

## РОЛЬ ГИДРОЛАЗ СЕМЕЙСТВА NUDIX В МЕТАБОЛИЗМЕ NAD И ADP-РИБОЗЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

### Обзор

© 2020 В.А. Куликова<sup>1,2,3\*</sup>, А.А. Никифоров<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет имени Петра Великого, 195251 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: veronika.a.kulikova@gmail.com

<sup>2</sup> ФГБУН Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 29.04.2020

После доработки 21.06.2020

Принята к публикации 22.06.2020

Белки суперсемейства NUDIX гидролазы (NUDT), расщепляющие органические пирофосфаты, найдены во всех классах организмов от архей и бактерий до высших эукариот. У млекопитающих белки данного семейства имеют широкий спектр функций и характеризуются различной субстратной специфичностью и внутриклеточной локализацией. Они контролируют концентрации различных метаболитов в клетке, в том числе ключевых регуляторных молекул, таких как NAD, ADP-рибоза и их производных. В данном обзоре рассмотрена роль белков NUDT в метаболизме NAD и ADP-рибозы в клетках человека и животных.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** NUDIX гидролазы, NAD, ADP-рибоза, метаболизм.

DOI: 10.31857/S0320972520080047

### ВВЕДЕНИЕ

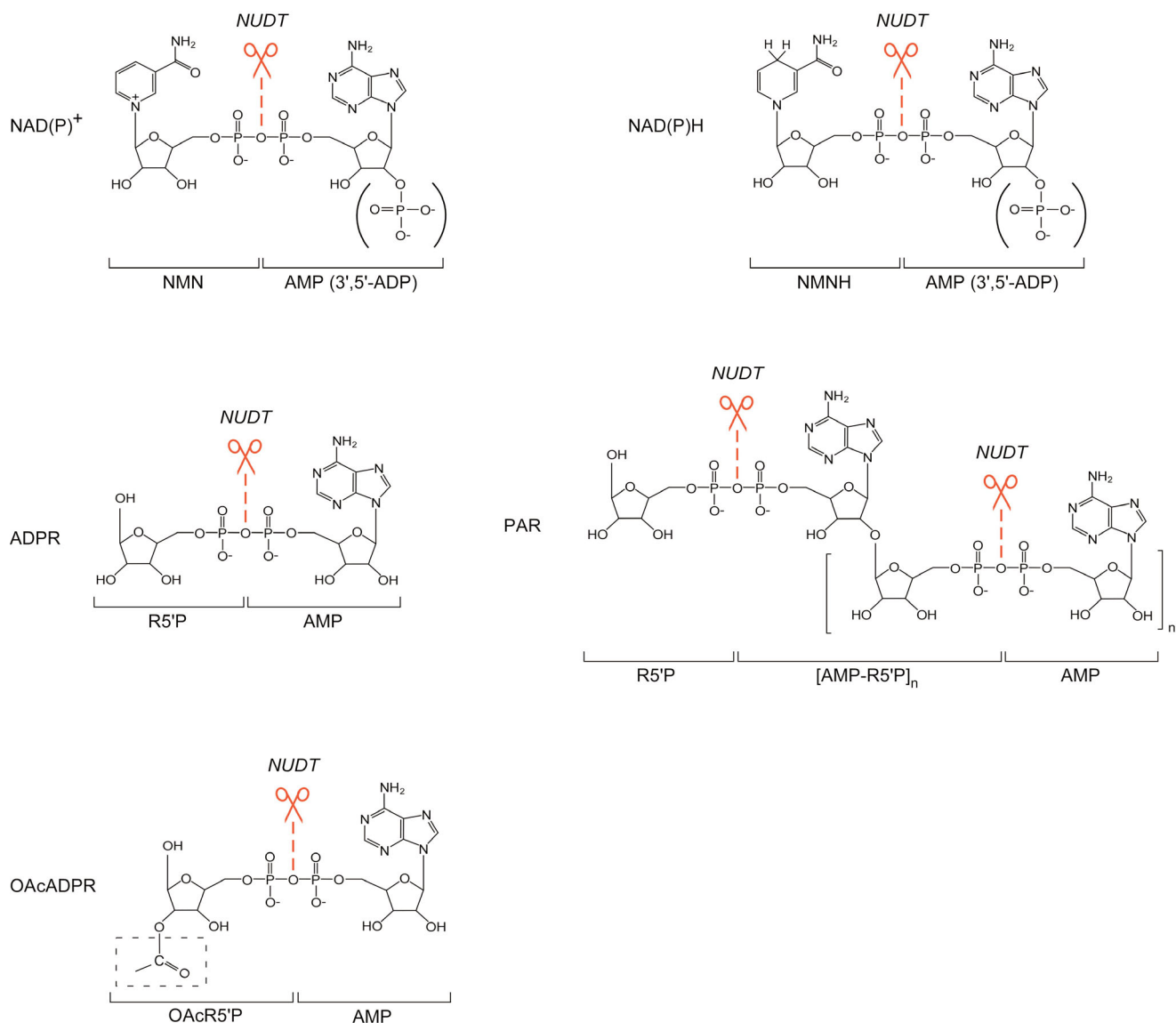
Белки суперсемейства NUDIX гидролазы (NUDT) найдены во всех классах организмов от архей и бактерий до высших эукариот. Данные ферменты расщепляют широкий спектр органических пирофосфатов, преимущественно имею-

щих структуру NDP-X (NDP – нуклеозиддифосфат, X – любое соединение). В результате гидролиза пирофосфатной связи образуется нуклеозидмонофосфат (NMP) и P-X. Субстратами NUDIX гидролазы являются (дезоксид)нуклеозидтрифосфаты, в том числе их окисленные формы, нуклеотидные сахара и спирты, динуклеозидные полифосфаты ( $Np_nN$ ), а также кэп-структуры РНК. Все белки семейства NUDIX имеют консервативный каталитический NUDIX домен (NUDIX box), состоящий из 23 аминокислот  $GX_5EX_5[UA]XREX_2EEXGU$ , где U – алифатическая гидрофобная аминокислота, X – любая аминокислота [1].

К настоящему времени у млекопитающих охарактеризовано 24 гена, кодирующих белки семейства NUDIX гидролазы. Белки данного семейства имеют широкий спектр функций и характеризуются различной субстратной специфичностью и внутриклеточной локализацией. Одни гидролазы расщепляют окисленные нуклеотиды, которые обладают мутагенным потенциалом, другие контролируют внутриклеточные концентрации различных метаболитов, в том числе важнейших регуляторных молекул [1, 2]. Например, цитозольные NUDIX гидролазы млекопитающих (NUDT1, NUDT5 и NUDT15) расщепляют окисленные нуклеотиды и предо-

Принятые сокращения: NUDT – белки суперсемейства NUDIX гидролазы; ADPR – ADP-рибоза (ADP-ribose); OAcADPR – O-ацетил-ADP-рибоза (O-acetyl-ADP-ribose); PARP – семейство белков поли(ADP-рибоза)полимераз (poly(ADP-ribose)polymerase); Nam – никотинамид (nicotinamide); PAR – полимеры ADP-рибозы (poly(ADP-ribose)); ЭР – эндоплазматический ретикулум; PARG – поли-ADP-рибозилгликогидролаза (poly(ADP-ribose) glycohydrolase); ARH – семейство белков ADP-рибозилгидролазы (ADP-ribosylhydrolase); TARG – терминальная ADP-рибозилгидролаза (terminal ADP-ribose protein glycohydrolase); SIRT1-7 – белки семейства сиртуинов; cADPR – циклическая ADP-рибоза (cyclic ADP-ribose); R5'P – рибозо-5'-фосфат (ribose-5'-phosphate); АФК – активные формы кислорода; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase); NMN – никотинамидмононуклеотид (nicotinamide mononucleotide); NMNAT – семейство белков никотинамидмононуклеотидаденилтрансфераз (nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase); ANT – аденин-нуклеотидтранслоказа (adenine nucleotide translocase); AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа (AMP-activated protein kinase); NAD – никотинамидадениндинуклеотид.

\* Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Структуры NAD(P), ADP-рибозы и её производных – субстратов гидролаз семейства NUDIX. NUDIX гидролазы (NUDT) млекопитающих расщепляют NAD(P)<sup>+</sup> на NMN и AMP (3',5'-ADP). NAD(P)H расщепляется на NMNH и AMP (3',5'-ADP). ADP-рибоза (ADPR) расщепляется на рибозо-5'-фосфат (R5'P) и AMP. Полимеры ADP-рибозы (PAR) расщепляются с образованием R5'P, AMP и AMP, соединенного с R5'P (AMP-R5'P). О-ацетил-ADP-рибоза (OAcADPR) расщепляется с образованием О-ацетил-рибозо-5'-фосфата (OAcR5'P) и AMP. (С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>)

тврщают их встраивание в ДНК и РНК, поддерживая стабильность генома и повышая устойчивость клеток к оксидативному стрессу [3–6]. Другие представители семейства NUDIX (белки NUDT20, NUDT16 и NUDT3) убирают 5'-кэп (7-метилгуанозин) с РНК, и таким образом регулируют стабильность мРНК и малых ядерных РНК и контролируют экспрессию генов [7, 8]. Тогда как пероксисомальные белки мыши Nudt7 и Nudt19, а также митохондриальный белок Nudt8 расщепляют кофермент-А (CoA) и его ацильные производные (Ацил-CoA)

с образованием 3',5'-ADP и соответствующих ацильных производных 4'-фосфопантетеина [9–11]. Более того, установлено, что Nudt19 участвует в регуляции уровня CoA в почках, а сверхэкспрессия Nudt7 в печени мышей приводит к уменьшению концентрации короткоцепочечных Ацил-CoA, что коррелирует со значительным снижением уровня желчных кислот и скорости окисления жирных кислот в гепатоцитах [10, 11].

Такие важнейшие низкомолекулярные соединения, как NAD, NADP, ADP-рибоза и

OAcADPR, также являются субстратами гидролаз семейства NUDIX (рис. 1). В данном обзоре рассмотрена роль белков NUDT в метаболизме NAD и ADP-рибозы в клетках человека и животных.

### МЕТАБОЛИЗМ NAD И ADP-РИБОЗЫ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

NAD является коферментом дегидрогеназ, катализирующих окислительно-восстановительные реакции центральных метаболических путей в клетках человека. Ключевые реакции гликолиза, цикла Кребса и  $\beta$ -окисления жирных кислот сопряжены с обратимым переходом NAD из его окисленной формы ( $NAD^+$ ) в восстановленную форму (NADH). NADH является донором электронов для электрон-транспортной цепи, работа которой сопряжена с окислительным фосфорилированием ADP до АТФ. Фосфорилированная форма NAD (NADP) также является жизненно необходимым внутриклеточным метаболитом. Данный динуклеотид существует преимущественно в восстановленной форме (NADPH) и является коферментом реакций в анаболических процессах синтеза жирных кислот и холестерина, а также необходим для защиты клетки от окислительного стресса [12].

В настоящее время известно, что NAD, помимо ключевой роли в энергетическом метаболизме клетки, также играет важнейшую роль в различных регуляторных процессах в клетке [13–15] (рис. 2).  $NAD^+$  используется в качестве субстрата ферментами семейства PARP для внутриклеточного ADP-рибозилирования белков. В результате этой посттрансляционной модификации  $NAD^+$  расщепляется на никотинамид (NAM) и ADP-рибозу, затем одна (моно-ADP-рибозилирование) или несколько (поли-ADP-рибозилирование) молекул ADP-рибозы переносятся на специфические аминокислоты белка-мишени. Семейство PARP включает 17 ферментов, четыре из которых PARP1, PARP2, PARP5a и PARP5b являются поли(ADP-рибоза)полимеразами и могут присоединять к своим мишеням длинные разветвленные цепочки полимеров ADP-рибозы, PAR. Остальные представители семейства PARP являются ADP-рибозилтрансферазами, катализирующими моно-ADP-рибозилирование белков. Поли-ADP-рибозилирование белков является важнейшей регуляторной модификацией и играет ключевую роль в ответе клетки на повреждение ДНК, в регуляции транскрипции, а также в гибели клетки [16, 17]. Также внутриклеточные моно- и поли-ADP-рибозилирование вовлечены в регуляцию

множества других клеточных процессов, таких как поддержание теломера, синтез и процессинг РНК, трансляция, деградация белков, ответ на клеточный стресс, вызванный накоплением в эндоплазматическом ретикулуме несвернутых белков (ЭР-стресс), иммунный ответ, дифференцировка и многие другие [16, 17]. ADP-рибозилирование является обратной модификацией. Поддержание баланса между ADP-рибозилированием белков и отщеплением ADP-рибозы крайне важно для регуляции ответа клетки на различные стрессовые факторы. Например, эффективность ответа клетки на повреждение ДНК зависит от баланса между активностями поли(ADP-рибоза)полимеразы PARP1 и фермента PARG, расщепляющего полимеры ADP-рибозы [16]. Ферменты PARG и ARH3 (ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3) расщепляют O-гликозидную связь в полимерах ADP-рибозы, в то время как оставшуюся молекулу ADP-рибозы, присоединенную к белку, убирают ферменты — MacroD1, MacroD2, гликогидролаза TARG1 (terminal ADP-ribose protein glycohydrolase 1), а также ARH3 и ARH1 [18] (рис. 2). Недавно было показано, что субстратами ферментов семейства PARP являются не только белки, но и нуклеиновые кислоты [19, 20] (рис. 2). Обратимое моно- и поли-ADP-рибозилирование ДНК может играть важную роль в репарации ДНК, а также в защите ДНК от деградации нуклеазами. Также было продемонстрировано, что белки человека PARP10, PARP11 и PARP15 моно-ADP-рибозилируют фосфорилированные концы РНК *in vitro* [21].

Другим семейством  $NAD^+$ -зависимых регуляторных ферментов в клетке является семейство высококонсервативных деацетилаз — сиртуинов [22]. Данные ферменты отщепляют Nam от  $NAD^+$  и переносят ацетильную группу с остатка лизина модифицированного белка на ADP-рибозу, в результате чего образуется OAcADPR [23]. Установлено, что сиртуины деацетилируют широкий спектр белковых субстратов, включая гистоны, регуляторные, структурные и каталитически активные белки, и таким образом участвуют в регуляции транскрипции, репарации, апоптоза, секреции инсулина, работы биологических часов, старения и многих других процессов [22, 24–26]. Образующаяся в результате  $NAD^+$ -зависимого деацетилирования белков OAcADPR может активировать катионные каналы TRPM2 на плазматической мембране [27]. OAcADPR расщепляется до ADP-рибозы белками ARH3, MacroD1 и MacroD2 [28, 29] (рис. 2).

Также  $NAD^+$  является субстратом ADP-рибозилциклаз CD38 и SARM1, которые используют данный динуклеотид для синтеза ADP-рибозы и циклической ADP-рибозы (cADPR),





ADP-рибозы [14, 34, 35]. Нарушение регуляции уровня NAD в клетках и тканях ассоциированы с широким спектром заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, диабет, ожирение, метаболический синдром, рак и многие другие [36]. Основным способом поддержания уровня NAD в клетках человека и животных является его синтез из Nam, который поступает в организм с пищей, а также образуется в результате расщепления NAD<sup>+</sup> в различных регуляторных процессах. Помимо этого, NAD может эффективно синтезироваться из других форм витамина B3, а также образовываться *de novo* из триптофана [35, 37, 38].

### РОЛЬ NUDIX ГИДРОЛАЗ ПРОСТЕЙШИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ NAD И ADP-РИБОЗЫ

В клетках прокариот и простейших эукариот уровень NAD регулируется не только за счет биосинтеза, но также путем ферментативного расщепления данного динуклеотида гидролазами семейства NUDIX [39–42].

NUDIX гидролазы, субстратами которых являются NAD<sup>+</sup>(H), обнаружены во многих классах организмов. Показано, что NUDIX гидролаза *E. coli* YjaD расщепляет NAD<sup>+</sup> и NADH *in vitro*. При этом NADH является в 120 раз более предпочтительным субстратом, чем NAD<sup>+</sup> [39]. Пероксисомальный белок *S. cerevisiae* Npy1p также является NUDIX гидролазой, расщепляющей NAD<sup>+</sup>(H) и NADP<sup>+</sup>(H) *in vitro* [41, 42]. Установлено, что в *A. nidulans* белок NdxA семейства NUDIX гидролаз расщепляет NAD<sup>+</sup> и NADH *in vitro* и *in vivo* и таким образом контролирует уровень внутриклеточного NAD и поддерживает соотношение NAD<sup>+</sup> и NADH, тем самым регулируя важнейшие NAD-зависимые клеточные процессы [40]. NdxA негативно регулирует активность сирутина sirA, который NAD<sup>+</sup>-зависимым образом деацетилюет остаток лизина 16 гистона H4, тем самым регулируя экспрессию генов [40].

NUDIX гидролазы можно разделить на подсемейства, характеризующиеся гомологичными последовательностями аминокислот, которые определяют специфичность гидролаз к различным субстратам. У всех описанных NAD<sup>+</sup>(H) гидролаз из разных организмов была выявлена последовательность SQPWPFPXS со стороны C-конца от NUDIX box [43].

Белки семейства NUDIX, субстратом которых является ADP-рибоза, обнаружены во многих классах организмов, включая *E. coli*, *S. cerevisiae* и млекопитающих. У NUDIX гидролаз, расщепляющих ADP-рибозу, нет общей консер-

вативной последовательности, определяющей их субстратную специфичность. Однако у многих охарактеризованных гидролаз ADP-рибозы семейства NUDIX из разных организмов был выявлен консервативный остаток пролина, находящийся на расстоянии 15–16 аминокислот со стороны C-конца от Nudix box [44, 45].

NUDIX гидролаза Ysa1 дрожжей *S. cerevisiae* локализуется преимущественно в митохондриях и расщепляет ADP-рибозу до AMP и рибозо-5'-фосфата (R5'P) *in vitro* и *in vivo* [46]. Установлено, что белок Ysa1 контролирует уровень ADP-рибозы в клетке, тем самым, влияя на устойчивость клеток к оксидативному стрессу и на уровень эндогенных активных форм кислорода (АФК). Ysa1 повышает уровень АФК в клетке с помощью двух различных механизмов. Показано, что в отсутствие Ysa1 в митохондриях накапливается ADP-рибоза, которая подавляет комплекс I электрон-транспортной цепи, утечка электронов из которого является одним из основных источников образования АФК в клетке [46, 47]. Также было продемонстрировано, что в отсутствие Ysa1 в клетках накапливается ADP-рибоза, которая подавляет гликолиз, ингибируя глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), в результате чего увеличивается окисление глюкозы в пентозофосфатном пути и продукция NADPH. Накопление NADPH приводит к повышению устойчивости клетки к оксидативному стрессу, так как NADPH является коферментом редуктаз, защищающих клетку от АФК [46, 48].

### РОЛЬ NUDIX ГИДРОЛАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ NAD

Среди представителей белков семейства NUDIX у млекопитающих охарактеризовано два белка NUDT12 и NUDT13, последовательности которых наиболее гомологичны последовательностям описанных ранее NAD<sup>+</sup>(H) гидролаз из прокариот и низших эукариот [43, 49].

**NUDT12.** NUDIX гидролаза человека NUDT12 имеет сигнальный пептид PNL на C-конце и локализуется в пероксисомах [43]. Также была показана его цитозольная локализация [2, 50]. Белок NUDT12 был охарактеризован *in vitro* как NAD<sup>+</sup>(H) гидролаза [43]. Показано, что NUDT12 эффективно гидролизует NADH до восстановленной формы NMN (NMNH) и AMP ( $K_m = 11$  мкМ,  $k_{cat} = 11$  с<sup>-1</sup>) и NADPH до NMNH и 2',5'-ADP ( $K_m = 16$  мкМ,  $k_{cat} = 16$  с<sup>-1</sup>) *in vitro*. Менее эффективно белок также гидролизует NAD<sup>+</sup> ( $K_m = 190$  мкМ,  $k_{cat} = 10,5$  с<sup>-1</sup>). Также ме-

нее эффективно белок гидролизует  $\text{Ap}_2\text{A}$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}$  и  $\text{ADP}$ -рибозу. Для гидролазной активности NUDT12 необходимы катионы  $\text{Mn}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$ . Наибольшая активность белка с  $\text{NADH}$  наблюдается при значениях pH от 8,0 до 9,0, при этом NUDT12 сохраняет 50% активности при значениях pH 6,5 и 11,0 [43]. Было продемонстрировано, что у трансгенных мышей с полным отсутствием белка Nudt12 в печени и почках уровень  $\text{NADH}$  (но не  $\text{NAD}^+$ ) в данных тканях значительно повышен [50].

$\text{NAD}$  в пероксисомах используется как кофактор для бета-окисления жирных кислот [51]. Пероксисомальный белок NUDT12 потенциально может участвовать в регуляции уровня  $\text{NAD}$  в органелле, расщепляя его на  $\text{NMN}$  и  $\text{AMP}$  (рис. 3). Было показано, что  $\text{NAD}$  может транспортироваться из цитозоля в пероксисомы с помощью переносчика SLC25A17 [52], тогда как молекулы размером до 300 Да, например,  $\text{AMP}$ , могут входить и выходить из пероксисомы через каналы  $\text{Pxmp}2$  [53–55]. Вероятно,  $\text{NMN}$  тоже может выходить из пероксисомы через данные каналы. Таким образом, расщепление пероксисомального  $\text{NAD}$  на  $\text{NMN}$  и  $\text{AMP}$  гидролазой NUDT12 может быть одним из механизмов регуляции не только пероксисомально, но и цитозольного пула  $\text{NAD}$  [35].

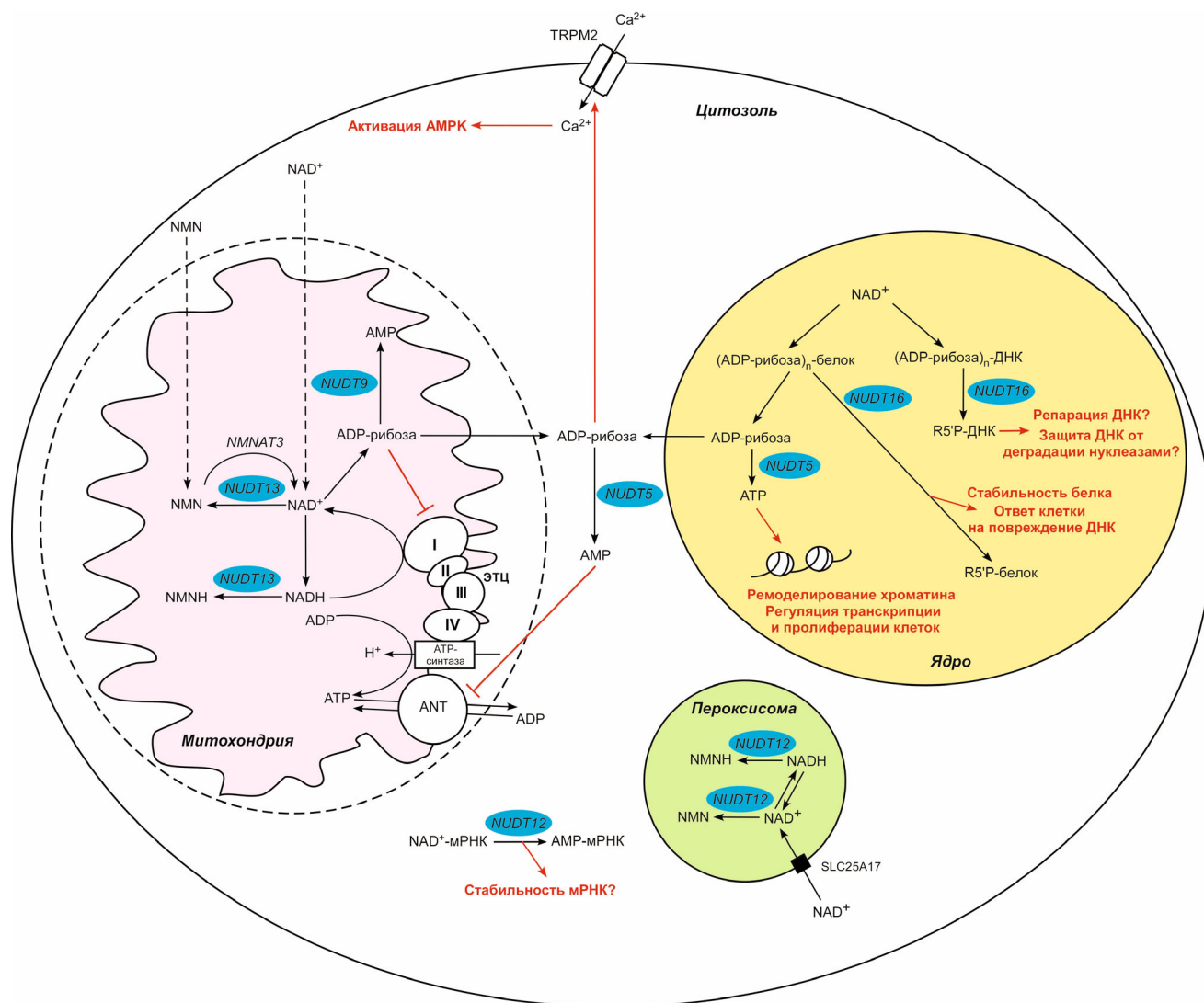
В клетках эукариот в процессе транскрипции РНК подвергается модификации – кэпированию 5'-конца транскрипта 7-метилгуанозинном. Кэпирование защищает 5'-конец РНК от действия рибонуклеаз, участвует в экспорте мРНК из ядра, а также в инициации трансляции [56]. Недавно было показано, что РНК млекопитающих также может быть кэпирована  $\text{NAD}^+$  [33] (рис. 2). РНК, кэпированные  $\text{NAD}^+$  с 5'-конца, не могут эффективно транслироваться, а также менее стабильны, чем молекулы РНК, кэпированные 7-метилгуанозинном, и некэпированные РНК [33]. Белки семейства DXO могут детектировать и убирать  $\text{NAD}^+$ -кэпы с молекул РНК, что приводит к их деградации [33]. Установлено, что NUDIX гидролаза NUDT12 также может убирать  $\text{NAD}^+$ -кэпы с 5'-конца мРНК [50, 57] (рис. 2). Продемонстрировано, что мышинный белок Nudt12 и белок человека NUDT12 могут расщеплять  $\text{NAD}^+$ -кэп молекул РНК *in vitro*. Расщепление происходит по фосфодиэфирной связи, в результате образуется  $\text{NMN}$  и  $\text{AMP}$ , связанный с РНК [50, 57]. Нокаут по NUDT12 в клетках HEK293 приводит к увеличению количества кэпированных  $\text{NAD}^+$  мРНК в 1,5 раза, при этом растет уровень кэпированных  $\text{NAD}^+$  мРНК, кодирующих белки, вовлеченные в энергетический метаболизм клетки, в том числе митохондриальные белки электрон-транспорт-

ной цепи [57]. Таким образом, NUDT12 может играть важную роль в регуляции экспрессии генов на уровне стабильности мРНК, однако на сегодняшний день функциональная роль  $\text{NAD}^+$ -кэпирования молекул РНК у млекопитающих до конца не ясна.

NUDT13. Мышиный белок Nudt13 является еще одной гидролазой млекопитающих, расщепляющей  $\text{NAD}^+(\text{H})$ . Nudt13 локализуется в митохондриях и ядре [2, 49]. Было показано, что Nudt13 эффективно гидролизует  $\text{NADH}$  ( $K_m = 340 \text{ мкМ}$ ,  $k_{\text{cat}} = 7 \text{ с}^{-1}$ ) и  $\text{NADPH in vitro}$  (рис. 2). Менее эффективно белок также расщепляет  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{ADP}$ -рибозу,  $\text{FAD}$  и  $\text{Ap}_2\text{A}$  [49]. Для эффективного катализа Nudt13 необходимы катионы  $\text{Mn}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$  в необычно больших концентрациях (соответственно 2–5 мМ  $\text{Mn}^{2+}$  и 40–100 мМ  $\text{Mg}^{2+}$ ). Наибольшая активность белка наблюдается при pH от 7,8 до 8,2 [49].

В некоторых тканях митохондрии содержат до 70 % клеточного  $\text{NAD}$  [58, 59]. Митохондриальный  $\text{NAD}$  является коферментом таких жизненно необходимых метаболических процессов, как цикл трикарбоновых кислот и окисление жирных кислот, а  $\text{NADH}$  является донором электронов для дыхательной цепи на внутренней мембране митохондрии, который сопряжен с синтезом  $\text{ATP}$  [60].  $\text{NAD}^+$  в митохондрии также является субстратом белков SIRT3, 4 и 5, регулирующих активность ключевых метаболических ферментов [61].

Механизмы регуляции митохондриального пула  $\text{NAD}$  на сегодняшний день до конца не ясны. Вероятнее всего, механизмы поддержания митохондриального пула  $\text{NAD}$  отличаются в разных типах клеток в зависимости от их тканевого происхождения. В одних клетках прямого обмена между митохондриальным и цитоплазматическим пулами  $\text{NAD}$  не происходит [62–64]. Локализация  $\text{NAD}$ -биосинтетического фермента никотинамидмононуклеотидаденилтрансферазы NMNAT3 в митохондриальном матриксе указывает на то, что предшественником митохондриального  $\text{NAD}$  может являться цитозольный  $\text{NMN}$ , который транспортируется в митохондриальный матрикс и используется там для синтеза  $\text{NAD}$  [65]. В других клетках  $\text{NAD}$  напрямую транспортируется через митохондриальную мембрану из цитозоля в митохондриальный матрикс [66]. Подавление экспрессии NMNAT3 приводит к значительному снижению уровня митохондриального  $\text{NAD}$  в клетках HEK293, при этом никак не влияет на уровень митохондриального  $\text{NAD}$  в клетках линии HeLa [67]. Белок NUDT13 потенциально может участвовать в регуляции уровня  $\text{NAD}$  и  $\text{NAD}$ -зависимых процессов в митохондрии, а также



**Рис. 3.** Компартментализация NUDT-зависимого расщепления NAD, ADP-рибозы и их производных. NUDT5 расщепляет ADP-рибозу в цитозоле, тем самым, предотвращая активацию транспорта  $Ca^{2+}$  из внеклеточного пространства через каналы TRPM2 на плазматической мембране и последующую активацию AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK). Расщепление ADP-рибозы в цитозоле белком NUDT5 приводит к накоплению AMP, который ингибирует синтез ATP на внутренней мембране митохондрии, блокируя ANT. Пероксисомальный белок NUDT12 может участвовать в регуляции уровня NAD и NAD-зависимых процессов в пероксисомах, а также контролировать соотношение  $NAD^+/NADH$  в данной органелле путем расщепления пероксисомального  $NAD^+(H)$  на NMN(H) и AMP. Цитозольная форма NUDT12 расщепляет  $NAD^+$  на 5'-конце мРНК и может регулировать стабильность транскриптов. NUDT13 может участвовать в регуляции уровня NAD и NAD-зависимых процессов в митохондрии, а также контролировать соотношение  $NAD^+/NADH$  в данной органелле за счет расщепления митохондриального  $NAD^+(H)$  на NMN(H) и AMP. NUDT9 расщепляет ADP-рибозу в митохондрии, не позволяя ей выходить в цитозоль, и таким образом регулирует импорт  $Ca^{2+}$  из внеклеточного пространства и активность AMPK. NUDT9-зависимое расщепление ADP-рибозы может играть важную роль для энергетического метаболизма клетки, так как свободная ADP-рибоза является ингибитором окисления NADH комплексом I электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). В ядре  $NAD^+$  используется белками семейства PARP для обратимого моно- и поли-ADP-рибозилирования белков и ДНК. NUDT16 расщепляет ADP-рибозу и полимеры ADP-рибозы, присоединенные к белку или ДНК, в результате чего белок или ДНК остаются модифицированы рибозо-5'-фосфатом (R5'P). NUDT16 регулирует стабильность белков в ядре и играет важную роль в ответе клетки на повреждение ДНК. NUDT5 использует ADP-рибозу для синтеза ATP в ядре. NUDT5-зависимое повышение уровня ATP в ядре необходимо для ремоделирования хроматина, регуляции транскрипции и пролиферации клеток

контролировать соотношение  $NAD^+/NADH$  в данной органелле путем расщепления митохондриального  $NAD^+(H)$  на NMN(H) и AMP (рис. 3).

Комплексный сравнительный анализ субстратной специфичности 18 гидролаз человека семейства NUDIX, помимо NUDT12 и NUDT13, выявил еще два белка NUDT5 и

NUDIX гидролазы млекопитающих в метаболизме NAD и ADP-рибозы

Гидролаза семейства NUDIX	Локализация в клетке	Субстраты	Ссылки
mNudt5	ядро, цитозоль	ADPR, OAcADPR	[77]
hNUDT5	ядро, цитозоль	ADPR, NADH, NADPH	[2, 69, 70, 86]
hNUDT9	митохондрии, цитозоль	ADPR, OAcADPR, PAR-белок	[2, 77, 79, 86]
hNUDT12	пероксисомы, цитозоль	NAD <sup>+</sup> (H), NADP <sup>+</sup> (H), ADPR, NAD <sup>+</sup> -PHK	[2, 43, 50]
mNudt12	пероксисомы, цитозоль	NAD <sup>+</sup> -PHK	[57, 68]
mNudt13	митохондрии	NAD <sup>+</sup> (H), NADP <sup>+</sup> (H), ADPR	[49]
hNUDT14	цитозоль	NADH, ADPR	[2, 86]
mNudt16	цитозоль, ядро	NAD <sup>+</sup> , NAD <sup>+</sup> -PHK	[68]
hNUDT16	цитозоль, ядро	ADPR, ADPR-белок, PAR-белок, ADPR-ДНК, PAR-ДНК, ADPR-PHK, NAD <sup>+</sup> -PHK	[19–21, 68, 86–88]

NUDT14, расщепляющих NADH *in vitro* [2]. Также было показано, что мышинный белок Nudt16 расщепляет NAD<sup>+</sup> и NAD<sup>+</sup>-кэп молекул PHK *in vitro* [68] (таблица).

### РОЛЬ NUDIX ГИДРОЛАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В МЕТАБОЛИЗМЕ ADP-РИБОЗЫ

Анализ субстратной специфичности белков семейства NUDIX выявил у млекопитающих несколько ферментов, катализирующих расщепление ADP-рибозы и её производных, таких как полимеры ADP-рибозы и OAcADPR (таблица). Наиболее хорошо охарактеризованы NUDIX гидролазы млекопитающих NUDT5, NUDT9 и NUDT16.

**NUDT5.** Из всех NUDIX гидролаз человека белок NUDT5 имеет наибольшую гомологию с дрожжевым белком Ysa1 (63% идентичных аминокислот) и локализуется в цитозоле и ядре [2, 69, 70]. Показано, что белок NUDT5 расщепляет преимущественно ADP-рибозу ( $K_m = 60$  мкМ,  $V_{max} = 8$  мкмоль·мин<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>). Продуктами расщепления ADP-рибозы являются AMP и рибозо-5'-фосфат. Менее эффективно гидролаза также расщепляет и другие нуклеозид-5'-дифосфосахара, такие как ADP-манноза и ADP-глюкоза, а также динуклеотиды NADH и NADPH. Важно отметить, что cADPR не является субстратом для NUDT5. Для эффективного катализа NUDT5 необходимы катионы Mn<sup>2+</sup> или Mg<sup>2+</sup>. Наибольшая активность белка наблюдается при значениях pH от 7,4 до 9,0 [70].

Было продемонстрировано, что подавление экспрессии NUDT5 в клетках человека линии

U2OS приводит к значительному снижению скорости гидролиза ADP-рибозы в экстрактах клеток по сравнению с контрольными экстрактами [71], тогда как нокдаун NUDT5 в клетках HeLa приводит к накоплению ADP-рибозы, которая активирует каналы TRPM2 на плазматической мембране [72] (рис. 3).

Также показано, что расщепление ADP-рибозы NUDIX гидролазами NUDT5 и NUDT9 приводит к накоплению AMP, который ингибирует синтез ATP на внутренней мембране митохондрии, блокируя адениннуклеотидтранслоказу (ANT) [73] (рис. 3). ANT — белок внутренней мембраны митохондрии, который отвечает за импорт цитозольного ADP в митохондриальный матрикс для последующего фосфорилирования ATP-синтазой и за выход ATP из митохондрии. ANT высокоспецифична по отношению к ADP и ATP [74] и играет важнейшую роль в энергетическом метаболизме клетки. В ответ на повреждение ДНК PARP1 гиперактивируется, в результате чего повышается уровень полимеров ADP-рибозы. PARG расщепляет полимеры ADP-рибозы, а NUDIX гидролазы NUDT5 и NUDT9 расщепляют образовавшиеся молекулы свободной ADP-рибозы, что приводит к накоплению цитозольного AMP, который конкурирует с ADP за связывание с ANT и блокирует транслоказу, таким образом подавляя синтез ATP [73] (рис. 3).

Еще одной потенциальной ролью NUDIX гидролазы NUDT5 является регуляция активности важнейшего энергетического сенсора клетки — AMPK. AMPK активируется в ответ на накопление AMP и подавление синтеза ATP. Главная функция данной серин/треониновой протеинкиназы — поддержание энергетического



баланса в клетке в ответ на различные виды метаболического стресса. АМПК фосфорилирует широкий спектр субстратов, тем самым активируя катаболические пути, в результате которых синтезируется АТФ, и подавляя анаболические пути, в которых АТФ расходуется [75]. АМР аллостерически активирует АМПК: он связывается с её  $\gamma$ -субъединицей, что стимулирует фосфорилирование Thr172  $\alpha$ -субъединицы АМПК [76]. Расщепляя АДФ-рибозу, NUDT5 может контролировать уровень АМР в клетке, и таким образом регулировать активность АМПК.

NUDIX гидролаза мыши Nudt5 эффективно расщепляет пирофосфатную связь в молекуле OAcADPR *in vitro*, в результате чего образуется O-ацетил-рибозо-5'-фосфат и АМР [77] (рис. 1 и 2). NUDT5 может контролировать концентрацию внутриклеточной OAcADPR, которая наряду с ADPR, активирует катионные каналы TRPM2 на плазматической мембране [27]. Таким образом, расщепляя АДФ-рибозу и её ацетилированную производную, NUDT5 может играть важную роль в регуляции  $Ca^{2+}$  сигналинга в клетке, однако экспериментальные подтверждения данной гипотезы еще предстоит получить.

Недавно было показано, что белок NUDT5 обладает не только гидролазной, но и фосфорилазной активностью, катализируя образование АТФ и рибозо-5'-фосфата из АДФ-рибозы и пирофосфата (PPi) *in vitro* [69]. С использованием siRNA к NUDT5 было установлено, что в ответ на обработку раковых клеток T47D прогестинами уровень АТФ в ядре повышается NUDT5-зависимым образом (рис. 3). В частности, было показано, что в ответ на обработку клеток прогестинами активируется PARP1, в результате чего повышается уровень полимеров АДФ-рибозы. PARG расщепляет полимеры АДФ-рибозы, и NUDT5 использует образовавшиеся молекулы АДФ-рибозы для синтеза АТФ. Повышение АТФ в ядре необходимо для прогестин-индуцированного ремоделирования хроматина, регуляции транскрипции и пролиферации клеток [69] (рис. 3). В другой работе было продемонстрировано, что ингибирование NUDT5 в клетках T47D приводит к снижению уровня АТФ в ядре по сравнению с необработанными клетками, а также блокирует прогестин-индуцированное ремоделирование хроматина и экспрессию прогестин-зависимых генов в раковых клетках [71].

Анализ данных базы TGCA (The Cancer Genome Atlas) показал, что уровень мРНК NUDT5 во многих видах опухолей выше, чем в нормальных тканях [78]. Более высокий уровень экспрессии NUDT5 в раковых клетках по

сравнению с нормальными также подтверждается данными иммуногистологического окрашивания образцов опухолей пациентов специфичными антителами к NUDT5 [78]. Кроме того, у пациентов с раком молочной железы, имеющих повышенный уровень экспрессии NUDT5, был более высокий риск рецидивов и метастазирования [69]. Таким образом, повышенный уровень экспрессии NUDT5 является прогностическим маркером более агрессивного фенотипа различных типов опухолей [78]. Было установлено, что NUDT5 повышает агрессивность опухоли через модуляцию экспрессии ряда ключевых онкогенов, таких как убиквитин-специфичная пептидаза 22 (USP22), RAB35B, FOCAD и простагландин Е-синтаза (PTGES) [78]. Также было показано, что раковые клетки с нокдауном по NUDT5 и раковые клетки различных линий, в которых активность NUDT5 подавлена специфичным ингибитором, не могут расти в формате 3D-культур, так как синтез АТФ в ядре белком NUDT5 необходим для регуляции экспрессии генов, участвующих в клеточной адгезии, поддержании раковых стволовых клеток и в эпителиально-мезенхимальном переходе [78].

**NUDT9.** Митохондриальный белок человека NUDT9 является еще одной NUDIX гидролазой высокоспецифичной по отношению к АДФ-рибозе [79] (рис. 2).

Источниками свободной АДФ-рибозы в митохондрии может быть обратимое моно-АДФ-рибозилирование белков ферментом SIRT4 [80, 81], а также неферментативное АДФ-рибозилирование [82, 83]. Кроме того, сиртуины NAD<sup>+</sup>-зависимым образом деацетилируют белки в митохондриальном матриксе с образованием OAcADPR, которая расщепляется ферментом ARH3 до АДФ-рибозы [29] (рис. 2).

В нескольких исследованиях продемонстрировано, что расщепление АДФ-рибозы гидролазой NUDT9 регулирует транспорт  $Ca^{2+}$  из внеклеточного пространства через каналы TRPM2 на плазматической мембране [72, 84] (рис. 3). В ответ на оксидативный стресс в клетке происходит накопление АДФ-рибозы, которая активирует каналы TRPM2. Сверхэкспрессированный в митохондрии клеток HEK293 белок NUDT9 расщепляет АДФ-рибозу, не позволяя ей выходить в цитозоль и активировать транспорт  $Ca^{2+}$  из внеклеточного пространства через каналы TRPM2 [84]. В другой работе было показано, что в условиях гипоксии при подавлении экспрессии NUDT9 в клетках HeLa транспорт  $Ca^{2+}$  через каналы TRPM2 значительно возрастает [72]. Повышение уровня  $Ca^{2+}$  приводит к активации  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимой протеинкиназы

II, которая фосфорилирует и активирует AMPK (рис. 3). Активация AMPK в ответ на подавление NUDT9 приводит к повышению уровня HIF-1 $\alpha$  и к активации экспрессии генов мишенной HIF-1 $\alpha$  [72]. Таким образом, было установлено, что в условиях гипоксии гидролаза NUDT9 негативно регулирует уровень белка HIF-1 $\alpha$  и его функции [72].

Помимо этого, митохондриальный белок NUDT9 может играть важную роль в регуляции энергетического метаболизма клетки, так как свободная ADP-рибоза является ингибитором окисления NADH комплексом I дыхательной цепи в митохондриях [85] (рис. 3).

Помимо свободной ADP-рибозы, субстратами NUDT9 также являются полимеры ADP-рибозы, связанные с белком. Было показано, что при инкубации автомодифицированного белка PARP1 с NUDT9 *in vitro* полимеры ADP-рибозы эффективно расщепляются [86] (рис. 2).

**NUDT16.** NUDIX гидролаза человека NUDT16 расщепляет фосфодиэфирную связь в молекуле ADP-рибозы. Субстратами NUDT16 являются как свободная ADP-рибоза, так и молекулы моно-ADP-рибозы, которыми модифицированы белки, ДНК и РНК. Также NUDT16 расщепляет полимеры ADP-рибозы, которыми модифицированы белки и ДНК [19–21, 86–88] (рис. 2).

Было установлено, что при инкубации автомодифицированного белка PARP1 с NUDT16 *in vitro* полимеры ADP-рибозы эффективно расщепляются, в результате чего молекула белка остается модифицирована рибозо-5'-фосфатом, и образуются AMP и АМР, соединенный с рибозо-5'-фосфатом [86, 87] (рис. 1). Совсем недавно было показано, что NUDIX гидролаза NUDT16 расщепляет полимеры ADP-рибозы, присоединенные к C-концу белка 53BP1, регулируя его стабильность и выживаемость клеток в ответ на повреждение ДНК [88] (рис. 3). Белок 53BP1 играет важную роль в ответе клетки на повреждение ДНК [89]. Поли-ADP-рибозилирование 53BP1 в клетке приводит к его узнаванию E3 убиквитин лигазой RNF146, в результате чего происходит его полиубиквитинилирование и деградация [88]. Было показано, что C-конец белка 53BP1 поли-ADP-рибозилируется *in vitro*, и NUDT16 убирает образовавшиеся полимеры ADP-рибозы. В клетках с нокаутом по NUDT16 уровень белка 53BP1 ниже, а уровень его поли-ADP-рибозилирования в ответ на повреждение ДНК выше, чем в контрольных клетках. Более того, в отсутствие NUDT16 снижается выживаемость клеток после повреждения ДНК [88]. Также было установлено, что NUDT16 расщепляет моно-ADP-рибозу, которой модифицирован белок, в результате чего белок остается модифици-

рован рибозо-5'-фосфатом [86, 87], а также молекулы свободной ADP-рибозы [87] (рис. 2).

Недавно было показано, что субстратами ферментов семейства PARP являются не только белки, но и нуклеиновые кислоты (рис. 2). PARP1 и PARP2 обратимо поли-ADP-рибозилируют фосфорилированные концы одно- и двунитевых ДНК *in vitro* [19]. PARP3 обратимо моно-ADP-рибозилирует преимущественно фосфатные группы на тупых 5'-концах двунитевых ДНК, а так же на 5'-концах одностранных разрывов ДНК *in vitro* [20, 90]. Кроме того, одностранный разрыв ДНК, моно-ADP-рибозилированный белком PARP3, может быть лигирован в отсутствие АТФ с образованием двунитевой ДНК, содержащей неклассический апурин-апириимидиновый сайт (ribo-AP-сайт), который служит субстратом для белков эксцизионной репарации оснований [90]. Ферменты PARG, ARH3, MacroD1, MacroD2 и TARG1 отщепляют ADP-рибозу от ДНК [20] (рис. 2). Обратимое моно- и поли-ADP-рибозилирование ДНК может играть важную роль в репарации ДНК, а также в защите ДНК от деградации нуклеазами. Было показано, что NUDT16 расщепляет моно-ADP-рибозу и полимеры ADP-рибозы, присоединенные к ДНК *in vitro*, в результате чего ДНК остается модифицирована рибозо-5'-фосфатом [19, 20] (рис. 2). Таким образом, NUDIX гидролаза NUDT16 может играть роль в ответе клетки на повреждение ДНК, регулируя ADP-рибозилирование ДНК (рис. 3).

Помимо этого, было продемонстрировано, что белки человека PARP10, PARP11 и PARP15 моно-ADP-рибозилируют фосфорилированные концы РНК *in vitro* [21]. Ферменты PARG, ARH3, MacroD1, MacroD2 и TARG1 отщепляют ADP-рибозу от РНК, в то время как NUDT16 расщепляет фосфодиэфирную связь в молекуле моно-ADP-рибозы, которой модифицирована молекула РНК *in vitro* [21] (рис. 2).

Также совсем недавно было установлено, что белок мыши Nudt16 может расщеплять свободный NAD<sup>+</sup> и NAD<sup>+</sup>-кэп молекул РНК *in vitro* (таблица). Нокаут по NUDT16 в клетках HEK293 приводит к увеличению количества кэпированных NAD<sup>+</sup> РНК в 1,3 раза [68].

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 18-74-00081) и РФФИ (проект 19-34-60039).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McLennan, A. G. (2006) The Nudix hydrolase superfamily, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 123-143, doi: 10.1007/s00018-005-5386-7.
- Carreras-Puigvert, J., Zitnik, M., Jemth, A. S., Carter, M., Unterlass, J. E. et al. (2017) A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family, *Nat. Commun.*, **8**, 1541, doi: 10.1038/s41467-017-01642-w.
- Rai, P., and Sobol, R. W. (2019) Mechanisms of MTH1 inhibition-induced DNA strand breaks: the slippery slope from the oxidized nucleotide pool to genotoxic damage, *DNA Rep.*, **77**, 18-26, doi: 10.1016/j.dnarep.2019.03.001.
- Ishibashi, T., Hayakawa, H., and Sekiguchi, M. (2003) A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides, *EMBO Rep.*, **4**, 479-483, doi: 10.1038/sj.embor.embor838.
- Cai, J. P., Ishibashi, T., Takagi, Y., Hayakawa, H., and Sekiguchi, M. (2003) Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8-oxoguanine nucleotides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 1073-1077, doi: 10.1016/s0006-291x(03)00864-7.
- Ishibashi, T., Hayakawa, H., Ito, R., Miyazawa, M., Yamagata, Y., and Sekiguchi, M. (2005) Mammalian enzymes for preventing transcriptional errors caused by oxidative damage, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3779-3784, doi: 10.1093/nar/gki682.
- Grudzien-Nogalska, E., and Kiledjian, M. (2017) New insights into decapping enzymes and selective mRNA decay, *Wiley Interdisc. rev. RNA*, **8**, doi: 10.1002/wrna.1379.
- Lu, G., Zhang, J., Li, Y., Li, Z., Zhang, N., Xu, X., Wang, T., Guan, Z., Gao, G. F., and Yan, J. (2011) hNUDT16: a universal decapping enzyme for small nucleolar RNA and cytoplasmic mRNA, *Protein Cell*, **2**, 64-73, doi: 10.1007/s13238-011-1009-2.
- Gasmi, L., and McLennan, A. G. (2001) The mouse Nudt7 gene encodes a peroxisomal nudix hydrolase specific for coenzyme A and its derivatives, *Biochem. J.*, **357**, 33-38, doi: 10.1042/0264-6021:3570033.
- Shumar, S. A., Kerr, E. W., Geldenhuys, W. J., Montgomery, G. E., Fagone, P., Thirawatananond, P., Saavedra, H., Gabelli, S. B., and Leonardi, R. (2018) Nudt19 is a renal CoA diphosphohydrolase with biochemical and regulatory properties that are distinct from the hepatic Nudt7 isoform, *J. Biol. Chem.*, **293**, 4134-4148, doi: 10.1074/jbc.RA117.001358.
- Kerr, E. W., Shumar, S. A., and Leonardi, R. (2019) Nudt8 is a novel CoA diphosphohydrolase that resides in the mitochondria, *FEBS Lett.*, **593**, 1133-1143, doi: 10.1002/1873-3468.13392.
- Ying, W. (2008) NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences, *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 179-206, doi: 10.1089/ars.2007.1672.
- Kulikova, V. A., Gromyko, D. V., and Nikiforov, A. A. (2018) The regulatory role of NAD in human and animal cells, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 800-812, doi: 10.1134/S0006297918070040.
- Stromland, O., Niere, M., Nikiforov, A. A., VanLinden, M. R., Heiland, I., and Ziegler, M. (2019) Keeping the balance in NAD metabolism, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 119-130, doi: 10.1042/BST20180417.
- Yang, Y., and Sauve, A. A. (2016) NAD(+) metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1787-1800, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.014.
- Gupte, R., Liu, Z., and Kraus, W. L. (2017) PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes, *Genes Dev.*, **31**, 101-126, doi: 10.1101/gad.291518.116.
- Cohen, M. S., and Chang, P. (2018) Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, 236-243, doi: 10.1038/nchembio.2568.
- Rack, J. G. M., Palazzo, L., and Ahel, I. (2020) (ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology, *Genes Dev.*, **34**, 263-284, doi: 10.1101/gad.334631.119.
- Talhaoui, I., Lebedeva, N. A., Zarkovic, G., Saint-Pierre, C., Kutuzov, M. M., Sukhanova, M. V., Matkarimov, B. T., Gasparutto, D., Saparbaev, M. K., Lavrik, O. I., and Ishchenko, A. A. (2016) Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments *in vitro*, *Nucl. Acids Res.*, **44**, 9279-9295, doi: 10.1093/nar/gkw675.
- Munnur, D., and Ahel, I. (2017) Reversible mono-ADP-ribosylation of DNA breaks, *FEBS J.*, **284**, 4002-4016, doi: 10.1111/febs.14297.
- Munnur, D., Bartlett, E., Mikolcevic, P., Kirby, I. T., Rack, J. G. M., Mikoc, A., Cohen, M. S., and Ahel, I. (2019) Reversible ADP-ribosylation of RNA, *Nucl. Acids Res.*, **47**, 5658-5669, doi: 10.1093/nar/gkz305.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 225-238, doi: 10.1038/nrm3293.
- Tanner, K. G., Landry, J., Sternglanz, R., and Denu, J. M. (2000) Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14178-14182, doi: 10.1073/pnas.250422697.
- Sassone-Corsi, P. (2016) *The Epigenetic and Metabolic Language of the Circadian Clock*, in *A Time for Metabolism and Hormones* (Sassone-Corsi, P., and Christen, Y. eds.) Cham (CH), pp. 1-11
- Imai, S., and Guarente, L. (2014) NAD<sup>+</sup> and sirtuins in aging and disease, *Trends Cell. Biol.*, **24**, 464-471, doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.002.
- Cao, Y., Jiang, X., Ma, H., Wang, Y., Xue, P., and Liu, Y. (2016) SIRT1 and insulin resistance, *J. Diabetes Complic.*, **30**, 178-183, doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.08.022.
- Grubisha, O., Rafty, L. A., Takanishi, C. L., Xu, X., Tong, L., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., and Denu, J. M. (2006) Metabolite of SIR2 reaction modulates TRPM2 ion channel, *J. Biolog. Chem.*, **281**, 14057-14065, doi: 10.1074/jbc.M513741200.
- Chen, D., Vollmar, M., Rossi, M. N., Phillips, C., Kraehenbuehl, R., Slade, D., Mehrotra, P. V., von Delft, F., Crosthwaite, S. K., Gileadi, O., Denu, J. M., and Ahel, I. (2011) Identification of macrodomain proteins as novel O-acetyl-ADP-ribose deacetylases, *J. Biolog. Chem.*, **286**, 13261-13271, doi: 10.1074/jbc.M110.206771.
- Ono, T., Kasamatsu, A., Oka, S., and Moss, J. (2006) The 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3 hydrolyzes O-acetyl-ADP-ribose, a product of the Sir2 family of acetyl-histone deacetylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16687-16691, doi: 10.1073/pnas.0607911103.
- Lee, H. C., and Zhao, Y. J. (2019) Resolving the topological enigma in Ca<sup>2+</sup> signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP, *J. Biolog. Chem.*, **294**, 19831-19843, doi: 10.1074/jbc.REV119.009635.
- Guse, A. H. (2015) Calcium mobilizing second messengers derived from NAD, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 1132-1137, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.015.
- Sumoza-Toledo, A., and Penner, R. (2011) TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling, *J.*



- Physiol.*, **589**, 1515-1525, doi: 10.1113/jphysiol.2010.201855.
33. Jiao, X., Doamekpor, S. K., Bird, J. G., Nickels, B. E., Tong, L., Hart, R. P., and Kiledjian, M. (2017) 5'-End nicotinamide adenine dinucleotide cap in human cells promotes RNA decay through DXO-mediated deNADding, *Cell*, **168**, 1015-1027, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.019.
  34. Luscher, B., Butepage, M., Ecker, L., Krieg, S., Verheugd, P., and Shilton, B. H. (2018) ADP-ribosylation, a multifaceted posttranslational modification involved in the control of cell physiology in health and disease, *Chem. Rev.*, **118**, 1092-1136, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00122.
  35. Nikiforov, A., Kulikova, V., and Ziegler, M. (2015) The human NAD metabolome: functions, metabolism and compartmentalization, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **50**, 284-297, doi: 10.3109/10409238.2015.1028612.
  36. Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D., and Auwerx, J. (2020) NAD<sup>+</sup> homeostasis in health and disease, *Nat. Metab.*, **2**, doi: 10.1038/s42255-019-0161-5.
  37. Dolle, C., Skoge, R. H., Vanlinden, M. R., and Ziegler, M. (2013) NAD biosynthesis in humans – enzymes, metabolites and therapeutic aspects, *Curr. Top. Med. Chem.*, **13**, 2907-2917, doi: 10.2174/15680266113136660206.
  38. Yang, Y., Zhang, N., Zhang, G., and Sauve, A. A. (2020) NRH salvage and conversion to NAD<sup>+</sup> requires NRH kinase activity by adenosine kinase, *Nat. Metab.*, **2**, 364-379, doi: 10.1038/s42255-020-0194-9.
  39. Frick, D. N., and Bessman, M. J. (1995) Cloning, purification, and properties of a novel NADH pyrophosphatase. Evidence for a nucleotide pyrophosphatase catalytic domain in MutT-like enzymes, *J. Biol. Chem.*, **270**, 1529-1534, doi: 10.1074/jbc.270.4.1529.
  40. Shimizu, M., Masuo, S., Fujita, T., Doi, Y., Kamimura, Y., and Takaya, N. (2012) Hydrolase controls cellular NAD, sirtuin, and secondary metabolites, *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 3743-3755, doi: 10.1128/MCB.00032-12.
  41. Xu, W., Dunn, C. A., and Bessman, M. J. (2000) Cloning and characterization of the NADH pyrophosphatases from *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*, members of a Nudix hydrolase subfamily, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 753-758, doi: 10.1006/bbrc.2000.2999.
  42. AbdelRaheim, S. R., Cartwright, J. L., Gasmí, L., and McLennan, A. G. (2001) The NADH diphosphatase encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* NPY1 Nudix hydrolase gene is located in peroxisomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **388**, 18-24, doi: 10.1006/abbi.2000.2268.
  43. AbdelRaheim, S. R., Spiller, D. G., and McLennan, A. G. (2003) Mammalian NADH diphosphatases of the Nudix family: cloning and characterization of the human peroxisomal NUDT12 protein, *Biochem. J.*, **374**, 329-335, doi: 10.1042/BJ20030441.
  44. Dunn, C. A., O'Handley, S. F., Frick, D. N., and Bessman, M. J. (1999) Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the nudix hydrolases and tentative identification of trgB, a gene associated with tellurite resistance, *J. Biol. Chem.*, **274**, 32318-32324, doi: 10.1074/jbc.274.45.32318.
  45. Lin, S., Gasmí, L., Xie, Y., Ying, K., Gu, S., Wang, Z., Jin, H., Chao, Y., Wu, C., Zhou, Z., Tang, R., Mao, Y., and McLennan, A. G. (2002) Cloning, expression and characterisation of a human Nudix hydrolase specific for adenosine 5'-diphosphoribose (ADP-ribose), *Biochim. Biophys. Acta*, **1594**, 127-135, doi: 10.1016/s0167-4838(01)00296-5.
  46. Tong, L., Lee, S., and Denu, J. M. (2009) Hydrolase regulates NAD<sup>+</sup> metabolites and modulates cellular redox, *J. Biol. Chem.*, **284**, 11256-11266, doi: 10.1074/jbc.M809790200.
  47. Adam-Vizi, V., and Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species, *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 639-645, doi: 10.1016/j.tips.2006.10.005.
  48. Jamieson, D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **14**, 1511-1527, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S.
  49. Abdelraheim, S. R., Spiller, D. G., and McLennan, A. G. (2017) Mouse Nudt13 is a mitochondrial Nudix hydrolase with NAD(P)H pyrophosphohydrolase activity, *Protein J.*, **36**, 425-432, doi: 10.1007/s10930-017-9734-x.
  50. Wu, H., Li, L., Chen, K. M., Homolka, D., Gos, P., Fleury-Olela, F., McCarthy, A. A., and Pillai, R. S. (2019) Decapping enzyme NUDT12 partners with BLMH for cytoplasmic surveillance of NAD-capped RNAs, *Cell Rep.*, **29**, 4422-4434, doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.108.
  51. Wanders, R. J., Waterham, H. R., and Ferdinandusse, S. (2015) Metabolic interplay between peroxisomes and other subcellular organelles including mitochondria and the endoplasmic reticulum, *Front. Cell Dev. Biol.*, **3**, 83, doi: 10.3389/fcell.2015.00083.
  52. Agrimi, G., Russo, A., Scarcia, P., and Palmieri, F. (2012) The human gene SLC25A17 encodes a peroxisomal transporter of coenzyme A, FAD and NAD<sup>+</sup>, *Biochem. J.*, **443**, 241-247, doi: 10.1042/BJ20111420.
  53. Antonenkov, V. D., and Hiltunen, J. K. (2012) Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1374-1386, doi: 10.1016/j.bbadis.2011.12.011.
  54. Antonenkov, V. D., Sormunen, R. T., and Hiltunen, J. K. (2004) The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites *in vitro*, *J. Cell Sci.*, **117**, 5633-5642, doi: 10.1242/jcs.01485.
  55. Rokka, A., Antonenkov, V. D., Soinen, R., Immonen, H. L., Pirila, P. L., Bergmann, U., Sormunen, R. T., Weckstrom, M., Benz, R., and Hiltunen, J. K. (2009) Pmp2 is a channel-forming protein in mammalian peroxisomal membrane, *PLoS One*, **4**, e5090, doi: 10.1371/journal.pone.0005090.
  56. Ramanathan, A., Robb, G. B., and Chan, S. H. (2016) mRNA capping: biological functions and applications, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 7511-7526, doi: 10.1093/nar/gkw551.
  57. Grudzien-Nogalska, E., Wu, Y., Jiao, X., Cui, H., Mateyak, M. K., Hart, R. P., Tong, L., and Kiledjian, M. (2019) Structural and mechanistic basis of mammalian Nudt12 RNA deNADding, *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 575-582, doi: 10.1038/s41589-019-0293-7.
  58. Alano, C. C., Tran, A., Tao, R., Ying, W., Karliner, J. S., and Swanson, R. A. (2007) Differences among cell types in NAD(+) compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 3378-3385, doi: 10.1002/jnr.21479.
  59. Stein, L. R., and Imai, S. (2012) The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria, *Trends Endocrinol. Metab.*, **23**, 420-428, doi: 10.1016/j.tem.2012.06.005.
  60. Wallace, D. C. (2009) Mitochondria, bioenergetics, and the epigenome in eukaryotic and human evolution, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **74**, 383-393, doi: 10.1101/sqb.2009.74.031.
  61. Dolle, C., Rack, J. G., and Ziegler, M. (2013) NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria, *FEBS J.*, **280**, 3530-3541, doi: 10.1111/febs.12304.
  62. Yang, H., Yang, T., Baur, J. A., Perez, E., Matsui, T., Carmona, J. J., Lamming, D. W., Souza-Pinto, N. C., Bohr, V. A., Rosenzweig, A., de Cabo, R., Sauve, A. A., and Sinclair, D. A. (2007) Nutrient-sensitive mitochondri-



- al NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival, *Cell*, **130**, 1095-1107, doi: 10.1016/j.cell.2007.07.035.
63. Pittelli, M., Formentini, L., Faraco, G., Lapucci, A., Rapizzi, E., Cialdai, F., Romano, G., Moneti, G., Moroni, F., and Chiarugi, A. (2010) Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase: cellular bioenergetics reveals a mitochondrial insensitive NAD pool, *J. Biol. Chem.*, **285**, 34106-34114, doi: 10.1074/jbc.M110.136739.
  64. Barile, M., Passarella, S., Danese, G., and Quagliariello, E. (1996) Rat liver mitochondria can synthesize nicotinamide adenine dinucleotide from nicotinamide mononucleotide and ATP via a putative matrix nicotinamide mononucleotide adenyltransferase, *Biochem. Mol. Biol. Intern.*, **38**, 297-306.
  65. Nikiforov, A., Dolle, C., Niere, M., and Ziegler, M. (2011) Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 21767-21778, doi: 10.1074/jbc.M110.213298.
  66. Davila, A., Liu, L., Chellappa, K., Redpath, P., Nakamaru-Ogiso, E., Paoletta, L. M., Zhang, Z., Migaud, M. E., Rabinowitz, J. D., and Baur, J. A. (2018) Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.33246.
  67. Cambronne, X. A., Stewart, M. L., Kim, D., Jones-Brunette, A. M., Morgan, R. K., Farrens, D. L., Cohen, M. S., and Goodman, R. H. (2016) Biosensor reveals multiple sources for mitochondrial NAD(+), *Science*, **352**, 1474-1477, doi: 10.1126/science.aad5168.
  68. Sharma, S., Grudzien-Nogalska, E., Hamilton, K., Jiao, X., Yang, J., Tong, L., and Kiledjian, M. (2020) Mammalian Nudix proteins cleave nucleotide metabolite caps on RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 6788-6798, doi: 10.1093/nar/gkaa402.
  69. Wright, R. H., Lioutas, A., Le Dily, F., Soronellas, D., Pohl, A., Bonet, J., Nacht, A. S., Samino, S., Font-Mateu, J., Vicent, G. P., Wierer, M., Trabado, M. A., Schelhorn, C., Carolis, C., Macias, M. J., Yanes, O., Oliva, B., and Beato, M. (2016) ADP-ribose-derived nuclear ATP synthesis by NUDIX5 is required for chromatin remodeling, *Science*, **352**, 1221-1225, doi: 10.1126/science.aad9335.
  70. Gasmı, L., Cartwright, J. L., and McLennan, A. G. (1999) Cloning, expression and characterization of YSA1H, a human adenosine 5'-diphosphosugar pyrophosphatase possessing a MutT motif, *Biochem. J.*, **344 Pt. 2**, 331-337.
  71. Page, B. D. G., Valerie, N. C. K., Wright, R. H. G., Wallner, O., Isaksson, R., Carter, M., Rudd, S. G., Loseva, O., Jemth, A. S., Almlof, I., Font-Mateu, J., Llona-Minguez, S., Baranczewski, P., Jeppsson, F., Homan, E., Almqvist, H., Axelsson, H., Regmi, S., Gustavsson, A. L., Lundback, T. et al. (2018) Targeted NUDT5 inhibitors block hormone signaling in breast cancer cells, *Nat. Commun.*, **9**, 250, doi: 10.1038/s41467-017-02293-7.
  72. Yoon, B., Yang, E. G., and Kim, S. Y. (2018) The ADP-ribose reactive NUDIX hydrolase isoforms can modulate HIF-1alpha in cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **504**, 321-327, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.08.185.
  73. Formentini, L., Macchiarulo, A., Cipriani, G., Camaioni, E., Rapizzi, E., Pellicciari, R., Moroni, F., and Chiarugi, A. (2009) Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure, *J. Biol. Chem.*, **284**, 17668-17676, doi: 10.1074/jbc.M109.002931.
  74. Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G. J., Brandolin, G., and Pebay-Peyroula, E. (2006) Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 713-741, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142747.
  75. Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 251-262, doi: 10.1038/nrm3311.
  76. Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A., and Hardie, D. G. (2013) AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation, *Cell Metab.*, **18**, 556-566, doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.019.
  77. Rafty, L. A., Schmidt, M. T., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., and Denu, J. M. (2002) Analysis of O-acetyl-ADP-ribose as a target for Nudix ADP-ribose hydrolases, *J. Biol. Chem.*, **277**, 47114-47122, doi: 10.1074/jbc.M208997200.
  78. Pickup, K. E., Pardow, F., Carbonell-Caballero, J., Lioutas, A., Villanueva-Canas, J. L., Wright, R. H. G., and Beato, M. (2019) Expression of oncogenic drivers in 3D cell culture depends on nuclear ATP synthesis by NUDT5, *Cancers*, **11**, doi: 10.3390/cancers11091337.
  79. Perraud, A. L., Shen, B., Dunn, C. A., Rippe, K., Smith, M. K., Bessman, M. J., Stoddard, B. L., and Scharenberg, A. M. (2003) NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 1794-1801, doi: 10.1074/jbc.M205601200.
  80. Ahuja, N., Schwer, B., Carobbio, S., Waltregny, D., North, B. J., Castronovo, V., Maechler, P., and Verdin, E. (2007) Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **282**, 33583-33592, doi: 10.1074/jbc.M705488200.
  81. Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Karow, M., Blander, G., Wolberger, C., Prolla, T. A., Weindruch, R., Alt, F. W., and Guarente, L. (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells, *Cell*, **126**, 941-954, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.057.
  82. Zhang, J., Zhang, J., Benovic, J. L., Sugai, M., Wetzker, R., Gout, I., and Rittenhouse, S. E. (1995) Sequestration of a G-protein beta gamma subunit or ADP-ribosylation of Rho can inhibit thrombin-induced activation of platelet phosphoinositide 3-kinases, *J. Biol. Chem.*, **270**, 6589-6594, doi: 10.1074/jbc.270.12.6589.
  83. Jacobson, E. L., Cervantes-Laurean, D., and Jacobson, M. K. (1997) ADP-ribose in glycation and glycooxidation reactions, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **419**, 371-379, doi: 10.1007/978-1-4419-8632-0\_49.
  84. Perraud, A. L., Takahashi, C. L., Shen, B., Kang, S., Smith, M. K., Schmitz, C., Knowles, H. M., Ferraris, D., Li, W., Zhang, J., Stoddard, B. L., and Scharenberg, A. M. (2005) Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels, *J. Biol. Chem.*, **280**, 6138-6148, doi: 10.1074/jbc.M411446200.
  85. Zharova, T. V., and Vinogradov, A. D. (1997) A competitive inhibition of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) by ADP-ribose, *Biochim. Biophys. Acta*, **1320**, 256-264, doi: 10.1016/s0005-2728(97)00029-7.
  86. Palazzo, L., Thomas, B., Jemth, A. S., Colby, T., Leidecker, O., Feijs, K. L., Zaja, R., Loseva, O., Puigvert, J. C., Matic, I., Helleday, T., and Ahel, I. (2015) Processing of protein ADP-ribosylation by Nudix hydrolases, *Biochem. J.*, **468**, 293-301, doi: 10.1042/BJ20141554.
  87. Thirawatananond, P., McPherson, R. L., Malhi, J., Nathan, S., Lambrecht, M. J., Brichacek, M., Hergenrother, P. J., Leung, A. K. L., and Gabelli, S. B. (2019) Structural analyses of NudT16-ADP-ribose complexes direct rational design of mutants with improved processing of poly(ADP-ribosyl)ated proteins, *Sci. Rep.*, **9**, 5940, doi: 10.1038/s41598-019-39491-w.

88. Zhang, F., Lou, L., Peng, B., Song, X., Reizes, O., Almasan, A., and Gong, Z. (2020) Nudix hydrolase NUDT16 regulates 53BP1 protein by reversing 53BP1 ADP-ribosylation, *Cancer Res.*, **80**, 999-1010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2205.
89. Ward, I. M., Minn, K., van Deursen, J., and Chen, J. (2003) p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 2556-2563, doi: 10.1128/mcb.23.7.2556-2563.2003.
90. Belousova, E. A., Kutuzov, M. M., Ivankina, P. A., Ishchenko, A. A., and Lavrik, O. I. (2018) A new DNA break repair pathway involving PARP3 and base excision repair proteins, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **482**, 233-237, doi: 10.1134/S1607672918050010.

## THE ROLE OF NUDIX HYDROLASES IN NAD AND ADP-RIBOSE METABOLISM IN MAMMALS

### Review

V. A. Kulikova<sup>1,2,3\*</sup> and A. A. Nikiforov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 195251 St. Petersburg, Russia;  
E-mail: veronika.a.kulikova@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,  
Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia

Received April 29, 2020

Revised June 21, 2020

Accepted June 22, 2020

Proteins of the NUDIX hydrolase (NUDT) superfamily that cleave organic pyrophosphates are found in all classes of organisms, from archaea and bacteria to higher eukaryotes. In mammals, NUDTs exhibit a wide range of functions and are characterized by different substrate specificity and intracellular localization. They control the concentration of various metabolites in the cell, including key regulatory molecules such as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), ADP-ribose, and their derivatives. In this review, we discuss the role of NUDT proteins in the metabolism of NAD and ADP-ribose in human and animal cells.

**Keywords:** NUDIX hydrolases, NAD, ADP-ribose, metabolism