

СПЕЦИФИЧНАЯ ДЛЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА – ЭВОЛЮЦИОННОЕ «ПРИБРЕТЕНИЕ» МЛЕКОПИТАЮЩИХ

©2015 г. В. И. МУРОНЕЦ^{1,2*}, М. Л. КУРАВСКИЙ¹,
К. В. БАРИНОВА^{1,2} и Е. В. ШМАЛЬГАУЗЕН¹

¹НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского и

²факультет биоинженерии и биоинформатики Московского
государственного университета имени М.В. Ломоносова.

I. Введение. II. Спермоспецифичная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDS). III. Эволюция GAPDS. IV. Роль гликолиза и GAPDS в обеспечении энергией движения сперматозоидов. V. Каталитические свойства GAPDS. VI. Четвертичная структура GAPDS. VII. Исследование роли шаперонина Tric/CCT в сворачивании dN-GAPDS. VIII. Стабильность dN-GAPDS. IX. Причины повышенной устойчивости dN-GAPDS к денатурации. X. Влияние точечных мутаций на стабильность dN-GAPDS. XI. Влияние мутаций в области междоменных и межсубъединичных ионных мостиков на параметры связывания с кофактором (NAD⁺). XII. Экспрессия GAPDS в клеточных линиях меланомы. XIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPD) – один из самых изученных и распространённых ферментов. К настоящему времени механизм реакции окисления глицеральдегид-3-фосфата и строение ферментов из различных источников – от микроорганизмов до человека – детально исследованы. Нативная молекула GAPD состоит из четырех идентичных субъединиц массой около 36 кДа и содержит четыре активных центра, состоящих из субстрат- и кофактор-связывающих доменов. GAPD катализирует реакцию гликолитической окси-

Принятые сокращения: GAPD – соматическая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; GAPDS – спермоспецифичная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; АФК – активные формы кислорода; кДа – килодальтон; K_m – константа Михаэлиса; GdnHCl – гуанидин гидрохлорид.

*Адрес для корреспонденции: vimuronets@belozersky.msu.ru

Работа была поддержана грантом РФФИ №13-04-00823-а, а также грантом РНФ №15-14-00069 для Е.В. Шмальгаузен.

доредукции, в результате которой образуется первое макроэргическое соединение в цепи гликолиза – 1,3-дифосфоглицерат, используемый далее для синтеза АТФ. Кроме того, в этой реакции происходит восстановление NAD^+ до NADH , который является одним из субстратов окислительного фосфорилирования в митохондриях эукариот. В представленном обзоре мы остановимся только на GAPD, характерной для различных животных организмов, поскольку именно для фермента из этих источников была продемонстрирована мультифункциональность. Кроме того, в процессе эволюции животных произошло появление особой спермоспецифичной формы GAPD, которая является основным объектом обсуждения в данной статье. Но прежде чем приступить к описанию специфичной формы GAPD, следует вкратце остановиться на свойствах обычной соматической глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

Хорошо известно, что GAPD присутствует в значительных количествах в цитоплазме всех соматических клеток животных – ее содержание достигает 5–15% от содержания растворимых белков. GAPD является конститутивным белком, кодируемым «геном домашнего хозяйства» («housekeeping gene»). По этой причине мРНК GAPD и белок GAPD используют в качестве стандартного контроля при исследовании экспрессии или синтеза различных белков в клетке. Долгое время было принято считать, что никакой регуляторной роли GAPD не играет и какая-либо связь между активностью этого фермента и развитием патологических состояний отсутствует. Однако постепенно стало накапливаться все больше фактов о негликолитических функциях фермента. Было показано, что GAPD принимает участие во многих перечисленных ниже негликолитических процессах, которые как раз и могли бы быть связаны с возникновением различных патологий: эндоцитоз [1–3], слияние плазматических мембран [4], сборка микротрубочек [5–7], транспорт секреторных везикул [8, 9], фосфорилирование белков [10, 11], трансляционный и транскрипционный контроль генной экспрессии [12–14], регуляция структуры теломерных участков хромосом [15, 16], слияние ядерных мембран [17], транслокация молекул мРНК через ядерную мембрану [18], эксцизионная репарация ДНК [19, 20] и индукция апоптоза [21–25]. Кроме того, GAPD может быть вовлечена в механизм развития таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера [26–28] и болезнь Хантингтона [28–30].

Особо хотелось бы отметить возможность вовлечения глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в развитие онкологических заболеваний. Для раковых клеток, наряду с их разнообразными особенностями, характерны нарушения индукции апоптоза и регуляции гликолиза.

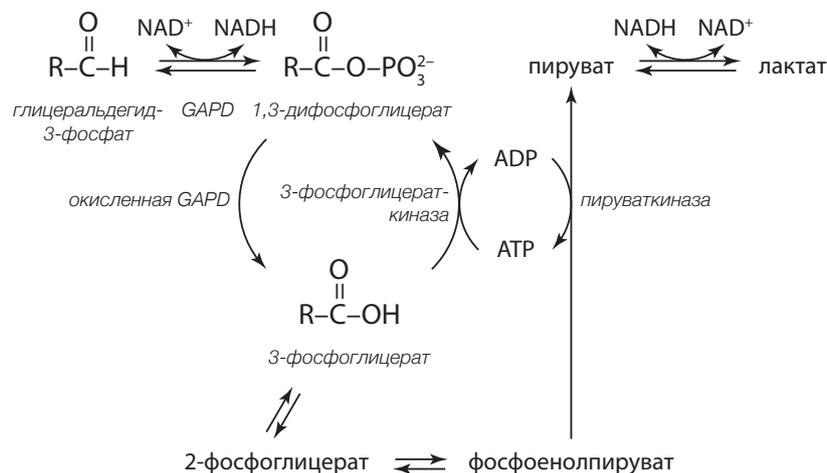


Рис. 1. «Футильный» цикл гликолиза – разобщение окисления и фосфорилирования (модифицировано по [33, 34]).

В оба эти процесса может быть вовлечена GAPD.

Так, например, известно, что эффект Пастера, заключающийся в подавлении гликолиза в аэробных условиях, не характерен для раковых клеток. В раковых клетках наблюдается активное протекание гликолиза, скорость которого не замедляется в присутствии кислорода. Такое изменение регуляции энергетического обмена известно как эффект Варбурга. Переход на бескислородный способ энергетики, согласно Варбургу, приводит к автономному бесконтрольному существованию клетки: она начинает вести себя как самостоятельный организм, стремящийся к воспроизведению [31, 32]. Обнаруженное нами появление ацилфосфатазной активности у частично окисленной GAPD при сохранении основной гликолитической функции может играть определенную роль в сопряжении гликолиза и дыхания. Мы показали, что в нормальных клетках частичное окисление GAPD приводит к разобщению окисления и фосфорилирования в гликолизе, что позволяет скоординировать процессы, происходящие при дыхательном фосфорилировании с гликолитическими реакциями (рис. 1) [33, 34].

Кроме того, как в наших работах, так и в работах других исследователей было показано, что GAPD образует комплексы с различными гликолитическими ферментами [35-38], а также со структурными элементами клетки, что позволяет регулировать скорость протекания гликолиза [5, 39-41]. Очевидно, что изменение свойств GAPD или

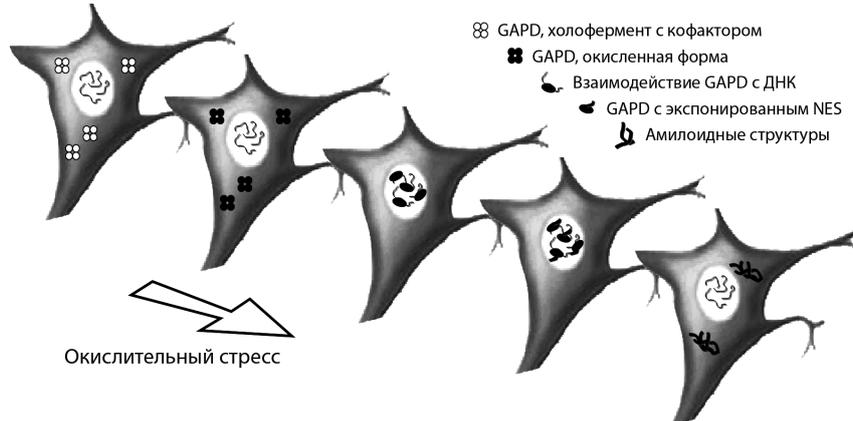


Рис. 2. Гипотетическая схема внутриклеточной транслокации различных форм GAPD в условиях окислительного стресса.

появление ее изоферментов при онкологических патологиях может изменять сопряжение гликолиза и дыхательного фосфорилирования, а также характерные для GAPD белок-белковые взаимодействия, участвуя тем самым в возникновении эффекта Варбурга и в иных нарушениях энергетического метаболизма.

За последние 15 лет накопилось много фактов об участии GAPD в индукции апоптоза [21, 42–45]. В нормальных клетках большая часть GAPD находится в виде активных тетрамерных молекул и локализована в цитоплазме. Некоторое количество GAPD адсорбировано на структурных элементах клетки: актиновых стресс-фибриллах, микротрубочках и т.д. Вероятно, часть адсорбированной GAPD находится в димерной или мономерной форме, что позволяет идентифицировать ее с помощью специфических моноклональных антител против ненативных форм фермента. Ситуация изменяется при воздействии на клетку цитотоксических факторов и при индукции апоптоза фактором некроза опухоли или перекисью водорода. В этом случае происходит транслокация мономерных или димерных форм GAPD в ядро в соответствии с приведенной на рис. 2 схемой.

На схеме показаны процессы, которые происходят при индукции апоптоза активными формами кислорода. На первом этапе происходит окисление сульфгидрильных групп активного центра GAPD, вызывающее ослабление связывания с ферментом кофактора NAD^+ . Образующаяся апоформа GAPD легко диссоциирует на субъединицы, проникающие за счет пассивного транспорта в ядро клетки. После связывания субъединиц GAPD с ядерными нуклеиновыми кисло-

тами происходит дальнейшее разворачивание белка с экспонированием «сигнала ядерного экспорта» («nuclear export signal» – NES). Денатурированные полипептидные цепи GAPD переходят в цитоплазму, где могут подвергаться дальнейшим превращениям: агрегации, связыванию с шаперонами и убиквитинированию. Перемещение ненативных форм GAPD из цитоплазмы в ядро без каких-либо внешних сигналов характерно также для некоторых линий раковых клеток, например, для клеток HeLa .

Очевидно, что в процесс индукции апоптоза GAPD вовлечена не как гликолитический фермент, а как «мессенджер» белковой природы, участвующий в разнообразных белок-белковых и белок-лигандных взаимодействиях. Важнейшую роль в этой функции GAPD играют ее способность чрезвычайно прочно кооперативно связывать кофактор NAD^+ , возможность регулирования этого связывания путем модификации сульфгидрильных групп активного центра и, наконец, присутствие «сигнала ядерного экспорта». В заключение следует отметить, что все указанные выше особенности GAPD характерны для соматической формы дегидрогеназы, которая и исследовалась в течение длительного времени практически во всех работах. Очевидно, что отсутствие любого признака, характерного для соматического фермента, должно кардинальным образом изменять как энергетический метаболизм, так и те элементы апоптического пути клеток, в которые он вовлечен.

Описанная выше мультифункциональность GAPD характерна для соматической формы фермента млекопитающих, поскольку практически все эксперименты проводились на GAPD человека или кролика. Таким образом, в соматических клетках млекопитающих в значительных количествах присутствует цитоплазматический белок, не только катализирующий гликолитическую оксидоредукцию, но выполняющий много других функций. Возможно, каталитические особенности соматической GAPD млекопитающих (отрицательная кооперативность по связыванию кофактора NAD^+ , очень прочное связывание двух молекул NAD^+ на тетрамер GAPD, высокая реакционная способность сульфгидрильных групп активного центра и т.д.) необходимы не столько для осуществления катализа, сколько для выполнения дополнительных функций фермента. К сожалению, информация о некаталитических функциях фермента из других групп животных практически отсутствует. По этой причине невозможно проследить эволюционные аспекты возникновения дополнительных функций у соматической формы GAPD и их взаимосвязь со структурными особенностями ферментов.

Однако у млекопитающих есть еще одна форма GAPD – спермоспецифичная GAPDS. Очевидно, что многие функции соматической GAPD являются для GAPDS «лишними» (например, процессы, связанные с транслокацией фермента в ядро и взаимодействием с нуклеиновыми кислотами). Следовательно, сравнительный анализ двух белков позволяет найти структурные элементы, отвечающие за специфические для соматического или сперматозоидного фермента функции. На базе такого анализа можно также найти подходы к изменению свойств ферментов в нужном направлении и с помощью сайт-специфического мутагенеза получить белки с предсказанными характеристиками. Такое моделирование может быть полезно для получения биокатализаторов для решения биотехнологических задач. Однако в данном обзоре особое внимание мы хотели бы уделить другому аспекту, связанному с патологическими процессами в организме человека. Известно, что спермоспецифичная GAPDS приспособлена для осуществления гликолиза с целью обеспечения энергией подвижности хвоста сперматозоида. При этом у фермента отсутствуют почти все негликолитические функции, характерные для соматической формы. Без этих функций он прекрасно функционирует в сперматозоидах, однако экспрессия спермоспецифичной GAPDS в других клетках должна существенно влиять на их жизнедеятельность. В наших работах было показано, что в некоторых типах раковых клеток происходит экспрессия GAPDS, что может изменять энергетический обмен и индуцировать апоптоз [46]. Возможно также, что появление необычной формы фермента в нервных клетках участвует в возникновении нейродегенеративных заболеваний амилоидной природы [47].

Таким образом, в представленном обзоре мы остановимся на основных свойствах GAPDS и ее роли в обеспечении энергией движения сперматозоидов, эволюции GAPDS, а также на возможной роли GAPDS, экспрессирующейся в соматических клетках, в развитии патологических изменений.

II. СПЕРМОСПЕЦИФИЧНАЯ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА (GAPDS)

GAPDS – изофермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, который встречается только в сперматозоидах. Соматическая GAPD кодируется у человека на 12 хромосоме, однако у нее существует паралог – ген *GAPDS* на 19 хромосоме, который экспрессируется только в сперматозоидах [48, 49]. GAPDS на 68% идентична соматической GAPD. Она состоит из 408 аминокислотных остатков и содержит на

N-конце дополнительную последовательность из 72 аминокислот, благодаря которой белок связывается с цитоскелетом жгутика сперматозоида [50]. Молекулярная масса GAPDS, рассчитанная из аминокислотной последовательности, составляет примерно 44,5 кДа, однако есть данные, что, благодаря обилию остатков пролина, молекула обладает аномальной подвижностью при Ds-Na-электрофорезе в полиакриламидном геле и даёт полосу на уровне 56 кДа [49].

Ранее в нашей лаборатории было показано, что общими для соматической и сперматозоидной GAPD являются мотивы, обеспечивающие участие в гликолизе. В составе соматической GAPD выявлены два специфических мотива, связанных с ее ядерными функциями (репарация и репликация ДНК, а также мотив, определяющий внутриклеточную локализацию). Отсутствие этих мотивов в составе GAPDS позволяет предположить, что ядерные функции соматической GAPD для нее нехарактерны. Это согласуется с данными о том, что GAPDS связана своим N-концевым доменом с нерастворимыми компонентами клетки и в силу этого может терять ряд функций, характерных для GAPD. Возможно, GAPDS принимает участие в процессе сборки веретена деления в сперматиде. При этом для соматической GAPD участие в данном процессе (в других типах клеток), по-видимому, нехарактерно [51].

III. ЭВОЛЮЦИЯ GAPDS

В наших работах была подробно исследована эволюция белкового семейства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ. Было показано, что изоферменты GAPD-1 и GAPD-2 (или GAPD и GAPDS) [51, 52] млекопитающих имеют ортологи в других группах позвоночных животных. Расхождение генов, кодирующих эти изоферменты, случилось в ходе ранней эволюции хордовых и не связано ни с одной из двух полногеномных дупликаций, специфических для позвоночных животных. Ген *GAPD-1*, кодирующий соматический изофермент, претерпел затем ряд дополнительных дупликаций, тогда как ген *GAPD-2* был утерян многими организмами и сохранился, помимо млекопитающих, только у ящериц и рыб.

Основной тенденцией в эволюции GAPD-1 и GAPD-2 позвоночных животных является их функциональная дивергенция. Полученные данные свидетельствуют о том, что изоферменты глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы костистых рыб, экспрессирующиеся в одних и тех же тканях, специализируются на участии в различных негликолитических процессах. Изоферменту GAPD-2 млекопитаю-

щих, по-видимому, также несвойственно выполнение ряда негликолитических функций GAPD-1. Кроме того, GAPD-2 млекопитающих и ящериц эволюционировал в спермоспецифичный белок и приобрел дополнительный полипролиновый домен, необходимый для прикрепления к фиброному слою жгутика сперматозоида. Во взаимодействие с полипролиновым доменом, вероятно, вовлечены несколько различных белков цитоскелета, причем само взаимодействие носит неспецифический характер. У ящериц GAPD-2 экспрессируется и в некоторых соматических тканях (для которых характерно интенсивное деление клеток). Однако в этих тканях белок оказывается лишенным полипролинового домена вследствие альтернативного сплайсинга кодирующей его мРНК.

Таким образом, только в сперматозоидах млекопитающих и ящериц присутствует специальная форма глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPD-2, или GAPDS), обеспечивающая энергоснабжение движения длинных «хвостов» этих клеток. Вероятно, такое «приобретение» обеспечивает определенные эволюционные преимущества при размножении данных организмов. Интересно, что побочным следствием экспрессии GAPDS в регенерирующихся тканях ящериц является обеспечение энергией гликолиза интенсивно делящихся клеток, дающее определенные преимущества этим животным. У млекопитающих экспрессия GAPDS в соматических клетках может вызывать патологические изменения, пример которых будет нами рассмотрен в заключительных разделах.

IV. РОЛЬ ГЛИКОЛИЗА И GAPDS В ОБЕСПЕЧЕНИИ ЭНЕРГИЕЙ ДВИЖЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Для обеспечения движения жгутика сперматозоида требуется большое количество энергии, запасенной в форме АТФ, которая расходуется моторным белком динеином [53]. В животных клетках АТФ образуется преимущественно при протекании двух процессов: гликолиза и окислительного фосфорилирования.

Локализация митохондрий исключительно в среднем отделе жгутика сперматозоида послужила причиной возникновения сомнений в том, что скорость диффузии АТФ вдоль жгутика способна покрыть потребность динеина в энергии [54, 55]. Было подсчитано, что для обеспечения энергией окислительного фосфорилирования сперматозоидов с относительно короткими жгутиками, таких как у морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* (40 мкм), скорость диффузии может оказаться достаточной [56, 57]. Однако, у многих

видов млекопитающих сперматозоиды обладают существенно более длинными жгутиками. Например, у сперматозоидов грызунов длина жгутика превышает 150 мкм [58]. Кроме того, в моделях, использованных для вычислений, АТФ рассматривалась в отрыве от АДФ и неорганического фосфата. Использование энергии, запасенной в форме АТФ, может быть эффективным только в том случае, когда реакция $ATP \leftrightarrow ADP + P_i$ смещена от состояния равновесия. Так, в цитоплазме типичной животной клетки при постоянной концентрации P_i , равной 10 мМ, отношение АТФ/АДФ превышает равновесное в 105 раз [59]. В дистальной области жгутика сперматозоида концентрация АТФ ниже, чем в его проксимальной области, а концентрации АДФ и P_i – выше. Соответственно, реакция расщепления АТФ, протекающая в дистальной области, находится ближе к состоянию равновесия, и, следовательно, менее эффективна [55].

В середине 80-х годов была выдвинута гипотеза о работе креатинфосфатного челночного механизма. За счет реакции $ATP + \text{креатин} \leftrightarrow ADP + \text{креатинфосфат}$ соотношение АТФ/АДФ может поддерживаться на относительно постоянном уровне, и, кроме того, обладающий более высокой диффузионной подвижностью креатинфосфат может обеспечивать более эффективный перенос энергии вдоль жгутика [60]. Креатинкиназа, катализирующая реакцию переноса фосфата между АДФ и креатином, позднее была обнаружена в сперматозоидах морского ежа [61]. Однако у всех исследованных млекопитающих креатинкиназа либо не была обнаружена в сперматозоидах, либо обладала пониженной ферментативной активностью [53, 62, 63]. Кроме того, концентрация креатинфосфата в сперматозоидах млекопитающих близка к нулю [64, 65]. Таким образом, креатинфосфатный челночный механизм либо не работает вовсе, либо играет незначительную роль. Вывод согласуется с результатами экспериментов по получению мышей с нокаутированной креатинкиназой: мыши оставались фертильными, а подвижность их сперматозоидов была на уровне дикого типа [62].

В отличие от сперматозоидов морского ежа, преимущественно окисляющих жирные кислоты [66], основным топливом для сперматозоидов млекопитающих являются углеводы [67]. Это позволяет генерировать АТФ путем гликолиза в цитоплазме жгутика независимо от митохондрий. Роль гликолиза и окислительного фосфорилирования в энергообеспечении жгутика сперматозоидов была подробно исследована в работе Mukai et al [67]. В качестве меры эффективности энергообеспечения рассматривалась частота биения жгутика. Были получены следующие свидетельства в пользу того, что АТФ, потребляемая жгутиком, преимущественно образуется в ходе гликолиза:

- в присутствии глюкозы добавление ингибиторов окислительного фосфорилирования (антимидин А и СССР – карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона) практически не влияло на частоту биения жгутика;
- добавление пирувата не повышало частоту биения жгутика, если гликолиз был ингибирован с помощью 2-дезоксид-*D*-глюкозы – неметаболизируемого аналога глюкозы.

Однако в том же исследовании было показано, что сперматозоиды способны сохранять подвижность, если единственным источником энергии служит пируват. Для объяснения этого наблюдения была выдвинута гипотеза о том, что пируват служит субстратом для глюконеогенеза, протекающего в митохондриях. Образующаяся в ходе глюконеогенеза глюкоза диффундирует в жгутик, где подвергается гликолизу. Так как 2-дезоксид-*D*-глюкоза ингибирует не только гликолиз, но и глюконеогенез [68, 69], ее присутствие подавляет биение жгутика, индуцируемое как глюкозой, так и пируватом.

Эффективное протекание гликолиза в сперматозоидах обеспечивается наличием гликолитических изоферментов, которые не встречаются в других тканях. В частности, это сперматозоидные формы гексокиназы, фосфофруктокиназы, альдолазы, фосфоглицераткиназы, фосфоглицератмутазы, пируваткиназы, лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDS), роль которой будет рассмотрена более подробно.

Ключевая роль спермоспецифичной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в энергообеспечении сперматозоидов была продемонстрирована в экспериментах, проведенных на мышцах с нокаутированным геном *GAPDS* [70]. Было показано, что в отсутствие этого фермента протекание гликолиза в сперматозоидах полностью прекращается. Уровень АТФ составлял всего 10,4% от нормы; инкубация сперматозоидов в течение 4 ч при температуре 37 °С приводила к его дальнейшему снижению до 2%. Подвижность жгутиков сперматозоидов сохранялась, но также была существенно снижена. При этом вращение, возникающее в среднем отделе жгутика, не распространялось вдоль основного отдела. Такие сперматозоиды были не способны к поступательному движению, а самцы мышей с гомозиготной мутацией оказались стерильными. Потребление кислорода митохондрией и, следовательно, производство АТФ в процессе окислительного фосфорилирования оставалось на прежнем уровне. Структура фиброзного слоя и других компонентов цитоскелета жгутика не проявляла никаких морфологических нарушений. Таким образом, GAPDS является единственным энзиматически

активным изоферментом глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, присутствующим в зрелых сперматозоидах и играющим ключевую роль в обеспечении жгутика энергией АТФ.

В наших работах была исследована взаимосвязь между активностью сперматозоидной изоформы GAPDS и подвижностью сперматозоидов [71]. Было показано, что среднее значение активности GAPDS в образцах сперматозоидов с низкой подвижностью в 2,5 – 3 раза ниже, чем в образцах с высокой подвижностью. Подвижность сперматозоидов снижалась в присутствии аниона супероксида, гидроксильного радикала и перекиси водорода. Снижение подвижности сперматозоидов в присутствии перекиси водорода было пропорционально концентрации окислителя и коррелировало со снижением активности GAPDS ($r = 0,96$). На основании литературных данных о необходимости GAPDS для подвижности сперматозоидов и полученных экспериментальных наблюдений был сделан вывод, что уменьшение подвижности сперматозоидов в присутствии активных форм кислорода происходит в результате окисления GAPDS и ингибирования гликолиза.

Необходимо заметить, что выраженное окисление GAPDS и снижение подвижности сперматозоидов свидетельствуют о том, что система антиоксидантной защиты сперматозоидов не справляется с удалением АФК, и, следовательно, может произойти повреждение ДНК генома. Таким образом, снижение подвижности сперматозоида в ответ на окислительный стресс можно рассматривать как естественный биологический барьер, предотвращающий оплодотворение яйцеклетки сперматозоидом с дефектным геномом. Следовательно, меры по увеличению подвижности сперматозоидов должны быть в первую очередь направлены на устранение причин, приводящих к повышенной продукции АФК (авитаминоз, интоксикация организма, воспалительные заболевания урогенитального тракта).

V. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА GAPDS

До наших работ в литературе практически отсутствовали сведения о каталитических, регуляторных и физико-химических свойствах GAPDS, поскольку выделение фермента из сперматозоидов является достаточно сложной задачей. Так, GAPDS была выделена из сперматозоидов хряка, но авторы не изучали ее каталитические характеристики [72]. Рекомбинантный белок также не удавалось получить, поскольку в процессе его экспрессии образовывались гетеродимеры, содержащие субъединицы рекомбинантного белка и субъединицы

белка клеток-продуцентов. Даже рентгеноструктурный анализ GAPDS был сделан на гибридном тетрамере, состоящем из димеров рекомбинантной GAPDS и димеров GAPD из *E. coli* [73].

Прежде всего, нами была получена GAPDS из сперматозоидов человека, и исследованы некоторые свойства выделенного белка [74]. На этом этапе работы мы оценили свойства лишенной N-концевого фрагмента GAPDS, выделенной из сперматозоидов, что позволило в дальнейшем сравнить ее свойства с рекомбинантным белком и убедиться в его «нативности». Для выделения рекомбинантной GAPDS мы использовали плазмиды, кодирующие полноразмерную GAPDS и GAPDS, лишенную N-концевого фрагмента (dN-GAPDS). В обоих случаях мы не использовали каких-либо дополнительных «тагов», иногда облегчающих выделение фермента, а выделяли ферменты традиционными способами с помощью фракционирования сульфатом аммония и хроматографии. Полноразмерную GAPDS нам не удалось выделить, так как «тельца включения», образующиеся при экспрессии фермента, невозможно было разрушить различными детергентами. dN-GAPDS была выделена в гомогенном виде и подробно охарактеризована различными методами. Ее параметры (удельная активность, pH-зависимость активности и K_m для субстратов), которые мы смогли определить для рекомбинантной и нативной dN-GAPDS, оказались сходными (табл. 1), что позволило нам основные исследования проводить на рекомбинантном ферменте.

Следует отметить, что «нативная» GAPDS из сперматозоидов и рекомбинантная dN-GAPDS были лишены N-концевого фрагмента. Мы считаем, что свойства такого «транкированного белка» лучше моделируют поведение фермента, встроенного в фиброзный слой сперматозоида. У встроенного белка, по крайней мере, один N-концевой фрагмент экранирован белками фиброзного слоя и не может влиять на поведение всей молекулы фермента. Возможно, в сперматозоидах остальные N-концевые фрагменты GAPDS отщепляются от основной полипептидной цепи в результате ограниченного протеолиза, поскольку при обработке гомогенатов сперматозоидов детергентами не удается получить полноразмерные полипептидные цепи. То есть GAPDS в сперматозоидах, вероятно, функционирует в виде тетрамера, закрепленного в фиброзном слое через N-концевой фрагмент одной субъединицы и содержащего еще 3 субъединицы без дополнительных участков.

Анализ данных табл. 1 показывает, что каталитические свойства соматической и спермоспецифичной изоформ дегидрогеназы отличаются. Во-первых, активность GAPDS практически в два раза

Таблица 1. Каталитические свойства выделенной из сперматозоидов и рекомбинантной dN-GAPDS и GAPD

	dN-GAPDS из сперматозоидов	Рекомбинантная dN-GAPDS	GAPD из мышц кролика
Максимальная удельная активность, ед/мг	50	50–60	100–110
pH-оптимум	8,7	8,9	8,9
K_M по глицеральдегид-3-фосфату, мкМ	770	540 ± 70	290 ± 60
K_M по NAD ⁺ , мкМ	23	100 ± 10	270 ± 110
Константа инактивации H ₂ O ₂ , мМ ⁻¹ мин ⁻¹	–	0,54 ± 0,02	0,60 ± 0,07

ниже, чем у соматического фермента. Наибольшая энзиматическая активность dN-GAPDS наблюдалась при pH 8,9, что соответствует значению pH-оптимума GAPD. Константа Михаэлиса dN-GAPDS по глицеральдегид-3-фосфату приблизительно в 2 раза превышала аналогичную величину, определенную для GAPD. В то же время значение константы Михаэлиса dN-GAPDS по NAD⁺ оказалось в 2,5 раза ниже, чем для GAPD. Оба изофермента проявляли одинаковую чувствительность к окислению активного центра пероксидом водорода.

Наиболее интересны особенности кооперативного поведения двух дегидрогеназ. Для соматического фермента характерен достаточно необычный эффект «отрицательной кооперативности» по связыванию кофактора NAD⁺: первые две молекулы кофактора связываются очень прочно (K_d от 10^{-11} до 10^{-7} М, по разным источникам), а две последующие – слабо (K_d от 10^{-5} до 10^{-3} М) [75, 76]. Такой эффект позволяет ферменту все время находится в стабильном состоянии, характерном для холоформы, – комплекса GAPD с NAD⁺, но достаточно хорошо осуществлять катализ за счет действия активных центров с низким сродством к кофакторам. Мы полагаем также, что «отрицательная кооперативность» играет ключевую роль в осуществлении негликолитических функций GAPD. Так, нами было доказано, что окисление сульфгидрильной группы активного центра GAPD приводит к ослаблению связывания кофактора и к увеличению сродства фермента к нуклеиновым кислотам. Возможно, именно этот процесс связан с участием GAPD в индукции апоптоза, а также с диссоциацией и денатурацией фермента при окислительном стрессе.

Для GAPDS мы не обнаружили «отрицательной кооперативности» по связыванию кофактора [77]. Напротив, этот фермент обладает «положительной кооперативностью», характерной для GAPD из дрожжей. Структурные предпосылки для такого изменения кооперативности были изучены нами с помощью сайт-специфического мутагенеза (см. следующие разделы).

VI. ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА GAPDS

При выделении GAPDS из обработанных ультразвуком сперматозоидов человека вся дегидрогеназная активность была обнаружена в нерастворимой фракции клеток. Инкубация этой фракции с трипсином приводила к отщеплению N-концевого фрагмента GAPDS и переходу фермента в раствор. Молекулярная масса очищенной GAPDS составляла около 150 кДа (по данным «голубого нативного электрофореза», позволяющего определить массу белка в неденатурирующих условиях). Молекулярная масса субъединиц GAPDS, определенная при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия, была равна 40кДа. Вероятно, GAPDS представляет собой тетрамер, состоящий из четырех идентичных субъединиц [74]. Сходные результаты были получены для рекомбинантной dN-GAPDS. Для исследования олигомерного состава dN-GAPDS был также использован метод динамического светорассеяния [78]. Полученные с помощью этого подхода значения эффективных гидродинамических диаметров молекул dN-GAPDS и GAPD практически не отличались друг от друга и составляли, соответственно, 9,1 и 8,7 нм. Сделанные наблюдения дают основания утверждать, что рекомбинантная dN-GAPDS, так же как и GAPD, является тетрамером.

VII. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ШАПЕРОНИНА TRIC/ССТ В СВОРАЧИВАНИИ DN-GAPDS

Цитоплазматический шаперонин Tric/ССТ было принято считать главным участником сворачивания структурных белков. Однако в последние годы круг его субстратов расширился. Мы предположили, что Tric/ССТ может быть вовлечен в сворачивание GAPDS, исходя из следующей информации. Во-первых, содержание Tric/ССТ максимально в ретикулоцитах и семенниках. Следовательно, в семенниках данный шаперонин может участвовать в сворачивании специфических для этой ткани белков. Во-вторых, GAPDS обладает N-концевым

фрагментом, который должен встраиваться в фиброзный слой. Для этого процесса могут потребоваться специальные белки, одним из которых может быть Tgic/ССТ. Действительно, нами было показано, что выделенный из семенников шаперонин Tgic/ССТ повышает эффективность ренатурации dN-GAPDS после денатурации в гуанидин гидрохлориде [79]. Было также проверено влияние точечных мутаций на эффективность шаперонин-зависимой ренатурации dN-GAPDS. Было показано, что замена остатков пролина P111, P157, P326 на аланин не оказывает влияния на эффективность шаперонин-зависимой ренатурации соответствующих белков, по сравнению с диким типом. Во всех случаях процесс ренатурации является АТР-зависимым. При этом шаперонин Tgic/ССТ не влияет на ренатурацию соматической GAPD, а ускорение ренатурации соматической лактатдегидрогеназы является АТР-независимым процессом. Таким образом, GAPDS является достаточно специфическим субстратом шаперонина Tgic/ССТ.

VIII. СТАБИЛЬНОСТЬ DN-GAPDS

При выделении и исследовании различных характеристик спермоспецифичной GAPD мы обратили внимание на повышенную стабильность этого фермента, по сравнению с соматической формой. Чувствительность dN-GAPDS к денатурации была определена с использованием трех различных методов: измерения стационарного соотношения концентраций нативных и денатурированных форм белка при различных концентрациях GdnHCl, измерения скорости инактивации в присутствии 4 М GdnHCl и дифференциальной сканирующей калориметрии. Каждый из этих методов позволяет оценить определенный аспект: термодинамическую стабильность при воздействии GdnHCl, кинетическую стабильность активного центра при воздействии GdnHCl и термодинамическую стабильность при воздействии повышенной температуры, соответственно. Было показано, что dN-GAPDS существенно более стабильна, чем GAPD, по всем перечисленным выше параметрам [78]. Биологическая роль повышенной устойчивости GAPDS к денатурации может быть связана с особенностями ее функционирования. Известно, что на завершающих стадиях сперматогенеза происходит инактивация ядерной ДНК и элиминирование большей части цитоплазмы, содержащей молекулы аппарата трансляции. Таким образом, фермент должен функционировать на протяжении всего периода жизни сперматозоида (до 2 недель) для обеспечения энергией его движения. Следовательно,

dN-GAPDS должна обладать повышенной стабильностью, по сравнению с соматической формой, время полужизни которой составляет несколько часов. В пользу данного предположения говорит и то, что другой спермоспецифичный фермент – лактатдегидрогеназа С – также обладает повышенной стабильностью, по сравнению со своими соматическими гомологами [80].

IX. ПРИЧИНЫ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ DN-GAPDS К ДЕНАТУРАЦИИ

Одним из наиболее распространенных механизмов стабилизации белковых молекул является образование поперечных «сшивок», ограничивающих подвижность полипептидной цепи. В качестве таких «сшивок» могут выступать как дисульфидные связи, так и нековалентные взаимодействия (ионные и водородные связи). По данным имеющихся рентгеновских моделей, в составе обоих изоферментов дисульфидные связи не образуются, и, следовательно, повышенная стабильность dN-GAPDS должна объясняться другими причинами.

Было показано, что оба изофермента содержат по 20 ионных связей на субъединицу, 12 из которых являются общими. При этом dN-GAPDS обладает меньшим количеством ионных связей, экспонированных в раствор, но большим количеством ионных связей, скрытых внутри белковой глобулы. Если экспонированные ионные связи, действительно, оказывают дестабилизирующее воздействие, то повышенная стабильность dN-GAPDS может объясняться уменьшением их числа. Наоборот, дополнительные скрытые ионные связи могут повышать устойчивость к денатурации.

Снижение конформационной энтропии полипептидной цепи может быть достигнуто и за счет увеличения жесткости ее остова. В первом приближении, остатки пролина повышают жесткость полипептидной цепи, а остатки глицина снижают, однако оказываемый эффект сильно зависит от их расположения [81]. В составе dN-GAPDS было выявлено семь дополнительных остатков пролина. В то же время, последовательность GAPD содержит девять остатков глицина, отсутствующих в составе dN-GAPDS.

По-видимому, стабильность фермента, участвующего в производстве энергии для движения сперматозоида, имела решающее значение для эффективного оплодотворения, в результате чего образовалась изоформа глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы с повышенной стабильностью. Таким образом, у нас оказался удобный объект для исследования роли отдельных элементов структуры в стаби-

лизации белковой молекулы. Нам представлялось важным выяснить, какие аминокислотные замены позволили обеспечить стабилизацию фермента без существенной потери его ферментативной активности. Эти данные могут быть полезными для создания термостабильных ферментов для применения в производстве и биотехнологии.

При выравнивании последовательностей изоферментов GAPDS и GAPD в последовательности GAPDS было обнаружено 7 дополнительных остатков пролина (рис. 3).

Пролин отличается от других аминокислот по своим конформационным свойствам, поскольку его боковая цепь ковалентно связана с атомом азота предшествующей пептидной связи. Пятичленное пирролидиновое кольцо накладывает жесткие ограничения на вращение вокруг N–Ca-связей. Благодаря этим структурным особенностям остаток Pro может стабилизировать белки, жестко фиксируя их нативную конформацию. Сравнение ферментов из мезофильных и термофильных источников показало, что белки из термофилов содержат больше Pro в неструктурированных участках, β -изгибах и α -спиралях, по сравнению со своими аналогами из мезофилов [81]. Существует ряд примеров успешного увеличения термостабильности белков методом направленного мутагенеза при заменах остальных 19 аминокислот на остатки Pro. Например, введение Pro привело к стабилизации лизоцима фага T4 [82], протеазы из *Bacillus sp.* [83], термолизин-подобной протеазы из *Bacillus stearothermophilus* [84] и олиго-1,6-глюкозидазы из *Bacillus cereus* [85]. Авторы последней работы сформулировали так называемое «пролиновое правило», согласно которому, во-первых, важные для термостабильности остатки Pro, как правило, расположены в (i+1)-м положении β -изгибов и первом положении α -спиралей, и, во-вторых, стабилизирующие эффекты этих Pro независимы и аддитивны.

Интересно, что 6 из 7 дополнительных остатков пролина, обнаруженных в последовательности термостабильной GAPDS, соответствовали пролиновому правилу: три из них попадали на 1-е положение α -спирали (P111, P157, P326) и три (P164, P197 и P213) – на второе положение бета-поворота [78]. Нам показалось интересным проверить, действительно ли данные остатки необходимы для стабилизации сперматозоидной изоформы фермента. С этой целью были получены мутантные белки dN-GAPDS, содержавшие замены указанных остатков пролина (P111, P157, P326, P164, P197 или P213) на аланин, и исследована их термостабильность и устойчивость к денатурации в присутствии гуанидин гидрохлорида. Кроме того, ранее при сравнительном исследовании структур изоферментов

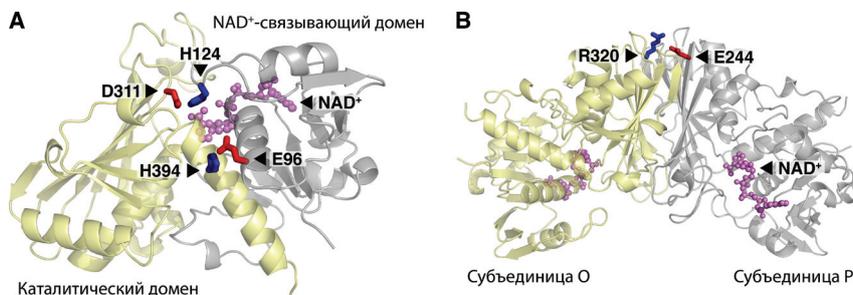


Рис. 4. Междоменные (А) и межсубъединичные (В) солевые мостики, специфичные для изоформы GAPDS. Показаны одна субъединица (А) или две субъединицы (В) тетрамерной молекулы.

GAPD и GAPDS были обнаружены дополнительные скрытые солевые мостики (междоменные солевые мостики E96–H394 и D311–H124 и межсубъединичный мостик E244–R320), которые также могут вносить вклад в стабилизацию молекулы GAPDS [78] (рис. 4).

Для проверки данного предположения был изучен вклад аминокислотных остатков в термостабильность dN-GAPDS с помощью замены остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот, принимающих участие в образовании перечисленных солевых мостиков, соответственно, на глутамин и аспарагин.

Х. ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ НА СТАБИЛЬНОСТЬ DN-GAPDS

Нами было получено 6 мутантных белков dN-GAPDS с заменами пролина на аланин (P111A, P157A, P326A, P164A, P197A и P213A) и 3 мутантных белка dN-GAPDS с мутациями в области дополнительных междоменных и межсубъединичных солевых мостиков (E96Q, D311N, E244Q).

Все полученные препараты обладали ферментативной активностью (табл. 2). Определение размеров молекул мутантных белков методом лазерного динамического светорассеяния и коэффициентов седиментации методом аналитического ультрацентрифугирования показало, что у всех выделенных мутантов эти параметры близки к значениям, характерным для нативного рекомбинантного фермента, и, следовательно, они представляют собой тетрамерные молекулы.

Стабильность полученных препаратов исследовали тремя описанными выше методами. Параллельно с мутантными формами dN-GAPDS исследовали dN-GAPDS дикого типа, а также фермент из мышц кролика (GAPD).

Значения T_m для белков GAPD и dN-GAPDS дикого типа различаются приблизительно на 7° С. Из всех исследованных мутаций пролиновых остатков только одна (P326A) привела к существенному снижению параметра T_m для dN-GAPDS почти на 6 °С (табл. 2). Мутации P164A и P197A приводили к умеренному (3 and 2 °С, соответственно) снижению значения T_m . Среди мутаций в области ионных мостиков к небольшому (2 °С) снижению T_m привела мутация E96Q. Эти данные позволяют предполагать, что остатки P326, P164 и P197, а также междоменный солевой мостик E96-H394 важны для стабильности белка dN-GAPDS.

Исследование инактивации исследуемых белков в присутствии 4 М гуанидин гидрохлорида показало, что две мутации пролина повлияли на скорость разворачивания активного центра в присутствии GdnHCl. В случае P326A константа инактивации увеличилась с 0,13 до 0,15 мин⁻¹. Мутация P111A привела к снижению константы инактивации с 0,13 до 0,07 мин⁻¹. Разрыв междоменного ионного мостика D311-H124 (мутация D311N) привел к существенному (почти в 6 раз) увеличению скорости инактивации dN-GAPDS, по сравнению с белком дикого типа (табл. 2). Остальные мутации не повлияли существенно на скорость инактивации фермента. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что междоменный ионный мостик D311-H124 важен для стабильности активного центра фермента.

Еще один метод, который использовался для оценки стабильности белков – определение доли денатурированного белка при разных концентрациях GdnHCl. Определение соотношения концентраций нативной и денатурированной форм белков в пробах проводили путем анализа спектров триптофановой флуоресценции (возбуждение при 295 нм). Денатурация белков сопровождается сдвигом максимумов эмиссии примерно от 335 до 355 нм. Отношение интенсивностей флуоресценции при данных длинах волн может быть использовано для оценки содержания нативной и денатурированной форм белков в исследуемых растворах [86].

В табл. 2 приведены значения параметра $GdnHCl_{50}$, определенные из графиков инактивации. Для 4-х исследованных мутантных белков (dN-GAPDS P157A, P164A, P213A и D311N) наблюдалось снижение параметра $GdnHCl_{50}$, по сравнению с белком дикого типа. Только в случае мутации P111A значение $GdnHCl_{50}$ увеличилось с 1,89 до 2,29 М. Следовательно, мутации P157A, P164A, P213A и D311N приводят к снижению стабильности белка в отношении GdnHCl. Остальные мутации не влияют на стабильность dN-GAPDS или приводят к увеличению стабильности (P111A).

Таблица 2. Характеристика мутантных форм dN-GAPDS в сравнении с dN-GAPDS дикого типа и мышечной изоформой GAPD

Белок	Локализация остатка/роль в структуре	Удельная активность, мкмоль NADH/мг	Константа инактивации в 4 М GdnHCl, мин ⁻¹	T _m , °C	[GdnHCl] _{50%} , М
GAPD		95 ± 5	>10	61.4 ± 0.5	0.24 ± 0.01; 1.09 ± 0.01
dN-GAPDS		45 ± 5	0.13 ± 0.01	68.6 ± 0.5	1.83 ± 0.02
dN-GAPDS P111A	Первое положение α-спирали	47 ± 3	0.05 ± 0.01	70.5 ± 0.5	2.26 ± 0.02
dN-GAPDS P157A	Первое положение α-спирали	50 ± 3	0.12 ± 0.01	69.1 ± 0.5	1.47 ± 0.02
dN-GAPDS P326A	Первое положение α-спирали	47 ± 3	0.17 ± 0.01	62.6 ± 0.5	1.77 ± 0.01
dN-GAPDS P164A	β-изгиб	47 ± 3	0.12 ± 0.01	65.3 ± 0.5	1.70 ± 0.01
dN-GAPDS P197A	β-изгиб	64 ± 3	0.15 ± 0.01	66.9 ± 0.5	1.82 ± 0.01
dN-GAPDS P213A	β-изгиб	46 ± 3	0.12 ± 0.01	67.5 ± 0.5	1.55 ± 0.01
dN-GAPDS D311N	Междоменный ионный мостик	92 ± 3	0.82 ± 0.01	70.4 ± 0.5	1.35 ± 0.05
dN-GAPDS E96Q	Междоменный ионный мостик	64 ± 5	0.13 ± 0.01	66.6 ± 0.5	1.79 ± 0.02
dN-GAPDS E244Q	Межсубъединичный ионный мостик	60 ± 3	0.13 ± 0.01	68.6 ± 0.5	1.78 ± 0.04

Как видно из табл. 2, наибольший эффект на термостабильность был обнаружен в случае мутантов GAPDS P326A и P164A: значения максимума кривых теплопоглощения (T_m) снизились, соответственно, на 6,0 и 3,3 °C, по сравнению с белком дикого типа. На устойчивость в отношении GdnHCl в наибольшей степени повлияла мутация D311N, разрушавшая ионный мостик между NAD-связывающим и каталитическим доменами: константа инактивации GAPDS в присутствии GdnHCl снизилась в 6 раз, а значение концентрации GdnHCl, при

которой наблюдается полуденатурация белка, снизилось с 1,83 до 1,35 М. Кроме того, мутация D311N увеличивала ферментативную активность GAPDS приблизительно в 2 раза.

Таким образом, R326 (первое положение альфа-спирали) и P164 (бета-изгиб) в наибольшей степени влияют на термостабильность GAPDS, не оказывая существенного влияния на каталитическую активность фермента. Солевой мостик между каталитическим и NAD-связывающим доменами (D311-H124) увеличивает стабильность активного центра в отношении GdnHCl, снижая каталитическую активность в 2 раза, но не вносит вклад в термостабильность молекулы белка.

XI. ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ОБЛАСТИ МЕЖДОМЕННЫХ И МЕЖСУБЪЕДИНИЧНЫХ ИОННЫХ МОСТИКОВ НА ПАРАМЕТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ С КОФАКТОРОМ (NAD⁺)

Исследовано влияние мутаций в области специфических для GAPDS ионных мостиков E96–H394, D311–H124 и E244–R320 (рис. 4) на коэнзим-связывающие характеристики белка dN-GAPDS [77]. Связывание NAD⁺ глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой сопровождается тушением триптофановой флуоресценции, что позволяет исследовать взаимодействие фермента с NAD⁺ методом флуориметрического титрования. Нами было показано, что рекомбинантный спермоспецифичный фермент dN-GAPDS существенно отличается от соматического фермента GAPD по своим кофермент-связывающим характеристикам, определенным методом флуориметрического титрования. В отличие от соматической GAPD, которая проявляет выраженную отрицательную кооперативность по отношению к NAD⁺ [75, 76], dN-GAPD дикого типа проявляет положительную кооперативность при связывании кофермента (табл. 3). Было сделано предположение, что особые NAD-связывающие характеристики белка могут быть связаны с наличием дополнительных ионных мостиков в молекуле dN-GAPDS: E96–H394, D311–H124 и E244–R320 (рис. 4).

Кривые флуоресцентного титрования мутантных форм dN-GAPDS E96Q, D311N и E244Q коферментом представлены на рис. 5. Концентрации связанного и свободного NAD⁺ в каждой точке титрования рассчитывали из экспериментальных значений интенсивности флуоресценции, используя уравнение, предложенное Б.И. Кургановым [87]:

$$[NAD^+]_{bound} = 4[E]_T \frac{1 - F/F_0}{1 - F_\infty/F_0},$$

Таблица 3. Константы диссоциации NAD^+ для dN-GAPDS дикого типа и мутантных форм

Белок	K_1', M	K_2', M	K_3', M	K_4', M
dN-GAPDS дикий тип	$9,3 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$4,6 \times 10^{-7}$
dN-GAPDS E96Q	$1,7 \times 10^{-5}$	$4,7 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-7}$
dN-GAPDS E244Q	$6,9 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$9,1 \times 10^{-7}$	$3,3 \times 10^{-7}$
dN-GAPDS D311N	$9,3 \times 10^{-7}$	$9,3 \times 10^{-7}$	$9,3 \times 10^{-7}$	$9,3 \times 10^{-7}$

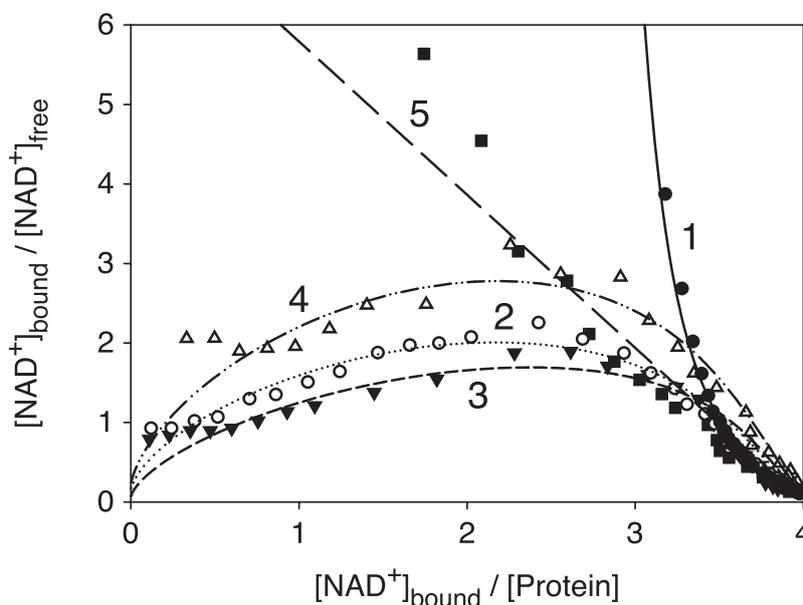


Рис. 5. График связывания кофермента NAD^+ в координатах Скэтчарда для GAPD (1), dN-GAPDS дикого типа (2) и мутантных форм E96Q (3), E244Q (4) и D311N (5).

где $[NAD^+]_{bound}$ – концентрация связанного NAD^+ , $[E]_T$ – общая концентрация фермента, F – интенсивность флуоресценции, F_0 – исходное значение интенсивности флуоресценции (в отсутствие добавленного NAD^+) и F_∞ – конечное значение интенсивности флуоресценции (при насыщении NAD^+). Полученные экспериментальные данные хорошо описывались согласованной моделью Моно-Уаймена-Шанже, а также последовательными моделями Кошланда-Немети-Филмера для тетраэдрических и для квадратных тетрамеров.

Как можно видеть в координатах Скэтчарда, связывание NAD^+ в случае dN-GAPD дикого типа, а также мутаций E96Q и E244Q носит положительно кооперативный характер (кривые 2–4 на рис. 5). Для сравнения приведена кривая титрования фермента из мышц кролика с выраженной отрицательной кооперативностью (кривая 1 на рис. 5). Мутация D311N приводит к исчезновению положительной кооперативности по связыванию NAD^+ (кривая 5 на рис. 5).

Рассчитанные константы диссоциации для всех мутантных dN-GAPDS приведены в табл. 3. Как видно из табл. 3, мутации E96Q и E244Q не оказывают существенного влияния на характер связывания кофермента: во всех случаях константы диссоциации NAD^+ для первой субъединицы в 20–50 раз выше, чем для последней. Однако мутация D311N, разрывающая ионный мостик между NAD -связывающим и каталитическим доменами, существенно изменяет характер взаимодействия с коферментом, устраняя кооперативное связывание NAD^+ (константа диссоциации NAD^+ для всех субъединиц одинакова и составляет $9,3 \times 10^{-7}$ М).

Таким образом, показано, что ионный мостик D311-H124 важен не только для обеспечения стабильности активного центра GAPDS, но также обеспечивает положительную кооперативность по связыванию NAD^+ .

ХИ. ЭКСПРЕССИЯ GAPDS В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ

ЭКСПРЕССИЯ МРНК GAPDS В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ

Известно, что различные спермоспецифичные белки (точнее, белки семенников – «testis specific proteins») могут быть маркерами отдельных типов онкологических заболеваний. Экспериментальные исследования экспрессии мРНК GAPDS к началу нашей работы были немногочисленны, а сведения о синтезе этого белка в каких-либо раковых тканях или раковых клеточных линиях отсутствовали. Однако имелись указания о присутствии необычных форм глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы при некоторых видах злокачественных опухолей [88].

Нами был проведен анализ баз данных по экспрессии мРНК спермоспецифичного белка GAPDS в соматических клетках в норме, а также при различных онкологических заболеваниях. Мы проанализировали базу данных ArrayExpress (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) на предмет транскрипции мРНК GAPDS в здоровых тканях человека и в различных опухолевых линиях. Были также рас-

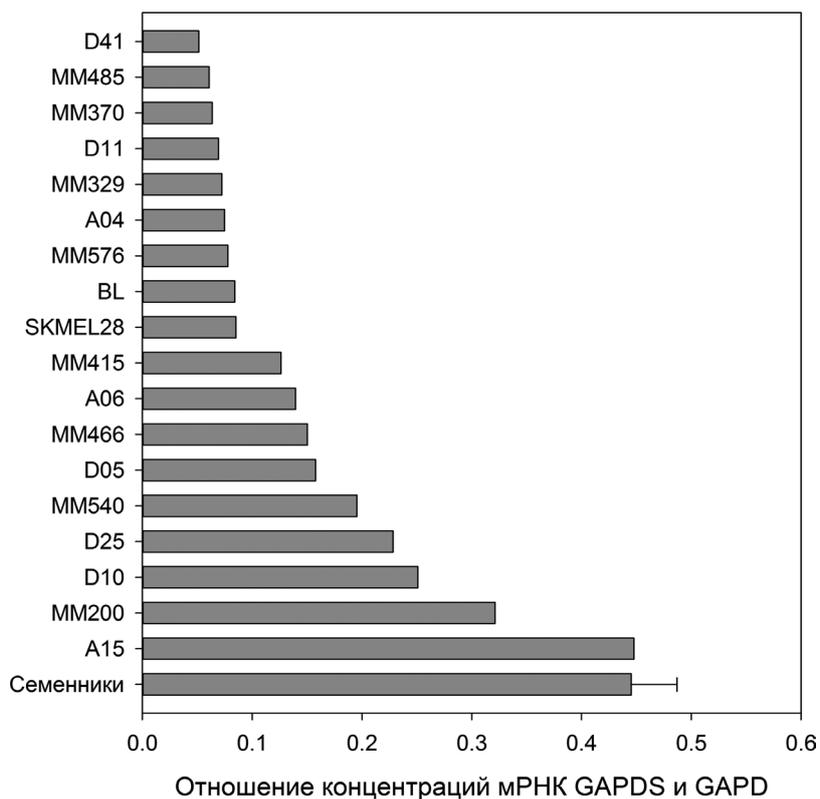


Рис. 6. Уровни транскрипции мРНК GAPDS в различных линиях меланомы и семенниках.

Диаграмма построена по результатам экспериментов ArrayExpress E-TABM-185, E-GEOD-7127, E-GEOD-7307, E-GEOD-10843 (www.ebi.ac.uk/arrayexpress).

смотрены результаты экспериментов E-TABM-185, E-GEOD-2109, E-MTAB-37, E-GEOD-7127, E-GEOD-10843 и E-GEOD-7307 (название экспериментов в базе данных ArrayExpress), в общей сложности содержавшие информацию об уровне транскрипции генов в 9765 образцах (количество контролей и опытных образцов). Проанализированные данные свидетельствуют о том, что в клетках здоровых соматических тканей и большинстве опухолей транскрипция мРНК GAPDS практически не происходит: содержание ее мРНК в среднем на два порядка ниже, чем в семенниках. Однако высокие уровни транскрипции мРНК GAPDS наблюдались в некоторых меланомах (линии A15 и MM200) (рис. 6).

СИНТЕЗ БЕЛКА GAPDS В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ

Мы предположили, что фермент GAPDS может продуцироваться в тех видах опухолей, где уровень транскрипции ее мРНК достаточно велик. Для проверки этого предположения было предложено протестировать различные клеточные линии меланомы на наличие белка GAPDS. Для этого нам были необходимы антитела против GAPDS, причем антитела как против нативной формы GAPDS (для выделения GAPDS из клеточных экстрактов методом иммунопреципитации), так и против денатурированных форм GAPDS (для детекции методом иммуноблоттинга).

Нами был разработан оригинальный метод получения поликлональных антител двух типов, специфически взаимодействующих с нативными или с денатурированными формами GAPDS [89]. Полученные антитела разных типов были использованы для проведения иммунопреципитации, для детекции GAPDS в клетках, а также для идентификации GAPDS после проведения электрофореза в денатурирующих условиях.

Ряд клеточных линий меланомы был протестирован на наличие белка GAPDS методом иммуноблоттинга с использованием полученных поликлональных антител против GAPDS. Материалом для исследования послужили клеточные линии меланомы человека (MelIL, MelKog, MelP). Клеточные линии были ранее получены в РОНЦ им. Н. Н. Блохина и НИИ онкологии им. проф. Н. Н. Петрова [90, 91]. В качестве положительного контроля использовали лизат человеческих сперматозоидов и рекомбинантный белок dN-GAPDS. В качестве отрицательного контроля использовали лизат клеток тератокарциномы и препарат соматической GAPD, полученный из мышц кролика.

В экстракте сперматозоидов окрашивалась полоса молекулярной массой 56 кДа, что согласуется с литературными данными относительно подвижности полноразмерной GAPDS в полиакриламидном геле [49], и полосы 37 и 36 кДа, соответствующие продуктам протеолиза полноразмерного белка GAPDS. В препарате dN-GAPDS также детектировалась полоса 37 кДа. Во всех 3-х исследованных нами клеточных лизатах меланомных линий содержался белок, который взаимодействовал с антителами против GAPDS человека. Окрашенный продукт имел молекулярную массу около 37 кДа [46].

В результате проведенного исследования нам удалось показать, что лизаты меланомных клеток содержат белок, взаимодействующий с антителами против GAPDS. Молекулярная масса обнаруженного белка составляла около 37 кДа. Нам не удалось детектировать в лизатах

меланомных клеточных линий полосу 56 кДа, соответствующую полноразмерной GAPDS. Это может быть обусловлено либо частичным протеолизом полноразмерной GAPDS при получении лизатов, либо протеолизом данного белка в меланомных клетках. Однако мРНК полноразмерного белка GAPDS не обнаруживалась ни в одной из линий меланомных клеток. Таким образом, было показано, что в клетках некоторых линий меланомы продуцируется GAPDS без N-концевого домена. Согласно проведенному в нашей лаборатории анализу матричных РНК из базы данных GenBank, GAPDS без N-концевого фрагмента встречается в активно делящихся соматических клетках (эмбриональные клетки и клетки регенерирующих тканей) у некоторых позвоночных (*Anolis carolinensis*) [52]. В этих случаях отсутствие N-концевого домена GAPDS обусловлено альтернативным сплайсингом. Поскольку N-концевой фрагмент необходим GAPDS для связывания с цитоскелетом жгутика сперматозоида, его наличие не является обязательным для функционирования данного фермента в других клетках.

Присутствие GAPDS в клеточных линиях меланом было подтверждено экспериментами по иммунопреципитации [46]. Для иммунопреципитации мы использовали кроличьи поликлональные антитела против нативной GAPDS, иммобилизованные на протеин G-сефарозе, и лизат клеток меланомы MelKog и MelP. Мы показали, что в клеточных линиях меланом MelKog и MelP содержится белок, который специфически взаимодействует с антителами против GAPDS. Молекулярная масса данного белка 37 кДа, что соответствует массе GAPDS без N-концевого фрагмента. Следует отметить, что содержание этого белка в линии MelKog существенно меньше, чем в линии MelP. Наличие белка GAPDS в экстракте MelP было подтверждено методом MALDI-MS спектрометрии. Выделенный с помощью иммунопреципитации белок содержит также соматическую форму GAPD, причем содержание двух изоформ глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (спермоспецифичной и соматической) в лизате меланомных клеточных линий является близким. Полученные результаты указывают на то, что комплекс, изолированный методом иммунопреципитации из лизата клеточной меланомной линии MelP, содержит гетероолигомерные формы фермента, состоящие из мономера GAPD и GAPDS. Возможно, гетероолигомер GAPD содержит один димер соматического фермента GAPD и один димер спермоспецифичного фермента GAPDS. Ранее были описаны такие гибридные формы GAPDS – при экспрессии крысиной GAPDS в клетках *E. coli* наблюдали образование тетрамеров, содержащих два типа

субъединиц: рекомбинантной GAPDS крысы и собственной GAPD *E. coli* [73]. По-видимому, аналогичную ситуацию мы и наблюдаем в клетках меланомы.

Подтвердив наличие белка GAPDS в некоторых меланомных клеточных линиях, мы решили убедиться, что синтез этого белка является специфичным именно для меланомных клеток. Для этого мы провели оценку уровня транскрипции мРНК GAPDS в ряде немеланомных опухолевых клеточных линиях. Наличие белка GAPDS в лизатах этих клеток анализировали методом Ds-Na-электрофореза и иммуноблоттинга. Как видно из данных, представленных в табл. 4, во всех исследованных клеточных линиях транскрипция мРНК GAPDS практически не происходит, содержание ее мРНК в среднем на два порядка ниже, чем в семенниках. Белковых продуктов, взаимодействующих с антителами против GAPDS, также не было обнаружено.

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ GAPDS В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ

Таким образом, мы показали, что продукция белка GAPDS характерна для меланомных клеток. Как уже упоминалась выше, методом масс-спектрометрического анализа мы подтвердили, что белок, который был нами обнаружен в лизатах меланомных клеточных линий, специфически взаимодействующий с антителами против GAPDS, является спермоспецифичной формой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы без N-концевой аминокислотной последовательности. Поскольку N-концевой фрагмент необходим GAPDS для прикрепления к цитоскелету жгутика сперматозоида, очевидно, что в случае продукции фермента без N-концевого фрагмента белок GAPDS должен находиться в цитозольной фракции, как и цитоплазматическая изоформа GAPD. Чтобы подтвердить наше предположение, мы провели иммунохимическое окрашивание клеток меланомных линий MelP и MelKog с использованием кроличьих поликлональных антител против нативной GAPDS. В качестве отрицательного контроля мы использовали клетки фибробластов, в которых, как нами было показано (табл. 4), белок GAPDS не синтезируется. Результаты иммунохимического окрашивания показали, что GAPDS локализована в цитоплазме клеток меланомы. Фибробласты, которые были использованы в качестве отрицательного контроля, не окрасились. Для обоих типов клеток не наблюдалось окрашивания после обработки только вторичными антителами против IgG кролика. Аналогичные результаты были получены при

Таблица 4. Уровень мРНК GAPD и GAPDS, а также наличие белка GAPDS в некоторых тканях и клеточных линиях

Линия клеток	Ткань или тип клеток	Белок GAPDS (иммуно-блоттинг)	мРНК GAPDS	мРНК GAPD
	Семенники	+	1.0	7.21
	Фибробласты	1.0	0.04	14.87
HEK293T	Эмбриональные клетки почек	–	0.04	8.16
SKOV-3	Рак яичников	–	0.02	6.39
HL60	Промиелоцитная лейкемия	–	0.04	9.72
LnCaP	Аденокарцинома простаты	–	0.03	9.21
Raji	Лимфома Беркитта	–	0.05	15.08
K562	Миелогенная лейкемия	–	0.03	11.29
PC3	Аденокарцинома простаты	–	0.05	12.11
Jurkat	T-лимфобластная лейкемия	–	0.04	14.04
HT-1080	Фибросаркома	–	0.04	8.48
A549	Аденокарцинома легких	–	0.04	13.41
MCF7	Аденокарцинома груди	–	0.03	14.96
RKO	Аденокарцинома прямой кишки	–	0.04	11.30
MelII	Меланома	+		
MelP	Меланома	+	0.01–4*	7–14*
MelKor	Меланома	+		

* дан разброс значений для 63 линий меланомы (GEOD-7127 по данным ArrayExpress).

иммунохимическом окрашивании клеток меланомы MelKor, однако окрашивание GAPDS было менее интенсивным.

Локализация GAPDS в цитоплазме может способствовать формированию гетеролигомеров глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, состоящих из сперматозоидного и соматического ферментов. Формирование таких гибридных белковых молекул, с одной стороны, может приводить к исчезновению некоторых свойственных соматическому ферменту негликолитических функций, а именно, способности

участвовать в апоптозе, с другой стороны, за счет присутствия сперматозоидного фермента, данный гибридный фермент начинает проявлять повышенную устойчивость к различным неблагоприятным воздействиям. В целом, такие вновь приобретенные свойства гетеро-олигомера могут вносить свой вклад в метаболизм опухолевых клеток, приводя к повышению выживаемости клеток и, тем самым, к прогрессии опухоли.

Мы предполагаем, что, возможно, наличие и уровень транскрипта гена GAPDS в меланомных линиях может являться, наряду с транскриптами генов E-кадгерина, N-кадгерина, MITF и S100A4/MTS1, маркером стадии опухолевой прогрессии.

Таким образом, полученные результаты в совокупности с данными литературы дают нам основание предполагать, что продукция GAPDS в линиях меланомы является результатом повышения экспрессии фактора транскрипции MITF, однако данные о связи уровня экспрессии MITF с агрессивностью опухоли противоречивы и требуют дополнительного анализа.

Необходимо напомнить, что белок GAPDS без N-концевой последовательности, обнаруженный в некоторых линиях меланомы, встречается также в активно делящихся соматических клетках некоторых позвоночных (эмбриональные клетки и клетки регенерирующих тканей у ящериц *Anolis carolinensis*) [52]. То есть GAPDS встречается в интенсивно делящихся клетках, и эти клетки не обязательно злокачественные. Возможно, продукция этого белка дает делящимся клеткам какие-то преимущества в получении энергии путем гликолиза. Как было показано раньше, рекомбинантный белок dN-GAPDS (GAPDS без N-концевого домена) сохраняет ферментативную активность и к тому же проявляет повышенную стабильность [78]. Таким образом, продукция этого белка в клетках может влиять на метаболизм.

Таким образом, нам удалось показать, что экстракты некоторых меланомных клеток содержат белок, взаимодействующий с антителами против GAPDS. Молекулярная масса обнаруженного белка составляла около 37 кДа. Поскольку мРНК полноразмерного белка GAPDS не обнаруживалась ни в одной из исследованных линий меланомы, был сделан вывод, что в клетках меланомы экспрессируется ген GAPDS без N-концевого домена. Продукция GAPDS в линиях меланом была подтверждена экспериментами по иммунопреципитации с последующим анализом методами Ds-Na-электрофореза в полиакриламидном геле и MALDI. Иммунохимическое окрашивание клеток линий MelP и MelKog с использованием кроличьих поликлональных антител против нативной GAPDS

показало, что GAPDS находится в цитоплазме клеток. Были проанализированы меланомные линии, соответствующие разным стадиям дифференцировки опухоли. Все случаи обнаружения мРНК GAPDS или белка GAPDS относятся к умеренно дифференцированным линиям. На поздних стадиях развития опухоли (MelSi и MelME) не обнаружено ни мРНК, ни белка GAPDS.

Известно, что среднегодовой темп прироста заболеваемости меланомой кожи является одним из самых высоких среди всех злокачественных опухолей [92, 93]. Эффективность существующих методов лечения меланомы напрямую зависит от стадии диагностики заболевания. К сожалению, несмотря на возможность визуальной локализации, меланома детектируется на начальных (I–II) стадиях лишь у 62–65% пациентов, в то время как в остальных случаях пациенты имеют запущенную форму заболевания [94]. В результате выживаемость больных меланомой достаточно низка. Очевидно, что обнаруженное нами появление белка GAPDS, по крайней мере в некоторых клеточных линиях меланомы, позволяет надеяться на использование этого белка в качестве нового, причем достаточно специфического онкомаркера. Следует отметить, что GAPDS не появляется в других типах злокачественных клеток, а его продукция характерна только для определенной стадии прогрессии меланомы. Безусловно, для разработки диагностического метода, основанного как на выявлении белка GAPDS, так и антител на него в крови пациентов, требуется проведение большого объема исследований в клинических условиях.

Участие GAPD и GAPDS в регуляции метаболизма и индукции апоптоза в нормальных и злокачественных клетках создает предпосылки для создания противоопухолевых препаратов. Разработка способов противоопухолевой терапии требует детального понимания молекулярных и биохимических процессов, лежащих в основе прогрессии меланомы. Активное протекание гликолиза, скорость которого не замедляется в присутствии кислорода, как основного пути для генерации энергии в опухолевых и раковых клетках, известно как эффект Варбурга. Переход на бескислородный способ энергетики, согласно Варбургу, приводит к автономному бесконтрольному существованию клетки: она начинает вести себя как самостоятельный организм, стремящийся к воспроизведению [31, 32]. Возможно, в реализации такого отклонения от регуляции энергетического обмена соматических клеток могут принимать участие и отдельные изоформы некоторых гликолитических ферментов, в частности, GAPDS. Продукция GAPDS в раковых клетках может также приво-

дуть к изменению индукции апоптоза, в которую вовлечена соматическая форма фермента. GAPDS не может участвовать в сложных внутриклеточных перемещениях, характерных для GAPD, ввиду отсутствия специальных мотивов в структуре белка и большей стабильности. Кроме того, GAPDS предотвращает участие соматической формы фермента в индукции апоптоза, взаимодействуя с ее субъединицами и образуя прочные гетерологические тетрамеры. Если предположить, что GAPDS, действительно, вовлечена в указанные выше особенности энергетического метаболизма и апоптоза злокачественных клеток (по крайней мере, меланомных), то специфические лиганды, взаимодействующие только с этой формой фермента, могут быть рассмотрены в качестве противоопухолевых препаратов.

ХIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спермоспецифичная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, безусловно, является очень интересным и удобным объектом для изучения эволюции, каталитического механизма и стабильности фермента. Сравнительный подход, широко применявшийся полвека назад, в сочетании с методами биоинформатики и сайт-специфичного мутагенеза позволяет получать новую важную информацию о структурных основах функционирования различных глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназ, а также других ферментов. Как было показано в наших работах, определенные свойства GAPDS близки к свойствам ферментов из микроорганизмов. Например, GAPDS не обладает отрицательной кооперативностью по связыванию NAD^+ , характерной для соматической GAPD из различных видов млекопитающих, и отличается от соматического фермента по ряду каталитических характеристик. Мы планируем провести сравнительный анализ структуры и каталитических параметров соматической GAPD, GAPDS и GAPD патогенных микроорганизмов (в частности, микобактерий), найти отличия и сходство между этими ферментами и с помощью молекулярного моделирования найти ингибиторы GAPDS и GAPD патогенных микроорганизмов, оказывающие минимальное воздействие на соматическую GAPD. Экспериментальная проверка ингибиторов может быть проведена сначала на рекомбинантных белках, а затем на препаратах сперматозоидов. Хорошо отработанные методы хранения сперматозоидов, а также оценки их подвижности, в сочетании с доступностью сперматозоидов различных домашних животных, делают такой подход достаточно простым и эффективным.

Однако в заключении мы хотели бы подчеркнуть медицинские аспекты изучения спермоспецифичной GAPD. Наиболее очевидна взаимосвязь GAPDS с подвижностью сперматозоидов. Нам удалось показать, что существует прямая корреляция между снижением активности GAPDS (например, под действием активных форм кислорода) и уменьшением подвижности сперматозоидов. Однако это не означает, что для увеличения оплодотворяющей способности сперматозоидов нужно обязательно использовать антиоксиданты. Во-первых, окислительный стресс может быть фактором отбора тех сперматозоидов, которые обладают наилучшей антиоксидантной активностью. Во-вторых, низкие концентрации оксидантов (10 мкМ пероксид водорода) активирует антиоксидантную защиту и увеличивает подвижность сперматозоидов за счет повышения активности GAPDS [95]. Более того, недавно появилась работа, в которой было обнаружено, что локализованная на поверхности акросом GAPDS принимает прямое участие в процессе проникновения сперматозоида в яйцеклетку [96].

Естественно, прямая связь между активностью GAPDS и подвижностью сперматозоидов побудила исследователей искать новые «мужские» контрацептивные средства. Именно для этого несколькими группами исследователей были предприняты попытки выделить GAPDS и установить ее пространственную структуру. Рентгеноструктурный анализ гибридного тетрамера, состоящего из димеров GAPDS и GAPD из *E. coli*, а затем гомотетрамера GAPDS показал, что структуры соматического и сперматозоидного фермента сходны, но не идентичны [73, 97]. Однако задача создания специфического ингибитора GAPDS так и не была решена. Вероятно, эта неудача была связана с тем, что получить абсолютно специфический ингибитор GAPDS очень сложно, а частично ингибировать соматическую форму во всех типах клеток ради достижения контрацептивного эффекта на сперматозоиды нерационально. Однако установленное нами присутствие GAPDS в клетках меланомы вновь поднимает вопрос о поиске специфического ингибитора этого фермента. Подавление гликолиза меланомных клеток ингибиторами GAPDS, тем более при локальном применении, могло бы предотвратить или замедлить развитие этого злокачественного заболевания. Отрывочные сведения о вовлечении GAPDS в индукцию нейродегенеративных заболеваний также дают основания для применения ингибиторов этого фермента с профилактическими или лечебными целями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glaser, P.E., and Gross, R.W. (1995) Rapid plasmemylethanolamine-selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms, *Biochemistry*, **34**, 12193–12203.
2. Robbins, A.R., Ward, R.D., and Oliver, C. (1995) A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells, *The Journal of*, **130**, 1093–1104.
3. Raje, C.I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J.S., Raje, M. (2007) The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor, *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 3252–3261.
4. Hessler, R.J., Blackwood, R.A., Brock, T.G., Francis, J.W., Harsh, D.M., Smolen, J.E. (1998) Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a Ca²⁺-dependent fusogen in human neutrophil cytosol, *Journal of Leukocyte Biology*, **63**, 331–336.
5. Muronetz, V.I., Wang, Z.X., Keith, T.J., Knull, H.R., Srivastava, D.K. (1994) Binding constants and stoichiometries of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-tubulin complexes, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **313**, 253–260.
6. Volker, K.W., Reinitz, C.A., and Knull, H.R. (1995) Glycolytic enzymes and assembly of microtubule networks, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, **112**, 503–514.
7. Cueille, N., Blanc, C.T., Riederer, I.M., Riederer, B.M. (2007) Microtubule-associated protein 1B binds glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Proteome Research*, **6**, 2640–2647.
8. Брыксин А.В., Лактионов П.П. (2008) Роль глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в везикулярном транспорте, протекающем в клетке между аппаратом Гольджи и эндоплазматическим ретикулумом, *Биохимия*, **73**, 773–781.
9. Tisdale, E.J., Azizi, F., and Artalejo, C.R. (2009) Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C {iota} to associate with microtubules and to recruit dynein, *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 5876–5884.
10. Engel, M., Seifert, M., Theisinger, B., Seyfert, U., Welter, C. (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and Nm23-H1/nucleoside diphosphate kinase A. Two old enzymes combine for the novel Nm23 protein phosphotransferase function, *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 20058–20065.
11. Duclos-Vallée, J.C., Capel, F., Mabit, H., Petit, M.A. (1998) Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity, *The Journal of General Virology*, **79**, 1665–1670.
12. Dai, R.-P., Yu, F.X., Goh, S.R., Chng, H.W., Tan, Y.L., Fu, J.L., Zheng, L., Luo, Y. (2008) Histone 2B (H2B) expression is confined to a proper NAD⁺/NADH redox status, *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 26894–28901.
13. Li, Y., Huang, T., Zhang, X., Wan, T., Hu, J., Huang, A., Tang, H. (2009) Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binding to hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in regulating expression of HBV surface antigen, *Archives of Virology*, **154**, 519–524.
14. Kondo, S., Kubota, S., Mukudai, Y., Nishida, T., Yoshihama, Y., Shirota, T., Shintani, S., Takigawa, M. (2011) Binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to the cis-acting element of structure-anchored

- repression in *ccn2* mRNA, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **405**, 382–387.
15. Sundararaj, K.P., Wood, R.E., Ponnusamy, S., Salas, A.M., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Ogretmen, B. (2004) Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 6152–6162.
 16. Demarse, N.A., Ponnusamy, S., Spicer, E.K., Apohan, E., Baatz, J.E., Ogretmen, B., Davies, C. (2009) Direct binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation, *Journal of Molecular Biology*, **394**, 789–803.
 17. Nakagawa, T., Hirano, Y., Inomata, A., Yokota, S., Miyachi, K., Kaneda, M., Umeda, M., Furukawa, K., Omata, S., Horigome, T. (2003) Participation of a fusogenic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in nuclear membrane assembly, *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 20395–20404.
 18. Singh, R., and Green, M.R. (1993) Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Science (New York, N.Y.)*, **259**, 365–368.
 19. Meyer-Siegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J.K., Sirover, M.A. (1991) A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 8460–8464.
 20. Azam, S., Jouvet, N., Jilani, A., Vongsamphanh, R., Yang, X., Yang, S., Ramotar, D. (2008) Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1, *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 30632–30641.
 21. Arutyunova, E.I., Danshina, P.V., Domnina, L.V., Pleten, A.P., Muronetz, V.I. (2003) Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances its binding to nucleic acids, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 547–552.
 22. Hara, M.R., Cascio, M.B., and Sawa, A. (2006) GAPDH as a sensor of NO stress, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1762**, 502–509.
 23. Hara, M.R., and Snyder, S.H. (2006) Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade, *Cellular and Molecular Neurobiology*, **26**, 527–538.
 24. Sen, N., Hara, M.R., Kornberg, M.D., Cascio, M.B., Bae, B.I., Shahani, N., Thomas, B., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Snyder, S.H., Sawa, A. (2008) Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis, *Nature Cell Biology*, **10**, 866–873.
 25. Hwang, N.R., Yim, S.H., Kim, Y.M., Jeong, J., Song, E.J., Lee, Y., Lee, J.H., Choi, S., Lee, K.J. (2009) Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions, *The Biochemical Journal*, **423**, 253–264.
 26. Mazzola, J.L., and Sirover, M.A. (2001) Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease and in Huntington's disease fibroblasts, *Journal of Neurochemistry*, **76**, 442–449.
 27. Naletova, I., Schmalhausen, E., Kharitonov, A., Katrukha, A., Saso, L., Caprioli, A., Muronetz, V. (2008) Non-native glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1784**, 2052–2058.

28. 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**, 369–393.
29. Mazzola, J.L., and Sirover, M.A. (2002) Alteration of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase structure in Huntington's disease fibroblasts, *Brain Research. Molecular Brain Research*, **100**, 95–101.
30. Bae, B.-I., Hara, M.R., Cascio, M.B., Wellington, C.L., Hayden, M.R., Ross, C.A., Ha, H.C., Li, X.J., Snyder, S.H., Sawa, A. (2006) Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3405–3409.
31. Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924) Ueber den stoffwechsel der tumoren, *Biochem. Zeitschrift*, **152**, 319–344.
32. Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells, *Science (New York, N.Y.)*, **123**, 309–314.
33. Schmalhausen, E. V & Muronetz, V.I. (1997) An uncoupling of the processes of oxidation and phosphorylation in glycolysis, *Bioscience Reports*, **17**, 521–527.
34. Schmalhausen, E. V., Nagradova, N.K., Boschi-Muller, S., Branlant, G., Muronetz, V.I. (1999) Mildly oxidized GAPDH: the coupling of the dehydrogenase and acyl phosphatase activities, *FEBS Letters*, **452**, 219–222.
35. Weber, J.P., and Bernhard, S.A. (1982) Transfer of 1,3-diphosphoglycerate between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase via an enzyme-substrate-enzyme complex, *Biochemistry*, **21**, 4189–4194.
36. Sukhodolets, M. V., Muronetz, V.I., Tsuprun, V.L., Kaftanova, A.S., Nagradova, N.K. (1988) Association of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. The biochemical and electron-microscopic evidence, *FEBS Letters*, **238**, 161–166.
37. Tompa, P., and Batke, J. (1990) Fructose-1,6-bisphosphate aldolase preferentially associates to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a mixture of cytosolic proteins as revealed by fluorescence energy transfer measurements, *Biochemistry International*, **20**, 487–494.
38. Fokina, K. V., Dainyak, M.B., Nagradova, N.K., Muronetz, V.I. (1997) A study on the complexes between human erythrocyte enzymes participating in the conversions of 1,3-diphosphoglycerate, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **345**, 185–192.
39. Clarke, F.M., and Masters, C.J. (1975) On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle, *Biochimica et Biophysica Acta*, **381**, 37–46.
40. Ryazanov, A.G., Ashmarina, L.I., and Muronetz, V.I. (1988) Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with mono- and polyribosomes of rabbit reticulocytes, *European Journal of Biochemistry / FEBS*, **171**, 301–305.
41. Walsh, J.L., Keith, T.J., and Knull, H.R. (1989) Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules, *Biochimica et Biophysica Acta*, **999**, 64–70.
42. 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**, 133–140.
43. Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R.M., Elstner, M., Leesch, W., Jagod-

- zinski, F.B., Stupak, D.P., Sugrue, M.M., Tatton, N.A. (2000) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling, *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, **60**, 77–100.
44. Lee, S.Y., Kim, J.H., Jung, H., Chi, S.W., Chung, S.J., Lee, C.K., Park, B.C., Bae, K.H., Park, S.G. (2012) Glyceraldehyde-3-phosphate, a glycolytic intermediate, prevents cells from apoptosis by lowering S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 571–573.
45. Арутюнова Е.И., Домнина Л.В., Чудинова А.А., Макшакова О.Н., Арутюнов Д.Ю., Муронец В.И. (2013) Локализация ненативных форм D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в клетках HeLa в ходе нормального роста и апоптоза, *Биохимия*, **78**, 118–123.
46. Sevostyanova, I.A., Kulikova, K.V., Kuravsky, M.L., Schmalhausen, E.V., Muronetz, V.I. (2012) Sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is expressed in melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **427**, 649–653.
47. Li, Y., Nowotny, P., Holmans, P., Smemo, S., Kauwe, J.S., Hinrichs, A.L., Tacey, K., Doil, L., van Luchene, R., Garcia, V., Rowland, C., Schrodi, S., Leong, D., Gogic, G., Chan, J., Cravchik, A., Ross, D., Lau, K., Kwok, S., Chang, S.Y., Catanese, J., Sninsky, J., White, T.J., Hardy, J., Powell, J., Lovestone, S., Morris, J.C., Thal, L., Owen, M., Williams, J., Goate, A., Grupe, A. (2004) Association of late-onset Alzheimer's disease with genetic variation in multiple members of the GAPD gene family, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 15688–15693.
48. Welch, J.E., Schatte, E.C., O'Brien, D.A., Eddy, E.M. (1992) Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells, *Biology of Reproduction*, **46**, 869–878.
49. Welch, J.E., Brown, P.L., O'Brien, D.A., Magyar, P.L., Bunch, D.O., Mori, C., Eddy, E.M. (2000) Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells, *Journal of Andrology*, **21**, 328–338.
50. Bunch, D.O., Welch, J.E., Magyar, P.L., Eddy, E.M., O'Brien, D.A. (1998) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis, *Biology of Reproduction*, **58**, 834–841.
51. Куравский М.Л. и Муронец В.И. (2007) Соматическая и сперматозоидная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа: сравнительный анализ первичных структур и функциональных особенностей, *Биохимия*, **72**, 915–922.
52. Kuravsky, M.L., Aleshin, V.V., Frishman, D., Muronetz, V.I. (2011) Testis-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: origin and evolution, *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 160.
53. Kamp, G., Büsselmann, G., Lauterwein J. (1996) Spermatozoa: models for studying regulatory aspects of energy metabolism, *Experientia*, **52**, 487–494.
54. Turner, R.M. (2003) Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?, *Journal of Andrology*, **24**, 790–803.
55. Ford, W.C.L. (2006) Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round?, *Human Reproduction Update*, **12**, 269–274.
56. Nevo, A.C., Rikmenspoel, R. (1970) Diffusion of ATP in sperm flagella, *Journal of Theoretical Biology*, **26**, 11–18.

57. Adam, D.E., Wei, J. (1975) Mass transport of ATP within the motile sperm, *Journal of Theoretical Biology*, **49**, 125–145.
58. Gage, M.J. (1998) Mammalian sperm morphometry, *Proceedings Biological Sciences / The Royal Society*, **265**, 97–103.
59. Nicholls, D.G., Ferguson, S.J. (2002) *Bioenergetics*. 3rd edition. Academic Press.
60. Tombes, R.M., Shapiro, B.M. (1985) Metabolite channeling: a phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail, *Cell*, **41**, 325–334.
61. Tombes, R.M., Shapiro, B.M. (1987) Enzyme termini of a phosphocreatine shuttle. Purification and characterization of two creatine kinase isozymes from sea urchin sperm, *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 16011–16019.
62. Steeghs, K., Oerlemans, F., Wieringa, B. (1995) Mice deficient in ubiquitous mitochondrial creatine kinase are viable and fertile, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1230**, 130–138.
63. Yeung, C.H., Majumder, G.C., Rolf, C., Behre, H.M., Cooper, T.G. (1996) The role of phosphocreatine kinase in the motility of human spermatozoa supported by different metabolic substrates, *Molecular Human Reproduction*, **2**, 591–596.
64. Smith, M.B., Babcock, D.F., Lardy, H.A. (1985) A ³¹P NMR study of the epididymis and epididymal sperm of the bull and hamster, *Biology of Reproduction*, **33**, 1029–1040.
65. Robitaille, P.M., Robitaille, P.A., Martin, P.A., Brown, G.G. (1987) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of spermatozoa from the boar, ram, goat and bull, *Comparative Biochemistry and Physiology B, Comparative Biochemistry*, **87**, 285–296.
66. Mita, M., Ueta, N. (1988) Energy metabolism of sea urchin spermatozoa, with phosphatidylcholine as the preferred substrate, *Biochimica et Biophysica Acta*, **959**, 361–369.
67. Mukai, C., Okuno, M. (2004) Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement, *Biology of Reproduction*, **71**, 540–547.
68. Hiipakka, R.A., Hammerstedt, R.H. (1978) 2-Deoxyglucose transport and phosphorylation by bovine sperm, *Biology of Reproduction*, **19**, 368–379.
69. Hyne, R. V., Edwards, K.P. (1985) Influence of 2-deoxy-D-glucose and energy substrates on guinea-pig sperm capacitation and acrosome reaction, *Journal of Reproduction and Fertility*, **73**, 59–69.
70. Miki, K., Qu, W., Goulding, E.H., Willis, W.D., Bunch, D.O., Strader, L.F., Perreault, S.D., Eddy, E.M., O'Brien, D.A., Brien, D.A.O. (2004) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 16501–16506.
71. Элькина Ю.Л., Атрощенко М.М., Брагина Е.Е., Муронец В.И., Шмальгаузен Е.В. (2011) Окисление глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы снижает подвижность сперматозоидов, *Биохимия*, **76**, 268–272.
72. Westhoff, D., Kamp, G. (1997) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa, *Journal of Cell Science*, **110**, 1821–1829.
73. Frayne, J., Taylor, A., Cameron, G., Hadfield, A.T. (2009) Structure of insoluble rat sperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) via heterotetramer formation with *Escherichia coli* GAPDH reveals

- target for contraceptive design, *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 22703–22712.
74. Щуцкая, Ю.Ю., Элькина, Ю.Л., Куравский, М.Л., Брагина, Е.Е., Шмальгаузен, Е.В. (2008) Исследование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека, *Биохимия*, **73**, 228–236.
75. Conway, A., Koshland, D.E. (1968) Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry*, **7**, 4011–4023.
76. de Vijlder, J.J., Slater, E.C. (1968) The reaction between NAD⁺ and rabbit-muscle glyceraldehydephosphate dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **167**, 23–34.
77. Kuravsky, M.L., Barinova, K.V., Asryants, R.A., Schmalhausen, E.V., Muronetz, V.I. (2015) Structural basis for the NAD binding cooperativity and catalytic characteristics of sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochimie*, **115**, 28–34.
78. Elkina, Y.L., Kuravsky, M.L., El'darov, M.A., Stogov, S.V., Muronetz, V.I., Schmalhausen, E.V. (2010) Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structural basis for enhanced stability, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**, 2207–2212.
79. Naletova, I.N., Popova, K.M., Eldarov, M.A., Kuravsky, M.L., Schmalhausen, E.V., Sevostyanova, I.A., Muronetz, V.I. (2011) Chaperonin TRiC assists the refolding of sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* **516**, 75–83.
80. Goldberg, E. (1972) Amino acid composition and properties of crystalline lactate dehydrogenase X from mouse testes, *J. Biol. Chem.*, **247**, 2044–2048.
81. Bogin, O., Peretz, M., Hacham, Y., Korkhin, Y., Frolow, F., Kalb(Gilboa), A.J., Burstein, Y. (1998) Enhanced thermal stability of *Clostridium beijerinckii* alcohol dehydrogenase after strategic substitution of amino acid residues with prolines from the homologous thermophilic *Thermoanaerobacter brockii* alcohol dehydrogenase, *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, **7**, 1156–1163.
82. Matthews, B.W., Nicholson, H., Becktel, W.J. (1987) Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 6663–6667.
83. Masui, A., Fujiwara, N., Imanaka, T. (1994) Stabilization and rational design of serine protease AprM under highly alkaline and high-temperature conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3579–3584.
84. Veltman, O.R., Vriend, G., Middelhoven, P.J. (1996) Analysis of structural determinants of the stability of thermolysin-like proteases by molecular modelling and site-directed mutagenesis, *Protein Eng.*, **9**, 1181–1189.
85. Watanabe, K., Masuda, T., Ohashi, H., Mihara, H., Suzuki, Y. (1994) Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule, *Eur. J. Biochem.*, **226**, 277–283.
86. Fan, H., Liu, J., Ren, W., Zheng, Z., Zhang, Y., Yang, X., Li, H., Wang, X., and Zou, G. (2008) pH induces thermal unfolding of UTI: an implication of reversible and irreversible mechanism based on the analysis of thermal stability, thermodynamic, conformational characterization, *J. Fluoresc.*, **18**, 305–317.

87. Kurganov, V.I., Sugrobova, N.P., Yakovlev, V.A. (1972) Estimation of dissociation constant of enzyme-ligand complex from fluorometric data by «difference» method, *FEBS Lett.*, **19**, 308–310.
88. Папра С., Гош С., Бера С., Рой А., Рей С., Рей М. (2009) Молекулярная характеристика глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, связанной с опухолью, *Биохимия*, **74** 886–898.
89. Kuravsky, M.L., Schmalhausen, E.V., Pozdnyakova, N.V., Muronetz, V.I. (2012) Isolation of antibodies against different protein conformations using immunoaffinity chromatography, *Analytical Biochemistry*, **426**, 47–53.
90. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф., Бутова О.С., Панкина Т.Н., Козлов А.М., Голубева В.А., Черемушкин Е.А., Дорошенко М.Б., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Ларин С.С., Георгиев Г.П. (2005) Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин, *Вестник Российской Академии медицинских наук*, **7**, 37–40.
91. Mikhaylova, I.N., Kovalevsky, D.A., Morozova, L.F., Golubeva, V.A., Cheremushkin, E.A., Lukashina, M.I., Voronina, E.S., Burova, O.S., Utyashev, I.A., Kiselev, S.L., Demidov, L.V., Beablashvilli, R.Sh., Baryshnikov, A.Y. (2008) Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines, *Melanoma Research*, **18**, 303–313.
92. Лемехов В.Г. (2001) Эпидемиология, факторы риска, скрининг меланомы кожи, *Практическая Онкология*, **2**, 3–11.
93. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*, **127**, 2893–2917.
94. Двойрин В.В., Трапезников Н.Н. и Михайловский, А.В. (1997) Статистика меланомы кожи в России, *Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН*, **8**, 3–12.
95. Евдокимов В.В., Барина К.В., Туровецкий В.Б., Муронец В.И., Шмальгаузен Е.В. (2015) Низкие концентрации H₂O₂ активируют систему антиоксидантной защиты сперматозоидов человека, *Биохимия*, **80**, 1431–1439.
96. Margaryan, H., Dorosh, A., Capkova, J., Manaskova-Postlerova, P., Philimonenko, A., Hozak, P., Peknicova, J. (2015) Characterization and possible function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-spermatogenic protein GAPDHS in mammalian sperm, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **13**, 15.
97. Chaikuad, A., Shafqat, N., Al-Mokhtar, R., Cameron, G., Clarke, A.R., Brady, R.L., Oppermann, U., Frayne, J., Yue, W.W. (2011) Structure and kinetic characterization of human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDS, *Biochem. J.*, **435**, 401–409.