

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА  
НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО  
*На правах рукописи*

**Медведева Мария Витальевна**

**S-нитрозилирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы**

1.1.10 - Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
д.б.н., профессор Муронец Владимир Израилевич  
к.б.н., доцент Шмальгаузен Елена Викторовна

Москва – 2024

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b> .....	<b>2</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	<b>6</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>8</b>
1. Актуальность проблемы.....	8
2. Степень разработанности темы.....	9
3. Цели и задачи.....	12
4. Объект и предмет исследования.....	13
5. Научная новизна.....	13
6. Теоретическая и практическая значимость.....	14
7. Методология исследования.....	14
8. Положения, выносимые на защиту.....	15
9. Степень достоверности данных.....	16
10. Личный вклад автора.....	16
11. Публикации по теме диссертации.....	16
12. Аprobация результатов.....	18
13. Структура диссертации.....	18
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>19</b>
1. Свойства ГАФД.....	19
1.1. Ген ГАФД.....	19
1.2. Строение ГАФД.....	20
1.3. Активный центр ГАФД человека.....	21
1.4. Дегидрогеназная активность.....	23
1.5. Ацилфосфатазная активность.....	27
1.6. Роль дегидрогеназной и ацилфосфатазной активностей ГАФД в регуляции метаболизма.....	28
2. Посттрансляционные модификации ГАФД.....	30
2.1. Влияние окисления цистеиновых остатков ГАФД на каталитические свойства фермента.....	32
2.2. S-нитрозилирование ГАФД.....	34
2.3. Глутатионилирование ГАФД.....	36
2.4. Последствия посттрансляционных модификаций ГАФД: апоптоз.....	38
3. Взаимодействие ГАФД с актином.....	43
3.1. Свойства актина.....	44
3.2. Взаимодействие ГАФД с актином.....	45
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	<b>49</b>
<b>МАТЕРИАЛЫ</b> .....	<b>49</b>
<b>МЕТОДЫ</b> .....	<b>51</b>
1. Получение препаратов белков.....	51
1.1. Выделение ГАФД из мышц кролика.....	51
1.2. Выделение человеческой рекомбинантной соматической глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.....	52
1.3. Выделение мутантной человеческой рекомбинантной соматической глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека C156S.....	56
1.4. Хранение препаратов ГАФД.....	56

1.5 Подготовка ГАФД перед экспериментами.....	56
1.6 Концентрация белка.....	57
<b>2 Определение активности ферментов.....</b>	<b>57</b>
2.1 Определение дегидрогеназной активности ГАФД.....	57
2.2 Определение ацилфосфатазной активности ГАФД.....	58
2.3 Определение активности каталазы.....	58
<b>3 Определение концентрации реагентов.....</b>	<b>59</b>
3.1 Концентрация DEANO (донора NO).....	59
3.2 Концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	59
3.3. Концентрация восстановленного глутатиона (GSH).....	59
3.4. Концентрация NAD <sup>+</sup> .....	59
3.5. Приготовление и определение концентрации 3-ФГА.....	60
<b>4. Получение S-глутатионилированной ГАФД.....</b>	<b>60</b>
<b>5. Модификация ГАФД окисью азота и характеристика препаратов модифицированной ГАФД.....</b>	<b>61</b>
5.1. Получение S-нитрозилированной ГАФД.....	61
5.2. Количественное определение модифицированных цистеинов методом Элмана.....	61
5.3. Количественное определение S-нитрозотиолов в S-нитрозилированной ГАФД методом Сэвилла-Грисса.....	62
<b>6. Сравнительный анализ S-глутатионилированной ГАФД и S-нитрозилированной ГАФД.....</b>	<b>63</b>
6.1. Исследование обратимости модифицированной ГАФД.....	63
6.2. Исследование термостабильности методом S-глутатионилированной и S-нитрозилированной ГАФД дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).....	63
6.3. Исследование скорости трипсинолиза нативной и модифицированной ГАФД.....	64
<b>7. Методы анализа белков.....</b>	<b>64</b>
7.1. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-электрофорез).....	64
7.2. Иммуноблоттинг.....	65
7.3. Точечный иммуноблоттинг.....	66
7.4. Спектроскопия кругового дихроизма.....	66
7.5. MALDI-TOF-масс-спектрометрия.....	67
7.6. Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ESI-MS).....	68
<b>8. Эксперименты на эукариотических клетках линии НЕК 293Т.....</b>	<b>69</b>
8.1. Культивирование клеток НЕК 293Т.....	69
8.2. Подсчёт клеток.....	70
8.3. Инкубация клеток в присутствии H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> и донора NO.....	70
8.4. Проточная цитометрия.....	70
8.5. Получение клеточных лизатов.....	72
8.6. Измерение активности ГАФД в клеточных лизатах.....	73
8.7. Обнаружение S-глутатионилированных белков в клеточных лизатах с помощью иммунопреципитации с антителами против GSH.....	73
8.8. Обнаружение сульфенированных белков в клеточных лизатах.....	74
<b>9. Влияние H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NO на взаимодействие ГАФД с белками-партнёрами.....</b>	<b>75</b>
9.1. Иммунопреципитация комплекса ГАФД с белками-партнёрами из клеточных лизатов.....	75
9.2. Исследование взаимодействия между ГАФД и альфа-актином с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).....	76

9.3. Получение S-нитрозилированного актина.....	77
9.4. Транснитрозилирование между ГАФД-SNO и G-актином: обнаружение методом иммуноблотинга.....	78
9.5. Идентификация сульфенированных остатков цистеина в G-актине с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа.....	78
9.6. MALDI-TOF-масс-спектрометрия проб актина после транснитрозилирования с ГАФД-SNO.....	79
<b>10. Статистическая обработка.....</b>	<b>80</b>
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>82</b>
<b>1. Получение препаратов белков.....</b>	<b>82</b>
1.1. Выделение ГАФД из мышц кролика.....	82
1.2. Выделение человеческой рекомбинантной ГАФД дикого типа.....	82
1.3. Рентгеноструктурный анализ.....	85
<b>2. Модификация ГАФД из мышц кролика окисью азота.....</b>	<b>87</b>
2.1. Дегидрогеназная и ацилфосфатазная активности кроличьей ГАФД в присутствии донора NO.....	87
2.2. Подтверждение образования цистеинсульфеновой кислоты в активном центре ГАФД.....	89
2.3. Оценка содержания ГАФД-SOH в ГАФД после инкубации с DEANO.....	94
2.4. Обнаружение S-нитрозилированной ГАФД (ГАФД-SNO).....	99
2.5. Количественная оценка ГАФД-SNO после модификации ГАФД с DEANO.....	101
2.6. Взаимосвязь между различными модификациями каталитического цистеина в ГАФД.....	102
<b>3. Модификация рекомбинантной ГАФД человека.....</b>	<b>104</b>
3.1. Сравнение ГАФД дикого типа и мутантной формы ГАФД с заменой C156S.....	104
3.1.1. Дегидрогеназная и ацилфосфатазная активность ГАФД дикого типа и мутантной формы C156S в присутствии донора NO.....	104
3.1.2. Количественная оценка содержания нитрозотиолов (SNO) в ГАФД дикого типа и ГАФД C156S после модификации с DEANO методом Сэвилла-Грисса.....	107
3.2. Сравнение нативной и нитрозилированной ГАФД методом кругового дихроизма.....	109
<b>4. Сравнительное исследование S-нитрозилированной и S-глутатионилированной ГАФД.....</b>	<b>110</b>
4.1. Сравнение термостабильности S-нитрозилированной и S-глутатионилированной ГАФД.....	110
4.2. Влияние модификаций ГАФД на расщепление её трипсином.....	112
4.3. Обратимость S-нитрозилирования и S-глутатионилирования ГАФД.....	115
<b>5. Взаимосвязь между S-нитрозилированием и S-глутатионилированием.....</b>	<b>118</b>
5.1. Цистеинсульфеновая кислота способствует S-глутатионилированию белков.....	118
5.2. Детекция сульфенированных белков в клеточных лизатах.....	119
5.3. Детекция S-глутатионилированных белков в клеточных лизатах.....	123
5.4. Иммунопреципитация S-глутатионилированных белков в клеточных лизатах.....	129
<b>6. Влияние H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NO на клетки НЕК 293Т.....</b>	<b>133</b>
6.1. Детекция апоптоза в клетках методом проточной цитометрии.....	134
<b>7. Взаимодействие ГАФД с актином.....</b>	<b>139</b>
7.1. Поиск белков-партнёров ГАФД методом иммунопреципитации с антителами к ГАФД.....	139
7.2. Иммунопреципитация белковых комплексов с антителами к актину.....	142
7.3. Сравнение последовательностей глобулярного (G-) и фибриллярного (F-) актина человека и кролика.....	143
7.4. Исследование комплекса ГАФД с глобулярным (G-) и фибриллярным (F-) актином из мышц кролика методом иммуноферментного анализа (ИФА).....	144
7.5. Оценка денитрозилирования ГАФД в присутствии актина по восстановлению дегидрогеназной активности и анализу содержания NO методом Сэвилла-Грисса.....	146

7.6. Проверка гипотезы о переносе NO-группы с ГАФД-SNO на актин методом иммуноблоттинга.....	151
7.7. Идентификация сульфенированного остатка цистеина в актине после инкубации с ГАФД-SNO. .	153
7.8. Возможная роль взаимодействия ГАФД и актина.....	157
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>160</b>
<b>ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....</b>	<b>163</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>	<b>165</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>166</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<b>АДФ</b>	аденозиндифосфат
<b>АТФ</b>	аденозинтрифосфат
<b>АФА</b>	активные формы азота
<b>АФК</b>	активные формы кислорода
<b>БП</b>	болезнь Паркинсона
<b>БСА</b>	бычий сывороточный альбумин
<b>1,3-БФГ</b>	1,3-бисфосфоглицерат
<b>ГАФД</b>	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
<b>ДНК</b>	дезоксирибонуклеиновая кислота
<b>ДСК</b>	дифференциальная сканирующая калориметрия
<b>ДСН</b>	додецилсульфат натрия
<b>ДТНБ</b>	5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная) кислота
<b>ДТТ</b>	дитиотреитол
<b>КД</b>	круговой дихроизм
<b>МЕ</b>	$\beta$ -меркаптоэтанол
<b>ПААГ</b>	полиакриламидный гель
<b>ТРИС</b>	трис(гидроксиметил)аминометан
<b>3-ФГА</b>	3-фосфоглицериновый альдегид
<b>ЭДТА</b>	этилендиаминтетрауксусная кислота
<b>DAPI</b>	4',6-диамидино-2-фенилиндол
<b>ELISA</b>	твердофазный иммуноферментный анализ
<b>ESI</b>	ионизация распылением в электрическом поле
<b>FITC</b>	флуоресцеинизотиоцианат

<b>MALDI-TOF</b>	матрично-активированная лазерная десорбционная ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия
<b>NAD<sup>+</sup></b>	никотинамидадениндинуклеотид (окисленный)
<b>NADH</b>	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)
<b>PBS</b>	фосфатно-солевой буфер
<b>PBST</b>	фосфатно-солевой буфер с добавлением к нему детергента Tween 20 до конечной концентрации 0,05%
<b>SD</b>	стандартное отклонение

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **1. Актуальность проблемы**

Оксид азота (NO) играет важную роль в регуляции многих процессов, происходящих в живых организмах. Изучению воздействия NO как на отдельные белки, так и на жизнедеятельность клеток и функционирование тканей и органов посвящено большое количество работ [1,2]. Известно, что NO может приводить к трём основным модификациям белков – S-нитрозилированию/окислению сульфгидрильных групп остатков цистеина (Cys-SNO) [3], нитрованию остатков тирозина (Tyr-NO<sub>2</sub>) [4] и нитрованию триптофана (Trp-NO<sub>2</sub>) [5]. Однако, многие аспекты влияния NO на белки остаются мало исследованными прежде всего из-за нестабильности главного продукта их модификации при S-нитрозилировании сульфгидрильных групп цистеиновых остатков.

Мы выбрали глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФД) в качестве объекта для изучения продуктов действия NO и определения соотношения между продуктами S-нитрозилирования/окисления сульфгидрильных групп остатков цистеина, а также воздействия двух типов модификации на свойства белка.

ГАФД является ключевым ферментом гликолиза и выполняет ряд важных функций в клеточном метаболизме. Одним из важных аспектов ГАФД является её способность подвергаться различным посттрансляционным модификациям, таким как окисление, S-нитрозилирование и глутатионилирование [6]. Эти модификации существенно изменяют активность и функциональные свойства ГАФД, что, в свою очередь, влияет на её роль в метаболических и клеточных процессах [7].

S-нитрозилирование участвует в регуляции разнообразных клеточных процессов, включая апоптоз. Известно, что апоптоз сопровождается перемещением ГАФД из цитоплазмы в клеточное ядро [8,9]. Предполагается, что развитие апоптоза индуцируется S-нитрозилированием ГАФД, однако до сих пор непонятны молекулярные механизмы, которые вызывают перемещение ГАФД в ядро, как непонятны и механизмы воздействия S-нитрозилирования на каталитическую активность фермента.

Актуальность представляет и исследование роли модифицированной ГАФД в патогенезе. Информация об особенностях модификации ГАФД оксидом азота и роли этого процесса в индукции апоптоза позволит установить неизвестный до сих пор механизм действия одного из лекарственных препаратов против болезни Паркинсона, мишенью для которого является ГАФД. Данный препарат - производное депренила, ингибирует активность NO-синтаз [10] и обладает анти-апоптотической активностью [11]. В 2022 году появились публикации о связи S-нитрозилирования ГАФД и саркопении (возрастном снижении мышечной массы) через апоптотические механизмы [12,13]. Таким образом, понимание механизмов S-нитрозилирования ГАФД открывает новые возможности для создания лекарств и использования модификаций фермента для терапии различных заболеваний.

## **2. Степень разработанности темы**

Исторически внимание к ГАФД сосредоточивалось на её основной каталитической активности и структуре. Исследования фермента начались ещё в 1950-х годах [14], начиная с 1975-х годов стали активно изучаться некаталитические свойства ГАФД, в том числе S-нитрозилирование ГАФД [15]. Инактивация ГАФД под действием NO была показана различными научными группами [16–20]. Впрочем, в ранних работах не было единого

мнения относительно продукта модификации ГАФД. Сначала было установлено, что инкубация ГАФД в присутствии тринитроглицерина приводит к образованию цистеинсульфеновой кислоты в активном центре [16]. Затем появилось несколько работ, в которых были показаны ковалентные модификации ГАФД нуклеотидами в присутствии NO, а именно ADP-рибозилирование [21,22] и ковалентное присоединение NAD<sup>+</sup> [23]. Однако, как было установлено позже, ковалентная модификация нуклеотидами не имела отношения к обратимой инактивации ГАФД, наблюдаемой под действием NO. Было высказано предположение, что основным механизмом инактивации ГАФД является обратимое S-нитрозилирование каталитического цистеина [20,24]. Впоследствии было показано, что мутация каталитического цистеинового остатка предотвращает модификацию ГАФД под действием NO, что подтвердило участие каталитического остатка цистеина в модификации [25]. Стоит заметить, что в этой работе, как и во всех последующих, ГАФД-SNO определяли с помощью анализа биотин-свитч. Считалось, что ГАФД-SNO не может быть обнаружена ни методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, ни методом ESI-масс-спектрометрии, поскольку лабильная связь S-NO расщепляется в процессе ионизации [25]. Существование стабильной S-нитрозилированной ГАФД прямым методом не было подтверждено на момент начала работы над диссертацией.

Среди упомянутых негликолитических функций ГАФД наибольший интерес представляет возможное участие фермента в развитии апоптоза. В 1996 г. было высказано предположение об участии ГАФД в апоптозе, инициированном релокацией фермента в ядро [24,26]. Однако, чем именно объясняется миграция ГАФД в ядро не ясно до сих пор. Существует несколько гипотез относительно механизма ядерной транслокации ГАФД. Согласно одной из них ГАФД нитрозилируется NO по каталитическому остатку цистеина, что приводит к инактивации белка и конформационным

изменениям в его молекуле. Эти изменения облегчают связывание ГАФД с E3-убиквитин-лигазой Siah1, которая обладает сигналом ядерной локализации (NLS) и транслоцирует ГАФД в ядро [27]. Тем не менее молекулярные механизмы этого сигнального пути на данный момент детально не установлены: отсутствуют прямые доказательства взаимодействия ГАФД и Siah1, не доказана возможность образования комплексов NO-модифицированной ГАФД с белками-партнёрами.

Существует также точка зрения, что инициация апоптоза может быть опосредована S-глутатионированием ГАФД [28]. В соответствии с этими гипотезами, S-нитрозилирование или S-глутатионилирование ГАФД вызывает её перемещение в ядро, где запускается каскад реакций, приводящих к апоптозу. Таким образом, каждая из этих модификаций может быть вовлечена в регуляцию клеточных процессов. Однако, до сих пор неизвестно, как эти модификации влияют на структуру и свойства ГАФД, какими особенностями обладает каждая из них и существует ли связь между этими модификациями.

### 3. Цели и задачи

**Целью** данной работы является выяснение механизма S-нитрозилирования ГАФД и последствий окислительного и нитрозативного стресса для взаимодействия ГАФД с другими белками.

Для реализации этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать влияние модификации ГАФД окисью азота на каталитические свойства фермента;
2. Идентификация продуктов S-нитрозилирования ГАФД;
3. Сравнение модификации ГАФД дикого типа и ГАФД с заменой C156S;
4. Сравнение свойств S-нитрозилированной и S-глутатионилированной ГАФД;
5. Анализ апоптотического воздействия  $H_2O_2$  и NO на клетки НЕК 293Т;
6. Обнаружение S-сульфенированных и S-глутатионилированных белков в лизатах клеток после инкубации в присутствии  $H_2O_2$  и NO;
7. Идентификация белков, взаимодействующих с модифицированной ГАФД, после окислительного и нитрозативного стресса.

#### 4. Объект и предмет исследования

**Объектом исследования** были нативная ГАФД, модифицированная оксидом азота ГАФД, клетки линии НЕК 293Т.

**Предметом исследования** была идентификация продуктов нитрозилирования ГАФД, дегидрогеназная и ацилфосфатазная активности модифицированных форм фермента, детекция S-сульфенированных и S-глутатионилированных белков в клеточных лизатах.

#### 5. Научная новизна

Впервые детектированы формы ГАФД-SNO и ГАФД-SOH (с использованием реагента на сульфеновую кислоту, димедон) после инкубации с донором NO методами ESI и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Установлено количественное распределение продуктов NO-модификации ГАФД: число модифицированных остатков цистеина при нитрозилировании составляет 3,3 на тетрамер ГАФД. При этом включение NO в молекулу ГАФД с образованием ГАФД-SNO составляет 2,3 моль/моль тетрамера ГАФД. Следовательно, содержание цистеинсульфеновой кислоты не превышает 1 моль/моль тетрамера ГАФД. Была предложена схема образования продуктов модификации ГАФД: в присутствии донора NO ГАФД нитрозилируется по остатку цистеина активного центра, превращаясь в нитрозилированную форму ГАФД-SNO, которая гидролизуеться до цистеинсульфеновой кислоты ГАФД-SOH. Окисление остатков цистеина приводит к дальнейшей реакции ГАФД с восстановленным глутатионом (GSH) с образованием глутатионилированной ГАФД - ГАФД-SSG.

Предложенная схема подтверждалась экспериментами на клеточной культуре НЕК 293Т. Было продемонстрировано, что NO, подобно H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, приводит к сульфенированию ГАФД и бета-актина, что способствует их

реакции с клеточным GSH с образованием соответствующих S-глутатионилированных белков.

## **6. Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты расширяют теоретические представления о механизмах модификации ГАФД донором NO и дополняют предложенные гипотезы участия модифицированной ГАФД в апоптозе.

Полученные данные по влиянию модификации  $H_2O_2/NO$  на ферментативную активность фермента и способности к реактивации модифицированной ГАФД в присутствии восстановителей могут быть использованы для объяснения эффективности одного из препаратов против болезни Паркинсона (производного депренила), а также могут применяться для разработки терапевтических агентов для предупреждения саркопении.

## **7. Методология исследования**

В исследовании были использованы биохимические, физико-химические и биоинформатические методы, методы работы с культурами клеток млекопитающих для проведения экспериментальных исследований и рентгеноструктурный анализ. Все использованные методики были применены в соответствии с общепринятыми мировыми стандартами и с надлежащими контролями. Методы выделения ГАФД из мышц кролика, рекомбинантной ГАФД человека из *Escherichia coli*, измерения активности ГАФД были разработаны и ранее апробированы коллективом лаборатории.

## 8. Положения, выносимые на защиту

1. Идентифицированы основные продукты модификации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) оксидом азота (NO): S-нитрозилированная форма (ГАФД-SNO) и S-сульфенированная форма (ГАФД-SOH), образующаяся в результате гидролиза ГАФД-SNO. Инкубация ГАФД с донором оксида азота (DEANO) приводит к инактивации фермента вследствие модификации каталитического остатка цистеина (Cys152).

2. Инкубация клеток НЕК 293Т с  $H_2O_2$  или DEANO приводит к накоплению S-сульфенированных ГАФД и бета-актина с их последующим взаимодействием с клеточным восстановленным глутатионом с образованием соответствующих S-глутатионилированных белков.

3. S-нитрозилирование и S-глутатионилирование ГАФД не только инактивируют фермент, но и уменьшают его термостабильность и повышают чувствительность к расщеплению трипсином. S-глутатионилированная ГАФД практически не подвергается деглутатионилированию при физиологических значениях pH; в отличие от S-нитрозилированной ГАФД, которая легко денитрозилируется. Следовательно, S-глутатионилированная ГАФД может накапливаться в клетках.

4. Образование комплекса между ГАФД и актином обнаружено как в лизатах клеток НЕК 293Т, так и при изучении изолированных белков. При образовании комплекса между S-нитрозилированной ГАФД и актином происходит перенос NO-группы с цистеина активного центра ГАФД на цистеиновый остаток актина (транснаитрозилирование), что сопровождается реактивацией ГАФД и сульфенированием актина по остатку Cys374.

## **9. Степень достоверности данных**

Обзор литературы подготовлен с использованием актуальных публикаций по теме диссертации. Данные, представленные в работе, получены с использованием современных молекулярно-биологических и биохимических методик и воспроизводимы. Для выявления значимых отличий между выборками была проведена статистическая обработка результатов с помощью программного пакета GraphPad Prism. Основные результаты опубликованы в международных рецензируемых журналах.

## **10. Личный вклад автора**

Основные результаты работы были получены самим автором. Личный вклад заключается в анализе научной литературы, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке статей к публикации, участии в научных конференциях. Ведение клеток и измерения на цитофлуориметре проводились при участии Д.В. Поздышева; структура ГАФД была получена и добавлена в базу данных PDB В.Р. Самыгиной; дифференциальная сканирующая калориметрия была проведена С.Ю. Клейменовым; MALDI-TOF масс-спектрометрию проводила М.В. Серебрякова; ESI масс-спектрометрию проводил В.В. Чаговец; альфа-актин из мышц кролика был предоставлен А.М. Матюшенко.

## **11. Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликованы 3 экспериментальные и 3 обзорные статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science, Scopus, РИНЦ.

1. E.V. Schmalhausen, **M.V. Medvedeva**, V.I. Muronetz (2024) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **V. 758**, P. 110065; JIF (для WoS) = 3,8, Q1 - (0,5 / 0,15)<sup>1</sup> (review).
2. В.И. Муронец, **М.В. Медведева**, Е.В. Шмальгаузен (2024) Посттрансляционные модификации сульфгидрильной группы цистеинового остатка глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*, **т. 65**, № 2, С. 128-135; SJR (для Scopus) = 0,104, Q4 - (0,5 / 0,15)<sup>1</sup> (обзор).
3. **M.V. Medvedeva**, S.Yu. Kleimenov, V.R. Samygina, V.I. Muronetz, E.V. Schmalhausen (2023) S-nitrosylation and S-glutathionylation of GAPDH: Similarities, differences, and relationships // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **V. 1867**, № 9, P. 130418; JIF (для WoS) = 2,8, Q1 - (1,75 / 1,05)<sup>1</sup>.
4. K.V. Barinova, M.V. Serebryakova, A.K. Melnikova, **M.V. Medvedeva**, V.I. Muronetz, E.V. Schmalhausen (2023) Mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the presence of methylglyoxal // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **V. 733**, P. 109485; JIF (для WoS) = 3,8, Q1 - (0,56 / 0,09)<sup>1</sup>.
5. E.V. Schmalhausen, **M.V. Medvedeva**, M.V. Serebryakova, V.V. Chagovers, V.I. Muronetz (2022) Products of S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Relation between S-nitrosylation and oxidation // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **V. 1866**, № 1, P. 130032; JIF (для WoS) = 2,8, Q1 - (0,68 / 0,23)<sup>1</sup>.
6. V.I. Muronetz, **M.V. Medvedeva**, I.A. Sevostyanova, E.V. Schmalhausen (2021) Modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with nitric oxide: role in signal transduction and development of apoptosis // *Biomolecules*, **V. 11**, № 11, P. 1656; JIF (для WoS) = 4,8, Q1 - (0,81 / 0,21)<sup>1</sup> (review).

---

<sup>1</sup> В скобках приведён объём публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

## **12. Апробация результатов**

Результаты работы были представлены на международных конференциях:

«13-я Международная научная конференция Биокатализ» (Россия, Суздаль, 2023), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» (Россия, Москва, 2023).

## **13. Структура диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, основных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 188 страницах, иллюстрирована 55 рисунками, 1 схемой и 7 таблицами. Список цитируемой литературы включает 204 наименования.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. Свойства ГАФД

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) - фермент класса оксидоредуктаз (код фермента 1.2.1.12), катализирующий гликолитическую реакцию субстратного фосфорилирования с образованием макроэргического соединения 1,3-бисфосфоглицерата и NADH (рис. 2): 3-фосфоглицериновый альдегид + NAD<sup>+</sup> + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 1,3-бисфосфоглицерат + NADH + H<sup>+</sup>

#### 1.1. Ген ГАФД

У человека встречается две изоформы ГАФД: соматическая изоформа и спермоспецифическая ГАФДс. Соматическая ГАФД кодируется геном на 12 хромосоме с координатами 12p13.31 и представлена на двух аллелях в каждой соматической клетке. В то время как паралог ГАФД в сперматозоидах (ГАФДс) кодируется другим геном и представлен только одним аллелем из-за гаплоидности половых клеток. Ген соматической ГАФД человека содержит 9 экзонов и 8 интронов, транскрибируется без альтернативного сплайсинга в одну мРНК, кодирующую пептид длиной в 335 а.о. [29].

Интересно, что помимо конститутивных участков в промоторе гена соматической ГАФД есть цис-регуляторные элементы, которые индуцируются, например, гипоксией [30], инсулином [31], глутамином [32] и клеточной дифференциацией. Исследования содержания мРНК ГАФД в разных тканях крыс показали уменьшение концентрации мРНК ГАФД в ряду: мышцы>сердце>мозг>почка>печень. Соотношения количества белка ГАФД, определённые методом вестерн-блоттинга, были примерно такими же: мышцы>сердце>мозг=почка=печень [33]. Суммарно ГАФД составляет

до 5-25% от содержания растворимых белков клетки, это примерно 0,4 мкМ для большинства тканей [34] и 75 мкМ для скелетной мышцы [29].

## 1.2. Строение ГАФД

Соматическая ГАФД человека представляет собой гомотетрамер молекулярной массой ~144 кДа, состоящий из 4-х идентичных субъединиц длиной в 335 а.о. и весом в 36 кДа [35] (рис. 1). Изоэлектрическая точка белка составляет 8,3. Субъединица ГАФД состоит из 2-х доменов: 1-150 а.о. фермента образуют  $\text{NAD}^+$  связывающий домен и 150-335 а.о. составляют каталитический домен, отвечающий за связывание субстрата и катализ (рис. 1).

Н-концевой  $\text{NAD}^+$  связывающий домен (1-150 а.о.) имеет классическую укладку Россмана: состоит из 6 параллельных бета-листов, фланкированных с двух сторон альфа-спиралями.  $\text{NAD}^+$  в каждой из 4-х субъединиц связывается ближе к центру тетрамера и взаимодействует с областью анти-параллельных бета-листов (180-201 а.о.). При стандартном выделении ГАФД содержит от 3 до 4 молей  $\text{NAD}^+$  на 1 моль тетрамера [36]. На тетрамер ГАФД приходится 4 высокорезактивные сульфгидрильные группы Cys152 готовые к катализу, по одной на мономер ГАФД. И ещё по одному Cys156 в активном центре каждой субъединицы.

С-концевой каталитический домен (151-335 а.о.) содержит 8 анти-параллельных бета-листов, которые формируют межсубъединичные контакты, с одной стороны от которых располагаются 4 альфа-спирали (148-167, 202-217, 216-268, 314-335 а.о.), последняя из которых ассоциирована с  $\text{NAD}^+$  связывающим доменом так, что С-терминальный остаток расположен близко к N-концу. В С-концевой области ГАФД большинства млекопитающих есть два цистеиновых остатка: Cys247 и Cys284. В человеческой ГАФД один из остатков (Cys284) заменён на остаток серина.

Нет информации об образовании межсубъединичных или межмолекулярных дисульфидных связей в нативной ГАФД, однако они могут появиться после разворачивания полипептидных цепей [37,38]. Предполагается, что межмолекулярные дисульфидные связи между развёрнутыми полипептидными цепями ГАФД играют решающую роль в агрегации фермента в условиях окислительного стресса [37,39].

### 1.3. Активный центр ГАФД человека

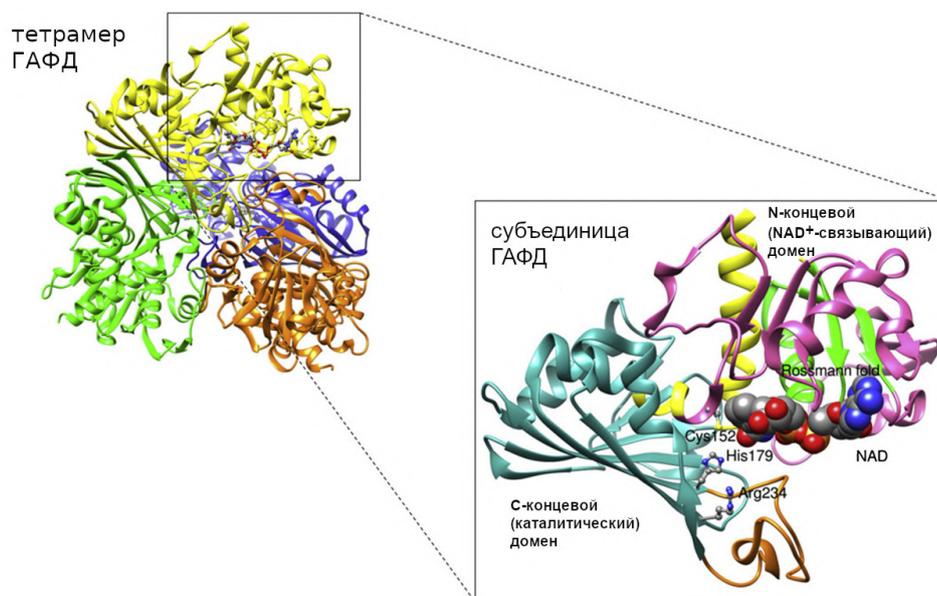
Активный центр каждого мономера располагается в углублении между двумя доменами, в котором во время химической реакции располагаются 3-фосфоглицериновый альдегид,  $\text{NAD}^+$ , фосфат-ион, в связывании которых принимают участие консервативные остатки Asp35, Cys152, His179, Thr182, Thr-211, Arg234, Tyr-314 и Tyr320 [40] (рис. 1). Активный центр ГАФД в пределах мотива STTNCLAPLAKV (рис. 1) является высококонсервативным (у млекопитающих единственным исключением является ГАФД из *Mesocricetus auratus* (золотистый хомячок), который имеет последовательность STTTC) [29].

Цистеин активного центра (Cys152) располагается на N-конце первой альфа-спирали каталитического домена [41]. Интересно, что модификация ГАФД йодоацетатом или йодоацетамидом модифицирует только один каталитически активный остаток цистеина Cys152 на одну белковую субъединицу, остальные цистеины остаются интактными [42,43]. Присутствие  $\text{NAD}^+$  в активном центре и образование ионной пары каталитического цистеина ГАФД Cys152 с соседним остатком His179 приводит к депротонированию Cys152, снижая его рК до 5,5 (стандартный рК цистеина 8,0), что облегчает нуклеофильную атаку 3-фосфоглицеринового альдегида тиолат-анионом [44]. По этой причине Cys152 обладает повышенной реакционной способностью по сравнению с

другими цистеинами и легко подвергается различным модификациям при физиологических значениях pH.

Помимо цистеина активного центра Cys152, ещё два цистеина Cys156 и Cys247 присутствуют в каждой субъединице фермента. В нативной ГАФД все цистеины находятся в восстановленном состоянии и не формируют внутримолекулярные дисульфидные связи. Cys156 располагается близко к активному центру, где может образовывать S-S мостик с Cys152 при денатурации, в то время как Cys247 находится далеко от поверхности белковой глобулы и недоступен для модификаций [45].

Второй цистеин активного центра Cys156 также консервативен для большинства организмов, и до настоящего времени его роль оставалась неясной. В некоторых бактериальных ГАФД (например, в бактериях рода *Thermus*) Cys154 заменён на серин, что позволяет предположить, что он не участвует в катализе. Согласно последним исследованиям, проведённым на человеческой рекомбинантной ГАФД, Cys156 избирательно повышает реакционную способность цистеина активного участка (Cys152) по отношению к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> за счёт образования сети водородных связей (протонное реле) с Thr153 и Tyr 314. Мутация C156S в ГАФД человека значительно увеличивает устойчивость фермента к перекиси водорода и к S-глутатионированию, при этом не влияет на саму реакционную способность фермента [46].



**Рис. 1. Строение ГАФД человека, полученное методом рентгенструктурного анализа (PDB ID: 1U8F).**

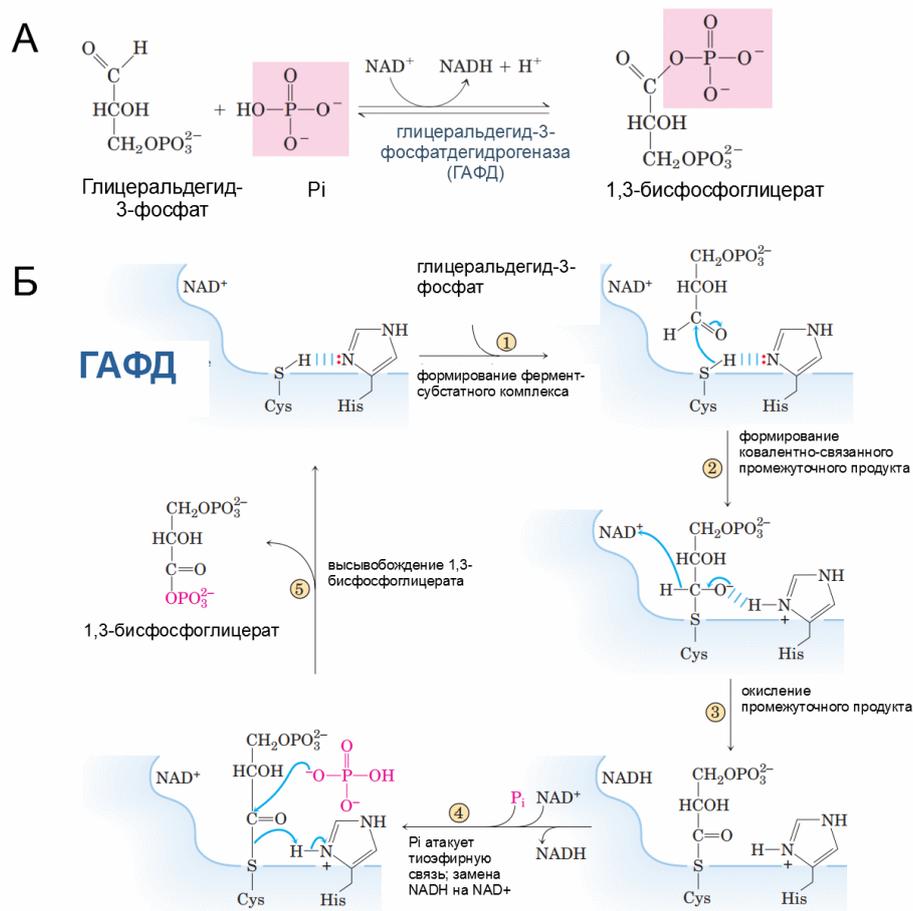
ГАФД состоит из 4-х одинаковых мономеров-субъединиц A, B, C, и D (голубой, жёлтый, оранжевый и зелёный цвета соответственно). На вынесенном рисунке показана с увеличением субъединица A с Cys152, His179 и Arg234, участвующими в каталитической активности фермента, и связанным  $NAD^+$ . Субъединица состоит из  $NAD^+$ -связывающего домена (N-концевого домена и укладки Россмана, розовый и зелёный цвет соответственно) и C-концевого каталитического домена (голубой цвет). Адаптировано из [45].

#### 1.4. Дегидрогеназная активность

ГАФД катализирует гликолитическую реакцию, окисляя 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) до 1,3-бисфосфоглицерата; при этом  $NAD^+$  восстанавливается до NADH (рис. 2 А). При связывании  $NAD^+$  с ферментом между сульфгидрильной группой Cys152 и положительно заряженным никотинамидным кольцом  $NAD^+$  образуется комплекс с переносом заряда. Водород оттягивается с тиола Cys152 на N His179, затем происходит нуклеофильная атака связанного в каталитическом домене 3-

ФГА тиолят-анионом Cys152, неспаренная пара электронов на атоме кислорода идёт на образование двойной связи, что приводит к образованию ковалентного промежуточного продукта 3-фосфоглицероил-фермента в комплексе с NADH (рис. 2 Б, стадии 1-3). После обмена NADH на  $\text{NAD}^+$ , в присутствии неорганического фосфата происходит фосфорилиз с образованием продукта 1,3-бисфосфоглицерата (рис. 2 Б, стадии 4-5) [29,36].

Реакция обратимая. NADH (продукт прямой реакции) может стимулировать прямую реакцию. И, наоборот, в глюконеогенезе  $\text{NAD}^+$  (продукт обратной реакции) может выступать в качестве эффектора обратной реакции, но только при низком содержании ко-субстрата (в данном случае 1,3-бисфосфоглицерата) [47].



**Рис. 2. Реакция окислительного фосфорилирования, катализируемая ГДФ.**

А) Глицеральдегид-3-фосфат окисляется до 1,3-бисфосфоглицерата, и  $\text{NAD}^+$  восстанавливается до  $\text{NADH}$ .

Б) Схема механизма реакции, катализируемой ГДФ. После формирования субстрат-ферментного комплекса (1) формируется ковалентная связь между Cys152 активного центра и глицеральдегид-3-фосфатом, за счёт присутствия  $\text{NAD}^+$  и возможного участия ближайшего остатка гистидина (2). После этого  $\text{NAD}^+$  окисляет комплекс с формированием ацил-фермента (3-фосфоглицероил-энзим· $\text{NADH}$ ) (3).  $\text{NADH}$  в активном центре заменяется на  $\text{NAD}^+$ , при этом неорганический фосфат ( $\text{P}_i$ ) атакует ацил-фермент (4), в результате чего происходит фосфоролит и продукт 1,3-бисфосфоглицерат высвобождается из активного центра фермента (5). Адаптировано из [48].

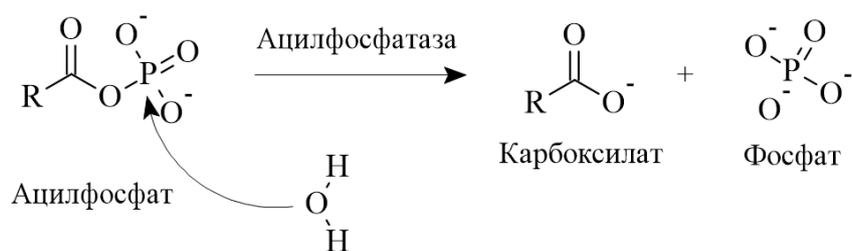
ГАФД относят к “moonlighting proteins”, то есть к ферментам, демонстрирующим наряду с основной активностью дополнительные неканонические функции [49,50]. Чаще всего таким свойством обладают высоко консервативные белки с высоким уровнем постоянной экспрессии, включая ГАФД. За последние 20 лет накопилось много данных о некаталитических функциях ГАФД, таких как участие в транскрипции, трансляции, апоптозе и вовлечение в различные патологические процессы у человека [51–53].

Важной негликолитической функцией ГАФД является её связывание с нуклеиновыми кислотами. Взаимодействие между ГАФД и РНК контролирует экспрессию белка, снижая или повышая стабильность транскрипта или ингибируя трансляцию [54]. Было показано, что ГАФД связывается с фосфатидилсеринем в фосфолипидных мембранах, вызывая слияние мембран [55]. ГАФД была обнаружена на поверхности клеток макрофагов человека и мыши, где она участвовала в эндоцитозе и поглощении железа. Было показано, что фермент взаимодействует с трансферрином, после чего комплекс ГАФД-трансферрин захватывается клеткой, образуя ранние эндосомы [56]. Ещё одной из хорошо известных негликолитических функций ГАФД является её участие в регуляции апоптоза. Различные независимые исследовательские группы наблюдали транслокацию ГАФД в ядро под воздействием неблагоприятных факторов, что сопровождалось развитием апоптоза [57–60].

Однако, в большинстве случаев остаётся неясным, как регулируются эти разнообразные функции ГАФД. Возможно, окислительные посттрансляционные модификации ГАФД могут влиять на её взаимодействие с белками-партнёрами, изменяя функции этих белков в ответ на окислительный/нитрозативный стресс.

## 1.5. Ацилфосфатазная активность

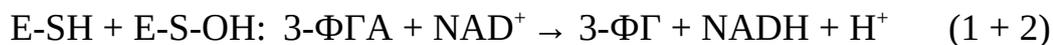
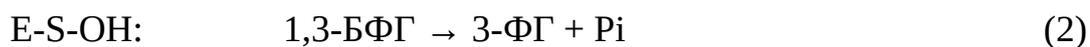
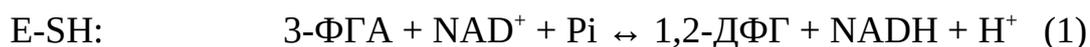
Ацилфосфатаза - это фермент, катализирующий гидролиз карбоксил-фосфатной связи ацилфосфатов, где ацилфосфат и  $\text{H}_2\text{O}$  являются субстратами, а карбоксилат и неорганический фосфат ( $\text{P}_i$ ) - продуктами реакции (рис. 3).



**Рис. 3. Гидролиз карбоксил-фосфатной связи ацилфосфатов.**

В 1957 году Хэрари продемонстрировал, что ацилфосфатаза, выделенная из мышц, катализирует гидролиз 1,3-бисфосфоглицерата (продукт реакции ГАФД) в 3-фосфоглицерат с высвобождением  $\text{P}_i$  [61]. Таким образом, ацилфосфатаза позволяет идти гликолизу, пропуская 7 стадию с участием 3-фосфоглицераткиназы и образованием АТФ из АДФ (рис. 4). В связи с этим появилось предположение, что ацилфосфатазная активность может играть регуляторную роль в клеточной энергетике [61]. Другие работы [16] показали, что ГАФД сама может выступать в качестве ацилфосфатазы, такая неканоническая активность возникает в результате окисления тиола Cys152 до сульфеновой кислоты.

Примечательно, что ацилфосфатазная активность ГАФД, индуцированная перекисью водорода, сначала была ошибочно принята за нефосфорилирующую дегидрогеназную активность [62], но затем оказалось, что это результат двух различных реакций катализируемых восстановленным (SH) и окисленным (S-OH) каталитическими цистеинами: дегидрогеназной и ацилфосфатазной реакциями [63] (Схема 1).



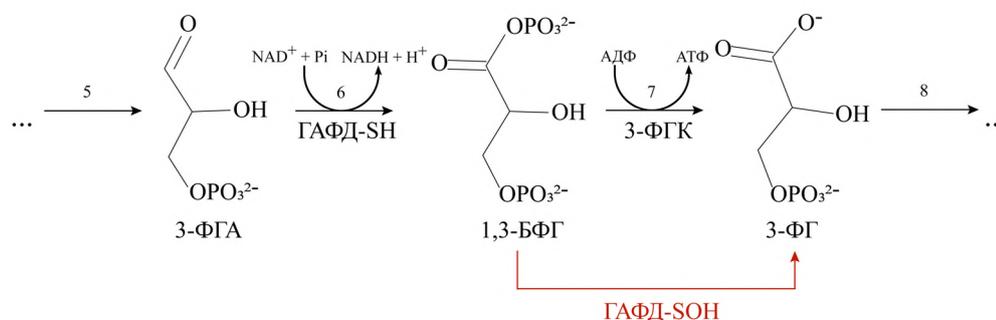
**Схема 1. Окисление 3-ФГА ГАФД, содержащей восстановленные и окисленные цистеины в активном центре.** 3-ФГА: 3-фосфоглицериновый альдегид, P<sub>i</sub>: неорганический фосфат, 1,3-БФГ: 1,3-бисфосфоглицерат, 3-ФГ: 3-фосфоглицерат, E: ГАФД.

Именно сульфеновая кислота в ГАФД обуславливает появление ацилфосфатазной активности, что доказывается исчезновением этой активности при восстановлении окисленного фермента димедоном [64].

### **1.6. Роль дегидрогеназной и ацилфосфатазной активностей ГАФД в регуляции метаболизма**

Как было показано выше, при гликолизе присутствие слабо окисленной ГАФД может привести к одновременному осуществлению дегидрогеназной и ацилфосфатазной реакций: субъединицы фермента, содержащие восстановленные сульфгидрильные группы, синтезируют 1,3-бисфосфоглицерат, а субъединицы с окисленным до сульфеновой кислоты остатком его гидролизуют [16,63]. Таким образом, из-за гидролиза 1,3-бисфосфоглицерата исчезает макроэргическое соединение, которое в обычных условиях используется для синтеза АТФ. Было показано, что добавление перекиси водорода в концентрации 100 мкМ к мышечному экстракту увеличивало накопление лактата в 2 раза по сравнению с тем, что наблюдалось в присутствии бета-меркаптоэтанола. Однако, в присутствии

$\text{H}_2\text{O}_2$  выход АТФ снижался примерно в 2 раза. Следовательно, ацилфосфатазная активность слабоокисленной ГАФД приводит к ускорению гликолиза в ущерб синтезу АТФ [65] (рис. 4).



**Рис. 4. Схема гликолиза в присутствии окисленной ГАФД (ГАФД-SOH).** Красным цветом выделен альтернативный путь гликолиза в присутствии ГАФД-SOH без образования АТФ в киназной реакции.

В аэробных условиях гликолитический путь окисления глюкозы с нулевым выходом АТФ может быть вполне осуществим, поскольку он обеспечивает NADH и пируват для более эффективного окислительного фосфорилирования в митохондриях даже при низкой концентрации АДФ. Однако, следует отметить, что в клетках сульфеновая кислота взаимодействует с восстановленным глутатионом, образуя смешанный дисульфид, что приводит к полному ингибированию ацилфосфатазной активности [46]. Следовательно, ацилфосфатазная активность ГАФД может влиять на гликолиз в некоторых экстремальных случаях, когда содержание восстановленного глутатиона в клетке значительно снижается.

Также важно отметить, что не только  $\text{H}_2\text{O}_2$ , но и NO оказывает влияние на активность ГАФД. Метаболические исследования макрофагов, культивируемых в условиях, индуцирующих выработку NO, показали, что клетки, генерирующие NO, демонстрировали увеличение скорости гликолиза и снижение концентрации АТФ. Эти данные, наряду с

результатами, подтверждающими снижение активности ГАФД в клетках, продуцирующих NO [66], согласуются с предположением о том, что NO может выступать сигнальной молекулой, отделяющей гликолиз от генерации АТФ за счёт ацилфосфатазной активности NO-модифицированной ГАФД [67].

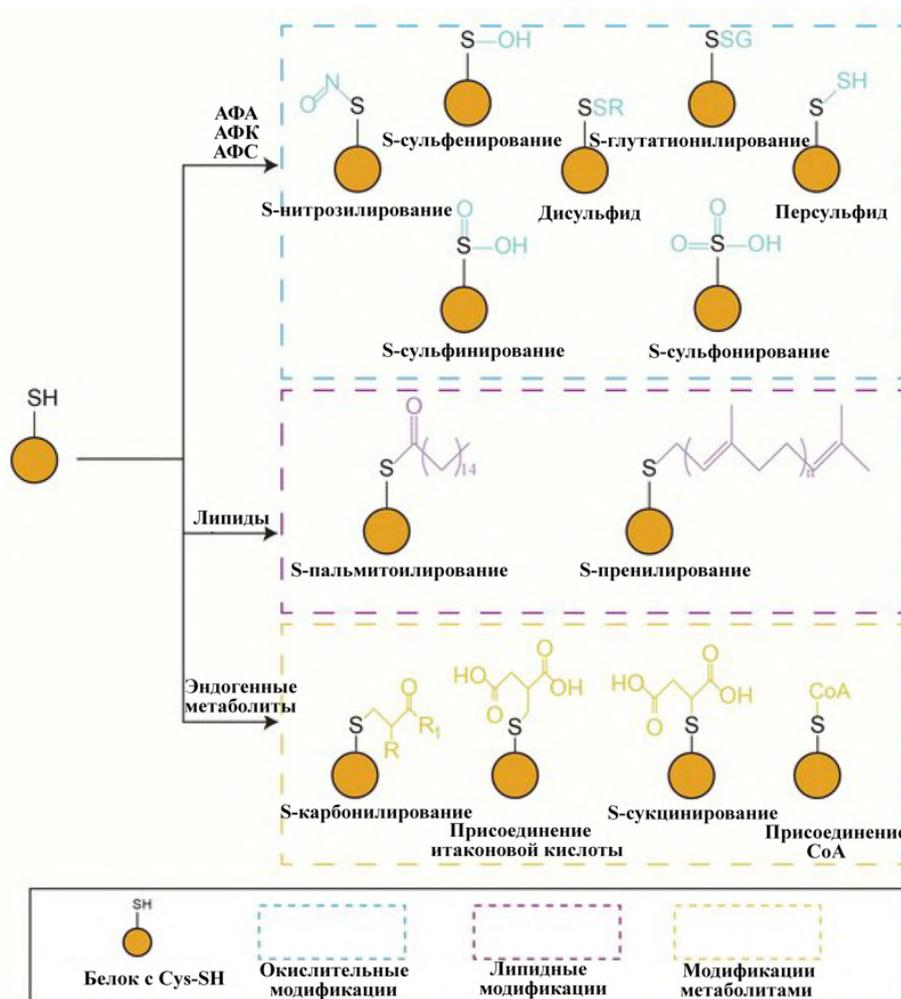
Также было обнаружено, что S-нитрозилирование снижает сродство ГАФД к белку band 3 мембран эритроцитов. Этот белок взаимодействует не только с ГАФД, но и с другими белками гликолиза [68]. Данные факты указывают на важную роль S-нитрозилирования ГАФД в регуляции энергетического метаболизма и жизнедеятельности клетки в целом.

## **2. Посттрансляционные модификации ГАФД**

ГАФД подвергается разным посттрансляционным модификациям. Наиболее хорошо изучены два класса таких модификаций. К первому классу относятся модификации поверхностных остатков белковой молекулы, которые влияют на взаимодействие ГАФД с белками-партнёрами. Прежде всего, это фосфорилирование сериновых и тирозиновых остатков, приводящее к изменению связывания ГАФД с другими белками [69], а также гликирование лизиновых остатков, вызывающее инактивацию фермента и изменение некоторых его свойств [70]. Такие модификации имеют важное значение для осуществления негликолитических функций ГАФД, из-за которых фермент называется «moonlighting protein» [71]. Второй класс модификаций влияет на каталитическую активность ГАФД и затрагивает аминокислотные остатки активного центра. Мы остановимся только на последствиях модификации сульфгидрильной группы цистеинового остатка ГАФД.

Как уже обсуждалось ранее, Cys152 является каталитическим остатком, и любая его модификация инактивирует фермент. Цистеины

могут подвергаться следующим посттрансляционным модификациям: S-сульфенирование, S-сульфинирование, S-сульфонирование, S-нитрозилирование, S-глутатионилирование и др. [72] (рис. 5).

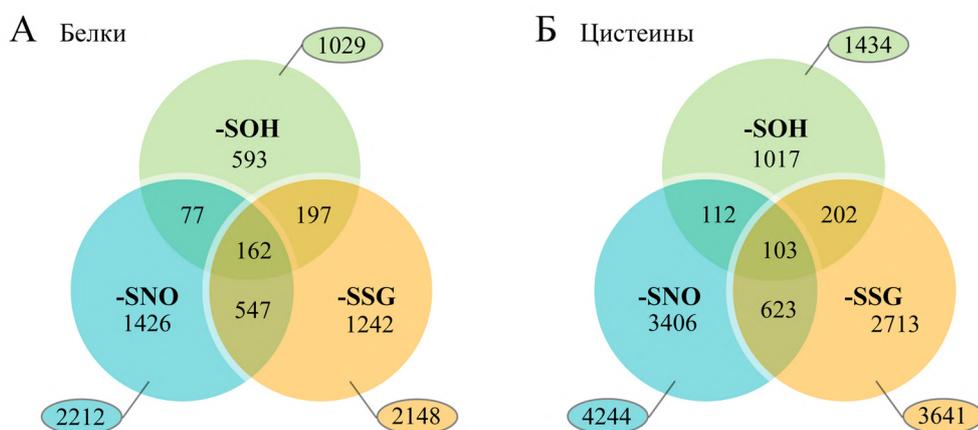


**Рис. 5. Посттрансляционные модификации Cys-SH содержащих белков. Адаптировано из [73].**

В нашей работе мы рассматривали только три посттрансляционные модификации: S-сульфенирование, S-нитрозилирование и S-глутатионилирование.

Согласно базе данных dbSNO [74] для 1029 белков экспериментально доказана возможность S-сульфенирования 1434 цистеинов, для 2212 белков - S-нитрозилирование 4244 цистеинов, для 2148 белков - S-глутатионилирование 3641 цистеина (рис. 6). Из них 162 белка или 103

цистеина могут подвергаться всем трём посттрансляционным модификациям. Следовательно, если цистеин подвержен одной модификации, то необязательно, что он будет подвержен всем трём модификациям.



**Рис. 6. Белки и цистеины белков, подвергающиеся S-нитрозилированию, S-сульфенированию и S-глутатионилированию.** Показаны значения для белков человека. Данные из [75] и баз данных [72,74].

В группе белков, подвергающимся всем трём модификациям, есть ГАФД и Cys152 ГАФД (рис. 6 А и Б, пересечение множеств). При этом Буи и коллеги изучили окружение сайтов, подвергаемых этим модификациям [75]: на -2 позиции чаще всего стоит **R** или **K**, на +2: **L** или **V**, на +3: **E** и на +4: **E** [75], что не совпадает с окружением Cys152 ГАФД (**A**S**C**T**T**N**C**).

## 2.1. Влияние окисления цистеиновых остатков ГАФД на каталитические свойства фермента

Окисление сульфгидрильных групп каталитических цистеиновых остатков ГАФД, а также иные их модификации приводят к инактивации фермента. Процесс окисления проходит в несколько стадий, начиная с образования цистеинсульфеновой кислоты (Cys-S-OH). Дальнейшее

окисление цистеинсульфеновой кислоты приводит к образованию цистеинсульфиновой (Cys-SO<sub>2</sub>H) и цистеинсульфоновой (Cys-SO<sub>3</sub>H) кислот [76]. Окисление Cys152 с образованием Cys-SO<sub>2</sub>H и Cys-SO<sub>3</sub>H в активном центре ГАФД происходит при воздействии разных окислителей, прежде всего АФК, и приводит к полной и необратимой инактивации фермента [77]. Для ГАФД образование сульфиновой кислоты является необратимым процессом [78].

Кроме того, в активном центре окисленной ГАФД ослабевает связывание кофактора NAD<sup>+</sup> из-за невозможности образования комплекса с переносом заряда между его никотинамидным кольцом и сульфгидрильной группой, характерного для немодифицированного фермента. В отсутствие кофактора стабильность ГАФД уменьшается, фермент денатурирует и подвергается действию протеолитических ферментов. Таким образом, окисление каталитического цистеина ГАФД с образованием цистеинсульфиновой или цистеинсульфоновой кислот приводит к его необратимой инактивации, последующей деградации белка и, как следствие, к замедлению гликолиза. Кроме того, окисление ГАФД, как и другие модификации фермента, вызывает и более серьезные последствия для функционирования клетки (например, апоптоз), которые будут рассмотрены ниже.

Наиболее интересная модификация сульфгидрильных групп каталитических цистеиновых остатков ГАФД происходит при так называемом мягком окислении, например, под действием невысокой концентрации пероксида водорода или просто при инкубации фермента в водных растворах. В этом случае каталитический цистеин в активном центре ГАФД окисляется до цистеинсульфеновой кислоты, что вызывает изменение каталитических характеристик фермента. Во-первых, образование цистеинсульфеновой кислоты приводит к инактивации ГАФД (такая инактивация легко обратима и добавление дитиотреитола приводит к

полному восстановлению активности фермента). Во-вторых, у ГАФД, содержащей в активном центре SOH-группу, появляется новая каталитическая активность – ацилфосфатазная, о которой было написано ранее.

Следует отметить, что общие механизмы окисления сходны для ГАФД из различных организмов, поскольку ГАФД имеет довольно консервативный активный центр. Как и у млекопитающих, ГАФД из бактерий и дрожжей окисляется перекисью водорода [79–81]. Инкубация дрожжевых клеток с перекисью водорода приводит к S-глутатионированию ГАФД, и чувствительность различных ферментов к этой модификации может иметь значение для регуляции метаболизма [82].

## **2.2. S-нитрозилирование ГАФД**

Оксид азота (NO) - важная клеточная сигнальная молекула. NO участвует в различных физиологических процессах, включая релаксацию гладких мышц сосудов [83] и агрегацию тромбоцитов [84,85], а также во многих патофизиологических процессах, включая диабет [86] и нейродегенеративные заболевания [87]. NO обладает высокой реакционной способностью, он диффундирует через мембраны и имеет период полураспада всего несколько секунд. NO синтезируется ферментом NO-синтазой из L-аргинина, молекулярного кислорода и NADPH.

Таким образом, любая ткань, экспрессирующая изоформу NO-синтазы, может использовать NO в качестве внутри- и межклеточного сигнального агента. S-нитрозилирование может оказывать как токсическое, так и сигнальное действие на клетки. S-нитрозилированные белки могут также передавать нитрозильный остаток на цистеиновый остаток белка-акцептора (транснаитрозилирование), и этот процесс считается одним из механизмов сигнальных путей в клетке [88].

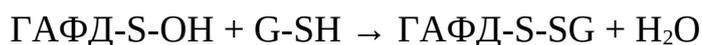
ГАФД - одна из самых распространённых мишеней для S-нитрозилирования из-за её высоких концентраций в клетке и присутствию в активном центре фермента цистеинового остатка с повышенной реакционной способностью [9,25,27,89–93]. Особенно важен этот процесс при нейродегенеративных заболеваниях [91,94], поскольку в этом случае нитрозативный стресс является распространённым явлением [95].

S-нитрозилирование ГАФД изучается уже 50 лет. Инактивация ГАФД в присутствии NO была показана различными исследовательскими группами [16,17,19,96,97]. Однако, в ранних работах не было единого мнения относительно продукта модификации ГАФД. В первом исследовании было установлено, что инкубация ГАФД в присутствии тринитроглицерина привела к образованию цистеинсульфеновой кислоты в активном центре [16]. Позже появилась серия работ, в которых было высказано предположение, что основным механизмом инактивации ГАФД является обратимое S-нитрозилирование каталитического цистеина [20,24]. Впоследствии было показано, что мутация каталитического остатка Cys152 на серин предотвращает модификацию ГАФД в присутствии NO, что подтвердило участие каталитического остатка цистеина в модификации [25]. Однако, в этой работе, как и во всех последних работах, ГАФД-SNO определяли с помощью мечения нитрозилированных белков биотином с последующим иммуноблоттингом (Biotin switch). Метод заключается в блокировке свободных SH-групп с последующими восстановлением нитрозотиолов (S–NO) аскорбатом и включением биотиновой метки в восстановленные SH-группы [98]. Данный метод предполагает, что аскорбат должен избирательно восстанавливать S-нитрозотиолы (Cys-SNO), не восстанавливая цистеинсульфеновую кислоту (Cys-SOH). Однако, в некоторых исследованиях отмечались ложноположительные результаты, полученные с помощью этого метода [99] из-за восстановления аскорбатом цистеинсульфеновой кислоты до цистеина [16].

Предполагается, что ГАФД-SNO не может быть обнаружена ни методом MALDI-TOF, ни методом ESI-масс-спектрометрии, поскольку лабильная связь S-NO расщепляется в процессе ионизации [25]. Таким образом, существование стабильной S-нитрозилированной ГАФД ещё не было подтверждено напрямую.

### 2.3. Глутатионилирование ГАФД

S-глутатионилирование - это образование смешанного дисульфида между SH-группой цистеинового остатка и глутатиона (Белок-S-SG). S-глутатионилирование является важным компонентом регуляции активности ГАФД. Глутатион находится в довольно высокой концентрации в клетке (10 мМ), состоит из трёх аминокислот (цистеин, глутамат, глицин), одна из которых - цистеин. S-глутатионилированная ГАФД не обладает каталитической активностью, однако эта модификация препятствует необратимому окислению ГАФД. S-глутатионилированию восстановленным глутатионом (G-SH) может подвергаться ГАФД-SOH, образуемая в результате модификации фермента активными формами кислорода:



Повышенный уровень S-глутатионилированных белков, включая ГАФД, в мозге при болезни Альцгеймера указывает на роль окислительного стресса в S-глутатионилировании белков и развитии заболеваний. Предполагается, что цистеиновые остатки, чувствительные к окислению, подвержены S-глутатионилированию [100]. Для растительной ГАФД было показано S-глутатионилирование по остаткам каталитического цистеина после обработки перекисью водорода в присутствии GSH [101,102]. Позже было показано, что ГАФД из животных тканей (мышц кролика) обратимо инактивируется в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и GSH [46].

Интересно, что при анализе пептидов, полученных после трипсинолиза S-глутатионилированной ГАФД, был зарегистрирован внутримолекулярный дисульфидный мостик Cys152–Cys156 [103]. Нельзя исключить, что дисульфидный мостик образуется при разворачивании белковой глобулы в ходе трипсинолиза. При рентгеноструктурном анализе растительной ГАФД, глутатионилированной после кристаллизации, дисульфидного мостика не обнаружено, но показано, что глутатионилированию подвергается только каталитический цистеин активного центра, в то время как соседний цистеиновый остаток остается интактным [104]. Вероятнее всего в кристалле не образуется дисульфидный мостик, так как подвижность белка существенно ограничена. Таким образом, образование дисульфидного мостика при S-глутатионилировании ГАФД не доказано, но исключить его образование в растворе нельзя.

При окислении гликолитическая активность ГАФД подавляется, перенаправляя метаболический поток на пентозофосфатный путь в ответ на окислительный стресс, тем самым увеличивая производство NADPH, активируя системы антиоксидантной защиты клетки [105,106] и поддерживая окислительно-восстановительный гомеостаз в эукариотических клетках [106]. Редокс-переключатель ГАФД особенно важен для опухолевых клеток, обеспечивая их выживание в стрессовых условиях и способствуя якорно-независимому росту [107]. Обратимая инактивация ГАФД S-глутатионилированием может также служить редокс-переключателем в регуляции клеточных функций [108]. Кроме того, поскольку ГАФД в животной клетке участвует в многочисленных негликолитических функциях, таких как рецептор-опосредованная сигнализация, поддержание целостности ДНК, транскрипционной и посттранскрипционной регуляции, а также апоптоза [109], S-глутатионилирование может участвовать в окислительно-восстановительной регуляции некоторых из этих негликолитических функций [108].

## 2.4. Последствия посттрансляционных модификаций ГАФД: апоптоз

Было показано, что при различных патологиях ГАФД, являющаяся цитоплазматическим ферментом, начинает накапливаться в ядре, что индуцирует апоптоз. Иммунохимическое окрашивание выявляло ГАФД только в ядре, но не в цитоплазме, что не соответствует локализации фермента в клетке при нормальных условиях [110,111]. Такое накопление ГАФД в ядре может быть вызвано воздействием оксида азота, реактивных форм кислорода и других соединений [58,111]. Было установлено, что такое окрашивание ГАФД в ядре связано с использованием популярных моноклональных антител клона 6С5 на ГАФД [112]. Было доказано, что эти антитела не взаимодействуют с нативной тетрамерной ГАФД, но распознают частично или полностью развёрнутые формы фермента [113]. Следовательно, в ядре были обнаружены денатурированные формы ГАФД (субъединицы или развёрнутые полипептидные цепи). Более того, транспорт тетрамера ГАФД в ядро с помощью белков-переносчиков невозможен, поскольку фермент не имеет сигнала ядерной локализации (NLS). Таким образом, для транслокации ГАФД в ядро требуется диссоциация окисленного, S-нитрозилированного или иным образом модифицированного тетрамера ГАФД на субъединицы. В отличие от тетрамерной молекулы, субъединицы или полностью развёрнутые полипептидные цепи ГАФД могут проникать в клеточное ядро путем пассивного транспорта [110].

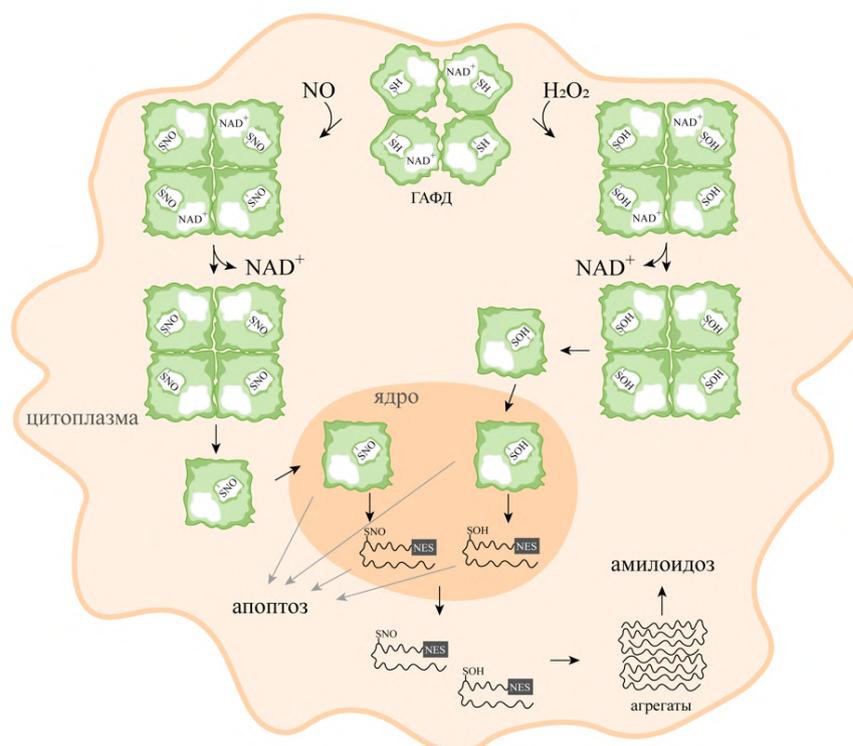
Предположение о диссоциации тетрамерной молекулы на субъединицы видится логичным. Хорошо известно, что  $\text{NAD}^+$  прочно связан в активном центре ГАФД и стабилизирует белок. Такое прочное связывание  $\text{NAD}^+$  обусловлено образованием комплекса с переносом заряда между никотинамидным кольцом молекулы  $\text{NAD}^+$  и сульфгидрильной группой

каталитического остатка цистеина в активном центре ГАФД. Окисление и другие модификации этой сульфгидрильной группы снижают сродство  $\text{NAD}^+$  к белку. Следовательно, высвобождение  $\text{NAD}^+$  из активного центра может вызвать диссоциацию тетрамера на субъединицы и их последующее перемещение в ядро. Кроме того, окисленные формы ГАФД обладают повышенным сродством к нуклеиновым кислотам, взаимодействие с которыми в ядре рассматривается как один из механизмов апоптоза [114].

Появление новых данных позволило уточнить схему индукции апоптоза. Было установлено, что ГАФД содержит сигнал ядерного экспорта (NES), включающий 13 аминокислот (KKVVKQASEGPLK) и расположенный в С-концевом домене ГАФД [111]. В нативной ГАФД эта последовательность образует альфа-спираль на поверхности белка и, вероятно, по этой причине не распознается как NES белком-экспортином 1, который экспортирует белки из ядра. Однако, после транслокации ГАФД из цитоплазмы в ядро структурированные области белка разворачиваются, что приводит к обнажению NES, который взаимодействует с белками-экспортёрами. Удаление последовательности NES или введение мутации в неё, увеличивало накопление ГАФД в ядре. На основании этих результатов был сделан вывод о том, что развёрнутые полипептидные цепи не могут накапливаться в ядре, как считалось ранее. В новой версии схемы предполагалось, что в результате различных эффектов ГАФД диссоциирует на компактные субъединицы, в которых NES структурирован в альфа-спираль, и после их транспортировки в ядро белок разворачивается и обнажает NES в полностью развёрнутых полипептидных цепях, которые, благодаря наличию в них NES, снова перемещаются в цитоплазму и формируют агрегаты [111] (рис. 7).

Была выдвинута гипотеза, что развёрнутые субъединицы ГАФД могут участвовать в формировании амилоидных структур, характерных для нейродегенеративных заболеваний [115]. Амилоидоподобные структуры,

содержащие полипептидные цепи ГАФД, сшитые дисульфидными связями, могут формироваться под действием окислительного стресса [37,39]. Предполагалось, что амилоидоподобные агрегаты ГАФД могут индуцировать апоптоз и другие нарушения клеточных функций клеток. Эта гипотеза подтверждалась тем, что соединения, предотвращающие агрегацию ГАФД, проявляли антиапоптотический эффект [116,117].



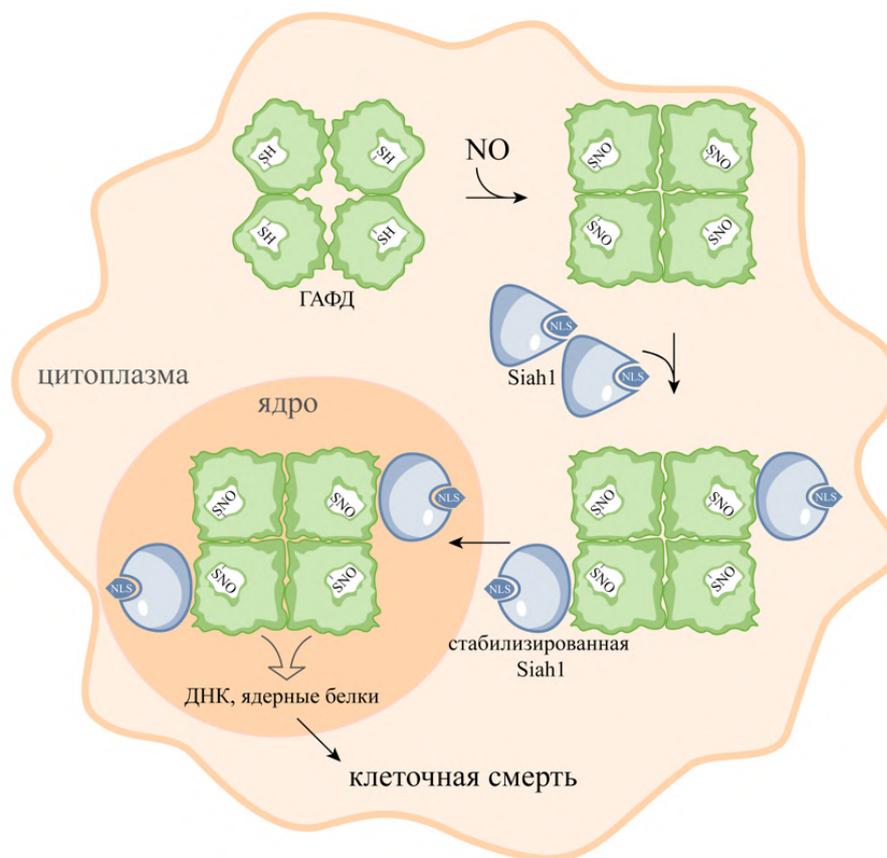
**Рис. 7. Схема апоптоза, индуцированного различными модификациями ГАФД.** Модификации каталитического цистеина в ГАФД снижают сродство  $NAD^+$  к белку, что приводит к высвобождению  $NAD^+$  из активного центра, дестабилизации тетрамера и его диссоциации на субъединицы. Субъединицы проникают в ядро посредством пассивного транспорта. В ядре разворачивание субъединиц ГАФД приводит к появлению сигнала ядерного экспорта (NES) и последующему транспорту развёрнутых субъединиц ГАФД в цитоплазму, где они образуют агрегаты (по данным [58,111,114,118]).

Все схемы и гипотезы, касающиеся транслокации ГАФД в ядро, были отброшены после появления работ группы С. Снайдера и А. Савы о роли S-нитрозилирования ГАФД в индукции апоптоза. Большинство работ было посвящено изучению NO-индуцированного апоптоза, опосредованного ГАФД. Также исследовались связи:

- между S-нитрозилированием ГАФД и развитием нейродегенеративных заболеваний, в первую очередь болезни Паркинсона [119–123];

- между изменениями каталитической активности S-нитрозилированной ГАФД и возможным влиянием этой модификации на энергетический метаболизм клеток [124–126].

Главное противоречие заключалось в том, что для выполнения различных необычных функций в ядре, ГАФД должна сохранять свою структуру. Это позволило бы ферменту модифицировать другие белки и/или образовывать с ними комплексы, регулируя их функции. Кроме того, только сохранение пространственной структуры ГАФД предотвращает его экспорт из ядра из-за экранирования NES. Однако, тетрамерная молекула не способна проникнуть в ядро из-за своего большого размера и отсутствия NLS. Серия работ группы С. Снайдера и А. Савы разрешила эти противоречия, предложив совершенно новый сигнальный механизм, ключевым элементом которого является S-нитрозилирование ГАФД (рис. 8).



**Рис. 8. Схема NO-индуцированного апоптоза, опосредованного ГАФД, предложенная А. Сава [9], с изображением структуры тетрамерной ГАФД. S-нитрозилирование ГАФД способствует её связыванию с Siah1. Siah1, обладающий сигналом ядерной локализации (NLS), транслоцирует ГАФД в ядро. В ядре ГАФД взаимодействует с ядерными белками, что приводит к апоптозу.**

Согласно этому механизму, широкий спектр апоптотических стимулов увеличивает выработку NO через индукцию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) или через активацию нейрональной синтазы оксида азота (nNOS). ГАФД нитрозилируется NO по каталитическому остатку цистеина, что приводит к инактивации белка и конформационным изменениям в его молекуле. Эти изменения облегчают связывание ГАФД с E3-убиквитинлигазой Siah1. Siah1, обладающая сигналом ядерной локализации (NLS),

транслоцирует ГАФД в ядро. Было установлено, что лизин 225 в последовательности ГАФД является критическим для её связывания с Siah1, поскольку мутация K225 предотвращает ядерную транслокацию как ГАФД, так и Siah1. Взаимодействие с ГАФД приводит к стабилизации Siah1, что обеспечивает быструю деградацию ядерных белков, приводящее к гибели клетки [9,27,127,128]. Согласно более поздней версии этого механизма, ГАФД в ядре ацетируется по Lys160 ацетилтрансферазой p300/CREB-связывающим белком (CBP) через прямое белковое взаимодействие, что, в свою очередь, стимулирует ацетилирование различных белков-мишеней p300/CBP. Нижележащие мишени p300/CBP, такие как p53, активируются и вызывают гибель клеток [129].

Есть ещё несколько гипотез, связывающих модификации ГАФД и индукцию апоптоза. ГАФД-SNO опосредует нитрозилирование ядерных белков через транснаитрозилирование, свидетельствующее, что перенос NO-групп может быть механизмом передачи клеточного сигнала [130]. Было также показано, что окислительные модификации ГАФД могут приводить к её агрегации [37], что приводит к взаимодействию агрегатов ГАФД с митохондриальным каналом [131], индуцируя образование пор в митохондриях и апоптоз [38].

### **3. Взаимодействие ГАФД с актином**

ГАФД взаимодействует с многочисленными белками, образуя обширный интерактом, включающий гликолитические ферменты и ферменты цикла трикарбоновых кислот. Например, у грибов вида *Paracoccidioides lutzii* ГАФД взаимодействует с 207 белками [132]. Как уже было описано ранее, человеческая S-нитрозилированная ГАФД может транслоцироваться в ядро через взаимодействие с E3-убиквитин-лигазой Siah1 и впоследствии транснаитрозилировать ядерные белки, такие как

сиртуин-1 SIRT1, гистон-деацетилазу-2 HDAC2 и ДНК-активированную протеинкиназу DNA-PK [130]. Кроме того, S-нитрозилированная ГАФД может действовать как митохондриальная транснаитрозилаза, проникая в митохондриальный матрикс и усиливая S-нитрозилирование различных митохондриальных белков, включая белок теплового шока HSP60, потенциал-зависимые анионные каналы VDAC-1 и ацетил-КоА ацетилтрансферазу [89]. Эти взаимодействия подчеркивают разнообразную роль ГАФД в клеточной передаче сигнала и модификации белков в различных клеточных компартментах.

Одним из белков, с которым взаимодействует ГАФД, является актин [108].

### **3.1. Свойства актина**

Актин, важнейший белок цитоскелета, существует в клетках млекопитающих во многих формах. Известны три основные изоформы: альфа-, бета- и гамма-актин [133]. Альфа-актин преимущественно находится в мышечных тканях (скелетных и сердечных). Он необходим для сокращения и формирования структуры мышц. Бета-актин экспрессируется в немышечных клетках и участвует в различных клеточных процессах, включая подвижность клеток и поддержание их формы. Гамма-актин также обнаруживается в немышечных клетках, но более распространён в некоторых тканях, например в цитоскелете фибробластов и гладкомышечных клеток [133]. Тромбоциты человеческой крови содержат как бета-, так и гамма-актин с соотношением бета и гамма 5:1 [134].

Хотя все три изоформы обладают высокой степенью сходства последовательностей, они также имеют уникальные аминокислотные последовательности, которые придают им специфические свойства и функции. Например, альфа-актин имеет аминоконцевой цистеин на N-конце

(Met-CYS-Asp-Glu-Asp-Glu), которого нет у бета- и гамма-актинов (Met-Asp-Asp-Asp и Met-Glu-Glu-Glu, соответственно) [134]. В клетках актин существует в виде мономерного глобулярного G-актина и полимеризованного в филаменты F-актина.

В литературе информация по концентрации актина очень разнится. В целом, концентрация актина в немышечной клетке составляет 40-70 мкМ (2-3 мг/мл), в мышечных клетках: 200-960 мкМ (10-30 мг/мл) [135,136] (таблица 1).

**Таблица 1. Концентрация G- и F-актина.**

Данные взяты из статей [135–139]. Соотношение G- и F-актина, помимо типа ткани, зависит от физиологического состояния клетки.

Форма актина	Концентрация в немышечной клетке, мкМ	Концентрация в мышечной клетке, мкМ
G-актин	40 - 70	1 - 24
F-актин	0,1	36 - 960

### 3.2. Взаимодействие ГАФД с актином

Большинство исследований посвящены взаимодействию ГАФД с актиновыми филаментами, которое наблюдается в скелетных мышцах [140], в синапсосомах и постсинаптических плотностях, выделенных из коры головного мозга свиньи [141], и в филоподиях эмбриональных сенсорных нейронов курицы [142]. Было показано, что гликолитические ферменты

ГАФД и альдолаза взаимодействуют с F-актином редокс-зависимым образом, выступая как часть механизма стрессового ответа [143].

Комплекс ГАФД с мономерным актином был выделен из экстракта нейронов с помощью аффинной хроматографии [144]. Факторы, влияющие на эту ассоциацию, а также функция этого комплекса остаются неясными.

Кроме того, и ГАФД, и актин связываются с РНК-полимеразой II, специфически взаимодействуя с её субъединицей Rpb7, что было продемонстрировано с помощью двугибридного скрининга и аффинной очистки в *Schizosaccharomyces pombe* [145]. Эти результаты подчёркивают сложный и контекстно-зависимый характер взаимодействия ГАФД с актином и потенциальную роль этого взаимодействия в клеточных процессах.

#### Комплекс ГАФД и актина

Моделирование методом броуновской динамики предсказывает связывание ГАФД с G- и F-актином посредством электростатических взаимодействий между положительно заряженными участками ГАФД (Lys 24, 69, 110 и 114) и отрицательно заряженными остатками актина (Asp 1, 25 и 363 и Glu 2, 4, 224 и 364) [146]. При pH 7,0 суммарный заряд тетрамера ГАФД составляет +1, для G-актина -10, для F-актина -59 [147]. Расчёты показали, что взаимодействие между ГАФД и F-актином должно быть сильнее, чем между ГАФД и G-актином. Отмечается, что энергия электростатического взаимодействия для комплекса ГАФД/F-актин больше, чем для комплекса ГАФД/G-актин, что указывает на более стабильное связывание с F-актином [148]. Было показано, что ГАФД из мышц кролика связывается с мышечным F-актином сильнее, чем ГАФД из дрожжей с дрожжевым F-актином, что позволяет предположить эволюционные различия в этом взаимодействии [147,149]. При этом, последовательности ГАФД из кролика и из дрожжей на 87% идентичны. Лизин 69, для которого

методом моделирования было предсказано образование солевых мостиков с аспартатами актина, в дрожжевой ГАФД заменён на аргинин.

### Взаимодействие ГАФД с актином при стрессе

В культуре клеток фибробластов мышцы NIH 3T3 удаление сыворотки приводит к перемещению ГАФД в ядро и колокализации ГАФД с актиновыми волокнами стресса, что свидетельствует о специализированном взаимодействии между этими белками [150]. В нормальных условиях при наличии сыворотки ГАФД локализуется преимущественно в цитоплазме. Частичная ядерная транслокация ГАФД происходит в течение нескольких дней после сывороточного голодания, а через пять дней наблюдается преимущественная ядерная локализация ГАФД. Исследование также показало, что ядерная локализация ГАФД является обратимым процессом: при повторном введении сыворотки или факторов роста в среду после сывороточного голодания ГАФД экспортируется обратно в цитоплазму. Этот экспорт не связан с синтезом новых белков, поскольку он происходит даже в присутствии циклогексимида, который ингибирует синтез белка. Примечательно, в клетках NIH 3T3 взаимодействие ГАФД с актином происходит только в условиях дефицита сыворотки, независимо от присутствия/отсутствия NO [150, 152].

Следует отметить, что S-нитрозилирование ГАФД способно участвовать в модификации белков-партнёров. Предположительно при образовании комплексов ГАФД-SNO с белками-партнёрами может происходить их нитрозилирование по сульфгидрильным группам. Наиболее вероятным субстратом для такой модификации является актин, поскольку известно, что актин содержит цистеиновые остатки, которые легко подвергаются окислению и S-нитрозилированию [151]. Однако, допущение о

роли ГАФД в транснаитрозилировании как актина, так и других белков требует экспериментального подтверждения.

#### Реакционная способность цистеиновых остатков актина

Актин содержит шесть консервативных цистеиновых остатка, играющих важную роль в структуре и функционировании белка, а также реагирующих на окислительный стресс. Эксперименты на альфа-актине из скелетных мышц крыс показали, что Cys239 и Cys259 подвержены окислению, образуя сульфеновую, сульфиновую или сульфоновую кислоты в окислительных условиях [153]. Cys285 и Cys374 особенно важны как сенсоры окислительного стресса [154]. Эти остатки могут формировать внутримолекулярные дисульфидные связи в окислительных условиях [154]. Образование дисульфидной связи между Cys374 и другим остатком цистеина приводит к димеризации актина и изменению его физико-химических свойств. Формирование таких дисульфидных связей обратимо в присутствии дитиотреитола [155]. Есть данные о S-глутатионилировании Cys374 [156]. Эти результаты подчёркивают способность специфических остатков цистеина актина отвечать на окислительный стресс.

Cys374 также чувствителен к нитрозилированию [151,157–159]. Нитрозилирование Cys374 было показано для мышечного альфа-актина [158,160,161] и для бета-актина [162]. S-нитрозилированный актин проявляет мощную сосудорасширяющую активность [158], что может быть связано с деполимеризацией актина [163]. Было показано, что S-нитрозилированные белки могут переносить NO-группу на акцепторные белки (транснаитрозилирование), и этот процесс рассматривается как один из механизмов сигнальных путей в клетке [88]. Например, S-нитрозилированная ГАФД может нитрозировать ядерные белки сиртуин-1 (SIRT1), гистоновую деацетилазу-2 (HDAC2) и ДНК-активируемую протеинкиназу (DNA-PK) [130].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### МАТЕРИАЛЫ

В работе были использованы следующие реактивы и расходные материалы:

Для биохимических методов: дитиотреитол; HEPES; коктейль ингибиторов протеаз (Amresco); ЭДТА; глицин (MP Biomedicals); 1,1-диэтил-2-гидрокси-2-нитрозо-гидразин натрия (DEANO); димедон (5,5-диметил-1,3-циклогексанедион); глицеральдегид-3-фосфат диэтилацеталь (бариевая соль); реагент Грисса (модифицированный); NAD<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich); 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (Ferak); DCP-Bio1 (3-(2,4-диоксициклогексил)пропил 5-((3aR,6S,6aS)-гексагидро-2-оксо-1H-тоено[3,4-d]имидазол-6-ил)пентаноат) (Kerafast); восстановленный глутатион; белок G-сефароза (Sigma-Aldrich); набор маркёров PageRuler Prestained Ladder и Pierce Unstained Protein Ladder (14,4-116 кДа) (Thermo Scientific); сефадекс G100 и G50.

Белки и ферменты: каталаза, рекомбинантный тиоредоксин человека 1 (Abcam); тиоредоксин редуктаза из печени крысы (Sigma); рекомбинантный глутаредоксин 1 человека (ACROBiosystems); моноклональные мышинные антитела против биолина, клон BN 34 (Sigma); моноклональные мышинные антитела против глутатионилированных белков (MAB5310, Merck Millipore); моноклональные мышинные антитела против бета-актина (MAB340Hu21, Cloud Clone Corp.); мышинные моноклональные антитела против ГАФД (6C5, Hu Test); козы антитела против антител мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch); козы антитела против антител кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Imtek, Россия); G- и F-актин был предоставлен Александром Матюшенко

(федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук).

Для работы с культурами клеток: среда DMEM/F-12; пенициллин/стрептомицин (5000 ед/мл/5мг/мл); трипсин 0,25%-ный раствор; 0,02%-ный раствор ЭДТА в 10 мМ PBS (ПанЭко); трипановый синий (Sigma); GlutaMAX (Gibco); эмбриональная бычья сыворотка (HyClone); заключающая среда Mowiol; покровные стёкла диаметром 12 мм; предметные стёкла Superfrost (Menzel); антитела против IgG мыши; конъюгированные с FITC (Abcam).

## **МЕТОДЫ**

### **1 Получение препаратов белков**

#### **1.1 Выделение ГАФД из мышц кролика**

ГАФД выделяли из замороженных мышц кролика, используя модификацию стандартного метода [164]. Измельчённые мышцы кролика заливали холодным рабочим буфером (10 мМ фосфата калия, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ, рН 7,5; 150 мл буфера на 100 г мышц) и гомогенизировали с помощью блендера. Гомогенат центрифугировали (10 000 g, 30 мин), полученный супернатант отфильтровывали через несколько слоев марли.

#### **Высаливание экстракта сульфатом аммония до 70%-насыщения**

Полученный экстракт высаливали измельчённым сульфатом аммония (50,5 г на 100 мл экстракта) на холоде при постоянном перемешивании, после чего рН суспензии доводили до 7,0-7,5 с помощью 10% раствора аммиака. Через 30 мин образовавшийся осадок удаляли центрифугированием (15 000 g, 30 мин).

#### **Кристаллизация**

Образовавшийся за ночь осадок собирали центрифугированием (20 000 g, 30 мин). Осадок ресуспендировали в рабочем буфере так, чтобы концентрация белка составляла приблизительно 2 мг/мл. Раствор белка высаливали измельчённым в порошок сульфатом аммония на льду при постоянном перемешивании до помутнения (примерный расход сульфата аммония 46 г на 100 мл раствора). рН суспензии доводили до 8,0-8,5 с помощью 10%-ного аммиака, а затем оставляли на 1-3 дня при температуре 4 °С.

Осадок собирали центрифугированием (20 000 g, 30 мин) и проводили вышеописанную процедуру (растворение, высаливание и осаждение) 1-2 раза. На этих этапах очистки во всех фракциях определяли общую

ферментативную активность ГАФД определяли во всех фракциях, чтобы не потерять целевой белок.

### **Гель-хроматография на сефадексе G-100**

Полученный белок содержал следы миоглобина, который удаляли на колонке с сефадексом G-100, уравновешенной рабочим буфером, содержащим 0,1 М сульфат аммония (рН 7,5). Белковые фракции, содержавшие чистую ГАФД (по результатам ДСН-электрофореза), объединяли и высаливали сульфатом аммония, как описано выше. Удельная активность свежевыделенного фермента составляла  $95 \pm 5$  мкмоль NADH/мин на мг белка при рН 8,9 и 22 °С. Фермент хранился в виде концентрированной суспензии (концентрация белка 60 мг/мл) в 3,2 М сульфате аммония при температуре 4 °С.

## **1.2 Выделение человеческой рекомбинантной соматической глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы**

Выделение рекомбинантной ГАФД человека проводили на основе ранее разработанного в нашей лаборатории протокола [165], немного модифицировав его. Клетки *E. coli* штамма Rosetta 2 (DE3), трансформированные плазмидой рЕТ23а, содержащей ген ГАФД без дополнительных мотивов, были получены ранее в нашей лаборатории.

### **Наработка рекомбинантной соматической глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека в *E. coli***

Клетки *E. coli* штамма Rosetta 2 (DE3) выращивали согласно стандартной методике для автоиндукции. Для наращивания культуры без индукции плазмиды клон клеток, содержащий ген ГАФД в плазмиде рЕТ23а, переносили в 10 мл среды ZY (1%-ный триптон, 0,5%-ный дрожжевой экстракт), содержащей 0,8%-ную глюкозу, 100 мкг/мл

ампициллина и 30 мкг/мл хлорамфеникола, и выращивали в течение ночи при 37°C и 220 об/мин. Полученную культуру клеток хранили при -80°C.

**Среда ZYP-0.8G для наращивания культуры без индукции плазмиды (для хранения):**

Компонент	Объём
ZY (1%-ный триптон, 0.5%-ный дрожжевой экстракт)	44 мл
1M MgSO <sub>4</sub>	50 мкл
40%-ная глюкоза	1 мл
10 x NPS: 3.3 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 6.8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7.1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> на 100	5 мл
мл воды	50 мкл
Ампициллин 50 мг/мл	
(рН среды должен быть ~ 6,75)	

Для автоиндукции культуры использовали стерилизованную среду ZYP-5052, которую готовили из следующих компонентов (на 1 л):

- 1) ZY: 10 г триптон (или NZ-amine), 5 г дрожжевого экстракта – 800 мл воды;
- 2) 10 x NPS: 3,3 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6,8 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,1 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> на 100 мл воды;
- 3) 5052: 5 г глицерина, 0,5 г глюкозы, 2 г лактозы - 100 мл воды;
- 4) 1 M MgSO<sub>4</sub>.

Среду готовили следующим образом: смешивали 1+2+3, добавляли 1 мл 4 (рН среды должен быть 6,75). Разливали готовую среду в 1-л колбы (по 200 мл). Автоклавировали при 0,5 атм. Когда среда остынет, в колбы добавляли ампициллин (конечная концентрация 100 мкг/мл) и по 200 мкл культуры штамма продуцента, выращенного на среде ZY-0.8G. Растили клетки 22-24 ч при 25-26°C, 250 об/мин до OD<sub>600</sub> 1,8 – 1,9.

### **Экстракция белков.**

Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин при 4°C. Из 1 л культуры получали ~10 г клеточного осадка, который сразу использовали для выделения рекомбинантной ГАФД. Осадок ресуспендировали в 5-кратном объеме 10 mM калий-фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 2 mM ДТТ, 1 mM ЭДТА, 0,1 mM NAD<sup>+</sup> и коктейль ингибиторов протеаз в разведении 1:100. Сначала клетки ресуспендировали в 20 мл буфера и разрушали ультразвуком 8 раз по 15 сек при 30%-ной амплитуде при помощи ультразвукового генератора (Branson Digital Sonifier, Marshall Scientific, США). Затем добавляли к суспензии разрушенных клеток оставшийся буфер и оставляли 15 мин во льду при перемешивании.

### **Фракционирование сульфатом аммония.**

Разрушенные клетки удаляли центрифугированием (15000 g, 15 мин, 4°C). К полученному экстракту добавляли сухой измельченный сульфат аммония до 50%-ного насыщения (29,5 г сульфата аммония на 100 мл экстракта). Полученную суспензию центрифугировали (15000 g, 30 мин, 4 °C).

Полученный супернатант высаливали до 70%-ного насыщения (12,7 г сульфата аммония на 100 мл объема). Полученную суспензию центрифугировали (15000 g, 30 мин, 4 °C) и собирали супернатант.

Полученный супернатант 70%-ного насыщения высаливали до 85% (10 г сульфата аммония на 100 мл), доводили pH суспензии до 8 раствором 10%-ного аммиака и оставляли при 4°C до следующего дня.

### **Кристаллизация.**

На следующий день полученную суспензию центрифугировали (27000 g, 30 мин, 4°C). Осадок растворяли в минимальном объеме буфера (10 mM фосфат калия, 2 mM ДТТ, 1 mM ЭДТА, pH 7,4) и затем разбавляли указанным буфером до концентрации белка 1-2 мг/мл. От денатурированного белка избавлялись центрифугированием при 15000 g в

течение 10 мин при 4°C. К полученному супернатанту добавляли сухой сульфат аммония до помутнения раствора (приблизительно 0,295 г/мл) , после чего рН доводили до 8,0 добавлением 10%-ного водного раствора аммиака. Полученную суспензию оставляли стоять при 4°C на 24-72 ч.

Далее образовавшийся осадок центрифугировали (15000 g, 30 мин). Полученные осадок и супернатант анализировали на общую активность ГАФД. В том случае, если большая часть активности содержалась в осадке, его перекристаллизовывали (повторяли этап кристаллизации, как описано выше). Если основная часть общей активности ГАФД содержалась в супернатанте, то к супернатанту добавляли сухой сульфат аммония до помутнения и оставляли стоять на 24-48 ч, после чего образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (15000 g, 30 мин) и перекристаллизовывали.

#### **Гель-хроматография на сефадексе G-100.**

При необходимости ГАФД дополнительно очищали при помощи гелефильтрации на колонке с носителем сефадекс G-100 (1,2 × 25 см).

Предварительно суспензию белка после перекристаллизации осаждали центрифугированием (15000 g, 30 мин), и осадок растворяли в калий-фосфатном буфере, рН 7,4. На колонку, уравновешенную буфером (10 мМ фосфат калия , рН 7,4, 2 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА), наносили 0,5 мл ГАФД. При элюции собирали фракции по 0,5 мл, измеряя поглощение элюата при 280 нм с помощью UV-детектора Gilson, модель 111В. Все фракции, содержавшие белок, анализировали методом ДСН-электрофореза, после чего кристаллизовали необходимые фракции.

### **1.3 Выделение мутантной человеческой рекомбинантной соматической глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека C156S**

Наработку и выделение рекомбинантной мутантной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы человека C156S проводили по протоколу, описанному для рекомбинантной ГАФД дикого типа в разделе 1.2. Клетки *E. coli* штамма Rosetta 2 (DE3), трансформированные плазмидой pET23a, содержащей ген ГАФД с мутацией C156S, были получены ранее в нашей лаборатории [103].

### **1.4 Хранение препаратов ГАФД**

Для длительного хранения суспензии рекомбинантных белков центрифугировали в микроцентрифужных пробирках в течение 10 мин при 4 °С. Осадки ресуспендировали в 2,6 М растворе сульфата аммония, рН 7,0, при этом концентрация белка составляла 5-10 мг/мл. Суспензии ГАФД хранили в холодильнике при 4 °С.

### **1.5 Подготовка ГАФД перед экспериментами**

Необходимый объем суспензии ГАФД в сульфате аммония (30-50 мкл) центрифугировали (10 мин, 14 000 g, 4°C). Полученный осадок растворяли в 1 мл 10 mM калий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержавшего 5 mM дитиотреитол (ДТТ), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре для восстановления SH-групп в белке. Для удаления сульфата аммония и ДТТ белковый раствор пропускали через колонку с сефадексом G-50, уравновешенную 10 mM калий-фосфатным буфером с необходимым значением рН. Полученный раствор ГАФД использовали в течение дня.

## 1.6 Концентрация белка

Поскольку рекомбинантная ГАФД содержала NAD<sup>+</sup>, концентрацию рекомбинантной человеческой ГАФД определяли по методу Брэдфорда [166] с использованием калибровочного графика, построенного по раствору кроличьей ГАФД. Концентрацию ГАФД из мышц кролика определяли по поглощению ( $A_{280}^{0,1\%} = 1,07$ ).

Концентрацию актина определяли по поглощению  $A_{290}^{0,1\%} = 0,63$  [167].

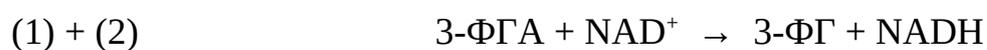
## 2 Определение активности ферментов

### 2.1 Определение дегидрогеназной активности ГАФД

Дегидрогеназную активность ГАФД определяли по скорости накопления NADH при окислении 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА) при 22 ° С. За ходом реакции следили при 340 нм на спектрофотометре Shimadzu UV-1800. Для расчёта активности использовали коэффициент молярной экстинкции NADH  $\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Реакционная смесь (1 мл) содержала буферный раствор (50 мМ глицин, 50 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, рН 8,9), 0,5 мМ NAD<sup>+</sup>, 1 мМ 3-ФГА и 1-5 мкг анализируемого препарата ГАФД. Реакцию начинали добавлением раствора 3-ФГА к реакционной смеси, и изменение поглощения регистрировали в течение 1 мин. Активность рассчитывали по линейной части кривой, которая соответствовала первым 10 секундам после добавления 3-ФГА. Активность выражали в мкмоль NADH, образующегося за 1 мин в расчёте на мг белка.

## 2.2 Определение ацилфосфатазной активности ГАФД

Ацилфосфатазную активность ГАФД определяли по накоплению NADH (340 нм) в результате сопряжения дегидрогеназной и ацилфосфатазной реакций, как описано ранее [168].



Реакция 1 обратима, идёт в присутствии ГАФД-SH до состояния равновесия. Реакция 2 необратимая, идёт в присутствии ГАФД-SOH. Когда обе реакции идут вместе (1+2), регистрируя NADH, мы следим за реакцией 2.

Смесь для анализа (1 мл) содержала 50 мМ HEPES, 1 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, pH 7,6, 1 мМ NAD<sup>+</sup>, 1 мМ 3-ФГА, и 30-40 мкг ГАФД. Реакцию начинали добавлением ГАФД, накопление NADH отслеживали в течение 30 секунд. Ацилфосфатазную активность рассчитывали по участку кривой, который соответствовал 5-15 секунд от начала реакции. Активность выражали в мкмоль NADH, образующегося за 1 мин, на мг ГАФД.

## 2.3 Определение активности каталазы

Ферментативную активность каталазы определяли спектрофотометрически по скорости снижения концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, которая определялась по поглощению при 230 нм ( $\epsilon = 72,7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Каталазу (1 мкг) добавляли к образцу (1 мл), содержавшему 0,1 мМ раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 10

мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,0, и регистрировали снижение поглощения при 230 нм в течение 1 мин при 22 ° С с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800. Активность выражали в мкмоль Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, расщеплённых в минуту, на 1 мг каталазы.

### **3 Определение концентрации реагентов**

#### **3.1 Концентрация DEANO (донора NO)**

Концентрацию DEANO определяли спектрофотометрически при 250 нм, считая коэффициент молярной экстинкции равным 6700 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>.

#### **3.2 Концентрация Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>**

Концентрацию Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> определяли спектрофотометрически при 230 нм с использованием молярного коэффициента поглощения 72,7 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>.

#### **3.3. Концентрация восстановленного глутатиона (GSH)**

Концентрацию GSH определяли в реакции с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБ), используя коэффициент молярной экстинкции образующегося продукта (5-тио-2-нитробензоат-аниона) 13 600 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> при 412 нм.

#### **3.4. Концентрация NAD<sup>+</sup>**

Раствор NAD<sup>+</sup> готовили на бидистиллированной воде. Концентрацию NAD<sup>+</sup> в получившемся растворе измеряли спектрофотометрически при 260 нм. Для расчёта концентрации NAD<sup>+</sup> использовали значение коэффициента молярной экстинкции при 260 нм  $\epsilon_{260} = 1,84 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ .

### 3.5. Приготовление и определение концентрации 3-ФГА

3-ФГА готовили из бариевой соли DL-глицеральдегид-3-фосфатдиэтилацетата (Sigma, США). Для этого 60 мг бариевой соли 3-ФГА суспендировали в 1 мл воды, добавляли Dowex-50 и встряхивали на Вортексе до полного растворения, после чего инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Далее держали пробирку ровно 5 мин на кипящей водяной бане, после чего давали раствору остыть.

Определение концентрации 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА) проводили ферментативным способом. Реакционная смесь (1 мл) содержала буфер для измерения ферментативной активности (50 мМ глицин, 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 мМ ЭДТА, pH 9,0), 1 мМ  $\text{NAD}^+$ , 10 мкг ГАФД и 1-2 мкл раствора с неизвестной концентрацией 3-ФГА. Реакцию инициировали добавлением фермента. После окончания дегидрогеназной реакции (отсутствие роста поглощения при 340 нм) фиксировали значение поглощения при 340 нм и рассчитывали концентрацию NADH в растворе (использовали значение коэффициента молярной экстинкции NADH при 340 нм  $\epsilon_{340} = 6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Концентрацию 3-ФГА рассчитывали из концентрации образования NADH, учитывая, что при окислении одной молекулы 3-ФГА образуется 1 молекула NADH.

### 4. Получение S-глутатионилированной ГАФД

Раствор ГАФД (0,8-1,0 мг/мл) в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,0, инкубировали в присутствии 0,1 мМ GSH и 0,1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  при 22°C (сначала добавляли GSH, а затем  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Во время инкубации из образца отбирали аликвоты объёмом 1 - 5 мкл для определения дегидрогеназной активности ГАФД, как описано в разделе 2.1, до тех пор, пока дегидрогеназная активность не достигала постоянного значения (примерно в

течение 1 ч). После инкубации дегидрогеназная активность составляла  $8,5 \pm 1,7$  мкмоль NADH/мг белка (10% активности по сравнению с необработанным образцом). S-глутатионилирование ГАФД в указанных условиях было подтверждено в нашей лаборатории раньше [46].

## **5. Модификация ГАФД окисью азота и характеристика препаратов модифицированной ГАФД**

### **5.1. Получение S-нитрозилированной ГАФД**

ГАФД готовили к эксперименту, как указано в разделе 1.5. В качестве донора NO использовали DEANO.

Концентрированный раствор DEANO (20-30 мМ) в метаноле готовили непосредственно перед экспериментом.

К раствору ГАФД (0,8-1,0 мг/мл) в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,0, добавляли DEANO до достижения необходимой конечной концентрации (0,1-0,3 мМ). Образец инкубировали при 22 °С в течение 1 ч. Во время инкубации из образца отбирали аликвоты объемом 1-5 мкл для определения дегидрогеназной активности ГАФД, как описано в разделе 2.1., пока активность фермента не достигла постоянного значения. Из той же пробы отбирали аликвоты объемом 30 мкл для определения ацилфосфатазной активности, как описано в разделе 2.2.

### **5.2. Количественное определение модифицированных цистеинов методом Элмана**

Количество свободных цистеинов в нативной и S-нитрозилированной ГАФД определяли по методу Элмана [169]. Раствор ГАФД (нативной или модифицированной) пропускали через колонку с сефадексом G-50, уравновешенную с 50 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, рН 7,6. Элюированную

фракцию, содержащую ГАФД (0,5 мл), смешивали с 0,5 мл 8 М гидрохлорида гуанидина в том же буфере. К полученному образцу добавляли 10 мкл 10 мМ 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты (ДТНБ) и наблюдали за увеличением поглощения при 412 нм. После завершения реакции регистрировали значение поглощения. Содержание цистеинов на моль ГАФД было рассчитано с использованием молярного коэффициента поглощения для тионитробензоат аниона, равного  $13\ 600\ \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Количество модифицированных цистеинов определяли как разницу в количестве свободных цистеинов в нативной и модифицированной ГАФД.

### **5.3. Количественное определение S-нитрозотиолов в S-нитрозилированной ГАФД методом Сэвилла-Грисса**

После 1-ч инкубации ГАФД или актина в присутствии DEANO образец белка пропускали через колонку с сефадексом G-50, уравновешенную 10 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7,0. Фракцию, содержащую максимальную концентрацию белка, инкубировали с 1 мМ раствором ацетата ртути (II) в течение 15 минут, а затем выпавший осадок белка удаляли центрифугированием (5 минут, 13 000 g). Полученный супернатант (0,5 мл) смешивали с 0,5 мл реактива Грисса и через 15 минут регистрировали поглощение при 540 нм против контрольного образца, содержащего смесь буфера с реактивом Грисса. Содержание SNO в белке рассчитывали с помощью калибровочного графика, построенного по раствору нитрита натрия.

## **6. Сравнительный анализ S-глутатионилированной ГАФД и S-нитрозилированной ГАФД**

### **6.1. Исследование обратимости модифицированной ГАФД**

Для изучения обратимости модификаций ГАФД S-нитрозилированную и S-глутатионилированную ГАФД получали, как описано в разделах 4 и 5.1. После инактивации раствор ГАФД (5,5 мкМ) разбавляли в 4 раза 10 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7,0, без добавок или в присутствии следующих добавок: 1) 5 мМ ДТТ, 2) 5 мМ GSH, 3) 5 мМ GSH вместе с 1 мкМ глутаредоксином 1 (Grx1), 4) 1 мкМ или 5 мкМ Grx1, предварительно восстановленного в присутствии 5 мМ GSH, 5) 1 мкМ тиоредоксина 1 вместе с 0,5 мкМ тиоредоксинредуктазой и 0,2 мМ NADPH, и 6) 0,5 мкМ тиоредоксинредуктазы и 0,2 мМ NADPH. Все образцы инкубировали при 22°C. Для контроля реактивации ГАФД через указанные промежутки времени из образцов отбирали аликвоты для определения дегидрогеназной активности, как описано в разделе 2.1.

### **6.2. Исследование термостабильности методом S-глутатионилированной и S-нитрозилированной ГАФД дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК)**

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии использовали исследования влияния модификаций на стабильность ГАФД.

Дифференциальную сканирующую калориметрию проводили на калориметре MicroCal VP-DSC с танталовыми капиллярами (Malvern Instruments, Northampton, MA 01060, США) при скорости нагрева 1 град/мин. Каждый образец (700 мкл) содержал раствор нативной или модифицированной ГАФД (0,5 мг/мл в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,0). Термическая денатурация исследуемых белков была необратимой.

### **6.3. Исследование скорости трипсинолиза нативной и модифицированной ГАФД**

Растворы нативной, S-нитрозилированной и S-глутатионированной ГАФД (0,4-0,5 мг/мл в 10 mM калий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 1 mM CaCl<sub>2</sub>) инкубировали при 37°C в присутствии трипсина (50 мкг/мл) при осторожном встряхивании. Через различные промежутки времени из растворов отбирали аликвоты (20 мкл), смешивали с 20 мкл буфера для образцов и нагревали в течение 5 мин при 90°C. Образцы анализировали с помощью ДСН-электрофореза в восстанавливающих условиях. Скорость расщепления ГАФД трипсином оценивали по убыванию интенсивности полосы, соответствующей мономеру ГАФД (36 кДа). Количественное определение интенсивности белковых полос проводили с помощью программы ImageJ.

## **7. Методы анализа белков**

### **7.1. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-электрофорез)**

Анализ белковых проб, полученных на разных стадиях работы, проводили методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по методу Лэммли [170]. В качестве электродного буфера использовали 0,025 M Трис, 0,192 M глицин, 0,1% ДСН, pH 8,3. В качестве стандартов молекулярных масс использовали наборы Pierce Unstained Protein Ladder (14,4-116 кДа, Biorad, США) или PageRuler Prestained Ladder (10-170 кДа). К образцам белка добавляли равный объём 2-кратного буфера для образцов (0,125 M Трис-HCl, pH 6,8; 4% ДСН; 20% глицерин; 0,02% бромфеноловый синий, 10% β-меркаптоэтанол) или соответствующий объём 4-кратного буфера для образцов (0,25 M Трис-HCl, pH 6,8, 8%-ный ДСН,

40%-ный глицерин, 0,04%-ный бромфеноловый синий, 20% β-меркаптоэтанол) и инкубировали их в течение 10 мин при 95°C. В случае невозстанавливающих условий образцы разбавляли буфером для образцов без β-меркаптоэтанола и анализировали без нагревания.

На гель наносили 5-20 мкл белковых растворов, содержащих 0,5 – 15 мкг белка. Электрофорез проводили при постоянной силе тока 15 мА на одно стекло. Гели окрашивали в течение 5 мин в горячем растворе красителя (0,04%-ный Кумасси R-250, 20%-ный изопропанол, 10%-ный этанол и 10%-ная уксусная кислота) и затем отмывали избыток красителя в 10%-ной уксусной кислоте при нагревании.

## **7.2. Иммуноблоттинг**

После проведения ДСН-электрофореза по методу Лэммли в 12% разделяющем геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью камеры полусухого переноса Trans-Blot (Biorad) (165 мА, 22 мин), предварительно замачивая на 40 мин мембрану и гель в буфере для переноса (25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% этанол, рН 8,6).

После переноса мембрану блокировали буфером PBST (PBS с 0,1%-ным Tween 20), содержащем 5% сухого молока, в течение 60 мин. Затем мембрану инкубировали с раствором необходимых первичных антител в PBST, содержащем 5% сухого молока, в течение 1 ч. Моноклональные мышинные антитела против биотина разводили буфером PBST с 3%-ным сухим обезжиренным молоком в соотношении 1:1500, моноклональные мышинные антитела против глутатионилированных белков разводили тем же буфером в соотношении 1:750, моноклональные мышинные антитела против бета-актина разводили в соотношении 1:1500, мышинные моноклональные антитела против ГАФД использовали в концентрации 1 мкг/мл.

Вторичные антитела представляли собой конъюгированные с пероксидазой антитела против антител мыши или кролика с разведением 1:5000 в PBST, содержащем 5% сухого обезжиренного молока. Инкубацию с вторичными антителами проводили 1 ч при 25°C. Белковые полосы визуализировали с помощью набора для усиленной хемилюминесценции (Advansta WesternBright ECL) с использованием системы гель-документирования ChemiDoc XRS+ (BioRad, США) с экспозицией от 20 сек до 4 мин.

### **7.3. Точечный иммуоблоттинг**

Для детекции глутатионилированной формы ГАФД на нитроцеллюлозную мембрану наносили растворы интактной ГАФД и глутатионилированной ГАФД (раздел 4). Мембрану высушивали естественным образом. Для блокировки участков неспецифического связывания антител мембрану инкубировали в буфере PBST с 5%-ным обезжиренным молоком в течение 1 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Далее проводили окрашивание мышинными антителами против глутатионилированных белков (MAB5310, Merck Millipore, разведение 1:750) как описано в разделе 7.2.

### **7.4. Спектроскопия кругового дихроизма**

Для изучения изменений вторичной структуры белка, после модификаций мы использовали спектроскопию кругового дихроизма (КД).

Для записи спектров ГАФД использовали 10 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,5, концентрация белка составляла ~1 мг/мл. Спектры КД регистрировали в диапазоне длин волн от 190 до 240 нм при температуре 25°C в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0,1 мм на

спектрополяриметре Chirascan (Applied Photophysics, UK). Скорость изменения длины волны составляла 1 нм/сек.

## 7.5. MALDI-TOF-масс-спектрометрия

Анализ методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии проводили на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащённом Nd-лазером, путём детектирования ионов. Данный метод использовали для обнаружения цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД в присутствии димедона, который связывается с цистеинсульфеновой кислотой с образованием стабильного продукта.

ГАФД инкубировали в присутствии 0,1 мМ DEANO при 22 °С в течение 30 мин (раздел 5.1), затем добавляли димедон (конечная концентрация 1 мМ). После 1-часовой инкубации с димедоном при 22 °С модифицированную ГАФД диализовали против воды, очищенной системой Milli Q (4 ч при 4 °С). Контрольный образец ГАФД инкубировали в тех же условиях без добавок и затем также диализовали против очищенной воды.

Анализировали растворы полноразмерных белков (0,2 мг/мл), а также пептиды, полученные после их расщепления трипсином.. Для получения триптической карты 50 мкл белка смешивали с 10 мкл модифицированного трипсина (15 мк г/мл, Promega) в 0,05 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , и раствор инкубировали в течение 50 мин при 37 °С. Протеолиз останавливали добавлением 10 мкл 0,5% трифторуксусной кислоты (ТФУ). Аликвоту 0,5 мкл смешивали с 1 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (20 мг/мл в 30% растворе ацетонитрила, содржавшего 0,5% ТФУ). Спектры полноразмерных белков снимали в линейном режиме; точность измерения среднего пика массы находилась в пределах 10 Да. Спектры проб, расщеплённых трипсином, регистрировали в рефлекторном режиме, точность измерения моноизотопных массовых пиков составляла 50 ppm. Масс-спектры

обрабатывали с помощью программного обеспечения FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия). Пептиды идентифицировали с помощью базы данных NCBI и программы поиска пептидов Mascot peptide mass fingerprint search program [171]. MS/MS спектры были проанализированы вручную.

## **7.6. Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ESI-MS)**

Метод применяли для исследования продуктов модификации ГАФД окисью азота.

ГАФД (1 мг/мл) инкубировали в присутствии 0,3 мМ DEANO при 22 °С в течение 1 ч (см. раздел 5.1). Раствор делили на две пробы, в одну из которых добавляли димедон (конечная концентрация 1 мМ). Через 15 мин модифицированные образцы (с димедоном и без него) диализовали против воды, очищенной в системе Milli Q (3 ч при 4 °С). Контрольный образец ГАФД инкубировали в тех же условиях без добавок и затем диализовали против очищенной воды. Все образцы хранили в замороженном виде до анализа.

Образцы разбавляли в 10 раз 0,1%-ной муравьиной кислотой и анализировали в трёх повторностях методом ESI-MS с проточной инъекцией и гибридным квадрупольным масс-анализатором (Maxis Impact qTOF, Bruker Daltonics, Бремен, Германия). Постоянный поток ацетонитрила/Н<sub>2</sub>О (9/1, по объёму) с 0,1%-ной муравьиной кислотой подавался со скоростью 10 мкл/мин через бинарный насос Dionex UltiMate 3000, и 5 мкл образца вводили с помощью автодозатора Dionex UltiMate 3000 (ThermoScientific, Бремен, Германия). Масс-спектры были получены в режиме положительных ионов. 100 масс-спектров усреднялись по максимуму общего ионного тока (ОИТ). Исходные MS-файлы обрабатывали с помощью программы Compass DataAnalysis (версия 4.1). Точность определения масс для обнаруженных пиков составила приблизительно 1 ppm ( $\pm 0,001$  Да).

## 8. Эксперименты на эукариотических клетках линии НЕК 293Т

### 8.1. Культивирование клеток НЕК 293Т<sup>1</sup>

Линия клеток НЕК 293Т является производной оригинальной клеточной линии эмбриональной почки человека НЕК 293. Геном НЕК 293Т содержит SV40 Т-антиген, что позволяет клеточной линии производить рекомбинантные белки с плазмидных векторов, содержащих промотор SV40. По этой причине НЕК 293Т обычно используется для продукции с ретровирусных векторов.

Культура клеток НЕК 293Т состоит из популяции клеток, прикреплённых к подложке. Клетки культивировали в культуральных флаконах в среде DMEM/F-12 (Панэко, Россия) с добавлением 10%-ного раствора эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), GlutaMAX (Gibco, США), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Панэко, Россия). Клеточные культуры выращивали в увлажненной атмосфере при 5%-ном содержании CO<sub>2</sub> при 37°C. Все манипуляции с клетками проводили в стерильных условиях под ламинатором. Ростовую среду сменяли каждые 3-4 дня.

Пассирование клеток *in vitro* осуществляли по стандартной методике: при достижении монослоем 80-90%-ной конфлюэнтности, клетки переводили в суспензию с использованием раствора, содержавшего 0,25%-ный трипсин и 0,2% ЭДТА и рассеивали в соотношении 1:5-1:20. В экспериментах с использовали клеточную культуру до 25-го пассажа.

---

<sup>1</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: **M.V. Medvedeva, S. Yu Kleimenov, V.R. Samygina, V.I. Muronetz, E.V. Schmalhausen (2023) S-nitrosylation and S-glutathionylation of GAPDH: Similarities, differences, and relationships. *Biochimica et Biophysica Acta* 1867(9):130418.** Личный вклад автора состоит в проведении экспериментов и анализе результатов.

## 8.2. Подсчёт клеток

Подсчёт клеток осуществляли на автоматическом счётчике клеток TC20 (Biorad, США).

## 8.3. Инкубация клеток в присутствии $H_2O_2$ и донора NO

Клетки линии НЕК 293Т переносили в 6-луночные планшеты по  $1 \cdot 10^6$  клеток в лунку или культуральные флаконы T25 по  $2 \cdot 10^6$  клеток на флакон в буфере для культивирования клеток (раздел 8.1.) и оставляли в  $CO_2$ -инкубаторе до следующего дня, когда проводили эксперимент.

Перед экспериментом клетки дважды промывали буфером HBSS (Hank's balanced salt solution): 0,14 М NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 мМ Д-глюкоза (декстроза), 4 мМ NaHCO<sub>3</sub>. Во флаконы с клетками добавляли растворы  $H_2O_2$  или DEANO в буфере HBSS до достижения различных концентраций (25 - 100 мкМ  $H_2O_2$  или 0,1 - 0,4 мМ DEANO). В контрольные флаконы добавляли соответствующие объёмы HBSS буфера без добавок. После 1ч инкубации при 37°C клетки осторожно промывали буфером HBSS, чтобы удалить избыток реагентов.

## 8.4. Проточная цитометрия

Степень апоптоза клеток НЕК 293Т после инкубации с перекисью водорода или донором NO оценивали с помощью набора Annexin V-FITC/PI (Vazyme, Нанджинг, Китай), в соответствии с инструкцией производителя. Клетки высевали в 12-луночные планшеты ( $0,15 \times 10^6$  клеток/мл) по 1 мл на лунку на ночь. Через 24 ч клетки обрабатывали перекисью водорода или донором NO, как описано в разделе 8.3. После этого клетки промывали 2

раза HBSS буфером, открепляли от подложки добавлением 100 мкл раствора трипсин-ЭДТА, промывали в растворе PBS и собирали центрифугированием при 500×g в течение 10 мин. К осадку клеток добавляли 5 мкл аннексина V, меченого FITC и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 10 мкл йодистого пропидия PI, в защищённом от света месте. Окрашенные клетки анализировали методом проточной цитометрии с помощью анализатора MACSQuant Analyzer (Milteyi Biotec GmbH, Северный Рейн-Вестфалия, Германия). Для каждого анализа использовали не менее 10 000 клеток, эксперименты проводили дважды. Необработанные данные извлекали из файлов \*.fcs с помощью программы FlowJo v.10.

Апоптоз анализировали путём построения точечной диаграммы аннексин/PI, которая позволяет различать следующие популяции: левый нижний квадрант (аннексин-V-FITC и PI отрицательные): жизнеспособные клетки; правый нижний квадрант (аннексин-V позитивный, PI отрицательный): ранний апоптоз; правый верхний квадрант (положительный как для аннексина-V, так и для PI): поздний апоптоз и левый верхний квадрант (положительный для PI, отрицательный для аннексина-V-FITC): некроз. Данные анализировали с помощью программы MACSQuantify и аналитического программного обеспечения FlowJo v10 (Tree Star Inc.).

Данные предварительно подготовили: построили графики зависимости SSC (боковой разброс) от FSC (прямой разброс), это параметры коррелируют с размером клеток. Мы убрали популяцию с маленькими значениями SSC и FSC, т.к. она соответствует обломкам клеток, а не целым клеткам. Далее мы оставили только сигналы от отдельных клеток, убрав сигналы от слипшихся клеток: построили график FSC-W (ширина прямого разброса) от FSC и убрали популяции клеток с сигналами, выше сигнала от 1 клетки. Степень апоптоза/некроза определяли как процент клеток соответствующего квадранта от общего числа клеток.

## 8.5. Получение клеточных лизатов

Прикреплённые клетки отделяли от подложки с помощью раствора трипсина/ЭДТА (0,25%-ные растворы трипсина и ЭДТА смешивали в соотношении 1:3), после чего трипсин инактивировали добавлением 2-3-кратного объема культуральной среды с 10%-ной сывороткой. Клетки осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 мин.

Клеточный осадок дважды промывали холодным буфером PBS, pH 7,0, и суспендировали в 0,2 мл PBS, pH 7,0, содержащего коктейль ингибиторов протеаз (Amresco, США). Для определения активности ГАФД клетки суспендировали в указанном буфере без добавок. Для выявления S-глутатионилированных белков методом вестерн-блоттинга или иммунопреципитации с антителами против GSH клетки суспендировали в буфере, содержащем 5 мМ йодацетамид (для предотвращения окисления свободных SH-групп). Для выявления сульфенированных белков клетки суспендировали в буфере, содержащем 5 мМ йодацетамид и 1 мМ DCP-Bio1 (реагент на сульфеновую кислоту, конъюгированный с биотином).

Образцы подвергали ультразвуковой обработке на льду с помощью цифрового ультразвукового дезинтегратора Branson (амплитуда 10 %, 5 x 1 сек). Клеточные обломки удаляли центрифугированием (14 000 g, 10 мин, 4°C). Концентрацию общего белка в лизатах измеряли по методу Брэдфорд (раздел 1.6), используя калибровочную кривую для кроличьей ГАФД. Концентрацию общего белка в пробах выравнивали до 1 мг/мл, добавляя PBS, pH 7,4.

Полученные лизаты использовали для определения активности ГАФД в клетках, для выявления S-глутатионилированных белков методом иммунопреципитации или для обнаружения сульфенированных белков методом иммуноблоттинга в восстанавливающих условиях.

## **8.6. Измерение активности ГАФД в клеточных лизатах**

Через 30 мин инкубации при 25°C измеряли ферментативную активность ГАФД (раздел 2.1), отбирая 20-40 мкг общего белка на одно измерение. Активность ГАФД в одной пробе измеряли 2-3 раза.

## **8.7. Обнаружение S-глутатионилированных белков в клеточных лизатах с помощью иммунопреципитации с антителами против GSH**

Суспензию белок G-сефарозы (около 300 мкл) промывали PBS, pH 7,0, и центрифугировали в 1,5-мл центрифужной пробирке (500 g, 5 мин). Супернатант удаляли пипеткой. Осадок сефарозы (150 мкл) смешивали с 150 мкл буфера PBS и 30 мкг мышинных антител против S-глутатионилированных белков (MAB5310, Merck Millipore). Сефарозу инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 часа, а затем центрифугировали (500 g, 5 мин). Супернатант удаляли пипеткой, затем к сефарозе добавляли 1 мл PBS, перемешивали, центрифугировали и удаляли супернатант. Процедуру повторяли четыре раза, чтобы удалить не связавшиеся с сефарозой антитела. Полученную сефарозу с иммобилизованными антителами делили на три части (по 50 мкл осажденной сефарозы). Каждый образец смешивали с 1 мл исследуемого лизата (общая концентрация белка 1 мг/мл) клеток НЕК 293Т, приготовленного из интактных клеток (1), клеток после инкубации с 50 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2) и после инкубации с 0,3 мМ DEANO (3) (лизаты были приготовлены, как описано в разделе 8.5). Контрольный образец, содержащий 50 мкл белок G-сефарозы без антител, смешивали с экстрактом необработанных клеток для проверки неспецифического связывания белков с белок G-сефарозой. Все образцы сефарозы инкубировали на шейкере в течение 1 часа при 4°C, а затем промывали PBS

4 раза, как описано выше. После промывки образцы смешивали с 50 мкл восстанавливающего буфера для ДСН-электрофореза и нагревали в течение 5 мин при 90°C. При такой обработке комплексы глутатионилированных белков с иммобилизованными на сефарозе антителами переходят в раствор, после чего белки могут быть идентифицированы методом иммуноблоттинга с соответствующими антителами. Полученные супернатанты анализировали методом вестерн-блоттинга. Для окрашивания на ГАФД мембрану инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против ГАФД (PAV932Hu02, Cloud-Clone Corp., разведение 1:2000), а затем с вторичными антителами против антител кролика, конъюгированными с пероксидазой (Imtek, Россия, разведение 1:5000). Для окрашивания на актин мембрану промывали 30 мин стриппинг-буфером (15% глицин, 1% ДСН, 10% Tween 20, pH 2,2 и инкубировали с мышинными моноклональными антителами против бета-актина (MAV340Hu21, Cloud-Clone Corp., разведение 1:1000), а затем с вторичными антителами против антител мыши, конъюгированными с пероксидазой (Sigma-Aldrich).

### **8.8. Обнаружение сульфенированных белков в клеточных лизатах**

После инкубации клеток НЕК 293Т с 50 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и после инкубации с 0,3 мМ DEANO получали лизаты клеток в присутствии DCP-Bio1 (лизаты были приготовлены, как описано в разделе 8.5). Ультразвуковую обработку проводили в лизирующем буфере PBS pH 7,0, содержащем 1 мМ DCP-Bio1, 5 мМ JAm (чтобы предотвратить окисление SH-групп), ингибиторы протеаз в разведении 1:100. После обработки ультразвуком лизаты инкубировали 15 минут на льду.

Далее к части образцов добавляли 4-кратный восстанавливающий буфер для ДСН-электрофореза и нагревали в течение 5 мин при 90°C. Полученные супернатанты анализировали методом вестерн-блоттинга.

## **9. Влияние $H_2O_2$ и NO на взаимодействие ГАФД с белками-партнёрами**

### **9.1. Иммунопреципитация комплекса ГАФД с белками-партнёрами из клеточных лизатов**

Суспензию белок G-сефарозы (около 300 мкл) промывали PBS, pH 7,0, и центрифугировали в 1,5-мл центрифужной пробирке (500 g, 5 мин). Супернатант удаляли пипеткой. Осадок сефарозы (150 мкл) смешивали с 150 мкл буфера PBS и 30 мкг мышинных моноклональных антител против ГАФД (6C5, Nu Test). Сефарозу инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 часа, а затем центрифугировали (500 g, 5 мин). Супернатант удаляли пипеткой, затем к сефарозе добавляли 1 мл PBS, перемешивали, центрифугировали и удаляли супернатант. Процедуру повторяли четыре раза, чтобы удалить не связавшиеся с сефарозой антитела. Полученную сефарозу с иммобилизованными антителами делили на три части (по 50 мкл осажденной сефарозы). Каждый образец смешивали с 1 мл исследуемого лизата (общая концентрация белка 1 мг/мл) клеток НЕК 293Т, приготовленного из интактных клеток, клеток после инкубации с 2 мМ ДТТ или с 50 мкМ  $H_2O_2$  и клеток после инкубации с 0,3 мМ DEANO (лизаты были приготовлены, как описано в разделе 8.5. Контрольный образец, содержащий 50 мкл белок G-сефарозы без антител, смешивали с лизатом необработанных клеток для проверки неспецифического связывания белков с белок G-сефарозой. Все образцы сефарозы инкубировали на шейкере в течение 1 часа при 4°C, а затем промывали PBS 4 раза, как описано выше. После промывки образцы осажденной сефарозы смешивали с 50 мкл восстанавливающего буфера для ДСН-электрофореза и нагревали в течение 5 мин при 90°C.

Полученные супернатанты сначала исследовали ДСН-элекрофорезом. На геле помимо полос, соответствующим ГАФД, тяжёлым и лёгким цепям антител против ГАФД, мы обнаружили полосы белков-партнёров ГАФД. Самые яркие из этих полос мы вырезали и идентифицировали методом масс-спектрометрии. Среди вырезанных белков обнаружили актин.

Далее, полученные супернатанты анализировали методом вестерн-блоттинга. Для окрашивания на ГАФД мембрану инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против ГАФД (разведение 1:2000) (PAB932Hu02, Cloud-Clone Corp., разведение 1:2000), а затем с вторичными антителами против антител кролика, конъюгированными с пероксидазой (Imtek, Россия).

Для окрашивания мембраны на актин, мембрану предварительно промывали 30 мин стриппинг-буфером (15% глицин, 1% ДСН, 10% Tween 20, рН 2,2) и инкубировали с мышинными моноклональными антителами против бета-актина (разведение 1:1000) (MAV340Hu21, Cloud-Clone Corp.), а затем с вторичными антителами против антител мыши, конъюгированными с пероксидазой (разведение 1:5000) (Sigma-Aldrich).

## **9.2. Исследование взаимодействия между ГАФД и альфа-актином с помощью иммуоферментного анализа (ИФА)**

Раствор очищенного белка (восстановленной или окисленной ГАФД, глобулярного или фибриллярного мышечного альфа-актина) в концентрации 2 мкг/мл в буфере PBS, рН 7,4, добавляли в лунки 96-луночного планшета (100 мкл на лунку). Для адсорбции белка планшет инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с медленным покачиванием. После инкубации лунки промывали буфером PBST 3 раза, а затем к адсорбированному белку добавляли раствор тестируемого белка-партнёра (2 мкг/мл в буфере PBS, рН 7,4) (растворимый актин добавляли к

адсорбированной ГАФД и наоборот). Планшет инкубировали в течение 30 мин при медленном покачивании, затем лунки промывали PBST 3 раза. Для выявления связывания растворимой ГАФД с адсорбированным актином использовали мышинные моноклональные антитела против ГАФД (клон 6С5, NuTest). Для выявления связывания растворимого актина с адсорбированной ГАФД использовали мышинные моноклональные антитела против бета-актина (MAВ340Hu21, Cloud-Clone Corp.), которые распознают как бета-, так и альфа-актин.

Раствор первичных антител (1 мкг/мл в буфере PBS, pH 7,4) добавляли в лунки по 100 мкл, и планшет инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре при медленном покачивании. После инкубации планшет промывали PBST 3 раза и добавляли в лунки по 100 мкл раствора конъюгированных с пероксидазой IgG против антител мыши (Sigma-Aldrich, 1 мкг/мл в буфере PBS, pH 7,4). После 30-минутной инкубации при комнатной температуре планшет промывали PBST и в лунки добавляли по 100 мкл субстратной смеси (0,1 мл 0,3 М этанольного раствора о-фенилендиамина и 5 мкл 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 5 мл 50 mM цитратного буфера, pH 4,5). После 10-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли поглощение в лунках при 492 нм с помощью микропланшетного ридера Stat Fax 2100 Thermo Fisher.

### **9.3. Получение S-нитрозилированного актина**

G-актин переносили в 10 mM калий-фосфатный буфер, pH 7,0, путём гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50. Раствор G-актина (2 мг/мл) инкубировали в присутствии 0,3 mM DEANO в течение 1 ч, а затем избыток DEANO удаляли гель-фильтрацией.

#### **9.4. Транснитрозилирование между ГАФД-SNO и G-актином: обнаружение методом иммуноблотинга**

S-нитрозилирование G-актина в присутствии ГАФД-SNO выявляли по появлению сульфенированного актина (актин-SOH), который является продуктом спонтанного гидролиза актин-SNO. Актин-SOH метили DCP-Bio1 (реагент на сульфеновую кислоту, конъюгированный с биотином), после чего белковую смесь анализировали методом иммуноблотинга с антителами против биотина.

ГАФД-SNO готовили, как описано в разделе 5.1. Раствор ГАФД-SNO в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,0 (1 мг/мл, 150 мкл) смешивали с раствором интактного G-актина в том же буфере (1 мг/мл, 150 мкл), и смесь инкубировали в течение 1 ч.

Смесь белков инкубировали с 1 мМ DCP-Bio1 в течение 15 минут, в результате чего образовывался стабильный продукт между сульфенированными белками и DCP-Bio1. После ДСН-электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, и окрашивали на биотин с помощью мышинных моноклональных антител на биотин, клон BN 34 (Sigma, 1:1500). Вторичные антитела представляли собой конъюгированные с пероксидазой антимышиные IgG (Sigma-Aldrich, 1:5000).

#### **9.5. Идентификация сульфенированных остатков цистеина в G-актине с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа**

Чтобы идентифицировать сульфенированные остатки цистеина в актине после инкубации с ГАФД-SNO, сульфеновую кислоту метили димедоном (реагентом, образующим стабильный ковалентный продукт с цистеинсульфеновыми кислотами). Поскольку белковую смесь затем разделяли методом ДСН-электрофореза, свободные цистеиновые остатки

модифицировали йодоацетамидом, чтобы предотвратить их взаимодействие с акриламидным гелем. Для этого образец, содержащий ГАФД-SNO и G-актин, сначала инкубировали с 5 мМ димедоном в течение 30 минут, после чего добавляли йодоацетамид до конечной концентрации 2 мМ. Смесь инкубировали в течение 30 мин при 25 °С, а затем оставили на ночь при 4 °С на качалке.

На следующий день к образцу добавляли новую порцию йодоацетамида (общая концентрация 5 мМ), рН образца доводили до 8,5 с помощью концентрированного раствора Триса и добавляли ДСН (конечная концентрация 2%). После 30-минутной инкубации при 25 °С образец дважды разбавляли буфером для ДСН-электрофореза и нагревали при 90 °С в течение 5 минут. Образец, содержащий S-нитрозилированный актин (положительный контроль), модифицировали димедоном и йодоацетамидом, как описано выше. Образец, содержащий интактный актин (отрицательный контроль), модифицировали йодоацетамидом без димедона. После ДСН-электрофореза полосы актина вырезали из геля и анализировали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

#### **9.6. MALDI-TOF-масс-спектрометрия проб актина после транснаитрозилирования с ГАФД-SNO**

Анализ проб проводили на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащённом Nd-лазером, путём детекции молекулярных ионов  $MH^+$ . Белковую полосу, окрашенную Coomassie Brilliant Blue G-250, вырезали из геля и дважды промывали 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1 М  $NH_4HCO_3$  в течение 20 мин при 37°С для удаления красителя. После удаления ацетонитрила кусочек геля высушивали. Образцы геля смешивали с 4 мкл модифицированного

трипсина (Promega) или эндопротеиназы AspN (Sigma-Aldrich) (15 мкг/мл в 0,05 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) и инкубировали в течение 6 ч при 37°C.

Масс-спектры анализировали с помощью программы FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). Белки идентифицировали с помощью программы Mascot.

## 10. Статистическая обработка

Количество независимых повторов эксперимента указано в подписях к рисункам. Количество повторов внутри эксперимента указано в соответствующем разделе Материалов и методов. Для данных в виде диаграмм границы соответствуют нижнему и верхнему значениям эксперимента, сплошная линия соответствует среднему значению. Для данных, представленных в виде бокс-плотов (диаграмм размаха), усы показывают крайние значения или возможные выбросы из распределения согласно расчёту:  $X1 = Q1 - k(Q3-Q1)$ ;  $X2 = Q3 + k(Q3-Q1)$ , где  $X1$  и  $X2$  - нижняя и верхняя границы усов соответственно;  $Q1$  и  $Q3$  - первый и третий квартили;  $Q3-Q1$  - интерквартиль;  $k = 1,5$ . Сплошной линией показана медиана, пунктирной - среднее значение.

Для статистического анализа был использован пакет GraphPad Prism (2024, Бостон, США). Критерии, использованные для определения наличия статически значимого отличия между выборками с уровнем значимости 0,05, указаны в подписях к рисункам.

Нормальность распределения определяли с помощью 4 критериев по приоритету: Д'Агностини-Пирсона > Шапиро-Уилка > Андерсон-Дарлингга > Колмогорова-Смирнова. Выбор теста на нормальность определялась наличием/отсутствием в выборке перекосов и повторяющихся данных.

Если нормальность распределения данных подтверждалась, для парных выборок использовали t-критерий Стьюдента, в случае невозможности использования дисперсионного анализа применяли

непараметрический U-критерий Манна-Уитни с уровнем статистической значимости  $p < 0,05$ . Для сравнения множественных групп с нормальным распределением использовали ANOVA, с ненормальным распределением тест Краскал-Уоллиса. Разница между группами считалась статистически значимой при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Получение препаратов белков

#### 1.1. Выделение ГАФД из мышц кролика

Для выделения кроличьей ГАФД использовали гомогенизированные замороженные мышцы кролика, высаливали экстракт до 70%-насыщения, ресуспендировали в калий-фосфатном буфере, рН 7,0 и кристаллизовали добавлением сухого сульфата аммония, как было описано ранее (Материалы и методы, раздел 1.1). Осадок, полученный после кристаллизации, растворяли в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,0 с добавлением 2 мМ ДТТ и наносили на колонку с сефадексом G-100, предварительно уравновешенную этим же буфером (Материалы и методы, раздел 1.1). Собирали фракции объёмом 1 мл. Фракции, соответствующие началу и середине пика элюции белка, содержащие меньше примесных белков высаливали сухим сульфатом аммония (0,52 г на 1 мл) с последующим доведением рН до 8,0 10%-ным раствором аммиака.

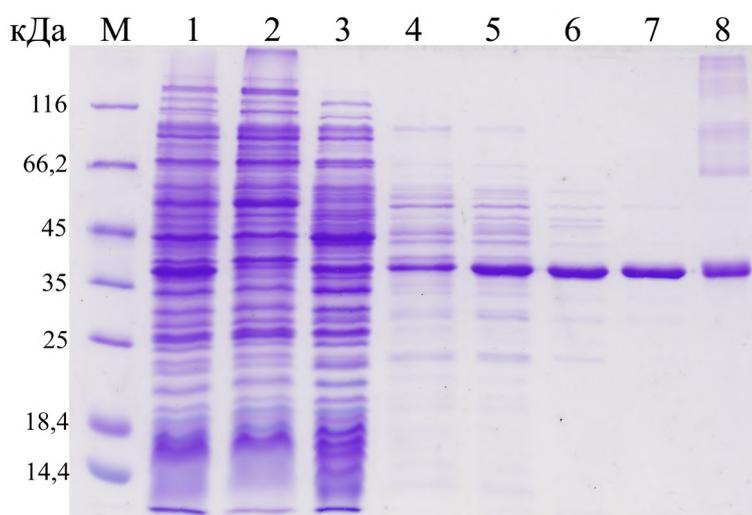
Из 400 г замороженных мышц кролика получили около 60 мг чистого белка. Удельная активность кроличьей ГАФД при 22 °С составила  $125 \pm 8$  мкмоль NADH / мин\*мг белка.

О чистоте препарата можно судить по электрофореграмме: при анализе белка методом ДСН-электрофореза наблюдали основную полосу с молекулярной массой около 35 кДа (рис. 17 В, дорожка 1).

#### 1.2. Выделение человеческой рекомбинантной ГАФД дикого типа

Для выделения активной, не содержащей дополнительных мотивов, ГАФД человека из клеток-продуцентов *E. coli* клеточный экстракт, полученный после наработки белка, фракционировали сухим сульфатом

аммония, пошагово собирая фракции 0-50%, 50-70%, 70-80%-ного насыщения (Материалы и методы, раздел 1.2). Осадок, полученный после центрифугирования фракции 70-80%-ного насыщения сульфатом аммония (рис. 9, дорожка 4) ресуспендировали в калий-фосфатном буфере, рН 7,0 и кристаллизовали добавлением сухого сульфата аммония до помутнения раствора, после чего доводили рН суспензии до 8,0 (рис. 9, дорожка 4). Во время выделения разные фракции анализировали методом ДСН-электрофореза (рис. 9) и определяли в них дегидрогеназную активность (таблица 2).



**Рис. 9. Анализ препарата рекомбинантной ГАФД человека на разных стадиях очистки методом ДСН-электрофореза по методу Лэммли.**

*М* – маркёры молекулярного веса;

*1* - экстракт клеток после обработки ультразвуком;

*2* - фракция 0-50% насыщения сульфатом аммония, осадок;

*3* - фракция 50-70% насыщения сульфатом аммония, осадок;

*4* - фракция 70-85% насыщения, осадок;

*5* - фракция, полученная после кристаллизации ГАФД при рН 8,0;

*6* - I перекристаллизация;

*7* - II перекристаллизация;

*8* - контрольная рекомбинантная ГАФД человека.

**Таблица 2. Активность рекомбинантной ГАФД человека в разных фракциях при насыщении экстракта сульфатом аммония\*.**

\* приведены данные одного выделения. Показатели активности записаны как среднее трех независимых измерений  $\pm$  SD.

Стадия очистки	Общий белок, мг	Удельная активность, (мкмоль NADH/(мин*мг))	Общая активность, (мкмоль NADH/мин)	Выход, %
Исходный экстракт	263	22 $\pm$ 4	5905 $\pm$ 140	<b>Рис.100</b>
Супернатант после 50% насыщения	175	30 $\pm$ 1	5380 $\pm$ 74	91,12
Супернатант после 70% насыщения	113,3	38 $\pm$ 5	4334 $\pm$ 51	73,4
Фракция 70-85% насыщения	15	65 $\pm$ 5	979 $\pm$ 32	16,6
Осадок после кристаллизации	7	121 $\pm$ 5	848 $\pm$ 15	14,37

Из 1 г клеток-продуцентов *E. coli* получали около 2 мг рекомбинантного белка. Конечная активность очищенной ГАФД составляла 110  $\pm$  8 мкмоль NADH/(мин·мг). Рекомбинантную ГАФД С156S выделяли по аналогичному протоколу.

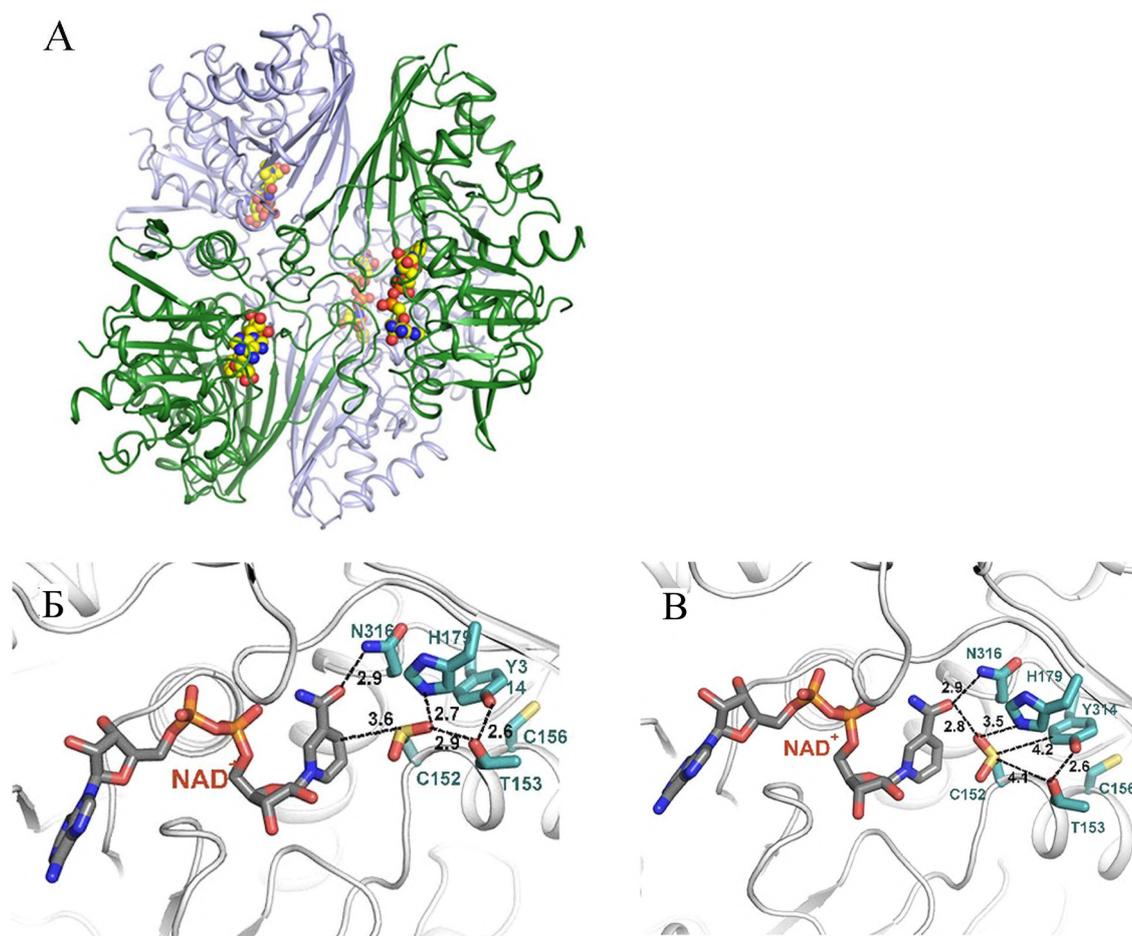
### 1.3. Рентгеноструктурный анализ<sup>2</sup>

Структура рекомбинантной ГАФД человека, выделенной в нашей лаборатории, была получена методом рентгеноструктурного анализа в институте кристаллографии в рамках совместного проекта (PDB ID: 8P5F). Кристаллические структуры рекомбинантной человеческой ГАФД в комплексе с коферментом NAD<sup>+</sup> были определены с разрешением 1,82 Å. Общая структура ГАФД (рис. 10) сходна с представленной ранее структурой, полученной для рекомбинантной ГАФД человека (pdb-код 4wnc, [172]). В активном центре видны консервативные аминокислотные остатки Cys152, Cys156, His179, Tyr314 и кофермент NAD<sup>+</sup>, которые необходимы для катализа.

Как следует из данных рентгеноструктурного анализа, каталитический остаток Cys152 окислен до сульфиновой кислоты (-SO<sub>2</sub>-) (Рисунок 10, Б и В). Для ферментативной активности необходима восстановленная форма Cys152 (Cys-SH). Предположительно, Cys152 был окислен во время кристаллизации, поскольку исходный препарат ГАФД был ферментативно активен. Также важно, что близлежащий цистеин Cys156 находится в восстановленной форме. Эти результаты согласуются с концепцией, согласно которой сульфгидрильная группа каталитического цистеина в ГАФД является высокореактивной из-за взаимодействия с соседним гистидиновым остатком [173,174]. По этой причине Cys152 легко окисляется в отсутствие восстановителей.

---

<sup>2</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: **M.V. Medvedeva**, S. Yu Kleimenov, V.R. Samygina, V.I. Muronetz, E.V. Schmalhausen (2023) S-nitrosylation and S-glutathionylation of GAPDH: Similarities, differences, and relationships. *Biochimica et Biophysica Acta* **1867**(9):130418. Личный вклад автора состоит в проведении экспериментов и анализе результатов.



**Рис. 10. Структура рекомбинантной ГАФД человека, выделенной в ходе данной работы. Строение получено методом рентгеноструктурного анализа в институте кристаллографии в рамках совместного проекта (PDB ID: 8P5F). (A) Общий вид тетрамера ГАФД. Белок показан в представлении “cartoon”; атомы  $NAD^+$  показаны в виде сфер. (Б, В) Активный центр ГАФД.  $NAD^+$  и боковые цепи каталитического Cys152 и близлежащих остатков показаны в виде палочек. (Б) C152-CSD находится в основной конформации. (В). C152-CSD находится в минорной конформации.**

## 2. Модификация ГАФД из мышц кролика окисью азота<sup>3</sup>

Первые исследования влияния окиси азота на каталитические свойства ГАФД, а также исследование продуктов нитрозилирования ГАФД проводились с использованием ГАФД из мышц кролика. Позднее были получены рекомбинантные белки человека: ГАФД дикого типа, а также мутантная ГАФД с заменой С156S.

### 2.1. Дегидрогеназная и ацилфосфатазная активности кроличьей ГАФД в присутствии донора NO

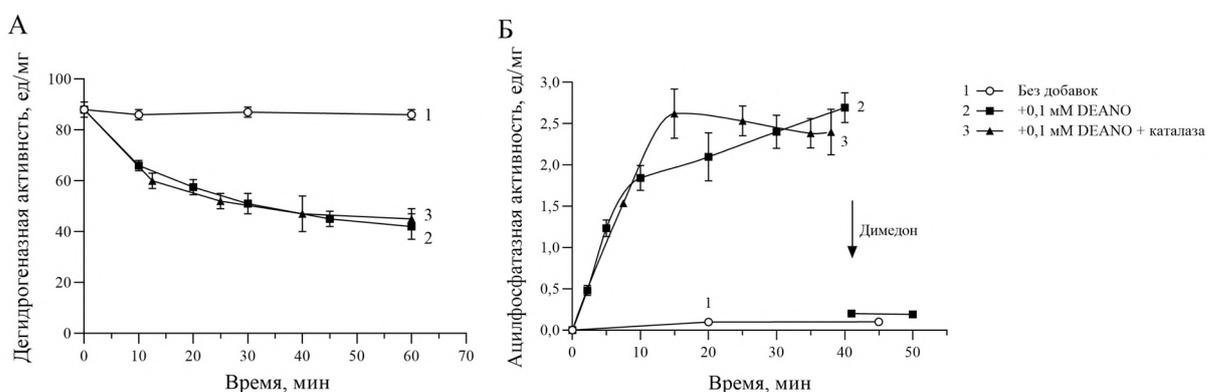
ГАФД состоит из четырёх одинаковых субъединиц, каждая содержит активный центр с остатком цистеина (Cys150 в ферменте из мышц кролика), который участвует в катализе дегидрогеназной реакции (окисление 3-фосфоглицеринового альдегида в присутствии кофермента  $\text{NAD}^+$  с образованием 1,3-БФГ и  $\text{NADH}$ ). За ходом модификации каталитического цистеинового остатка можно проследить по снижению дегидрогеназной активности ГАФД. Это позволяет оценить количество модифицированных цистеинов, но не даёт информации о продуктах модификации. В то же время известно, что окисление Cys150 с образованием цистеинсульфеновой кислоты (Cys-SOH) приводит к появлению ацилфосфатазной активности, т.е. способности фермента расщеплять ацилфосфаты [16]. Как следствие, окисленная ГАФД приобретает способность катализировать распад продукта своей собственной реакции, 1,3-БФГ [63]. Это способствует удалению 1,3-БФГ и, как следствие, ускорению дегидрогеназной реакции, что можно регистрировать по накоплению  $\text{NADH}$ .

---

<sup>3</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Schmalhausen, E.V., **Medvedeva, M.V.**, Serebryakova, M.V., Chagovets, V.V., Muronetz, V.I. (2022). Products of S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Relation between S-nitrosylation and oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1866**(1): 130032. Вклад автора состоит в проведении экспериментов и анализе результатов.

Измерение ацилфосфатазной активности ГАФД (Материалы и методы, раздел 2.2) во время модификации Cys150 позволяет контролировать накопление цистеинсульфеновой кислоты в активном центре ГАФД.

Для изучения S-нитрозилирования ГАФД мы использовали в качестве донора NO 1,1-диэтил-2-гидрокси-2-нитрозо-гидразин натрия (DEANO), который спонтанно диссоциирует в водной среде с периодом полураспада 16 мин при 22-25°C, pH 7,4, высвобождая 1,5 моль NO на моль исходного соединения [175,176]. Поскольку в литературе есть данные об образовании цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД в присутствии донора NO [16], мы оценивали дегидрогеназную и ацилфосфатазную активности ГАФД во время инкубации с DEANO.

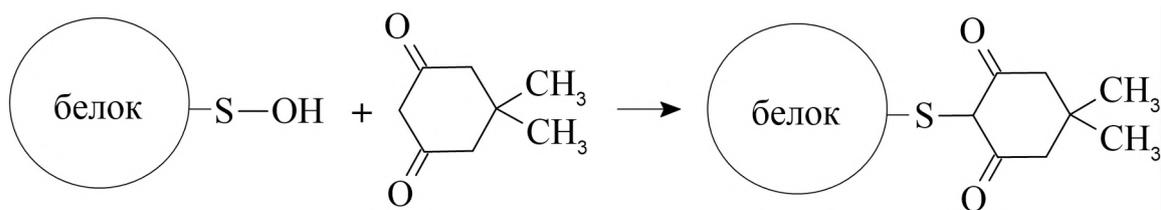


**Рис. 11. Снижение дегидрогеназной активности (А) и развитие ацилфосфатазной активности в присутствии DEANO (Б).** Мышечную ГАФД кролика (1 мг/мл) инкубировали в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,0 (22 °C), без добавок (1), в присутствии 0,1 мМ DEANO (2) или в присутствии 0,1 мМ DEANO вместе с 1 мкг каталазы (3). В указанное время инкубации из образцов 1, 2 и 3 отбирали аликваты для определения дегидрогеназной и ацилфосфатазной активности. Стрелка на рис. Б указывает на добавление димедона (конечная концентрация, 1 мМ) к образцу 2, что приводит к исчезновению ацилфосфатазной активности. Данные представлены как средние значения трёх независимых экспериментов  $\pm$ SD.

Как видно из рис. 11 А (кривая 2), дегидрогеназная активность ГАФД снижается в присутствии NO, что указывает на модификацию каталитического остатка цистеина (Cys150). Одновременно с этим наблюдается появление ацилфосфатазной активности (рис. 11 Б, кривая 2), что свидетельствует об образовании цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД (ГАФД-SOH). Известно, что окисление остатков цистеина в ГАФД с образованием производных сульфеновой кислоты наблюдается в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Чтобы исключить, что образование ГАФД-SOH в присутствии DEANO опосредовано образованием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в анализируемой смеси, к образцу с DEANO добавляли каталазу (удельная активность составляла 1000 мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/мин на мг при pH 7,0 и 22 °С). Как видно из рис. 11, добавление каталазы не препятствует появлению ацилфосфатазной активности (рис. 11 Б, кривая 3). Следовательно, возникновение ГАФД-SOH не связано с образованием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в системе, и можно предположить, что цистеинсульфеновая кислота может быть одним из продуктов модификации цистеинов в присутствии NO.

## **2.2. Подтверждение образования цистеинсульфеновой кислоты в активном центре ГАФД**

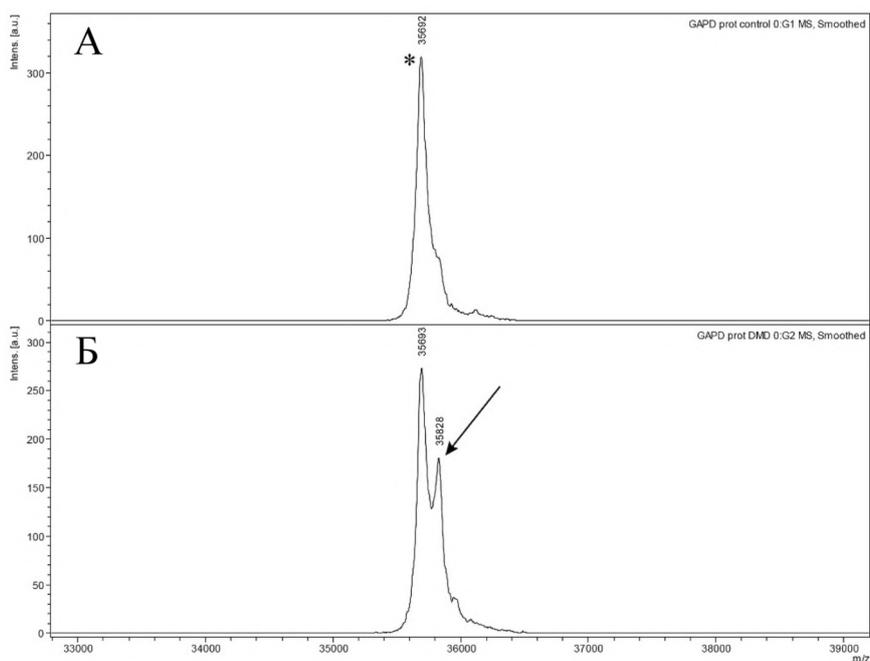
Одним из специфических реагентов для обнаружения цистеинсульфеновой кислоты в белках является димедон (5,5-диметил-1,3-циклогександион), который впервые был использован В. Эллисоном для обнаружения цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД [64], и затем успешно применялся для обнаружения цистеинсульфеновых кислот в других белках [177,178]. Димедон реагирует с цистеинсульфеновой кислотой с образованием стабильного продукта, необратимого в присутствии ДТТ (рис. 12).



**Рис. 12. Реакция цистеинсульфеновой кислоты в белке с димедоном.**

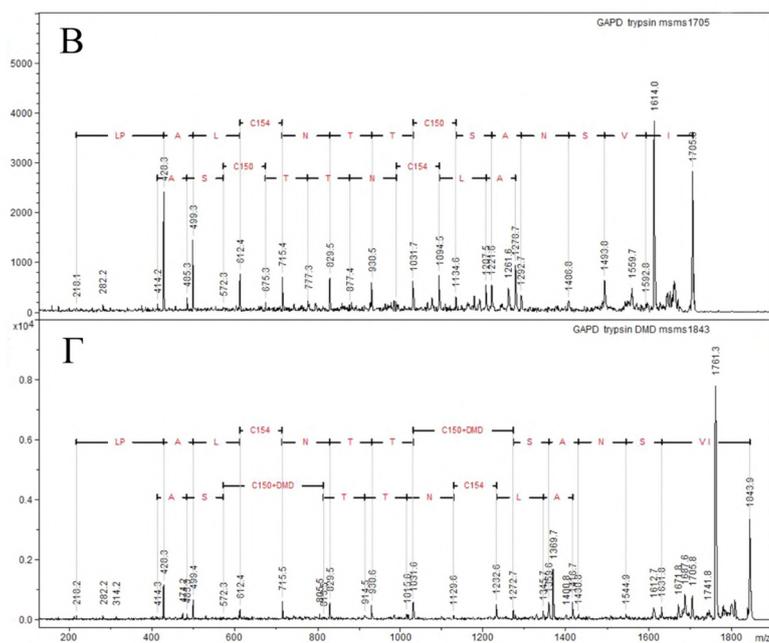
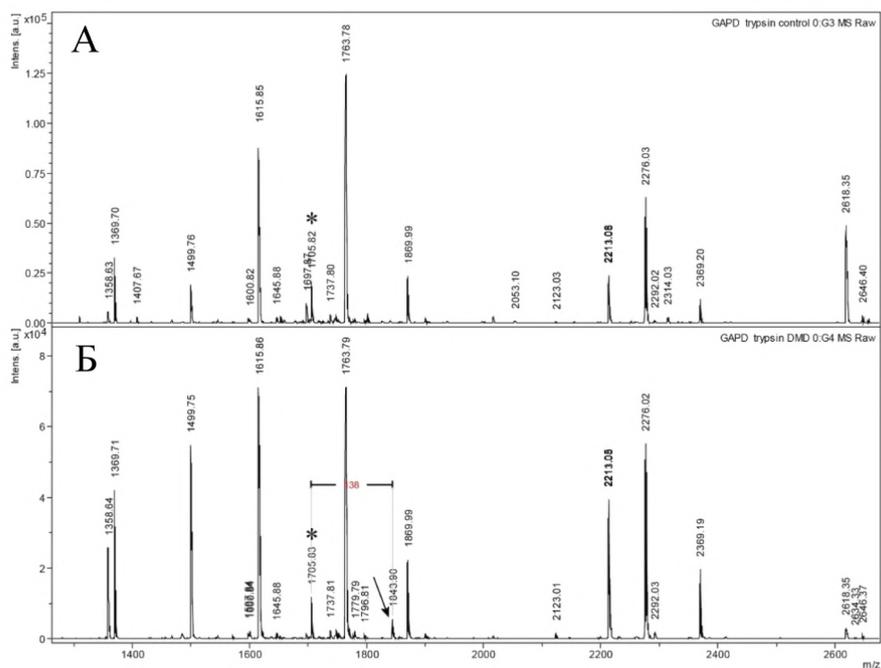
Добавление димедона к модифицированной ГАФД приводит к быстрому исчезновению ацилфосфатазной активности (стрелка на рис. 11 Б), что подтверждает предположение об образовании цистеинсульфеновой кислоты в активном центре ГАФД. Чтобы идентифицировать полученный продукт, S-нитрозилированная ГАФД после инкубации с димедоном была исследована методом MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа. На рис. 13 представлены масс-спектры нативной ГАФД (А) и S-нитрозилированной ГАФД после обработки димедоном (Б).

Пик с  $m/z$  35,692 (отмечен звездочкой на рис. 13) соответствует субъединице нативной ГАФД. Включение димедона в белок должно привести к увеличению его молекулярной массы на 138. После инкубации ГАФД с DEANO и димедоном появляется дополнительный пик с  $m/z = 35,828 (+136)$  (стрелка на рис. 13 Б). Принимая во внимание точность измерения средней массы пика ( $\pm 5$  Da), дополнительный пик соответствует ГАФД с включением димедона.



**Рис. 13. MALDI-TOF-масс-спектры ГАФД из мышц кролика: А) нативный белок; Б) после инкубации в присутствии 0,1 мМ DEANO и 1 мМ димедона. Звёздочкой отмечен пик, соответствующий нативной ГАФД. Стрелкой показан пик, соответствующий аддукту ГАФД с димедоном (+136).**

Чтобы доказать, что димедон включается в каталитический остаток Cys150, образец ГАФД, обработанный димедоном, гидролизовали трипсином и анализировали полученные пептиды. На рис. 14 представлены спектры пептидов нативной ГАФД (А) и S-нитрозилированной ГАФД после обработки димедоном (Б). Пик с  $m/z = 1705,8$  (показан звёздочкой на рис. 14 А) соответствует пептиду 144-160 в последовательности ГАФД, которая включает консервативную аминокислотную последовательность активного центра с каталитическим остатком Cys150 (рис. 15). После инкубации в присутствии DEANO и димедона в спектре появляется дополнительный пик с  $m/z = 1843,9$ , что соответствует включению димедона (+138, показано стрелкой на рис. 14 Б). Фрагментация этого пика подтверждает, что димедон включается в Cys150 пептида 144-160, при этом остаток Cys154 остается интактным (рис. 14 Г).



**Рис. 14.** Пептидные спектры, полученные после трипсинолиза нативной ГАФД (А) и ГАФД после S-нитрозилирования и обработки димедоном (Б). Пептид с  $m/z = 1705,8$  (отмечен звездочкой) соответствует пептиду 144-160 в последовательности ГАФД. Стрелкой показан пептид 144-160 с включением димедона ( $m/z = 1843,9$ ). В и Г: Спектры фрагментации пептидов с  $m/z = 1705,8$  (В) и  $1843,9$  (Г).

```

      10          20          30          40          50
MVKVGVNGFG RIGRLVTRAA FNSGKVDVVA INDPFIDLHY MVYMFQYDST

      60          70          80          90         100
HGKFNHGTVKA ENGKLVINGK AITIFQERDP ANIKWGDAGA QYVVESTGVF

      110         120         130         140         150
TTMEKAG AHL KGGAKRVIIS APSADAPMFV MGVNHEKYDN SLKIVSNASC

      160         170         180         190         200
TTNCLAPLAK VIHDHFGIVE GLMTTVHAIT ATQKTVDGPS GKLWRDGRGA

      210         220         230         240         250
AQNIIIPASTG AAKAVGKVIP ELNGKLTGMA FRVPTPNVSV VDLTCRLEKA

      260         270         280         290         300
AKYDDIKKVV KQASEGPLKG ILGYTEDQVV SCDFNSDTHS STFDAGAGIA

      310         320         330
LNDHFVKLIS WYDNEFGYSN RVVDLMVHMA SKE

```

**Рис. 15. Аминокислотная последовательность ГАФД мышц кролика (UniProtKB A0A5F9DFJ9). Пептид 144-160 выделен жирным шрифтом. Каталитический цистеин Cys150 подчёркнут.**

Таким образом, было показано включение димедона в каталитический остаток Cys150 после обработки DEANO, что подтвердило модификацию Cys150 с образованием цистеинсульфеновой кислоты (Cys-SOH) под действием NO. Поскольку было показано, что образование Cys-SOH не связано с образованием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в среде инкубации (Результаты и их обсуждение, раздел 2.1), мы предположили, что NO-опосредованное образование ГАФД-SOH может происходить через гидролиз первоначально образовавшейся S-нитрозилированной ГАФД (ГАФД-SNO) в соответствии с общими механизмами образования сульфеновых кислот в белках [179] (рис. 16).



**Рис. 16. Схема S-нитрозилирования ГАФД. Показана одна субъединица тетрамера ГАФД из мышц кролика. C150 – каталитический цистеин активного центра, C154 – некаталитический цистеиновый остаток активного центра.**

### 2.3. Оценка содержания ГАФД-SOH в ГАФД после инкубации с DEANO

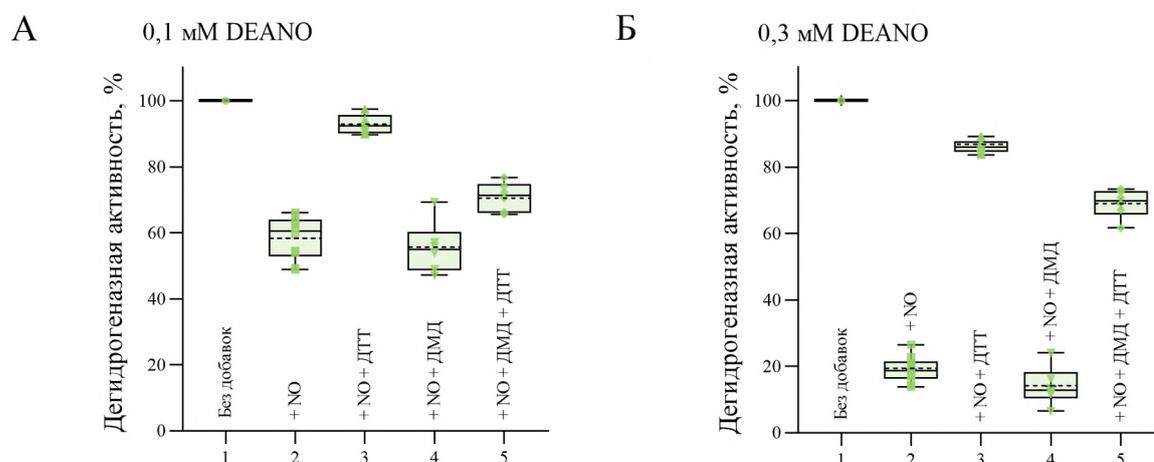
Каждая полипептидная цепь кроличьей ГАФД содержит 4 цистеиновых остатка, один из которых (Cys 150) участвует в катализе. Таким образом, тетрамер содержит 16 цистеиновых остатков, 4 из которых важны для каталитической активности. Чтобы убедиться, что инактивация ГАФД в присутствии DEANO обусловлена модификацией цистеиновых остатков, содержание цистеиновых остатков в молекуле ГАФД определяли по методу Элмана до и после модификации (Материалы и методы, раздел 5.2). Согласно результатам исследования, нативная ГАФД содержала  $14,6 \pm 0,8$  цистеинов на тетрамер. Инкубация с DEANO уменьшила количество цистеиновых остатков, способных вступать в реакцию с реактивом Элмана. В препарате ГАФД с остаточной дегидрогеназной активностью  $22 \pm 5\%$ , было определено  $11,55 \pm 0,3$  цистеина на тетрамер ГАФД. Таким образом, модификация примерно 3-х цистеиновых остатков на тетрамер приводит к 78 % инактивации ГАФД. Это соответствует основным представлениям о механизме катализа ГАФД, согласно которому модификация 4 каталитических цистеинов на тетрамер приводит к полной инактивации ГАФД [29]. Таким образом, измеряя дегидрогеназную активность ГАФД, мы можем контролировать модификацию каталитических цистеиновых остатков.

Общее содержание модифицированного Cys150 в S-нитрозилированной ГАФД определяли по снижению дегидрогеназной активности ГАФД после инкубации с DEANO (рис. 17 А и Б, разница между столбиками 1 и 2). Содержание продуктов необратимой модификации (Cys150-SO<sub>2</sub>H, Cys150-SO<sub>3</sub>H) оценивали после реактивации S-нитрозилированной ГАФД в присутствии 5 мМ дитиотреитола (ДТТ) (рис. 17 А и Б, разница между столбиками 1 и 3). Аналогично, содержание обратимых продуктов модификации Cys150 определяли как разницу между столбиками 3 и 2 на рис. 17 (А, Б). Для оценки содержания Cys150-SOH к S-

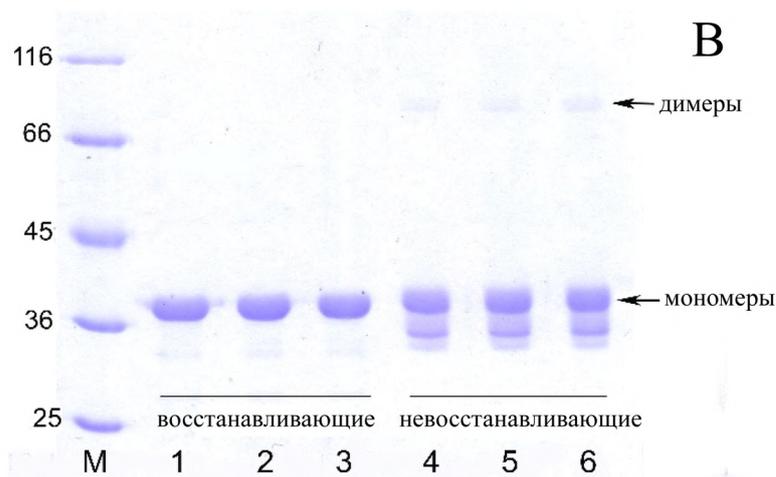
нитрозилированной ГАФД добавляли димедон для связывания образовавшейся цистеинсульфеновой кислоты, а затем ГАФД реактивировали добавлением ДТТ. Содержание Cys150-SOH определяли как разницу между процентом реактивации ГАФД под действием ДТТ в отсутствие (столбик 3) и в присутствии димедона (столбик 5). Содержание обратимых продуктов, не являющихся Cys150-SOH, оценивали как процент реактивации S-нитрозилированной ГАФД с помощью ДТТ после добавления димедона (разница между столбиками 5 и 4 на рис. 17 А и Б). Результаты суммированы в таблице 3.

Неизвестные обратимые продукты, которые реактивируются с помощью ДТТ после добавления димедона (приблизительно 48%), могут включать ГАФД-SNO и ГАФД с внутрисубъединичными дисульфидными связями. Мы не рассматриваем ГАФД с межсубъединичными дисульфидными связями как обратимый продукт, поскольку цистеины расположены внутри белковой глобулы, и, следовательно, межсубъединичные дисульфидные связи могут быть образованы только после денатурации белка. В этом случае дисульфидные связи могут быть восстановлены с помощью ДТТ, но это не приведёт к реактивации ГАФД, поскольку денатурация необратима. Для проверки образования межсубъединичных дисульфидных связей после обработки NO, образцы с DEANO и без него были проанализированы с помощью ДСН-электрофореза в восстановительных и невосстановительных условиях. Как видно из рис. 17 В, в невосстанавливающих условиях мономер ГАФД даёт две полосы (дорожки 4-6). Предположительно, восстановленный и окисленный мономеры ГАФД имеют разную электрофоретическую подвижность, поскольку вторая полоса исчезает в восстанавливающих условиях (дорожки 1-3). Димеры ГАФД, образующиеся в результате межсубъединичной дисульфидной связи, обнаруживаются, но их содержание невелико и не зависит от присутствия DEANO (дорожки 4-6). Поскольку все образцы (с и

без DEANO) демонстрируют одинаковую картину в невосстанавливающем ДСН-электрофорезе, вероятно, что все наблюдаемые окисленные формы образуются после разворачивания белка.



**Рис. 17. (А и Б) Инактивация ГАФД в присутствии 0,1 мМ или 0,3 мМ DEANO и реактивация в присутствии 5 мМ ДТТ.** Раствор ГАФД (6 мкМ) инкубировали в присутствии DEANO при pH 7,0, 22°C до завершения процесса инактивации (60 мин). Затем раствор модифицированной ГАФД разливали в две пробирки, одну из которых оставляли без добавок, а в другую добавляли димедон (конечная концентрация 1 мМ). Через 15 мин отбирали аликвоты из образцов без добавок (столбцы 2) и из образцов с димедоном (столбцы 4) для определения дегидрогеназной активности. Затем к образцам добавляли ДТТ, и после 1-часовой инкубации из образцов отбирали аликвоты для определения дегидрогеназной активности (столбцы 3 и 5). Активность ГАФД без добавок принимали за 100% (столбцы 1). Данные представлены в виде диаграммы размаха с указанием точек конкретных экспериментальных значений. Сплошная линия показывает медиану, пунктирная - среднее значение. Различия между группами статистически значимы по результатам теста One Way ANOVA с апостериорными множественными сравнениями по критерию Бонферрони ( $P < 0,05$ ), за исключением различий между группами 1 и 3 (А), 2 и 4 (А и Б). Количество независимых повторов составляет  $n = 6$  для определения активности ГАФД с добавлением димедона и  $n = 10$  для всех других групп.



**Рис. 17. (В)** ДСН-электрофорез образцов ГАФД после 60-мин инкубации без добавок (1, 4), с 0,1 мМ DEANO (2, 5) и с 0,3 мМ DEANO (3, 6) в восстанавливающих (1-3) и невосстанавливающих (4-6) условиях.

**Таблица 3.**

Процентное содержание обратимых и необратимых продуктов модификации Cys150 после инкубации ГАФД с DEANO.<sup>a</sup>

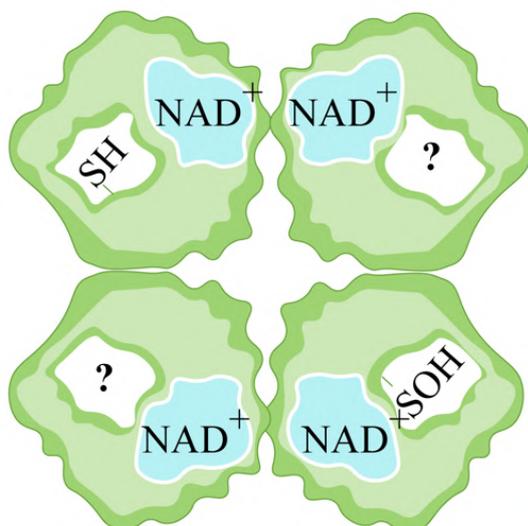
DEANO, мМ	Все продукты модификации Cys150, % (столбец 1 - столбец 2)	Необратимые продукты (SO <sub>2</sub> H и SO <sub>3</sub> H), % (столбец 1 - столбец 3)	Обратимые продукты, % (столбец 3 - столбец 2)	S-OH, % (столбец 3 - столбец 5)	Неизвестные обратимые продукты, % (столбец 5 - столбец 4)
0,1	41 ± 5	8 ± 2	33 ± 7	21 ± 5	17 ± 7
0,3	82 ± 6	16 ± 1,5	66 ± 7,5	18 ± 7,7	47,5 ± 7

<sup>a</sup> Рассчитано по данным, представленным на рисунке 17 (А и Б).

Как видно из таблицы 3, в присутствии 0,3 мМ DEANO (соответствует 0,45 мМ NO), 82% каталитических цистеинов в ГАФД модифицированы. Большинство продуктов модификации являются обратимыми (66%), и среди них 18% соответствует ГАФД-SOH. Неизвестные обратимые продукты,

которые реактивируются с помощью ДТТ после добавления димедона (около 48%), могут включать ГАФД-SNO и ГАФД с внутрисубъединичными дисульфидными связями. Мы не рассматриваем ГАФД с межсубъединичными дисульфидными связями как обратимый продукт, поскольку цистеиновые остатки расположены внутри белковой глобулы, и, следовательно, межсубъединичные дисульфидные связи могут образоваться только после денатурации белка. В этом случае дисульфидные связи могут быть восстановлены с помощью ДТТ, но это не приведёт к реактивации ГАФД, поскольку денатурация необратима. По этой причине ГАФД с межсубъединичными дисульфидными связями можно отнести к продуктам необратимой модификации.

Таким образом, по нашим оценкам (таблица 3), ГАФД, инактивированная на 80%, содержит примерно 20% цистеинсульфеновой кислоты и неизвестный обратимый продукт (48%), который может включать SNO (рис. 18).



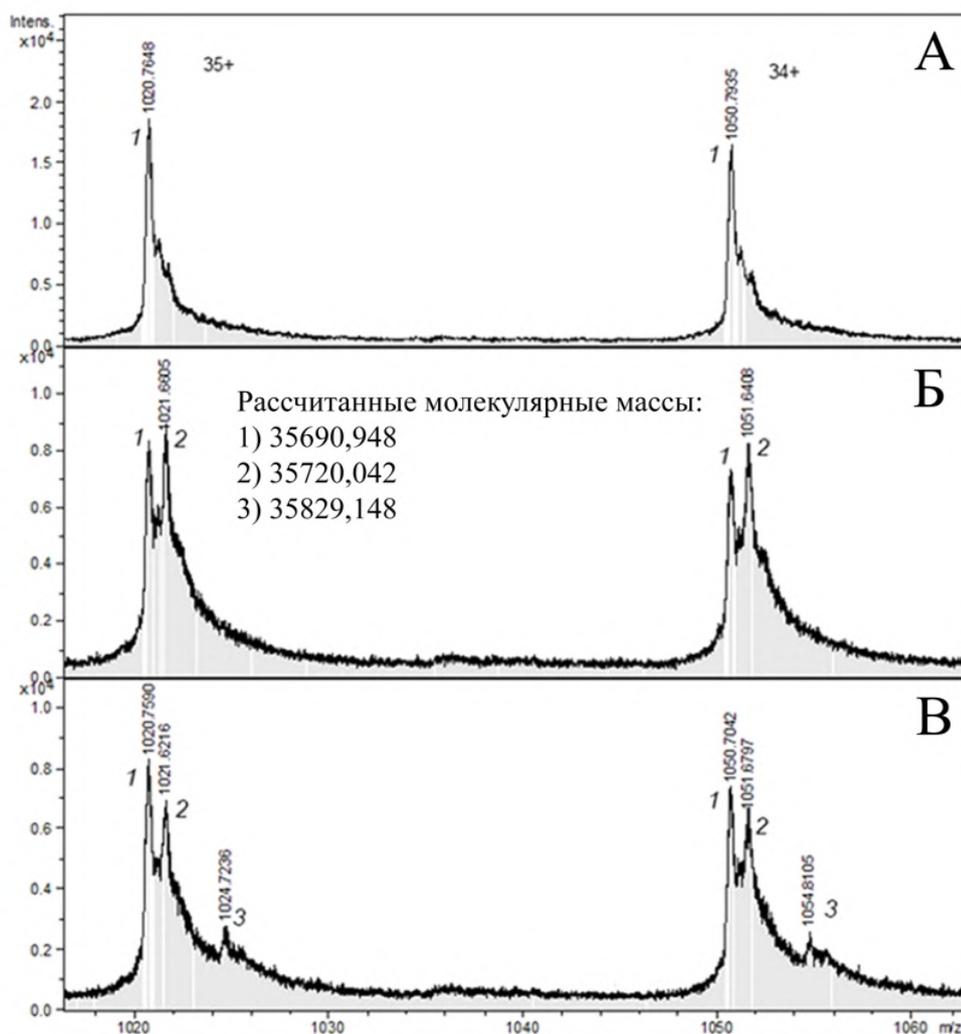
**Рис. 18. Схематическое изображение распределения продуктов тетрамера ГАФД после нитрозилирования в присутствии 0,3 мМ DEANO.**

## 2.4. Обнаружение S-нитрозилированной ГАФД (ГАФД-SNO)

Для обнаружения ГАФД-SNO мы использовали метод масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI) анализ. Для этого ГАФД инкубировали в присутствии 0,3 мМ DEANO, поскольку по нашим данным в этих условиях содержание неизвестного обратимого продукта модификации, которым может быть ГАФД-SNO, выше, чем после инкубации с 0,1 мМ DEANO (таблица 3).

Масс-спектры ГАФД (нативной и модифицированной в присутствии DEANO) представлены на рис. 19. Расчёт молекулярной массы белка для пика нативной ГАФД (обозначен 1 на панели А) даёт значение 35690,948 Да, что соответствует молекулярной массе мономера ГАФД. После инкубации ГАФД с DEANO в спектре появляются дополнительные пики (отмечены 2 на панели Б). Расчёт молекулярной массы для пика 2 даёт значение 35720,042 Да, что соответствует добавлению молекулы NO (+29). После инкубации S-нитрозилированной ГАФД с димедоном в спектре появляется третий пик (3 на панели В). Расчёт молекулярной массы для этого пика даёт значение 35829,148 Да, что соответствует образованию аддукта с димедоном (+138). Таким образом, ESI-масс-спектрометрия позволила обнаружить S-нитрозилированную ГАФД. Кроме того, был обнаружен аддукт с димедоном, что согласуется с результатами результатами MALDI-масс-спектрометрии.

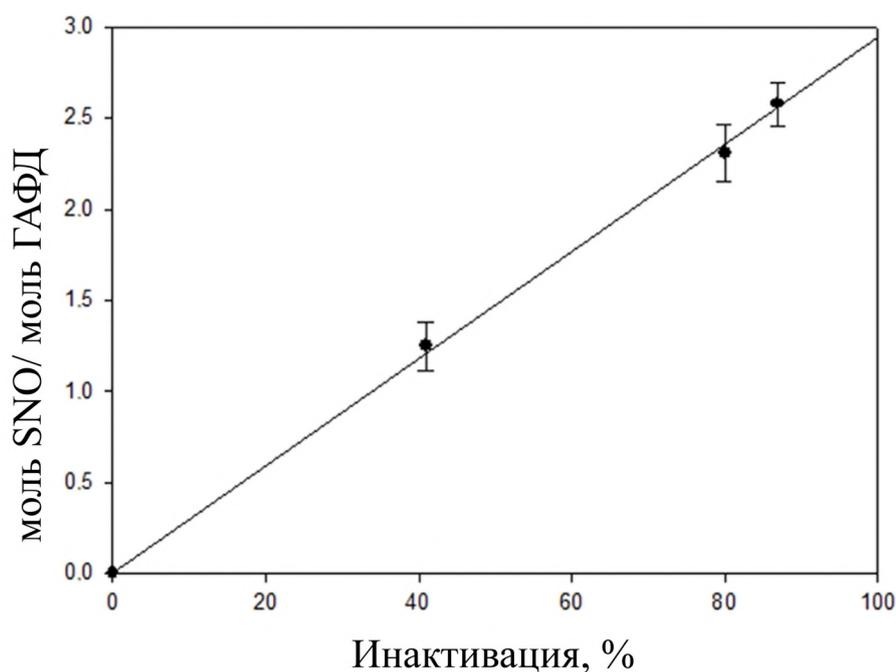
Следует отметить, что образование внутримолекулярной дисульфидной связи между Cys150 и Cys154 должно уменьшить молекулярную массу мономера на 2, но мы не обнаружили пиков с такими изменениями. Таким образом, мы можем сделать вывод, что S-нитрозилирование не приводит к образованию дисульфидной связи Cys150-Cys154 или количество молекул ГАФД с внутримолекулярной дисульфидной связью слишком мало, чтобы её детектировать.



**Рис. 19.** Анализ продуктов модификации ГАФД методом ESI-масс-спектрометрии. ГАФД без добавок (А), после инкубации с 0,3 мМ DEANO (Б), и после инкубации с 0,3 мМ DEANO с последующим добавлением 1 мМ димедона (В). Все образцы перед анализом диализовали против воды, очищенной в системе Milli-Q. Показаны пики мономера ГАФД с зарядами 35+ и 34+: пики, обозначенные 1, 2 и 3 соответствуют нативной ГАФД, ГАФД-SNO, и аддукту ГАФД с димедоном, соответственно. На вставке показаны рассчитанные молекулярные массы для пиков 1, 2 и 3.

## 2.5. Количественная оценка ГАФД-SNO после модификации ГАФД с DEANO

Для количественной оценки S-нитрозилированных цистеинов мы использовали метод Сэвилла-Грисса (Материалы и методы, 5.3). На рис. 20 представлена зависимость молярного соотношения S-нитрозилированных цистеинов (SNO) в ГАФД от процента инактивации ГАФД. Видно, что содержание -SNO пропорционально инактивации ГАФД. Для масс-спектрометрического анализа мы использовали препарат ГАФД после инкубации с 0,3 мМ DEANO (рис. 19 Б). В этих условиях было обнаружено 2,3 моль SNO на моль ГАФД.



**Рис. 20. Определение содержания цистеина-SNO в ГАФД методом Сэвилла-Грисса.** Образцы ГАФД инкубировали в присутствии 0,1-0,3 мМ DEANO в течение 1 ч, после чего определяли дегидрогеназную активность и содержание SNO. Показаны средние значения трёх экспериментов  $\pm SD$ .

## 2.6. Взаимосвязь между различными модификациями каталитического цистеина в ГАФД

Мы показали, что инкубация ГАФД в присутствии донора NO DEANO приводит к образованию двух основных продуктов: S-нитрозилированной ГАФД (ГАФД-SNO) и S-сульфенированной ГАФД (ГАФД-SOH). Данные по количественному определению основных продуктов S-нитрозилирования ГАФД приведены в таблице 4 и на рисунке 21.

**Таблица 4.**

Содержание продуктов модификации каталитического остатка Cys150 после инкубации ГАФД из мышц кролика в присутствии 0,3 мМ DEANO.

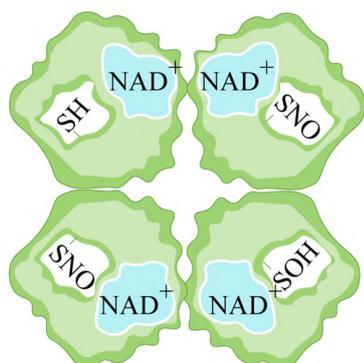
Общее содержание модифицированных Cys150, моль/моль ГАФД		S-NO, моль/моль ГАФД	S-OH, моль/моль ГАФД
3,05 ± 0,8 <sup>a</sup>	3,28 ± 0,24 <sup>b</sup>	2,3 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,28 <sup>г</sup>

<sup>a</sup> Рассчитано по методу Элмана.

<sup>b</sup> Рассчитано по снижению дегидрогеназной активности.

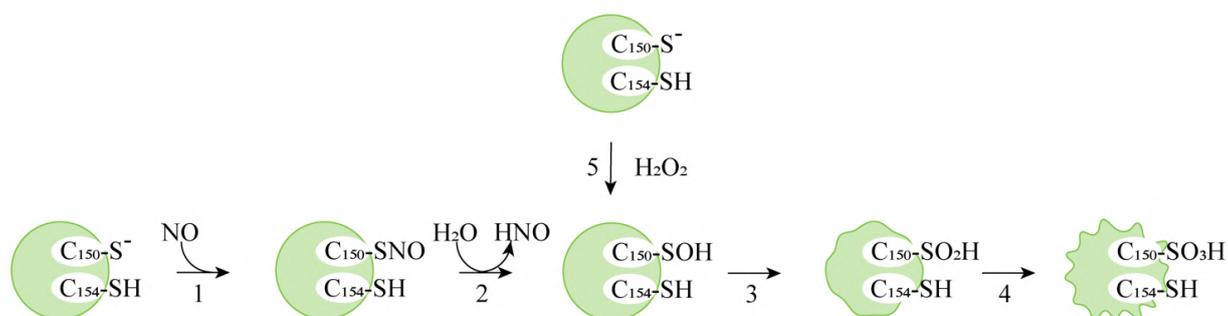
<sup>б</sup> Рассчитано по методу Сэвилла-Грисса.

<sup>2</sup> Рассчитано по реактивации ГАФД в присутствии димедона.



**Рис. 21. Схематическое изображение распределения продуктов тетрамера ГАФД после нитрозилирования под действием 0,3 мМ DEANO.**

Кроме того, часть продуктов S-нитрозилирования представляла собой необратимо модифицированные цистеины (предположительно Cys-SO<sub>2</sub>H и CysSO<sub>3</sub>H), которые могли образоваться в результате окисления цистеинсульфеновой кислоты (таблица 3). Таким образом, согласно нашим результатам, мы предполагаем, что ГАФД S-нитрозилируется по остатку Cys150 с образованием ГАФД-SNO (реакция 1 на рис. 22), который затем гидролизуется в некоторых активных центрах с образованием цистеинсульфеновой кислоты (реакция 2 на рис. 22). Некоторая часть производных сульфеновой кислоты может окисляться далее в аэробных условиях с образованием необратимых продуктов окисления (реакции 3, 4 на рис. 22).



**Рис. 22. Взаимосвязь между S-нитрозилированием и окислением ГАФД.** Показана одна субъединица тетрамерной молекулы ГАФД из мышц кролика. C150 – каталитический остаток цистеина, C154 – некаталитический остаток цистеина.

### 3. Модификация рекомбинантной ГАФД человека

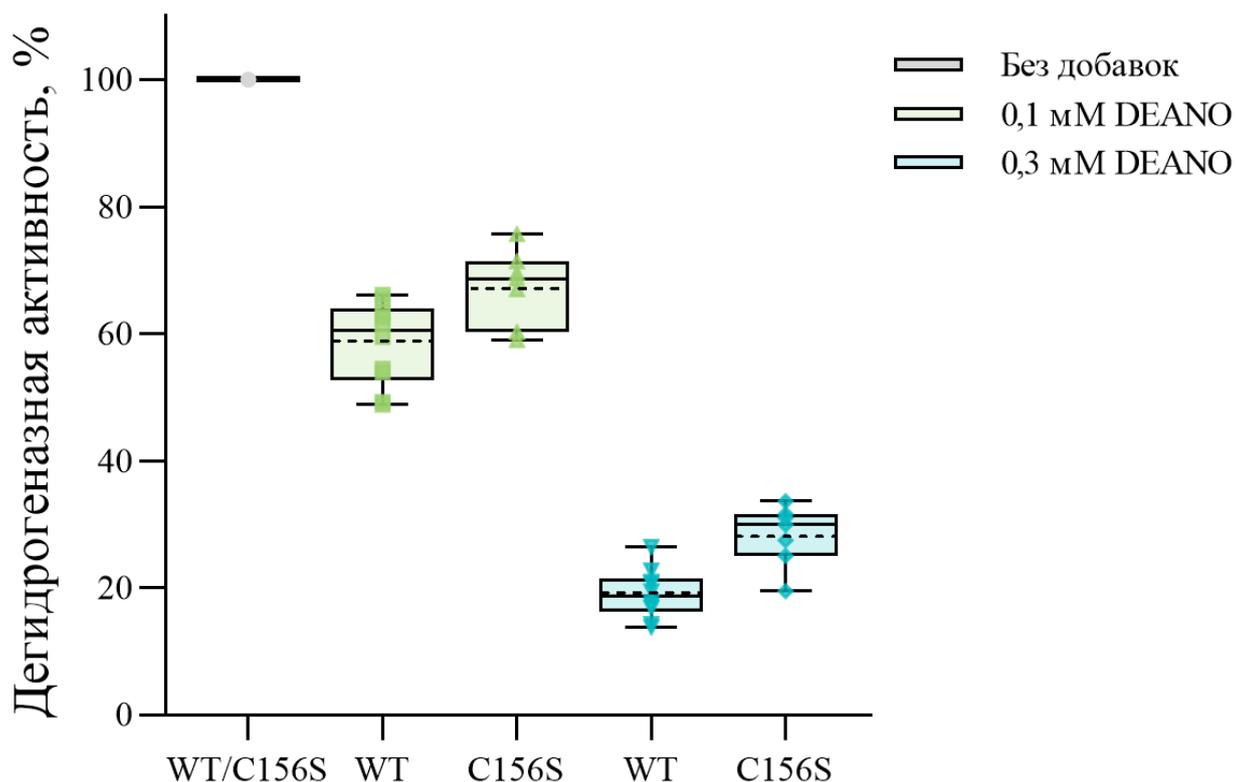
#### 3.1. Сравнение ГАФД дикого типа и мутантной формы ГАФД с заменой C156S

Дальнейшие исследования проводились на рекомбинантной ГАФД человека. В этой части работы мы хотели проверить, воспроизводятся ли результаты, полученные на ГАФД из кролика, на рекомбинантной ГАФД человека, а также исследовать S-нитрозилирование рекомбинантной ГАФД с мутацией C156S. В активном центре ГАФД человека также присутствуют

два остатка цистеина – каталитический Cys152 и некаталитический Cys156. Используя мутантную форму ГАФД C156S, мы хотели выяснить, влияет ли некаталитический Cys156 на реакционную способность Cys152 в отношении NO.

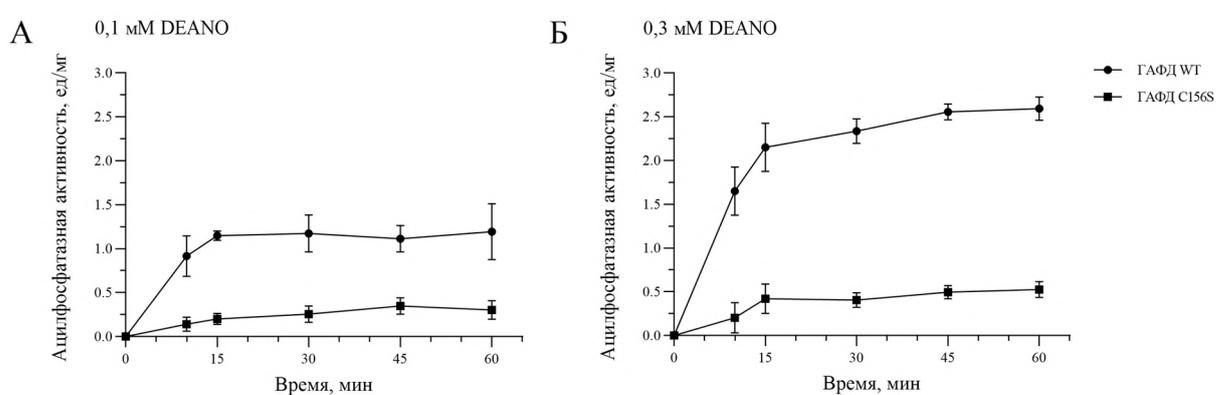
### **3.1.1. Дегидрогеназная и ацилфосфатазная активность ГАФД дикого типа и мутантной формы C156S в присутствии донора NO**

Мы повторили эксперимент с нитрозилированием ГАФД из мышц кролика на рекомбинантной ГАФД человека дикого типа и мутантной форме C156S. Как видно из рис. 23, дегидрогеназная активность ГАФД снижается в присутствии 0,1 мМ DEANO на 40%, что указывает на модификацию каталитического остатка цистеина (Cys152). При добавлении 0,3 мМ DEANO активность снижается на 80%, что согласуется с результатами, полученными на ферменте из мышц кролика. Мутантная ГАФД C156S также подвергается инактивации в присутствии DEANO, при этом статистически значимых отличий между степенью инактивации ГАФД дикого типа и мутантной формы не было.



**Рис. 23. Снижение дегидрогеназной активности ГАФД дикого типа и ГАФД C156S в присутствии DEANO (0,1 и 0,3 мМ).** Рекомбинантную ГАФД человека дикого типа (WT) или с заменой C156S (1 мг/мл) инкубировали в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,0 (22 °C), без добавок (показано серым), в присутствии 0,1 мМ DEANO (зелёным) или в присутствии 0,3 мМ DEANO (синим). Через час из образцов отбирали аликвоты для определения дегидрогеназной активности. Данные представлены в виде диаграммы размаха с указанием точек конкретных экспериментальных значений. Сплошная линия показывает медиану, пунктирная - среднее значение. Различия между группами статистически значимы от контроля без добавок с  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни). Количество независимых повторов составляет  $n = 7$  для определения активности ГАФД C156S и  $n = 10$  для ГАФД WT.

Одновременно со снижением дегидрогеназной активности наблюдается появление ацилфосфатазной активности у обеих форм ГАФД (рис. 24), что свидетельствует об образовании цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД (ГАФД-SOH). Из рис. 24 видно, что ацилфосфатазная активность мутантной формы ГАФД C156S в 4-5 раз ниже по сравнению с ГАФД дикого типа, при том, что обе формы ГАФД подвергаются инактивации и степень инактивации ГАФД C156S не сильно отличается от ГАФД дикого типа (рис. 23). Ещё заметно, что повышение концентрации DEANO не сильно влияет на ацилфосфатазную активность мутантной формы.

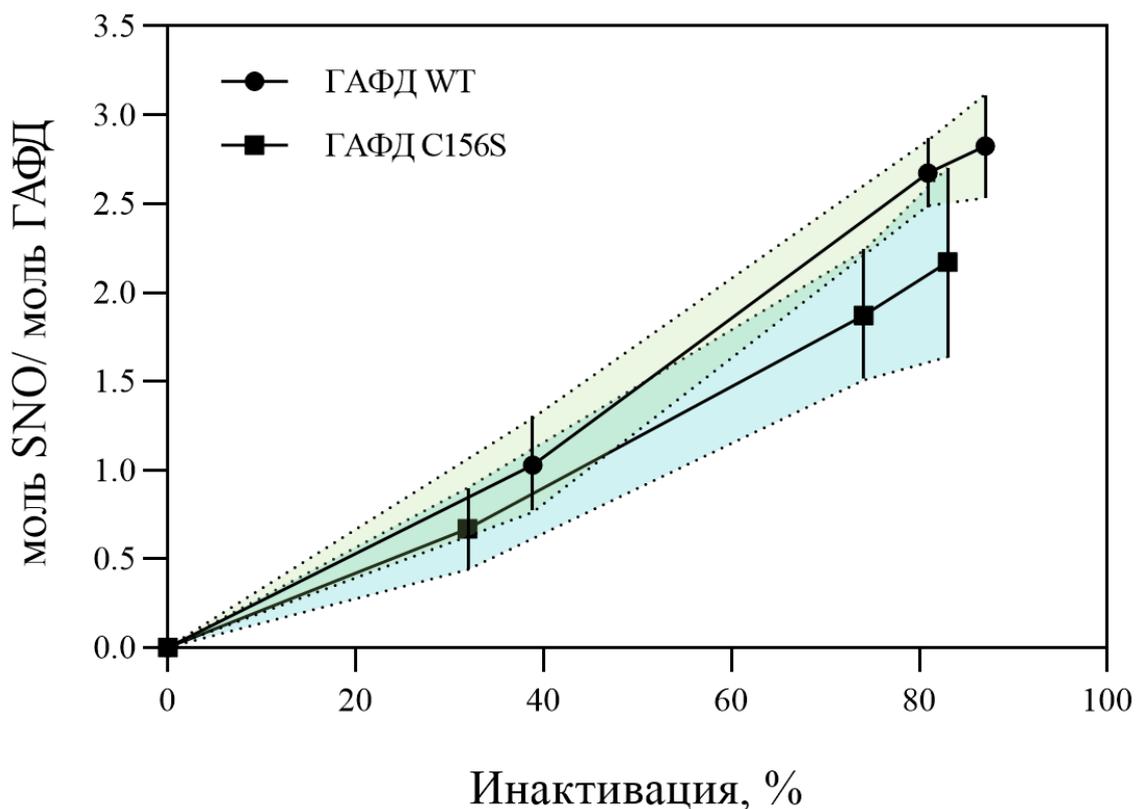


**Рис. 24. Развитие ацилфосфатазной активности ГАФД в присутствии DEANO (0,1 и 0,3 мМ).** Рекombинантную ГАФД человека дикого типа (WT) или с заменой C156S (1 мг/мл) инкубировали в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,0 (22 °C) в присутствии 0,1 мМ DEANO (А) или в присутствии 0,3 мМ DEANO (Б). Через час из образцов отбирали аликвоты для определения дегидрогеназной активности. Данные представлены как средние значения трёх независимых экспериментов  $\pm$ SD.

Таким образом, можно сделать вывод, что в присутствии DEANO Cys152 модифицируется и в ГАФД WT, и в ГАФД C156S.

### **3.1.2. Количественная оценка содержания нитрозотиолов (SNO) в ГАФД дикого типа и ГАФД C156S после модификации с DEANO методом Сэвилла-Грисса**

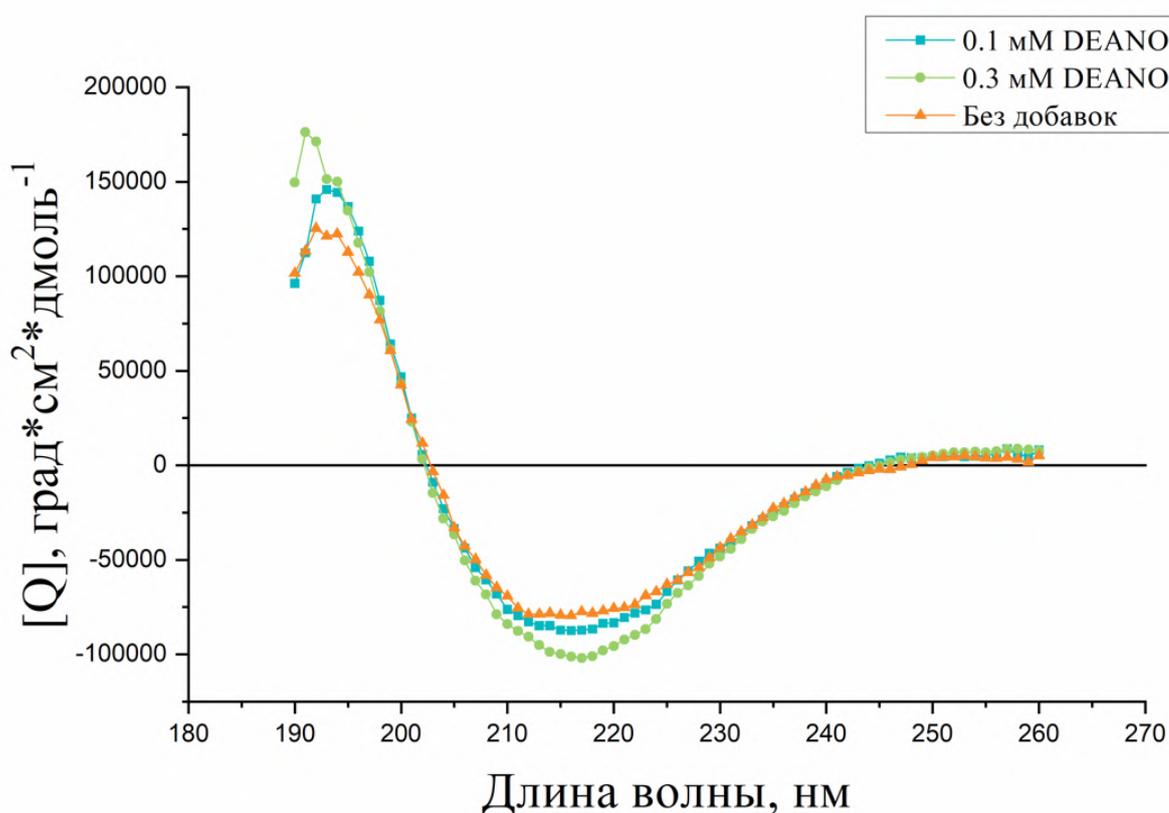
Чтобы количественно оценить содержание SNO в ГАФД дикого типа и C156S, мы использовали метод Сэвилла-Грисса (Материалы и методы, 5.3). На рис. 25 представлена зависимость молярного соотношения S-нитрозилированных цистеинов (SNO) в ГАФД от процента инактивации ГАФД (100% - полная инактивация ГАФД). Видно, при 80%-ной инактивации ГАФД человека дикого типа содержание SNO-групп составляет приблизительно  $2,5 \pm 0,2$  моль/моль ГАФД, что согласуется с результатами, полученными на ГАФД из мышц кролика. При той же степени инактивации мутантной ГАФД C156S содержание SNO-групп составляет  $1,9 \pm 0,4$  моль /моль ГАФД, но различия статистически не значимы. Таким образом, мутация C156S не препятствует S-нитрозилированию каталитического остатка Cys152, но существенно снижает содержание сульфеновой кислоты в активном центре ГАФД. Возможно, это происходит вследствие быстрого окисления S-OH до  $SO_2H$ , но это предположение требует дополнительного исследования.



**Рис. 25.** Определение содержания цистеина-SNO в ГАФД дикого типа (WT) и ГАФД C156S методом Сэвилла-Грисса. Образцы ГАФД инкубировали в присутствии 0,1-0,3 мМ DEANO в течение 1 ч, после чего определяли дегидрогеназную активность и содержание SNO. Показаны средние значения трёх экспериментов  $\pm SD$ . Жёлтым полем показана область SD для ГАФД дикого типа, синим для ГАФД C156S.

### 3.2. Сравнение нативной и нитрозилированной ГАФД методом кругового дихроизма

Для оценки изменений в структуре фермента, инкубированного в присутствии 0,1 и 0,3 мМ DEANO, мы проанализировали содержание различных вторичных структур методом кругового дихроизма. На рисунке 26 приведены полученные спектры кругового дихроизма.



**Рис. 26.** Спектры кругового дихроизма нативной ГАФД (показан оранжевой кривой) и ГАФД после нитрозилирования в присутствии 0,1 мМ DEANO (показан синей кривой) или 0,3 мМ DEANO (зелёная кривая).

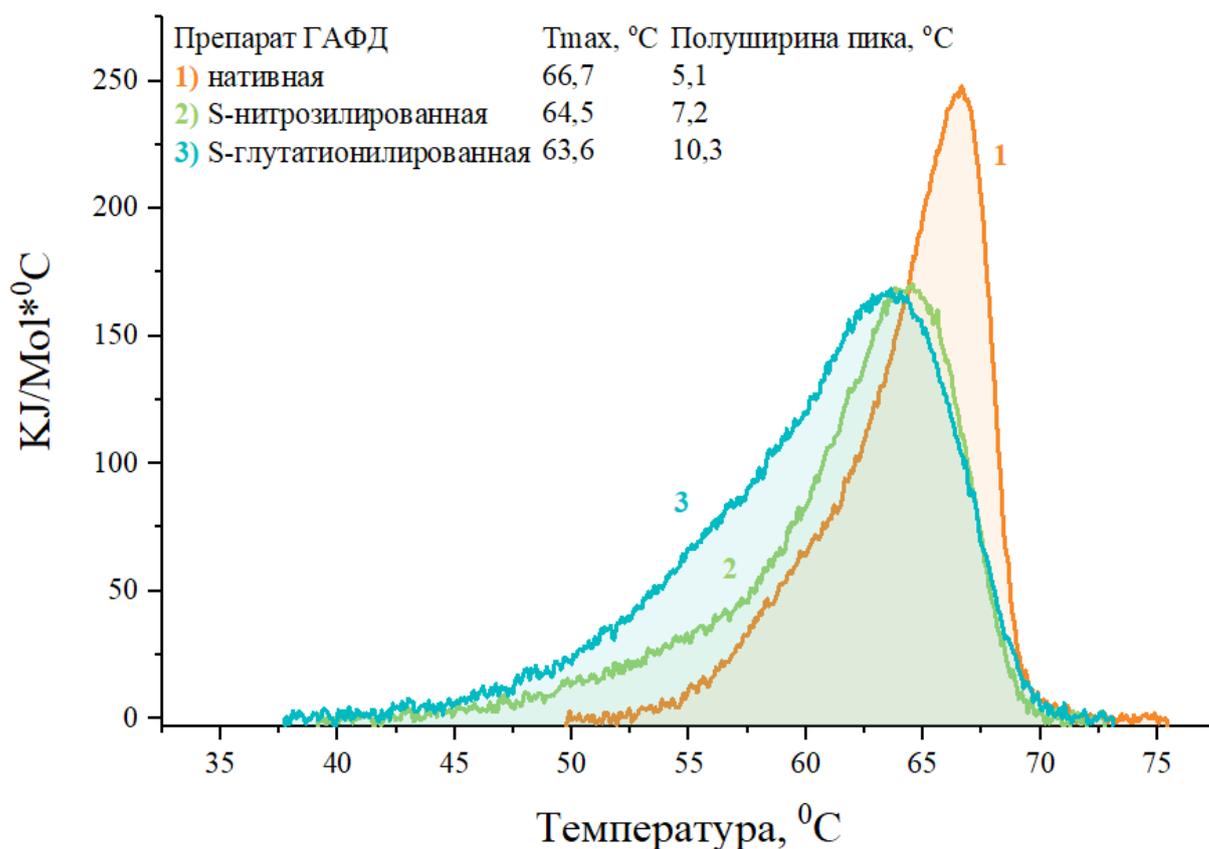
При анализе образцов нативной ГАФД и ГАФД после обработки 0,1 мМ и 0,3 мМ DEANO не было обнаружено существенных отличий во вторичной структуре нативного и модифицированного ферментов. Такой результат не исключает изменения структуры на более высоких уровнях организации молекулы.

#### **4. Сравнительное исследование S-нитрозилированной и S-глутатионилированной ГАФД**

Дальнейшие исследования проводились на рекомбинантной ГАФД человека. Сравнительные исследования двух обратимых модификаций каталитического цистеинового остатка ГАФД были связаны с необходимостью выяснить, чем S-нитрозилирование отличается от другой известной модификации каталитического цистеина ГАФД – S-глутатионилирования. Ранее было показано, что S-глутатионилирование также приводит к инактивации ГАФД, при этом ферментативная активность восстанавливается в присутствии дитиотреитола [46]. В данной работе мы сравнивали стабильность S-нитрозилированной и S-глутатионилированной форм ГАФД, а также обратимость этих модификаций в присутствии естественных восстановителей (восстановленного глутатиона (GSH), глутаредоксина 1 и тиоредоксина 1).

##### **4.1. Сравнение термостабильности S-нитрозилированной и S-глутатионилированной ГАФД**

Для исследования термостабильности препаратов модифицированной ГАФД использовали метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Метод позволяет следить за разворачиванием белковой глобулы при нагревании. Во время нагревания регистрируется поглощение тепла, которое расходуется на разворачивание белковой глобулы. Кривые поглощения тепла, представленные на рис. 27, отражают процесс тепловой денатурации нативной и модифицированной ГАФД. Термостабильность каждой формы может быть оценена по положению максимума кривой теплопоглощения ( $T_{max}$ ). Кроме того, по изменению ширины пика можно сделать вывод об изменении компактности белковой глобулы.



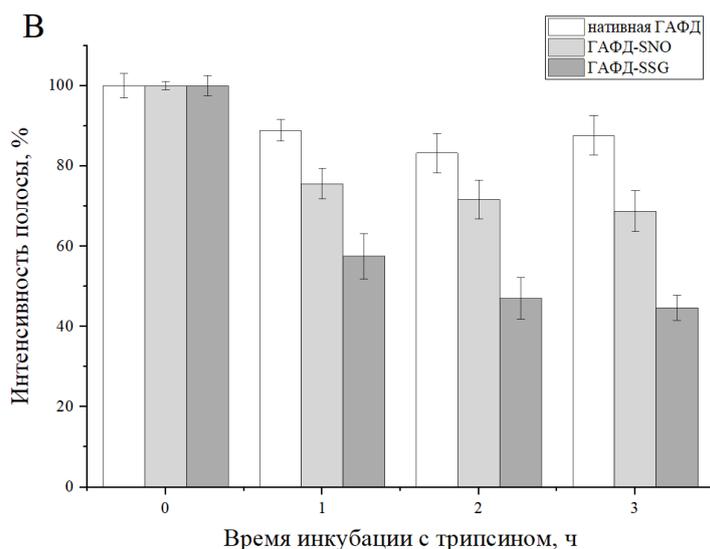
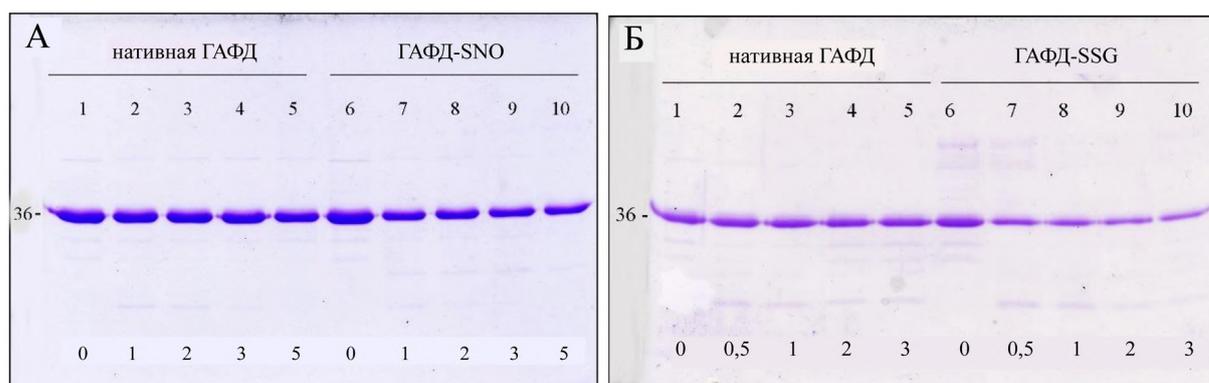
**Рис. 27.** Исследование термостабильности ГАФД методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Кривые теплопоглощения нативной (1), S-нитрозилированной (2) и S-глутатионилированной (3) ГАФД. Исследуемые растворы содержали 0,5 мг/мл белка в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,0.

Как видно из рис. 27, S-нитрозилирование и S-глутатионилирование ГАФД снижает значение T<sub>max</sub> кривой поглощения тепла на 2,2 и 3,1 градуса соответственно (вставка на рис. 27), что указывает на снижение термостабильности ГАФД. Кроме того, увеличение полуширины пика (ширины пика на половине высоты) указывает на снижение кооперативности разворачивания в 1,4 раза для S-нитрозилированной ГАФД и в 2 раза для S-глутатионилированной ГАФД. Это указывает на ослабление взаимодействий между аминокислотными остатками, участвующими в

формировании третичной структуры в модифицированной ГАФД. Эти результаты позволяют предположить, что обе модификации каталитического цистеинового остатка (Cys152 в ГАФД человека) снижают стабильность фермента и приводят к разрыхлению его глобулярной структуры, при этом включение глутатиона приводит к более выраженным изменениям. Вероятно, это может быть связано с большим размером GSH (по сравнению с NO): чем больше модификатор, тем сильнее структурные изменения.

#### **4.2. Влияние модификаций ГАФД на расщепление её трипсином**

Еще один метод оценки влияния модификаций Cys152 на пространственную структуру ГАФД - исследование чувствительности к расщеплению протеиназами. Как правило, чем компактнее структура белка, тем более он устойчив к действию протеиназ. Расщепление протеиназами происходит в первую очередь в слабоструктурированных областях из-за их повышенной доступности для протеиназ. Таким образом, повышенная чувствительность к протеиназам свидетельствует о появлении таких слабоструктурированных областей. Мы изучили расщепление ГАФД трипсином. На рисунке 28 (А и Б) представлены результаты ДСН-электрофореза нативной и модифицированной ГАФД после инкубации с трипсином.



Г

MGKVKVGVNNGFGRIGRLVTRAAFNSGKVDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHGKE  
 HGTVKAENGKLVINGNPITIFQERDPSKIKWGDAGAEYVVESTGVFTTMEKAGAHLQ  
 GGAKRVIISAPSADAPMFVMGVNHEKYDNSLKIISNASCTTNCLAPLAKVIHDNFGIVE  
 GLMTTVHAITATQKTVDGPSGKLWRDGRGALQNIIPASTGAAKAVGKVPELNGKLT  
 GMAFRVPTANVSVDLTCRLEKPAKYDDIKKVVKQASEGPLKGILGYTEHQVVSDF  
 NSDTHSSTFDAGAGIALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE

**Рис. 28. Исследование расщепления S-нитрозилированной (А) и S-глутатионилированной (Б) ГАФД трипсином методом ДСН-электрофореза.** А и Б). Растворы нативной, S-нитрозилированной и S-глутатионилированной ГАФД инкубировали в присутствии трипсина (50 мкг/мл) при 37°C на шейкере. Через указанные промежутки времени из инкубационной смеси отбирали аликвоты и останавливали трипсинолиз нагреванием с буфером для образцов (90°C, 5 мин). Образцы анализировали с помощью ДСН-электрофореза.

В) Интенсивность полос в геле определяли с помощью программы ImageJ. Представлены средние значения 3 независимых экспериментов  $\pm$  SD. Различия между группами через 1, 2 и 3 ч инкубации были статистически значимыми ( $p < 0,05$ ).

Г) Места расщепления трипсином в последовательности ГАФД подчёркнуты.

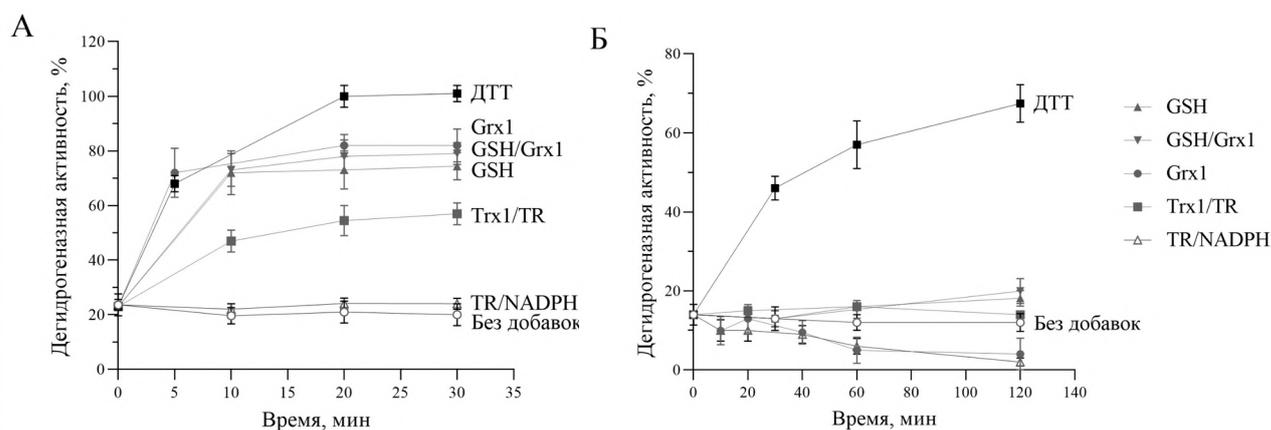
Как видно из данных, представленных на рис. 28 В, нативная ГАФД медленно расщепляется трипсином: интенсивность полосы ГАФД снижается на 15% за 2 ч. После S-нитрозилирования ГАФД скорость трипсинолиза возрастает: интенсивность полосы снижается на 25% за 2 ч. После S-глутатионилирования ГАФД скорость расщепления трипсином заметно возрастает: интенсивность полосы ГАФД снижается на 50 % за 2 ч. Эти данные свидетельствуют об увеличении доступности сайтов трипсинолиза в модифицированной молекуле ГАФД по сравнению с нативной, что предполагает разрыхление структуры белковой глобулы в ходе модификаций. При этом важно отметить, что мы не наблюдаем появления низкомолекулярных пептидов, возможно, это связано с большим количеством сайтов трипсинолиза в ГАФД (рис. 28 Г, таблица 5). Изменения в S-глутатионилированной ГАФД более выражены по сравнению с S-нитрозилированной ГАФД, что согласуется с результатами ДСК.

**Таблица 5.** 5 самых длинных пептидов после расщепления ГАФД трипсином (при условии, что протеолизу подверглись все сайты).

Пептид	Положение	Длина, а.о.	Масса, кДа
<u>V</u> DIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHG <u>K</u>	28-55	28	3,31
<u>W</u> GDAGAEYVVESTGVFTTME <u>K</u>	87-107	21	2,28
<u>V</u> IISAPSADAPMFVMGVNHE <u>K</u>	119-139	21	2,21
<u>V</u> IHDNFGIVEGLMTTVHAITATQ <u>K</u>	163-186	24	2,6
<u>G</u> ILGYTEHQVVSSDFNSDTHSSTFDAGAGIALN DHFV <u>K</u>	272-309	38	4,04

### 4.3. Обратимость S-нитрозилирования и S-глутатионилирования ГАФД

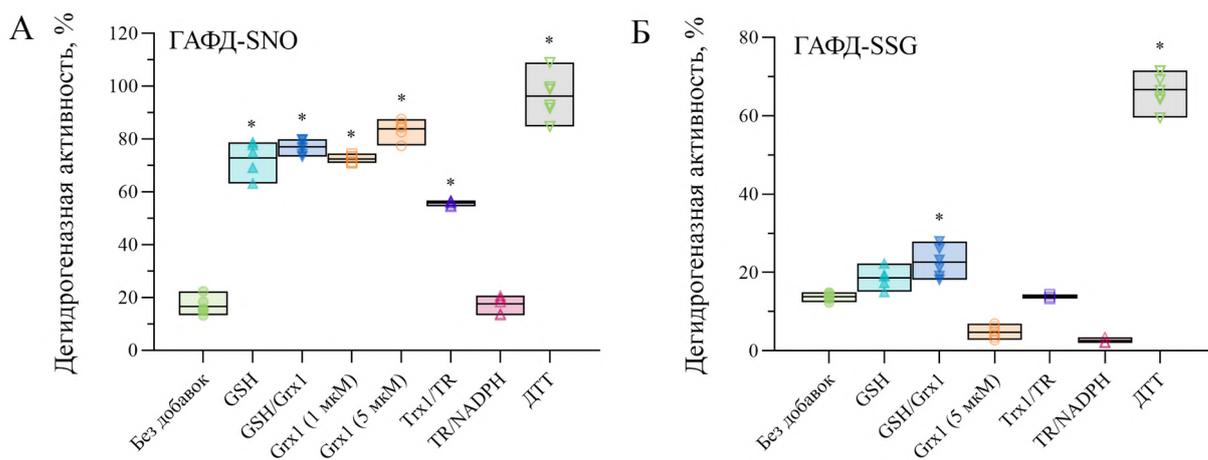
Чтобы оценить обратимость этих модификаций в физиологических условиях, мы исследовали способность модифицированной ГАФД реактивироваться при нейтральном pH в присутствии естественных клеточных компонентов, таких как восстановленный глутатион (GSH), глутаредоксин 1 (Grx1) и тиоредоксин 1 (Trx1). Тест на реактивацию с ДТТ служил положительным контролем и свидетельствовал о целостности белка и об обратимости исследуемых модификаций.



**Рис. 29. Реактивация S-нитрозилированной (А) и S-глутатионилированной (Б) ГАФД (см. также рис. 30).**

ГАФД модифицировали, как описано в разделах 4 и 5.1 Материалов и методов. S-нитрозилированную А) или S-глутатионилированную Б) ГАФД разбавляли калий-фосфатным буфером, pH 7,0, без добавок или в присутствии ДТТ, GSH, GSH+Grx1, Grx1 (1 и 5 мкМ), Trx1/TR (тиоредоксин 1 + тиоредоксин-редуктаза + NADPH) или TR/NADPH (тиоредоксин-редуктаза + NADPH). Через указанные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты для определения дегидрогеназной активности, как описано в разделе 2.1 Материалов и методов.

Представлены данные трёх независимых экспериментов  $\pm$  SD.



**Рис. 30. Реактивация S-нитрозилированной (А) и S-глутатионилированной (Б) ГАФД.**

ГАФД модифицировали, как описано в разделах 4 и 5.1 Материалов и методов. S-нитрозилированную или S-глутатионированную ГАФД разбавляли фосфатно-калиевым буфером, pH 7,0, без добавок или в присутствии ДТТ, GSH, GSH+Grx1, Grx1 (1 и 5 мкМ), Trx1/TR (тиоредоксин 1 + тиоредоксин-редуктаза + NADPH) или TR/NADPH (тиоредоксин-редуктаза + NADPH). Представлены данные дегидрогеназной активности, измеренной через 30 мин для проб с ГАФД-SNO (А) и 120 мин для проб с ГАФД-SSG (Б). Данные представлены в виде диаграммы с точками конкретных экспериментальных значений, линия - среднее значение,

\*- статистически значимое отличие от контроля без добавок с  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни). Количество независимых повторов составляет  $n=6$ .

Как показано на рис. 29 А и 30 А, S-нитрозилированная ГАФД эффективно денитрозилируется в присутствии ДТТ, о чём свидетельствует реактивация фермента на 60-70% за 5 мин инкубации и почти полная реактивация за 20 мин. Денитрозилирование ГАФД также эффективно в присутствии GSH или системы Grx1/GSH: ГАФД реактивируется на 60 % за 10 мин инкубации. Однако, степень реактивации в присутствии GSH ниже,

чем в присутствии ДТТ. Вероятно, это связано с образованием цистеинсульфеновой кислоты (Cys-SOH) в 20% активных центров S-нитрозилированной ГАФД, что было показано нами (Результаты и их обсуждение, раздел 2.3): активные центры, содержащие цистеинсульфеновую кислоту, реагируют с GSH с образованием смешанного дисульфида ГАФД-SSG (S-глутатионилированная ГАФД), который реактивируется гораздо медленнее (рис. 29 Б). Восстановленный Grx1 без GSH также способен денитрозировать ГАФД (5). Добавление избытка восстановленного Grx1 приводит к мгновенной реактивации S-нитрозилированной ГАФД, но степень реактивации на 20% ниже, чем в присутствии ДТТ (рис. 29 А). Это может быть связано с тем, что Grx1 не восстанавливает Cys-SOH. В присутствии тиоредоксина 1 денитрозирование происходит с наименьшей эффективностью (менее 50 % за 30 мин) (рис. 29 А и 30 А).

В отличие от денитрозирования ГАФД, деглутатионилирование происходит гораздо медленнее (рис. 29 Б и 30 Б). Реактивация в присутствии ДТТ на 50 % при pH 7,0 занимает около 1 ч, в отличие от S-нитрозилированной ГАФД, которая реактивируется на 50 % менее чем за 5 мин (рис. 29 А и 30 А). Неполная реактивация S-глутатионилированной ГАФД под действием ДТТ может быть объяснена необратимым окислением части каталитических цистеинов ГАФД (с образованием  $-SO_2H$ ) в условиях S-глутатионилирования ( $H_2O_2$  и GSH в соотношении 1:1). В присутствии GSH или Grx1 реактивация происходит еще медленнее: степень реактивации ГАФД не превышает 10 % за 2 ч.

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что S-нитрозирование ГАФД является относительно мягкой модификацией, которая сопровождается умеренными изменениями в третичной структуре и легко обратима в физиологических условиях в присутствии GSH или Grx1. S-глутатионилирование ГАФД приводит к более выраженным изменениям в

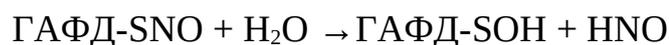
молекуле ГАФД по сравнению с S-нитрозилированием, что проявляется в большем снижении термостабильности и повышении чувствительности к действию трипсина. S-глутатионилированная ГАФД гораздо менее обратим в физиологических условиях по сравнению с S-нитрозилированной ГАФД.

## **5. Взаимосвязь между S-нитрозилированием и S-глутатионилированием**

Эта часть исследования была направлена на проверку гипотезы, согласно которой S-нитрозилирование белков может способствовать их S-глутатионилированию в присутствии клеточного GSH. Гипотеза была основана на экспериментах *in vitro* с очищенной ГАФД из мышц кролика (Результаты и их обсуждение, раздел 2), показавших, что S-нитрозилирование ГАФД приводит к образованию цистеинсульфеновой кислоты примерно в 20% активных центров. Раньше было показано, что образование цистеинсульфеновой кислоты способствует S-глутатионилированию ГАФД [180].

### **5.1. Цистеинсульфеновая кислота способствует S-глутатионилированию белков**

Во 2 разделе мы описали эксперимент, который позволил обнаружить сульфеновую кислоту в препарате S-нитрозилированной ГАФД по образованию аддукта между каталитическим цистеином и димедоном, который необратимо связывается с цистеинсульфеновой кислотой в белках. Предположительно, цистеинсульфеновая кислота в активном центре ГАФД образуется в результате гидролиза ГАФД-SNO):



Известно, что во многих случаях окисление остатков цистеина с образованием цистеинсульфеновой кислоты способствует дальнейшей

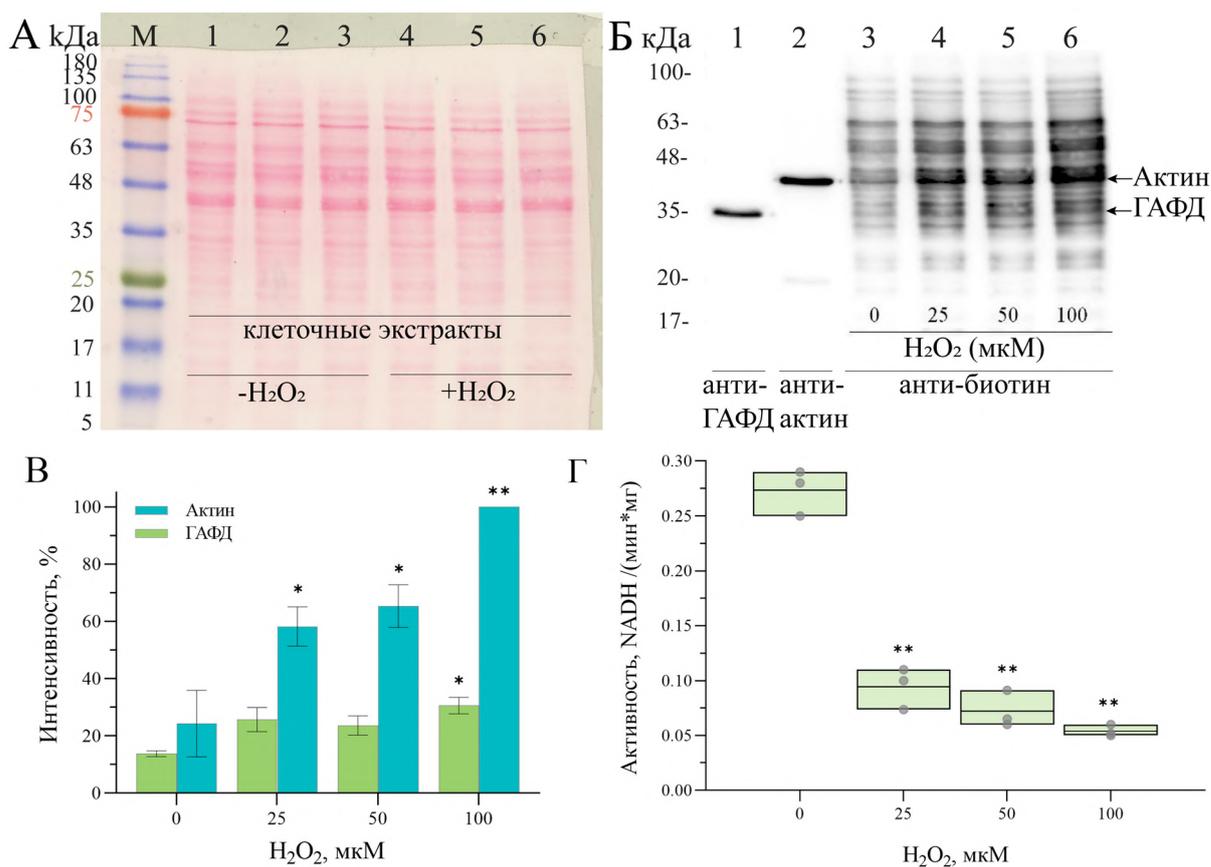
реакции с GSH с образованием смешанного дисульфида (S-глутатионирование): Белок-SOH + GSH → Белок-SSG + H<sub>2</sub>O

Этот механизм был показан для бета-актина [181], гемоглобина [182], пероксиредоксина 2 [183], тирозиновой фосфатазы PTP-1B [184] и растительной ГАФД [102].

Поскольку в естественных условиях концентрация GSH в клетках обычно высока, формирование ГАФД-SOH под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или NO должно приводить к S-глутатионированию белка с образованием ГАФД-SSG. Мы предположили, что NO может стимулировать S-глутатионирование ГАФД через образование Cys-SOH на каталитическом Cys152, подобно тому, как это наблюдается в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [46]. Чтобы подтвердить этот механизм, мы проанализировали лизаты клеток после обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и донором NO (DEANO) на содержание S-сульфенированной и S-глутатионированной ГАФД.

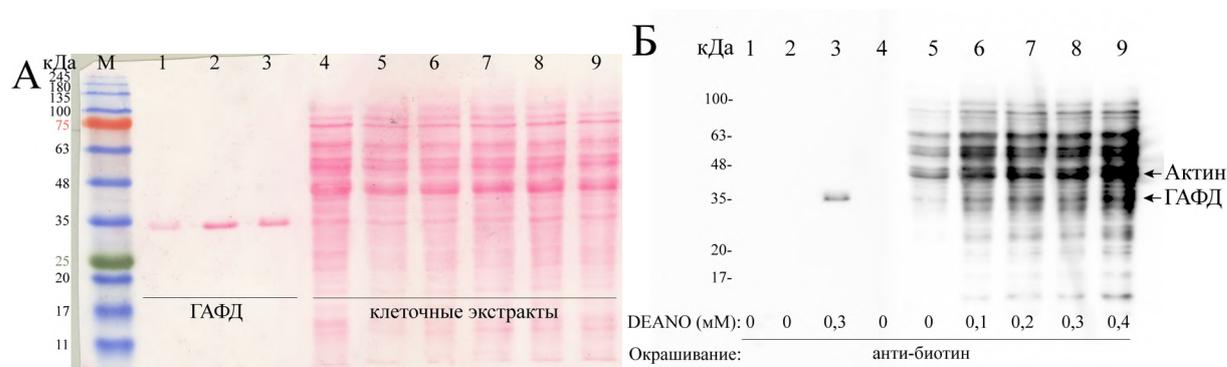
## **5.2. Детекция сульфенированных белков в клеточных лизатах**

Для обнаружения сульфенированной ГАФД мы использовали реагент на сульфеновую кислоту, конъюгированный с биотином (DCP-Bio1). Наличие биотиновой метки позволяет обнаруживать сульфенированные белки с помощью антител к биотину. В наших экспериментах клетки линии HEK 293T инкубировали в присутствии различных концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или DEANO в течение 1 ч, после чего клетки промывали HBSS буфером, чтобы удалить реагенты. Для обнаружения сульфенированных белков клетки обрабатывали ультразвуком в присутствии DCP-Bio1 и йодоацетамида (для защиты свободных SH-групп от окисления во время пробоподготовки). Обломки клеточных стенок удаляли центрифугированием, а полученные лизаты анализировали методом вестерн-блоттинга с антителами к биотину. Перед окрашиванием антителами мембрану окрашивали Ponceau S для контроля нанесения белков.



**Рис. 31. Обнаружение Cys-SOH в белках после инкубации клеток НЕК 293Т в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с использованием реагента для сульфеновой кислоты с биотиновой меткой (DCP-Bio1). Дорожки: 1-3) лизаты необработанных клеток; 4-6) лизаты клеток, обработанных 25, 50 и 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. А) Мембрана была окрашена Rose Bengal S для контроля равного нанесения. Б) После промывки мембрану разрезали на 3 секции (дорожка 1, дорожка 2 и дорожки 3-6), которые окрашивали антителами против ГАФД, бета-актина и биотина, соответственно. В) Количественное определение окрашивания биотином ГАФД и бета-актина. Г) Активность ГАФД в клеточных лизатах после инкубации с указанными концентрациями H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Данные представлены как средние значения 3 независимых экспериментов ±SD и с указанием конкретных экспериментальных значений. Указаны статистически значимые различия по сравнению с группой без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: \* p<0,05, \*\* p<0,01 (параметрический анализ One-way ANOVA с апостериорными множественными сравнениями с помощью поправки Бонферрони).**

Обнаружение сульфенированных белков после инкубации клеток в присутствии  $H_2O_2$  показано на рис. 31 Б (дорожки 3-6). Видно, что ГАФД окрашивалась антителами к биотину. Кроме того, интенсивное окрашивание наблюдалось для полосы белка, соответствующей бета-актину. Интенсивность окрашивания биотином для ГАФД и бета-актина увеличивалась после инкубации с  $H_2O_2$  (рис. 31 Б и В). На рис. 31 Г показано, что активность ГАФД в клеточных лизатах снижается после инкубации клеток в присутствии  $H_2O_2$ , что указывает на окисление каталитических цистеинов фермента.

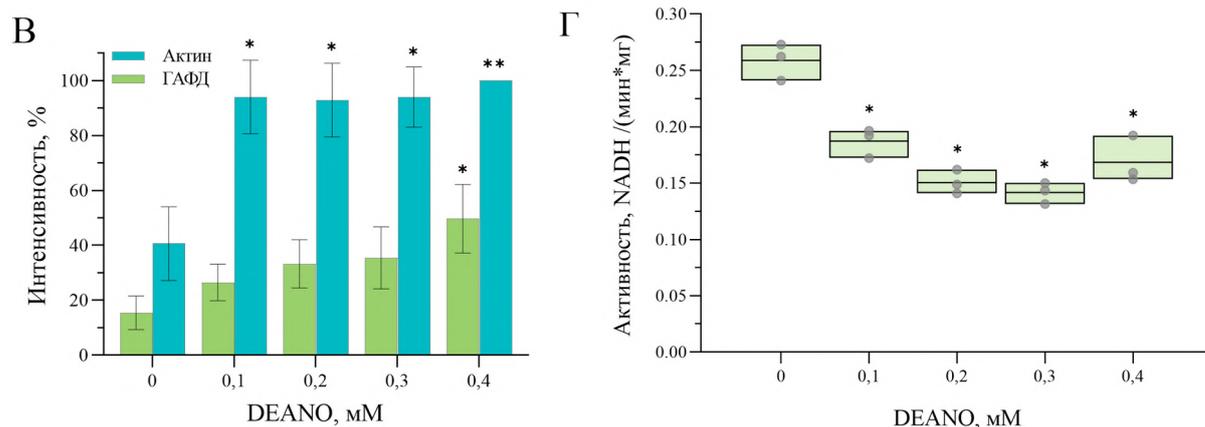


**Рис. 32 А, Б. Обнаружение Cys-SOH в белках после инкубации клеток НЕК 293Т в присутствии DEANO с использованием реагента для сульфеновой кислоты с биотиновой меткой (DCP-Bio1).**

Дорожки: 1) рекомбинантная ГАФД человека (0,6 мкг); 2) рекомбинантная ГАФД человека (0,6 мкг) после инкубации с DCP-Bio1; 3) рекомбинантная ГАФД человека (0,6 мкг) после инкубации с 0,3 мМ DEANO и DCP-Bio1; 4) лизат клеток без обработки DEANO без DCP-Bio1; 5) лизат без обработки DEANO + DCP-Bio1; 6 - 9) лизаты клеток, инкубированных с 0,1 - 0,4 мМ DEANO + DCP-Bio1.

А) Мембрану окрашивали Ронсеаи S для контроля нанесения.

Б) После промывки мембрану окрашивали антителами против биотина.



**Рис. 32 В, Г. Обнаружение Cys-SOH в белках после инкубации клеток НЕК 293Т в присутствии DEANO с использованием реагента для сульфеновой кислоты с биотиновой меткой (DCP-Bio1).**

*В) Количественное определение окрашивания биотином ГАФД и бета-актина.*

*Г) Активность ГАФД в клеточных лизатах после инкубации с указанными концентрациями DEANO. Данные представлены как средние значения 3 независимых экспериментов  $\pm$  SD и с указанием конкретных экспериментальных значений.*

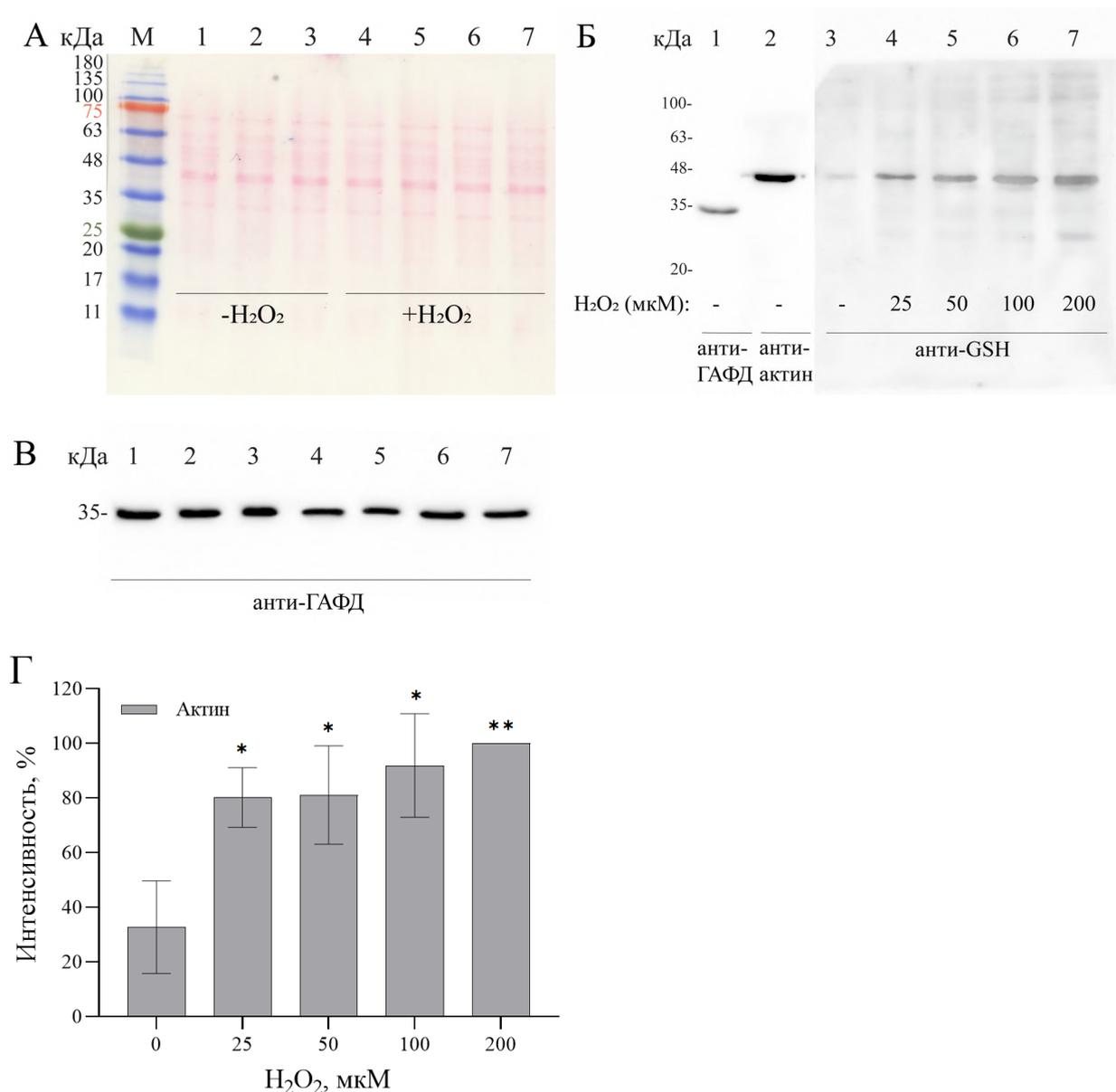
*Указаны статистически значимые различия по сравнению с группой без DEANO: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (параметрический анализ One-way ANOVA с апостериорными множественными сравнениями с помощью поправки Бонферрони).*

После обработки клеток DEANO интенсивность окрашивания биотином ГАФД и бета-актина также увеличивается по сравнению с интактными клетками (рис. 32 Б и 32 В). На рис. 32 Г показано, что активность ГАФД в клеточных лизатах снижается после обработки клеток DEANO, что указывает на модификацию каталитического остатка цистеина в ГАФД.

Представленные данные показывают, что инкубация клеток с  $H_2O_2$  и NO приводит к сульфенированию цистеинов в ряде белков, среди которых обнаружены ГАФД и актин.

### **5.3. Детекция S-глутатионированных белков в клеточных лизатах**

Поскольку GSH присутствует в клетках в высоких концентрациях, мы предположили, что образование цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД под действием  $H_2O_2$  или NO может способствовать S-глутатионированию белка. Для проверки этой гипотезы лизаты клеток HEK 293T после обработки  $H_2O_2$  и DEANO были проанализированы методом вестерн-блоттинга в невозстанавливающих условиях с последующим окрашиванием антителами против GSH. Результаты экспериментов представлены на рис. 33 и 34.



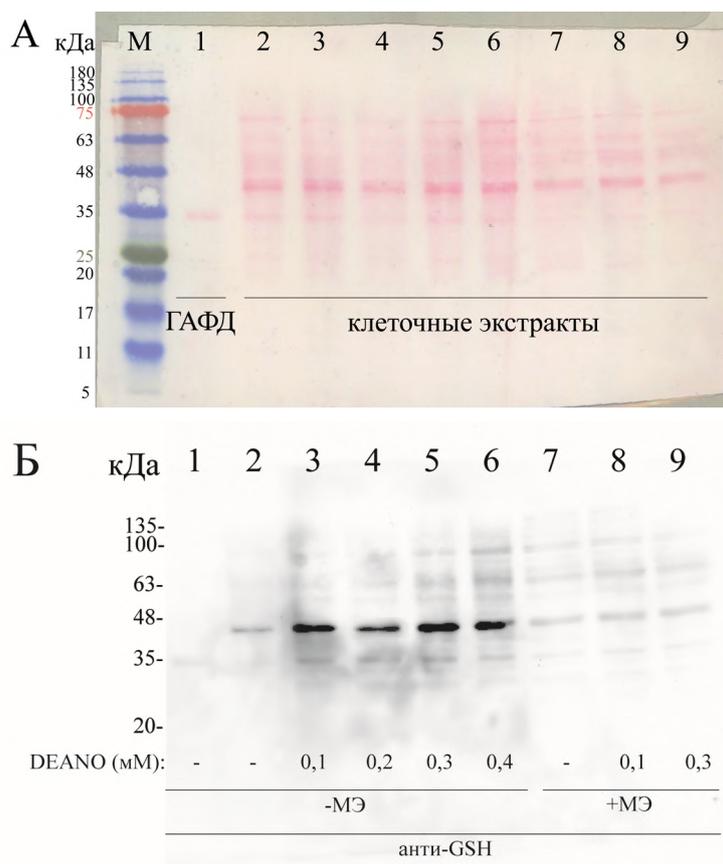
**Рис. 33. Обнаружение S-глутатионилированных белков в клеточных лизатах после инкубации клеток с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: ДСН-электрофорез образцов проводили в невозстанавливающих условиях, затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с последующим окрашиванием на глутатионилированные белки.**

1-3) Лизаты интактных клеток; 4-7) Лизаты клеток после инкубации с 25, 50, 100 и 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

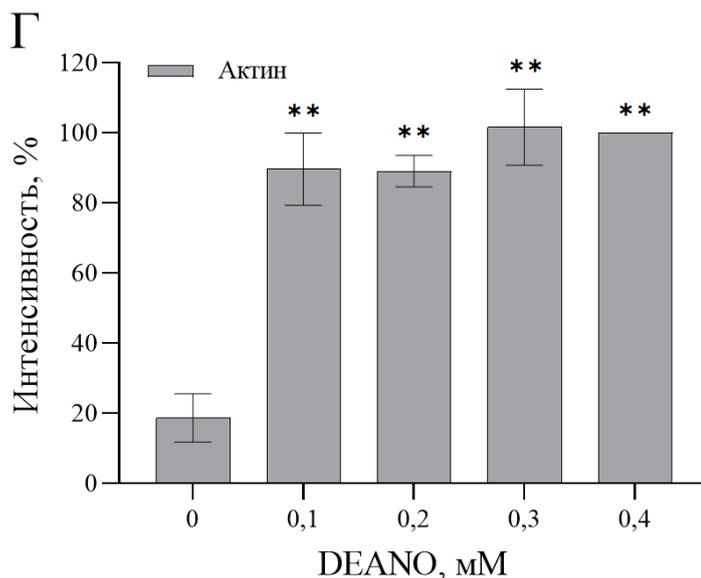
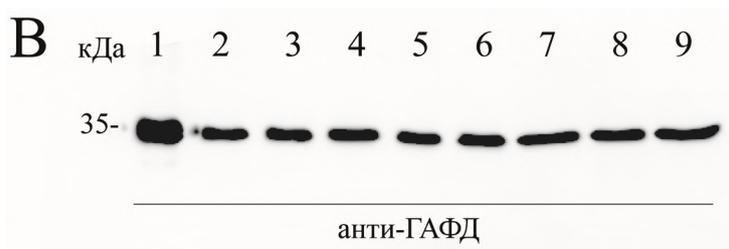
А) Окрашивание Рорсеаи S; Б) Окрашивание на ГАФД (1), бета-актин (2) и на GSH (3 - 7); В) Окрашивание для ГАФД; Г) Количественное определение окрашивания актина для GSH: средние значения 3 независимых экспериментов ±SD.

Указаны статистически значимые различия по сравнению с группой без H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: \* p<0,05, \*\* p<0,01 (параметрический анализ One-way ANOVA с апостериорными множественными сравнениями с помощью поправки Бонферрони).

После инкубации клеток с  $H_2O_2$  окрашивание на GSH не выявило S-глутатионилированной ГАФД в клеточных лизатах, но выявило S-глутатионилированный бета-актин. Интенсивность окрашивания бета-актина на GSH увеличивалась после инкубации клеток с  $H_2O_2$  (дорожки 4-7 на рис. 33 А и рис. 33 Б). В качестве контроля нанесения использовали окрашивание на ГАФД (рис. 33 В).

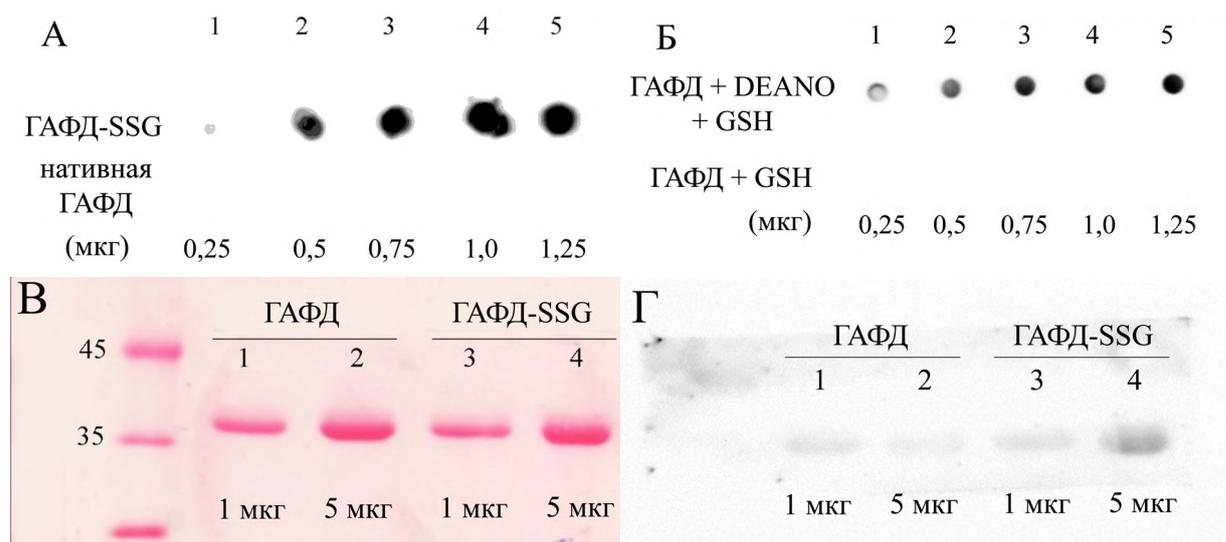


**Рис. 34. А и Б. Вестерн-блоттинг клеточных лизатов после инкубации клеток с DEANO:** ДСН-электрофорез образцов проводили в невосстанавливающих (дорожки 1-6) и восстанавливающих (дорожки 7-9) условиях с последующим окрашиванием мембраны на белок (А), на GSH (Б). Дорожки: 1) рекомбинантная ГАФД (0,8 мкг); 2) клеточный лизат без обработки; 3-6) клеточные лизаты после инкубации клеток с 0,1, 0,2, 0,3 и 0,4 мМ DEANO, соответственно; 7) лизат без обработки; 8,9) клеточные лизаты после инкубации клеток с 0,1 и 0,3 мМ DEANO.



**Рис. 34. В и Г. Вестерн-блоттинг клеточных лизатов после инкубации клеток с DEANO:** ДСН-электрофорез образцов проводили в невосстанавливающих (дорожки 1-6) и восстанавливающих (дорожки 7-9) условиях с последующим окрашиванием мембраны на ГАФД (В). Дорожки: 1) рекомбинантная ГАФД (0,8 мкг); 2) клеточный лизат без обработки; 3-6) клеточные лизаты после инкубации клеток с 0,1, 0,2, 0,3 и 0,4 мМ DEANO, соответственно; 7) лизат без обработки; 8,9) клеточные лизаты после инкубации клеток с 0,1 и 0,3 мМ DEANO. Г) Количественная оценка интенсивности окрашивания бета-актина на GSH: среднее значение для 3 независимых экспериментов  $\pm$ SD (статистически значимые различия указаны по сравнению с группой без DEANO: \*\*  $p < 0,01$ , параметрический анализ One-way ANOVA с апостериорными множественными сравнениями с помощью поправки Бонферрони).

В случае клеток, обработанных DEANO, окрашивание на GSH выявило интенсивную полосу бета-актина (45 кДа) (рис. 34 Б, дорожки 3-6), которая исчезала в восстанавливающих условиях (рис. 34 Б, дорожки 7-9), что соответствовало распаду смешанного дисульфида в присутствии меркаптоэтанола. Полоса, соответствующая S-глутатионилированной ГАФД в лизатах (~ 35 кДа), была довольно слабой по сравнению с полосой бета-актина (рис. 34 Б, дорожки 3-6). Следовательно, мы наблюдали S-глутатионилированный бета-актин в клетках, обработанных как H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, так и DEANO (рис. 33 Б и 34 Б), но обнаружили только следы S-глутатионилированной ГАФД в клетках, обработанных DEANO. Такие результаты могут быть связаны с тем, что содержание ГАФД в клетках значительно ниже по сравнению с бета-актином. В то же время нельзя исключить распад смешанного дисульфида ГАФД-SSG (деглутатионилирование) в условиях ДСН-электрофореза. Можно предположить, что условия ДСН-электрофореза (щелочной pH и денатурирующий агент) могут способствовать деглутатионированию ГАФД. Это предположение подтверждается нашими данными, согласно которым S-глутатионилированная рекомбинантная ГАФД окрашивается антителами против GSH после точечного блоттинга (рис. 35 А и Б), но после вестерн-блоттинга чувствительность к антителам против GSH значительно снижается (рис. 35 В и Г). По этой причине мы попытались обнаружить S-глутатионилированную ГАФД в клеточных лизатах с помощью иммунопреципитации с антителами против GSH.

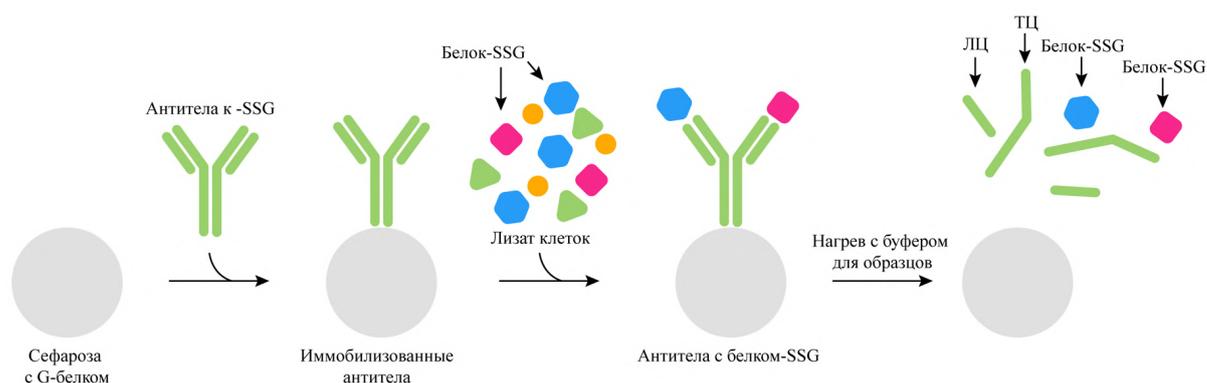


**Рис. 35. Анализ S-глутатионилированной ГАФД методом дот-блоттинга (А и Б) и вестерн-блоттинга (В и Г).**

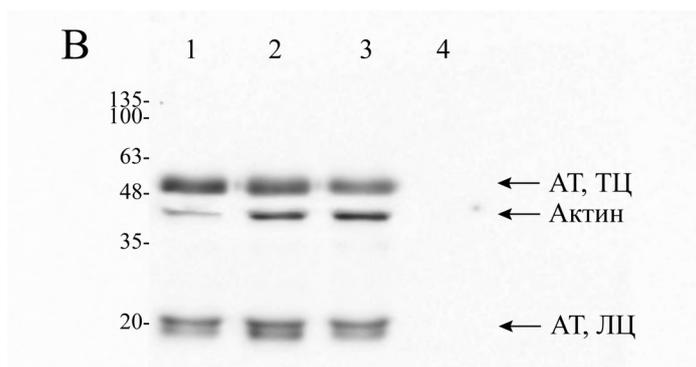
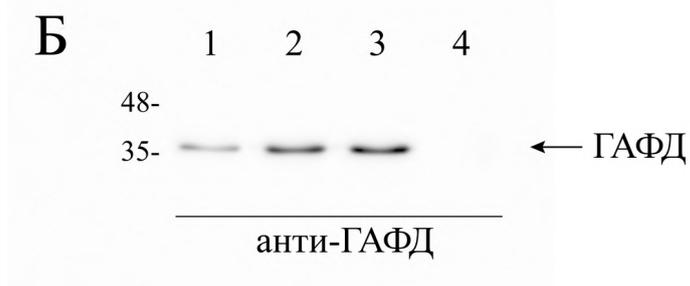
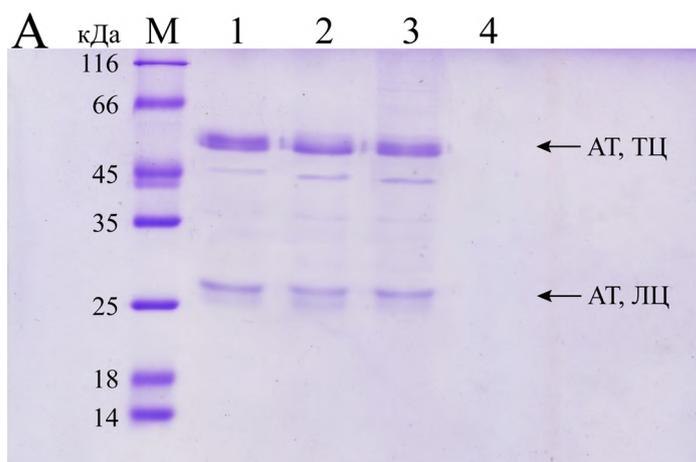
А) Человеческая рекомбинантная ГАФД была S-глутатионирована в присутствии GSH и  $H_2O_2$  (Материалы и методы, раздел 4). Б) Рекомбинантную ГАФД человека инкубировали в присутствии DEANO, как описано в разделе 5.1, а затем добавляли GSH до конечной концентрации 0,5 мМ. В качестве контроля использовали ГАФД, инкубированную с 0,5 мМ GSH без предварительной обработки DEANO. Через 30 мин растворы освобождали от реагентов с помощью колонки с сефадексом G-50. Препараты S-глутатионилированной или нативной ГАФД наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану высушивали на воздухе, блокировали PBST с 5% сухого молока, а затем окрашивали антителами против GSH. Антитела не окрашивают раствор GSH, нанесенный на мембрану (данные не показаны). В, Г) Вестерн-блоттинг нативной и S-глутатионированной ГАФД: дорожки 1 и 2 - нативная ГАФД; дорожки 3 и 4 - S-глутатионированная ГАФД. После ДСН-электрофореза в невосстанавливающих условиях белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали Ponceau S (В), а затем антителами против GSH (Г).

#### 5.4. Иммунопреципитация S-глутатионилированных белков в клеточных лизатах

Для иммунопреципитации мышинные моноклональные антитела против GSH иммобилизовали на протеин G-сефарозе, а затем инкубировали с исследуемыми клеточными лизатами (рис. 36). Образцы протеин G-сефарозы, содержащие комплексы антител с S-глутатионилированными белками, отмывали от несвязанных белков и анализировали в ДСН-электрофорезом (рис. 37 А) и вестерн-блоттингом с антителами против ГАФД (рис. 37 Б). Для подтверждения S-глутатионилирования бета-актина образцы также анализировали с антителами против бета-актина (рис. 37 В).



**Рис. 36. Схема иммунопреципитации S-глутатионилированных белков из клеточных лизатов с помощью антител против GSH.**



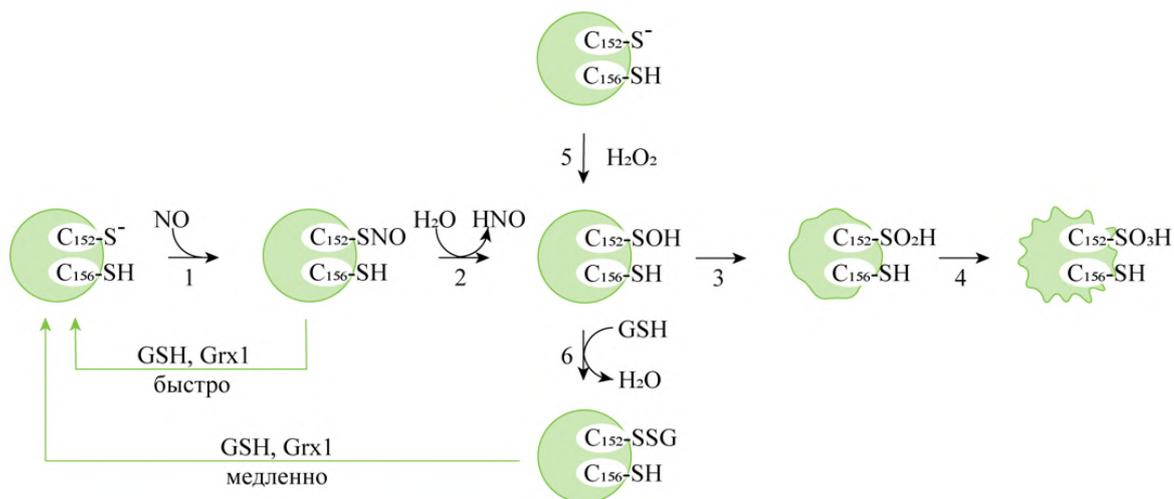
**Рис. 37. Иммунопреципитация S-глутатионилированных белков из клеточных лизатов с помощью антител против GSH.**

Лизаты клеток НЕК 293Т без обработки (1), после инкубации с 50 мкМ  $H_2O_2$  (2) и после инкубации с 0,3 мМ DEANO (3) инкубировали с мышинными моноклональными антителами против GSH, иммобилизованными на белок G-сефарозе. Лизат необработанных клеток инкубировали с сефарозой без антител (4, контроль неспецифического связывания). Белки, связавшиеся с сефарозой, анализировали с помощью ДСН-электрофореза (А) и вестерн-блоттинга с использованием кроличьих поликлональных антител против ГАФД (Б). Затем мембрану промывали стриппинг-буфером и окрашивали мышинными моноклональными антителами против бета-актина (В).

АТ - моноклональные антитела; ТЦ и ЛС - тяжелые и легкие цепи, соответственно.

Анализ полученных комплексов ДСН-электрофорезом показал наличие одинакового количества моноклональных антител (АТ) против GSH во всех исследуемых образцах (дорожки 1-3 на рис. 37 А). Кроме того, в образцах с иммобилизованными антителами присутствует полоса белка 45 кДа (дорожки 1-3 на рис. 37 А). В образце протеин G-сефарозы без антител (дорожка 4 на рис. 37 А) белковые полосы отсутствуют, что свидетельствует о том, что образцы были отмыты от неспецифически связанных белков. Хотя S-глутатионилированная ГАФД не видна на геле (рис. 37 А), вестерн-блоттинг выявил S-глутатионилированную ГАФД во всех образцах (рис. 37 Б, дорожка 1-3). После обработки  $H_2O_2$  или DEANO количество S-глутатионилированной ГАФД увеличивалось (рис. 37 Б, дорожки 2 и 3). На сефарозе без антител ГАФД не обнаружена, что исключает неспецифическое связывание (рис. 37 Б, дорожка 4). В случае окрашивания на бета-актин (рис. 37 В) тяжелые и лёгкие цепи мышечных моноклональных антител против GSH (АТ, ТЦ и ЛЦ) видны на дорожках 1-3, поскольку мы использовали вторичные антитела против антител мышцы для окрашивания актина. Как и ГАФД, S-глутатионилированный актин был обнаружен во всех лизатах (рис. 37 В, дорожка 1), но после обработки  $H_2O_2$  и DEANO количество S-глутатионилированного актина увеличилось (рис. 37 В, дорожки 2 и 3).

Эти эксперименты позволили обнаружить S-глутатионилированную ГАФД в клеточных лизатах и показать, что инкубация клеток с  $H_2O_2$  и DEANO способствует её S-глутатионилированию. Кроме того, было подтверждено, что 45-кДа S-глутатионилированный белок, обнаруженный в клеточных лизатах после обработки  $H_2O_2$  и DEANO, является бета-актином. Эти данные позволяют предположить, что механизм, предложенный для S-глутатионилирования ГАФД под действием NO (рис. 38) с участием цистеинсульфеновой кислоты, может быть применим и к бета-актину.



**Рис. 38.** Схема взаимосвязи между S-нитрозилированием и S-глутатионированием ГАФД (показана одна субъединица тетрамера ГАФД). S-нитрозилирование (1), как и окисление (5), приводит к образованию цистеинсульфеновой кислоты на каталитическом Cys152. Сульфенирование Cys152 способствует его реакции с GSH с образованием смешанного дисульфида (6). Образование цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД при инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> было показано в литературе (реакция 5) [46].

Это предположение согласуется с результатами предыдущих исследований, показавших, что бета-актин обладает чувствительным к окислительно-восстановительным процессам остатком цистеина Cys374, который легко окисляется, S-нитрозилируется и S-глутатионируется [158,160,185], а образование цистеинсульфеновой кислоты в бета-актине способствует его S-глутатионированию в присутствии GSH [181].

Представленные данные показывают возможный путь связи между S-нитрозилированием и S-глутатионированием ГАФД, а также других белков, содержащих редокс-чувствительные цистеины. Гидролиз S-нитрозилированных белков с образованием цистеинсульфеновых кислот и накопление соответствующих сульфенированных белков, склонных к реакции с GSH, является основным фактором, обеспечивающим связь

между этими модификациями. Эти результаты важны для понимания накопления S-глутатионилированных белков при некоторых заболеваниях, которые сопровождаются развитием окислительного/нитрозативного стресса. Хорошей моделью нитрозативного стресса является болезнь Альцгеймера (БА), поскольку в патологических условиях NO вырабатывается в мозге одной из трёх изоформ NO-синтазы (NOS) в качестве провоспалительного ответа [186]. В ряде исследований сообщается о повышенном уровне S-глутатионилированных белков при БА. Было показано, что уровень S-глутатионилированных белков дезоксигемоглобина, альфа-кристаллина В, ГАФД и альфа-энолазы повышен в мозге при БА по сравнению с контрольной группой, соответствующей возрасту [100]. Была обнаружена корреляция между содержанием S-глутатионилированной ГАФД в плазме крови и прогрессированием БА [187]. Кроме того, в одной из недавних работ было показано, что повышенная продукция АФК у мышечной модели БА приводит к S-глутатионилированию синаптического актина, что приводит к деполимеризации актиновых филаментов, потере дендритных отростков и развитию когнитивного дефицита [188].

## **6. Влияние H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NO на клетки НЕК 293Т**

Возможно, окислительные модификации ГАФД могут участвовать в регуляции апоптоза в клетках. В предыдущих разделах было показано, что инкубация клеток в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или донора NO способствует окислению и S-глутатионилированию ГАФД. В данной части работы мы исследовали, как инкубация клеток в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или донора NO влияет на развитие апоптоза.

## 6.1. Детекция апоптоза в клетках методом проточной цитометрии

Клетки линии НЕК 293Т в 12-луночном планшете инкубировали в течение 1 часа в HBSS буфере с концентрацией перекиси водорода: 0, 25, 50 и 100  $\mu\text{M}$ . Далее клетки отмывали PBS буфером и обрабатывали растворами иодида пропидия (PI) и аннексина V меченого FITC в соответствии с протоколом набора для анализа мёртвых клеток в популяции (Материалы и методы, раздел 8.4).

Анализ популяции клеток производили методом проточной цитометрии. PI – флуоресцентный краситель, связывающийся с нуклеиновыми кислотами; окрашивание этим красителем определяет популяцию мёртвых клеток. Аннексин V, конъюгированный с флуоресцентной меткой FITC, связывает фосфатидилсерин на мембране клеток при переходе клетки в апоптоз (Материалы и методы, раздел 8.4). Фосфатидилсерин у живых здоровых клеток расположен на внутренней мембране. При раннем апоптозе он экспонируется на наружную мембрану, и аннексин-V может с ним связаться, но поскольку мембрана всё ещё целая, PI не может проникнуть внутрь клетки. На поздних стадиях апоптоза фосфатидилсерин экспонируется на внешней стороне мембраны, связываясь с аннексином-V, и целостность мембраны нарушается: PI проникает внутрь клеток, связываясь с нуклеиновыми кислотами. При некрозе фосфатидилсерин не экспонируется, но целостность мембраны нарушается.

Рассматривая графики зависимости сигнала PI от Annexin V-FITC, можно разделить их на 4 области:

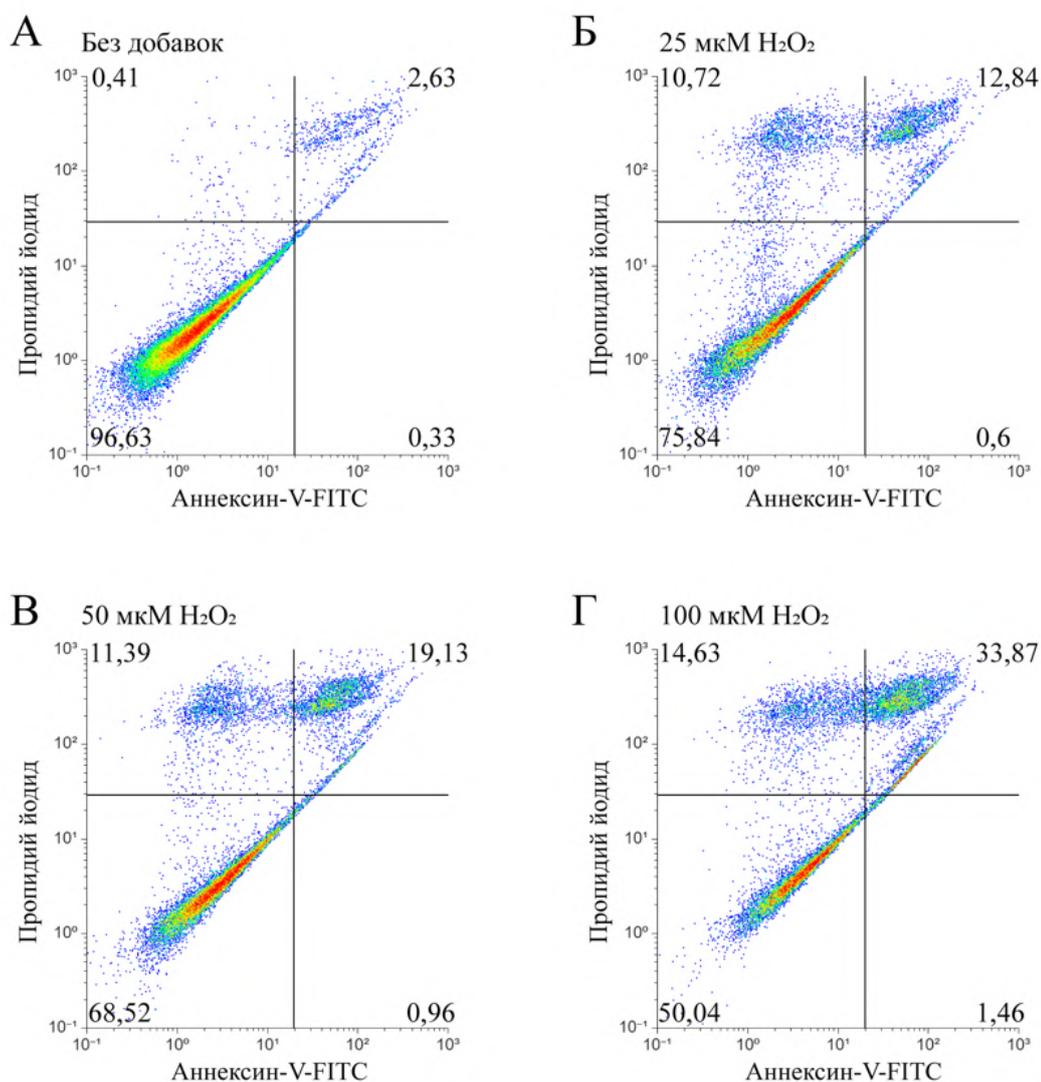
PI (-), аннексин (-) – здоровые клетки (левый нижний квадрат),

PI (+), аннексин (-) – некроз клеток (левый верхний квадрат),

PI (-), аннексин (+) – начало апоптоза (правый нижний квадрат),

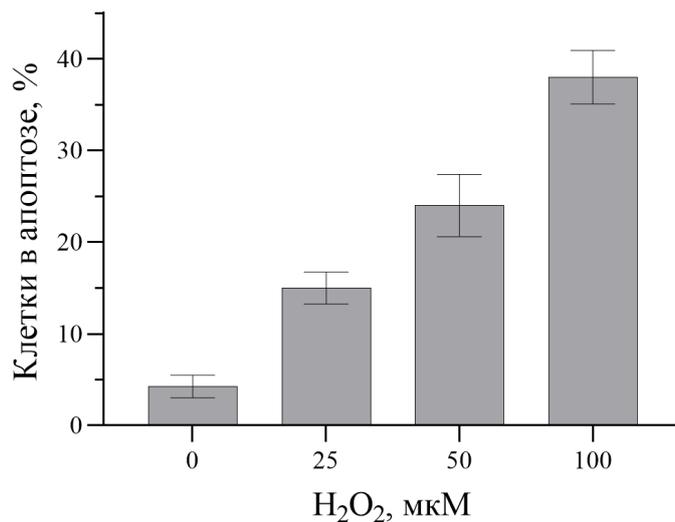
PI (+), аннексин (+) – поздние стадии апоптоза (правый верхний квадрат).

Деление на 4 группы было проведено отдельно для PI и аннексина-V, а после откорректировано так, чтобы группы были визуально отличимы, для контрольных клеток – это же деление использовалось для клеток после инкубации с перекисью водорода.



**Рис. 39. Зависимость сигнала PI от аннексин V-FITC для клеток без добавок или после инкубации с 25, 50 и 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

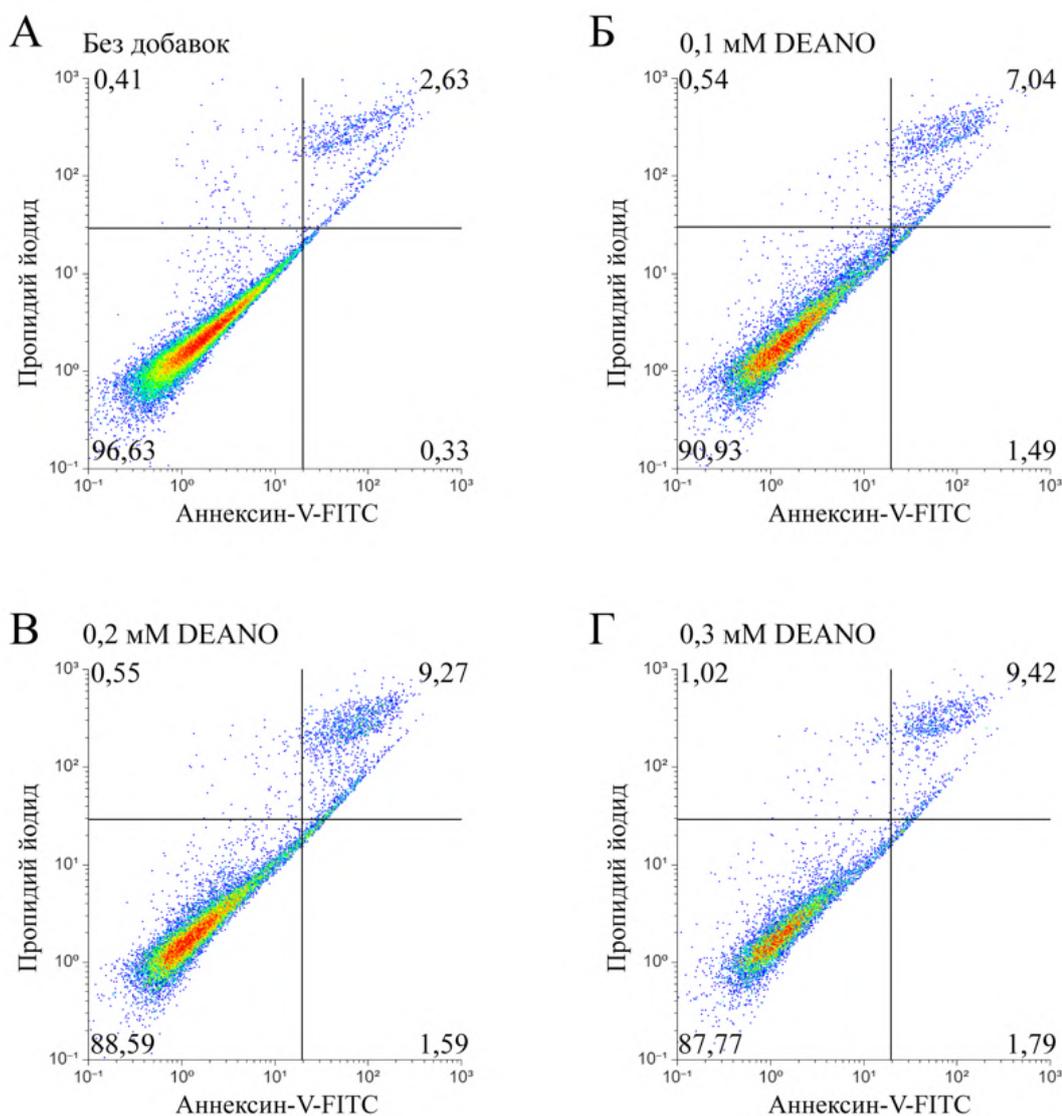
Каждая точка на графике соответствует одному сигналу (клетке). Окрашивание точек соотносится с их плотностью: от наименьшей до наибольшей (синий < голубой < зелёный < жёлтый < красный). В “квадратах” показаны проценты клеток, попавших в эту область.



**Рис. 40. Процент клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза (высокий сигнал FITC на рис. 39).**

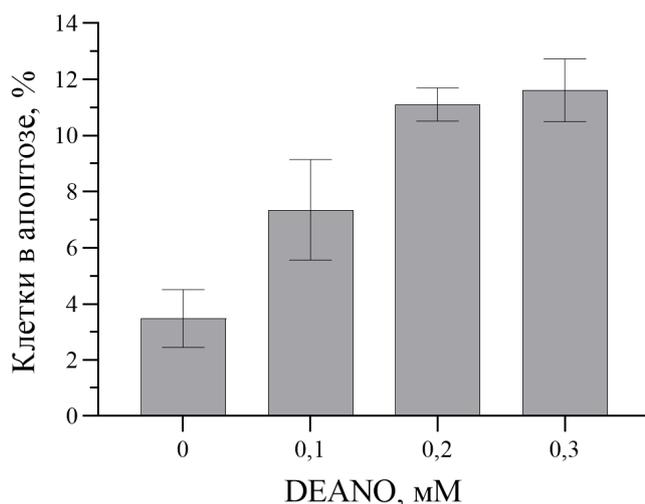
*Показаны значения для групп клеток без добавок или после инкубации с 25, 50 и 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . На графике представлены средние значения 3 экспериментов с  $\pm$  SD.*

На рис. 39 и 40 видна разница в популяциях клеток при увеличении концентрации добавленной перекиси водорода: растёт количество клеток в некрозе и апоптозе.



**Рис. 41. Зависимость сигнала PI от аннексин V-FITC для клеток без добавок или после инкубации с 0,1, 0,2 и 0,3 мМ DEANO.**

Каждая точка на графике соответствует одному сигналу (клетке). Окрашивание точек соотносится с их плотностью: от наименьшей до наибольшей (синий < голубой < зелёный < жёлтый < красный). В “квадратах” показаны проценты клеток, попавших в эту область.



**Рис. 42. Процент клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза (высокий сигнал FITC на рис. 41).**

Показаны значения для групп клеток без добавок или после инкубации с 100, 200 и 300  $\mu\text{M}$  DEANO. На графике представлены средние значения 2 экспериментов с  $\pm$  SD.

При воздействии на клетки перекисью водорода ~10% клеток перешло в некроз (рис. 39, левый верхний квадрант). При этом при воздействии максимальных использованных концентраций нитрозилирующего агента всего 1% клеток перешёл в некроз (рис. 41). Количество клеток в апоптозе также больше для использованных концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  по сравнению с DEANO (рис. 41 и 42), что говорит о более агрессивной воздействию перекиси водорода.

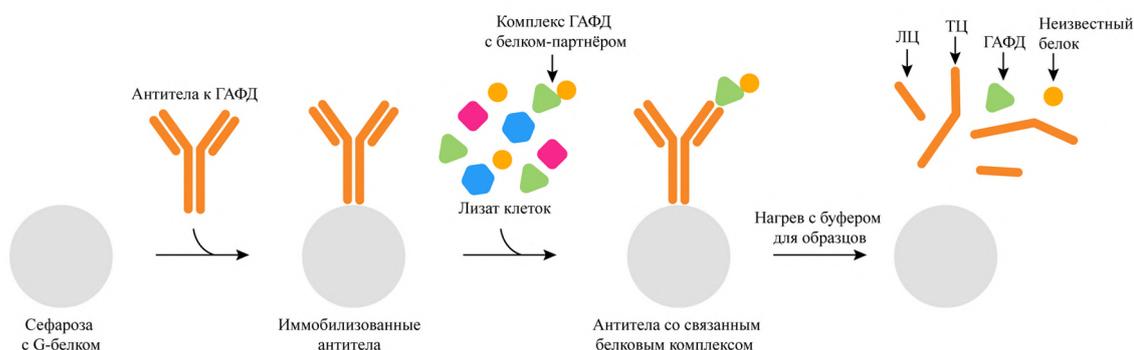
Такую разницу в действии нитрозилирующего агента по сравнению с  $\text{H}_2\text{O}_2$  можно объяснить тем, что NO, будучи сигнальной молекулой, является не только источником, но и регулятором стресса. Интересно, что в литературе есть данные об участии NO в механизмах ответных реакций растений на различные стрессы (от тяжёлых металлов, солей, температур, радиации) [189–191] и об участии NO в защите *Bacillus Subtilis* от окислительного стресса, вызванного АФК [192].

## 7. Взаимодействие ГАФД с актином

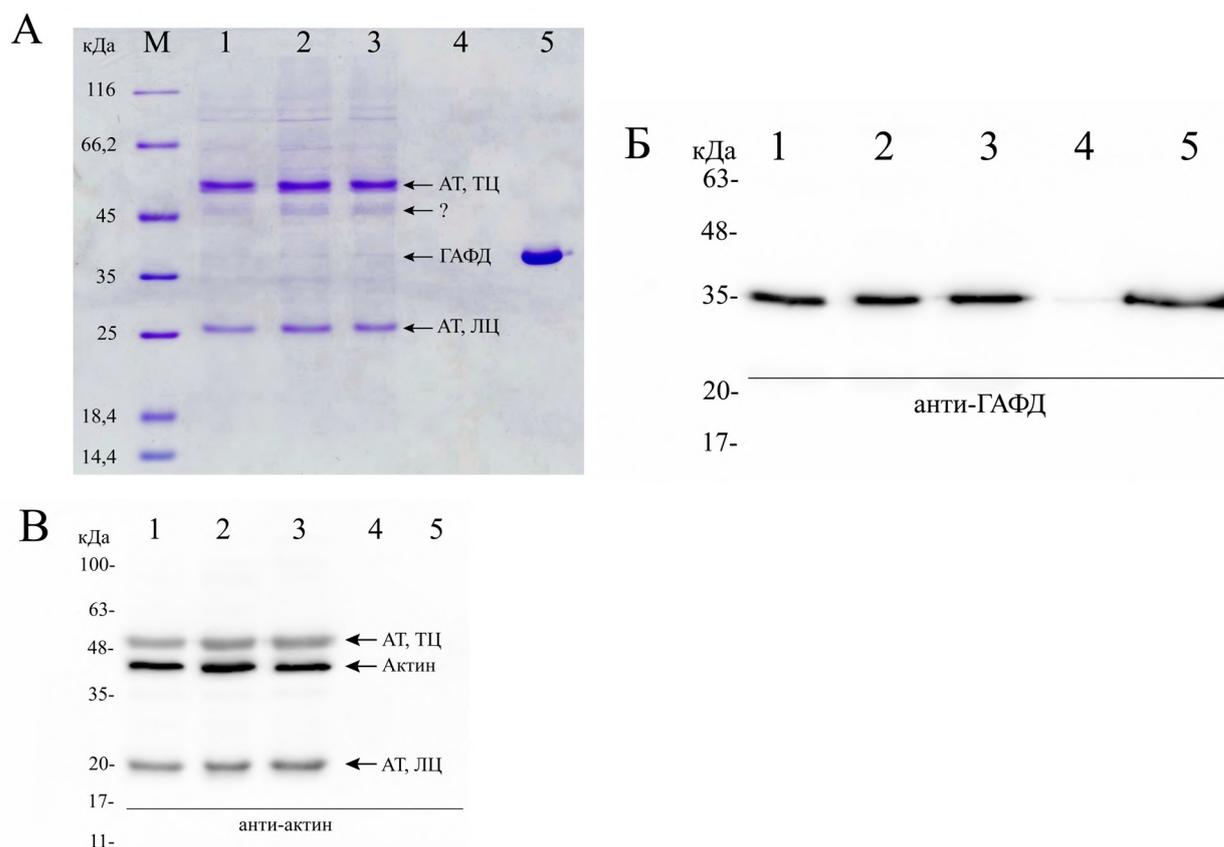
### 7.1. Поиск белков-партнёров ГАФД методом иммунопреципитации с антителами к ГАФД

Для изучения взаимодействия ГАФД с возможными белками-партнёрами мы исследовали белковые комплексы, полученные из клеточных экстрактов методом иммунопреципитации. Поскольку образование белковых комплексов может регулироваться АФК/АФА, в экспериментах мы использовали интактные клетки, обработанные  $H_2O_2$  или донором  $NO$  DEANO, или клетки, инкубированные с ДТТ.

Для выделения комплексов, образованных ГАФД, лизаты, полученные из клеток НЕК 293Т (интактные клетки и обработанные  $H_2O_2$  или DEANO), инкубировали с мышинными моноклональными антителами против ГАФД (клон 6С5, Hytest), иммобилизованными на сефарозе с G белком. После инкубации образцы сефарозы отмывали от несвязавшихся белков, а затем нагревали с буфером для образцов. Это приводило к элюции антител вместе с белковыми комплексами с сефарозных бусин (рис. 43). Соответствующие элюаты анализировали с помощью ДСН-электрофореза (рис. 44 А, дорожки 1-3).



**Рис. 43.** Схема проведения иммунопреципитации лизатов клеток, предварительно инкубированных с  $H_2O_2$  или DEANO, с антителами к ГАФД.



**1** MDDIAALVV DNGSGMCKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH QGVVMVGMGQK  
**51** DSYVGDEAQS KRGILTLKYP IEHGIVTNWD DMEKIWHHTF YNELRVAPEE  
**101** HPVLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNTP AMYVAIQAVL SLYASGRITG  
**151** IVMDSGDGVT HTVPIYEGYA LPHAILRLDL AGRDLTDYLM KILTERGYSF  
**201** TTTAEREIVR DIKEKLCYVA LDFEQEMATA ASSSLEKSY ELPDGQVITI  
**251** GNERFRCPEA LFQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR KDLYANTVLS  
**301** GGTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW IGGSILASLS  
**351** TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF

**Рис. 44. Анализ белковых комплексов, полученных методом иммунопреципитации с моноклональными антителами против ГАФД, методом ДСН-электрофореза (А) и иммуноблоттинга (Б и В).**

А) Полиакриламидный гель, окрашенный Кумасси: ТЦ и ЛЦ - тяжелые и легкие цепи моноклональных антител; неизвестный белок обозначен знаком вопроса. Б) Нитроцеллюлозная мембрана после окрашивания кроличьими поликлональными антителами к ГАФД; В) Нитроцеллюлозная мембрана после окрашивания мышинными моноклональными антителами к актину. 1-3) Иммуобилизованные анти-ГАФД антитела после инкубации с лизатами клеток, полученных из клеток без обработки (1) или после обработки DEANO (2) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3); 4) контрольная сефароза с протеином G (без антител) после инкубации с лизатом клеток; 5) рекомбинантная ГАФД (маркер).; Д) Аминокислотная последовательность бета-актина и пептиды, обнаруженные в анализируемой полосе белка (выделены жирным красным шрифтом). Места расщепления трипсином подчеркнуты.

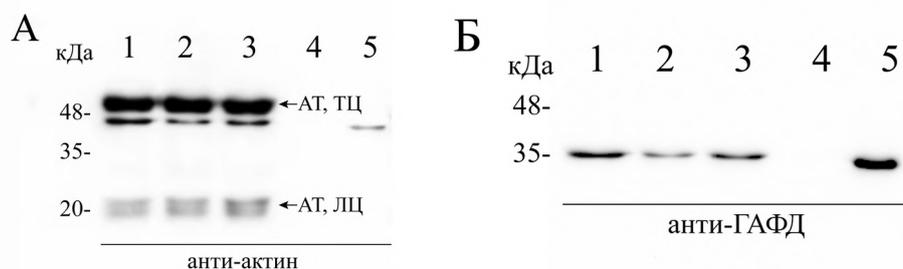
Наиболее интенсивные полосы белка на рис. 44 А соответствуют тяжёлой и лёгкой цепям иммобилизованных антител (дорожки 1-3, ТЦ и ЛЦ, соответственно). Полоса ГАФД плохо видна на рис. 44 А, но её можно обнаружить с помощью иммуноблотинга (дорожки 1-3, рис. 44 Б), что свидетельствует о связывании ГАФД с антителами. Помимо антител и ГАФД, в исследуемых образцах был обнаружен неизвестный белок (обозначен знаком вопроса на рис. 44 А) и белки массой 90-100 кДа.

Соответствующие полосы были вырезаны и исследованы методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Метод показал, что полоса на 45 кДа соответствует человеческому бета-актину с покрытием последовательности 46 % (рис. 44 Д) и оценкой 118. (Оценки белка более 56 баллов являются значимыми ( $p < 0,05$ )). Также методом масс-спектрометрии MALDI-TOF среди вырезанных полос был обнаружен белок теплового шока HSP90-альфа (покрытие последовательности 34% и оценка 189) и HSP90-бета (покрытие последовательности 28% и оценка 167).

Анализ выделенных комплексов методом иммуноблотинга с антителами против актина подтвердил наличие бета-актина (рис. 44 В, дорожки 1-3). В образце с сефарозой без антител ни ГАФД, ни актин не обнаруживались (рис. 44 Б и В, дорожка 4), что указывает на отсутствие неспецифического связывания белков с сефарозой. На рис. 44 В, дорожки 1-3, мышинные моноклональные антитела к ГАФД также окрашивались во время окрашивания актина, поскольку в качестве вторичных антител использовались антимишнинные антитела.

## 7.2. Иммунопреципитация белковых комплексов с антителами к актину

Для подтверждения взаимодействия ГАФД с бета-актином был проведен аналогичный эксперимент по извлечению белковых комплексов из клеточных лизатов с использованием антител к бета-актину. Мышинные моноклональные антитела к бета-актину иммобилизовали на протеин G-сефарозе, а затем инкубировали с лизатами, полученными из клеток НЕК 293Т (интактных, а также обработанных  $H_2O_2$  или дитиотреитолом). Результаты представлены на рис. 45.



**Рис. 45. Анализ белковых комплексов, полученных методом иммунопреципитации с мышиными моноклональными антителами против бета-актина, методом иммуноблоттинга. Окрашивание мышиными антителами на бета-актин (А) и кроличьими антителами на ГАФД (Б).**

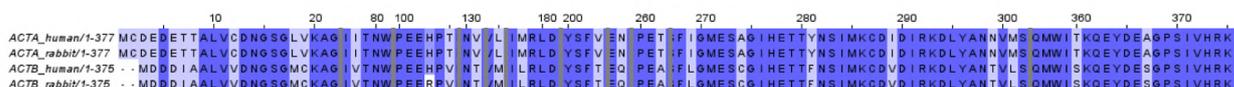
1-3) сефароза с иммобилизованными антителами к бета-актину после инкубации с экстрактом интактных клеток (1) или клеток обработанных 2 mM ДТТ (2) или 0,1 mM  $H_2O_2$  (3); 4) контрольная сефароза (без антител) после инкубации с клеточным экстрактом; 5) раствор ГАФД + G-актин (маркеры).

Как видно из рис. 45 А, во всех пробах с иммобилизованными антителами после инкубации с экстрактами клеток присутствует бета-актин (дорожки 1-3). В пробе с сефарозой без антител бета-актин не обнаруживается (дорожка 4), что говорит об отсутствии неспецифического связывания белков с сефарозой. На рис. 45 Б в пробах, содержащих антитела

со связанным бета-актином, видны полосы ГАФД (дорожки 1-3). Полученные результаты говорят о взаимодействии бета-актина с ГАФД, причём комплекс ГАФД-актин может быть выделен из клеточных лизатов при помощи антител как к ГАФД, так и к бета-актину. Однако, никакой связи образования комплексов с воздействием окислителей/восстановителей выявить не удалось.

### 7.3. Сравнение последовательностей глобулярного (G-) и фибриллярного (F-) актина человека и кролика

В данной работе мы исследовали взаимодействие ГАФД с G- и F-формами человеческого бета-актина и кроличьего альфа-актина. Выравнивание 4 форм представлено ниже (рис. 46). По выравниванию видно, что все 4 последовательности очень схожи. Из них выделяется бета-актин кролика, имеющий аргинин вместо гистидина в 103 позиции. Альфа-формы разных организмов идентичны между собой.

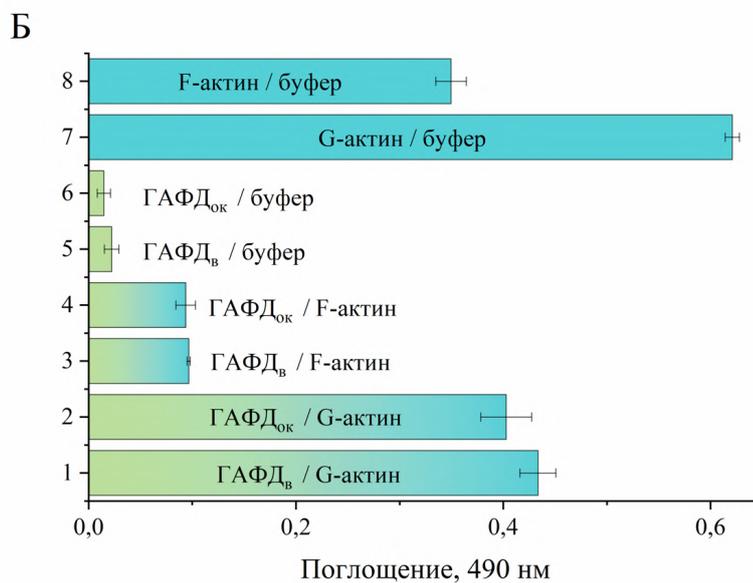
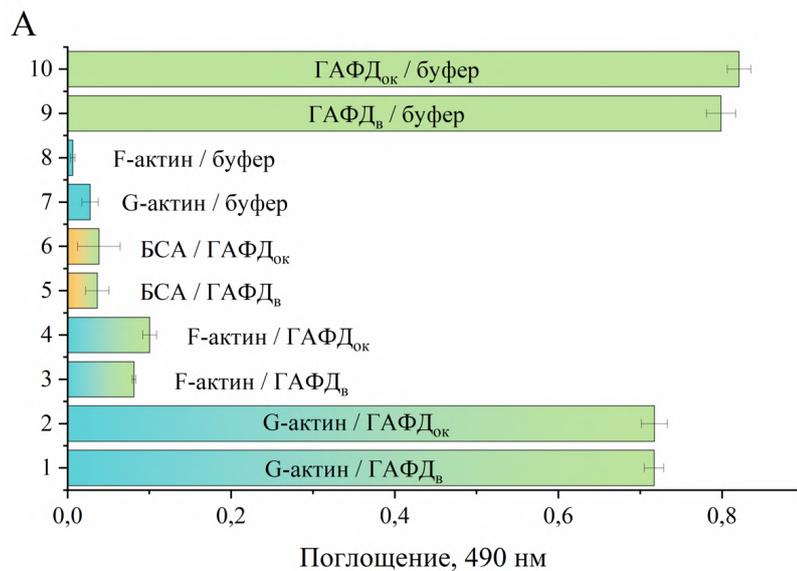


**Рис. 46. Выравнивание альфа-актинов (ACTA) и бета-актинов (ACTB) человека (human) и кролика (rabbit).**

*Синим цветом показаны консервативные участки последовательностей, светло-синим цветом показаны различающиеся аминокислоты. Показано не всё выравнивание, а только различающиеся фрагменты, они отделены серыми линиями. Позиции аминокислот в последовательности указаны сверху. Для выравнивания использовали последовательности белков из UniProt (ACTA\_human: P68133, ACTA\_rabbit: P68135, ACTB\_human: P60709, ACTB\_rabbit: P29751). Строили глобальные выравнивания (т.к. последовательности белков похожи) алгоритмом Clustal с параметрами по умолчанию в программе JalView.*

#### **7.4. Исследование комплекса ГАФД с глобулярным (G-) и фибриллярным (F-) актином из мышц кролика методом иммуноферментного анализа (ИФА)**

Чтобы выяснить, насколько специфичным является взаимодействие между ГАФД и актином, мы исследовали взаимодействие ГАФД с альфа-актином из мышц кролика. Для оценки взаимодействия ГАФД с глобулярной (G) и фибриллярной (F) формами мышечного актина использовали метод ИФА. В ходе эксперимента лунки 96-луночного планшета обрабатывали растворами G-актина (рис. 47 А, столбцы 1 и 2) и F-актина (рис. 47 А, столбцы 3 и 4). После промывания лунок буфером, иммобилизованный актин инкубировали с раствором восстановленной ГАФД (рис. 47 А столбцы 1, 3) или окисленной ГАФД (рис. 47 А, столбцы 2, 4). В качестве отрицательного контроля использовали лунки с иммобилизованным БСА, которые после промывания инкубировали с раствором восстановленной или окисленной ГАФД (рис. 47 А столбцы 5, 6), а также лунки с иммобилизованным G- или F-актином (рис. 47 А столбцы 7, 8). В качестве положительного контроля служили лунки с иммобилизованной ГАФД (рис. 47 А столбцы 9, 10). После промывания планшета лунки окрашивали антителами к ГАФД согласно стандартной процедуре (Материалы и методы, раздел 9.2) и измеряли поглощение в лунках при 490 нм.



**Рис. 47. Исследование взаимодействия альфа-актина с ГАФД методом твердофазного иммуоферментного анализа.**

А) в лунках планшета сначала сорбировали G-или F- актин, после чего иммобилизованный актин инкубировали с раствором ГАФД. После инкубации лунки планшета промывали и окрашивали антителами к ГАФД. Б) в лунках планшета сначала сорбировали ГАФД (восстановленную и окисленную), после чего иммобилизованную ГАФД инкубировали с раствором актина. После инкубации лунки планшета промывали и окрашивали антителами к актину.

В подписях на столбиках указана последовательность обработки планшета растворами белков: белок, иммобилизованный в лунках планшета/белок-партнёр, с раствором которого инкубировали иммобилизованный в лунках белок.

Как видно из рис. 47 А, ГАФД взаимодействует преимущественно с глобулярным актином (столбцы 1 и 2). При этом окисление/восстановление ГАФД не имеет значения для связывания с актином.

В другой постановке опыта в лунки планшета сначала вносили растворы окисленной или восстановленной ГАФД (рис. 47 Б, столбцы 1-6). После иммобилизации ГАФД на планшете, лунки с ГАФД инкубировали с раствором G-актина (столбцы 1, 2) или F-актина (столбцы 3, 4). В качестве отрицательного контроля лунки с ГАФД инкубировали с буфером (рис. 47 Б, столбцы 5, 6). В качестве положительного контроля служили лунки с иммобилизованным F-или G-актином (рис. 47 Б, столбцы 7, 8). После промывания планшета лунки окрашивали антителами к бета-актину и определяли поглощение в лунках при 490 нм. Как видно из рис. 47 Б, в данной постановке ГАФД тоже взаимодействует с G-актином лучше, чем с F-актином независимо от окисления/восстановления.

Таким образом, ГАФД также взаимодействует с мышечным актином, при этом преимущественно с глобулярным актином.

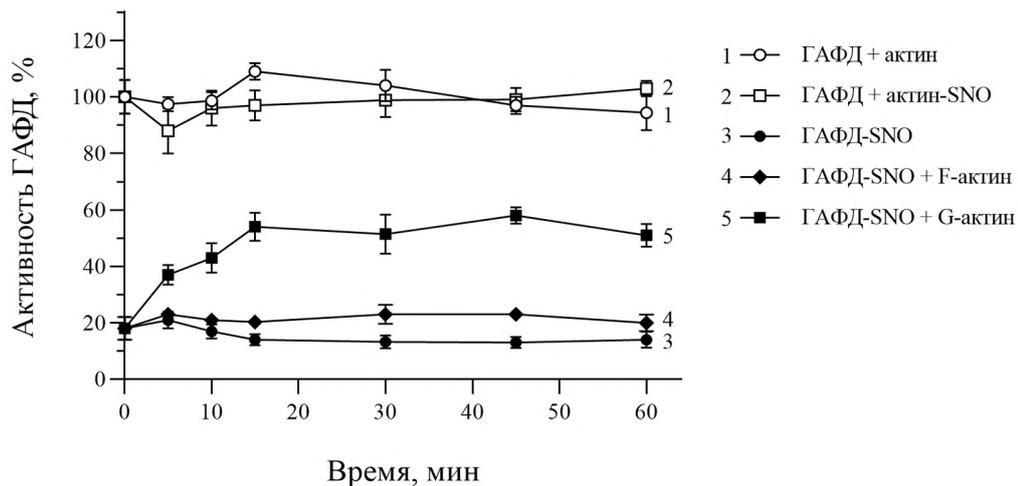
Этими экспериментами мы показали взаимодействие между ГАФД и актином. Дальше мы попытались выяснить, каким образом это взаимодействие отражается на свойствах ГАФД.

#### **7.5. Оценка денитрозилирования ГАФД в присутствии актина по восстановлению дегидрогеназной активности и анализу содержания NO методом Сэвилла-Грисса**

Мы предположили, что образование комплекса между ГАФД и актином может способствовать реакции транснаитрозилирования между белками. Для проверки этого предположения G-актин нитрозилировали в

присутствии донора NO DEANO, что приводило к включению 1,6 моль NO/моль актина (согласно методу Сэвилла-Грисса). S-нитрозилированный актин смешивали с раствором ГАФД в молярном соотношении 3,5:1 и следили за изменением активности ГАФД. В случае S-нитрозилирования ГАФД мы должны были увидеть снижение дегидрогеназной активности в ходе инкубации с нитрозилированным актином, но активность ГАФД не изменилась (рис. 48 А, кривая 2) по сравнению с контролем, в котором ГАФД инкубировали с интактным актином (рис. 48 А, кривая 1). Следовательно, нитрозилированный актин не нитрозилирует ГАФД.

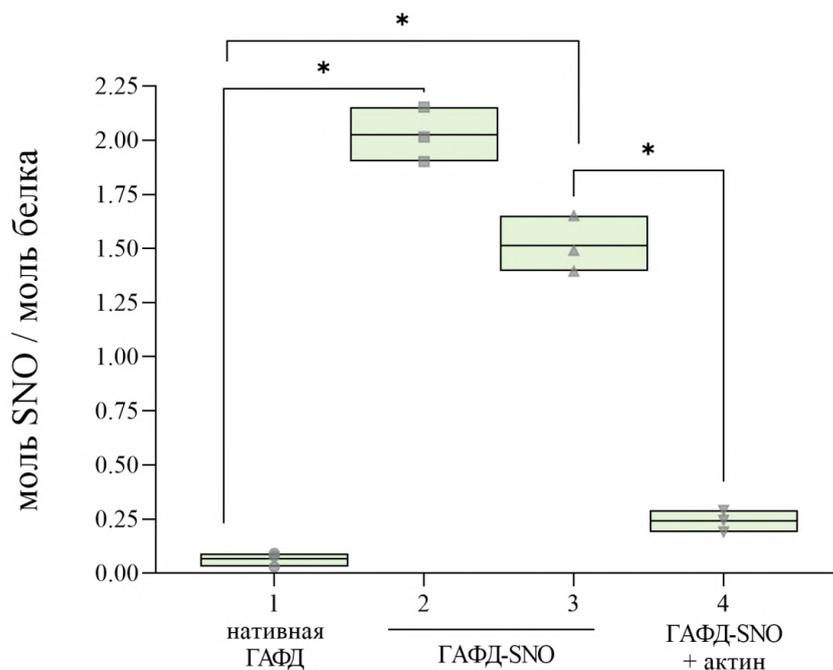
В другом эксперименте мы нитрозилировали ГАФД в присутствии DEANO, что сопровождалось снижением активности фермента до  $18 \pm 6\%$  от исходного значения и включению 1,85 моль NO/моль ГАФД (согласно методу Сэвилла-Грисса). S-нитрозилированную ГАФД (ГАФД-SNO) инкубировали в присутствии G- и F-актина в течение 1 ч. В ходе инкубации из смеси отбирали пробы и измеряли ферментативную активность ГАФД. За время инкубации с G-актином активность ГАФД-SNO увеличилась с 18 до 50% (рис. 48 А, кривая 5) в отличие от контрольной пробы ГАФД-SNO без актина, в которой активность ГАФД снизилась до 12% от исходного значения (рис. 48 А, кривая 3). При инкубации S-нитрозилированной ГАФД с F-актином её активность не изменилась (рис. 48 А, кривая 4). Таким образом, инкубация ГАФД-SNO с G-актином приводит к частичному восстановлению ферментативной активности ГАФД, что может происходить вследствие переноса NO с ГАФД на G-актин.



**Рис. 48 А. Оценка S-нитрозилирования/денитрозилирования ГАФД путём её инактивации/реактивации.**

Нативную ГАФД инкубировали с S-нитрозилированным G-актином (кривая 1) или с нативным G-актином (кривая 2). S-нитрозилированную ГАФД инкубировали в присутствии нативного G- и F-актина (кривые 5 и 4) или без добавок (кривая 3). Белки брали в соотношении 1 мг ГАФД на 1 мг альфа-актина (молярное соотношение ГАФД/актин составляло 1:3,5). Удельная активность нативной ГАФД принималась за 100%.

Данные представлены как среднее 3 экспериментов  $\pm$  SD.



**Рис. 48 Б. Определение содержания SNO в ГАФД методом Сэвилла-Грисса.**

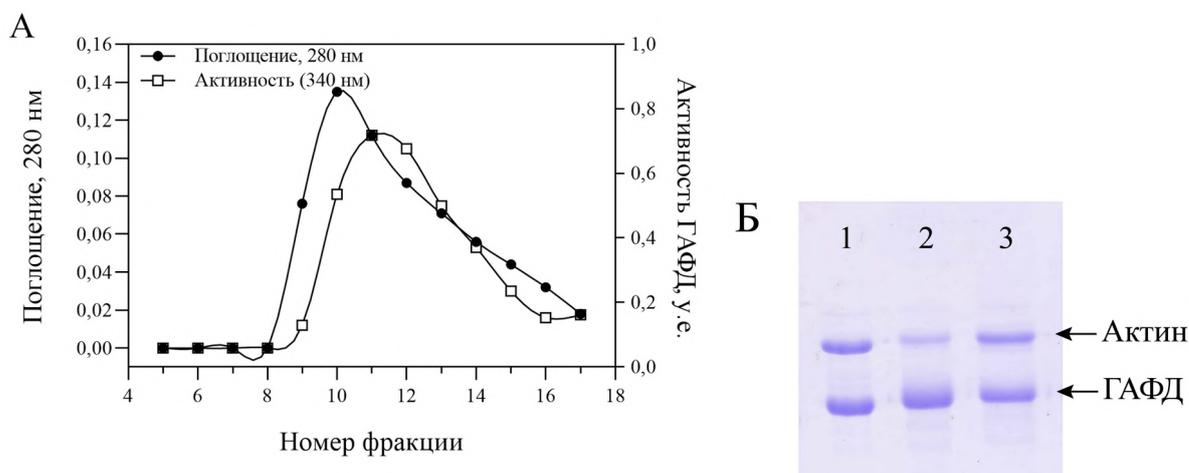
1) нативная ГАФД; 2 и 3) S-нитрозилированная ГАФД в начале эксперимента и после 1-часовой инкубации в отсутствие актина; 4) S-нитрозилированная ГАФД после 1-часовой инкубации с актином. Данные представлены в виде диаграммы с указанием точками конкретных экспериментальных значений.

\* - статистически значимое отличие с  $p < 0,001$  (однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными множественными сравнениями с помощью критериев Бонферрони)

Чтобы подтвердить денитрозилирование ГАФД после инкубации S-нитрозилированной ГАФД с актином смесь белков разделяли методом гель-хроматографии на сефадексе G-100. Смесь ГАФД-SNO и актина (1 мл) наносили на колонку с сефадексом G-100 (1 x 25 см) и элюировали буфером (10 мМ фосфат калия, рН 7,0), собирая фракции по 0,5 мл (рис. 49 А). Объединённая фракция, соответствующая пикам поглощения и активности ГАФД (фракции 9-13 на рис. 49 А), содержала в основном ГАФД и небольшую примесь актина (дорожка 2 на рис. 49 Б). Содержание S-

нитрозотиолов в этой фракции составило 0,22 моль SNO/моль ГАФД, что соответствует 7-кратному снижению по сравнению с образцом ГАФД-SNO, инкубированной без актина (рис. 48 Б, столбцы 4 и 3, соответственно).

Объединённая фракция, соответствующая нисходящей части белкового пика (фракции 14-17 на рис. 49 А), содержала смесь G-актина и ГАФД (рис. 49 Б, дорожка 3). Таким образом, гель-хроматография не позволила отделить актин от ГАФД, что можно объяснить взаимодействием ГАФД и актина. По этой причине мы не смогли определить содержание SNO в актине после инкубации с ГАФД-SNO.



**Рис. 49. Разделение смеси S-нитрозилированной ГАФД и актина методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-100.**

А) Элюция белков с колонки, которую регистрировали по абсорбции при 280 нм (кривая 1) и по активности ГАФД (кривая 2).

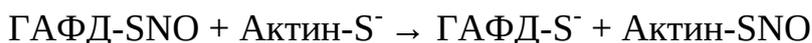
Б) ДСН-электрофорез фракций после разделения гель-хроматографией: 1) смесь S-нитрозилированной ГАФД с актином до разделения на колонке; 2) объединённая фракция, соответствующая пикам белка и активности ГАФД (фракции 9-13 на рис. 49 А); 3) объединённая фракция с низкой активностью ГАФД, соответствующая фракциям 14-17 на рис. 49 А.

Поскольку инкубация ГАФД-SNO с актином приводит к 7-кратному снижению содержания SNO-групп в молекуле ГАФД (с 1,5 до 0,22 моль/моль, рис. 48 Б), что сопровождается заметным (на 40%) восстановлением ферментативной активности ГАФД (рис. 48 А, кривая 5),

мы можем предположить, что в присутствии актина наблюдается перенос NO<sup>+</sup>-группы с Cys152 ГАФД на цистеиновые остатки актина (транснаитрозилирование).

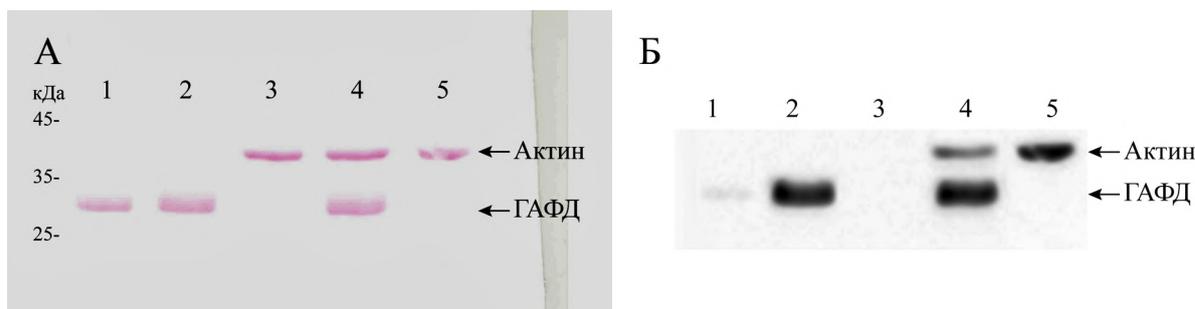
### **7.6. Проверка гипотезы о переносе NO-группы с ГАФД-SNO на актин методом иммуноблоттинга**

Ранее мы показали, что одним из продуктов S-нитрозилирования ГАФД *in vitro* является цистеинсульфеновая кислота (Cys-SOH). Обработка клеток донором NO приводит к появлению цистеинсульфеновой кислоты в ряде белков, среди которых была обнаружена ГАФД, а также бета-актин. На основании этих исследований было сделано предположение, что образовавшийся в результате S-нитрозилирования нитрозоцистеин (Cys-SNO) может подвергаться гидролизу с образованием цистеинсульфеновой кислоты (Cys-SOH), которая определяется в клеточных белках после обработки клеток донорами NO. В таком случае, транснаитрозилирование актина в присутствии ГАФД-SNO также может приводить к окислению цистеинов актина с образованием цистеинсульфеновой кислоты:



Цистеинсульфеновая кислота может быть легко обнаружена в белках с помощью реагента на сульфеновую кислоту DCP-Bio1, конъюгированного с биотином. После обработки исследуемых образцов DCP-Bio1 сульфенированные белки можно обнаружить методом иммуноблоттинга с антителами к биотину. Для подтверждения транснаитрозилирования актина в присутствии ГАФД-SNO мы проанализировали образцы актина,

инкубированные с ГАФД-SNO и без неё, на наличие цистеинсульфеновой кислоты.



**Рис. 50. Определение Cys-SOH в препаратах ГАФД и актина при помощи DCP-Bio1.**

Образцы белка инкубировали с реагентом на сульфеновую кислоту (DCP-Bio1), а затем анализировали методом иммуноблотинга с антителами к биотину. Нитроцеллюлозную мембрану окрашивали Рорсеаи S (А), а затем антителами к биотину (Б). 1) ГАФД без обработки, 2) S-нитрозилированная ГАФД; 3) G-актин после 1-часовой инкубации без добавок; 4) смесь G-актина и S-нитрозилированной ГАФД после 1-часовой инкубации; 5) S-нитрозилированный G-актин (после инкубации с DEANO).

Как видно на рис. 50 Б, следы цистеинсульфеновой кислоты обнаруживаются в исходном препарате ГАФД (дорожка 1), поскольку каталитические цистеины ГАФД легко окисляются в отсутствие восстановителей. В препарате G-актина сульфеновая кислота не обнаруживалась после 1 ч инкубации без добавок (дорожка 3). Обработка ГАФД DEANO приводит к включению около 2 моль NO/моль ГАФД (рис. 48 Б, столбец 2) и увеличивает содержание сульфеновой кислоты (рис. 50 Б, дорожка 2), что согласуется с ранее описанными результатами. Обработка G-актина DEANO приводит к встраиванию NO в молекулу актина (1,6 моль/моль актина, по методу Сэвилла-Грисса) и появлению цистеинсульфеновой кислоты (рис. 50 Б, дорожка 5). Эти данные согласуются с предположением, что цистеинсульфеновая кислота в актине является продуктом гидролиза S-нитрозоцистеина. Инкубация интактного G-актина в присутствии S-нитрозилированной ГАФД также приводит к

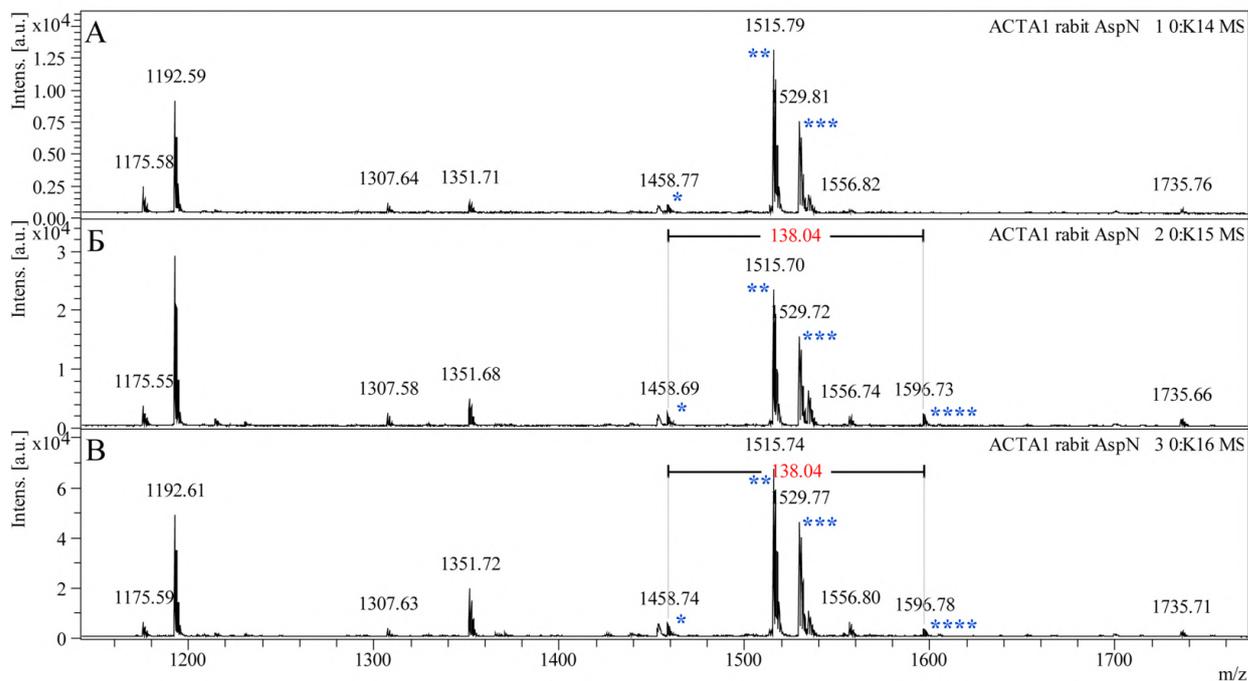
появлению сульфеновой кислоты в молекуле актина (рис. 50 Б, дорожка 4), что согласуется с нашим предположением о переносе NO-группы с ГАФД-SNO на G-актин (транснаитрозилирование) с последующим гидролизом Cys-SNO в молекуле актина.

### **7.7. Идентификация сульфенированного остатка цистеина в актине после инкубации с ГАФД-SNO**

Для идентификации сульфенированных остатков цистеина в S-нитрозилированном актине мы использовали масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF. Для этого образец актина, смешанный с ГАФД-SNO, инкубировали с димедоном для мечения цистеинсульфеновой кислоты, а затем с йодоацетамидом для модификации свободных остатков цистеина (Материалы и методы, раздел 9.5). Затем белки разделяли на ДСН-электрофореze и вырезали из геля полосу актина. Образец актина, S-нитрозилированного в присутствии DEANO, обрабатывали таким же образом. Образцы геля инкубировали с трипсином или протеиназой AspN, а полученные гидролизаты белков исследовали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Расщепление актина, инкубированного с ГАФД-SNO, протеиназой AspN выявило C-концевой пептид 363-375 с включением димедона. На рисунке 51 представлены пики, соответствующие различным модификациям C-концевого пептида, которые перечислены в таблице 6. Пик с  $m/z$  1458 (отмечен звездочкой на рис. 51 А-В) соответствует немодифицированному C-концевому пептиду 363-375. Пик с  $m/z$  1515,7 соответствует C-концевому пептиду, модифицированному йодоацетамидом. Пик с  $m/z$  1529 соответствует модификации пептида пропионамидом (продукт взаимодействия остатков цистеина с акриламидным гелем). Пик с  $m/z$  1596,7 на рис. 51 Б и В соответствует включению димедона в пептид 363-375.

Следовательно, мы обнаружили включение димедона в С-концевой пептид актина после инкубации с DEANO или с S-нитрозилированной ГАФД, что указывает на сульфенирование Cys374 после инкубации как с DEANO, так и с ГАФД-SNO.



**Рис. 51. Модификации С-концевого пептида в альфа-актине (см. также таблицу 6).**

А) актин модифицировали йодоацетамидом; Б) актин S-нитрозилировали в присутствии DEANO, а затем инкубировали с димедоном и йодоацетамидом; В) актин инкубировали с ГАФД-SNO, а затем инкубировали с димедоном и йодоацетамидом. Все образцы были подвергнуты ДСН-электрофорезу. Соответствующие полосы актина инкубировали с протеиназой AspN и анализировали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

**Таблица 6.**

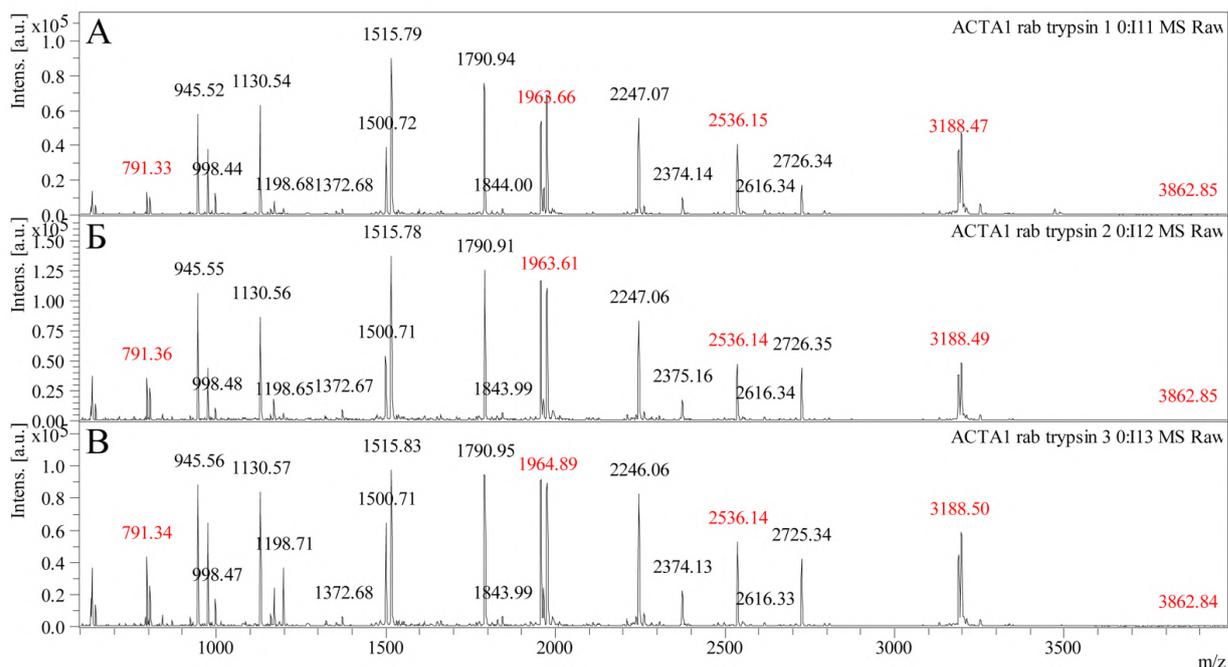
Модификации С-концевого пептида, наблюдаемые в образцах альфа-актина после расщепления протеиназой AspN.

Пик	Пептид 363-375	m/z	Модификация
*	DEAGPSIVHRKCF	1458	Без модификаций
**	DEAGPSIVHRKCF	1515	Йодацетамид (Cys374) (+57)
***	DEAGPSIVHRKCF	1529	Пропионамид (Cys374) (+71)
****	DEAGPSIVHRKCF	1596	Димедон (Cys374) (+138)

**1** DEDETTALVC DNGSGLVKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH QGVVMVGMGQK  
**51** DSYVGDEAQS KRGILTLYKYP IEHGIITNWD DMEKIWHHTF YNELRVAPEE  
**101** HPTLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNVP AMYVAIQAVL SLYASGRITG  
**151** IVLDSGDGVT HNVPIYEGYA LPHAIMRLDL AGRDLTDYLM KILTERGYSF  
**201** VTTAEREIVR DIKEKLCYVA LDFENEMATA ASSSLEKSY ELPDGQVITI  
**251** GNERFRCPET LFQPSFIGME SAGIHETTYN SIMKCDIDIR KDLYANNVMS  
**301** GGTTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW IGGILASLS  
**351** TFQQMWITKQ EYDEAGPSIV HRKCF

**Рис. 52. Последовательность актина.** Красным цветом выделены детектированные пептиды после расщепления пробы протеиназой AspN актина после инкубации с ГАФД-SNO. Детектированные пептиды, содержащие цистеин, подчеркнуты.

С помощью протеиназы AspN мы смогли обнаружить все цистеины в последовательности, кроме 257 и 285 (рис. 52). Среди обнаруженных пептидов модификация с димедоном была детектирована только в Cys374. Чтобы убедиться, что Cys257 и Cys285 не модифицируются, образцы белка из геля расщепили трипсином и повторили масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF (рис. 53). Исследование S-нитрозилированного актина после расщепления трипсином не выявило пептидов с включением димедона, но С-концевой пептид с остатком Cys374 был потерян, так как трипсин отщепляет три С-концевые аминокислоты.



**Рис. 53. Масс-спектр альфа-актина, после трипсинолиза (см. также таблицу 7).**

А) актин модифицировали йодоацетамидом; Б) актин *S*-нитрозилировали в присутствии DEANO, а затем инкубировали с димедоном и йодоацетамидом; В) актин инкубировали с ГАФД-SNO, а затем инкубировали с димедоном и йодоацетамидом. Все образцы были подвергнуты ДСН-электрофорезу. Соответствующие полосы актина инкубировали с трипсином и анализировали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Красным выделены пики пептидов, содержащих цистеины.

**Таблица 7.**

Детектированные пептиды альфа-актина после трипсинолиза, содержащие цистеины.

Положение пика	m/z	Последовательность пептида
1-18	1964	DEDETTALVCDNGSGLVK
1-37	3862	DEDETTALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFPSIVGR
216-238	2536	LCYVALDFENEMATAASSSLEK
257-284	3188	CPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMK
285-290	791	CDIDIR

1 **DEDETTALVC DNGSGLVKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH QGVMVGMGQK**  
 51 **DSYVGDEAQS KRGILTLKYP IEHGIITNWD DMEKIWHHTF YNELRVAPEE**  
 101 **HPTLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNVP AMYVAIQAVL SLYASGRTTG**  
 151 **IVLDSGDGVT HNVPIYEGYA LPHAIMRLDL AGRDLTDYLM KILTERGYSF**  
 201 **VTTAEREIVR DIKEKLCYVA LDFENEMATA ASSSSLEKSY ELPDGGQVITI**  
 251 **GNERFRCPET LFQPSFIGME SAGIHETTYN SIMK CDIDIR KDLYANNVMS**  
 301 **GGTTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW IGGASILASLS**  
 351 **TFQQMWITKQ EYDEAGPSIV HRKCF**

**Рис. 54. Последовательность актина.** Красным цветом выделены детектированные пептиды после трипсинолиза пробы актина после инкубации с ГАФД-SNO. Детектированные пептиды, содержащие цистеин, подчеркнуты.

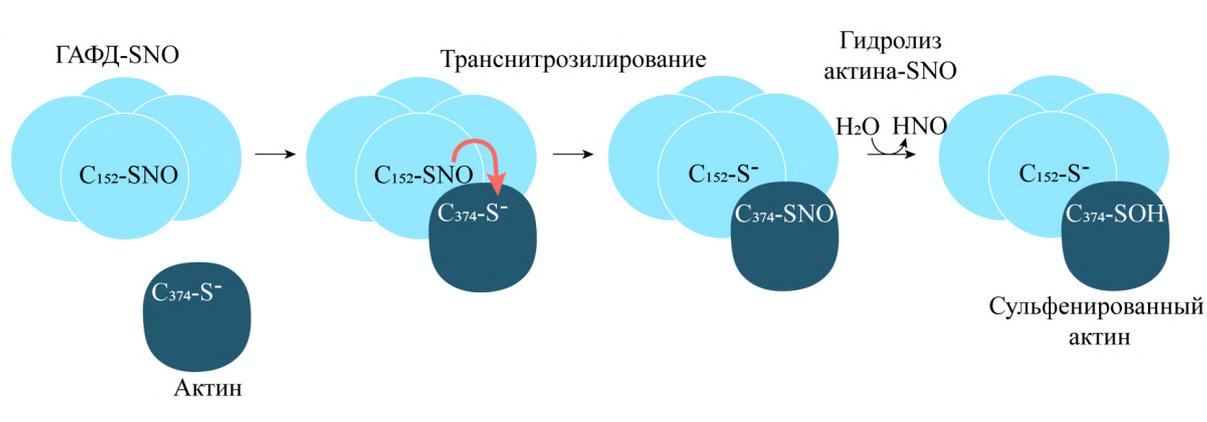
С помощью трипсинолиза мы смогли обнаружить все цистеины в последовательности, кроме Cys374. Среди детектированных пептидов модификации с димедоном нет (рис. 53 и 54). Таким образом, транснаитрозилированию подвергается только Cys374 в альфа-актине.

## 7.8. Возможная роль взаимодействия ГАФД и актина

Мы выделили комплекс ГАФД с бета-актином из клеток НЕК 293Т с помощью метода иммунопреципитации. Образование комплекса не зависело от присутствия  $H_2O_2$  или донора NO. Этот результат стимулировал дальнейшие исследования на очищенных препаратах рекомбинантной человеческой ГАФД и мышечного альфа-актина. Иммуноферментный анализ показал, что ГАФД взаимодействует с глобулярным актином гораздо лучше, чем с фибриллярным. S-нитрозилированная ГАФД (ГАФД-SNO) частично реактивировалась в присутствии G-актина. Наблюдаемая реактивация сопровождалась снижением содержания SNO в ГАФД. Полученные результаты позволяют предположить, что реактивация может быть обусловлена переносом NO-группы с ГАФД-SNO на актин. F-актин не реактивировал ГАФД-SNO, что говорит о том, что для реакции транснаитрозилирования необходимо образование комплекса. Инкубация G-

актина с DEANO или с S-нитрозилированной ГАФД приводила к появлению цистеинсульфеновой кислоты в молекуле актина, которая была идентифицирована как Cys374. Учитывая, что цистеинсульфеновая кислота является продуктом гидролиза S-нитрозотиолов, этот результат позволяет предположить, что Cys374 в актине подвергается S-нитрозилированию во время инкубации с донором NO или с ГАФД-SNO. Это согласуется с данными других исследований, согласно которым Cys374 подвергается S-нитрозилированию в присутствии доноров NO *in vitro* [158] и в клеточных культурах [162]. Перенос NO-группы с ГАФД-SNO на C-концевой Cys374 актина предполагает, что при взаимодействии с ГАФД C-концевой участок актина оказывается в активном центре ГАФД вблизи каталитического Cys152. Следовательно, C-концевая часть молекулы актина непосредственно участвует в образовании комплекса с ГАФД. Предпочтительное взаимодействие ГАФД с G-актином, вероятно, связано с тем, что в F-актине C-концевой участок вовлечен во внутрисубъединичные контакты [199]. Интересно, что актин-связывающие белки гельсолин и профилин взаимодействуют с C-концом актина, что приводит к конформационным перестройкам в молекуле актина и влияет на нуклеотидный обмен [199].

Таким образом, мы предлагаем следующую схему транснаитрозилирования с ГАФД-SNO на актин (рис. 55).



**Рис. 55. Перенос -SNO группы с ГАФД-SNO на актин.**

Значение взаимодействия между G-актином и ГАФД остаётся неясным. Можно предположить, что взаимодействие между ГАФД и G-актином может контролировать S-нитрозилирование актина. Известно, что S-нитрозилирование актина по остатку Cys374 снижает скорость формирования актиновых филаментов [158], как и другие модификации этого остатка — окисление [160] и глутатионилирование [185]. Следовательно, модификация актина за счёт различных окислительно-восстановительных посттрансляционных модификаций Cys374 модулирует динамику актина [193-198]. Возможно, способность ГАФД нитрозилировать актин способствует окислительно-восстановительной регуляции сигнальных путей, контролируемых актином. Кроме того, взаимодействие с ГАФД может влиять на взаимодействие актина с актин-связывающими белками.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа играет важную роль в клеточных процессах и механизмах клеточной смерти с участием оксида азота (NO). Согласно одной гипотезе NO может индуцировать S-нитрозилирование ГАФД, что приводит к её ядерной транслокации и апоптозу [128,200]. Согласно другому предположению окисление и нитрозилирование вызывает агрегацию ГАФД и также приводит к гибели клетки [201]. Цистеин активного центра Cys152 ГАФД играет существенную роль в этих гипотезах. Например, известно, что присутствие мутанта ГАФД с заменой C152A в клеточной линии нейробластомы может спасти клетки от NO-индуцированной гибели, препятствуя агрегации ГАФД дикого типа [38]. Однако, неясны молекулярные механизмы существующих гипотез, и многие аспекты влияния NO на ГАФД остаются недостаточно исследованными прежде всего из-за нестабильности главного продукта их модификации ГАФД-SNO.

Целью данной работы было выяснение механизма S-нитрозилирования ГАФД и последствий окислительного и нитрозативного стресса на взаимодействие ГАФД с другими белками.

На первом этапе мы прямыми методами идентифицировали основные продукты модификации ГАФД NO: ГАФД-SNO и ГАФД-SOH, которая образуется в результате гидролиза ГАФД-SNO. Мы также детектировали количественное соотношение продуктов S-нитрозилирования ГАФД разными методами.

На следующем этапе мы исследовали две обратимые модификации каталитического цистеинового остатка ГАФД: S-нитрозилирование и S-глутатионилирование. Известно, S-глутатионилированная ГАФД накапливается во время окислительного стресса при нейродегенеративных заболеваниях [102,202]. Мы сравнивали стабильность S-нитрозилированной

и S-глутатионилированной форм ГАФД, а также обратимость этих модификаций в присутствии естественных восстановителей.

Известно, что образование цистеинсульфеновой кислоты способствует S-глутатионированию ГАФД [180]. Мы предположили, что NO может стимулировать S-глутатионирование ГАФД через образование Cys-SOH на каталитическом Cys152, подобно тому, как это наблюдается в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [46]. Мы подтвердили этот механизм, детектировав S-сульфенированную и S-глутатионированную ГАФД в лизатах клеток линии НЕК 293Т после обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и донором NO (DEANO).

Наконец, методом иммунопреципитации мы исследовали белковые комплексы ГАФД, полученные из лизатов клеток, и обнаружили взаимодействие ГАФД с актином. Этот результат стал причиной появления серии экспериментов по исследованию взаимодействия ГАФД и актина. Иммуноферментный анализ показал, что ГАФД взаимодействует с глобулярным актином гораздо лучше, чем с фибриллярным. S-нитрозилированная ГАФД (ГАФД-SNO) частично реактивировалась в присутствии G-актина, что позволило предположить перенос NO-группы с ГАФД-SNO на актин. Инкубация G-актина с DEANO или с S-нитрозилированной ГАФД приводила к появлению цистеинсульфеновой кислоты в Cys374 актина. Значение взаимодействия между G-актином и ГАФД остаётся неясным.

Всё больше появляется исследований о роли нитрозилирования ГАФД в различных заболеваниях. При болезни Альцгеймера нитрозилированная ГАФД способствует патологическому ацетилированию тау, способствуя нейродегенерации [94]. Аналогично, при рассеянном склерозе нитрозилирование ГАФД связано с повреждением аксонов [203]. Важно отметить, что блокирование нитрозилирования ГАФД обладает терапевтическим потенциалом. Препарат CGP3466B (омигапил) предотвращает амилоид-индуцированное ацетилирование тау и ухудшение

памяти в моделях болезни Альцгеймера [94] и уменьшает аксональное повреждение на мышиной модели с аутоиммунным энцефаломиелитом [203]. Кроме того, депренил и омегапил продемонстрировали нейропротекторный эффект, предотвращая нитрозилирование ГАФД и последующую ядерную транслокацию в моделях болезни Паркинсона [128]. Эти данные свидетельствуют о том, что препятствие нитрозилированию ГАФД может стать перспективным терапевтическим подходом для лечения нейродегенеративных заболеваний [204].

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Впервые прямыми методами идентифицированы основные продукты модификации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) оксидом азота (NO): S-нитрозилированная форма (ГАФД-SNO) и S-сульфенированная форма (ГАФД-SOH), образующаяся в результате гидролиза ГАФД-SNO.

2. Показано, что инкубация с донором оксида азота приводит к инактивации фермента вследствие модификации каталитического цистеинового остатка (Cys152).

3. Обнаружено, что после инактивации ГАФД донором оксида азота (DEANO) содержание ГАФД-SNO и ГАФД-SOH составляет 2,3 и 0,7 моль на моль тетрамера ГАФД, соответственно. Незначительная часть продуктов модификации представлена необратимо окисленными формами белка (предположительно ГАФД-SO<sub>2</sub>H и ГАФД-SO<sub>3</sub>H).

4. Сравнение S-нитрозилированной и S-глутатионилированной форм ГАФД показало, что обе модификации не только инактивируют фермент, но и уменьшают его термостабильность и повышают чувствительность к расщеплению трипсином, что свидетельствует о снижении компактности белковой глобулы.

5. Доказано, что S-глутатионилированная ГАФД медленно деглутатионируется по сравнению с S-нитрозилированной ГАФД, которая быстро денитрозилируется и, следовательно, S-глутатионилированная ГАФД может накапливаться в клетках.

6. Показано, что инкубация клеток НЕК 293Т в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или DEANO приводит к накоплению S-сульфенированных ГАФД и бета-актина с последующим их взаимодействием с клеточным GSH с образованием соответствующих S-глутатионилированных белков.

7. Обнаружено образование комплекса ГАФД с бета-актином как в лизатах клеток НЕК 293Т, так и при изучении изолированных белков. При этом ГАФД связывается преимущественно с мономерной формой - G-актином, а окисление ГАФД не влияет на это связывание.

8. Образование комплекса между G-актином и S-нитрозилированной ГАФД приводит к денитрозилированию ГАФД и сульфенированию актина по С-концевому остатку Cys374, что указывает на протекание реакции транснаитрозилирования между двумя белками.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своим научным руководителям, Владимиру Израилевичу Муронцу и Елене Викторовне Шмальгаузен за направление исследования, ценные советы и внимательное отношение.

Автор выражает благодарность С.Ю. Клейменову, М.В. Серебряковой, В.В. Чаговцу и А.М. Матюшенко за незаменимую помощь в методологических аспектах работы и в обработке полученных данных.

Автор также выражает признательность коллективу отдела биохимии животной клетки, в особенности Д.В. Поздышеву, С.С. Кудрявцевой, К.В. Бариновой и Л.П. Курочкиной за помощь в выполнении данной работы и создание комфортной атмосферы в лаборатории.

Автор выражает благодарность своей семье за поддержку стремления заниматься наукой и интерес к результатам исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L. and Snyder, S.H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*, **120**, 227–37.  
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-120-3-199402010-00009>
- [2] Gibaldi, M. (1993) What is nitric oxide and why are so many people studying it? *Journal of Clinical Pharmacology*, **33**, 488–96.  
<https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1993.tb04694.x>
- [3] Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., Posencheg, M.A. and Ischiropoulos, H. (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, **287**, L262-268.  
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00295.2003>
- [4] Prütz, W.A., Mönig, H., Butler, J. and Land, E.J. (1985) Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **243**, 125–34.  
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90780-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90780-5)
- [5] Nuriel, T., Hansler, A. and Gross, S.S. (2011) Protein nitrotryptophan: formation, significance and identification. *Journal of Proteomics*, **74**, 2300–12. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.032>
- [6] Zaffagnini, M., Fermani, S., Costa, A., Lemaire, S.D. and Trost, P. (2013) Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 450.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00450>
- [7] Tossounian, M.-A., Zhang, B. and Gout, I. (2020) The Writers, Readers, and Erasers in Redox Regulation of GAPDH. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, **9**, 1288. <https://doi.org/10.3390/antiox9121288>
- [8] Chuang, D.-M., Hough, C. and Senatorov, V.V. (2005) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**, 269–90.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095902>
- [9] Hara, M.R., Cascio, M.B. and Sawa, A. (2006) GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1762**, 502–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.01.012>

- [10] Czerniczyniec, A., Bustamante, J. and Lores-Arnaiz, S. (2006) Modulation of brain mitochondrial function by deprenyl. *Neurochemistry International*, **48**, 235–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.09.006>
- [11] Maruyama, W., Takahashi, T. and Naoi, M. (1998) (-)-Deprenyl protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells from apoptosis induced by peroxynitrite and nitric oxide. *Journal of Neurochemistry*, **70**, 2510–5. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70062510.x>
- [12] Xie, T., Qiao, X., Sun, C., Chu, B., Meng, J. and Chen, C. (2022) GAPDH S-nitrosation contributes to age-related sarcopenia through mediating apoptosis. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **120**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2021.12.006>
- [13] Hall, D.T., Ma, J.F., Marco, S.D. and Gallouzi, I.-E. (2011) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle wasting syndrome, sarcopenia, and cachexia. *Aging*, **3**, 702–15. <https://doi.org/10.18632/aging.100358>
- [14] Cori, G.T., Slein, M.W. and Cori, C.F. (1948) Crystalline d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, **173**, 605–18.
- [15] Berry, M.D. and Boulton, A.A. (2000) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis. *Journal of Neuroscience Research*, **60**, 150–4. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(20000415\)60:2<150::AID-JNR3>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(20000415)60:2<150::AID-JNR3>3.0.CO;2-4)
- [16] You K-S, null, Benitez, L.V., McConachie, W.A. and Allison, W.S. (1975) The conversion of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to an acylphosphatase by trinitroglycerin and inactivation of this activity by azide and ascorbate. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **384**, 317–30. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90033-9](https://doi.org/10.1016/0005-2744(75)90033-9)
- [17] Dimmeler, S., Lottspeich, F. and Brüne, B. (1992) Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 16771–4.
- [18] Padgett, C.M. and Whorton, A.R. (1997) Glutathione redox cycle regulates nitric oxide-mediated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibition. *The American Journal of Physiology*, **272**, C99-108. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.1.C99>
- [19] Broniowska, K.A. and Hogg, N. (2010) Differential mechanisms of inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosothiols and NO in cellular and cell-free conditions. *American Journal of Physiology Heart and*

*Circulatory Physiology*, **299**, H1212-1219.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00472.2010>

- [20] Mohr, S., Stamler, J.S. and Brüne, B. (1996) Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 4209–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.8.4209>
- [21] Dimmeler, S. and Brüne, B. (1992) Characterization of a nitric-oxide-catalysed ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, **210**, 305–10. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17422.x>
- [22] Dimmeler, S., Ankarcona, M., Nicotera, P. and Brüne, B. (1993) Exogenous nitric oxide (NO) generation or IL-1 beta-induced intracellular NO production stimulates inhibitory auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in RINm5F cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, **150**, 2964–71.
- [23] McDonald, L.J. and Moss, J. (1993) Stimulation by nitric oxide of an NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 6238–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6238>
- [24] Padgett, C.M. and Whorton, A.R. (1995) S-nitrosoglutathione reversibly inhibits GAPDH by S-nitrosylation. *The American Journal of Physiology*, **269**, C739-749. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.3.C739>
- [25] Zaffagnini, M., Morisse, S., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Festa, M., Rouhier, N. et al. (2013) Mechanisms of nitrosylation and denitrosylation of cytoplasmic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 22777–89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.475467>
- [26] Sirover, M.A. (1997) Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *Journal of Cellular Biochemistry*, **66**, 133–40.
- [27] Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y. et al. (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology*, **7**, 665–74. <https://doi.org/10.1038/ncb1268>
- [28] Mustafa Rizvi, S.H., Shao, D., Tsukahara, Y., Pimentel, D.R., Weisbrod, R.M., Hamburg, N.M. et al. (2021) Oxidized GAPDH transfers S-glutathionylation to a nuclear protein Sirtuin-1 leading to apoptosis. *Free*

*Radical Biology & Medicine*, **174**, 73–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.07.037>

- [29] Seidler, N.W. (2013) Basic biology of GAPDH. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **985**, 1–36. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4716-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4716-6_1)
- [30] Graven, K.K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J.S. and Farber, H.W. (1999) Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1447**, 208–18. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(99\)00118-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(99)00118-9)
- [31] Alexander, M.C., Lomanto, M., Nasrin, N. and Ramaika, C. (1988) Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 5092–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5092>
- [32] Claeysens, S., Gangneux, C., Brasse-Lagnel, C., Ruminy, P., Aki, T., Lavoinne, A. et al. (2003) Amino acid control of the human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene transcription in hepatocyte. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, **285**, G840-849. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00060.2003>
- [33] Piechaczyk, M., Blanchard, J.M., Marty, L., Dani, C., Panabieres, F., El Sabouty, S. et al. (1984) Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Research*, **12**, 6951–63. <https://doi.org/10.1093/nar/12.18.6951>
- [34] Lazarev, V.F., Guzhova, I.V. and Margulis, B.A. (2020) Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase is a Multifaceted Therapeutic Target. *Pharmaceutics*, **12**, 416. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050416>
- [35] Walker, J.E., Wonacott, A.J. and Harris, J.I. (1980) Heat stability of a tetrameric enzyme, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, **108**, 581–6. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04753.x>
- [36] J. Ieuan Harris and Michael Waters. (1976) Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *The Enzymes*, **13**, 1–49.
- [37] Nakajima, H., Amano, W., Fujita, A., Fukuhara, A., Azuma, Y.-T., Hata, F. et al. (2007) The active site cysteine of the proapoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is essential in oxidative stress-induced aggregation and cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 26562–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704199200>

- [38] Nakajima, H., Itakura, M., Kubo, T., Kaneshige, A., Harada, N., Izawa, T. et al. (2017) Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry*, **292**, 4727–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.759084>
- [39] Nakajima, H., Amano, W., Kubo, T., Fukuhara, A., Ihara, H., Azuma, Y.-T. et al. (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 34331–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.027698>
- [40] Branlant, G. and Branlant, C. (1985) Nucleotide sequence of the Escherichia coli gap gene. Different evolutionary behavior of the NAD<sup>+</sup>-binding domain and of the catalytic domain of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, **150**, 61–6. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08988.x>
- [41] Jenkins, J.L. and Tanner, J.J. (2006) High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, **62**, 290–301. <https://doi.org/10.1107/S0907444905042289>
- [42] Sabri, M.I. and Ochs, S. (1971) Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in mammalian nerve by iodoacetic acid. *Journal of Neurochemistry*, **18**, 1509–14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb00013.x>
- [43] Williamson, J.R. (1967) Glycolytic control mechanisms. 3. Effects of iodoacetamide and fluoroacetate on glucose metabolism in the perfused rat heart. *The Journal of Biological Chemistry*, **242**, 4476–85.
- [44] Polgár, L. (1975) Ion-pair formation as a source of enhanced reactivity of the essential thiol group of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, **51**, 63–71. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb03907.x>
- [45] Gerszon, J. and Rodacka, A. (2018) Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegenerative processes and the role of low molecular weight compounds in counteracting its aggregation and nuclear translocation. *Ageing Research Reviews*, **48**, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.09.003>
- [46] Barinova, K.V., Serebryakova, M.V., Muronetz, V.I. and Schmalhausen, E.V. (2017) S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate

- dehydrogenase induces formation of C150-C154 intrasubunit disulfide bond in the active site of the enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects*, **1861**, 3167–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.09.008>
- [47] Smith, C.M. and Velick, S.F. (1972) The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases of liver and muscle. Cooperative interactions and conditions for functional reversibility. *The Journal of Biological Chemistry*, **247**, 273–84.
- [48] Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2004) Glycolysis, Gluconeogenesis, and the Pentose Phosphate Pathway. **Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition, pp. 521–559.**
- [49] Jeffery, C.J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**, 8–11. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01335-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01335-8)
- [50] Huberts, D.H.E.W. and van der Klei, I.J. (2010) Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1803**, 520–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.022>
- [51] Sirover, M.A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1432**, 159–84. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00119-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00119-3)
- [52] Rodacka, A. (2013) Properties and functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, **67**, 775–89. <https://doi.org/10.5604/17322693.1061630>
- [53] Sirover, M.A. (2021) The role of posttranslational modification in moonlighting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase structure and function. *Amino Acids*, **53**, 507–15. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-02959-z>
- [54] White, M.R. and Garcin, E.D. (2016) The sweet side of RNA regulation: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a noncanonical RNA-binding protein. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, **7**, 53–70. <https://doi.org/10.1002/wrna.1315>
- [55] Kaneda, M., Takeuchi, K., Inoue, K. and Umeda, M. (1997) Localization of the phosphatidylserine-binding site of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase responsible for membrane fusion. *Journal of Biochemistry*, **122**, 1233–40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021886>
- [56] Raje, C.I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J.S. and Raje, M. (2007) The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a

- novel transferrin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 3252–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608328200>
- [57] Ishitani, R., Tanaka, M., Sunaga, K., Katsube, N. and Chuang, D.M. (1998) Nuclear localization of overexpressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured cerebellar neurons undergoing apoptosis. *Molecular Pharmacology*, **53**, 701–7. <https://doi.org/10.1124/mol.53.4.701>
- [58] Dastoor, Z. and Dreyer, J.L. (2001) Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *Journal of Cell Science*, **114**, 1643–53. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.9.1643>
- [59] Schmitz, H.D. (2001) Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion. *European Journal of Cell Biology*, **80**, 419–27. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00174>
- [60] Arutyunova, E.I., Domnina, L.V., Chudinova, A.A., Makshakova, O.N., Arutyunov, D.Y. and Muronetz, V.I. (2013) Localization of non-native D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in growing and apoptotic HeLa cells. *Biochemistry Biokhimiia*, **78**, 91–5. <https://doi.org/10.1134/S0006297913010112>
- [61] Harary I. (1957) The hydrolysis of 1,3-diphosphoglyceric acid by acyl phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **26**, 434–6.
- [62] Schmalhausen, E.V., Muronetz, V.I. and Nagradova, N.K. (1997) Rabbit muscle GAPDH: non-phosphorylating dehydrogenase activity induced by hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, **414**, 247–52. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01044-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01044-2)
- [63] Schmalhausen, E.V., Nagradova, N.K., Boschi-Muller, S., Branlant, G. and Muronetz, V.I. (1999) Mildly oxidized GAPDH: the coupling of the dehydrogenase and acyl phosphatase activities. *FEBS Letters*, **452**, 219–22. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00627-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00627-4)
- [64] Benitez, L.V. and Allison, W.S. (1974) The inactivation of the acyl phosphatase activity catalyzed by the sulfenic acid form of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by dimedone and olefins. *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 6234–43.
- [65] Danshina, P.V., Schmalhausen, E.V., Avetisyan, A.V. and Muronetz, V.I. (2001) Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis. *IUBMB Life*, **51**, 309–14. <https://doi.org/10.1080/152165401317190824>

- [66] Mateo, R.B., Reichner, J.S., Mastrofrancesco, B., Kraft-Stolar, D. and Albina, J.E. (1995) Impact of nitric oxide on macrophage glucose metabolism and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. *The American Journal of Physiology*, **268**, C669-675.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.3.C669>
- [67] Albina, J.E., Mastrofrancesco, B. and Reichner, J.S. (1999) Acyl phosphatase activity of NO-inhibited glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): a potential mechanism for uncoupling glycolysis from ATP generation in NO-producing cells. *The Biochemical Journal*, **341 ( Pt 1)**, 5–9.
- [68] Galli, F., Rovidati, S., Ghibelli, L. and Canestrari, F. (1998) S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases the enzyme affinity to the erythrocyte membrane. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **2**, 17–27.  
<https://doi.org/10.1006/niox.1997.0148>
- [69] Sergienko, E.A., Kharitonov, A.I., Bulargina, T.V., Muronetz, V.V. and Nagradova, N.K. (1992) D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase purified from rabbit muscle contains phosphotyrosine. *FEBS Letters*, **304**, 21–3. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80580-a](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80580-a)
- [70] Muronetz, V.I., Barinova, K.V., Stroylova, Y.Y., Semenyuk, P.I. and Schmalhausen, E.V. (2017) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Aggregation mechanisms and impact on amyloid neurodegenerative diseases. *International Journal of Biological Macromolecules*, **100**, 55–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.066>
- [71] Sirover, M.A. (2020) Moonlighting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: posttranslational modification, protein and nucleic acid interactions in normal cells and in human pathology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **55**, 354–71.  
<https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1787325>
- [72] Meng, Y., Zhang, L., Zhang, L., Wang, Z., Wang, X., Li, C. et al. (2022) CysModDB: a comprehensive platform with the integration of manually curated resources and analysis tools for cysteine posttranslational modifications. *Briefings in Bioinformatics*, **23**, bbac460.  
<https://doi.org/10.1093/bib/bbac460>
- [73] Meng, Yanzheng and Li, Lei. (2021) Cysteine post-translational modifications: ten years from chemical proteomics to bioinformatics. *Biomolecules*,. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2105.13582>
- [74] Chen, Y.-J., Lu, C.-T., Su, M.-G., Huang, K.-Y., Ching, W.-C., Yang, H.-H. et al. (2015) dbSNO 2.0: a resource for exploring structural environment,

functional and disease association and regulatory network of protein S-nitrosylation. *Nucleic Acids Research*, **43**, D503-511.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gku1176>

- [75] Bui, V.-M., Weng, S.-L., Lu, C.-T., Chang, T.-H., Weng, J.T.-Y. and Lee, T.-Y. (2016) SOHSite: incorporating evolutionary information and physicochemical properties to identify protein S-sulfenylation sites. *BMC Genomics*, **17 Suppl 1**, 9. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2299-1>
- [76] Little, C. and O'Brien, P.J. (1969) Mechanism of peroxide-inactivation of the sulphhydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, **10**, 533–8. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00721.x>
- [77] Cremers, C.M. and Jakob, U. (2013) Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation. *The Journal of Biological Chemistry*, **288**, 26489–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.462929>
- [78] Woo, H.A., Jeong, W., Chang, T.-S., Park, K.J., Park, S.J., Yang, J.S. et al. (2005) Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 3125–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400496200>
- [79] Deng, X., Liang, H., Ulanovskaya, O.A., Ji, Q., Zhou, T., Sun, F. et al. (2014) Steady-state hydrogen peroxide induces glycolysis in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **196**, 2499–513. <https://doi.org/10.1128/JB.01538-14>
- [80] Cabisco, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. and Ros, J. (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 27393–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003140200>
- [81] Costa, V.M.V., Amorim, M.A., Quintanilha, A. and Moradas-Ferreira, P. (2002) Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radical Biology & Medicine*, **33**, 1507–15. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01086-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01086-9)
- [82] Shenton, D., Perrone, G., Quinn, K.A., Dawes, I.W. and Grant, C.M. (2002) Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 16853–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200559200>
- [83] Fujimoto, S. and Itoh, T. (1997) Role of nitric oxide and nitric oxide-independent relaxing factor in contraction and relaxation of rabbit blood

vessels. *European Journal of Pharmacology*, **330**, 177–84.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(97\)00180-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(97)00180-5)

- [84] Cozzi, M.R., Guglielmini, G., Battiston, M., Momi, S., Lombardi, E., Miller, E.C. et al. (2015) Visualization of nitric oxide production by individual platelets during adhesion in flowing blood. *Blood*, **125**, 697–705.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-579474>
- [85] Tymvios, C., Moore, C., Jones, S., Solomon, A., Sanz-Rosa, D. and Emerson, M. (2009) Platelet aggregation responses are critically regulated in vivo by endogenous nitric oxide but not by endothelial nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology*, **158**, 1735–42. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00408.x>
- [86] Tessari, P., Cecchet, D., Cosma, A., Vettore, M., Coracina, A., Million, R. et al. (2010) Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes*, **59**, 2152–9. <https://doi.org/10.2337/db09-1772>
- [87] Tewari, D., Sah, A.N., Bawari, S., Nabavi, S.F., Dehpour, A.R., Shirooie, S. et al. (2021) Role of Nitric Oxide in Neurodegeneration: Function, Regulation, and Inhibition. *Current Neuropharmacology*, **19**, 114–26.  
<https://doi.org/10.2174/1570159X18666200429001549>
- [88] Nakamura, T. and Lipton, S.A. (2013) Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18**, 239–49. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4703>
- [89] Kohr, M.J., Murphy, E. and Steenbergen, C. (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase acts as a mitochondrial trans-S-nitrosylase in the heart. *PloS One*, **9**, e111448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111448>
- [90] Hara, M.R. and Snyder, S.H. (2006) Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **26**, 527–38.  
<https://doi.org/10.1007/s10571-006-9011-6>
- [91] Nakamura, T., Prikhodko, O.A., Pirie, E., Nagar, S., Akhtar, M.W., Oh, C.-K. et al. (2015) Aberrant protein S-nitrosylation contributes to the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*, **84**, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.017>
- [92] Zahid, S., Khan, R., Oellerich, M., Ahmed, N. and Asif, A.R. (2014) Differential S-nitrosylation of proteins in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **256**, 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.026>
- [93] Wang, J., Wang, Y., Lv, Q., Wang, L., Du, J., Bao, F. et al. (2017) Nitric oxide modifies root growth by S-nitrosylation of plastidial glyceraldehyde-3-

- phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **488**, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.012>
- [94] Sen, T., Saha, P. and Sen, N. (2018) Nitrosylation of GAPDH augments pathological tau acetylation upon exposure to amyloid- $\beta$ . *Science Signaling*, **11**, eaa06765. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao6765>
- [95] Butterfield, D.A., Hardas, S.S. and Lange, M.L.B. (2010) Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, **20**, 369–93. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1375>
- [96] Beltrán, B., Orsi, A., Clementi, E. and Moncada, S. (2000) Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *British Journal of Pharmacology*, **129**, 953–60. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703147>
- [97] Souza, J.M. and Radi, R. (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **360**, 187–94. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0932>
- [98] Forrester, M.T., Foster, M.W., Benhar, M. and Stamler, J.S. (2009) Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radical Biology & Medicine*, **46**, 119–26. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.034>
- [99] Huang, B. and Chen, C. (2006) An ascorbate-dependent artifact that interferes with the interpretation of the biotin switch assay. *Free Radical Biology & Medicine*, **41**, 562–7. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.006>
- [100] Newman, S.F., Sultana, R., Perluigi, M., Coccia, R., Cai, J., Pierce, W.M. et al. (2007) An increase in S-glutathionylated proteins in the Alzheimer's disease inferior parietal lobule, a proteomics approach. *Journal of Neuroscience Research*, **85**, 1506–14. <https://doi.org/10.1002/jnr.21275>
- [101] Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Groni, H., Marchand, C.H., Puppo, C., Gontero, B. et al. (2012) Glutathionylation in the photosynthetic model organism *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic survey. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, **11**, M111.014142. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014142>
- [102] Bedhomme, M., Adamo, M., Marchand, C.H., Couturier, J., Rouhier, N., Lemaire, S.D. et al. (2012) Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is

reversed by both glutaredoxins and thioredoxins in vitro. *The Biochemical Journal*, **445**, 337–47. <https://doi.org/10.1042/BJ20120505>

- [103] Barinova, K.V., Serebryakova, M.V., Eldarov, M.A., Kulikova, A.A., Mitkevich, V.A., Muronetz, V.I. et al. (2020) S-glutathionylation of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and possible role of Cys152-Cys156 disulfide bridge in the active site of the protein. *Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects*, **1864**, 129560. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129560>
- [104] Zaffagnini, M., Marchand, C.H., Malferrari, M., Murail, S., Bonacchi, S., Genovese, D. et al. (2019) Glutathionylation primes soluble glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for late collapse into insoluble aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **116**, 26057–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914484116>
- [105] Schuppe-Koistinen, I., Moldéus, P., Bergman, T. and Cotgreave, I.A. (1994) S-thiolation of human endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase after hydrogen peroxide treatment. *European Journal of Biochemistry*, **221**, 1033–7. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18821.x>
- [106] Ralser, M., Wamelink, M.M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E.A. et al. (2007) Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, **6**, 10. <https://doi.org/10.1186/jbiol61>
- [107] Talwar, D., Miller, C.G., Grossmann, J., Szyrwił, L., Schwecke, T., Demichev, V. et al. (2023) The GAPDH redox switch safeguards reductive capacity and enables survival of stressed tumour cells. *Nature Metabolism*, **5**, 660–76. <https://doi.org/10.1038/s42255-023-00781-3>
- [108] Hildebrandt, T., Knuesting, J., Berndt, C., Morgan, B. and Scheibe, R. (2015) Cytosolic thiol switches regulating basic cellular functions: GAPDH as an information hub? *Biological Chemistry*, **396**, 523–37. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0295>
- [109] Sirover, M.A. (2011) On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1810**, 741–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.05.010>
- [110] Carlile, G.W., Chalmers-Redman, R.M., Tatton, N.A., Pong, A., Borden, K.E. and Tatton, W.G. (2000) Reduced apoptosis after nerve growth factor

and serum withdrawal: conversion of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to a dimer. *Molecular Pharmacology*, **57**, 2–12.

- [111] Brown, V.M., Krynetski, E.Y., Krynetskaia, N.F., Grieger, D., Mukatira, S.T., Murti, K.G. et al. (2004) A novel CRM1-mediated nuclear export signal governs nuclear accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase following genotoxic stress. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 5984–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307071200>
- [112] Kots AYa, null, Skurat, A.V., Sergienko, E.A., Bulargina, T.V. and Severin, E.S. (1992) Nitroprusside stimulates the cysteine-specific mono(ADP-ribosylation) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *FEBS Letters*, **300**, 9–12. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80153-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80153-8)
- [113] Grigorieva, J.A., Dainiak, M.B., Katrukha, A.G. and Muronetz, V.I. (1999) Antibodies to the nonnative forms of d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: identification, purification, and influence on the renaturation of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **369**, 252–60. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1341>
- [114] Arutyunova, E.I., Danshina, P.V., Domnina, L.V., Pleten, A.P. and Muronetz, V.I. (2003) Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances its binding to nucleic acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 547–52. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01222-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01222-1)
- [115] Naletova, I., Schmalhausen, E., Kharitonov, A., Katrukha, A., Saso, L., Caprioli, A. et al. (2008) Non-native glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1784**, 2052–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.07.013>
- [116] Itakura, M., Nakajima, H., Semi, Y., Higashida, S., Azuma, Y.-T. and Takeuchi, T. (2015) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregation inhibitor peptide: A potential therapeutic strategy against oxidative stress-induced cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **467**, 373–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.150>
- [117] Lazarev, V.F., Nikotina, A.D., Semenyuk, P.I., Evstafyeva, D.B., Mikhaylova, E.R., Muronetz, V.I. et al. (2016) Properties of substances inhibiting aggregation of oxidized GAPDH: Data on the interaction with the enzyme and the impact on its intracellular content. *Data in Brief*, **7**, 524–8. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.02.054>

- [118] Tatton, W., Chalmers-Redman, R. and Tatton, N. (2003) Neuroprotection by deprenyl and other propargylamines: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase rather than monoamine oxidase B. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, **110**, 509–15. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0827-z>
- [119] Benhar, M. and Stamler, J.S. (2005) A central role for S-nitrosylation in apoptosis. *Nature Cell Biology*, **7**, 645–6. <https://doi.org/10.1038/ncb0705-645>
- [120] Sultana, R., Poon, H.F., Cai, J., Pierce, W.M., Merchant, M., Klein, J.B. et al. (2006) Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiology of Disease*, **22**, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.10.004>
- [121] Duncan, A.J. and Heales, S.J.R. (2005) Nitric oxide and neurological disorders. *Molecular Aspects of Medicine*, **26**, 67–96. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.004>
- [122] Borutaite, V. and Brown, G.C. (2003) Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion. *Free Radical Biology & Medicine*, **35**, 1457–68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.003>
- [123] Brüne, B. and Lapetina, E.G. (1995) Protein thiol modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for nitric oxide signaling. *Genetic Engineering*, **17**, 149–64.
- [124] Brüne, B. and Mohr, S. (2001) Protein thiol modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and caspase-3 by nitric oxide. *Current Protein & Peptide Science*, **2**, 61–72. <https://doi.org/10.2174/1389203013381206>
- [125] Galli, F., Rossi, R., Di Simplicio, P., Floridi, A. and Canestrari, F. (2002) Protein thiols and glutathione influence the nitric oxide-dependent regulation of the red blood cell metabolism. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **6**, 186–99. <https://doi.org/10.1006/niox.2001.0397>
- [126] Borderie, D., Le Marechal, H., Ekindjian, O.G. and Hervann, A. (2000) Nitric oxide modifies glycolytic pathways in cultured human synoviocytes. *Cell Biology International*, **24**, 285–9. <https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0498>
- [127] Hara, M.R. and Snyder, S.H. (2007) Cell signaling and neuronal death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **47**, 117–41. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105311>

- [128] Hara, M.R., Thomas, B., Cascio, M.B., Bae, B.-I., Hester, L.D., Dawson, V.L. et al. (2006) Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3887–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511321103>
- [129] Sen, N., Hara, M.R., Kornberg, M.D., Cascio, M.B., Bae, B.-I., Shahani, N. et al. (2008) Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nature Cell Biology*, **10**, 866–73. <https://doi.org/10.1038/ncb1747>
- [130] Kornberg, M.D., Sen, N., Hara, M.R., Juluri, K.R., Nguyen, J.V.K., Snowman, A.M. et al. (2010) GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nature Cell Biology*, **12**, 1094–100. <https://doi.org/10.1038/ncb2114>
- [131] Tarze, A., Deniaud, A., Le Bras, M., Maillier, E., Molle, D., Larochette, N. et al. (2007) GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*, **26**, 2606–20. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210074>
- [132] E Silva, K.S.F., Lima, R.M., Baeza, L.C., Lima, P. de S., Cordeiro, T. de M., Charneau, S. et al. (2019) Interactome of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Points to the Existence of Metabolons in *Paracoccidioides lutzii*. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 1537. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01537>
- [133] Garrels, J.I. and Gibson, W. (1976) Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell*, **9**, 793–805. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90142-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90142-2)
- [134] Gunning, P., Ponte, P., Okayama, H., Engel, J., Blau, H. and Kedes, L. (1983) Isolation and characterization of full-length cDNA clones for human alpha-, beta-, and gamma-actin mRNAs: skeletal but not cytoplasmic actins have an amino-terminal cysteine that is subsequently removed. *Molecular and Cellular Biology*, **3**, 787–95. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.5.787-795.1983>
- [135] Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K. and Mizuno, K. (2011) Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension. *The Journal of Cell Biology*, **193**, 365–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.201101035>
- [136] Baatout, S., Chatelain, B., Staquet, P., Symann, M. and Chatelain, C. (1999) The G and F contents in megakaryocyte cell lines after stimulation with phorbol myristate acetate. *Anticancer Research*, **19**, 3259–64.

- [137]Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **29**, 545–76.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.545>
- [138]Shimizu, N. and Obinata, T. (1980) PRESENCE OF THREE ACTIN TYPES IN SKELETAL MUSCLE OF CHICK EMBRYOS. *Development, Growth & Differentiation*, **22**, 789–96. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.1980.00789.x>
- [139]Shimizu, N. and Obinata, T. (1986) Actin concentration and monomer-polymer ratio in developing chicken skeletal muscle. *Journal of Biochemistry*, **99**, 751–9.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135534>
- [140]Knull, H.R. and Walsh, J.L. (1992) Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton. *Current Topics in Cellular Regulation*, **33**, 15–30.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-152833-1.50007-1>
- [141]Rogalski-Wilk, A.A. and Cohen, R.S. (1997) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and F-actin associations in synaptosomes and postsynaptic densities of porcine cerebral cortex. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **17**, 51–70. <https://doi.org/10.1023/a:1026377004261>
- [142]Ketschek, A., Sainath, R., Holland, S. and Gallo, G. (2021) The Axonal Glycolytic Pathway Contributes to Sensory Axon Extension and Growth Cone Dynamics. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **41**, 6637–51.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0321-21.2021>
- [143]Wojtera-Kwiczor, J., Groß, F., Leffers, H.-M., Kang, M., Schneider, M. and Scheibe, R. (2012) Transfer of a Redox-Signal through the Cytosol by Redox-Dependent Microcompartmentation of Glycolytic Enzymes at Mitochondria and Actin Cytoskeleton. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 284.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00284>
- [144]Yuan, A., Mills, R.G., Bamburg, J.R. and Bray, J.J. (1999) Cotransport of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin in axons of chicken motoneurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **19**, 733–44.  
<https://doi.org/10.1023/a:1006953022763>
- [145]Mitsuzawa, H., Kimura, M., Kanda, E. and Ishihama, A. (2005) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and actin associate with RNA polymerase II and interact with its Rpb7 subunit. *FEBS Letters*, **579**, 48–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.045>

- [146] Waingeh, V.F., Lowe, S.L. and Thomasson, K.A. (2004) Brownian dynamics of interactions between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mutants and F-actin. *Biopolymers*, **73**, 533–41. <https://doi.org/10.1002/bip.10560>
- [147] Ouporov, I.V., Keith, T.J., Knull, H.R. and Thomasson, K.A. (2000) Computer simulations of glycolytic enzyme interactions with F-actin. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **18**, 311–23. <https://doi.org/10.1080/07391102.2000.10506668>
- [148] Ouporov, I.V., Knull, H.R., Lowe, S.L. and Thomasson, K.A. (2001) Interactions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with G- and F-actin predicted by Brownian dynamics. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, **14**, 29–41. [https://doi.org/10.1002/1099-1352\(200101/02\)14:1<29::AID-JMR517>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1099-1352(200101/02)14:1<29::AID-JMR517>3.0.CO;2-T)
- [149] Waingeh, V.F., Gustafson, C.D., Kozliak, E.I., Lowe, S.L., Knull, H.R. and Thomasson, K.A. (2006) Glycolytic enzyme interactions with yeast and skeletal muscle F-actin. *Biophysical Journal*, **90**, 1371–84. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.070052>
- [150] Schmitz, H.-D. and Bereiter-Hahn, J. (2002) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase associates with actin filaments in serum deprived NIH 3T3 cells only. *Cell Biology International*, **26**, 155–64. <https://doi.org/10.1006/cbir.2001.0819>
- [151] Lu, J., Katano, T., Uta, D., Furue, H. and Ito, S. (2011) Rapid S-nitrosylation of actin by NO-generating donors and in inflammatory pain model mice. *Molecular Pain*, **7**, 101. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-101>
- [152] Cao, F., Yanagihara, N. and Burke, J.M. (1999) Progressive association of a “soluble” glycolytic enzyme with the detergent-insoluble cytoskeleton during in vitro morphogenesis of MDCK epithelial cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **44**, 133–42. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(199910\)44:2<133::AID-CM5>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(199910)44:2<133::AID-CM5>3.0.CO;2-9)
- [153] Fedorova, M., Kuleva, N. and Hoffmann, R. (2010) Identification of cysteine, methionine and tryptophan residues of actin oxidized in vivo during oxidative stress. *Journal of Proteome Research*, **9**, 1598–609. <https://doi.org/10.1021/pr901099e>
- [154] Farah, M.E., Sirotkin, V., Haarer, B., Kakhniashvili, D. and Amberg, D.C. (2011) Diverse protective roles of the actin cytoskeleton during oxidative stress. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*, **68**, 340–54. <https://doi.org/10.1002/cm.20516>

- [155] Ishiwata, S. (1976) Freezing of actin. Reversible oxidation of a sulfhydryl group and structural change. *Journal of Biochemistry*, **80**, 595–609. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131315>
- [156] Fiaschi, T., Cozzi, G., Raugei, G., Formigli, L., Ramponi, G. and Chiarugi, P. (2006) Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 22983–91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603040200>
- [157] Thom, S.R., Bhopale, V.M., Mancini, D.J. and Milovanova, T.N. (2008) Actin S-nitrosylation inhibits neutrophil beta2 integrin function. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 10822–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709200200>
- [158] Dalle-donne, I., Milzani/snm>, A., Giustarini, D., Simplicio, P.D., Colombo, R. and Rossi, R. (2000) S-NO-actin: S-nitrosylation kinetics and the effect on isolated vascular smooth muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **21**, 171–81. <https://doi.org/10.1023/A:1005671319604>
- [159] Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P. and Snyder, S.H. (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biology*, **3**, 193–7. <https://doi.org/10.1038/35055104>
- [160] DalleDonne, I., Milzani, A. and Colombo, R. (1999) The tert-butyl Hydroperoxide-Induced Oxidation of Actin Cys-374 Is Coupled with Structural Changes in Distant Regions of the Protein. *Biochemistry*, **38**, 12471–80. <https://doi.org/10.1021/bi990367k>
- [161] DalleDonne, I., Milzani, A. and Colombo, R. (1995) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated actin: assembly and polymer interactions with cross-linking proteins. *Biophysical Journal*, **69**, 2710–9. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80142-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80142-6)
- [162] García-Ortiz, A., Martín-Cofreces, N.B., Ibiza, S., Ortega, Á., Izquierdo-Álvarez, A., Trullo, A. et al. (2017) eNOS S-nitrosylates  $\beta$ -actin on Cys374 and regulates PKC- $\theta$  at the immune synapse by impairing actin binding to profilin-1. *PLoS Biology*, **15**, e2000653. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000653>
- [163] Clifford, P.S., Ferguson, B.S., Jasperse, J.L. and Hill, M.A. (2018) Arteriolar vasodilation involves actin depolymerization. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, **315**, H423–8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00723.2017>
- [164] Scopes, R.K. and Stoter, A. (1982) Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract. *Methods in Enzymology*, **90 Pt E**, 479–90. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(82\)90175-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(82)90175-6)

- [165] Barinova, K.V., Eldarov, M.A., Khomyakova, E.V., Muronetz, V.I. and Schmalhausen, E.V. (2017) Isolation of recombinant human untagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *E. coli* producer strain. *Protein Expression and Purification*, **137**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.009>
- [166] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- [167] Houk, T.W. and Ue, K. (1974) The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods. *Analytical Biochemistry*, **62**, 66–74. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90367-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90367-4)
- [168] Schmalhausen, E.V., Pleten', A.P. and Muronetz, V.I. (2003) Ascorbate-induced oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **308**, 492–6. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01421-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01421-9)
- [169] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- [170] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- [171] Helsen, K., Martens, L., Vandekerckhove, J. and Gevaert, K. (2007) MascotDatfile: an open-source library to fully parse and analyse MASCOT MS/MS search results. *Proteomics*, **7**, 364–6. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600682>
- [172] White, M.R., Khan, M.M., Deredge, D., Ross, C.R., Quintyn, R., Zucconi, B.E. et al. (2015) A dimer interface mutation in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates its binding to AU-rich RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 1770–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618165>
- [173] Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A., Branlant, C. and Branlant, G. (1989) Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **28**, 2586–92. <https://doi.org/10.1021/bi00432a036>
- [174] Talfournier, F., Colloc'h, N., Mornon, J.P. and Branlant, G. (1998) Comparative study of the catalytic domain of phosphorylating

- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from bacteria and archaea via essential cysteine probes and site-directed mutagenesis. *European Journal of Biochemistry*, **252**, 447–57. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520447.x>
- [175] Maragos, C.M., Morley, D., Wink, D.A., Dunams, T.M., Saavedra, J.E., Hoffman, A. et al. (1991) Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, **34**, 3242–7. <https://doi.org/10.1021/jm00115a013>
- [176] Keefer, L.K., Nims, R.W., Davies, K.M. and Wink, D.A. (1996) “NONOates” (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods in Enzymology*, **268**, 281–93. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)68030-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)68030-6)
- [177] Klomsiri, C., Nelson, K.J., Bechtold, E., Soito, L., Johnson, L.C., Lowther, W.T. et al. (2010) Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection evaluation of conditions affecting probe incorporation into redox-sensitive proteins. *Methods in Enzymology*, **473**, 77–94. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)73003-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)73003-2)
- [178] Percival, M.D., Ouellet, M., Campagnolo, C., Claveau, D. and Li, C. (1999) Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors: evidence for the formation of mixed disulfides and a sulfenic acid. *Biochemistry*, **38**, 13574–83. <https://doi.org/10.1021/bi991028u>
- [179] Kettenhofen, N.J. and Wood, M.J. (2010) Formation, reactivity, and detection of protein sulfenic acids. *Chemical Research in Toxicology*, **23**, 1633–46. <https://doi.org/10.1021/tx100237w>
- [180] Gupta, V. and Carroll, K.S. (2014) Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1840**, 847–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.040>
- [181] Johansson, M. and Lundberg, M. (2007) Glutathionylation of beta-actin via a cysteinyl sulfenic acid intermediary. *BMC Biochemistry*, **8**, 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-8-26>
- [182] Regazzoni, L., Panusa, A., Yeum, K.-J., Carini, M. and Aldini, G. (2009) Hemoglobin glutathionylation can occur through cysteine sulfenic acid intermediate: electrospray ionization LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometry studies. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **877**, 3456–61. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.020>

- [183] Peskin, A.V., Pace, P.E., Behring, J.B., Paton, L.N., Soethoudt, M., Bachschmid, M.M. et al. (2016) Glutathionylation of the Active Site Cysteines of Peroxiredoxin 2 and Recycling by Glutaredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, **291**, 3053–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692798>
- [184] Barrett, W.C., DeGnore, J.P., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y., Yim, M.B. and Chock, P.B. (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 34543–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34543>
- [185] Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Rossi, R., Colombo, R. and Milzani, A. (2003) Reversible S-glutathionylation of Cys374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. *Free Radical Biology and Medicine*, **34**, 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01182-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01182-6)
- [186] Pacher, P., Beckman, J.S. and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, **87**, 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- [187] Tsai, C.W., Tsai, C.F., Lin, K.H., Chen, W.J., Lin, M.S., Hsieh, C.C. et al. (2020) An investigation of the correlation between the S-glutathionylated GAPDH levels in blood and Alzheimer’s disease progression. *PloS One*, **15**, e0233289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233289>
- [188] Kommaddi, R.P., Tomar, D.S., Karunakaran, S., Bapat, D., Nanguneri, S., Ray, A. et al. (2019) Glutaredoxin1 Diminishes Amyloid Beta-Mediated Oxidation of F-Actin and Reverses Cognitive Deficits in an Alzheimer’s Disease Mouse Model. *Antioxidants & Redox Signaling*, **31**, 1321–38. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7754>
- [189] Zhou, X., Joshi, S., Khare, T., Patil, S., Shang, J. and Kumar, V. (2021) Nitric oxide, crosstalk with stress regulators and plant abiotic stress tolerance. *Plant Cell Reports*, **40**, 1395–414. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02705-5>
- [190] Sharma, A., Soares, C., Sousa, B., Martins, M., Kumar, V., Shahzad, B. et al. (2020) Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects. *Physiologia Plantarum*, **168**, 318–44. <https://doi.org/10.1111/ppl.13004>

- [191] Sahay, S. and Gupta, M. (2017) An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **67**, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.04.011>
- [192] Gusarov, I. and Nudler, E. (2005) NO-mediated cytoprotection: instant adaptation to oxidative stress in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13855–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504307102>
- [193] Rouyère, C., Serrano, T., Frémont, S. and Echard, A. (2022) Oxidation and reduction of actin: Origin, impact in vitro and functional consequences in vivo. *European Journal of Cell Biology*, **101**, 151249. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2022.151249>
- [194] Gu, Y., Tang, S., Wang, Z., Cai, L., Lian, H., Shen, Y. et al. (2021) A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of  $\beta$ -actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered*, **12**, 6166–85. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1973220>
- [195] Kommaddi, R.P., Das, D., Karunakaran, S., Nanguneri, S., Bapat, D., Ray, A. et al. (2018) A $\beta$  mediates F-actin disassembly in dendritic spines leading to cognitive deficits in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **38**, 1085–99. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2127-17.2017>
- [196] Virtanen, J.A. and Vartiainen, M.K. (2017) Diverse functions for different forms of nuclear actin. *Current Opinion in Cell Biology*, **46**, 33–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.12.004>
- [197] Xu, Y.Z., Thuraisingam, T., Morais, D.A. de L., Rola-Pleszczynski, M. and Radzioch, D. (2010) Nuclear translocation of beta-actin is involved in transcriptional regulation during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Molecular Biology of the Cell*, **21**, 811–20. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-06-0534>
- [198] Qi, W., Li, J., Pei, X., Ke, Y., Bu, Q. and Ni, X. (2020)  $\beta$ -Actin facilitates etoposide-induced p53 nuclear import. *Journal of Biosciences*, **45**, 34.
- [199] Steffensen, K.E. and Dawson, J.F. (2023) Actin's C-terminus coordinates actin structural changes and functions. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*, **80**, 313–29. <https://doi.org/10.1002/cm.21757>
- [200] Kim, J.-J. and Lee, M.-Y. (2011) p53 is not necessary for nuclear translocation of GAPDH during NO-induced apoptosis. *BMB Reports*, **44**, 782–6. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2011.44.12.782>

- [201] Markossian, K.A., Khanova, H.A., Kleimenov, S.Y., Levitsky, D.I., Chebotareva, N.A., Asryants, R.A. et al. (2006) Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, **45**, 13375–84. <https://doi.org/10.1021/bi0610707>
- [202] Hyslop, P.A., Boggs, L.N. and Chaney, M.O. (2023) Origin of Elevated S-Glutathionylated GAPDH in Chronic Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 5529. <https://doi.org/10.3390/ijms24065529>
- [203] Godfrey, W.H., Hwang, S., Cho, K., Shanmukha, S., Gharibani, P., Abramson, E. et al. (2022) Therapeutic potential of blocking GAPDH nitrosylation with CGP3466b in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Frontiers in Neurology*, **13**, 979659. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.979659>
- [204] Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T.W. and Sawa, A. (2011) The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cellular Signalling*, **23**, 317–23. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.003>