

DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.14

АНАЛИЗ УРОВНЯ НАД И НАД-ЗАВИСИМОГО ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ МЫШЕЙ

© Л. В. Соловьева,¹ А. В. Панченко,² К. А. Шабалин,³ К. Б. Нериновский,⁴
А. П. Якимов,³ Е. А. Губарева,² М. П. Светлова,¹ О. С. Мудрак,¹
М. А. Ходорковский,⁵ А. А. Никифоров,^{1,5,*} В. А. Куликова^{1,5,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197758,

³ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300,

⁴ С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034,

и ⁵ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251;

* электронный адрес: andrey.nikiforov@gmail.com, veronika.a.kulikova@gmail.com

Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) играет ключевую роль в жизненно необходимых метаболических и регуляторных процессах у млекопитающих. Нарушение регуляции уровня НАД связаны с развитием таких серьезных заболеваний, как пеллагра, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые расстройства, диабет, рак и др. В настоящей работе представлен экспериментальный подход, позволяющий определять количество НАД⁺ в тканях мышечной ткани с помощью спектроскопии ЯМР, а также уровень НАД⁺-зависимого деацетилирования белков в цитозоле и митохондриях.

Ключевые слова: НАД, спектроскопия ЯМР, деацетилирование, иммуноблоттинг

Принятые сокращения: НАД — никотинамидадениндинуклеотид, РН — рибозид никотинамида, СОД2 — супероксиддисмутаза 2, ЯМР — ядерный магнитный резонанс, ДТТ — дитиотреитол, ДСН — додецилсульфат натрия.

Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) является коферментом дегидрогеназ, катализирующих окислительно-восстановительные реакции центральных метаболических путей в клетках человека. Помимо ключевой роли в энергетическом метаболизме клетки НАД также играет важнейшую роль в регуляторных процессах. НАД⁺-зависимое деацетилирование и АДФ-рибозилирование белков участвуют в регуляции жизненно необходимых процессов в клетке, таких как экспрессия генов, правильное прохождение по клеточному циклу, секреция инсулина, репарация ДНК, апоптоз, старение и мн. др. (Nikiforov et al., 2015; Kulikova et al., 2018). Кроме того, из НАД⁺ и его фосфорилированной формы (НАДФ⁺) синтезируются метаболиты, участвующие в мобилизации кальция — АДФ-рибоза, циклическая АДФ-рибоза и динуклеотид никотиновой кислоты и аденина (Fliegert et al., 2007). В результате описанных выше НАД⁺-зависимых процессов динуклеотид расщепляется, так как все они сопряжены с разрывом N-гликозидной связи между никотинамидом и рибозой. Для эффективного осуществления НАД-зависимых метаболических и сигнальных функций

клетке необходимо постоянно поддерживать определенный уровень НАД.

В настоящее время известно, что нарушения регуляции уровня НАД в клетках могут быть связаны с развитием таких серьезных заболеваний, как пеллагра, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые расстройства, диабет и рак (Belenky et al., 2007; Magni et al., 2008; Chiarugi et al., 2012). Кроме того, установлено, что уровень НАД значительно понижается в процессе старения у грызунов и людей (Braidy et al., 2011; Massudi et al., 2012).

Основными предшественниками НАД являются никотинамид и никотиновая кислота, известные как витамин В3, а также рибозиды никотинамида (РН) и никотиновой кислоты (Nikiforov et al., 2015; Kulikova et al., 2018).

В последние годы появилось много данных, свидетельствующих о том, что введение предшественников НАД грызунам увеличивает уровень внутриклеточного НАД в тканях животных и предотвращает развитие различных заболеваний. Например, на модели периферической нейропатии у крыс был показан положительный те-

рапевтический эффект РН (Hamity et al., 2017). Добавление РН в питьевую воду стимулировало регенерацию печени у крыс, подвергшихся частичной гепатэктомии (Mukherjee et al., 2017). Помимо этого, было показано, что добавление РН в пищу предотвращает избыточный набор массы тела у мышей, находящихся на диете с высоким содержанием жиров, и у мышей, страдающих диабетом 2-го типа (Canto et al., 2012; Trammell et al., 2016).

Разработка методов детекции НАД и его основных метаболитов, а также анализа НАД⁺-зависимых процессов, таких как деацетилирование белков сиртуинами, является актуальной задачей современной экспериментальной биомедицины.

В настоящей работе представлен экспериментальный подход, позволяющий определять количество НАД⁺ в тканях мышей с помощью спектроскопии ЯМР, а также уровень НАД⁺-зависимого деацетилирования белков в цитозоле и митохондриях.

Материал и методика

Использованные антитела. Для иммуноблоттинга: кроличьи антитела к α -тубулину (Abcam, Великобритания), мышинные к ацетилированному по Lys-40 α -тубулину (Sigma, США), мышинные к супероксиддисмутазе 2 (СОД2) D10 (Santa Cruz Biotechnology, США), кроличьи к ацетилированному по Lys-68 СОД2 (Abcam, Великобритания) и вторичные кроличьи антитела к IgG мыши и мышинные к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США).

Работа с мышами. Все эксперименты с животными проводили на мышах-самцах с массой тела 22—28 г линии FBV в виварии НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова в соответствии с протоколом, одобренным локальным этическим комитетом (выписка № 2/197 из протокола № 18 ЛЭК) и соответствующим нормам работы с лабораторными животными. Животных содержали в пластиковых клетках типа T2L не более 5 особей в клетке со свободным доступом к воде и корму (ООО Лабораторкорм, Россия), поддерживали световой режим 12 : 12 ч и температуру 18—24 °С. Образцы органов и тканей для исследований брали сразу после выполнения эвтаназии методом цервикальной дислокации. Иссеченные кусочки органов и тканей (головного мозга, сердца, печени, почки и скелетной мышцы массой 30—200 мг) споласкивали в большом объеме физиологического раствора, охлажденного до 4 °С, замораживали в жидком азоте, взвешивали и хранили при –80 °С.

Экстракция метаболитов и белков из тканей животных. Для определения количества НАД⁺ в органах мышей пробирки с замороженными образцами инкубировали на льду в течение 10 мин. Далее в них добавляли 0.7 мл охлажденных стеклянных шариков (диаметр 1.7 мм) и 1 мл 80%-ного метанола, охлажденного до –80 °С, гомогенизировали в криогенных условиях при помощи гомогенизатора FastPrep-24 с адаптером CoolPrep (MP Biomedicals, США), заполненным сухим льдом. Проводили 5 циклов гомогенизации по 60 с со скоростью 6.5 м/с с перерывами по 5 мин, в течение которых пробирки стояли в сухом льду. Далее экстракция продолжалась при перемешивании образцов с помощью ротатора в течение 30 мин при 4 °С. Затем полученные экстракты центрифугировали 30 мин при 15 000 g при 4 °С, после чего надосадочную жидкость хранили при –80 °С. Далее

образцы лиофилизовали и анализировали с помощью ЯМР-спектроскопии.

Для анализа уровня НАД⁺-зависимого деацетилирования белков в органах мышей с помощью иммуноблоттинга в пробирки с замороженными образцами добавляли 0.7 мл стеклянных шариков (диаметр 1.7 мм) и 1 мл буферного раствора RIPA (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % дезоксихолата натрия и 0.1 % DCH), охлажденного до 4 °С, в который предварительно добавляли ингибитор протеаз Complete Mini (Roche, Швейцария), и инкубировали на льду в течение 15 мин. Далее образцы гомогенизировали при помощи гомогенизатора FastPrep-24 с адаптером QuickPrep (MP Biomedicals, США) при 4 °С. Проводили 5 циклов гомогенизации по 40 с со скоростью 5 м/с с перерывами по 5 мин, во время которых пробирки стояли при 4 °С. Далее экстракция продолжалась при перемешивании образцов с помощью ротатора в течение 30 мин при 4 °С. Затем полученные экстракты центрифугировали 30 мин при 15 000 g при 4 °С, после чего надосадочную жидкость хранили при –20 °С.

Определение концентрации белка, электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг. Для определения концентрации белка в экстрактах органов мышей использовали набор реактивов Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) согласно протоколу



Рис. 1. Схема экспериментального подхода для анализа НАД и его метаболитов, а также уровня НАД⁺-зависимого деацетилирования белков в тканях мышей.

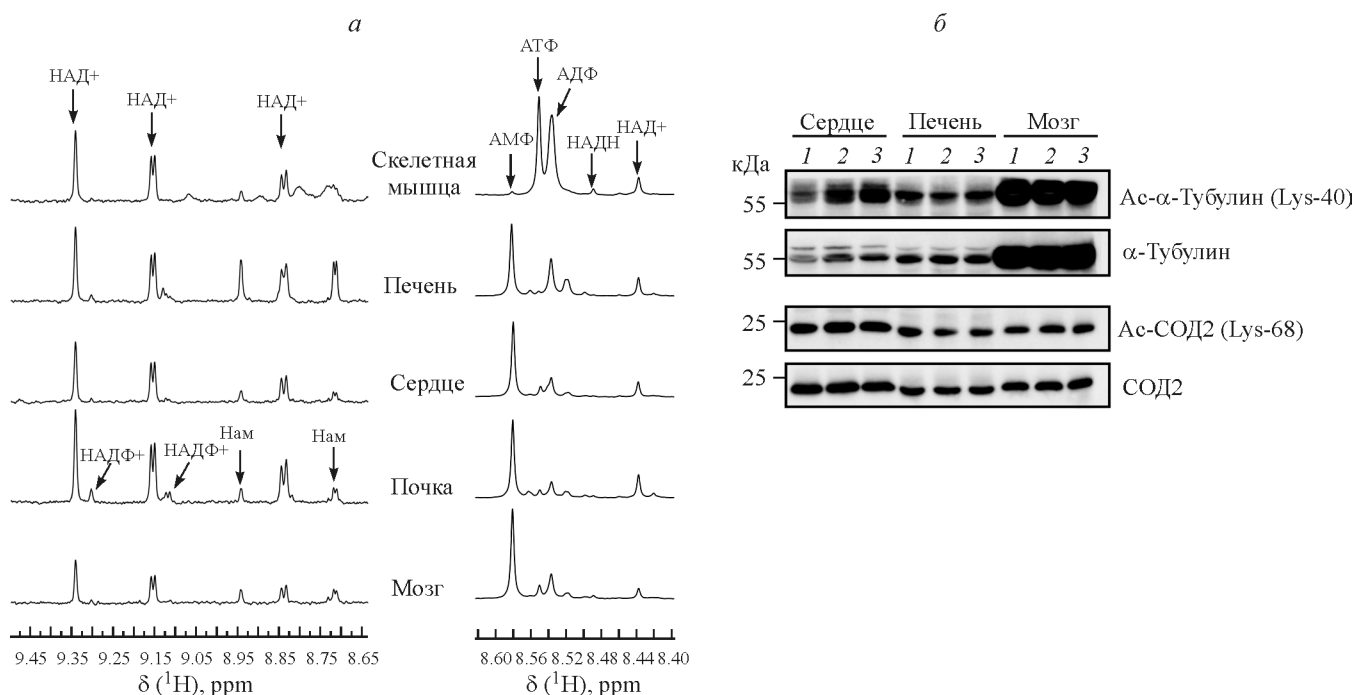


Рис. 2. Анализ НАД и его метаболитов, а также НАД⁺-зависимого деацетилирования белков в тканях мышей.

a — фрагменты ¹H-спектров ЯМР экстрактов, полученных из различных органов мышей; *стрелками* указаны пики, соответствующие НАД⁺, НАДН, НАДФ⁺, никотинамиду (Нам), а также АМФ, АДФ и АТФ. *б* — иммуноблоты образцов сердца, печени и головного мозга трех разных животных (1—3), полученные с использованием антител к белкам α-тубулину и СОД2, а также к их ацетилированным по Lys-40 и Lys-68 формам (Ac-α-Тубулин и Ac-СОД2).

фирмы-производителя. Перед нанесением на гель образцы инкубировали в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 2 % ДСН, 0.01 % бромфенола синего, 10 % глицерина и 100 мМ ДТТ, в течение 10 мин при 95 °С. На дорожку наносили 30 мкг белка. Иммуноблотинг проводили по стандартному протоколу. Для детекции α-тубулина, СОД2 и их ацетилированных форм использовали специфические антитела и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Для детекции сигнала использовали реактивы для усиленной хемилюминесценции SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США).

Спектроскопия ЯМР. Лиофилизированные образцы ресуспендировали в буферном растворе, приготовленном на основе D₂O и содержащем 50 мМ (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄) (pH 6.5) и 1 мМ сахарозы. Стандартные растворы, содержащие 100 мкМ НАД⁺, НАДН, фосфорилированной формы НАД⁺ (НАДФ⁺), никотинамида, АМФ, АДФ и АТФ, были приготовлены с использованием данного буферного раствора. Образцы хранили при –80 °С. Регистрацию ¹H-спектров проводили, как это описано ранее (Kulikova et al., 2015). В качестве стандарта химических сдвигов и концентрации использовался сигнал сахарозы с химическим сдвигом 5.42 ppm. Для каждого из метаболитов были выбраны соответствующие им неперекрывающиеся сигналы протонов (9.34, 9.15, 8.84 и 8.43 ppm для НАД⁺; 8.49 ppm для НАДН; 9.30 и 9.12 ppm для НАДФ⁺; 8.94 и 8.71 ppm для никотинамида; 8.58 ppm для АМФ; 8.535 ppm для АДФ и 8.545 ppm для АТФ), по положению которых проводили идентификацию метаболитов. Концентрацию НАД⁺ в различных органах определяли путем интегрирования сигналов протонов с химическими сдвигами 9.34, 9.15, 8.84 и 8.43 ppm и нормировки полученных значений на

массу образца органа. В результате получали концентрацию НАД⁺ (пмоль/мг) в исходном образце. Данные представлены как средние значения и стандартные ошибки (n = 4).

Результаты и обсуждение

Для анализа НАД и его основных метаболитов в различных органах мышей с помощью спектроскопии ЯМР прежде всего был оптимизирован протокол получения и приготовления образцов. У мышей получали образцы тканей головного мозга, сердца, печени, почки и скелетной мышцы, незамедлительно замораживали, взвешивали и хранили при –80 °С. Далее проводили гомогенизацию образцов при помощи механического измельчения в процессе тряски в присутствии стеклянных шариков и экстракцию метаболитов в 80%-ном метаноле. Процедуру проводили в криогенных условиях, чтобы предотвратить неспецифическое расщепление исследуемых соединений. Полученные экстракты лиофилизовали и анализировали при помощи спектроскопии ЯМР (рис. 1).

На рис. 2, *a* представлены ¹H-спектры ЯМР экстрактов, полученных из скелетной мышцы, печени, сердца, почек и головного мозга мышей. Пики, соответствующие окисленной форме НАД (НАД⁺), находятся в областях спектра, в которых не наблюдается сигналов от других соединений, находящихся в анализируемых экстрактах, что позволяет проводить точную количественную оценку данного динуклеотида. Концентрация НАД⁺ в печени составила 406.6 ± 24.4 пмоль/мг, в сердце — 687 ± 62.5, тогда как в головном мозге — 274 ± 18.4 пмоль/мг. Помимо НАД⁺ данный метод также позволяет анализировать в экстрактах мышечных тканей восстановленную

(НАДН) и фосфорилированную (НАДФ⁺) формы динуклеотида, а также никотинамид и аденозинфосфаты АТФ, АДФ и АМФ. Для каждого из метаболитов (НАДН, НАДФ⁺, никотинамида, АМФ, АДФ и АТФ) были выбраны соответствующие сигналы протонов в области спектра от 8.40 до 9.40 ppm, так как в данной области ¹H-ЯМР спектра не наблюдается сигналов от других химических соединений, содержащихся в экстрактах (рис. 2, а).

Кроме того, в данной работе был апробирован метод оценки НАД⁺-зависимого деацетилирования белков сиртуинами в цитозоле и митохондриях. Сиртуины являются высококонсервативными НАД⁺-зависимыми деацетилазами белков. В клетках человека охарактеризовано семь членов семейства сиртуинов (SIRT1—7), которые различаются по своей внутриклеточной локализации и субстратной специфичности. Их активность зависит от концентрации НАД⁺, поэтому, анализируя степень деацетилирования белков сиртуинами, можно судить об изменениях уровня НАД⁺ в клетке. Для оценки уровня НАД⁺-зависимого деацетилирования белков нами были выбраны следующие известные мишени сиртуинов — α-тубулин, ацетилированный по лизину 40, который деацетируется белком SIRT2 в цитозоле, и СОД2, ацетилированный по лизину 68, который деацетируется белком SIRT3 в митохондриях. Гомогенизацию образцов тканей сердца, печени и головного мозга проводили при помощи механического измельчения в процессе тряски со стеклянными шариками в присутствии детергентов при 4 °С. Экстрагированные белки далее анализировали при помощи иммуноблотинга с использованием специфических антител к α-тубулину и его ацетилированной по Lys-40 форме, а также к белку СОД2 и его ацетилированной по Lys-68 форме (рис. 1). Уровни белка СОД2 и его ацетилированной формы в сердце, печени и мозге были сопоставимы, тогда как уровень экспрессии α-тубулина в мозге был значительно выше, чем в сердце и печени (рис. 2, б). Кроме того, наблюдали повышенный уровень ацетилирования α-тубулина по Lys-40 в сердце по сравнению с печенью и головным мозгом (рис. 2, б).

Данный метод можно использовать для оценки изменения уровня НАД⁺-зависимого деацетилирования белков в цитозоле и митохондриях на мышечных моделях различных заболеваний или у пожилых мышей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10240).

Список литературы

- Belenky P., Bogan K. L., Brenner C. 2007. NAD⁺ metabolism in health and disease. Trends Biochem. Sci. 32 : 12—19.
- Braidy N., Guillemin G. J., Mansour H., Chan-Ling T., Poljak A., Grant R. 2011. Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. PLoS ONE. 6 : e19194.
- Canto C., Houtkooper R. H., Pirinen E., Youn D. Y., Oosterveer M. H., Cen Y., Fernandez-Marcos P. J., Yamamoto H., Andreux P. A., Cettour-Rose P., Gademann K., Rinsch C., Schoonjans K., Sauve A. A., Auwerx J. 2012. The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. Cell Metabolism. 15 : 838—847.
- Chiarugi A., Dolle C., Felici R., Ziegler M. 2012. The NAD metabolome — a key determinant of cancer cell biology. Nature Rev. Cancer. 12 : 741—752.
- Fliegert R., Gasser A., Guse A. H. 2007. Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. Biochem. Soc. 35 : 109—114.
- Hamity M. V., White S. R., Walder R. Y., Schmidt M. S., Brenner C., Hammond D. L. 2017. Nicotinamide riboside, a form of vitamin B3 and NAD⁺ precursor, relieves the nociceptive and aversive dimensions of paclitaxel-induced peripheral neuropathy in female rats. Pain. 158 : 962—972.
- Kulikova V. A., Gromyko D. V., Nikiforov A. A. 2018. The regulatory role of NAD in human and animal cells. Biochemistry (Moscow). 83 : 800—812.
- Kulikova V., Shabalin K., Nerinovski K., Dolle C., Niere M., Yakimov A., Redpath P., Khodorkovskiy M., Migaud M. E., Ziegler M., Nikiforov A. 2015. Generation, release, and uptake of the NAD precursor nicotinic acid riboside by human cells. J. Biol. Chem. 290 : 27 124—27 137.
- Magni G., Orsomando G., Raffelli N., Ruggieri S. 2008. Enzymology of mammalian NAD metabolism in health and disease. Front. Biosci. 13 : 6135—6154.
- Massudi H., Grant R., Braidy N., Guest J., Farnsworth B., Guillemin G. J. 2012. Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. PLoS ONE. 7 : e42357.
- Mukherjee S., Chellappa K., Moffitt A., Ndungu J., Dellinger R. W., Davis J. G., Agarwal B., Baur J. A. 2017. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis promotes liver regeneration. Hepatology. 65 : 616—630.
- Nikiforov A., Kulikova V., Ziegler M. 2015. The human NAD metabolome: functions, metabolism and compartmentalization. Critical Rev. Biochem. Mol. Biol. 50 : 284—297.
- Trammell S. A., Weidemann B. J., Chadda A., Yorek M. S., Holmes A., Coppey L. J., Obrosov A., Kardon R. H., Yorek M. A., Brenner C. 2016. Nicotinamide riboside opposes type 2 diabetes and neuropathy in mice. Sci. Reports. 6 : 26933.

Поступила 14 III 2018

ANALYSIS OF NAD LEVEL AND NAD-DEPENDENT PROTEIN DEACETYLATION
IN MOUSE TISSUES

*L. V. Solovjeva,¹ A. V. Panchenko,² K. A. Shabalin,³ K. B. Nerinovski,⁴ A. P. Yakimov,³
E. A. Gubareva,² M. P. Svetlova,¹ O. S. Mudrak,¹ M. A. Khodorkovskiy,⁵
A. A. Nikiforov,^{1, 5, *} V. A. Kulikova^{1, 5, *}*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

² N. N. Petrov National Medical Research Centre of Oncology, Ministry of Healthcare of Russian Federation,
St. Petersburg, 197758,

³ B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute»,
Gatchina, Leningrad Region, 188300,

⁴ St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, and

⁵ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: andrey.nikiforov@gmail.com, veronika.a.kulikova@gmail.com

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) plays a key role in vital metabolic and regulatory processes in mammals. Violation of the NAD level regulation is associated with such serious diseases as pellagra, neurodegenerative and cardiovascular disorders, diabetes, cancer and others. This paper presents an experimental approach that allows to determine the amount of NAD⁺ in mouse tissues using NMR spectroscopy, as well as the level of NAD⁺-dependent protein deacetylation in the cytosol and mitochondria.

Key words: nicotinamide adenine dinucleotide, NMR spectroscopy, deacetylation, immunoblotting
