [6]. Биоинформатический анализ с помощью программы DAVID v. 6.8 (табл. 5) также показал, что удерживаемые на тиамин-сефарозе белки ацетонового экстракта синапсом мозга быка значительно реже аннотируются термином «метилирование» (позиции 5 и 6), чем аналогичные белки полного гомогената коры мозга крысы (позиция 3). С учетом того, что термин «метилирование» не был значительно представлен и при предыдущем анализе тиамин-зависимых протеомов синаптосомальной фракции мозга крысы [6], можно заключить, что обогащение данного термина связано не с видоспецифическими эффектами, а с удалением при очистке синаптосомальной фракции группы взаимодействующих с тиаминном белков, характеризующихся функциональным термином «метилирование».

Представленное сравнение взаимодействия с тиамин-сефарозой как различных фракций белков мозга (полный гомогенат и ацетоновый экстракт синапсом), так и различных видов животных (бык и крыса) указывает на универсальность регуляции тиаминными соединениями таких ферментов центрального метаболизма мозга животных, как дегидрогеназы малата и глутамата. Биологическое значение регулятор-

ного действия тиамина и/или ТДФ подтверждено изменением регуляторных свойств ГДГ мозга крыс после введения животным высоких доз тиамина. Биоинформатический анализ наборов белков, элюируемых с тиамин-сефарозы в разных условиях, указывает на специфичность их обогащения термином «ацетилирование» и вовлеченность таких белков в процессы метилирования.

Финансирование. Работа О.А. Меженской, аспирантки Института биохимии им. А.В. Палладина НАНУ (Киев, Украина) (экспериментальные результаты, представленные на рис. 1, 2, 4 и в табл. 1–3 за исключением данных масс-спектрометрии), по данному проекту, выполняемому в МГУ им. М. В. Ломоносова, была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 15-34-50124) в числе работ, проводимых молодыми учеными под руководством кандидатов и докторов наук в научных организациях Российской Федерации. Эксперименты, представленные на рис. 3 и 5, анализ

(в т.ч. биоинформатический) результатов аффинной хроматографии в сочетании с данными масс-спектрометрии и подготовка публикации к печати проведены в рамках выполнения проекта, финансируемого Российским научным фондом (грант № 18-14-00116).

Благодарности. Авторы выражают благодарность к.б.н. А.В. Граф и к.б.н. М.В. Масловой (МГУ им. М.В. Ломоносова) за предоставление образцов мозга крыс, использованных в данном исследовании.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. В частности, все эксперименты с животными проводили с соблюдением этических норм согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным директивой Евросоюза 2010/63/EU. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Frank, L.L. (2015) Thiamin in clinical practice, *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.*, **39**, 503–520, doi: 10.1177/0148607114565245.
- Tylicki, A., Lotowski, Z., Siemieniuk, M., and Ratkiewicz, A. (2018) Thiamine and selected thiamine antivitaminases – biological activity and methods of synthesis, *Biosci. Rep.*, **38**, BSR20171148, doi: 10.1042/BSR20171148.
- Pavlovic, D.M. (2019) Thiamine deficiency and benfotiamine therapy in brain diseases, *Am. J. Biomed. Sci. Res.*, **3**, 1–5, doi: 10.34297/AJBSR.2019.03.000621.
- Bunik, V.I., and Aleshin, V.A. (2017) Analysis of the protein binding sites for thiamin and its derivatives to elucidate molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin (vitamin B1), *Studies in Natural Products Chemistry*, **53**, 375–429, doi: 10.1016/B978-0-444-63930-1.00011-9.
- Aleshin, V.A., Mkrtchyan, G.V., and Bunik, V.I. (2019) Mechanisms of the non-coenzyme action of thiamine: protein targets and medical implications, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1051–1075, doi: 10.1134/S0006297919080017.
- Mkrtchyan, G., Aleshin, V., Parkhomenko, Y., Kaehne, T., Luigi Di Salvo, M., Parroni, A., Contestabile, R., Vovk, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2015) Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis, *Sci. Rep.*, **5**, 12583, doi: 10.1038/srep12583.
- Tsepkova, P.M., Artiukhov, A.V., Boyko, A.I., Aleshin, V.A., Mkrtchyan, G.V., Zvyagintseva, M.A., Ryabov, S.I., Ksenofontov, A.L., Baratova, L.A., Graf, A.V., and Bunik, V.I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 723–736, doi: 10.1134/S0006297917060098.
- He, X., and Zhang, J. (2006) Toward a molecular understanding of pleiotropy, *Genetics*, **173**, 1885–1891, doi: 10.1534/genetics.106.060269.
- Morales-Gonzalez, J.A., Madrigal-Santillan, E., Morales-Gonzalez, A., Bautista, M., Gayosso-Islas, E., and Sanchez-Moreno, C. (2015) What is known regarding the participation of factor Nrf-2 in liver regeneration? *Cells*, **4**, 169–177, doi: 10.3390/cells4020169.
- Muller, S. (2017) DNA damage-inducing compounds: unraveling their pleiotropic effects using high throughput sequencing, *Curr. Med. Chem.*, **24**, 1558–1585, doi: 10.2174/0929867324666170124143710.
- Leeuw, E.P.H., Lee, S.H., Kim, W.H., Kwasny, S.M., Opperman, T.J., and Lillehoj, H.S. (2018) Pleiotropic anti-infective effects of defensin-derived antimicrobial compounds, *Avian Dis.*, **62**, 381–387, doi: 10.1637/11912-061118-Reg.1.
- Gomes, M.B., and Negrato, C.A. (2014) Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases, *Diabetol. Metab. Syndr.*, **6**, 80, doi: 10.1186/1758-5996-6-80.
- Turner, P.V., Pekow, C., Vasbinder, M.A., and Brabb, T. (2011) Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, **50**, 614–627.
- Postoyenko, V.A., Parkhomenko, Y.M., Vovk, A.I., Kholmuradov, A.G., and Donchenko, G.V. (1987) Isolation and some properties of thiamine-binding protein from the rat brain synaptosomes, *Biokhimiia*, **52**, 1792–1797.
- Graf, A., Kabysheva, M., Klimuk, E., Trofimova, L., Dunaeva, T., Zundorf, G., Kahlert, S., Reiser, G., Storozhevskiy, T., Pinelis, V., Sokolova, N., and Bunik, V. (2009) Role of 2-oxoglutarate dehydrogenase in brain pathologies involving glutamate neurotoxicity, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **61**, 80–87, doi: 10.1016/j.molcatb.2009.02.016.
- Klyashchitsky, B.A., Pozdnev, V.F., Mitina, V.K., Voskoboev, A.I., and Chernikevich, I.P. (1980) Isolation and purification of biopolymers by biospecific affinity

- chromatography. V. Affinity chromatography of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **6**, 1572–1579.
17. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
 18. Bunik, V., Kaehne, T., Degtyarev, D., Shcherbakova, T., and Reiser, G. (2008) Novel isoenzyme of 2-oxoglutarate dehydrogenase is identified in brain, but not in heart, *FEBS J.*, **275**, 4990–5006, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06632.x.
 19. MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., and MacCoss, M.J. (2010) Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments, *Bioinformatics*, **26**, 966–968, doi: 10.1093/bioinformatics/btq054.
 20. Wood, D.C., Jurgensen, S.R., Geesin, J.C., and Harrison, J.H. (1981) Subunit interactions in mitochondrial malate dehydrogenase. Kinetics and mechanism of reassociation, *J. Biol. Chem.*, **256**, 2377–2382.
 21. Bleile, D.M., Schulz, R.A., Harrison, J.H., and Gregory, E.M. (1977) Investigation of the subunit interactions in malate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **252**, 755–758.
 22. Fahien, L.A., Kmietek, E., and Smith, L. (1979) Glutamate dehydrogenase–malate dehydrogenase complex, *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 33–46, doi: 10.1016/0003-9861(79)90069-9.
 23. Fahien, L.A., Kmietek, E.H., MacDonald, M.J., Fibich, B., and Mandic, M. (1988) Regulation of malate dehydrogenase activity by glutamate, citrate, alpha-ketoglutarate, and multi-enzyme interaction, *J. Biol. Chem.*, **263**, 10687–10697.
 24. Fahien, L.A., MacDonald, M.J., Teller, J.K., Fibich, B., and Fahien, C.M. (1989) Kinetic advantages of hetero-enzyme complexes with glutamate dehydrogenase and the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, *J. Biol. Chem.*, **264**, 12303–12312.
 25. Bunik, V., Artiukhov, A., Aleshin, V., and Mkrtchyan, G. (2016) Multiple forms of glutamate dehydrogenase in animals: structural determinants and physiological implications, *Biology (Basel)*, **5**, 53, doi: 10.3390/biology5040053.

REGULATION OF MALATE DEHYDROGENASES AND GLUTAMATE DEHYDROGENASE OF MAMMALIAN BRAIN BY THIAMINE *in vitro* AND *in vivo**

O. A. Mezhenska¹, V. A. Aleshin^{2,3}, T. Kaehne⁴, A. V. Artiukhov^{2,3}, and V. I. Bunik^{2,3,***}**

¹ Department of Vitamin and Coenzyme Biochemistry, Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 01601 Kyiv, Ukraine

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia; E-mail: bunik@belozersky.msu.ru

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 19991 Moscow, Russia

⁴ Institute of Experimental Internal Medicine, Otto-von-Guericke University, 39120 Magdeburg, Germany

Received August 5, 2019

Revised September 24, 2019

Accepted September 24, 2019

To study the mechanisms of the non-coenzyme action of thiamine and its diphosphate (ThDP) on brain proteins, an acetone extract of bovine brain synaptosomes or homogenate of rat brain cortex are subjected to affinity chromatography on thiamine-modified Sepharose. Relative content of glutamate dehydrogenase (GDH) and isoenzymes of malate dehydrogenase (MDH) in step-wise eluates by thiamine (at pH 7.4 or 5.6), NaCl and urea is determined by mass-spectrometry. Influence of thiamine and/or ThDP on GDH and MDH activities in these eluates is studied as well. Activation of malate dehydrogenase reaction by thiamine is maximal after elution of proteins with an acidic thiamine solution that does not elute an MDH1 isoenzyme. Effects of exogenous thiamine or ThDP on GDH activity probably depend on the presence of endogenous regulators of the enzyme. In fact, thiamine and/or ThDP activate the brain GDH in eluates but inhibits the enzyme in crude preparations applied to the sorbent. ThDP inhibits the ADP-activated GDH. Activation of GDH by thiamine (but not ThDP) decreases in case when the acidic thiamine solution (pH 5.6) is used as eluent compared to the procedure employing slightly alkaline thiamine solution (pH 7.4). Simultaneous increase in the MDH2 content and in total GDH activity after the affinity elution at pH 5.6 compared to the elution at pH 7.4 indicates the role of the known GDH–MDH2 interaction in stabilizing the GDH activity and in GDH regulation by thiamine. The biological potential of thiamine-dependent regulation of the brain GDH is confirmed *in vivo* by demonstration of changes in regulatory properties of GDH after administration of a high dose of thiamine to rats. Bioinformatics analysis of the thiamine-eluted brain proteins shows specific enrichment of their annotation with terms «phosphoprotein», «acetylation» and «methylation». Relationship between thiamine and these post-translational modifications in brain may contribute to neuroprotective effects of high doses of thiamine, including the regulation of oxidation of the major excitatory neurotransmitter in brain – glutamate.

Keywords: thiamine, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, thiamine-Sepharose, phosphoprotein, acetylation, methylation