

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Медведева Мария Витальевна

S-нитрозилирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы

1.1.10 - Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в отделе биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители - **Муронец Владимир Израилевич**
доктор биологических наук, профессор

Шмальгаузен Елена Викторовна
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты - **Байков Александр Андреевич** - доктор химических наук, профессор, заведующий отделом химии белка Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Тишков Владимир Иванович - доктор химических наук, профессор, профессор кафедры химической энзимологии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Калинина Елена Валентиновна - доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Защита диссертации состоится 4 декабря 2024 года в 17:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3205>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Шаповалова И.В.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГАФД	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
ГАФД-SNO	нитрозилированная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
ГАФД-SOH	сульфенированная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
ГАФД-SSG	глутатионилированная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
ДСК	дифференциальная сканирующая калориметрия
ДСН	додецилсульфат натрия
ДТНБ	5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная) кислота
ДТТ	дитиотреитол
ESI	ионизация распылением в электрическом поле
FITC	флуоресцеин изотиоцианат
MALDI-TOF	матрично-активированная лазерная десорбционная ионизационная времяпролётная масс-спектрометрия
NAD ⁺	никотинамидадениндинуклеотид (окисленный)
NADH	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)
SD	стандартное отклонение

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность

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. Известно, что NO может приводить к трём основным модификациям белков – S-нитрозилированию/окислению сульфгидрильных групп остатков цистеина (Cys-SNO), нитрованию остатков тирозина (Tyr-NO₂) и нитрованию триптофана (Trp-NO₂). 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 S-глутатионилирование. Эти модификации существенно изменяют активность и функциональные свойства ГАФД, что, в свою очередь, влияет на её роль в метаболических и клеточных процессах.

S-нитрозилирование участвует в регуляции разнообразных клеточных процессов, включая апоптоз. Известно, что апоптоз сопровождается перемещением ГАФД из цитоплазмы в клеточное ядро. 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.

2. Степень разработанности темы

Исторически внимание к ГАФД сосредоточивалось на её основной каталитической активности. Исследования фермента начались ещё в 1950-х годах. Начиная с 1975-х годов стали активно изучаться некаталитические свойства ГАФД, в том числе S-нитрозилирование. Инактивация ГАФД под действием NO была показана различными научными группами. Сначала было установлено, что инкубация ГАФД в присутствии тринитроглицерина приводит к образованию цистеинсульфеновой кислоты в активном центре. Затем было высказано предположение, что основным механизмом инактивации ГАФД является обратимое S-нитрозилирование каталитического цистеина. 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, поскольку лабильная связь S-NO расщепляется в процессе ионизации. 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 году было высказано предположение об участии ГАФД в апоптозе, инициированном релокацией фермента в ядро. Однако, чем именно объясняется миграция ГАФД в ядро неясно до сих пор. Существует несколько гипотез относительно механизма ядерной транслокации ГАФД. Согласно одной из них инициация апоптоза может быть опосредована S-глутатионированием ГАФД. S-нитрозилирование или S-глутатионирование 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. 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 гидролизует 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_2O_2 , приводит к сульфенированию ГАФД и бета-актина, что способствует их реакции с клеточным GSH с образованием соответствующих S-глутатионилированных белков.

5. Теоретическая и практическая значимость

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

6. Методология исследования

В исследовании были использованы биохимические, физико-химические методы, методы работы с культурами клеток млекопитающих 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.

7. Положения, выносимые на защиту

1. Идентифицированы основные продукты модификации ГАФД NO: S-нитрозилированная и S-сульфенированная форма, образующаяся в результате гидролиза ГАФД-SNO. Инкубация ГАФД с NO азота приводит к инактивации фермента вследствие модификации каталитического остатка цистеина (Cys152).
2. Инкубация клеток НЕК 293Т с H_2O_2 или донором NO (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.

8. Степень достоверности данных

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.

9. 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; ДСК была проведена С.Ю. Клейменовым; масс-спектрометрию MALDI-TOF проводила М.В. Серебрякова; ESI-MS проводил В.В. Чаговец; альфа-актин из мышц кролика предоставил А.М. Матюшенко.

10. 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.

11. 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).

12. 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были ГАФД из мышц кролика, рекомбинантная ГАФД дикого типа человека и мутантная ГАФД с заменой C156S, клетки линии НЕК 293Т.

Производство рекомбинантных белков проводили в *E. coli*. Белки выделяли с помощью фракционирования сульфатом аммония и гель-фильтрации на Сефадексе G-100.

Для **получения модифицированных форм ГАФД** раствор 0,8-1,0 мг/мл ГАФД в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,0, инкубировали с 0,1-0,3 мМ DEANO для получения нитрозилированной ГАФД или с 0,1 мМ GSH и 0,1 мМ H₂O₂ для получения глутатионилированной ГАФД до падения дегидрогеназной активности на 80-90%.

Ферментативную активность ГАФД измеряли по продукции NADH в ходе реакции, катализируемой ГАФД, на спектрофотометре Shimadzu UV-1800.

ГАФД-SNO идентифицировали методом масс-спектрометрии ESI (Maxis Impact qTOF, Bruker Daltonics, Германия). ГАФД-SOH регистрировали методами ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии в присутствии димедона. Распределение продуктов модификации **количественно оценивали** по снижению дегидрогеназной активности, по реактивации в отсутствие и в присутствии димедона и с помощью методов Элмана и Сэвилла-Грисса. Сравнивали интактную ГАФД, ГАФД-SNO и ГАФД-SSG по возможности обращения модификации, скорости трипсинолиза и термостабильности. **Дифференциальную сканирующую калориметрию** нативной ГАФД, ГАФД-SNO или ГАФД-SSG проводили на калориметре MicroCal VP-DSC с танталовыми капиллярными ячейками (Malvern Instruments, Northampton, MA 01060, США) при скорости нагрева 1 град/мин.

Детекцию сульфенированных и S-глутатионилированных белков в лизатах клеток НЕК 293Т после инкубации с DEANO и H₂O₂ проводили с помощью **иммуноблоттинга** с первичными антителами к биотину (лизаты инкубировали с реагентом DCP-Bio1) или с антителами к GSH.

Поиск белков-партнёров ГАФД проводили методом **иммунопреципитации**. Белковые комплексы осаждали из лизатов клеток НЕК 293Т при помощи антител к ГАФД, иммобилизованных на Сефарозе с G-белком. Полученные комплексы анализировали методом ДСН-электрофореза. Белковые полосы анализировали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Взаимодействие **ГАФД с G- и F-актином** исследовали методом **иммуноферментного анализа**. Гипотезу о возможности переноса NO-группы с ГАФД-SNO на актин проверяли, измеряя содержание нитрозотиолов (SNO) в ГАФД методом Сэвилла-Грисса, а также детектируя появление цистеинсульфеновой кислоты в актине методами иммуноблоттинга и MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Модификация ГАФД из мышц кролика окисью азота

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

1.1. Дегидрогеназная и ацилфосфатазная активности ГАФД в присутствии NO

ГАФД состоит из четырёх одинаковых субъединиц, каждая из которых содержит активный центр с остатком цистеина (Cys150 в ферменте из мышц кролика). За ходом модификации каталитического остатка цистеина можно следить по снижению дегидрогеназной активности. Это позволяет оценить количество модифицированных остатков 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: окисленная ГАФД приобретает способность катализировать распад продукта своей собственной реакции, 1,3-бисфосфоглицерата. Это способствует удалению 1,3-бисфосфоглицерата и, как следствие, ускорению дегидрогеназной реакции, что можно регистрировать по накоплению NADH.

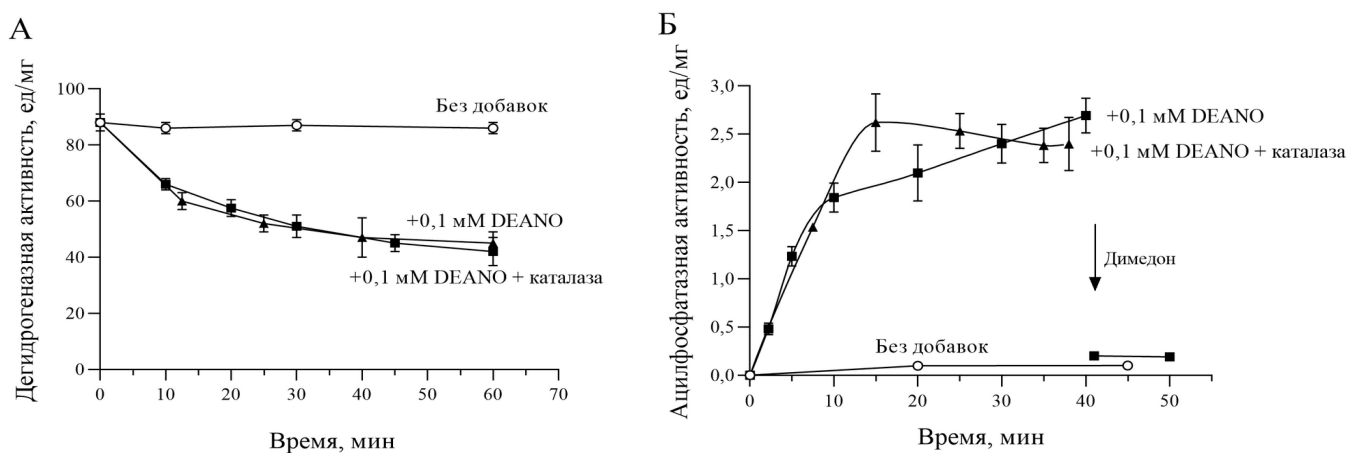


Рис. 1. Снижение дегидрогеназной активности (А) и развитие ацилфосфатазной активности в присутствии DEANO (Б).

Мышечную ГАФД кролика (1 мг/мл) инкубировали в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,0 (22 °С), без добавок (1), в присутствии 0,1 мМ DEANO (2) или в присутствии 0,1 мМ DEANO вместе с 1 мкг каталазы (на объём пробы 0,5 мл) (3). В указанное время инкубации из образцов 1, 2 и 3 отбирали аликвоты 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. 1 А (проба с 0,1 мМ DEANO), дегидрогеназная активность ГАФД снижается в присутствии NO, что указывает на модификацию каталитического остатка цистеина (Cys150). Одновременно с этим наблюдается появление ацилфосфатазной активности (рис. 1 Б, проба с 0,1 мМ DEANO), что свидетельствует о накоплении цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД (ГАФД-SOH). Известно, что окисление остатков цистеина в ГАФД с образованием производных сульфеновой кислоты наблюдается под действием H₂O₂. Для исключения гипотезы, что формирование ГАФД-SOH в присутствии DEANO опосредовано образованием H₂O₂ в анализируемой смеси, к образцу с DEANO добавляли каталазу (удельная активность составляла 1000 мкмоль H₂O₂/мин на мг при pH 7,0 и 22 °С). Как видно из рис. 1, добавление каталазы не препятствует появлению ацилфосфатазной активности (рис. 1 Б). Следовательно, возникновение ГАФД-SOH не связано с образованием H₂O₂ в системе, и можно предположить, что цистеинсульфеновая кислота является одним из продуктов модификации цистеинов в присутствии NO.

1.2. 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 реагирует с цистеинсульфеновой кислотой с образованием стабильного продукта, необратимо связанного в присутствии ДТТ (рис. 2).

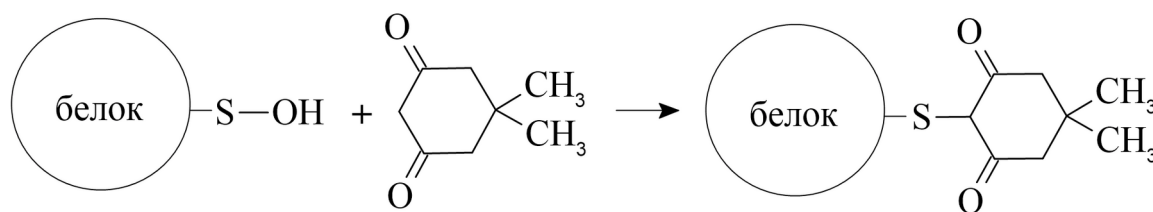


Рис. 2. Реакция цистеинсульфеновой кислоты в белке с димедоном.

Чтобы идентифицировать сульфеновую кислоту, S-нитрозилированная ГАФД после инкубации с димедоном была исследована методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. На рис. 3 представлены масс-спектры нативной ГАФД (А) и S-нитрозилированной ГАФД после обработки димедоном (Б).

Пик с m/z 35692 (отмечен звёздочкой на рис. 3) соответствует субъединице нативной ГАФД. Включение димедона в белок должно привести к увеличению его молекулярной массы на 138 Да. После инкубации ГАФД с DEANO и димедоном появляется дополнительный пик с $m/z = 35828 (+136)$ (стрелка на рис. 3 Б). Принимая во

внимание точность измерения средней массы пика (± 5 Да), дополнительный пик соответствует ГАФД с включением димедона.

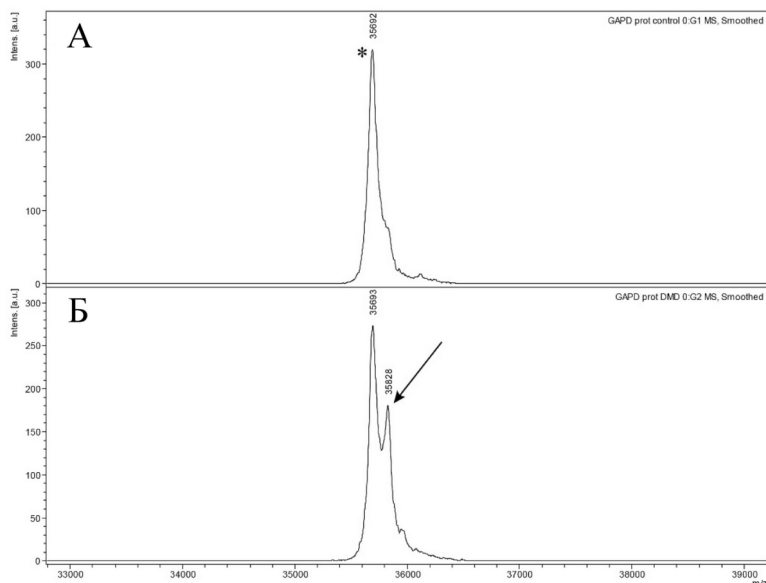


Рис. 3. MALDI-TOF-масс-спектры ГАФД из мышц кролика: А) нативный белок; Б) после инкубации с 0,1 мМ DEANO и 1 мМ димедона. Звёздочкой отмечен пик, соответствующий нативной ГАФД. Стрелкой показан пик, соответствующий аддукту ГАФД с димедоном (+136).

Фрагментация этого пика с включением димедона подтверждает, что димедон включается в Cys150 пептида 144-160, при этом остаток Cys154 остается интактным.

1.3. Обнаружение S-нитрозилированной ГАФД

Для обнаружения ГАФД-SNO мы использовали метод масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI). Масс-спектры ГАФД (нативной и модифицированной под действием DEANO) представлены на рис. 4. Расчёт молекулярной массы белка для пика нативной ГАФД (обозначен 1 на панели А, рис. 4) даёт значение 35691 Да, что соответствует молекулярной массе мономера ГАФД. После инкубации ГАФД с DEANO в спектре появляются дополнительные пики (отмечены 2 на панели Б, рис. 4) массой 35720 Да, что соответствует добавлению молекулы NO (+29 Да). После инкубации S-нитрозилированной ГАФД с димедоном в спектре появляется третий пик (3 на панели В, рис. 4) массой 35829 Да, что соответствует образованию аддукта с димедоном (+138 Да). 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.

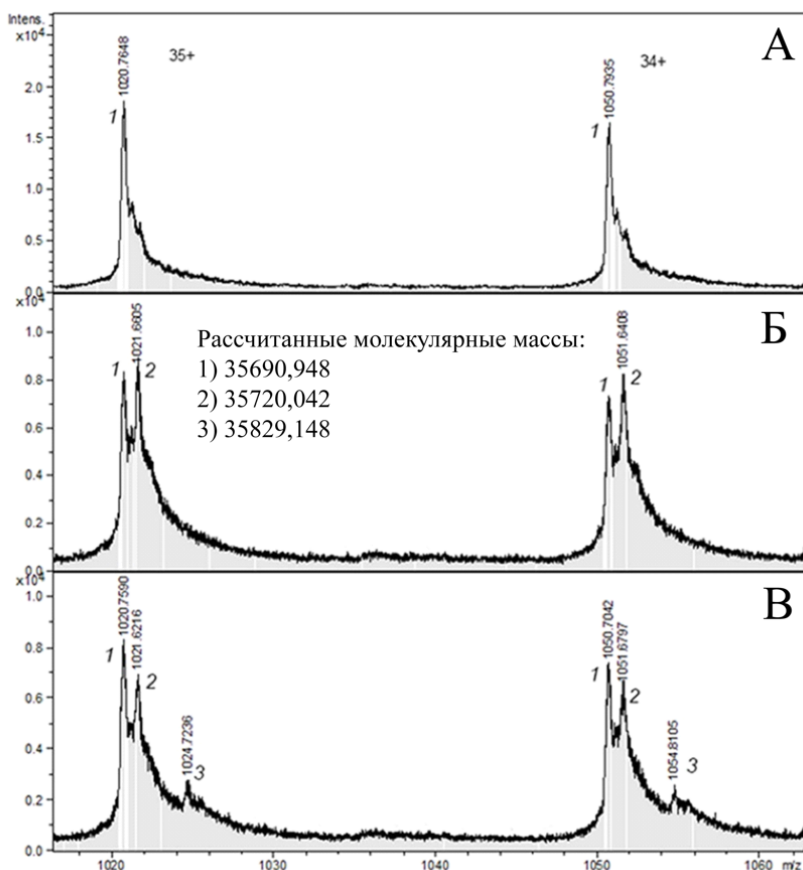


Рис. 4. Анализ продуктов модификации ГАФД методом ESI-масс-спектрометрии. ГАФД без добавок (А), после инкубации с 0,3 мМ DEANO (Б), после инкубации с 0,3 мМ DEANO с последующим добавлением 1 мМ димедона (В).

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.

На вставке показаны рассчитанные молекулярные массы для пиков 1, 2 и 3.

1.4. Количественная оценка продуктов модификации ГАФД с DEANO

Для оценки количества S-нитрозилированных цистеинов мы использовали метод Сэвилла-Грисса. На рис. 5 представлена зависимость молярного соотношения S-нитрозилированных цистеинов (SNO) в ГАФД от процента инактивации ГАФД. Видно, что содержание -SNO коррелирует инактивации ГАФД. Для масс-спектрометрического анализа мы использовали препарат ГАФД после инкубации с 0,3 мМ DEANO (рис. 4 Б). В этих условиях было обнаружено 2,3 моля SNO на моль ГАФД.

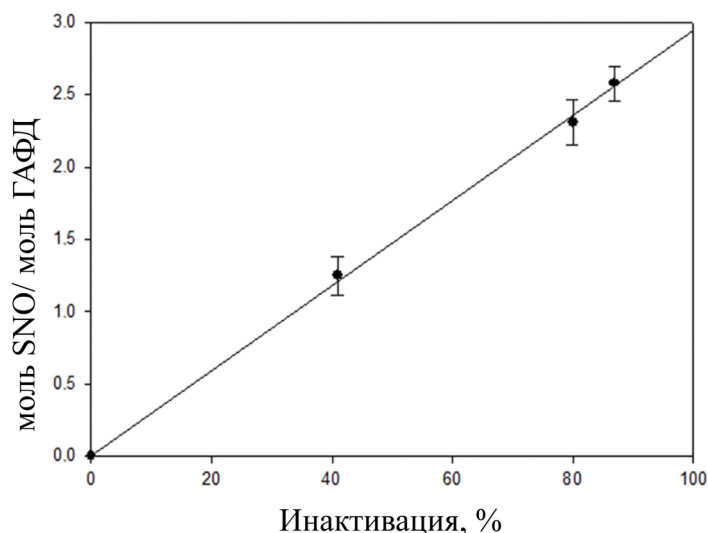


Рис. 5. Определение содержания цистеина-SNO в ГАФД методом Сэвилла-Грисса.

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.

1.5. Взаимосвязь между различными продуктами модификации 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 1.

Таблица 1. Содержание продуктов модификации каталитического остатка Cys150 после инкубации ГАФД из мышц кролика в присутствии 0,3 мМ DEANO.

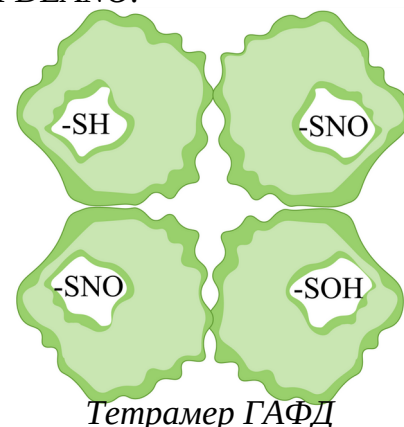
Общее содержание модифицированных Cys150, моль/моль ГАФД		S-NO, моль/моль ГАФД	S-OH, моль/моль ГАФД
3,1 ± 0,8 ^а	3,3 ± 0,2 ^б	2,3 ± 0,2 ^в	0,7 ± 0,3 ^г

^а Измерено по методу Элмана.

^б Измерено по снижению дегидрогеназной активности.

^в Измерено по методу Сэвилла-Грисса.

^г Измерено по реактивации ГАФД в присутствии димедона.



2. Сравнение ГАФД-SNO и ГАФД-SSG

Дальнейшие эксперименты проводились на рекомбинантной ГАФД человека. Сравнение двух обратимых модификаций каталитического остатка цистеина ГАФД были связаны с необходимостью выяснить, чем S-нитрозилирование отличается от другой известной модификации каталитического цистеина ГАФД – S-глутатионилирования. Мы сравнивали стабильность S-нитрозилированной и S-глутатионилированной форм ГАФД, а также обратимость этих модификаций в присутствии естественных восстановителей (восстановленного глутатиона (GSH), глутаредоксина1 и тиоредоксина 1).

2.1. Сравнение термостабильности ГАФД-SNO и ГАФД-SSG

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. 6, 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.

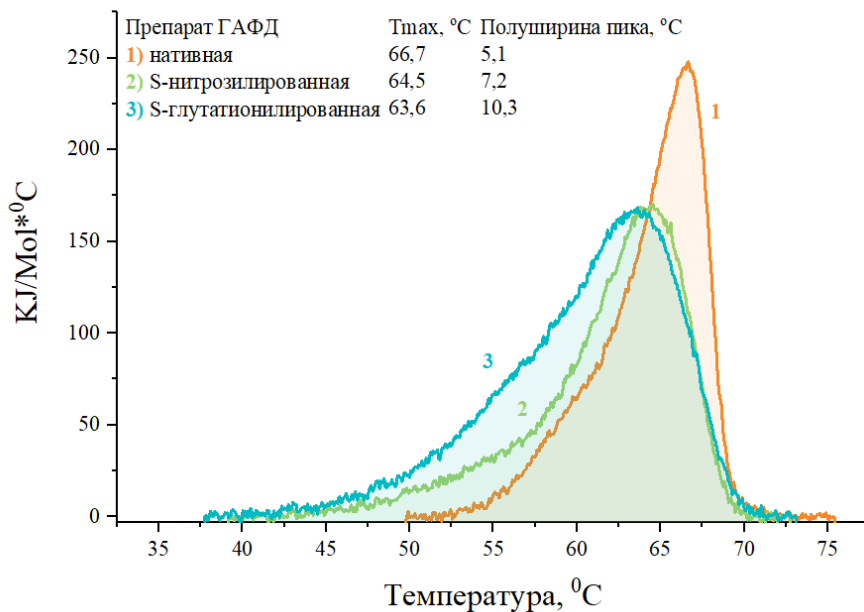


Рис. 6. Анализ термостабильности ГАФД методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

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. 6, S-нитрозилирование и S-глутатионилирование ГАФД снижает значение T_{max} на кривой поглощения тепла. Кроме того, увеличение полуширины пика (ширины пика на половине высоты) указывает на снижение кооперативности разворачивания для ГАФД-SNO и ГАФД-SSG. 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 снижают стабильность фермента и приводят к дестабилизации его глобулярной структуры.

2.2. Влияние модификаций ГАФД на расщепление её трипсином

Еще один метод оценки влияния модификаций Cys152 на пространственную структуру ГАФД - определение чувствительности к расщеплению протеиназами. Как правило, чем компактнее структура белка, тем более он устойчив к действию протеиназ. На рис. 7 (А и Б) представлены результаты ДСН-электрофореза нативной и модифицированной ГАФД после инкубации с трипсином.

2.3. Обратимость S-нитрозилирования и S-глутатионилирования ГАФД

Чтобы оценить обратимость этих модификаций в физиологических условиях, мы исследовали способность модифицированной ГАФД реактивироваться при нейтральном значении рН в присутствии естественных клеточных восстановителей (рис. 8). Тест на реактивацию с ДТТ служил положительным контролем и свидетельствовал о целостности белка и об обратимости исследуемых модификаций.

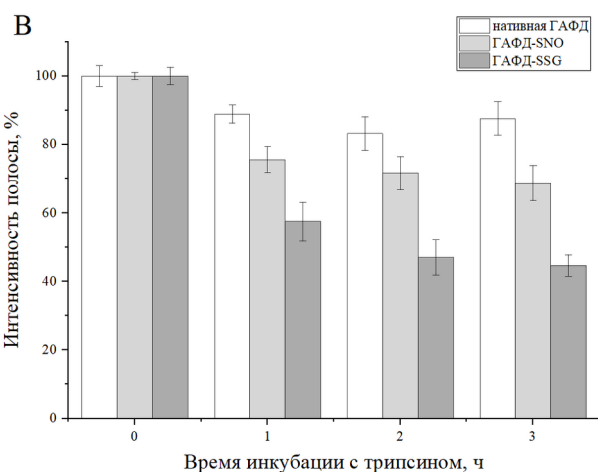
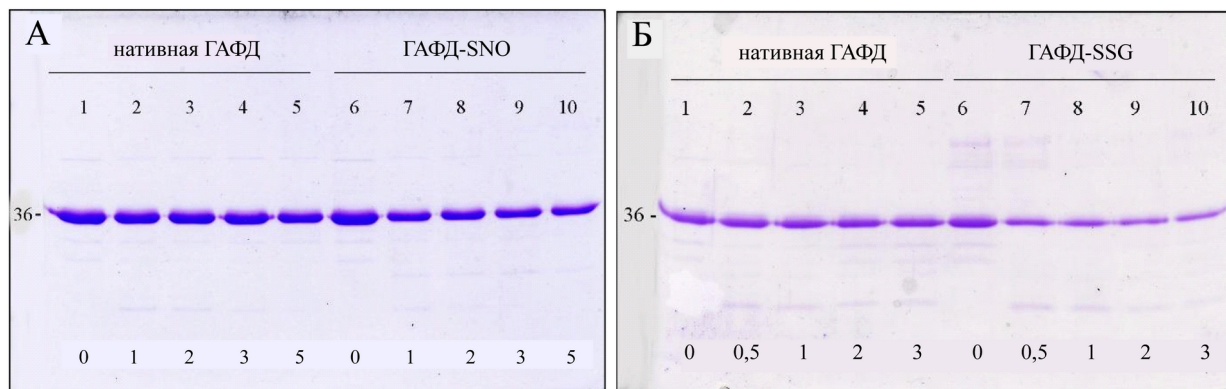


Рис. 7. Анализ расщепления ГАФД-SNO (А) и ГАФД-SSG (Б) трипсином методом ДСН-электрофореза. А) и Б). Растворы ГАФД, ГАФД-SNO и ГАФД-SSG инкубировали в присутствии трипсина. Через указанные промежутки времени отбирали аликвоты и останавливали трипсинолиз нагреванием с буфером для образцов (90°C, 5 мин). Образцы анализировали с помощью ДСН-электрофореза. В) Интенсивность полос определяли с помощью программы ImageJ. Представлены средние значения трёх независимых экспериментов \pm SD. Различия между группами через 1, 2 и 3 ч инкубации были статистически значимыми ($p < 0,05$).

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).

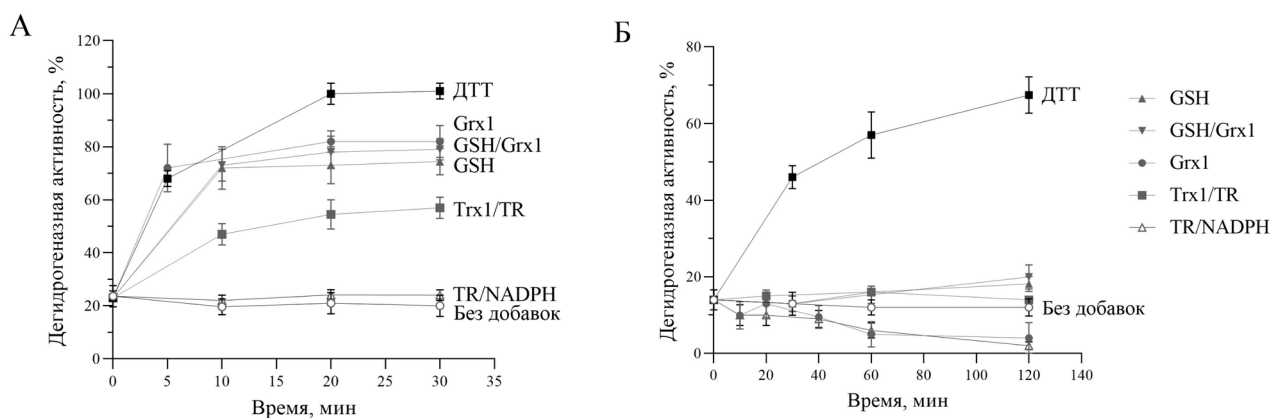


Рис. 8. Реактивация ГАФД-SNO (А) и ГАФД-SSG (Б).

ГАФД-SNO А) или ГАФД-SSG Б) разбавляли в калий-фосфатном буфере, 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. Через указанные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты для определения дегидрогеназной активности.

Представлены данные трёх независимых экспериментов \pm SD.

3. 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 НЕК 293Т инкубировали в присутствии различных концентраций DEANO в течение 1 ч.

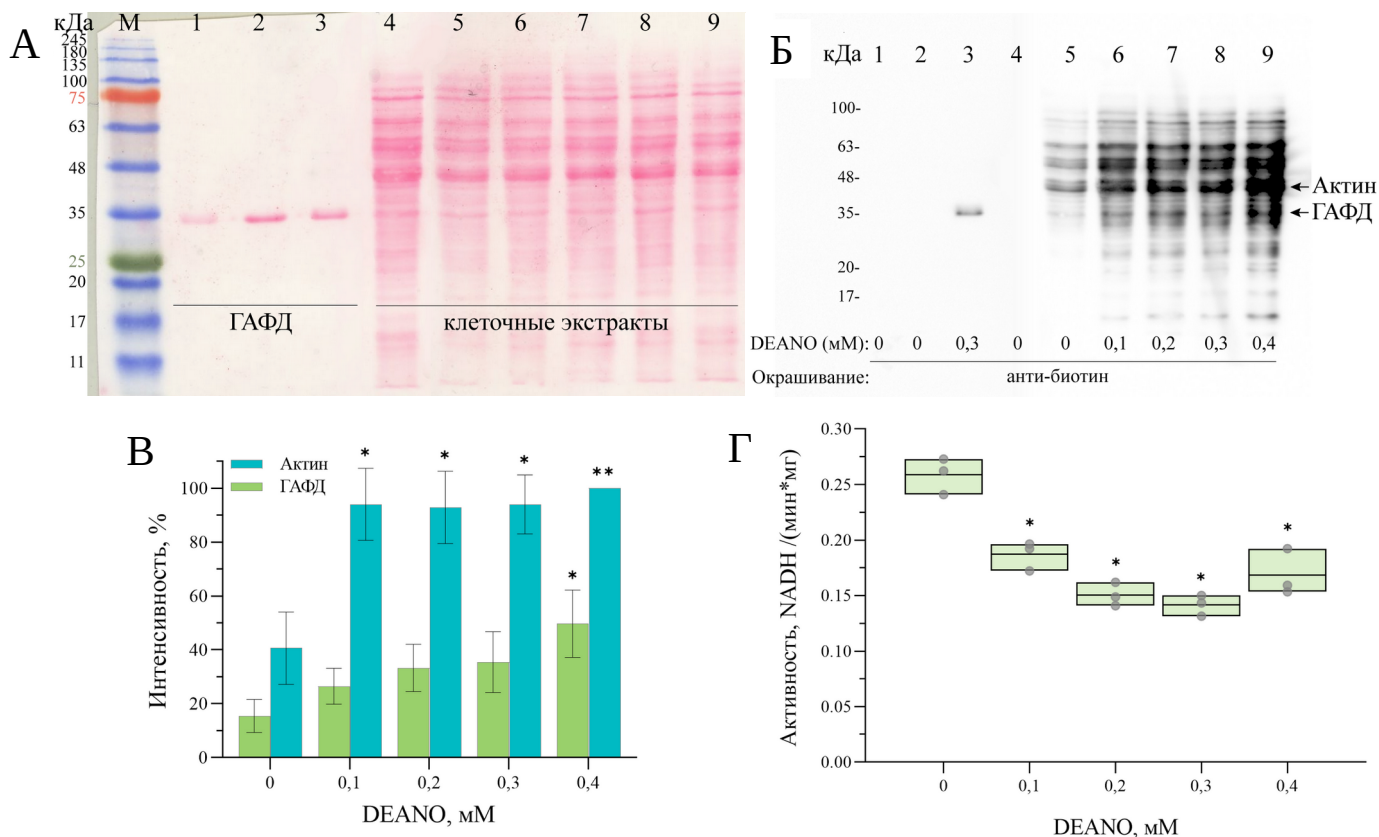


Рис. 9. Обнаружение Cys-SOH в белках после инкубации клеток НЕК 293Т в присутствии DEANO с использованием реагента для сульфеновой кислоты с биотиновой меткой (DCP-Bio1).

Дорожки: 1) рекомбинантная ГАФД человека (0,6 мкг); 2) рекомбинантная ГАФД человека (0,6 мкг) +DCP-Bio1; 3) рекомбинантная ГАФД человека (0,6 мкг) после инкубации с 0,3 мМ DEANO и DCP-Bio1; 4) лизат клеток без обработки 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. 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 трёх независимых экспериментов \pm SD и с указанием конкретных экспериментальных значений. Указаны статистически значимые различия по сравнению с группой без DEANO: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (One-way ANOVA).

После обработки клеток DEANO интенсивность окрашивания биотином ГАФД и бета-актина также увеличивается по сравнению с интактными клетками (рис. 9 Б и рис. 9 В). На рис. 9 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 NO приводит к сульфенированию цистеинов в ряде белков, среди которых обнаружены ГАФД и актин.

4. Иммунопреципитация S-глутатионилированных белков в клеточных лизатах

Для иммунопреципитации мышинные моноклональные антитела против GSH иммобилизовали на Сефарозе с G-белком, а затем инкубировали с исследуемыми клеточными лизатами (рис. 10).

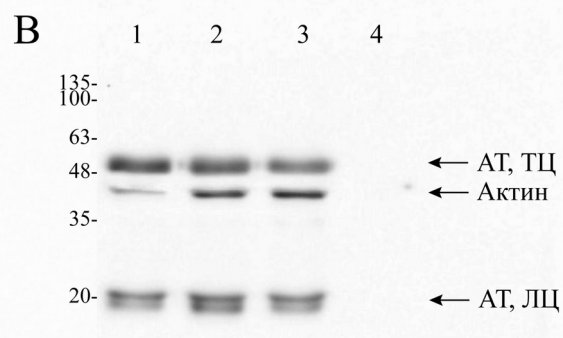
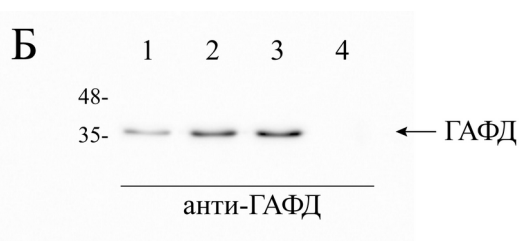
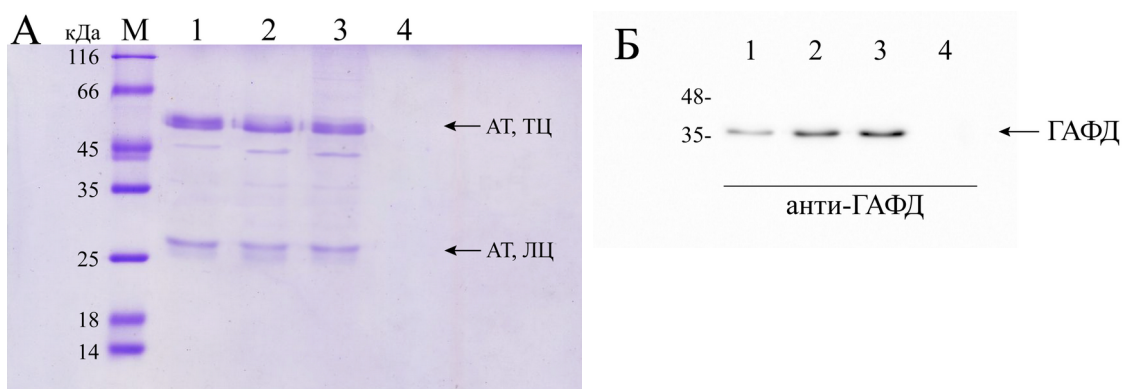


Рис. 10. Иммунопреципитация глетатионилированных белков из клеточных лизатов с помощью антител против GSH.

Лизаты клеток HEK 293T без обработки (1), после инкубации с 50 мкМ H₂O₂ (2) и после инкубации с 0,3 мМ DEANO (3) инкубировали с мышинными моноклональными антителами против GSH,

иммобилизованными на Сефарозе с G-белком. Лизат необработанных клеток инкубировали с Сефарозой с G-белком 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).

AT - моноклональные антитела; ТЦ и ЛС - тяжелые и лёгкие цепи, соответственно.

Анализ полученных комплексов показал наличие ГАФД-SSG (рис. 10 Б). После обработки H₂O₂ или DEANO количество S-глутатионилированной ГАФД увеличивалось (рис. 10 Б, дорожки 2 и 3). На Сефарозе без антител ГАФД не обнаружена, что

исключает неспецифическое связывание (рис. 10 Б, дорожка 4). Помимо ГАФД-SSG мы обнаружили актин-SSG.

Согласно результатам нашей работы, мы можем предложить механизм нитрозилирования ГАФД, представленный на рис. 11.

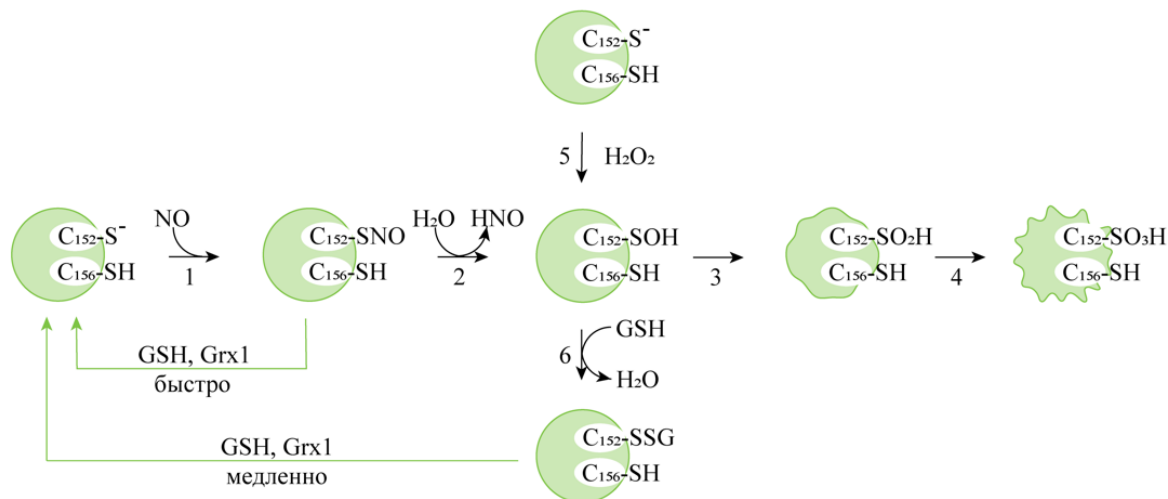


Рис. 11. Схема взаимосвязи между S-нитрозилированием и S-глутатионилированием ГАФД (показана одна субъединица тетрамера ГАФД).

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). Подтверждение образования цистеинсульфеновой кислоты в ГАФД при инкубации с H_2O_2 можно найти в литературе (реакция 5).

5. Поиск белков-партнёров ГАФД

Для изучения взаимодействия ГАФД с возможными белками-партнёрами мы исследовали белковые комплексы, полученные из клеточных экстрактов методом иммунопреципитации с антителами к ГАФД. Поскольку образование белковых комплексов может регулироваться АФК/АФА, в экспериментах мы использовали intactные клетки или обработанные H_2O_2 или донором NO DEANO. Полученные белковые комплексы анализировали с помощью ДСН-электрофореза (рис. 12 А, дорожки 1-3).

Наиболее интенсивные полосы белка на рис. 12 А соответствуют тяжелой и легкой цепям иммобилизованных антител (дорожки 1-3, ТЦ и ЛЦ, соответственно). Полоса ГАФД плохо видна на рис. 12 А, но её можно обнаружить с помощью иммуноблотинга (дорожки 1-3, Рис. 12 Б), что свидетельствует о связывании ГАФД с антителами. Помимо антител и ГАФД, в исследуемых образцах был обнаружен неизвестный белок (обозначен знаком вопроса на рис. 12 А) и белки массой 90-100 кДа.

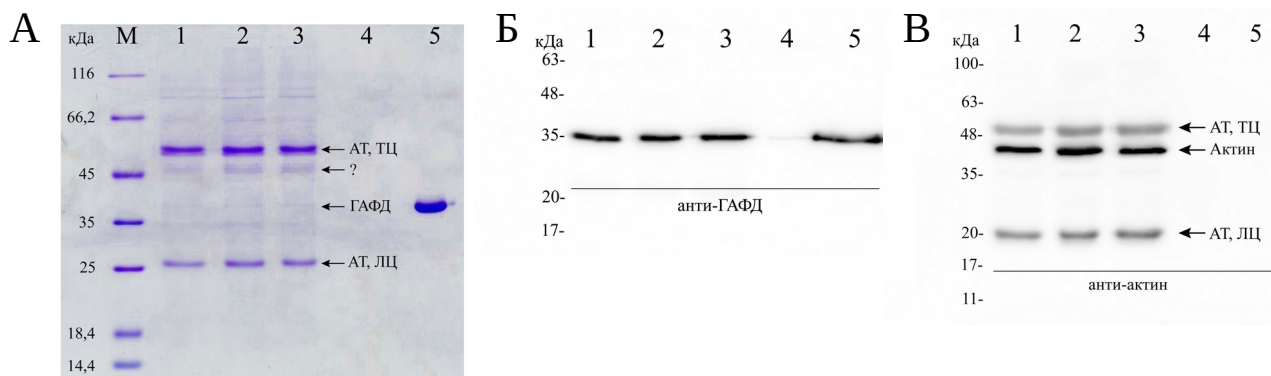


Рис. 12. Анализ белковых комплексов, полученных методом иммунопреципитации с моноклональными антителами против ГАФД, методом ДСН-электрофореза (А) и иммуноблоттинга (Б и В).

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) Иммунопреципитаты антител к ГАФД после инкубации с лизатами клеток, полученных из клеток без обработки (1) или после обработки DEANO (2) и H_2O_2 (3); 4) контрольная сефароза с протеином G (без антител) после инкубации с лизатом клеток; 5) рекомбинантная ГАФД (маркер).

Полоса неизвестного белка с молекулярной массой 45 кДа была вырезана и исследована методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Метод показал, что полоса соответствует человеческому бета-актину. Анализ выделенных комплексов методом иммуноблоттинга с антителами против актина подтвердил наличие бета-актина (Рис. 12 В, дорожки 1-3).

Для подтверждения взаимодействия ГАФД с бета-актином был проведен аналогичный эксперимент по извлечению белковых комплексов из клеточных лизатов с использованием антител к бета-актину. Результаты представлены на рис. 13.

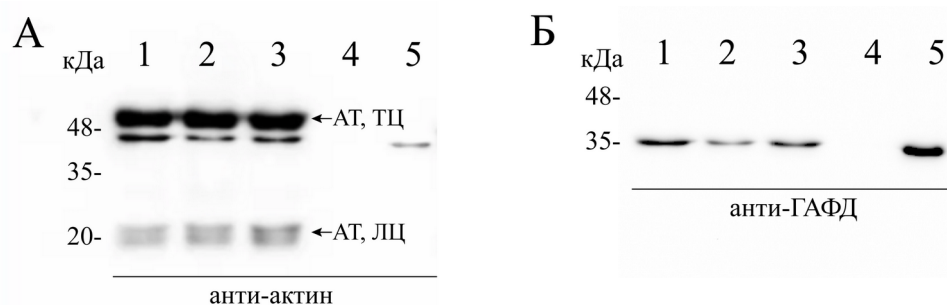


Рис. 13. Анализ белковых комплексов, полученных методом иммунопреципитации с мышинными моноклональными антителами против бета-актина, методом иммуноблоттинга. Окрашивание мышинными антителами на бета-актин (А) и кроличьими антителами на ГАФД (Б).

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

Как видно из рис. 13 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. 13 Б в пробах, содержащих антитела со связанным бета-актином, видны полосы ГАФД (дорожки 1-3). Полученные результаты подтверждают взаимодействие бета-актина с ГАФД. Однако, никакой связи образования комплексов с воздействием окислителей выявить не удалось.

Денитрозилирование ГАФД в присутствии актина

Мы предположили, что образование комплекса между ГАФД и актином может способствовать реакции транснаитрозилирования между белками. Для проверки этого предположения G-актин нитрозилировали 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: активность ГАФД не изменилась (Рис. 14, кривая 2) по сравнению с контролем, в котором ГАФД инкубировали с интактным актином (Рис. 14, кривая 1). Следовательно, нитрозилированный актин не нитрозилирует ГАФД.

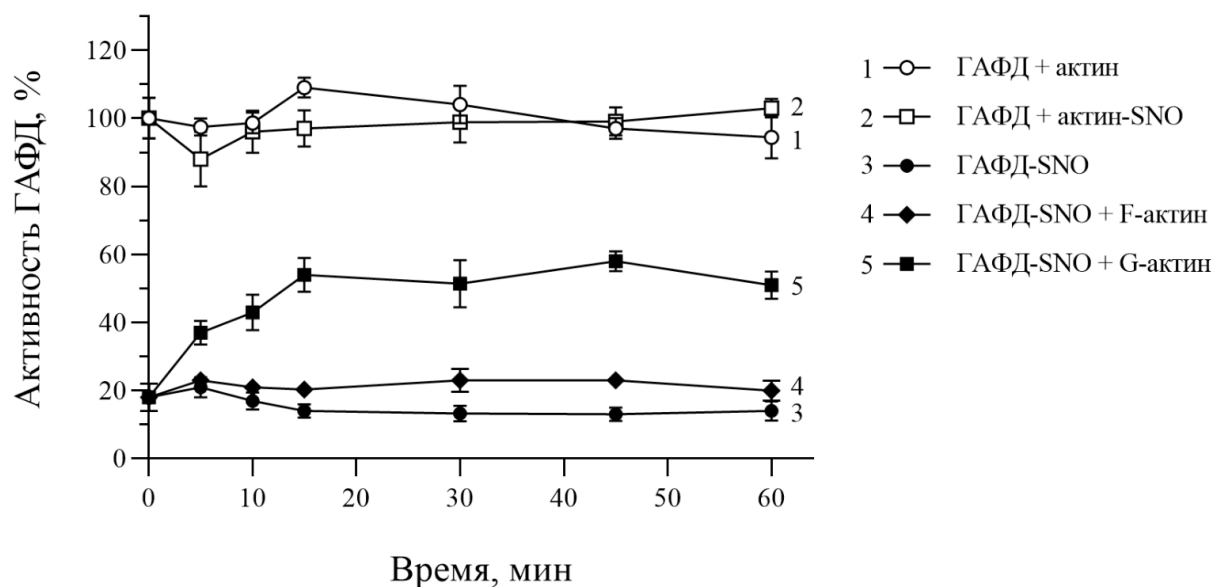


Рис. 14. Оценка S-нитрозилирования/денитрозилирования ГАФД путём её инактивации/реактивации.

ГАФД инкубировали с S-нитрозилированным G-актином (кривая 1) или с интактным G-актином (кривая 2). S-нитрозилированную ГАФД инкубировали с интактным G- или F-актином (кривые 5 и 4) или без добавок (кривая 3). Удельная активность интактной ГАФД принималась за 100%.

Данные представлены как среднее трёх экспериментов \pm SD.

В другой постановке эксперимента мы нитрозилировали ГАФД со 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. 14, кривая 5) в отличие от контрольной пробы ГАФД-SNO без актина, в которой активность ГАФД снизилась до 12% от исходного значения (Рис. 14, кривая 3). 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. Содержание S-нитрозотиолов во фракции ГАФД-SNO после инкубации с G-актином составило 0,22 моль SNO/моль ГАФД, что соответствует 7-кратному снижению по сравнению с образцом ГАФД-SNO, инкубированной без актина (Рис. 15, столбцы 4 и 3, соответственно).

Также к образцу актина после инкубации с ГАФД-SNO добавляли димедон и исследовали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF. Метод показал сульфенирование Cys374 актина, что подтверждает гипотезу транснаитрозилирования.

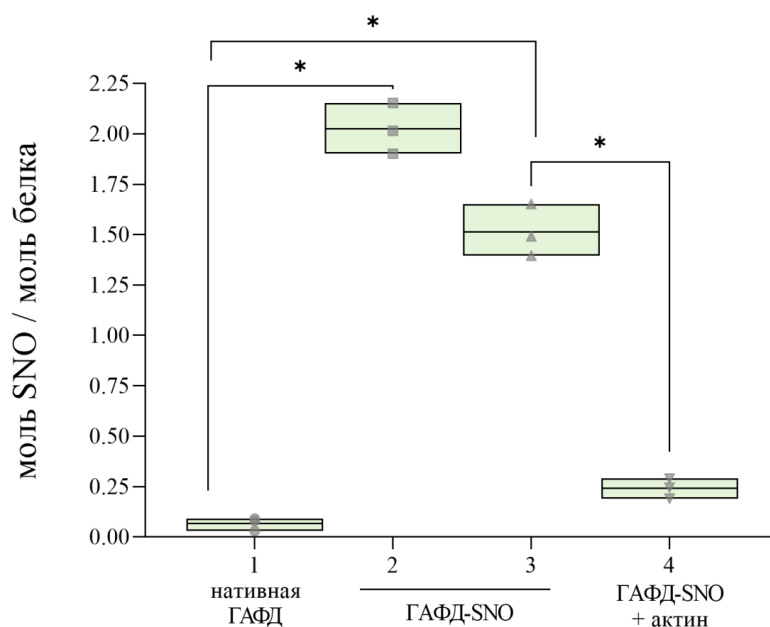


Рис. 15. Определение содержания SNO в ГАФД методом Сэвилла-Грисса.

1) интактная ГАФД; 2) и 3) ГАФД-SNO в начале эксперимента и после 1-часовой инкубации в отсутствие актина; 4) ГАФД-SNO после 1 ч инкубации в присутствии G-актина.

* - статистически значимое отличие с $p < 0,001$ (параметрический анализ One-way ANOVA с апостериорными множественными сравнениями с помощью поправки Бонферрони).

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-SO₂H и ГАФД-SO₃H).
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 H₂O₂ 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 C-концевому остатку Cys374, что указывает на протекание реакции транснаитрозилирования между двумя белками.

**НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В
ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI**

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)¹ (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)¹ (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)¹.
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)¹.
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)¹.
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)¹ (review).

¹ В скобках приведён объём публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

**ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ:**

- 1 **М.В. Медведева**, М.В. Серебрякова, С.Ю. Клейменов, В.И. Муронец, Е.В. Шмальгаузен (2023) S-нитрозилирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы: продукты модификации и влияние на свойства фермента. «13-я Международная научная конференция Биокатализ» (Россия, Суздаль), с. 198.
- 2 В.И. Муронец, **М.В. Медведева**, К.В. Барина, Е.В. Шмальгаузен (2023) Модулирование каталитических регуляторных и «побочных» функций ферментов при модификации сульфгидрильных групп активного центра. «13-я Международная научная конференция Биокатализ» (Россия, Суздаль), с. 25.
- 3 **М.В. Медведева**, Е.В. Шмальгаузен (2023) Взаимосвязь между S-нитрозилированием и S-глутатионилированием, Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» (Россия, Москва, 2023).