

УДК 577.1

РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛКОМ p53 МЕТАБОЛИЗМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ЗАВИСИМОГО ОТ ТИАМИНА (ВИТАМИНА В1)*

© 2020 В.И. Буник^{1,2,3**}, В.А. Алешин^{1,2}, С. Жоу⁴, Ш. Кришнан⁴, А. Карлссон⁴

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992 Москва, Россия

⁴ Отделение Клинической Микробиологии, Отдел Лабораторной Медицины, Каролинский Институт, Больница Каролинского Университета, 14186 Стокгольм, Швеция

Поступила в редакцию 25.05.2020

После доработки 09.06.2020

Принята к публикации 09.06.2020

Транскрипционный фактор p53 – один из главных регуляторов энергетического обмена. В свою очередь, энергетический обмен сильно зависит от тиамина (витамина В1) и/или его природных производных, причем известно, что основное производное, тиаминдифосфат (ТДФ), влияет на связывание p53 с ДНК. Чтобы получить системный взгляд на регуляцию зависимого от тиамина метаболизма белком p53, мы оценили предполагаемые сайты связывания p53 с ДНК вблизи участков инициации транскрипции генов, кодирующих транспортеры и ферменты, связанные с тиамином и/или его производными. Предсказания подтверждены экспериментальным исследованием изменений метаболизма в ответ на активатор p53 – цисплатин. Экспрессия p53 и его известной мишени, p21, была определена в клетках аденокарциномы легкого человека линии A549, обладающих функционирующим p53. Анализ проводили в контрольных клетках и клетках после обработки цисплатином. Также измеряли активности или экспрессию ряда ферментов энергетического метаболизма, зависимого от тиамина. Наряду с повышенной экспрессией p53 и p21 цисплатин влиял на активность метаболических ферментов, для генов которых были предсказаны участки связывания p53. Активность изофермента глутаматдегидрогеназы 2 сильно снижалась, тогда как активность NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ и малик-ферментов, а также 2-оксоглутаратдегидрогеназы с эндогенным уровнем ТДФ повышались. В то же время NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа, митохондриальная аспартатаминотрансфераза и два изофермента малатдегидрогеназы, у которых не было предсказано связывание p53 вблизи участков инициации транскрипции, также увеличивали свою активность после инкубации с цисплатином. Зависимая от p53 регуляция анализируемых метаболических ферментов лучше коррелировала с индукцией мишени p53 – p21, нежели с индукцией самого p53.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: клетки A549, цисплатин, глутатион, p53, p21, сукцинилфосфонат, тиамин-зависимый метаболизм.

DOI: 10.31857/S0320972520070088

ВВЕДЕНИЕ

Связывание p53 с ДНК может напрямую регулировать транскрипцию нескольких сотен

Принятые сокращения: ГДГ – глутаматдегидрогеназа; GOT2 – митохондриальная аспартатаминотрансфераза; GSH – глутатион; GSSG – глутатиондисульфид; ИЦДГ – изоцитратдегидрогеназа; МДГ – малатдегидрогеназа; ОГДК – комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы; СФ – сукцинил фосфонат; ТДФ – тиаминдифосфат.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-130, 24.06.2020.

** Адресат для корреспонденции.

белков, причем этот список расширяется до тысяч белков, регулируемых косвенно [1]. В основном опосредованная p53 активация транскрипции изучалась в отношении мишеней p53, имеющих общее регуляторное значение для судьбы клеток, таких как дестабилизирующий p53 HDM2, контролирующий клеточный цикл p21, регуляторы гибели/выживания клеток PUMA и TIGAR и т.д. Поскольку судьба клетки тесно связана с энергетическим статусом, неудивительно, что p53 также известен как главный регулятор энергетического обмена клетки. Несколько исследований рассматривали прямую активацию или репрессию соответствующих транспортеров и ферментов при индукции p53

[2–5]. При этом список белков-мишеней p53 включает переносчик тиамин (витамина B1) [2], дифосфатное производное которого, тиаминдифосфат (ТДФ), является не только коферментом энергетического метаболизма, но также регулятором связывания p53 с ДНК [6].

Хотя большинство исследований регуляции транскрипции с помощью p53 сфокусировано на онкогенной роли инактивации p53 в раковых клетках, некоторые опухолевые клетки используют систему регуляции, определяемую функционирующим у них p53. К таким клеткам относятся клетки немелкоклеточной аденокарциномы легкого линии A549 [7, 8]. Сигнальный путь p53 связан с изменениями регулируемого тиамином метаболизма опухолевых клеток [9, 10] и их реакцией на цисплатин [8] – наиболее применяемый для лечения рака легких препарат, к которому, однако, у раковых клеток развивается резистентность. Поэтому особый интерес представляет изучение в таких клетках зависящей от p53 и тиамин метаболической регуляции.

База данных DECODE, которая объединяет текстовый анализ данных ChIP-seq от компании SABiosciences и геномные данные из UCSC Genome Browser, обеспечивает предсказания сайтов связывания более чем для 200 транскрипционных факторов. Из них мы сосредоточились на предсказании сайтов связывания p53 в отношении генов, вовлеченных в регулируемый тиамином метаболизм. Целью данного исследования было оценить влияние p53 на зависящую от тиамин метаболическую регуляцию. Предсказание сайтов связывания p53 вблизи генов, кодирующих белки зависящего от тиамин метаболизма, сопоставлялись с результатами биохимического анализа таких белков после активации p53.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформатическая оценка потенциальных сайтов связывания p53 в геномах. Поиск сайтов связывания p53 в непосредственной близости от участков инициации транскрипции проводили аналогично другим исследованиям [11, 12], используя базу данных DECODE (от английского «DECipherment Of DNA Elements»), разработанную принадлежащей QIAGEN компанией SABiosciences, США. Совмещая результаты текстового анализа данных ChIP-seq и геномные данные UCSC Genome Browser, DECODE показывает расположение предсказанных участков связывания вблизи области инициации транскрипции гена для более чем 200 транскрипционных факторов. Для генов человека

мы сравнивали информацию коммерческой базы данных DECODE с данными открытой базы GeneCards (<https://www.genecards.org/>). GeneCards включает наиболее вероятные из указываемых компанией QIAGEN, владеющей базой DECODE, сайты связывания транскрипционных факторов.

Клеточная культура и реагенты. Клеточную линию аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого A549 (ATCC® CCL-185™, «ATCC», США) культивировали в среде DMEM («Thermo Fischer Scientific», США), которая содержала 1 г/литр глюкозы, 1 мМ пируват, 4 мМ GlutaMAX™, 10% FBS («Gibco», США), 100 Ед./мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина («Thermo Fisher Scientific», США), при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Клетки A549 высевали в 6-луночные планшеты по 2 × 10⁵ клеток на каждую лунку. Через 24 ч среду заменяли свежей с добавлением 5 мкМ цисплатина или 4,5 мМ сукцинилфосфоната (СФ). СФ был синтезирован в соответствии с ранее описанной методикой [13]. Его идентичность и чистоту подтверждали ЯМР-спектроскопией. Клетки культивировали в течение 24 ч (приблизительно до 70% плотности покрытия), подвергали лизису и собирали лизаты, как описано ранее [14]. При этом были использованы коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз cOmplete™ («Roche», Швейцария) и PhosSTOP™ («Roche», Швейцария).

Анализ ферментативных активностей. Ферментативные активности анализировали в день приготовления лизатов клеток, как описано ранее [14]. Анализ холофермента комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДК) при эндогенном уровне его кофермента ТДФ проводили, исключив ТДФ из среды измерения активности. Активность изофермента глутаматдегидрогеназы (ГДГ) человека, ГДГ2, анализировали при добавлении 1 мкМ GTP (для ингибирования ГДГ1) и 100 мкМ ADP (для активации GTP-резистентной ГДГ2), учитывая различия регуляторных свойств двух изоферментов [15]. Анализ NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) проводили, как предложено в исследовании Cox и Davies [16], с использованием буфера HEPES. NADP-зависимой ИЦДГ анализировали, как описано в работе Artiukhov et al. [17]. Используемые для измерений реактивы (NAD, NADP, ADP, GTP, NADH, 2-оксоглутарат, DL-изоцитрат, малат, оксалоацетат, CoA и ТДФ) были произведены «Sigma-Aldrich», США.

Ферментативные активности нормализовали на общее содержание белка в лизате, которое определяли с использованием набора для ана-

лиза белка («Bio-Rad», США) в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ p53, p21 и GOT2. Уровни белков p53 и митохондриальной аспартатаминотрансферазы GOT2 определяли методом иммунолоттинга с использованием первичных антител против p53 («Santa Cruz Bio-technology», США) и против GOT2 («Sigma-Aldrich», США). Для нормализации использовали уровни β-актина (антитела «Sigma-Aldrich», США) и VDAC/порина (антитела «Cell Signaling Technology», США) в тех же пробах.

Уровень мРНК p21 (5'-CAGACCAGCAT-GACAGATTC-3', 5'-TTAGGGCTTCCTCTTG-GAGA-3') анализировали с помощью ПЦР в реальном времени («Кара Biosystems», США). Для приготовления РНК использовали мини-набор RNeasy («QIAGEN», Нидерланды). Для нормализации определяемых уровней транскрипции p21 использовали мРНК β-актина и белка S18 в исследуемых пробах.

Анализ глутатиона и его дисульфида. Глутатион (GSH) определяли с использованием 5,5'-ди-тиобис-(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ), как описано в работе Boyko et al. [18]. Дисульфид глутатиона (GSSG) количественно определяли по флуоресценции его продукта с о-фталевым альдегидом по методике Hissin и Hilf [19], оптимизированной Senft et al. [20].

Статистический анализ. Значения представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Независимые эксперименты относятся к различным посевам клеток. Две экспериментальные группы (контроль и опыт) сравнивали с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента с поправкой Холма–Сидака для множественного тестирования. Все данные прошли проверку нормальности с помощью обобщенного теста Д'Агостино. Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism, версии 7.0 («GraphPad Software Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ферменты и транспортеры, связанные с тиамин и его природными производными, перечислены в таблице. В первую очередь таблица включает известные белки, каталитическая активность которых нуждается в основном внутриклеточном производном тиамин — коферменте ТДФ. Кроме того, в таблицу включены ферменты, которые регулируются тиамин и его природными производными аллостерически или конкурентно по отношению к субстратам [21, 22]. Наконец, таблица также включает фер-

менты, наиболее тесно связанные с функцией белков, зависящих от тиамин, а также известные в настоящее время ферменты метаболизма тиамин и транспортеры.

Используя данные DECODE, мы сопоставили наличие участков связывания p53 вблизи точек инициации транскрипции в трех хорошо охарактеризованных геномах млекопитающих: человека, мыши и крысы. Консервативность регуляции того или иного гена млекопитающих p53 определяли по числу предсказаний участков связывания p53 в этих геномах. Сходимость предсказаний в разных геномах считали маркером повышенной вероятности регуляции гена белком p53. Таким образом, общее количество потенциальных сайтов связывания p53 вблизи начальных точек транскрипции в трех геномах млекопитающих (таблица) рассматривалось, как кумулятивный маркер надежности предсказания. Для гетерогенных белковых комплексов, включая регуляторные ферменты, такие как киназы и фосфатазы, сайты связывания p53 суммировались по всем генам, кодирующим компоненты системы. Например, для полиферментного комплекса ОГДК было предсказано, что транскрипция как первого, так и второго компонента комплекса может зависеть от p53 (таблица). Это увеличивает вероятность регуляции белком p53 основной формы этого полиферментного комплекса, включающей продукт гена *OGDH* по сравнению с теми формами, которые содержат изоферменты *OGDH*, кодируемые недавно охарактеризованными генами *OGDHL* и *DHTKD1* [17]. Однако активность комплекса, включающих продукты генов *OGDHL* и *DHTKD1*, может также зависеть от p53 посредством его влияния на транскрипцию второго компонента комплекса, кодируемого геном *DLST*. Предсказанные сайты связывания p53 участками генов, кодирующих ТДФ-зависимые полиферментные комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот (таблица), хорошо соотносятся с существующими данными об индуцированном p53 повышении их транскрипции в химических моделях дефицита тиамин [23].

По сравнению с информацией, полученной нами из DECODE, лучшие находки, указанные в базе GeneCards, обладают меньшей чувствительностью. В частности, они не включают известные прямые мишени p53: SLC19A2 [2], PDK2 и PDK4 [4, 5, 24], у которых, по данным DECODE, предсказано от 2 до 6 сайтов p53 (таблица).

Для проверки биоинформатических данных о регуляции зависящих от тиамин метаболических генов p53 мы использовали цисплатин — хорошо известный активатор p53 в клетках A549 [8].

Предполагаемые участки связывания p53 с ДНК в непосредственной близости от участков инициации транскрипции генов, кодирующих белки зависимого от тиамина метаболизма в геномах человека, мыши и крысы

Группы белков	Гены	Участки связывания p53					
		Человек	Мышь	Крыса	в трех геномах	в расчете на гетерокомплекс	
ТДФ-зависимые ферменты	ОГДК	<i>OGDH*</i> <i>OGDHL</i> <i>DHTKD1</i> <i>DLST</i> <i>DLD</i>	1 0 0 1 0	2 0 0 1 0	0 0 0 1 0	3 0 0 3 0	6 сайтов в 2 каталитических компонентах
	Комплекс пируватдегидрогеназы	<i>PDHA1</i> <i>PDHA2</i> <i>PDHB</i> <i>DLAT</i> <i>PDHX</i> <i>PDK1*</i> <i>PDK2</i> <i>PDK3</i> <i>PDK4</i> <i>PDP1</i> <i>PDP2</i> <i>PDPR</i>	0 0 0 0 0 3 1 0 2 0 1 0	0 0 0 0 1 1 0 0 2 0 Нет рез. Нет рез.	0 0 0 0 0 1 1 0 2 0 1 Нет рез.	0 0 0 0 1 5 2 0 6 0 2 0	16 сайтов в основном в системе фосфорилирования
	ДГРОК	<i>BCKDHA</i> <i>BCKDHB</i> <i>DBT</i> <i>BCKDK</i> <i>PPM1K</i>	1 0 0 3 0	1 0 0 3 0	1 0 0 1 Нет рез.	3 0 0 7 0	10 сайтов в 2 компонентах: каталитическом и регуляторном
	Другие	<i>TKT*</i> <i>TKTL1</i> <i>TKTL2</i> <i>HACL1</i> <i>ILVBL</i>	4 0 0 0 0	1 0 0 0 0	1 Нет рез. Нет рез. Нет рез. Нет рез.	6 0 0 0 0	
	Другие ферменты, вовлеченные в зависимость от тиамина регуляцию метаболизма	Регулируемые тиамином и/или его производными	<i>GLUD1</i> <i>GLUD2*</i> <i>MDH1</i> <i>MDH2</i> <i>PDXK</i> <i>GOT1</i> <i>GOT2</i> <i>GPT*</i> <i>GPT2</i> <i>GLUL</i>	0 1 0 0 1 0 0 12 0 0	0 Нет гена 0 0 0 0 0 5 0 0	0 Нет гена 0 0 1 0 0 5 Нет рез. 0	0 1 0 0 2 0 0 22 0 0
Сопряженные с ТДФ-зависимыми ферментами		<i>IDH1 (NADP)</i> <i>IDH2 (NADP)</i>	1 0	1 0	1 0	3 0	
		<i>IDH3A (NAD)</i> <i>IDH3B (NAD)</i> <i>IDH3G (NAD)</i>	0 1 2	1 0 2	0 1 2	1 2 6	9 сайтов в 3 каталитических компонентах
		<i>ME1* (NADP)</i> <i>ME2 (NAD и NADP)</i> <i>ME3 (NADP)</i>	1 0 0	Нет рез. 0 0	0 Нет рез. Нет рез.	1 0 0	
Белки метаболизма и транспорта тиамина		<i>TPK1*</i> <i>THTPA</i> <i>SLC19A1</i> <i>SLC19A2</i> <i>SLC19A3</i> <i>SLC44A4</i> <i>SLC25A19</i>	1 2 0 2 0 3 0	1 2 0 0 0 4 0	Нет рез. 3 0 0 Нет рез. 4 0	2 7 0 2 0 11 0	

Примечание. Звездочки обозначают сайты p53 по базе GeneCards (<https://www.genecards.org/>). Сходимые предсказания генов с регулируемой p53 транскрипцией выделены жирным шрифтом. Описанные в литературе непосредственные мишени регуляции p53 отмечены серым. ДГРОК – комплекс дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот; рез. – результат.

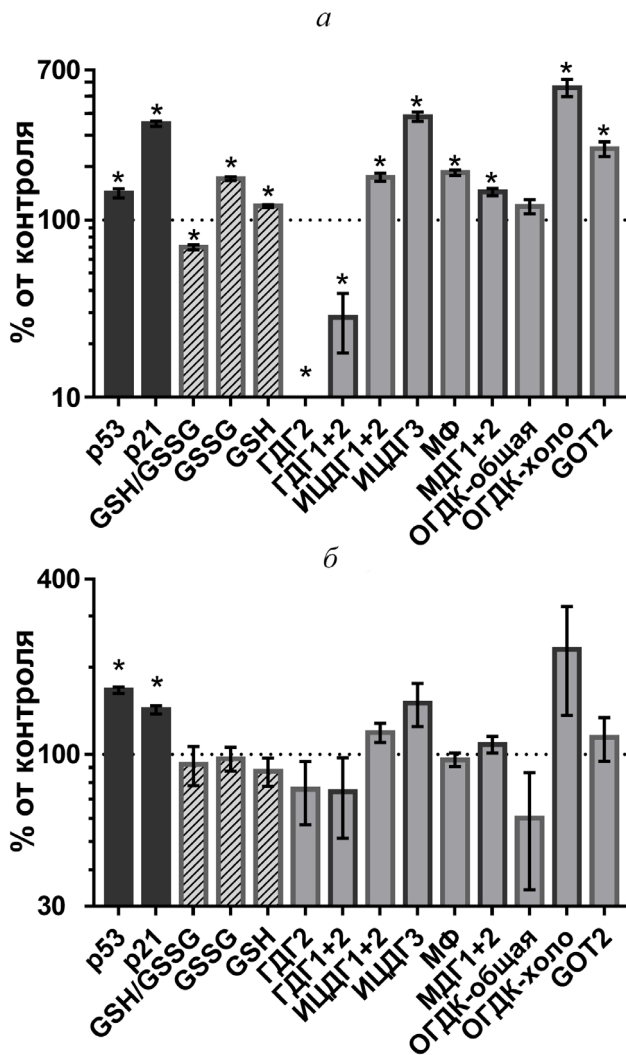


Рис. 1. Изменения уровней p53, p21, клеточного глутатиона и активности/экспрессии ферментов, связанных с зависимым от тиамин метаболизмом, после 24-часовой инкубации с 5 мкМ цисплатином (а) или 4,5 мМ СФ, специфическим ингибитором ОГДК (б); * $p < 0,05$. Сокращения: ГДГ – глутаматдегидрогеназа, ИЦДГ – исоцитратдегидрогеназа, МФ – малик-фермент (все три изофермента), МДГ – малатдегидрогеназа, ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, GOT2 – митохондриальная аспаратаминотрансфераза, GSH – глутатион, GSSG – глутатион дисульфид. Числа обозначают изоферменты в соответствии с таблицей

Действительно, 24 часа инкубации клеток A549 с 5 мкМ цисплатином (IC_{50} для клеток A549 к цисплатину составляет 18 мкМ [25]) повышала экспрессию p53, что приводило к индукции белка p21 (ингибитора циклин-зависимой киназы 1A) – известной мишени p53 (рис. 1, а). В этих условиях окислительно-восстановительный потенциал клеточного глутатиона (GSH/GSSG) снижался, что согласуется с молекулярным механизмом действия цисплатина, который вызывает окислительный стресс и продукцию актив-

ных форм кислорода (АФК) [26]. Тем не менее можно было наблюдать увеличение уровней не только окисленной, но и восстановленной форм глутатиона, хотя содержание последней росло заметно слабее (рис. 1, а). Таким образом, индукция цисплатином p53 вызывала рост биосинтеза глутатиона – известного пути, контролируемого взаимодействием сигнального пути АФК-p53-p21 и пути, регулируемого транскрипционным регулятором Nrf [27]. Биохимический анализ набора ферментов, выбранных из перечисленных в таблице белков, зависимых от тиамин, указывает на метаболические ферменты – мишени такой регуляции.

Как показано на рис. 1, а и 2, цисплатин вызывал значительные изменения в ферментах узла глутамата/2-оксоглутарата и сопряженного с ним метаболизма малата. Цисплатин увеличивал поток субстрата через ОГДК, повышая его насыщение эндогенным коферментом ТДФ, т.е. уровень холо-ОГДК, с $23 \pm 9\%$ до 100% ($p < 0,05$). Ввиду отсутствия увеличения общей активности ОГДК более высокое насыщение фермента эндогенным ТДФ хорошо согласуется с известным, зависимым от p53 увеличением транспорта тиамин [2]. Другие известные мишени транскрипционной регуляции p53 среди метаболических ферментов, такие как NADP-зависимые ИЦДГ и малик-ферменты [28, 29], также были активированы вместе с ростом p53 и p21 (рис. 1, а). В то же время специфический для человека изофермент глутаматдегидрогеназы ГДГ2 (ген *GLUD2*), у которого по биоинформатическому предсказанию имеется сайт связывания p53 (таблица), был сильно подавлен при обработке клеток цисплатином (рис. 1, а). Влияние на общую активность ГДГ было менее выраженным в соответствии с прогнозируемым отсутствием регуляции транскрипции ГДГ1 p53 (таблица). Наряду с 6-кратным увеличением активности холофермента ОГДК ($p < 0,02$) изофермент NADP-зависимая ИЦДГ, предшествующий ОГДК в цикле Кребса и обеспечивающий ОГДК его субстратом 2-оксоглутаратом, продемонстрировал 4-кратное увеличение при индукции p53 цисплатином ($p < 0,01$). Увеличивались и некоторые другие ферменты: МДГ (в 1,4 раза, $p < 0,02$) и GOT2 (в 2,5 раза, $p < 0,01$), которые, согласно предсказанию, не имеют сайтов связывания p53 (таблица). Известно, что изофермент МДГ1 является ко-активатором транскрипционной активности p53 [30, 31]. Однако механизмы наблюдаемой активации этих ферментов требуют дальнейших исследований. Они могут быть непрямыми мишенями p53; либо регулирующие эти гены сайты связывания p53 могут быть расположены на большом расстоянии от

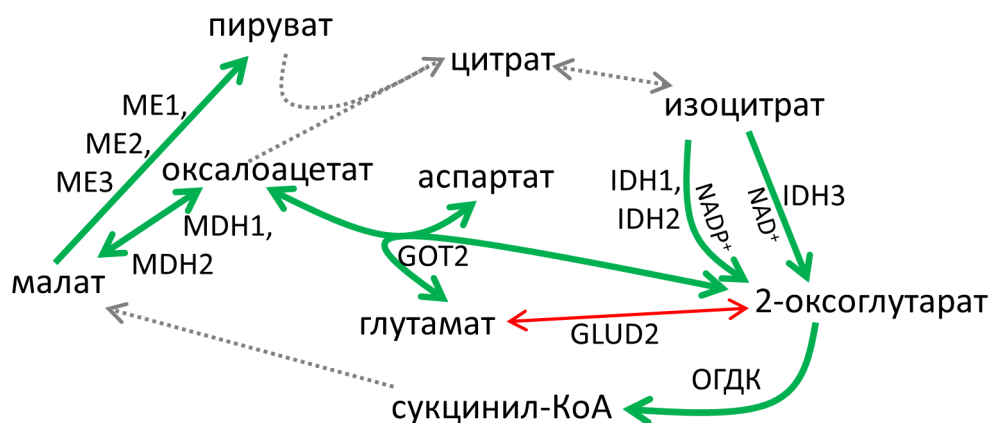


Рис. 2. Схематическое изображение перестройки метаболизма в ответ на активацию p53 цисплатином в клетках A549. Увеличение показано толстыми зелеными стрелками, уменьшение – тонкой красной стрелкой, неизмененные участки метаболизма – серыми пунктирными стрелками. Сокращенные названия ферментов на рисунке указаны в соответствии с идентификаторами в таблице. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

точек инициации транскрипции за счет трехмерной структуры организации хроматина, не учитываемой DECODE (таблица). В целом, наблюдаемые изменения в параметрах метаболизма под действием цисплатина на клетки A549 (рис. 1, а) указывают на то, что транскрипционная активность p53 повышает продукцию и окисление 2-оксоглутарата в цикле Кребса, снижая опосредованное ГДГ2 окисление глутамата. Такие изменения хорошо согласуются с увеличением потока глутамата на биосинтез глутатиона при окислительном стрессе, вызванном цисплатином.

Известно, что в зависимости от сигнала повышенная экспрессия p53 может приводить к различным результатам, и такая комплексная регуляция зависит от посттрансляционных модификаций p53 и его партнеров по связыванию с ДНК [1]. Действительно, по сравнению с действием цисплатина (рис. 1, а) инкубация клеток A549 с 4,5 мМ сукцинилфосфонатом – специфическим ингибитором ОГДК [13] – привела к сходному с индуцируемым цисплатином уровню активации p53, который, однако, способствовал значительно менее выраженной индукции p21 при действии СФ (рис. 1, б). При действии СФ отсутствовали и статистически значимые изменения гомеостаза глутатиона и исследованных ферментов (рис. 1, б). Тем не менее общая картина изменений была сходной при обработке клеток цисплатином (рис. 1, а) и СФ (рис. 1, б). Особенно заметными были увеличение активности холофермента ОГДК и NAD-зависимой ИЦДГ. Так, насыщение ОГДК эндогенным ТДФ увеличивалось после обработки СФ с $23 \pm 9\%$ до 78 ± 16 ($p = 0,06$). Одновременно наблюдали 1,5-кратное увеличение

NAD-зависимой ИЦДГ (рис. 1, б), хотя данное изменение и не достигло статистической значимости. Таким образом, подобно цисплатину, СФ повышал уровень p53 с последующим воздействием на уровень холофермента ОГДК, для которого была характерна самая большая амплитуда изменения по сравнению с изменениями других исследованных ферментативных активностей. Полученные данные свидетельствуют о том, что контролируемое p53 увеличение внутриклеточного тиамина за счет усиления регуляции транспортера SLC19A2 [2] является первоочередной защитой при нарушении метаболизма митохондрий путем вызываемого СФ ингибирования ОГДК. Действительно, как было показано ранее, при обработке СФ клеток и при введении его животным происходит увеличение притока тиамина в клетки или ткани [32]. Следует отметить, что цисплатин также известен в качестве ингибитора ОГДК [33].

В целом, охарактеризованные нами изменения метаболических ферментов после активации p53 в клетках A549 с помощью цисплатина (рис. 1 и 2) показывают хорошее соответствие предсказанным с помощью DECODE участкам связывания p53 вблизи генов, кодирующих данные ферменты и тиаминовые транспортеры (таблица). Таким образом, анализ геномов средствами биоинформатики является ценным инструментом для планирования и интерпретации сложных биологических экспериментов. Наши данные об участии p53 в регуляции зависимо от тиамина метаболизма в клетках A549, подвергшихся воздействию цисплатина, дают представление о метаболических особенностях этих раковых клеток и молекулярных механизмах действия цисплатина, который является наи-

более широко применяемым лекарством при раке легкого.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке шведского Ракового фонда (грант № CAN 2016/1342-1345 Анне Карлссон) и Российского научного фонда (грант № 18-14-00116 Виктории И. Буник).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Все международные, национальные и институциональные принципы проведения экспериментов были соблюдены. В частности, эксперименты с культурой клеток, представленные в этом исследовании, были проведены в Каролинском институте и одобрены местной комиссией по этике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Beckerman, R., and Prives, C. (2010) Transcriptional regulation by p53, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a000935, doi: 10.1101/cshperspect.a000935.
- Lo, P. K., Chen, J. Y., Tang, P. P., Lin, J., Lin, C. H., Su, L. T., Wu, C. H., Chen, T. L., Yang, Y., and Wang, F. F. (2001) Identification of a mouse thiamine transporter gene as a direct transcriptional target for p53, *J. Biol. Chem.*, **276**, 37186-37193, doi: 10.1074/jbc.M104701200.
- Itahana, Y., and Itahana, K. (2018) Emerging roles of p53 family members in glucose metabolism, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 776, doi: 10.3390/ijms19030776.
- Janky, R., Verfaillie, A., Imrichova, H., Van de Sande, B., Standaert, L., Christiaens, V., Hulselmans, G., Hertens, K., Naval Sanchez, M., Potier, D., Svetlichnyy, D., Kalender Atak, Z., Fiers, M., Marine, J. C., and Aerts, S. (2014) iRegulon: from a gene list to a gene regulatory network using large motif and track collections, *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003731, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003731.
- Wang, B., Niu, D., Lam, T. H., Xiao, Z., and Ren, E. C. (2014) Mapping the p53 transcriptome universe using p53 natural polymorphs, *Cell Death Differ.*, **21**, 521-532, doi: 10.1038/cdd.2013.132.
- McLure, K. G., Takagi, M., and Kastan, M. B. (2004) NAD⁺ modulates p53 DNA binding specificity and function, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 9958-9967, doi: 10.1128/MCB.24.22.9958-9967.2004.
- Breen, L., Heenan, M., Amberger-Murphy, V., and Clynes, M. (2007) Investigation of the role of p53 in chemotherapy resistance of lung cancer cell lines, *Anticancer Res.*, **27**, 1361-1364.
- Guntur, V. P., Waldrep, J. C., Guo, J. J., Selting, K., and Dhand, R. (2010) Increasing p53 protein sensitizes non-small cell lung cancer to paclitaxel and cisplatin *in vitro*, *Anticancer Res.*, **30**, 3557-3564.
- Jonus, H. C., Hanberry, B. S., Khatu, S., Kim, J., Luesch, H., Dang, L. H., Bartlett, M. G., and Zastre, J. A. (2018) The adaptive regulation of thiamine pyrophosphokinase-1 facilitates malignant growth during supplemental thiamine conditions, *Oncotarget*, **9**, 35422-35438, doi: 10.18632/oncotarget.26259.
- Duan, L., Perez, R. E., Chen, L., Blatter, L. A., and Maki, C. G. (2018) p53 promotes AKT and SP1-dependent metabolism through the pentose phosphate pathway that inhibits apoptosis in response to Nutlin-3a, *J. Mol. Cell Biol.*, **10**, 331-340, doi: 10.1093/jmcb/mjx051.
- Ye, L., Gu, L., Caprioli, J., and Piri, N. (2018) RNA-binding protein Rbpms is represented in human retinas by isoforms A and C and its transcriptional regulation involves Sp1-binding site, *Mol. Genet. Genomics*, **293**, 819-830, doi: 10.1007/s00438-018-1423-8.
- Sidibe, A., Ropraz, P., Jemelín, S., Emre, Y., Pointhevin, M., Pocard, M., Bradfield, P. F., and Imhof, B. A. (2018) Angiogenic factor-driven inflammation promotes extravasation of human proangiogenic monocytes to tumours, *Nat. Commun.*, **9**, 355, doi: 10.1038/s41467-017-02610-0.
- Bunik, V. I., Denton, T. T., Xu, H., Thompson, C. M., Cooper, A. J., and Gibson, G. E. (2005) Phosphonate analogues of α -ketoglutarate inhibit the activity of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex isolated from brain and in cultured cells, *Biochemistry*, **44**, 10552-10561, doi: 10.1021/bi0503100.
- Aleshin, V. A., Artiukhov, A. V., Oppermann, H., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., and Bunik, V. I. (2015) Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays, *Cells*, **4**, 427-451, doi: 10.3390/cells4030427.
- Plaitakis, A., Latsoudis, H., and Spanaki, C. (2011) The human GLUD2 glutamate dehydrogenase and its regulation in health and disease, *Neurochem. Int.*, **59**, 495-509, doi: 10.1016/j.neuint.2011.03.015.
- Cox, G. F., and Davies, D. D. (1967) Nicotinamide-adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from pea mitochondria. Purification and properties, *Biochem. J.*, **105**, 729-734, doi: 10.1042/bj1050729.
- Artiukhov, A. V., Grabarska, A., Gumbarewicz, E., Aleshin, V. A., Kahne, T., Obata, T., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., Stepulak, A., Fernie, A. R., and Bunik, V. I. (2020) Synthetic analogues of 2-oxo acids discriminate metabolic contribution of the 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in mammalian cells and tissues, *Sci. Rep.*, **10**, 1886, doi: 10.1038/s41598-020-58701-4.
- Boyko, A., Ksenofontov, A., Ryabov, S., Baratova, L., Graf, A., and Bunik, V. (2017) Delayed influence of spinal cord injury on the amino acids of NO[•] metabolism in rat cerebral cortex is attenuated by thiamine, *Front. Med.*, **4**, 249, doi: 10.3389/fmed.2017.00249.
- Hissin, P. J., and Hilf, R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.*, **74**, 214-226, doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- Senft, A. P., Dalton, T. P., and Shertzer, H. G. (2000) Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde, *Anal. Biochem.*, **280**, 80-86, doi: 10.1006/abio.2000.4498.
- Mkrtychyan, G., Aleshin, V., Parkhomenko, Y., Kaehne, T., Di Salvo, M. L., 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.
- Aleshin, V. A., Mkrtychyan, G. V., and Bunik, V. I. (2019) Mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin: protein targets and medical significance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, doi: 10.1134/S0320972519080013.
- Chorny, S., Parkhomenko, Y., and Chorna, N. (2017) Thiamine antagonists trigger p53-dependent apoptosis in

- differentiated SH-SY5Y cells, *Sci. Rep.*, **7**, 10632, doi: 10.1038/s41598-017-10878-x.
24. Contractor, T., and Harris, C. R. (2012) p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2, *Cancer Res.*, **72**, 560-567, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1215.
 25. Zhou, X., Paredes, J. A., Krishnan, S., Curbo, S., and Karlsson, A. (2015) The mitochondrial carrier SLC25A10 regulates cancer cell growth, *Oncotarget*, **6**, 9271-9283, doi: 10.18632/oncotarget.3375.
 26. Chen, B., Shen, Z., Wu, D., Xie, X., Xu, X., Lv, L., Dai, H., Chen, J., and Gan, X. (2019) Glutathione peroxidase 1 promotes NSCLC resistance to cisplatin via ROS-induced activation of PI3K/AKT pathway, *BioMed Res. Int.*, **2019**, 7640547, doi: 10.1155/2019/7640547.
 27. Jang, D. E., Song, J., Park, J. W., Yoon, S. H., and Bae, Y. S. (2020) Protein kinase CK2 activates Nrf2 via autophagic degradation of Keap1 and activation of AMPK in human cancer cells, *BMB Rep.*, **53**, 272-277.
 28. Kil, I. S., Huh, T. L., Lee, Y. S., Lee, Y. M., and Park, J. W. (2006) Regulation of replicative senescence by NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase, *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 110-119, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.021.
 29. Jiang, P., Du, W., Mancuso, A., Wellen, K. E., and Yang, X. (2013) Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence, *Nature*, **493**, 689-693, doi: 10.1038/nature11776.
 30. Lee, S. M., Dho, S. H., Ju, S. K., Maeng, J. S., Kim, J. Y., and Kwon, K. S. (2012) Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts, *Biogerontology*, **13**, 525-536, doi: 10.1007/s10522-012-9397-0.
 31. Lee, S. M., Kim, J. H., Cho, E. J., and Youn, H. D. (2009) A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress, *Cell Death Differ.*, **16**, 738-748, doi: 10.1038/cdd.2009.5.
 32. Mkrtchyan, G., Graf, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2016) Cellular thiamine status is coupled to function of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase, *Neurochem. Int.*, **101**, 66-75, doi: 10.1016/j.neuint.2016.10.009.
 33. Zhang, L., Cooper, A. J., Krasnikov, B. F., Xu, H., Bubber, P., Pinto, J. T., Gibson, G. E., and Hanigan, M. H. (2006) Cisplatin-induced toxicity is associated with platinum deposition in mouse kidney mitochondria *in vivo* and with selective inactivation of the α -ketoglutarate dehydrogenase complex in LLC-PK1 cells, *Biochemistry*, **45**, 8959-8971, doi: 10.1021/bi060027g.

REGULATION OF MAMMALIAN THIAMINE (VITAMIN B1)-DEPENDENT METABOLISM BY p53*

V. I. Bunik^{1,2,3**}, V. A. Aleshin^{1,2}, X. Zhou⁴, Sh. Krishnan⁴, and A. Karlsson⁴

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: bunik@belozersky.msu.ru*

² *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 119992 Moscow, Russia*

⁴ *Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital, 14186 Stockholm, Sweden*

Received May 25, 2020

Revised June 09, 2020

Accepted June 09, 2020

Transcriptional factor p53 is a master regulator of energy metabolism. Energy metabolism strongly depends on thiamine (vitamin B1) and/or its natural derivatives. Thiamine diphosphate (ThDP), which is a major thiamine derivative, affects p53 binding to DNA. In order to elucidate the mechanism of regulation of thiamine-dependent metabolism by p53, we assessed putative p53-binding sites near transcription starting points in genes coding for transporters and enzymes, whose function is associated with thiamine and/or its derivatives. The predictions were validated by studying cell metabolic response to the p53 inducer cisplatin. Expression of p53 and its known target, p21, has been evaluated in cisplatin-treated and control human lung adenocarcinoma A549 cells that possess functional p53 pathway. We also investigated the activity of enzymes involved in the thiamine-dependent energy metabolism. Along with upregulating the expression of p53 and p21, cisplatin affected the activities of metabolic enzymes, whose genes were predicted as carrying the p53-binding sites. The activity of glutamate dehydrogenase GDH2 isoenzyme strongly decreased, while the activities of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH) and malic enzymes, as well as the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex at its endogenous ThDP level, were elevated. Simultaneously, the activities of NAD⁺-dependent IDH, mitochondrial aspartate aminotransferase, and two malate dehydrogenase isoenzymes, whose genes were not predicted to have the p53-binding sequences near the transcription starting points, were upregulated by cisplatin. The p53-dependent regulation of the assayed metabolic enzymes correlated with induction of p21 by p53 rather than induction of p53 itself.

Keywords: A549 cells, cisplatin, glutathione, p53, p21, succinyl phosphonate, thiamine-dependent metabolism