

## АЦИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ МОЗГА КРЫСЫ ИЗМЕНЯЕТСЯ ПРИ СПЕЦИФИЧЕСКОМ ИНГИБИРОВАНИИ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *in vivo*

© 2023 В.А. Алешин<sup>1,2</sup>, Д.А. Сибирякина<sup>3</sup>, А.В. Казанцев<sup>1,4</sup>,  
А.В. Граф<sup>1,3</sup>, В.И. Буник<sup>1,2,5\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
119234 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Сеченовский Университет, кафедра биохимии, 119048 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119234 Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
химический факультет, 119234 Москва, Россия

<sup>5</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.11.2022

После доработки 25.11.2022

Принята к публикации 25.11.2022

Адаптация организма к нарушениям обмена веществ требует существования механизмов, связывающих метаболизм с экспрессией генов. В числе таких механизмов в последнее время все чаще рассматривают ацилирование метаболических и гистоновых белков. Мы предположили, что изменение уровня ацилирования белков опосредует адаптационный ответ на ингибирование ключевого метаболического процесса, катализируемого продуцирующим ацетил-КоА комплексом пируватдегидрогеназы (ПДГ). Для проверки этой гипотезы животным интраназально вводили специфические ингибиторы ПДГ: ацетил(метил)фосфинат (АцМеФ) или метиловый эфир ацетилфосфоната (АцФМе) – с последующей оценкой физиологических параметров, ацилирования белков мозга, а также экспрессии и фосфорилирования кодируемой *PDHA* альфа-субъединицы ПДГ ( $\alpha$ -ПДГ). При одинаковой дозе сильный ингибитор АцМеФ, в отличие от менее эффективного АцФМе, уменьшает уровень ацилирования и увеличивает уровень сукцинирования белков головного мозга с кажущейся молекулярной массой 15–20 кДа. Белки 30–50 кДа демонстрируют изменения ацетилирования лишь под влиянием сильного ингибитора АцМеФ, в то время как менее эффективный АцФМе в основном увеличивает уровень их сукцинирования. Отсутствие изменений в сукцинировании белков массой 30–50 кДа после введения АцМеФ совпадает с индукцией этим ингибитором десукцинилазы SIRT5, которая не наблюдается у животных, получавших АцФМе. Экспрессия и фосфорилирование  $\alpha$ -ПДГ в мозге, а также поведение животных и ЭКГ существенно не различаются между исследуемыми группами животных. Полученные результаты указывают на то, что кратковременное ингибирование ПДГ головного мозга влияет на уровень ацетилирования и/или сукцинирования белков головного мозга в зависимости от силы ингибитора, молекулярной массы белка и типа ацилирования. Стабильность физиологических параметров после ингибирования ПДГ свидетельствует в пользу гомеостатического характера этих изменений.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ацетилирование белков мозга, сукцинирование белков мозга, фосфоновые/фосфиновые аналоги пирувата, пируватдегидрогеназа, сиртуин.

DOI: 10.31857/S0320972523010116, EDN: PCTPCD

Принятые сокращения: ПДГ – пируватдегидрогеназа;  $\alpha$ -ПДГ – альфа-субъединица ПДГ; *PDHA* – ген, кодирующий  $\alpha$ -ПДГ; ОГДГ – 2-оксоглутаратдегидрогеназа (альфа-кетоглутаратдегидрогеназа); МДГ – малатдегидрогеназа; интервал R-R – средний интервал между ударами сердца; SD – стандартное отклонение средних значений интервала R-R; dX – диапазон значений интервала R-R; RMSSD – среднеквадратичное значение последовательных различий в интервалах R-R.

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Давно известно, что белковое ацетилирование регулирует организацию хроматина гистонами [1–3] и работу митохондриальных мультиферментных комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот, которые продуцируют ацил-КоА и другие реакционноспособные ацилсодержащие интермедиаты [4, 5]. В последнее время посттрансляционные модификации путем ацилирования остатков лизина привлекают все больше внимания. Значительный интерес в этом плане приобретают как неядерные белки, помимо дегидрогеназ 2-оксокислот, так и  $\text{NAD}^+$ -зависимые сиртуины – так называемые «омолаживающие» факторы, катализирующие деацелирование белков, отличных от гистонов [6–8]. В то же время, наряду с известной митохондриальной локализацией комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот, была выявлена и их ядерная локализация, связанная с участием комплексов в ацилировании гистонов [9–12]. Кроме того, в дополнение к автоацелированию [4, 5] показано участие комплексов дегидрогеназ 2-оксокислот в ацилировании различных метаболических белков [13, 14]. Таким образом, комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот могут поставлять ацильные производные коэнзима А (ацил-КоА) для ацилирования гистоновых и негистоновых белков. Поскольку основная функция комплексов тесно связана с аэробным окислением глюкозы мозга, саморегуляция этого ключевого для метаболизма мозга процесса с помощью ацилирования белков может участвовать в поддержании гомеостаза при нарушениях метаболизма. Действительно, адаптивная роль ацилирования была выявлена в недавнем исследовании вызванного судорогами дисбаланса обмена веществ в мозге на крысиной модели эпилепсии [15].

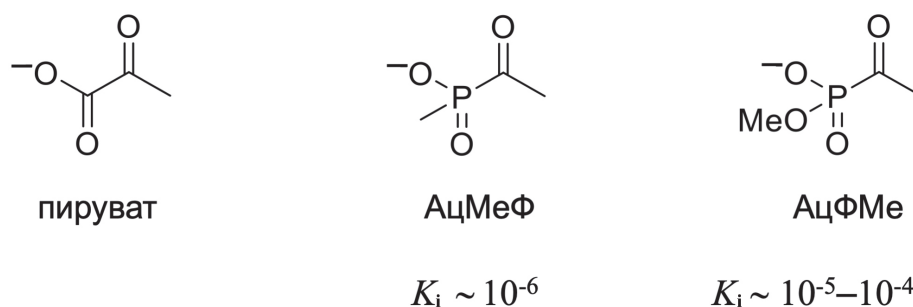
В дополнение к реакциям, катализируемым дегидрогеназами 2-оксокислот, молекулы ацил-КоА могут быть синтезированы и в других метаболических путях, таких как окисление жирных кислот или метаболизм кетоновых тел. В частности, в некоторых экспериментальных системах в ацетилирование гистонов вовлечены ацетат-зависимая ацетил-КоА-синтетаза 2 (ACSS2) или цитрат-зависимая АТФ-цитратлиаза [16, 17]. Поскольку потоки субстратов по генерирующим ацил-КоА путям зависят от тканеспецифичного метаболизма и экспрессии белков, вклад отдельных метаболических путей в ацилирование белков может меняться. В частности, ацетил-КоА, образующийся при окислении жирных кислот в условиях голодания, вызывает чрезмерное

ацетилирование белков печени у мышей [18]. Ацетилирование белков увеличивается и в том случае, если стимулировать окисление жирных кислот в культивируемых фибробластах человека [18]. Однако в этих экспериментальных системах окисление жирных кислот и гипер-ацетилирование белков вызваны направленными изменениями метаболизма. Физиологический уровень ацетилирования белка, как и его изменения в ответ на другие нарушения, вполне может быть обеспечен другими источниками ацетил-КоА, такими как полиферментный комплекс пируватдегидрогеназы (ПДГ).

Ацилирование белков мозга представляет особый интерес в связи с изучением молекулярных механизмов памяти. Ацетилирование гистонов имеет важное значение для формирования памяти, поскольку и обучение, и запоминание требуют ремоделирования хроматина, которое зависит от ацетилирования гистонов [19]. Недавно выявленное снижение уровня сукцинирования митохондриальных белков в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) [20] подтверждает патологическое значение давно известного снижения активности продуцента сукцинил-КоА – комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ) в мозге таких пациентов [21].

Цель нашей работы – охарактеризовать влияние продуцируемого ПДГ ацетил-КоА на ацилирование белков коры головного мозга крысы в модели кратковременной пертурбации метаболизма. Такое нарушение метаболизма может возникнуть под влиянием факторов внешней среды или иных подобных воздействиях, активирующих физиологические механизмы поддержания гомеостаза. В данной работе в качестве такого воздействия использовано кратковременное обратимое ингибирование ПДГ [22–25]. Такая фармакологическая регуляция фермента имеет преимущества перед манипуляциями с экспрессией генов или синтезом белка, поскольку последние могут затрагивать не только конкретную биохимическую реакцию, но и важные для организации биосистем белок-белковые взаимодействия.

Ввиду строгой селективности ингибирующего действия использованных нами фосфонатового и фосфинового аналогов пирувата на ПДГ *in vivo* [22, 23] и значительно более высокой (порядка 100-кратной) ингибирующей способности фосфинатного аналога, по сравнению с фосфонатным [23–25], в нашей работе используются два синтетических аналога пирувата, представленные на рис. 1. Эти аналоги, ацетил(метил)фосфинат (АцМеФ) и метиловый эфир ацетилфосфоната (АцФМе),



**Рис. 1.** Структуры пирувата (2-оксосубстрата ПДГ) и его фосфинатного (АцМеФ) и фосфонатного (АцФМе) аналогов. Константы ингибирования ( $K_i$ ) приведены по опубликованным результатам [23–25]

обладают сходными электростатическими и стерическими свойствами; таким образом, они не должны существенно отличаться по своей биодоступности. Следовательно, введение одной и той же дозы этих разных по силе ингибиторов должно моделировать различный уровень ингибирования ПДГ в головном мозге. Ввиду недавно охарактеризованной взаимозависимости различных типов ацилирования белка из-за перекрывающихся сайтов ацилирования и конкуренции между комплексами ПДГ и ОГДГ за их общий субстрат КоА [15], ингибирование ПДГ может оказывать не только прямое влияние на ацетилирование белков, но и косвенно влиять на другие типы ацилирования. В частности, ингибирование ПДГ может влиять на сукцинирование белков, поскольку существует тесная метаболическая связь между комплексами ПДГ и ОГДГ через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК): комплекс ПДГ поставляет ацетил-КоА в качестве субстрата ЦТК, а комплекс ОГДГ, продуцирующий сукцинил-КоА, лимитирует поток субстратов через ЦТК [25, 26]. Таким образом, в данной работе мы характеризуем ответ мозга на ингибирование ПДГ на уровне как ацетилирования, так и сукцинирования белков.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реагенты.** Натриевые соли АцМеФ и АцФМе синтезированы, как опубликовано ранее [24, 27], и их чистота была подтверждена методом ЯМР. В работе использованы буферы, соли и другие реагенты производства «Merck» (Германия) или наивысшей из доступных степени чистоты. Для приготовления растворов использовали деионизированную (MQ) воду. Используемые антитела указаны ниже в разделе, посвященном Вестерн-блоттингу.

**Лабораторные животные.** Самцы крыс линии Вистар ( $n = 22$ ) приобретены в Государственном исследовательском центре

Российской Федерации Института медико-биологических проблем РАН (ИМБП). В эксперименте использованы крысы в возрасте 11–12 недель (массой  $320 \pm 30$  г). Животных содержали при температуре  $21 \pm 2$  °С и относительной влажности  $53 \pm 5\%$  с 12/12-часовым циклом свет/темнота (свет включается в 9:00 = ZT 0 и выключается в 21:00 = ZT 12). Животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму для грызунов и водопроводной воде. Для содержания животных использованы стандартные клетки Т/4К (555/4К,  $580 \times 375 \times 200$  мм), по 4–5 животных в каждой клетке.

**Введение ингибиторов пируватдегидрогеназы.** Интраназальное введение водного раствора натриевых солей АцФМе или АцМеФ (в дозе 0,1 ммоль/кг) проводили один раз утром в  $10:00 \pm 1$  ч. Интраназальное введение является неинвазивным методом, обеспечивающим прямой (в обход гематоэнцефалического барьера) доступ к центральной нервной системе [28, 29]. Разделение животных на группы, получавшие физиологический раствор (0,9% NaCl;  $n = 6$ ), АцФМе ( $n = 8$ ) или АцМеФ ( $n = 8$ ), является случайным. Через 24 ч после введения ингибиторов проведены физиологические тесты (процедуры описаны ниже) с последующей декапитацией на гильотине («OpenScience», Россия). Декапитация считается одним из наименее стрессовых методов эвтаназии молодых крыс [30–32]. Процедуру проводят в соответствии с рекомендуемыми протоколами [30–32]. После каждого использования гильотина тщательно промывается водой и этанолом, чтобы запах крови не вызывал стресса у экспериментальных крыс. Извлеченный мозг немедленно помещали в лед. Отделяемую в течение 60–90 с после декапитации кору головного мозга замораживали в жидком азоте и хранили при температуре  $-70$  °С до проведения биохимических анализов.

**Поведенческие тесты и ЭКГ.** Оценку поведенческой активности проводили в тесте

«Открытое поле», как описано ранее [33]. Для тестирования использовали круглую полипропиленовую арену («OpenScience», Россия). Поведенческие параметры (время и количество актов груминга, время замираний, количество стоек и количество пересечений любого типа линий) определяли в качестве показателей тревожности, исследовательской и локомоторной активности [34, 35].

ЭКГ с использованием неинвазивных электродов регистрировали у бодрствующих животных в течение 3 мин, как описано ранее [33]. С помощью ЭКГ оценивают следующие параметры: средний интервал между сердечными сокращениями (интервал R-R, мс); стандартное отклонение средних значений интервала R-R (SD, мс); диапазон значений интервала R-R, т.е. разница между максимальными и минимальными значениями (dX, мс); среднеквадратичное значение последовательных отклонений в интервалах R-R (RMSSD, мс) и стресс-индекс (условные единицы).

**Приготовление гомогенатов коры головного мозга крысы.** Гомогенизацию ткани и обработку гомогенатов ультразвуком и детергентами проводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [36].

**Измерения активности ферментов.** Активность малатдегидрогеназы (МДГ) измеряют, как описано ранее [37].

**Анализ уровней и посттрансляционных модификаций белков в коре головного мозга с помощью Вестерн-блоттинга.** Уровни белковой экспрессии SIRT3, SIRT5,  $\alpha$ -ПДГ, фосфорилированной по Ser293  $\alpha$ -ПДГ и ацетилированных белков в коре головного мозга крыс определены методом Вестерн-блоттинга с использованием первичных антител («Cell Signaling Technology», США). Уровень сукцинирования белков определен с использованием антител («PTM Biolabs», США). Все первичные антитела использованы в разведениях 1:2000 с применением вторичных антител к кроличьим антигенам, конъюгированных с HRP («Имтек», Россия). Относительная количественная оценка хемилюминесценции проведена в программе ChemiDoc Imager («Bio-Rad», США) с использованием программного обеспечения Image Lab версии 6.0.1 («Bio-Rad»). Уровни иммунореактивности нормализованы на общий белок в соответствующих полосах геля с использованием количественного определения флуоресценции нанесенного на дорожку геля белка после взаимодействия с 2,2,2-трихлорэтанолом [38]. Общую интенсивность окрашивания определяли как интегральную интенсивность всего трека от конца геля до области

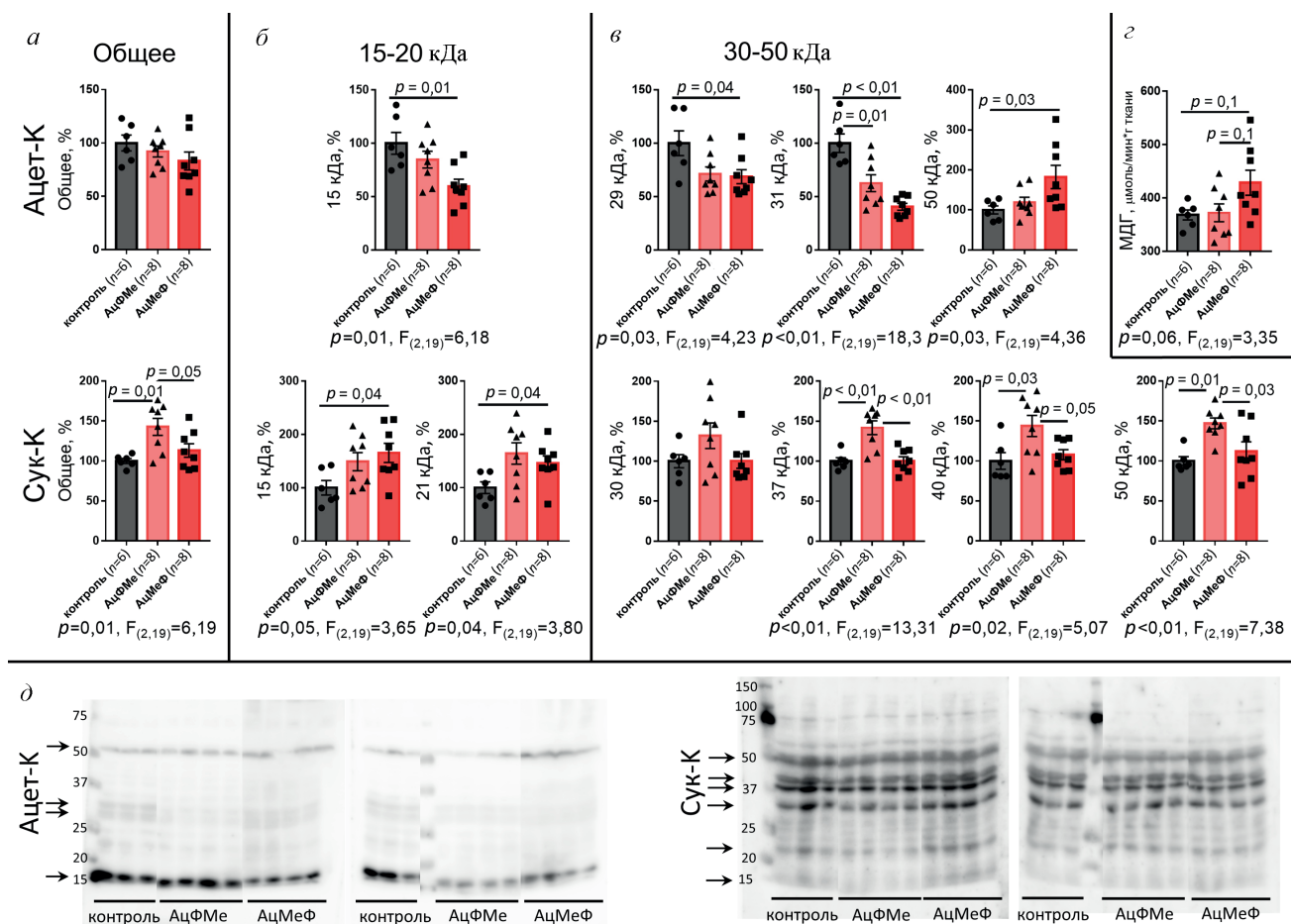
молекулярной массы белков 100 кДа. Полные изображения мембран, окрашенных антителами, и соответствующих гелей, окрашенных 2,2,2-трихлорэтанолом, используемых для нормировки на белок дорожки, приведены на Fig. S1 в Приложении.

**Статистический анализ данных.** Данные проанализированы с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.0 («GraphPad Software Inc.», США). Все данные на графиках показаны в виде столбцов со средними значениями и стандартными ошибками среднего (SEM) с дополнительным приведением индивидуальных значений параметров для каждого животного. Корреляции между параметрами проанализированы с использованием метода Спирмена. Статистическая значимость различий при сравнении трех экспериментальных групп оценена с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием post-hoc-критерия Тьюки. Статистически значимые ( $p \leq 0,05$ ) различия показаны на графиках. Статистическая значимость ( $p \leq 0,05$ ) фактора обработки, согласно ANOVA и F-значения со степенями свободы, показана под графиками как F (DFn, DFd). Во всех этих случаях значения F превышают соответствующие критические значения, подтверждая значимость представленных результатов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**АцМеФ уменьшает уровень ацетилирования основной белковой полосы 15 кДа, оказывая разные эффекты на ацетилирование белков головного мозга 30–50 кДа.** Вестерн-блоттинг с антителами к ацетилированным белкам выявил основную полосу ацетилированных белков головного мозга в области 15 кДа (рис. 2, д). Значительная интенсивность этой полосы и сходство ее кажущейся молекулярной массы с таковой у коровых гистонов [3] позволяют предположить, что полоса содержит гистоновые белки мозга.

Чем сильнее ингибитор ПДГ, тем более выражены его эффекты на ацетилирование белков головного мозга. Действительно, введение АцМеФ ( $K_i \sim 10^{-6}$  М) изменяет уровни ацетилирования во всех четырех количественно охарактеризованных полосах ацетилированных белков, в то время как обработка АцФМе ( $K_i \sim 10^{-5}$ – $10^{-4}$  М) изменяет уровень ацетилирования только белковой полосы 31 кДа (рис. 2, б–в; верхняя часть). Примечательно, что АцМеФ оказывает противоположные эффекты на ацилирование белков с разными молекулярными массами. Так, аце-



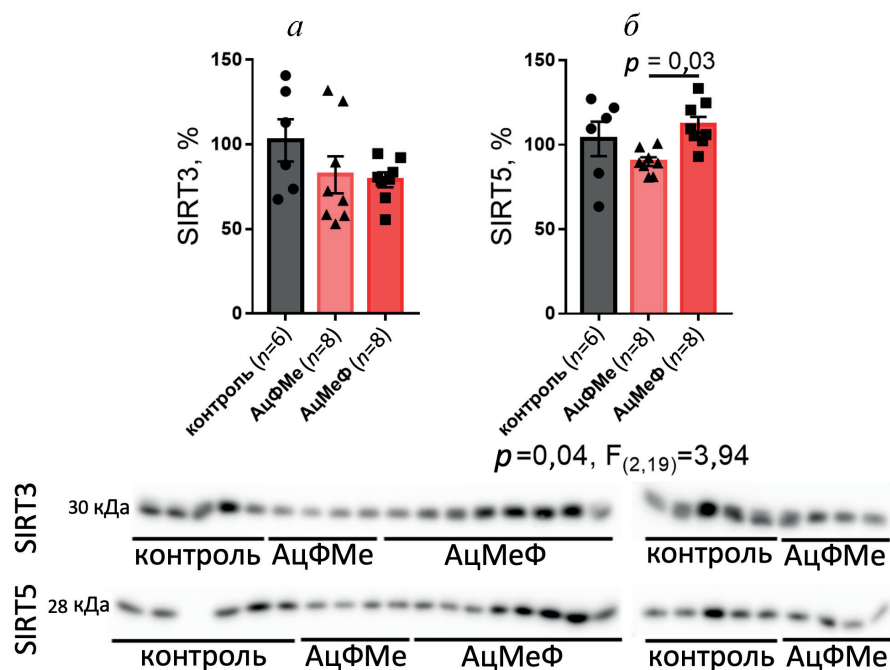
**Рис. 2.** Ацилирование белков в гомогенатах коры головного мозга через 24 ч после введения ингибиторов ПДГ. *а–в* – Ацетилирование и сукцинирование показаны в верхней и нижней частях рисунков. Интенсивность каждой полосы нормализовалась на общее содержание белка в дорожке и оценивалась относительно среднего значения нормализованной интенсивности полос в контрольной группе крыс, как описано в разделе «Материалы и методы». Значимость различий между группами на панелях (*а–г*) обозначена линиями с указанием *p*-значений над ними. Когда фактор обработки является значимым согласно анализу ANOVA, характеристические *p*- и *F*-значения приведены под графиками. *а* – Общее ацетилирование и сукцинирование белков. *б* – Изменения ацилирования низкомолекулярных белков (15–20 кДа). *в* – Изменения ацилирования белков 30–50 кДа. *г* – Влияние ингибиторов ПДГ на общую активность малатдегидрогеназы (МДГ) в гомогенатах коры головного мозга. *д* – Репрезентативные Вестерн-блоты ацетилированных (слева) и сукцинированных (справа) белков головного мозга, использованные для количественных оценок, представленных на панелях (*а–в*). Маркеры молекулярной массы приведены слева. Стрелками указаны полосы, использованные для количественного анализа. Здесь и далее одна панель образцов объединяет соответствующие части, вырезанные из одного блота, тогда как полные изображения мембран и соответствующих гелей, используемых для нормализации белка, показаны на Fig. S1 в Приложении

тирование белков с массами 15, 29, 31 кДа уменьшается после обработки АцМеФ, в то время как ацетилирование белков 50 кДа увеличивается (рис. 2, *б–в*; верхняя часть). В результате противоположных эффектов АцМеФ на ацетилирование разных белков и низкого вклада полосы 31 кДа, изменяющейся под действием АцФМе, в общую интенсивность суммарный уровень ацетилирования белков головного мозга не меняется после введения ни АцФМе, ни АцМеФ (рис. 2, *а*; верхняя часть).

Индукцированное АцМеФ увеличение ацетилирования белковой полосы 50 кДа согласуется с результатами функциональных тестов. Активность МДГ (36 кДа), для которой из-

вестно повышение при ацетилировании фермента [39], демонстрирует тенденцию ( $p = 0,1$ ) к увеличению (рис. 2, *г*) одновременно с индуцированным АцМеФ увеличением ацетилирования метаболических белков (50 кДа; рис. 2, *в*; верхняя часть).

**Сукцинирование и ацетилирование белков мозга меняются при ингибировании ПДГ по-разному.** Снижение под действием АцМеФ уровня ацетилирования белков массой 15 кДа сопровождается увеличением уровня сукцинирования белков массой 15–20 кДа. При этом менее эффективный ингибитор АцФМе не влияет на уровень сукцинирования белков головного мозга с низкой молекулярной



**Рис. 3.** Изменения уровней митохондриальной деацетилазы SIRT3 (а) и деацетилазы отрицательно заряженных ацильных групп SIRT5 (б) в гомогенатах коры головного мозга после введения ингибиторов ПДГ. Интенсивность каждого образца нормализована на содержание общего белка в дорожке и приведена в % к среднему значению такой интенсивности в контрольной группе крыс (см. раздел «Материалы и методы»). Репрезентативные Вестерн-блоты, использованные для количественной оценки, показаны под графиками. Различия между группами и соответствующие им *p*-значения показаны на графиках линиями. При значимости фактора обработки согласно анализу ANOVA, под графиками приведены характеристические *p*- и *F*-значения

массой (рис. 2, а–в; нижняя часть). Иная ситуация наблюдается для сукцинирования белков головного мозга массой 30–50 кДа. Сукцинирование этих белковых полос значительно увеличивается при воздействии менее эффективного ингибитора ПДГ – АцФМе, но не изменяется под действием сильного ингибитора АцМеФ (рис. 2, а–в; нижняя часть). Поскольку белки с массой 30–50 кДа представляют собой наибольшую часть сукцинированных белков, общий уровень сукцинирования также увеличивается под действием АцФМе, в отличие от АцМеФ.

Таким образом, сильный ингибитор ПДГ АцМеФ действует по-разному не только на ацилирование белков с разной молекулярной массой, но и на различные типы ацилирования. Вызванное АцМеФ снижение ацетилирования белков с кажущейся молекулярной массой, близкой к молекулярной массе коровых гистонов (15–20 кДа), сопровождается повышенным уровнем сукцинирования этих белков, тогда как на сукцинирование метаболитических белков (30–50 кДа) АцМеФ не влияет.

**Экспрессия митохондриальной деацетилазы SIRT3 и десукцинилазы SIRT5 после ингибирования ПДГ.** Принимая во внимание изменения в уровне ацетилирования и сукцинирования белков мозга под действием ингибиторов

ПДГ (рис. 2), мы оценили уровни экспрессии соответствующих митохондриальных деацетилаз мозга: деацетилазы сиртуина 3 (SIRT3) и десукцинилазы сиртуина 5 (SIRT5) (рис. 3). Ингибиторы ПДГ не индуцируют существенных изменений в уровнях SIRT3 или SIRT5 по сравнению с контрольными животными, однако уровень SIRT5 значительно повышается после воздействия АцМеФ по сравнению с АцФМе (рис. 3). Получавшие АцМеФ и АцФМе животные также существенно различались по уровням сукцинирования белковых полос в интервале масс 37–50 кДа (рис. 2, в; нижняя часть). Таким образом, умеренное ингибирование ПДГ при действии АцФМе не влияет на уровни SIRT3 и SIRT5 (рис. 3), но увеличивает сукцинирование белков массой 37–50 кДа по сравнению с контрольными и получившими АцФМе животными (рис. 2, в). При более сильном ингибировании ПДГ у животных, получавших АцМеФ, по сравнению с получавшими АцФМе животными повышается экспрессия десукцинилазы SIRT5 (рис. 3, б), что согласуется с отсутствием роста сукцинирования белков массой 37–50 кДа у этой группы по сравнению с контролем, в отличие от обработанной АцФМе группы (рис. 2, в).

Комплементарные изменения экспрессии SIRT5 и сукцинирования белков при

ингибировании ПДГ показывают критическую роль SIRT5 в поддержании уровня сукцинирования белков. Контроль сукцинирования за счет экспрессии SIRT5 согласуется с существованием отрицательной корреляции между уровнем сукцинирования белков мозга и уровнем десукцинилазы SIRT5 в мозге (табл. 1). Напротив, отрицательной корреляции между уровнем ацетилирования белков и уровнем митохондриальной деацетилазы SIRT3 не выявлено. Вместо этого и общее ацетилирование, и ацетилирование белков массой 15 кДа положительно коррелируют с уровнем SIRT3 (табл. 1). Таким образом, взаимосвязи между белковым ацетилированием и экспрессией деацетилаз могут быть сложнее, чем взаимосвязи между белковым сукцинированием и экспрессией десукцинилаз. По-видимому, это связано с существенно большим количеством метаболических путей, генерирую-

щих и утилизирующих ацетильные остатки по сравнению с теми, что участвуют в генерации и утилизации сукцинильных остатков.

С другой стороны, уровень сукцинирования белков массой 30 кДа положительно коррелирует с уровнем деацетилазы SIRT3 в мозге (табл. 1). Это наблюдение свидетельствует о конкурентных отношениях между ацетилированием и сукцинированием данных белков. По-видимому, деацетилирование лизинов под действием SIRT3 может увеличивать их доступность для сукцинирования.

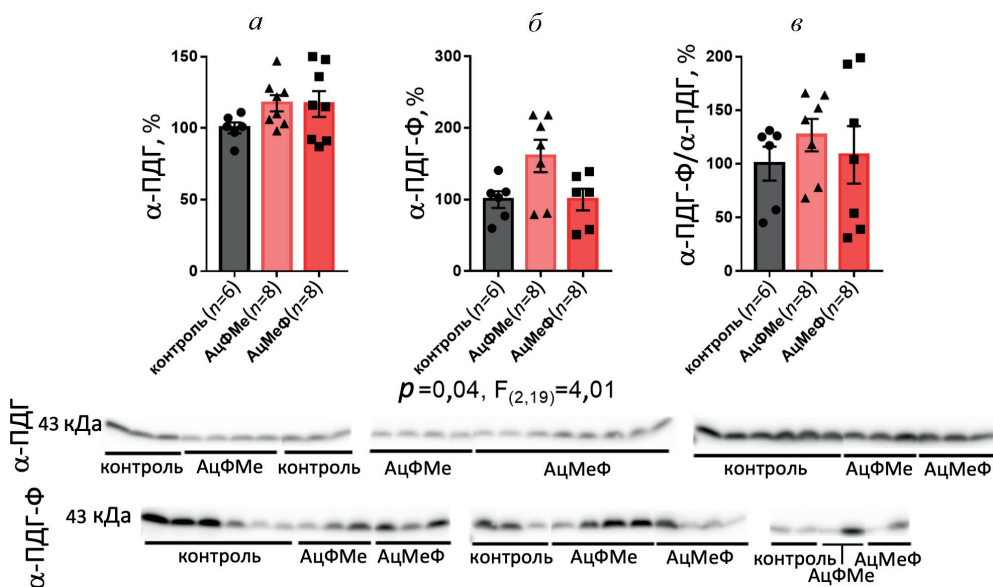
**Экспрессия альфа-субъединицы ПДГ и степень ее фосфорилирования по Ser293 после ингибирования ПДГ.** Экспрессия ПДГ и регуляция фермента фосфорилированием могут участвовать в компенсаторном ответе на ингибирование ПДГ, поскольку физиологические уровни активности ПДГ контролируются системой (де)фосфорилирования фермента. Фосфорилирование ПДГ по Ser293 киназой ПДГ инактивирует фермент, в то время как дефосфорилирование фосфатазой ПДГ увеличивает активность. Как видно из рис. 4, экспрессия кодируемой *PDHA* альфа-субъединицы ПДГ в мозге и фосфорилирование ее Ser293 достоверно не изменяются после введения ингибиторов ПДГ по сравнению с контролем. Дисперсионный анализ ANOVA показывает влияние ингибирования на фосфорилирование Ser293 (рис. 4, б), однако достоверной разницы между тремя исследованными группами не выявлено. Не отличаются эти группы животных и по отношению фосфорилированной субъединицы к общей экспрессии  $\alpha$ -ПДГ (рис. 4, в), что свидетельствует о пропорциональном изменении обоих параметров без изменения уровня фосфорилирования белка. Таким образом, ингибирование ПДГ, изменяющее ацетилирование и сукцинирование белков мозга (рис. 2 и 3), не вызывает компенсаторного повышения активности ПДГ посредством дефосфорилирования фермента (рис. 4).

Корреляционный анализ уровня ацетилирования белков головного мозга и экспрессии субъединицы  $\alpha$ -ПДГ (скорость-лимитирующего компонента ПДГ-комплекса), определенных у животных всех исследованных групп, показал, что экспрессия  $\alpha$ -ПДГ коррелирует положительно с ацетилированием белков массой 50 кДа и отрицательно – с ацетилированием белков массой около 30 кДа (табл. 2). Такой результат корреляционного анализа соответствует противоположным изменениям средних уровней ацетилирования этих белков при действии ингибиторов ПДГ (рис. 2). Уровень фосфорилированной  $\alpha$ -ПДГ ( $\alpha$ -ПДГ-Ф) положительно

**Таблица 1.** Корреляции Спирмена между ацилированием различных белков и экспрессией SIRT3 и SIRT5

Белки	SIRT3		SIRT5	
	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$
Ац-К Общее	<b>0,45</b>	<b>0,04</b>	0,15	0,51
Ац-К 15 кДа	<b>0,55</b>	<b>0,01</b>	0,03	0,90
Ац-К 29 кДа	-0,02	0,92	-0,26	0,24
Ац-К 31 кДа	-0,11	0,63	-0,35	0,11
Ац-К 50 кДа	-0,02	0,92	0,21	0,34
Сук-К Общее	0,12	0,6	-0,33	0,13
Сук-К 50 кДа	-0,03	0,89	<b>-0,5</b>	<b>0,02</b>
Сук-К 40 кДа	0,30	0,18	<b>-0,37</b>	<b>0,09</b>
Сук-К 37 кДа	0,20	0,36	<b>-0,67</b>	<b>0,00</b>
Сук-К 30 кДа	<b>0,39</b>	<b>0,07</b>	-0,21	0,34
Сук-К 21 кДа	0,11	0,62	0,05	0,84
Сук-К 15 кДа	-0,18	0,43	0,17	0,44

Примечание. Корреляции определены с использованием параметров исследованных животных всех групп ( $n = 22$ ). Ац-К – Ацетилированные лизиновые остатки белков; Сук-К – сукцинированные лизиновые остатки белков;  $R_s$  – коэффициент корреляции; SIRT3 – митохондриальная деацетилаза; и SIRT5 – десукцинилаза;  $p$  – значимость корреляции. Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) положительные или отрицательные корреляции окрашены в красный или синий цвета соответственно и выделены жирным шрифтом; тенденции ( $0,05 < p < 0,1$ ) выделены жирным курсивом.



**Рис. 4.** Регуляция экспрессии и фосфорилирования  $\alpha$ -ПДГ в гомогенатах коры головного мозга при введении ингибиторов ПДГ. *a* – Уровень альфа-субъединицы ПДГ ( $\alpha$ -ПДГ); *б* – уровень  $\alpha$ -ПДГ, фосфорилированной по Ser293 ( $\alpha$ -ПДГ-Ф); *в* – отношение между фосфорилированной и общей  $\alpha$ -ПДГ.  $\alpha$ -ПДГ и ее фосфорилирование определяли по Вестерн-блотам, показанным под графиками. Интенсивность каждой полосы нормализована на общий белок дорожки и представлена в % от среднего значения нормализованной на белок интенсивности в контрольной группе крыс (см. раздел «Материалы и методы»). В случае статистической значимости фактора обработки согласно анализу ANOVA, характеристические  $p$ - и  $F$ -значения приведены под графиками

**Таблица 2.** Корреляции Спирмена между ацелированием или сукцилированием белков и экспрессией  $\alpha$ -ПДГ, ее фосфорилированием по Ser293 и отношением фосфорилированной формы к общей экспрессии  $\alpha$ -ПДГ

Белки	$\alpha$ -ПДГ		$\alpha$ -ПДГ-Ф		$\alpha$ -ПДГ-Ф/ $\alpha$ -ПДГ	
	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$
Ац-К Общее	0,11	0,64	0,03	0,90	0,04	0,87
Ац-К 15 кДа	0,03	0,88	0,02	0,92	0,01	0,96
Ац-К 29 кДа	<b>-0,60</b>	<b>0,00</b>	-0,01	0,95	0,30	0,18
Ац-К 31 кДа	<b>-0,52</b>	<b>0,01</b>	-0,17	0,46	0,15	0,52
Ац-К 50 кДа	<b>0,58</b>	<b>0,00</b>	0,01	0,97	-0,21	0,35
Сук-К Общее	-0,02	0,91	<b>0,47</b>	<b>0,03</b>	0,25	0,26
Сук-К 50 кДа	-0,02	0,94	<b>0,50</b>	<b>0,02</b>	0,26	0,23
Сук-К 40 кДа	0,06	0,77	<b>0,44</b>	<b>0,04</b>	0,24	0,29
Сук-К 37 кДа	0,03	0,89	<b>0,54</b>	<b>0,01</b>	0,34	0,12
Сук-К 30 кДа	-0,14	0,53	0,27	0,22	0,13	0,56
Сук-К 21 кДа	0,14	0,54	0,14	0,53	-0,10	0,67
Сук-К 15 кДа	0,01	0,96	0,15	0,52	-0,10	0,64

Примечание. Уровни белковой экспрессии и ацилирования определяли с помощью Вестерн-блоттинга, как описано в разделе «Материалы и методы». Ац-К – Ацелирование; Сук-К – сукцилированные лизинозные остатки белков;  $\alpha$ -ПДГ-Ф – фосфорилирование субъединицы по Ser293;  $R_s$  – коэффициент корреляции Спирмена;  $p$  – статистическая значимость корреляций. Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) положительные или отрицательные корреляции выделены жирным шрифтом и окрашены в красный или синий цвета соответственно.



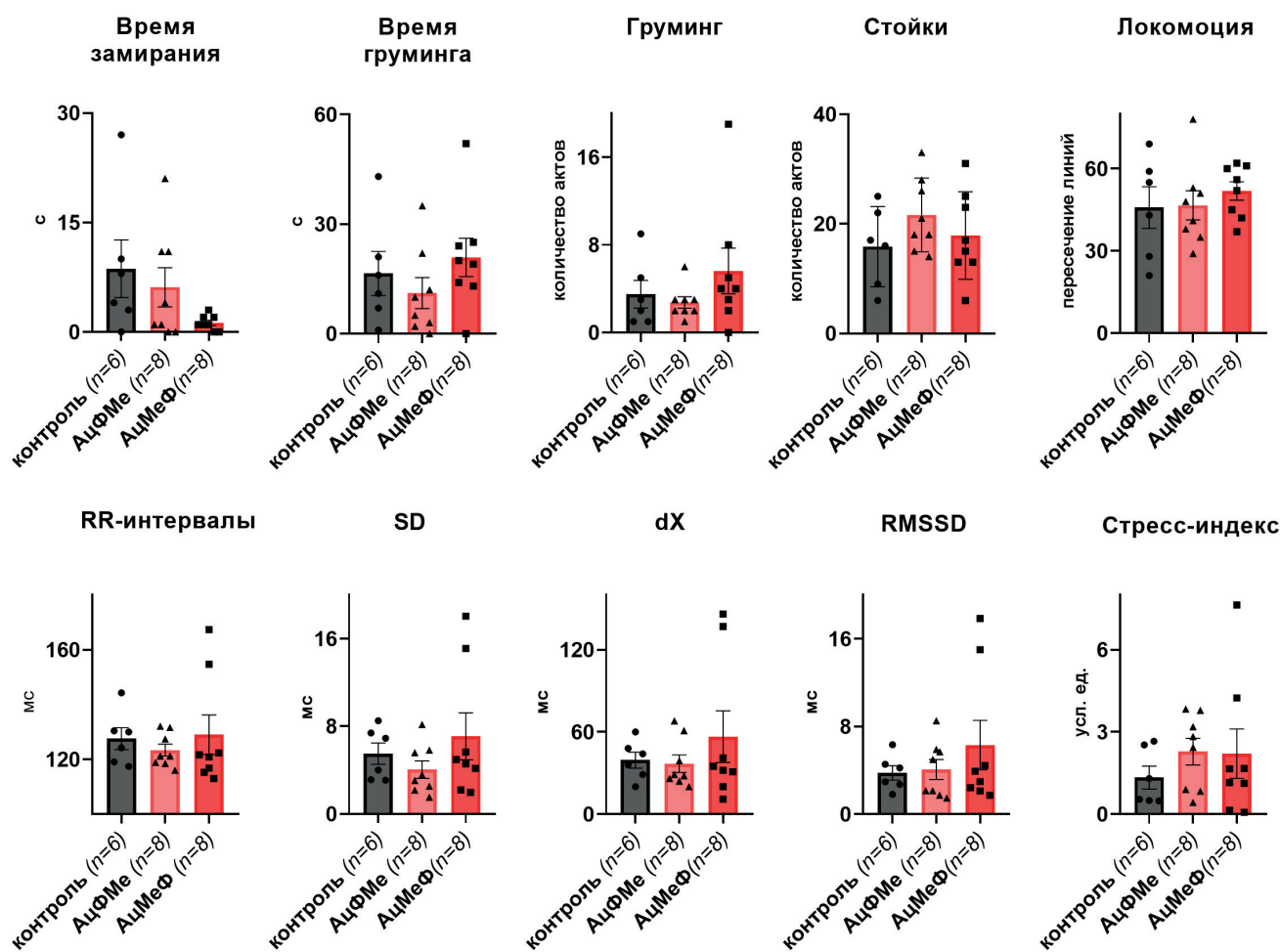


Рис. 5. Параметры поведения и ЭКГ через 24 ч после введения ингибиторов ПДГ. Время замирания, время груминга, количество актов груминга, стоек и локомоции определены в тесте «Открытое поле», как описано в «Материалах и методах». Длина интервала R-R (мс), стандартное отклонение средних значений интервала R-R (SD, мс), показатель variability сердечного ритма dX, парасимпатический (релаксационный) RMSSD индекс и стресс-индекс симпатической регуляции определены по ЭКГ, как описано в разделе «Материалы и методы»

коррелирует с уровнем сукцинирования метаболических белков (табл. 2; Сук-К 37–50 кДа). Таким образом, когда активность ПДГ-комплекса снижена в результате ее фосфорилирования или действия ингибитора AцФМе (рис. 2, б–в; нижняя часть), сукцинирование метаболических белков увеличивается.

**Физиологические параметры экспериментальных животных не изменяются под действием ингибиторов ПДГ.** Для определения потенциальных эффектов ингибиторов ПДГ на физиологическое состояние оценивали поведение животных в тесте «Открытое поле» (рис. 5, верхняя часть) и параметры неинвазивной ЭКГ (рис. 5, нижняя часть). Отсутствие существенных изменений данных параметров у животных после введения AцМеФ или AцФМе по сравнению с контрольной группой показывает, что биохимические изменения в мозге отражают адаптационный ответ, поддерживающий постоянство физиологических параметров

экспериментальных животных на контрольном уровне. Однако следует отметить, что при отсутствии существенных изменений в средних по выборке значениях физиологических параметров внутригрупповые различия между отдельными животными могут значительно изменяться под действием ингибиторов ПДГ. Например, у крыс, получавших сильный ингибитор ПДГ AцМеФ, наблюдается снижение variability такого параметра как продолжительность замирания, а variability параметров ЭКГ возрастает по сравнению с контрольными крысами, тогда как слабый ингибитор AцФМе не оказывает такого действия (рис. 5).

Важность изученных компонентов системы ацилирования мозга для физиологии очевидна из ряда значимых корреляций с параметрами поведения (табл. 3) и ЭКГ (табл. 4). Так, экспрессия SIRT5 демонстрирует положительную корреляцию со временем замирания; количество стоек положительно коррелирует

Таблица 3. Корреляции Спирмена между компонентами системы ацилирования мозга и параметрами поведения

Компоненты	Длительность замирания		Длительность груминга		Акты груминга		Стойки		Локомоция	
	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$
SIRT3	-0,05	0,83	-0,29	0,18	-0,20	0,37	0,01	0,98	-0,22	0,33
SIRT5	<b>0,41</b>	<b>0,06</b>	0,22	0,33	0,11	0,61	-0,17	0,44	0,20	0,37
Ац-К Общее	0,12	0,58	-0,06	0,79	<b>-0,49</b>	<b>0,02</b>	-0,03	0,90	-0,26	0,24
Ац-К 15 кДа	-0,02	0,94	-0,22	0,33	<b>-0,38</b>	<b>0,08</b>	0,01	0,97	<b>-0,37</b>	<b>0,09</b>
Ац-К 29 кДа	0,07	0,75	0,14	0,54	0,05	0,81	0,19	0,39	0,24	0,29
Ац-К 31 кДа	-0,03	0,88	-0,01	0,97	-0,07	0,76	0,10	0,67	0,09	0,69
Ац-К 50 кДа	0,12	0,58	0,29	0,19	-0,26	0,24	-0,16	0,47	-0,16	0,47
Сук-К Общее	-0,13	0,56	-0,30	0,18	0,07	0,76	<b>0,43</b>	<b>0,05</b>	-0,01	0,97
Сук-К 50 кДа	-0,17	0,46	-0,17	0,44	0,15	0,50	0,31	0,17	-0,04	0,87
Сук-К 40 кДа	-0,10	0,67	-0,33	0,13	-0,13	0,55	<b>0,38</b>	<b>0,08</b>	0,01	0,96
Сук-К 37 кДа	-0,25	0,27	-0,35	0,11	-0,03	0,89	0,30	0,18	-0,18	0,42
Сук-К 30 кДа	-0,04	0,85	-0,12	0,59	0,07	0,77	<b>0,37</b>	<b>0,09</b>	-0,01	0,96
Сук-К 21 кДа	-0,27	0,23	-0,29	0,20	0,11	0,62	<b>0,41</b>	<b>0,06</b>	0,06	0,79
Сук-К 15 кДа	-0,14	0,52	-0,04	0,87	<b>0,37</b>	<b>0,09</b>	0,15	0,50	0,09	0,68
$\alpha$ -ПДГ	-0,14	0,55	0,09	0,69	<b>-0,40</b>	<b>0,07</b>	-0,01	0,95	<b>-0,41</b>	<b>0,06</b>
$\alpha$ -ПДГ-Ф	-0,12	0,61	-0,14	0,52	0,07	0,75	0,00	0,98	-0,16	0,47
$\alpha$ -ПДГ-Ф/ $\alpha$ -ПДГ	0,05	0,84	-0,21	0,35	0,11	0,61	0,04	0,87	0,11	0,62
МДГ	-0,02	0,94	0,19	0,40	<b>0,44</b>	<b>0,04</b>	0,08	0,74	<b>0,39</b>	<b>0,07</b>

Примечание.  $R_s$  – Коэффициенты корреляций Спирмена;  $p$  – статистическая значимость корреляций. Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) положительные или отрицательные корреляции окрашены в красный или синий цвета соответственно и выделены жирным шрифтом; тенденции ( $0,05 < p < 0,1$ ) выделены жирным курсивом. Принятые сокращения даны в Примечании к табл. 2.

с сукцинированием белков мозга, в то время как количество актов груминга и в меньшей степени локомоторная активность связаны с ацетилованием белков мозга и экспрессией  $\alpha$ -ПДГ (табл. 3).

Среди компонентов системы ацилирования мозга, коррелирующих с параметрами ЭКГ, ацетилование белков с молекулярной массой 29 кДа демонстрирует сильную положительную корреляцию с частотой сердечных сокращений и вариабельностью сердечного ритма, коррелируя отрицательно со стресс-индексом, характеризующим симпатическую активность. Индекс парасимпатической (релаксационной)

активности (RMSSD) имеет тенденцию к отрицательной корреляции с уровнем деацетилазы SIRT3 (табл. 4). Таким образом, получены взаимодополняющие результаты о том, что релаксация падает с ростом деацетилирования митохондриальных белков, а стресс падает с ростом ацетилования белков 29 кДа.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При помощи фармакологического ингибирования ПДГ фосфинатным и фосфонатным аналогами пирувата мы определили связь между

Таблица 4. Корреляции Спирмена между компонентами системы ацилирования головного мозга и параметрами ЭКГ

Компоненты	Интервалы R-R		SD		dX		RMSSD		Стресс-индекс	
	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$	$R_s$	$p$
SIRT3	-0,06	0,79	-0,27	0,23	-0,04	0,87	<b>-0,36</b>	<b>0,10</b>	0,20	0,38
SIRT5	-0,07	0,76	-0,03	0,91	-0,12	0,60	-0,06	0,79	0,12	0,60
Ац-К Общее	0,10	0,65	0,00	0,99	0,14	0,54	-0,09	0,68	-0,08	0,73
Ац-К 15 кДа	0,06	0,77	-0,12	0,58	0,07	0,77	-0,20	0,38	0,02	0,92
Ац-К 29 кДа	<b>0,58</b>	<b>0,00</b>	<b>0,49</b>	<b>0,02</b>	<b>0,46</b>	<b>0,03</b>	0,25	0,27	<b>-0,50</b>	<b>0,02</b>
Ац-К 31 кДа	0,29	0,18	0,29	0,20	0,17	0,44	0,11	0,63	-0,30	0,18
Ац-К 50 кДа	-0,29	0,19	-0,11	0,63	-0,19	0,40	0,02	0,94	0,19	0,40
Сук-К Общее	0,05	0,84	-0,06	0,79	0,25	0,27	0,02	0,91	-0,01	0,97
Сук-К 50 кДа	0,05	0,84	-0,04	0,87	0,16	0,48	0,05	0,84	0,00	0,99
Сук-К 40 кДа	0,10	0,67	-0,12	0,60	0,18	0,41	-0,11	0,64	0,03	0,89
Сук-К 37 кДа	-0,05	0,84	-0,29	0,19	-0,02	0,94	-0,18	0,43	0,19	0,39
Сук-К 30 кДа	0,21	0,35	-0,02	0,92	0,34	0,12	0,05	0,84	-0,07	0,77
Сук-К 21 кДа	-0,17	0,44	-0,27	0,23	-0,02	0,92	-0,15	0,49	0,23	0,30
Сук-К 15 кДа	-0,13	0,55	-0,01	0,95	0,14	0,55	0,12	0,60	0,03	0,89
$\alpha$ -ПДГ	-0,34	0,12	-0,24	0,27	-0,21	0,34	-0,22	0,33	0,25	0,26
$\alpha$ -ПДГ-Ф	-0,08	0,73	-0,03	0,90	0,12	0,60	0,24	0,29	-0,03	0,90
$\alpha$ -ПДГ-Ф/ $\alpha$ -ПДГ	0,01	0,97	0,03	0,89	0,08	0,73	0,20	0,38	-0,10	0,66
МДГ	-0,03	0,90	0,12	0,58	0,10	0,67	-0,11	0,63	-0,07	0,75

Примечание. Расшифровка параметров ЭКГ приводится в подписи к рис. 5 и в разделе «Материалы и методы».  $R_s$  – Коэффициенты корреляций Спирмена;  $p$  – статистическая значимость корреляций. Статистически значимые ( $p < 0,05$ ) положительные или отрицательные корреляции окрашены в красный или синий цвета соответственно и выделены жирным шрифтом; тенденции ( $0,05 < p < 0,1$ ) выделены жирным курсивом. Принятые сокращения даны в Примечании к табл. 2.

катализируемой ПДГ реакцией и ацилированием белков мозга. Согласно охарактеризованной ранее [23–25] эффективности действия данных ингибиторов ПДГ, введение животным одной и той же дозы АцМеФ и АцФМе должно приводить к различным уровням ингибирования фермента *in vivo*. Определенная нами иерархичность ответа системы ацилирования мозга на введение этих ингибиторов ПДГ хорошо согласуется с разными уровнями ингибирования фермента (рис. 6). При умеренном уровне ингибирования ПДГ (рис. 6, а) ацетилирование значимо уменьшается только для белков массой 31 кДа, но значительно растет сукцинили-

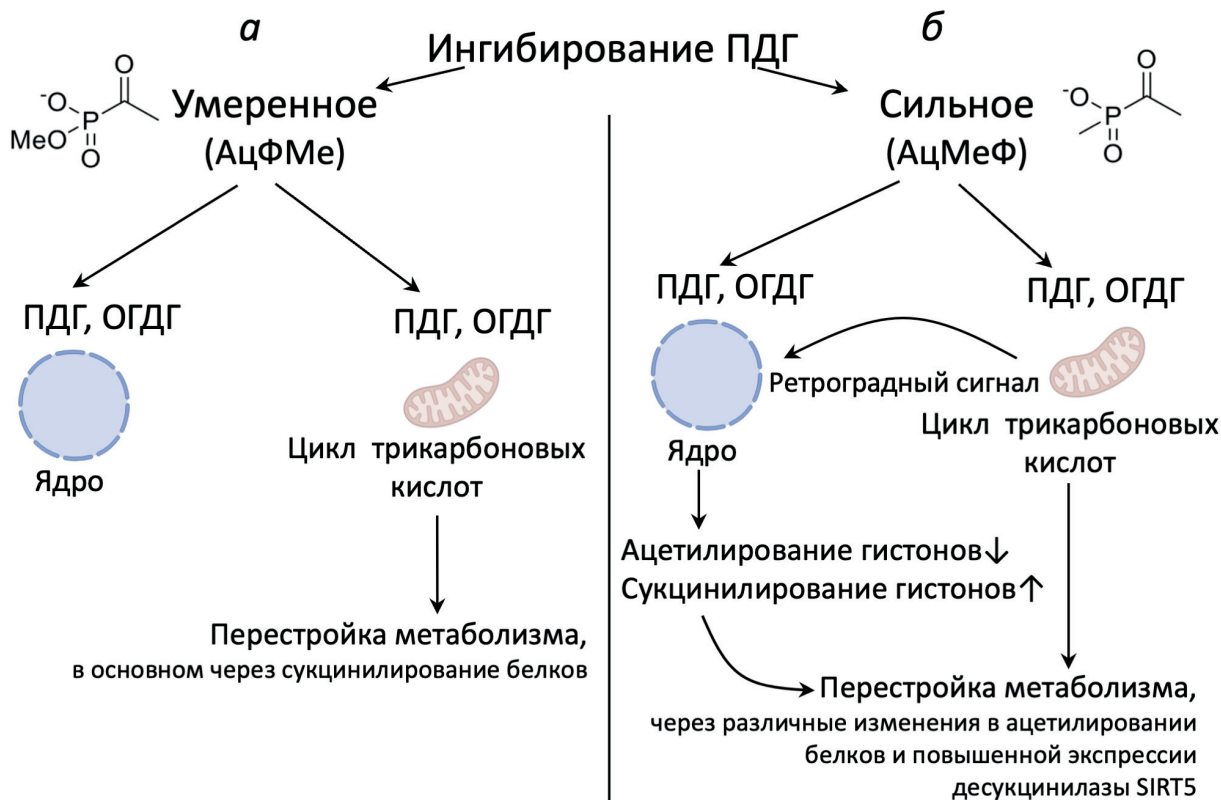
рование белков головного мозга. При сильном ингибировании ПДГ (рис. 6, б) значительно уменьшается ацетилирование основной полосы белкового ацетилирования, молекулярная масса которой (15 кДа) соответствует массе гистонов, а сукцинирование этих белков увеличивается. Для белков с другими молекулярными массами при сильном ингибировании ПДГ наблюдается как уменьшение (29 и 31 кДа), так и увеличение (50 кДа) ацетилирования. При этом уровень сукцинирования этих негистоновых белков не меняется, а экспрессия десукцинил-лазы SIRT5 растет (рис. 3). Наблюдаемые изменения системы ацилирования мозга в ответ

на ингибирование ПДГ согласуются с ядерной локализацией гистонов (15 кДа), вовлекаемых в транскрипционную регуляцию при сильном ингибировании ПДГ и митохондриальной/цитоплазматической локализацией других белков (30–50 кДа), реагирующих на умеренный уровень ингибирования ПДГ (рис. 6). Примечательно, что в независимом исследовании с использованием специфических антител к белкам разной внутриклеточной локализации и ингибирования ПДГ за счет нарушенного липоилирования ПДГ-комплекса были также показаны различия в изменении ацетилирования белков в зависимости от их локализации [40].

Повышенное сукцинирование белков головного мозга с кажущейся молекулярной массой, соответствующей гистонам (15–20 кДа) (рис. 2, б), совпадает с повышенной экспрессией десукцинилазы SIRT5 (рис. 3, б). Такие сопряженные изменения могут быть следствием ожидаемой активации транскрипции при сукцинировании гистонов, меняющим заряд лизиновых остатков гистонов с положительно на отрицательный. Тот факт, что повышенная экспрессия десукцинилазы метаболических белков (SIRT5) уменьшает сукцинирование негистоновых белков (30–50 кДа, рис. 2), но не белков массой 15 кДа, свидетельствует в пользу

локализации этих белков вне и внутри ядра соответственно, поскольку SIRT5 предназначен для десукцинирования негистоновых белков, тогда как деацетилазы гистонов являются ферментами другого типа.

Результаты данного исследования указывают на отсутствие однонаправленного ответа ацетилирования всех белков мозга на изменения функций ПДГ (производителя ацетильных остатков) и SIRT3 (деацетилазы). В частности, повышенное ацетилирование белков головного мозга с кажущейся молекулярной массой, соответствующей массе гистонов (15 кДа), положительно коррелирует с уровнями митохондриального SIRT3, что может свидетельствовать о вкладе ацетилирования митохондриальных белков в ретроградную передачу сигнала от митохондрий к ядру (рис. 6). Напротив, экспрессия  $\alpha$ -ПДГ положительно коррелирует с уровнем ацетилирования негистоновых белков, молекулярная масса которых (50 кДа) соответствует массе тубулина. С другой стороны, ацетилирование белков с массой около 30 кДа с уровнем  $\alpha$ -ПДГ коррелирует отрицательно. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что функция ПДГ по-разному контролирует ацетилирование конкретных белков мозга.



**Рис. 6.** Схема предполагаемых механизмов адаптационной перестройки метаболизма мозга через ацилирование белков, изменяющееся под действием ингибиторов ПДГ АцФМе (а) и АцМеФ (б). Указаны известные локализации полиферментных комплексов пируватдегидрогеназы (ПДГ) и 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДГ) в митохондриях и ядре

Одной из особенностей этой сложной системы является сильная взаимозависимость различных типов ацилирования белка. Результаты протеомных исследований, хранящиеся в базах данных (например, PhosphoSite [41]), показывают, что во многих случаях одни и те же остатки лизина могут подвергаться различным типам ацилирования. Вероятная конкуренция различных типов ацилирования за реакционноспособные белковые остатки лизина может приводить к тому, что сукцинирование некоторых остатков увеличивается, когда их ацетилирование — уменьшается. Такая конкуренция может объяснять наблюдаемую нами положительную корреляцию сукцинирования белков массой 30 кДа с уровнем деацетилазы SIRT3 в мозге (табл. 1) и аналогичные результаты недавнего масс-спектрометрического исследования белкового ацилирования на крысиной модели эпилепсии [15]. Конкуренция комплексов ПДГ и ОГДГ за их субстрат КоА, который является предшественником ацилирующих белки производных КоА, может также вносить вклад в конкуренцию между разными типами ацилирования белков. Так, повышение доступности свободного КоА за счет уменьшения выработки ацетил-КоА заингибированным комплексом ПДГ может стимулировать выработку сукцинил-КоА комплексом ОГДГ.

С другой стороны, как в данной работе (табл. 1), так и в недавнем исследовании модели эпилепсии у крыс [15] уровни ацетилирования белков коррелируют с уровнями деацетилаз SIRT3 и SIRT2 положительно. Это указывает на отсутствие прямого контроля состояния ацетилирования клеточных белков за счет экспрессии деацетилаз. Возможно, взаимные отношения между деацетилазами и уровнем белкового ацетилирования неоднозначны из-за различных источников и мишеней ацетилирования белков. Напротив, сукцинирование негистоновых белков коррелирует с экспрессией десукцинилазы метаболических белков (SIRT5) отрицательно, что соответствует непосредственному контролю уровня сукцинирования с помощью экспрессии десукцинилазы. Таким образом, факторы конкуренции и специфическая регуляция источников и мишеней ацилирования могут обусловить наблюдаемые взаимные влияния процессов ацетилирования и сукцинирования белков мозга, продемонстрированные при специфическом ингибировании ПДГ.

Фосфорилирование  $\alpha$ -ПДГ не претерпевает существенных изменений в ответ на кратковременное действие ингибиторов ПДГ. Действительно, известно, что фосфорилирование  $\alpha$ -ПДГ реагирует на гормональный фон [42–

45], который, по-видимому, не нарушен в наших экспериментальных условиях. В результате адаптационный ответ на кратковременное ингибирование ПДГ поддерживается взаимосвязанными реакциями ацилирования, а не фосфорилированием  $\alpha$ -ПДГ. Тем не менее уровень фосфорилированной (неактивной)  $\alpha$ -ПДГ положительно коррелирует с сукцинированием негистоновых белков (табл. 2), что хорошо соответствует росту сукцинирования при фармакологическом ингибировании ПДГ. Корреляция может отражать известное участие фосфорилирования  $\alpha$ -ПДГ в метаболическом переключении потоков субстратов между циклом трикарбоновых кислот, генерирующим сукцинил-КоА, и гликолизом [46–48]. Механизм такого переключения может включать образование комплекса между фосфорилированной  $\alpha$ -ПДГ и пируваткиназой 2М, выступающего в качестве регулятора транскрипции [44]. Схожее транскрипционное действие известно для ОГДГ в комплексе с ацетил-КоА-ацилтрансферазой 2, связывание которой с ДНК контролирует ацилирование гистонов [12]. Исследования ацилирования белков мозга указывают, что формирование памяти и ее возрастные или патологические нарушения зависят не только от давно известного ацетилирования [17, 49–51], но и от сукцинирования гистонов [12]. Нарушение сукцинирования негистоновых белков головного мозга является характерной чертой мозга пациентов с болезнью Альцгеймера [21], для которого давно известно снижение активности комплекса ОГДГ — продуцента сукцинил-КоА [20].

Наши результаты показывают иерархию изменений ацетилирования и сукцинирования белков, направленных на поддержание стабильности физиологических параметров в условиях метаболического стресса. Умеренный ингибитор ПДГ АцФМе изменяет ацилирование белков массой 30–50 кДа, а ацилирование белков массой 15–20 кДа изменяется под действием сильного ингибитора АцМеФ (рис. 2). Мы предполагаем, что такая последовательность событий указывает на два уровня системного ответа мозга на ингибирование ПДГ. В первую очередь реагирует система ацилирования метаболических белков, а далее наблюдается регуляция транскрипции за счет ацилирования гистонов (рис. 6).

Корреляции между различными компонентами системы ацилирования белков головного мозга и физиологическими параметрами (табл. 3 и 4) раскрывают физиологическое значение ацилирования белков — тему, которая еще очень мало разработана. В частности,

отрицательные корреляции между SIRT3 в мозге и RMSSD ЭКГ, а также между уровнем ацетилирования белков 29 кДа мозга и стресс-индексом ЭКГ (табл. 4) указывают на связь баланса парасимпатической (релаксационной) и симпатической (стрессорной) вегетативной регуляции с уровнем ацетилирования белков головного мозга. Эта взаимосвязь может быть обусловлена тем фактом, что более высокий «потенциал ацетилирования» может отражать повышенный биосинтез ацетил-КоА, который является субстратом для биосинтеза нейромедиатора парасимпатической нервной системы ацетилхолина. Известно, что баланс контролирующей стресс симпатической и парасимпатической систем находится в сложной взаимосвязи с формированием памяти [52], причем при определенных условиях стресс может улучшать память [53]. В этой связи обнаруженные нами корреляции между активностью парасимпатической системы и ацетилированием белков мозга могут указывать на зависимость памяти и когнитивных функций от ацилирования белков мозга. Дальнейшая идентификация специфических белков в составе белковых полос, ацилирование которых изменяется в ответ на ингибиторы ПДГ и коррелирует с физиологическими параметрами, может способствовать определению специфических компонентов системы ацилирования мозга, важных для контролируемых ацилированием белков мозга физиологических процессов. Эти компоненты могут участвовать и в нарушениях регуляции системы ацилирования при заболеваниях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Усиление ингибирования комплекса ПДГ в головном мозге уменьшает ацетилирование и увеличивает сукцинирование белков массой 15 кДа, в то время как влияние ингибиторов ПДГ на ацилирование белков головного мозга

массой 30–50 кДа неоднозначно. В отличие от ацилирования белков мозга, фосфорилирование ПДГ существенно не изменяется после 24-часового воздействия ингибиторов ПДГ. Таким образом, изменение ацилирования белков головного мозга представляет собой кратковременный ответ на ингибирование ПДГ, который может обеспечивать адаптацию организма к метаболическому стрессу и участвовать в механизмах развития патологий.

**Вклад авторов.** ВАА изучал белковое ацилирование, проводил анализ и визуализацию биохимических экспериментов; ДАС выполняла животные эксперименты и изучала экспрессию и фосфорилирование  $\alpha$ -ПДГ; АВК предоставил аналоги пирувата; АВГ руководила работой с животными, спланировала и анализировала животные эксперименты; ВИБ получила финансирование, сформулировала концепцию и руководила исследованием, написала и отредактировала текст статьи. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией.

**Финансирование.** Эта работа была выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00116).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Финансирующие спонсоры не принимали участия в разработке дизайна исследования, а также в сборе, анализе или интерпретации данных, написании рукописи или в принятии решения о публикации результатов.

**Соблюдение этических норм.** Все эксперименты на животных проводились в соответствии с методическими Директивами Хельсинкской декларации и были одобрены Комитетом по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол № 139-а от 11 ноября 2021 года).

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте: <https://www.springer.com/journal/10541>.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joseph, A. D. A., Robert, A. T., and Lawrence, R. G. (1980) Concentration-Dependent effects of sodium butyrate in Chinese hamster cells: cell-cycle progression, inner-histone acetylation, histone H1 dephosphorylation, and induction of an H1-like protein, *Biochemistry*, **19**, 2656-2671, doi: 10.1021/BI00553A019.
2. Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003) Histone and chromatin cross-talk, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 172-183, doi: 10.1016/s0955-0674(03)00013-9.
3. Jeans, C., Thelen, M. P., and Noy, A. (2006) Single molecule studies of chromatin, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 699771, doi: 10.2172/877892.
4. Akiyama, S. K., and Hammes, G. G. (1980) Elementary steps in the reaction mechanism of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*: kinetics of acetylation and deacetylation, *Biochemistry*, **19**, 4208-4213, doi: 10.1021/BI00559A011.

5. Waskiewicz, D. E., and Hammes, G. G. (1984) Elementary steps in the reaction mechanism of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*: kinetics of succinylation and desuccinylation, *Biochemistry*, **23**, 3136-3143, doi: 10.1021/BI00309A005.
6. Xu, Y., Shi, Z., and Bao, L. (2022) An expanding repertoire of protein acylations, *Mol. Cell. Proteomics*, **21**, 100193, doi: 10.1016/J.MCPRO.2022.100193.
7. Bruzzone, S., Parenti, M. D., Grozio, A., Ballestrero, A., Bauer, I., del Rio, A., and Nencioni, A. (2013) Rejuvenating sirtuins: the rise of a new family of cancer drug targets, *Ingentaconnect. Com.*, **19**, 614-623, doi: 10.2174/138161213804581954.
8. Grabowska, W., Sikora, E., and Bielak-Zmijewska, A. (2017) Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process, *Biogerontology*, **18**, 447-476, doi: 10.1007/S10522-017-9685-9.
9. Sutendra, G., Kinnaird, A., Dromparis, P., Paulin, R., Stenson, T. H., Haromy, A., Hashimoto, K., Zhang, N., Flaim, E., and Michelakis, E. D. (2014) A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of Acetyl-CoA and histone acetylation, *Cell*, **158**, 84-97, doi: 10.1016/J.CELL.2014.04.046.
10. Chueh, F. Y., Leong, K. F., Cronk, R. J., Venkitachalam, S., Pabich, S., and Yu, C. L. (2011) Nuclear localization of pyruvate dehydrogenase complex-E2 (PDC-E2), a mitochondrial enzyme, and its role in signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)-dependent gene transcription, *Cell Signal.*, **23**, 1170-1178, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2011.03.004.
11. Wang, Y., Guo, Y. R., Liu, K., Yin, Z., Liu, R., Xia, Y., Tan, L., Yang, P., Lee, J. H., Li, X. J., Hawke, D., Zheng, Y., Qian, X., Lyu, J., He, J., Xing, D., Tao, Y. J., and Lu, Z. (2017) KAT2A coupled with the  $\alpha$ -KGDH complex acts as a histone H3 succinyltransferase, *Nature*, **552**, 273-277, doi: 10.1038/NATURE25003.
12. Choi, S., Pflieger, J., Jeon, Y. H., Yang, Z., He, M., Shin, H., Sayed, D., Astrof, S., and Abdellatif, M. (2019) Oxoglutarate dehydrogenase and acetyl-CoA acyltransferase 2 selectively associate with H2A. Z-occupied promoters and are required for histone modifications, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1862**, 194436, doi: 10.1016/J.BBAGRM.2019.194436.
13. Boyko, A. I., Karlina, I. S., Zavileyskiy, L. G., Aleshin, V. A., Artiukhov, A. V., Kaehne, T., Ksenofontov, A. L., Ryabov, S. I., Graf, A. V., Tramonti, A., and Bunik, V. I. (2022) Delayed impact of 2-oxoadipate dehydrogenase inhibition on the rat brain metabolism is linked to protein glutarylation, *Front. Med.*, **9**, 896263, doi: 10.3389/fmed.2022.896263.
14. Gibson, G. E., Xu, H., Chen, H.-L., Chen, W., Denton, T. T., and Zhang, S. Z. (2015) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex-dependent succinylation of proteins in neurons and neuronal cell lines, *J. Neurochem.*, **134**, 86-96, doi: 10.1111/jnc.13096.
15. Zavileyskiy, L. G., Aleshin, V. A., Kaehne, T., Karlina, I. S., Artiukhov, A. V., Maslova, M. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2022) The brain protein acylation system responds to seizures in the rat model of PTZ-induced epilepsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12302, doi: 10.3390/ijms232012302.
16. Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., and Kroemer, G. (2015) Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger, *Cell Metab.*, **21**, 805-821, doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.014.
17. Mews, P., Donahue, G., Drake, A. M., Luczak, V., Abel, T., and Berger, S. L. (2017) Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory, *Nature*, **546**, 381-386, doi: 10.1038/NATURE22405.
18. Pougovkina, O., te Brinke, H., Ofman, R., van Cruchten, A. G., Kulik, W., Wanders, R. J. A., Houten, S. M., and de Boer, V. C. J. (2014) Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation, *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 3513-3522, doi: 10.1093/HMG/DDU059.
19. Gräff, J., and Tsai, L.-H. (2013) Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin, *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 97-111, doi: 10.1038/nrn3427.
20. Gibson, G. E., Blass, J. P., Beal, M. F., and Bunik, V. (2005) The  $\alpha$ -ketoglutarate-dehydrogenase complex: a mediator between mitochondria and oxidative stress in neurodegeneration, *Mol. Neurobiol.*, **31**, 43-63, doi: 10.1385/MN:31:1-3:043.
21. Yang, Y., Tapias, V., Acosta, D., Xu, H., Chen, H., Bhawal, R., Anderson, E. T., Ivanova, E., Lin, H., Sagdullaev, B. T., Chen, J., Klein, W. L., Viola, K. L., Gandy, S., Haroutunian, V., Beal, M. F., Eliezer, D., Zhang, S., and Gibson, G. E. (2022) Altered succinylation of mitochondrial proteins, APP and tau in Alzheimer's disease, *Nat. Commun.*, **13**, 159, doi: 10.1038/S41467-021-27572-2.
22. Bunik, V. I., Tylicki, A., and Lukashev, N. V. (2013) Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models, *FEBS J.*, **280**, 6412-6442, doi: 10.1111/febs.12512.
23. Bunik, V. I., Artiukhov, A., Kazantsev, A., Goncalves, R., Daloso, D., Oppermann, H., Kulakovskaya, E., Lukashev, N., Fernie, A., Brand, M., and Gaunitz, F. (2015) Specific inhibition by synthetic analogs of pyruvate reveals that the pyruvate dehydrogenase reaction is essential for metabolism and viability of glioblastoma cells, *Oncotarget*, **6**, 40036-40052, doi: 10.18632/ONCOTARGET.5486.
24. Nemeria, N. S., Korotchkina, L. G., Chakraborty, S., Patel, M. S., and Jordan, F. (2006) Acetylphosphinate is the most potent mechanism-based substrate-like inhibitor of both the human and *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase components of the pyruvate

- dehydrogenase complex, *Bioorg. Chem.*, **34**, 362-379, doi: 10.1016/J.BIOORG.2006.09.001.
25. Artiukhov, A. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2016) Directed regulation of multienzyme complexes of 2-oxo acid dehydrogenases using phosphonate and phosphinate analogs of 2-oxo acids, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1498-1521, doi: 10.1134/S0006297916120129.
  26. Bunik, V. I., and Fernie, A. R. (2009) Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation, *Biochem. J.*, **422**, 405-421, doi: 10.1042/BJ20090722.
  27. Artiukhov, A. V., Aleshin, V. A., Karlina, I. S., Kazantsev, A. V., Sibiryakina, D. A., Ksenofontov, A. L., Lukashev, N. V., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2022) Phosphonate inhibitors of pyruvate dehydrogenase perturb homeostasis of amino acids and protein succinylation in the brain, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 13186, doi: 10.3390/IJMS232113186.
  28. Badhan, R. K. S., Kaur, M., Lungare, S., and Obuobi, S. (2014) Improving brain drug targeting through exploitation of the nose-to-brain route: a physiological and pharmacokinetic perspective, *Curr. Drug Deliv.*, **11**, 458-471, doi: 10.2174/1567201811666140321113555.
  29. Djupesland, P. G., Messina, J. C., and Mahmoud, R. A. (2014) The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview, *Ther. Deliv.*, **5**, 709-733, doi: 10.4155/tde.14.41.
  30. Pierozan, P., Jernerén, F., Ransome, Y., and Karlsson, O. (2017) The choice of euthanasia method affects metabolic serum biomarkers, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **121**, 113-118, doi: 10.1111/BCPT.12774.
  31. Suckow, M., Stevens, K., and Wilson, R. (2012) *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, Academic Press.
  32. Underwood, W., and Anthony, R. (2020) AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 edition.
  33. Aleshin, V. A., Graf, A. V., Artiukhov, A. V., Boyko, A. I., Ksenofontov, A. L., Maslova, M. V., Nogués, I., di Salvo, M. L., and Bunik, V. I. (2021) Physiological and biochemical markers of the sex-specific sensitivity to epileptogenic factors, delayed consequences of seizures and their response to vitamins B1 and B6 in rat model, *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**, 737, doi: 10.3390/ph14080737.
  34. Jackson, H. F., and Broadhurst, P. L. (1982) The effects of Parachlorophenylalanine and stimulus intensity on open-field test measures in rats, *Neuropharmacology*, **21**, 1279-1282, doi: 10.1016/0028-3908(82)90133-2.
  35. Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., and Landgraf, R. (1998) Behavioral profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour, *Behavioural. Brain Res.*, **94**, 301-310, doi: 10.1016/S0166-4328(97)00198-8.
  36. Aleshin, V. A., Mkrtychyan, G. V., Kaehne, T., Graf, A. V., Maslova, M. V., and Bunik, V. I. (2020) Diurnal regulation of the function of the rat brain glutamate dehydrogenase by acetylation and its dependence on thiamine administration, *Wiley Online Library*, **153**, 80-102, doi: 10.1111/jnc.14951.
  37. Tsepkova, P., Artiukhov, A., Boyko, A., Aleshin, V. A., Mkrtychyan, G. V., Zvyagintseva, M. A., Ryabov, S. I., Ksenofontov, A. L., Baratova, L. A., Graf, A. V., and Bunik, V. I. (2017) Thiamine induces long-term changes in amino acid profiles and activities of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in rat brain, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 723-736, doi: 10.1134/S0006297917060098.
  38. Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., and Edwards, R. A. (2004) Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining, *Anal. Biochem.*, **326**, 13-20, doi: 10.1016/J.AB.2003.10.047.
  39. Kim, E. Y., Kim, W. K., Kang, H. J., Kim, J. H., Chung, S. J., Seo, Y. S., Park, S. G., Lee, S. C., and Bae, K. H. (2012) Acetylation of malate dehydrogenase 1 promotes adipogenic differentiation via activating its enzymatic activity, *J. Lipid Res.*, **53**, 1864-1876, doi: 10.1194/JLR.M026567.
  40. Tong, W. H., Maio, N., Zhang, D. L., Palmieri, E. M., Ollivierre, H., Ghosh, M. C., McVicar, D. W., and Rouault, T. A. (2018) TLR-activated repression of Fe-S cluster biogenesis drives a metabolic shift and alters histone and tubulin acetylation, *Blood Adv*, **2**, 1146-1156, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2018015669.
  41. Hornbeck, P. V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D512-520, doi: 10.1093/nar/gku1267.
  42. Arumugam, R., Horowitz, E., Noland, R. C., Lu, D., Fleenor, D., and Freemark, M. (2010) Regulation of islet  $\beta$ -cell pyruvate metabolism: interactions of prolactin, glucose, and dexamethasone, *Endocrinology*, **151**, 3074-3083, doi: 10.1210/EN.2010-0049.
  43. Consitt, L. A., Saxena, G., Saneda, A., and Houmard, J. A. (2016) Age-related impairments in skeletal muscle PDH phosphorylation and plasma lactate are indicative of metabolic inflexibility and the effects of exercise training, *J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **311**, E145-156, doi: 10.1152/ajpendo.00452.2015.
  44. Hossain, A. J., Islam, R., Kim, J.-G., Dogsom, O., Cap, K. C., and Park, J.-B. (2022) Pyruvate dehydrogenase A1 phosphorylated by insulin associates with pyruvate kinase M2 and induces LINC00273 through histone acetylation, *Biomedicines*, **10**, 1256, doi: 10.3390/BIOMEDICINES10061256.
  45. Denton, R. M., McCormack, J. G., Rutter, G. A., Burnett, P., Edgell, N. J., Moule, S. K., and Diggie, T. A. (1996) The hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase complex, *Adv. Enzyme Regul.*, **36**, 183-198, doi: 10.1016/0065-2571(95)00020-8.



46. Kim, W., and Kaelin, J. W. G. (2003) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer, *Curr. Opin. Genet Dev.*, **13**, 55-60, doi: 10.1016/S0959-437X(02)00010-2.
47. Li, X., Jiang, Y., Meisenhelder, J., Yang, W., Hawke, D. H., Zheng, Y., Xia, Y., Aldape, K., He, J., Hunter, T., Wang, L., and Lu, Z. (2016) Mitochondria-translocated PGK1 functions as a protein kinase to coordinate glycolysis and the TCA cycle in tumorigenesis, *Mol. Cell*, **61**, 705-719, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2016.02.009.
48. Nie, H., Ju, H., Fan, J., Shi, X., Cheng, Y., Cang, X., Zheng, Z., Duan, X., and Yi, W. (2020) O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth, *Nat. Commun.*, **11**, 36, doi: 10.1038/S41467-019-13601-8.
49. Guan, J. S., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J. H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T. J. F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J. E., DePinho, R. A., Jaenisch, R., and Tsai, L. H. (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity, *Nature*, **459**, 55-60, doi: 10.1038/NATURE07925.
50. Li, X., Zhang, J., Li, D., He, C., He, K., Xue, T., Wan, L., Zhang, C., and Liu, Q. (2021) Astrocytic ApoE reprograms neuronal cholesterol metabolism and histone-acetylation-mediated memory, *Neuron*, **109**, 957-970.e8, doi: 10.1016/J.NEURON.2021.01.005.
51. Stilling, R. M., and Fischer, A. (2011) The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease, *Neurobiol. Learn Mem.*, **96**, 19-26, doi: 10.1016/J.NLM.2011.04.002.
52. Shields, G. S., Sazma, M. A., McCullough, A. M., and Yonelinas, A. P. (2017) The effects of acute stress on episodic memory: A meta-analysis and integrative review, *Psychol. Bull.*, **143**, 636-675, doi: 10.1037/BUL0000100.
53. Goldfarb, E. V. (2019) Enhancing memory with stress: Progress, challenges, and opportunities, *Brain Cogn.*, **133**, 94-105, doi: 10.1016/J.BANDC.2018.11.009.

## ACYLATION OF THE RAT BRAIN PROTEINS IS AFFECTED BY THE INHIBITION OF PYRUVATE DEHYDROGENASE *in vivo*

V. A. Aleshin<sup>1,2</sup>, D. A. Sibiryakina<sup>3</sup>, A. V. Kazantsev<sup>1,4</sup>, A. V. Graf<sup>1,3</sup>, and V. I. Bunik<sup>1,2,5\*</sup>

<sup>1</sup> A. N. Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Department of Biokinetics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: bunik@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Sechenov University, 119048 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Organism adaptation to metabolic challenges requires coupling of metabolism to gene expression. In this regard, acylations of histones and metabolic proteins acquire significant interest. We hypothesize that adaptive response to inhibition of a key metabolic process, catalyzed by the acetyl-CoA-generating pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, is mediated by changes in the protein acylations. The hypothesis is tested by intranasal administration to animals of PDH-specific inhibitors acetyl(methyl)phosphinate (AcMeP) or acetylphosphonate methyl ester (AcPMe), followed by the assessment of physiological parameters, brain protein acylation, and expression/phosphorylation of PDHA subunit. At the same dose, AcMeP, but not AcPMe, decreases acetylation and increases succinylation of the brain proteins with apparent molecular masses of 15-20 kDa. Regarding the proteins of 30-50 kDa, a strong inhibitor AcMeP affects acetylation only, while a less efficient AcPMe mostly increases succinylation. The unchanged succinylation of the 30-50 kDa proteins after the administration of AcMeP coincides with the upregulation of desuccinylase SIRT5. No significant differences between the levels of brain PDHA expression, PDHA phosphorylation, parameters of behavior or ECG are observed in the studied animal groups. The data indicate that the short-term inhibition of brain PDH affects acetylation and/or succinylation of the brain proteins, that depends on the inhibitor potency, protein molecular mass, and acylation type. The homeostatic nature of these changes is implied by the stability of physiological parameters after the PDH inhibition.

**Keywords:** brain protein acetylation, brain protein succinylation, phosphonate/phosphinate analog of pyruvate, pyruvate dehydrogenase, sirtuin