БИОХИМИЯ, 2019, том 84, вып. 11, с. 1578 – 1591

УДК 577.151

ИНГИБИТОРЫ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И НЕОЖИДАННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ СНИЖЕНИЯ ЕЕ АКТИВНОСТИ

Обзор

© 2019 В.И. Муронец[1,2*,], А.К. Мельникова[2**], К.В. Баринова[1], Е.В. Шмальгаузен[1**]**

[1] *НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия; электронная почта: vimuronets@belozersky.msu.ru*

[2] *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 11.06.2019
После доработки 11.08.2019
Принята к публикации 14.08.2019

В обзоре рассмотрено использование ингибиторов глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) для изучения этого фермента и подавления его активности в различных типах клеток. Основная проблема специфического ингибирования ГАФД заключается в высокой консервативности активного центра фермента и, особенно, окружения необходимой для катализа сульфгидрильной группы остатка Cys150. Многочисленные попытки найти ингибиторы спермоспецифичной ГАФД, а также ГАФД трипаносом (*Trypanosoma* sp.) и микобактерий (*Mycobacterium tuberculosis*), которые бы не оказывали существенного воздействия на фермент соматических клеток млекопитающих, не привели к практически важным результатам, что заставляет искать новые пути решения этой задачи. Отдельные разделы посвящены инактивации фермента активными формами кислорода, глутатионом и гликирующими соединениями. В заключительном разделе обсуждаются последствия, к которым приводит ингибирование, а также инактивация ГАФД. В частности, рассматривается влияние изменения активности ГАФД на эффективность гликолиза и на связанные с ним метаболические пути (пентозофосфатный путь, «футильный» цикл разобщения окисления и фосфорилирования в гликолизе и другие).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ингибиторы, окисление, сульфгидрильные группы, гликирование, гликолиз.

DOI: 10.1134/S0320972519110058

Изучение глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) на кафедре биохимии животных биологического факультета МГУ было начато более 60 лет назад Натальей Константиновной Наградовой [1]. Как и многие другие направления, оно было инициировано Сергеем Евгеньевичем Севериным с целью выявления воздействия дипептидов – карнозина и анзерина – на различные процессы: функционирование клеток и отдельных органелл, метаболические пути и поведение ферментов. Специфического влияния дипептидов на ГАФД в первых работах Н.К. Наградовой обнаружить не удалось, и их воздействие на ферменты было объяснено буферным или хелатирующим действием дипептидов [2]. Однако именно эти работы послужили основой для многолетнего и разностороннего изучения глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы сначала на кафедре, а затем в созданном С.Е. Севериным отделе биохимии животной клетки НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Более 150 статей о глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе, в том числе обзоры и монография, были опубликованы за эти годы сотрудниками нашей лаборатории. Пророческие слова С.Е. Северина, перефразировавшего известное изречение, «Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа неисчерпаема как атом» подтверждаются возрастающим интересом к этому ферменту, который продолжают изучать как ученики Н.К. Наградовой, так и другие исследователи.

Принятые сокращения: ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ГАФД-с – спермоспецифичная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, GSH – восстановленный глутатион, ДГАФ – дигидроксиацетонфосфат.

* Адресат для корреспонденции.

** Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа катализирует одну из реакций гликолиза, так называемую реакцию гликолитической оксидоредукции, являющуюся важной стадией как анаэробного, так и аэробного энергетического пути. В ходе этой реакции образуется макроэргическое соединение – 1,3-дифосфоглицерат, необходимый для синтеза ATP на последующих стадиях гликолиза, и NADH. В анаэробных условиях (у анаэробных микроорганизмов или у аэробных организмов при гипоксии) гликолиз является единственным источником энергии, при этом NADH используется при восстановлении пирувата до лактата. Не меньшее значение имеет ГАФД для энергообеспечения в аэробных условиях, поскольку в этом случае пируват и NADH необходимы для синтеза ATP митохондриями. Следует также отметить, что в аэробных условиях определенное значение для бесперебойного образования субстратов окислительного фосфорилирования в митохондриях может иметь разобщение окисления и фосфорилирования в гликолизе. Такое разобщение может происходить при мягком окислении ГАФД из-за появления у фермента ацил-фосфатазной активности, как было показано в наших работах ранее [3–5]. Гидролиз 1,3-дифосфоглицерата окисленной ГАФД позволяет при недостатке ADP обходить 3-фосфоглицераткиназную реакцию и синтезировать пируват и NADH, необходимые для окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Однако, несмотря на важность ГАФД и ее интенсивное изучение (на этом объекте была сделана значительная часть фундаментальных энзимологических исследований), долгое время ГАФД не считали перспективной мишенью для воздействия на жизнедеятельность клетки. Причин такого «пренебрежительного» отношения к ферменту было несколько. Во-первых, содержание ГАФД во всех клетках очень велико (5–15% от общего содержания растворимых белков) [6], во-вторых, этот белок синтезируется постоянно и относится к белкам «домашнего хозяйства» («housekeeping») [6], и, в-третьих, информация о регуляторных воздействиях на ГАФД долгое время практически отсутствовала. Казалось очевидным, что ингибировать такой фермент, который никак нельзя отнести к «ключевым» ферментам гликолиза (в отличие от фосфофруктокиназы), не имеет смысла из-за его исходной очень высокой общей активности. Более того, существование альтернативных метаболических путей, например, пентозофосфатного, ограничивало применение ингибиторов ГАФД для уменьшения жизнеспособности клеток. Даже после ингибирования этого участка гликолиза энергоснабжение клеток могло быть обеспечено из других источников, прежде всего, за счет окислительного фосфорилирования в митохондриях.

Высокая концентрация фермента, его присутствие во всех типах клеток, конститутивный синтез сделали его основным белковым маркером, который служит для нормирования концентрации других белков при всех типах воздействий. В тысячах статей, в которых упоминается ГАФД (GAPDH или GPDH), речь идет не об изучении этого фермента, а просто о его использовании в качестве белка-маркера. Однако постепенно накапливается информация о том, что ГАФД может участвовать в регуляции жизнедеятельности клеток, и, изменяя ее активность, можно воздействовать не только на энергетический обмен, но и на другие процессы. Стало понятно, что каталитическая активность ГАФД не столь велика, поскольку pH оптимум этого фермента лежит в щелочной области (pH 9–10), а при физиологических значениях pH активность ГАФД значительно ниже (~30–40% от максимальной). Кроме того, содержание ГАФД может существенно изменяться при различных патологических процессах как за счет снижения синтеза белка, так и из-за его денатурации и накопления неактивных агрегированных форм. Возникли сомнения в правомерности использования ГАФД в качестве основного белка-маркера из-за вариабельности его содержания в анализируемых образцах [7, 8]. Особое значение имеет информация о вовлечении ГАФД в развитие различных заболеваний, например, нейродегенеративных болезней амилоидной природы [9–11]. При этом ГАФД может участвовать как в изменении энергоснабжения клеток при этих патологиях, так и непосредственно вовлекаться в формирование амилоидных агрегатов. Все эти наблюдения придают новое значение исследованиям действия ингибиторов на функционирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

В представленном обзоре мы рассматриваем информацию о действии различных ингибиторов как на свойства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, так и на изменение метаболизма в целом.

ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТА

В течение десятилетий исследование действия ингибиторов на каталитические свойства ГАФД было основным методом выяснения механизма действия этого фермента, вплоть до появления 70-х гг. сведений о его простран-

ственной структуре. Этой теме можно было бы посвятить отдельный обзор, но, как минимум, следует упомянуть имена крупнейших биохимиков 20-го столетия, которые проводили эти исследования. В работах нобелевского лауреата Пола Бойера (Cardon and Boyer [12]), Даниеля Кошланда (Koshland [13]), Сиднея Бернхарда (Malhotra and Bernhard [14]) и многих других был установлен механизм реакции, катализируемой ГАФД, а также общие закономерности функционирования сложного олигомерного фермента. Сделанные наблюдения позволили сформировать представления о взаимодействии фермента с субстратом (модель индуцированного соответствия «рука-перчатка» Byers and Koshland [15] и Levitzki and Koshland [16]), о роли кооперативных процессов в регуляции фермента и о многих других классических законах энзимологии. Интенсивное изучение ингибирования и инактивации ГАФД, проведенное Н.К. Наградовой и ее сотрудниками, внесло существенный вклад в выяснение роли отдельных аминокислотных остатков в функционировании ГАФД [17–19]. Так, впервые была доказана роль остатков Arg в регуляции активности ГАФД [20–22] и установлена роль мягкого окисления остатка Cys150 активного центра в разобщении окисления и фосфорилирования в гликолизе [3–5]. Использование аналогов кофермента NAD позволило получить новую информацию об особенностях его связывания с ферментом [23, 24], а анализ взаимодействия ГАФД из разных источников с так называемыми «полуцентровыми реагентами» (half-of-the-site reagents) – выяснить новые механизмы кооперативности работы активных центров белка [17, 25, 26]. После появления сведений о пространственной структуре ГАФД группой Branlant с помощью сайт-специфического мутагенеза была подтверждена или уточнена информация, исходно основанная на ингибиторном анализе [27, 28]. Завершение фундаментальных исследований механизма функционирования ГАФД и появление новых экспериментальных подходов привело к угасанию интереса к ингибиторному анализу, как основному подходу классической энзимологии, хотя, на наш взгляд, его комбинация с молекулярным моделированием, рентгеноструктурным анализом и сайт-специфическим мутагенезом могла бы решить ряд задач (особенности эффекта «полуцентровой реактивности» у ГАФД из разных источников, идентификацию структурных мотивов, вовлеченных в кооперативную работу активных центров, роль второго остатка Cys154 в активном центре фермента и др.).

ИНАКТИВАЦИЯ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЕСТЕСТВЕННЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ – ОКИСЛЕНИЕ И S-ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЕ

Каталитическая функция остатка Cys150 активного центра глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы досконально изучена – именно он взаимодействует с коферментом NAD с образованием «комплекса с переносом заряда», а затем ацилируется субстратом реакции, глицеральдегид-3-фосфатом. Естественно, что любая модификация этого остатка или его замена на другие остатки приводит к полной инактивации фермента. Наличие высоко реакционноспособной сульфгидрильной группы участвующего в каталитическом акте остатака Cys150 в каждом из четырех активных центров ГАФД делает этот фермент легкодоступным для целого ряда модификаций – алкилирование, нитрозилирование, окисление и другие. Мы остановимся в этом разделе только на окислении и S-глутатионилировании фермента, а гликирование, затрагивающее в основном остатки Lys и Arg, рассмотрим в заключительной части обзора.

Одним из наиболее важных естественных путей ингибирования ГАФД является окисление каталитических остатков Cys150 перекисью водорода. Механизм окисления ГАФД перекисью водорода достаточно подробно описан, в том числе в наших работах. Сульфгидрильные группы (SH) остатка Cys150 активного центра последовательно окисляются с образованием сульфеновой, сульфиновой и сульфоновой кислот (реакции 1–3 на схеме 1) [3, 29, 30].

При кратковременной инкубации (10–15 мин) в присутствии низких концентраций H_2O_2 (10–50 мкМ) происходит мягкое окисление каталитического остатка Cys с образованием цис-

$$\text{Cys150–SH} \xleftrightarrow{H_2O_2\ (1)} \text{Cys150–SOH} \xrightarrow{(2)} \text{Cys150–SO}_2\text{H} \xrightarrow{(3)} \text{Cys150–SO}_3\text{H}$$

$$\text{Cys150–SOH} \xrightarrow{(4)} \text{Cys150–Cys154}$$

Схема 1. Окисление Cys150 активного центра ГАФД перекисью водорода

теин-сульфеновой кислоты (схема 1, реакция 1). Данная стадия является обратимой: цистеин-сульфеновая кислота может быть восстановлена до Cys в присутствии аскорбиновой кислоты, арсенита натрия или низкомолекулярных тиолов [29, 31]. При более длительной инкубации с H_2O_2 или в присутствии более высокой концентрации окислителя образуются необратимые продукты окисления – цистеин-сульфиновая и цистеин-сульфоновая кислоты (схема 1, реакции 2 и 3).

Следует отметить, что важной особенностью ГАФД является присутствие двух остатков Cys в ее активном центре – Cys150, необходимый для катализа, и Cys154, который не участвует в катализе. В отличие от Cys150, Cys154 экранирован в активном центре ГАФД и становится доступен для окисления только после окисления Cys150. Роль Cys154 до сих пор неизвестна, хотя он является весьма консервативным остатком и присутствует у ГАФД из разных источников, за исключением ГАФД из некоторых микроорганизмов (например, бактерий рода *Thermus*) (https://www.uniprot.org/uniprot/P00361). Замена Cys154 на Ser не оказывает существенного влияния на активность фермента, но при этом снижает чувствительность каталитического остатка Cys150 к окислению [32].

Мы предположили, что второй остаток Cys154 может быть необходим для предотвращения глубокого окисления сульфгидрильных групп каталитического остатка Cys150, приводящего к необратимой инактивации фермента. Так, есть данные, что в аэробных условиях *in vivo* между двумя цистеинами активного центра ГАФД может образовываться дисульфидный мостик (реакция 4 на схеме 1) [33]. По-видимому, окисление Cys150 с образованием цистеин-сульфеновой кислоты способствует образованию дисульфидного мостика между соседними остатками Cys активного центра ГАФД в соответствии с общим механизмом окисления цистеинов в белках [34–36]. Дисульфидный мостик в активном центре ГАФД может быть восстановлен под действием дитиотреитола или β-меркаптоэтанола *in vitro*, а также при участии глутаредоксина, тиоредоксина или восстановленного глутатиона (GSH) в живых системах. Совокупность этих процессов позволяет предотвратить необратимую инактивацию ГАФД.

Необходимо заметить, что в нормальных условиях *in vivo* цистеин-сульфеновая кислота в активном центре ГАФД, скорее всего, не может существовать длительное время, поскольку GSH, который присутствует в клетках в высоких концентрациях (1–5 мМ), взаимодействует с цистеин-сульфеновой кислотой с образованием смешанного дисульфида [37, 38]:

$$\text{Cys150-SOH} + \text{GSH} \rightarrow \text{Cys150-SSG} + H_2O.$$

Данная модификация носит название S-глутатионилирования и приводит к полной инактивации фермента, но препятствует дальнейшему окислению цистеин-сульфеновой кислоты с образованием необратимых продуктов окисления ГАФД.

Однако полностью исключить возможность необратимого окисления ГАФД все же нельзя, поскольку концентрация GSH может снижаться при различных патологических состояниях.

Протеомный анализ позволил выявить S-глутатионилированную ГАФД в растительных и животных тканях [39, 40]. Взаимосвязь между окислением и S-глутатионилированием ГАФД была впервые продемонстрирована в работе Schuppe-Koistinen et al. [41]. Было показано, что обработка клеток эндотелия человека перекисью водорода приводит к S-глутатионилированию ГАФД и ее инактивации, в то время как деглутатионилирование ГАФД сопровождается восстановлением активности фермента. Позднее в нашей работе на очищенном препарате ГАФД из мышц кролика была доказана взаимосвязь окисления каталитических остатков Cys150 и S-глутатионилирования: фермент подвергался S-глутатионилированию при обработке перекисью водорода в присутствии GSH. При этом помимо смешанного дисульфида ГАФД-SSG, среди продуктов S-глутатионилирования был зарегистрирован внутримолекулярный дисульфидный мостик Cys150–Cys154. Согласно нашему предположению, смешанный дисульфид ГАФД-SSG является промежуточным продуктом реакции между Cys150-SOH и восстановленным глутатионом (схема 2, реакция 2), который дальше вступает в реакцию с Cys154 с образованием дисульфидного мостика (схема 2, реакция 3) [38].

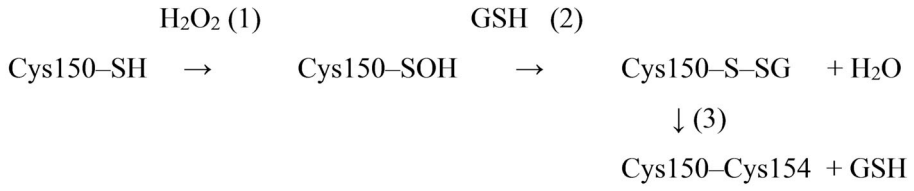

Схема 2. S-глутатионилирование ГАФД и образование дисульфидного мостика в присутствии H_2O_2 и GSH

Таким образом, S-глутатионилирование приводит к обратимой инактивации ГАФД. В нашей работе было показано, что неферментативное деглутатионилирование ГАФД и восстановление ферментативной активности может происходить в ходе реакции дисульфидного обмена с GSH в присутствии его избытка [38]:

ГАФД-SSG + GSH → ГАФД-SH + GSSG.

Кроме того, деглутатионилирование ГАФД и восстановление дисульфидного мостика Cys150–Cys154 может осуществляться ферментативными путями при участии глутаредоксина или тиоредоксина [37, 38].

Таким образом, S-глутатионилирование является обратимой модификацией, которая инициируется окислением каталитического Cys150 ГАФД и препятствует необратимому окислению фермента.

РОЛЬ S-ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ ГАФД В АКТИВАЦИИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

Основную роль в защите клеток от перекиси водорода играют пероксиредоксины: константа скорости окисления SH-групп пероксиредоксинов перекисью водорода составляет ~10^7 $M^{-1}c^{-1}$ [42], что на несколько порядков превышает константу скорости окисления SH-групп ГАФД (~10 $M^{-1}c^{-1}$) [43]. Однако чувствительность ГАФД к окислению перекисью водорода достаточно высока по сравнению с большинством SH-содержащих белков. При инкубации клеток с перекисью водорода в первую очередь окисляются пероксиредоксин 2 и ГАФД [44]. По-видимому, окисление ГАФД начинается тогда, когда антиоксидантная система клетки не справляется с защитой.

В работе Peralta et al. [32] было исследовано влияние H_2O_2 на дрожжевые штаммы, экспрессирующие ГАФД человека дикого типа, а также ГАФД с мутацией некаталитического остатка цистеина (Cys156 в случае ГАФД человека), которые отличались устойчивостью к окислению и, как следствие, к S-глутатионилированию. Было показано, что инкубация дрожжевых клеток, экспрессирующих ГАФД дикого типа, с H_2O_2 приводила к увеличению соотношения NADPH/NADP, в то время как в клетках, экспрессирующих мутантные ГАФД C156S с пониженной чувствительностью к окислению, такой эффект не развивался. На основании этих исследований был сделан вывод, что обратимая инактивация ГАФД путем S-глутатионилирования предполагает возможность обратимого ингибирования гликолиза и активации пентозофосфатного пути в ответ на окислительный стресс. Таким образом достигается увеличение продукции кофермента NADPH, который необходим для воспроизводства GSH при участии глутатионредуктазы и, следовательно, для поддержания системы антиоксидантной защиты. Введение мутаций, снижающих чувствительность ГАФД к окислению, приводит к устранению данного регуляторного механизма. Таким образом, повышенная чувствительность ГАФД к окислению является необходимым элементом системы антиоксидантной защиты клетки. Особенности S-глутатионилирования ГАФД человека с заменой C156S, обнаруженные при ее экспрессии в культуре дрожжевых клеток, указывают на возможную роль Cys156 в регуляции антиоксидантной защиты. Однако для проверки такого предположения необходимо проведение экспериментов не только на клеточных культурах, но и с изолированным мутантным ферментом с заменой C156S. В таких прямых экспериментах можно будет точно сравнить чувствительность нативной и мутантной ГАФД к окислению перекисью водорода и другими активными формами кислорода, оценить эффективность S-глутатионилирования двух форм фермента, а также обратимость этой модификации.

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ

Ингибирование ГАФД в качестве подхода для снижения жизнеспособности клеток имеет много ограничений. Однако в определенных случаях ингибирование ГАФД может эффективно нарушить энергоснабжение клетки в целом или ее отдельных компонентов. Например, ингибирование ГАФД может быть эффективным, если клетка не обладает иными источниками энергии, кроме гликолиза. Примером таких клеток могут быть паразитические микроорганизмы, вызывающие сонную болезнь [45–48] или болезнь Шагаса [49, 50]. Кроме того, ингибирование ГАФД могло бы приводить к нарушению энергоснабжения раковых клеток, основным источником энергии для которых является гликолиз. Можно также предположить, что ингибирование ГАФД может ухудшить энергоснабжение отдельных компонентов клетки, нарушив тем самым определенную функцию. Известно, что для отдельных ферментов гликолиза, прежде всего, для ГАФД и 3-фосфоглицераткиназы, катализирующей следующую реакцию,

сопряженную с синтезом АТР, характерна компартментализация. Так в мышечных клетках ГАФД адсорбируется на актине, в эритроцитах – на белках мембраны через «белок полосы 3», в ретикулоцитах – на полирибосомах, обеспечивая надежное энергоснабжение именно за счет гликолиза тех функций, для которых предназначены данные типы клеток. Следовательно, ингибирование ГАФД даже без существенного изменения содержания АТР в клетке в целом может ухудшать энергоснабжение именно тех функций, для которых необходим АТР, образующийся в гликолизе [51, 52].

Следовательно, можно полагать, что в определенных случаях ингибирование ГАФД может существенно снизить жизнеспособность клеток или, по крайней мере, затормозить их функционирование, несмотря на сохранение других источников АТР (например, митохондрий). Наиболее ярким примером являются сперматозоиды млекопитающих, поступательное движение которых обеспечивается волнообразными движениями их «хвоста». Несмотря на наличие митохондрий, важным источником энергии для этого типа движений является гликолиз, осуществляемый закрепленной вдоль «хвоста» ГАФД, связанной с другими гликолитическими ферментами. Более подробно эти примеры мы рассмотрим ниже.

ИНГИБИТОРЫ ТРИПАНОСОМНЫХ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗ

Впервые ингибиторы ГАФД были использованы для снижения жизнеспособности патогенных микроорганизмов, вызывающих сонную болезнь и болезнь Шагаса. Эти болезни вызывают простейшие *Trypanosoma cruzi* (болезнь Шагаса) и *Trypanosoma brucei* (сонная болезнь). Единственным источником энергии для удлиненной размножающейся формы *T. brucei*, паразитирующей в кровяном русле хозяина-млекопитающего, является гликолиз. При этом гликолиз протекает в специальных органеллах – гликосомах, содержащих набор гликолитических ферментов [53]. Окислительное фосфорилирование у этих форм *Trypanosoma* не происходит, поскольку митохондрии у них неактивны и не содержат крист.

Было показано, что последовательности ГАФД человека (https://www.uniprot.org/uniprot/P04406) и ГАФД из гликосом *T. cruzi* (https://www.uniprot.org/uniprot/P22513) содержат 178 идентичных а.о., что соответствует 53,1% идентичности их последовательностей (рис. 1). Аналогичная ситуация наблюдается в случае ГАФД из гликосом *T. brucei* (https://www.uniprot.org/uniprot/P22512).

Начиная с 90-х гг., поиск специфических ингибиторов ГАФД был сосредоточен на соединениях, являющихся аналогами NAD, точнее, на аналогах аденозиновой части этого кофермента [54, 55]. Так, на основании данных о пространственной структуре ГАФД *T. brucei* и других представителей этой группы простейших были разработаны эффективные ингибиторы фермента, взаимодействующие с аденозиновым участком NAD-связывающего домена. Найденные ингибиторы связывались с ГАФД простейших с K_d = 4–16 мкМ. При этом данные ингибиторы не влияли на активность ГАФД человека вплоть до концентрации 20–40 мкМ [45]. Менее успешным был поиск специфических ингибиторов ГАФД среди аналогов его субстрата – 1,3-дифосфоглицерата [46]. Поиск таких соединений интенсивно продолжается до настоящего времени [48], причем особый интерес представляют ингибиторы ГАФД из природных источников. Был проведен виртуальный скрининг баз природных соединений, среди которых удалось выявить 700 потенциальных ингибиторов для последующего анализа [56]. В ряде работ были также найдены эффективные ингибиторы ГАФД рода *Trypanosoma*: крассифлорон (crassiflorone) растительного происхождения [57], мастопаран (mastoparan) из яда бразильских ос [58] и другие. К сожалению, до сих пор не созданы лекарственные препараты на основе ингибиторов этого фермента. Ряд исследователей предлагают использовать ингибиторы ГАФД в сочетании с соединениями, влияющими на ферменты других метаболических путей, например, на трипанотионредуктазу (trypanothione reductase) [59].

СПЕРМОСПЕЦИФИЧНАЯ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА КАК ВОЗМОЖНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ПРОТИВОЗАЧАТОЧНЫХ СРЕДСТВ

Создание противозачаточных средств, которые могли бы использоваться мужчинами, является актуальной и до сих пор не решенной задачей. Идея использовать спермоспецифичную ГАФД (ГАФД-с) в качестве мишени для противозачаточных средств появилась 15 лет назад после того, как было обнаружено, что этот фермент необходим для обеспечения подвижности сперматозоидов. Более того, при отсутствии ГАФД-с самцы мышей теряли способность к оплодотворению [60]. Оказалось, что, несмотря на

```
sp|P9WN82|G3P_MYCTO      -MTVRVGINGFGRIGRNFYRALLAQQEQGTADVEVVAA-NDITDNSTLAHLLKFDSILGR  58
sp|P22513|G3PG_TRYCR     -MPIKVGINGFGRIGRMVFQALCEDGLLGTE-IDVVAVVDMNTDAEYFAYQMRYDTVHGK  58
sp|P04406|G3P_HUMAN      MGKVKVGVNGFGRIGRLVTRAAFNSG----K-VDIVAINDPFIDLNYMVYMFQYDSTHGK  55
                            ::**:******** . :*   .       :::**  :   * . :.: :::*:  *:

sp|P9WN82|G3P_MYCTO      LPCDVGL-------EGDDTIVVGRAKIKALAVREGPAALPWGDLGVDVVVESTGLFTNAA  111
sp|P22513|G3PG_TRYCR     FKYEVTTTKSSPSVAKDDTLVVNGHRILCVKAQRNPADLPWGKLGVEYVIESTGLFTAKA  118
sp|P04406|G3P_HUMAN      FHGTVKA--------ENGKLVINGNPI-TIFQERDPSKIKWGDAGAEYVVESTGVFTTME  106
                         :   *           :..:*:.   *  :  ...*: : **. *.: *:****:**

sp|P9WN82|G3P_MYCTO      KAKGHLDAGAKKVIISAPATDEDITIVLGVNDDKYDGS-QNIISNASCTTNCLAPLAKV-  169
sp|P22513|G3PG_TRYCR     AAEGHLRGGARKVVISAPASGGAKTLVMGVNHHEYNPSEHHVVSNASCTTNCLAPIVHVL  178
sp|P04406|G3P_HUMAN      KAGAHLQGGAKRVIISAPSA-DAPMFVMGVNHEKYDNS-LKIISNASCTTNCLAPLAKV-  163
                          * .** .**::*:****::     :*:***..:*: *  :::***********:.:*

sp|P9WN82|G3P_MYCTO      LDDEFGIVKGLMTTIHAYTQDQNLQDGPH-KDLRRARAAALNIVPTSTGAAKAIGLVMPQ  228
sp|P22513|G3PG_TRYCR     VKEGFGVQTGLMTTIHSYTATQKTVDGVSVKDWRGGRAAAVNIIPSTTGAAKAVGMVIPS  238
sp|P04406|G3P_HUMAN      IHDNFGIVEGLMTTVHAITATQKTVDGPSGKLWRDGRGALQNIIPASTGAAKAVGKVIPE  223
                         :.: **:  *****:*: *  *:  **   *  * .*.*  **:*::******:* *:*.

sp|P9WN82|G3P_MYCTO      LKGKLDGYALRVPIPTGSVTDLTVDLSTRASVDEINAAFKAAAEGRLKGILKYYDAPIVS  288
sp|P22513|G3PG_TRYCR     TQGKLTGMSFRVPTPDVSVVDLTFTAARDTSIQEIDAALKRASKTYMKGILGYTDEELVS  298
sp|P04406|G3P_HUMAN      LNGKLTGMAFRVPTANVSVVDLTCRLEKPAKYDDIKKVVKQASEGPLKGILGYTEHQVVS  283
                          :*** * ::***    **.***      :. ::*. ..* *::  :**** * :  :**

sp|P9WN82|G3P_MYCTO      SDIVTDPHSSIFDSGLTK-----VIDDQAKVVSWYDNEWGYSNRLVDLVTLVGKSL----  339
sp|P22513|G3PG_TRYCR     ADFINDNRSSIYDSKATLQNNLPKERRFFKIVSWYDNEWGYSHRVVDLVRHMASKDRSAR  358
sp|P04406|G3P_HUMAN      SDFNSDTHSSTFDAGAGI----ALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE----  335
                         :*: .* :** :*:               *::******:***:*:***:  :...

sp|P9WN82|G3P_MYCTO      -     339
sp|P22513|G3PG_TRYCR     L     359
sp|P04406|G3P_HUMAN      -     335
```

Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ГАФД *Mycobacterium tuberculosis* (UniProt ID P9WN82), *Trypanosoma cruzi* (UniProt ID P22513), *Homo sapiens* (UniProt ID P04406). Консервативные позиции отмечены звездочкой. Консервативный пептид активного центра фермента выделен рамкой. Цистеин активного центра показан стрелкой

нормальное функционирование митохондрий, осуществление прямого поступательного движения сперматозоидов невозможно без АТР, образующегося в гликолизе в результате реакций, катализируемых спермоспецифичными ферментами. Из этих наблюдений следовало, что ингибирование ГАФД-с, закрепленной в фиброзном слое хвоста сперматозоида по всей его длине, могло бы обездвижить сперматозоиды, обеспечив противозачаточное действие. Для решения этой задачи были выделены рекомбинантные формы ГАФД-с [43, 61, 62], и подробно изучены особенности их каталитического действия и регуляторные характеристики [62–64]. Затем были получены данные о пространственной структуре ГАФД-с. Сначала удалось установить структуру гибридных молекул тетрамера (димер ГАФД-с крысы с димером ГАФД из *Escherichia coli* [65]), а затем гомотетрамера рекомбинантной ГАФД-с человека [62, 66]. Основная работа по поиску ингибиторов, избирательно действующих на спермоспецифичную ГАФД, была проведена в группе O'Brien с помощью высокопроизводительного экспериментального скрининга [66, 67]. Было обнаружено несколько ингибиторов, значение IC_{50} для лучшего из которых составляло 1,2 мкМ. К сожалению, это соединение ингибировало и соматическую форму ГАФД, хотя и с меньшей эффективностью. Таким образом, поиски специфических ингибиторов, направленных на активный центр ГАФД-с, до настоящего времени не увенчались успехом. Возможно, более перспективным окажется подход, основанный на поиске лигандов, связывающихся вне активного центра, который мы рассмотрим далее.

ИНГИБИРОВАНИЕ СПЕРМОСПЕЦИФИЧНОЙ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

В нашей работе было показано, что некоторые линии клеток меланомы, наряду с обычной соматической ГАФД, содержат значительные (до 50% от общего содержания ГАФД) количества спермоспецифичной формы фермента [68]. Это наблюдение хорошо согласуется с многочисленными данными об экспрессии спермоспецифичных белков в раковых клетках. Можно

предположить, что экспрессия ГАФД-с в некоторых типах раковых клеток участвует в изменении их энергетического обмена. Как следует из предыдущего раздела, до сих пор нет существенного прогресса в поиске избирательных ингибиторов ГАФД-с. Однако разработка новых подходов, основанных на поиске эффекторов, связывающихся вне активного центра, позволяет надеяться на то, что такие ингибиторы будут найдены. В этом случае их использование поможет существенно снизить эффективность гликолиза или изменить соотношение метаболических путей в некоторых типах раковых клеток, в которых экспрессируется ГАФД-с, не затрагивая энергетический обмен здоровых клеток.

ИНГИБИТОРЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА МИКОБАКТЕРИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ТУБЕРКУЛЕЗ

Поиск новых соединений, направленных против вызывающих туберкулез микобактерий (*Mycobactérium tuberculósis*), становится все более актуальной задачей в связи с устойчивостью микобактерий к известным антибиотикам. Одной из мишеней для новых лекарственных препаратов могла бы стать глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа микобактерий, которая не только катализирует важнейшую гликолитическую реакцию, но и участвует в транспорте железа, взаимодействуя с трансферрином [69]. Boradia et al. предположили существование дополнительного пути получения железа, который включает интернализацию трансферрина с помощью ГАФД, присутствующей на поверхности клеток микобактерий. Вероятно, соединения, влияющие на активность и другие функции ГАФД, могли бы снижать жизнеспособность микобактерий. Однако ГАФД из *M. tuberculósis* (https://www.uniprot.org/uniprot/P9WN82) имеет до 49,6% идентичности с ферментом человека, согласно выравниванию их аминокислотных последовательностей, причем структура их активных центров практически не отличается (рис. 1).

Следовательно, поиск соединений, избирательно взаимодействующих с активным или кофермент-связывающим центрами ГАФД *M. tuberculósis*, представляется малоэффективным, о чем свидетельствуют не слишком успешные примеры использования ингибиторов ГАФД для подавления жизнеспособности сперматозоидов и трипаносом.

Более перспективным представляется поиск лигандов, взаимодействующих с участками ГАФД, расположенными вне активного центра. Такие соединения могли бы предотвращать связывание ГАФД с другими белками (например, с трансферрином в случае ГАФД *M. tuberculósis*) или оказывать влияние на каталитическую активность или регуляторные характеристики белка. Работы такого рода только начинаются, однако последние достижения в области молекулярного моделирования в сочетании с высокопроизводительным виртуальным и экспериментальным скринигом дают надежду на успешное применение новых типов лигандов, избирательно воздействующих на определенные изоформы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы.

К сожалению, ингибирования гликолиза в микобактериях может быть недостаточно для полного подавления энергообеспечения *M. tuberculósis*, поскольку в них эффективно функционирует окислительное фосфорилирование в митохондриях. Специфическое подавление митохондриального окисления может быть проведено бедаквилином, бактерицидное действие которого обусловлено специфическим ингибированием F_1F_O-ATP-синтазы в *M. tuberculósis* [70, 71], или имидазо[1,2-альфа]пиридином, бактерицидное действие которого основано на ингибировании дыхательного комплекса bc1 [72]. Однако действия этих соединений не всегда достаточно для подавления жизнедеятельности микобактерий – медленное действие, возникновение устойчивости, экспрессия цитохрома *bd* и др. факторы, включающие функционирование гликолитического пути [73, 74]. Мы полагаем, что на основе совместного использования специфических ингибиторов ГАФД и окислительного фосфорилирования, полностью подавляющих два основных пути энергоснабжения, может быть создан новый класс лекарственных препаратов против микобактерий, вызывающих туберкулез.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ И ГЛИКИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

В заключительном разделе мы хотели бы рассмотреть неожиданные последствия ингибирования глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы для метаболизма клеток. Если снижение эффективности гликолиза при ингибировании или инактивации ГАФД достаточно очевидно, то изменения в протекании других процессов, в которых участвует ГАФД, не столь предсказуемы. Как уже отмечалось выше, концентрация этого фермента во всех типах клеток очень велика.

Возможно, одной из причин высокой концентрации ГАФД в клетке является необходимость нейтрализовать действие ее высоко реакционноспособного субстрата – глицеральдегид-3-фосфата. Токсическое действие глицеральдегид-3-фосфата на белки проявляется в его способности модифицировать сульфгидрильные группы остатков Cys, аминогруппы остатков Lys, а также гуанидиновую группу остатков Arg. Однако в функционирующих клетках практически нет свободного глицеральдегид-3-фосфата, который после образования из фруктозо-1,6-дифосфата, в основном, утилизируется ГАФД в гликолитическом пути или подвергается изомеризации в дигидроксиацетонфосфат (ДГАФ) (рис. 2). Даже в том случае, когда интенсивность следующих после катализируемой ГАФД стадий гликолиза замедляется, глицеральдегид-3-фосфат не сохраняется в свободном состоянии, а содержится в связанной с ГАФД форме – в виде различных производных ГАФД (тиополуацеталь-, а затем ацил-фермент). В определенных условиях можно даже выделить промежуточное соединение – ацил-фермент [75]. Таким образом, для предотвращения токсического действия глицеральдегид-3-фосфата должна поддерживаться высокая концентрация активных форм ГАФД в клетке. Очевидно, что введение ингибиторов ГАФД или инактивация фермента, прежде всего в результате окисления сульфгидрильных групп или его гликирования, может приводить к накоплению глицеральдегид-3-фосфата и изменять соотношение метаболических путей, представленных на рис. 2.

Особое внимание хотелось бы обратить на гликирование ГАФД, которому долгое время не уделяли должного внимания. Известно, что ГАФД может подвергаться модификации раз-

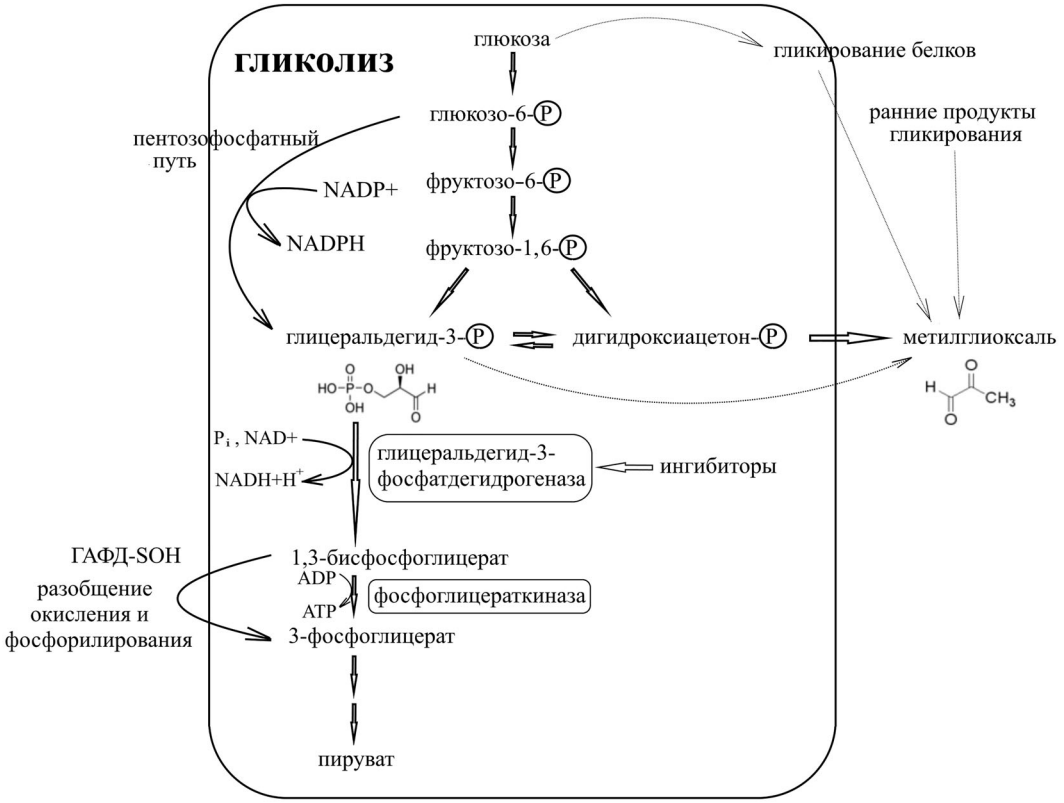

Рис. 2. Схема, иллюстрирующая возможное влияние ингибирования глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на гликолиз и связанные с ним метаболические пути. На рис. схематически представлены основные стадии гликолиза, приводящие в аэробных условиях к образованию пирувата, который в дальнейшем используется в цикле Кребса, а также реакции, в которых участвует глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. ГАФД, содержащая в активном центре окисленную до сульфеновой кислоты сульфгидрильную группу, (ГАФД-SOH) обладает ацил-фосфатазной активностью и гидролизует 1,3-дифосфоглицерат, осуществляя тем самым «футильный путь» разобщения окисления и фосфорилирования в гликолизе. При ингибировании ГАФД и снижении скорости гликолиза эффективность пентозофосфофосфатного пути может увеличиваться. Гликирование ГАФД метилглиоксалем приводит к ее инактивации, повышению концентрации глицеральдегд-3-фосфата, а затем метилглиоксаля. Тонкими серыми линиями указаны неферментативные реакции (гликирование и образование метилглиоксаля из глицеральдегид-3-фосфата и диоксиацетонфосфата)

личными сахарами (глюкозой, фруктозой и др.) по свободным аминогруппам а.о. в результате неферментативного гликозилирования (гликирования). Гликированием принято называть также модификацию метилглиоксалем и сходными с ним соединениями, включая глицеральдегид-3-фосфат. При этом метилглиоксаль может образовываться в результате сложного каскада реакций из первичных продуктов гликирования или синтезироваться в связанных с гликолизом метаболических путях [76]. Было показано, что метилглиоксаль эффективно модифицирует ГАФД по аминогруппам остатков Lys, что приводит к снижению ее активности [77]. В наших работах было обнаружено, что столь же выраженное инактивирующее воздействие оказывает на ГАФД гликирование ее собственным субстратом – глицеральдегид-3-фосфатом [78]. Естественно, гликирование ГАФД глицеральдегид-3-фосфатом по остаткам Lys и Arg не может происходить при обычных физиологических условиях. При воздействии глицеральдегид-3-фосфата на ГАФД, прежде всего происходит его связывание по сульфгидрильной группе остатка Cys150 активного центра, обладающей необычно высокой реакционной способностью из-за изменения ее pK_a за счет микроокружения. Т.е. происходит первый этап обычной реакции гликолитической оксидоредукции, характерной для гликолиза. Из-за протекания гликолитической реакции при высоком содержании ГАФД, существенно превышающем концентрацию ее субстрата, не остается свободного глицеральдегид-3-фосфата для гликирования фермента. Однако при ингибировании ГАФД различными лигандами или при модификации ее сульфгидрильных групп активными формами кислорода глицеральдегид-3-фосфат уже может модифицировать остатки Lys и Arg фермента, вызывая дополнительное снижение его активности. При этом возрастает и концентрация свободного глицеральдегид-3-фосфата, что усиливает эффективность гликирования фермента. Следует, однако, учитывать, что сдвиг равновесия триозофосфатизомеразной реакции в сторону образования ДГАФ (константа равновесия реакции глицеральдегид-3-фосфат → ДГАФ составляет 0,048 при 25 °C) [79] будет ограничивать накопление глицеральдегид-3-фосфата при ингибировании фермента. Тем не менее известно, что даже в этой ситуации при ингибировании ГАФД концентрация глицеральдегид-3-фосфата существенно возрастает (например, при ингибировании ГАФД иодацетатом – (6–7)×) и, следовательно, он может участвовать в гликировании фермента [80]. Хотя, безусловно, основным гликирующим фактором, скорее всего, будет метилглиоксаль, образующийся из ДГАФ, концентрация которого во всех случаях 10× превышает концентрацию глицеральдегид-3-фосфата. Очевидно, что увеличение концентрации метилглиоксаля за счет его образования из ДГАФ будет происходить при ингибировании ГАФД.

Таким образом, запущенные любым способом инактивация или ингибирование фермента вызывают увеличение концентрации свободного глицеральдегид-3-фосфата и метилглиоксаля, последующую дополнительную инактивацию ГАФД и новый виток этого процесса. Следовательно, ингибиторы ГАФД могут не только обратимо уменьшать интенсивность гликолиза, но и вызывать необратимую инактивацию ГАФД и других ферментов из-за их гликирования. Эти эффекты могут быть желательным последствием применения ингибиторов ГАФД в описанных выше случаях подавления жизнеспособности паразитических микроорганизмов или раковых клеток, а также снижения подвижности сперматозоидов. В то же время именно ингибирование ГАФД может быть важной причиной появления гликированных белков, участвующих в развитии ряда патологических процессов, например, нейродегенеративных заболеваний амилоидной природы [76].

Не менее важно учитывать влияние ингибиторов ГАФД на сопряженность окисления и фосфорилирования в гликолизе, обнаруженную в наших работах [3–5]. Для реализации разобщения необходимо присутствие в активном центре ГАФД остатка Cys150, окисленного до сульфеновой кислоты. Препятствием для появления сульфеновой кислоты может быть вовлечение сульфгидрильной группы во взаимодействие с ингибиторами, направленными на активный центр (каталитический, субстрат- или кофактор-связывающие центры). В этом случае не будет осуществляться ацил-фосфатазная реакция, позволяющая трансформировать 1,3-дифосфоглицерат в 3-фосфоглицерат без участия 3-фосфоглицераткиназы и синтеза ATP (рис. 2). Гидролиз 1,3-дифосфоглицерата окисленной ГАФД может приводить к ускорению образования пирувата при снижении продукции ATP. В аэробных условиях гликолиз с нулевым выходом ATP может иметь смысл, поскольку он обеспечивает продукцию NADH и пирувата для более эффективного окислительного фосфорилирования в митохондриях. Однако следует отметить, что сульфеновая кислота реагирует с восстановленным глутатионом с образованием смешанного дисульфида, что приводит к ингибированию ацил-фосфатазной активности [38]. Следовательно, ацил-фосфатазная активность ГАФД может иметь значение в том случае, когда

содержание восстановленного глутатиона в клетке значительно снижается.

Важнейшим метаболическим процессом, связанным с гликолизом, является пентозофосфатный путь (рис. 2). Судьба глюкозо-6-фосфата зависит от многих факторов, основным из которых является концентрация в клетке $NADP^+$. При повышении концентрации $NADP^+$ глюкозо-6-фосфат начинает использоваться в пентозофосфатном пути, что сопровождается образованием столь необходимого клеткам NADPH. Однако и ингибирование гликолиза стимулирует использование глюкозо-6-фосфата в пентозофосфатном пути, причем именно с использованием традиционных ингибиторов гликолиза он и был открыт. Следует отметить, что обратимое окисление ГАФД, ингибирующее гликолиз, должно повышать интенсивность пентозофосфатного пути. Наиболее подробно этот процесс был изучен в описанном выше примере S-глутатионилирования ГАФД. Происходящее при этом накопление NADPH, являющегося коферментом глутатионредуктазы, вызывает повышение концентрации GSH, необходимого для реактивации ГАФД и последующей стимуляции гликолиза. Очевидно, что такой механизм регуляции не функционирует для необратимых ингибиторов ГАФД. Однако не только S-глутатионилирование, но и другие способы обратимого ингибирования или инактивации ГАФД могут быть полезны в тех случаях, когда необходимо повысить содержание NADPH и GSH. Эти соображения могут указывать на важную роль ГАФД в регуляции окислительно-восстановительного статуса клеток и на необходимость учитывать разнообразные последствия ингибирования ГАФД на метаболизм клеток.

Безусловно, ингибирование и, тем более, инактивация ГАФД вызывают более серьезные последствия, которые не ограничиваются влиянием на энергетический метаболизм клеток. Прежде всего это касается появления неактивных, денатурированных и агрегированных форм ГАФД, играющих важную роль в формировании амилоидных структур в клетке. Эти аспекты выходят за рамки данного обзора и подробно освещены в наших недавно опубликованных статьях [9, 76].

Финансирование. Работа была поддержана Российским научным фондом (грант № 16-14-10027).

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов, а также экспериментов с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nagradova, N.K. (1956) Mechanism of action of carnosine on glycolytic oxidation reduction combined with phosphorylation, *Biochemistry (Moscow)*, **21**, 17–25.
2. Nagradova, N.K. (1965) The effect of histidine and other chelating agents on the activity of 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase from rabbit muscles, *Biochemistry (Moscow)*, **30**, 50–7.
3. Schmalhausen, E.V., Nagradova, N.K., Boschi-Muller, S., Branlant, G., and Muronetz, V.I. (1999) Mildly oxidized GAPDH: the coupling of the dehydrogenase and acyl phosphatase activities, *FEBS Lett.*, **452**, 219–222.
4. Danshina, P.V., Schmalhausen, E.V., Avetisyan, A.V., and Muronetz, V.I. (2001) Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis, *IUBMB Life*, **51**, 309–314.
5. Dan'shina, P.V., Schmalhausen, E.V., Arutiunov, D.Y., Pleten', A.P., and Muronetz, V.I. (2003) Acceleration of glycolysis in the presence of the non-phosphorylating and the oxidized phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases, *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 593–600.
6. Seidler, N.W. (2013) Basic biology of GAPDH, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **985,** 1–36.
7. Sikand, K., Singh, J., Ebron, J.S., and Shukla, G.C. (2012) Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β-actin are targets of miR-644a, *PLoS One*, **7**, e47510.
8. Caradec, J., Sirab, N., Revaud, D., Keumeugni, C., and Loric, S. (2010) Is GAPDH a relevant housekeeping gene for normalisation in colorectal cancer experiments? *Br. J. Cancer*, **103**, 1475–6.
9. Muronetz, V.I., Barinova, K.V., Stroylova, Y.Y., Semenyuk, P.I., and Schmalhausen, E.V. (2017) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: aggregation mechanisms and impact on amyloid neurodegenerative diseases, *Int. J. Biol. Macromol.*, **100**, 55–66.
10. Mazzola, J.L., and Sirover, M.A. (2002) Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders? *Neurotoxicology*, **23**, 603–609.
11. Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R.M., Elstner, M., Leesch, W., Jagodzinski, F.B., Stupak, D.P., Sugrue, M.M., and Tatton, N.A. (2000) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling, *J. Neural Transm. Suppl.*, **60**, 77–100.
12. Cardon, J.W., and Boyer, P.D. (1982) Subunit interaction in catalysis. Some experimental and theoretical approaches with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **257**, 7615–7622.
13. Koshland, D.E. (1977) The specificity of subunit interactions, *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 605–606.
14. Malhotra, O.P., and Bernhard, S.A. (1973) Activation of a covalent enzyme-substrate bond by noncovalent interaction with an effector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2077–2081.
15. Byers, L.D., and Koshland, D.E. (1975) The specificity of induced conformational changes. The case of yeast glycer-

aldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry*, **14**, 3661–3669.
16. Levitzki, A., and Koshland, D.E. (1976) The role of negative cooperativity and half-of-the-sites reactivity in enzyme regulation, *Curr. Top. Cell. Regul.*, **10**, 1–40.
17. Nagradova, N.K., Ashmarina, L.I., Asryants, R.A., Cherednikova, T.V., Golovina, T.O., and Muronetz, V.I. (1980) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: the role of subunit interactions in enzyme functioning, *Adv. Enzyme Regul.*, **19**, 171–204.
18. Nagradova, N.K. (2001) Interdomain interactions in oligomeric enzymes: creation of asymmetry in homo-oligomers and role in metabolite channeling between active centers of hetero-oligomers, *FEBS Lett.*, **487**, 327–332.
19. Nagradova, N.K. (2001) Study of the properties of phosphorylating D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 1067–1076.
20. Asryants, R.A., Kuzminskaya, E.V., Tishkov, V.I., Douzhenkova, I.V., and Nagradova, N.K. (1989) An examination of the role of arginine residues in the functioning of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 159–166.
21. Levashov, P.A., Schmalhausen, E.V., Muronetz, V.I., and Nagradova, N.K. (1995) E. coli D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase modified by 2,3-butanedione: manifestation of a pairwise of non-equivalence of active centers, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **37**, 991–1000.
22. Nagradova, N.K., Schmalhausen, E.V., Levashov, P.A., Asryants, R.A., and Muronetz, V.I. (1996) D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Properties of the enzyme modified at arginine residues, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **61**, 47–56.
23. Nagradova, N.K., Asryants, R.A., and Ivanov, M.V. (1971) Interaction of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate with yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Experientia*, **27**, 1169–1170.
24. Nagradova, N.K., Asryants, R.A., and Ivanov, M.V (1972) I-Anilino-8-naphthalene sulfonate as a coenzyme-competitive inhibitor of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: multiple inhibition studies, *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 622–628.
25. Golovina, T.O., Muronetz, V.I., and Nagradova, N.K. (1978) Half-of-the-sites reactivity of rat skeletal muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **524**, 15–25.
26. Muronets, V.I., Golovina, T.O., and Nagradova, N.K. (1982) Use of immobilization for the study of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Immobilized dimers of the enzyme, *Biochemistry (Moscow)*, **47**, 3–12.
27. Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A., Branlant, C., and Branlant, G. (1989) Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis, *Biochemistry*, **28**, 2586–2592.
28. Clermont, S., Corbier, C., Mely, Y., Gerard, D., Wonacott, A., and Branlant, G. (1993) Determinants of coenzyme specificity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of the acidic residue in the fingerprint region of the nucleotide binding fold, *Biochemistry*, **32**, 10178–10184.
29. Little, C., and O'Brien, P.J. (1969) Mechanism of peroxide-inactivation of the sulphydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 533–538.
30. Muronetz, V.I., Melnikova, A.K., Saso, L., and Schmalhausen, E.V (2018) Influence of oxidative stress on catalytic and non-glycolytic functions of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Curr. Med. Chem.*, doi: 10.2174/0929867325666180530101057.
31. You, K.S., Benitez, L.V., McConachie, W.A., and Allison, W.S. (1975) The conversion of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to an acylphosphatase by trinitroglycerin and inactivation of this activity by azide and ascorbate, *Biochim. Biophys. Acta*, **384**, 317–330.
32. Peralta, D., Bronowska, A.K., Morgan, B., Dóka, É., Van Laer, K., Nagy, P., Gräter, F., and Dick, T.P. (2015) A proton relay enhances H_2O_2 sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation, *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 156–163.
33. Leichert, L.I., Gehrke, F., Gudiseva, H.V, Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A.K., Strahler, J.R., Andrews, P.C., and Jakob, U. (2008) Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 8197–202.
34. Cremers, C.M., and Jakob, U. (2013) Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation, *J. Biol. Chem.*, **288**, 26489–26496.
35. Roos, G., and Messens, J. (2011) Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation, *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 314–326.
36. Rehder, D.S., and Borges, C.R. (2010) Cysteine sulfenic acid as an intermediate in disulfide bond formation and nonenzymatic protein folding, *Biochemistry*, **49**, 7748–7755.
37. Bedhomme, M., Adamo, M., Marchand, C.H., Couturier, J., Rouhier, N., Lemaire, S.D., Zaffagnini, M., and Trost, P. (2012) Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant Arabidopsis thaliana is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins *in vitro*, *Biochem. J.*, **445**, 337–347.
38. Barinova, K.V., Serebryakova, M.V., Muronetz, V.I., and Schmalhausen, E.V. (2017) S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces formation of C150-C154 intrasubunit disulfide bond in the active site of the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 3167–3177.
39. Gao, X.H., Bedhomme, M., Veyel, D., Zaffagnini, M., and Lemaire, S.D. (2009) Methods for analysis of protein glutathionylation and their application to photosynthetic organisms, *Molecular Plant*, **2**, 218–235.
40. Newman, S.F., Sultana, R., Perluigi, M., Coccia, R., Cai, J., Pierce, W.M., Klein, J.B., Turner, D.M., and Butterfield, D.A. (2007) An increase in S-glutathionylated proteins in the Alzheimer's disease inferior parietal lobule, a proteomics approach, *J. Neurosci. Res.*, **85**, 1506–1514.
41. Schuppe-Koistinen, I., Moldéus, P., Bergman, T., and Cotgreave, I.A. (1994) S-thiolation of human endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase after hydrogen peroxide treatment, *Eur. J. Biochem.*, **221**, 1033–1037.
42. Davies, M.J. (2016) Protein oxidation and peroxidation, *Biochem. J.*, **473**, 805–825.
43. Elkina, Y.L., Kuravsky, M.L., El'darov, M.A., Stogov, S.V., Muronetz, V.I., and Schmalhausen, E.V. (2010) Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structural basis for enhanced stability, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 2207–2212.
44. Baty, J.W., Hampton, M.B., and Winterbourn, C.C. (2005) Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells, *Biochem. J.*, **389**, 785–795.
45. Aronov, A.M., Verlinde, C.L., Hol, W.G., and Gelb, M.H. (1998) Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design, *J. Med. Chem.*, **41**, 4790–4799.
46. Ladame, S., Bardet, M., Périé, J., and Willson, M. (2001) Selective inhibition of Trypanosoma brucei GAPDH by 1,3-bisphospho-D-glyceric acid (1,3-diPG) analogues, *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 773–783.
47. Callens, M., and Hannaert, V. (1995) The rational design of trypanocidal drugs: selective inhibition of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Trypanosomatidae, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **89**, Suppl. 1, 23–30.

48. Haanstra, J.R., Gerding, A., Dolga, A.M., Sorgdrager, F.J.H., Buist-Homan, M., du Toit, F., Faber, K.N., Holzhütter, H.G., Szöör, B., Matthews, K.R., Snoep, J.L., Westerhoff, H.V., and Bakker, B.M. (2017) Targeting pathogen metabolism without collateral damage to the host, *Sci. Rep.*, **7**, 40406.
49. Pereira, J.M., Severino, R.P., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., da Silva, M.F.G.F., Zottis, A., Andricopulo, A.D., Oliva, G., and Corrêa, A.G. (2008) Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi, *Bioor. Med. Chem.*, **16**, 8889–8895.
50. Prokopczyk, I.M., Ribeiro, J.F.R., Sartori, G.R., Sesti-Costa, R., Silva, J.S., Freitas, R.F., Leitão, A., and Montanari, C.A. (2014) Integration of methods in cheminformatics and biocalorimetry for the design of trypanosomatid enzyme inhibitors, *Fut. Med. Chem.*, **6**, 17–33.
51. Chu, H., Puchulu-Campanella, E., Galan, J.A., Tao, W.A., Low, P.S., and Hoffman, J.F. (2012) Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 12794–12799.
52. Муронец В.И., Наградова Н.К. (1990) Взаимодействие глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы со структурными элементами клеток, *Успехи биологической химии*, **31**, 115–131.
53. Opperdoes, F.R., and Borst, P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in Trypanosoma brucei: the glycosome, *FEBS Lett.*, **80**, 360–364.
54. Van Calenbergh, S., Verlinde, C.L., Soenens, J., De Bruyn, A., Callens, M., Blaton, N.M., Peeters, O.M., Herdewijn, P., Rozenski, J., and Hol, W.G.J. (1995) Synthesis and structure-activity relationships of analogs of 2'-deoxy-2'-(3-methoxybenzamido)adenosine, a selective inhibitor of trypanosomal glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *J. Med. Chem.*, **38**, 3838–3849.
55. Link, A., Heidler, P., Kaiser, M., and Brun, R. (2009) Synthesis of a series of N6-substituted adenosines with activity against trypanosomatid parasites, *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 3665–3671.
56. Herrmann, F.C., Lenz, M., Jose, J., Kaiser, M., Brun, R., and Schmidt, T.J. (2015) In Silico Identification and *in vitro* activity of novel natural inhibitors of Trypanosoma brucei glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, *Molecules*, **20**, 16154–16169.
57. Uliassi, E., Fiorani, G., Krauth-Siegel, R.L., Bergamini, C., Fato, R., Bianchini, G., Carlos Menéndez, J., Molina, M.T., López-Montero, E., Falchi, F., Cavalli, A., Gul, S., Kuzikov, M., Ellinger, B., Witt, G., Moraes, C.B., Freitas-Junior, L.H., Borsari, C., Costi, M.P., and Bolognesi, M.L. (2017) Crassiflorone derivatives that inhibit Trypanosoma brucei glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TbGAPDH) and Trypanosoma cruzi trypanothione reductase (TcTR) and display trypanocidal activity, *Eur. J. Med. Chem.*, **141,** 138–148.
58. Vinhote, J.F.C., Lima, D.B., Menezes, R.R.P.P.B., Mello, C.P., de Souza, B.M., Havt, A., Palma, M.S., Santos, R.P.D., Albuquerque, E.L., Freire, V.N., and Martins, A.M.C. (2017) Trypanocidal activity of mastoparan from Polybia paulista wasp venom by interaction with TcGAPDH, *Toxicon*, **137**, 168–172.
59. Belluti, F., Uliassi, E., Veronesi, G., Bergamini, C., Kaiser, M., Brun, R., Viola, A., Fato, R., Michels, P.A., Krauth-Siegel, R.L., Cavalli, A., and Bolognesi, M.L. (2014) Toward the development of dual-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/trypanothione reductase inhibitors against Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi, *ChemMedChem*, **9**, 371–382.
60. Miki, K., Qu, W., Goulding, E.H., Willis, W.D., Bunch, D.O., Strader, L.F., Perreault, S.D., Eddy, E.M., and O'Brien, D.A. (2004) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16501–16506.
61. Lamson, D.R., House, A.J., Danshina, P. V, Sexton, J.Z., Sanyang, K., O'Brien, D.A., Yeh, L.A., and Williams, K.P. (2011) Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDHS) is expressed at high yield as an active homotetramer in baculovirus-infected insect cells, *Protein Expr. Purif.*, **75**, 104–113.
62. Chaikuad, A., Shafqat, N., Al-Mokhtar, R., Cameron, G., Clarke, A.R., Brady, R.L., Oppermann, U., Frayne, J., and Yue, W.W. (2011) Structure and kinetic characterization of human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDS, *Biochem. J.*, **435**, 401–409.
63. Kuravsky, M., Barinova, K., Marakhovskaya, A., Eldarov, M., Semenyuk, P., Muronetz, V., and Schmalhausen, E. (2014) Sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is stabilized by additional proline residues and an interdomain salt bridge, *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1820–1826.
64. Kuravsky, M.L., Barinova, K.V., Asryants, R.A., Schmalhausen, E.V., and 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.
65. Frayne, J., Taylor, A., Cameron, G., and 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, *J. Biol. Chem.*, **284**, 22703–22712.
66. Dan'shina, P.V., Qu, W., Temple, B.R., Rojas, R.J., Miley, M.J., Machius, M., Betts, L., and O'Brien, D.A. (2016) Structural analyses to identify selective inhibitors of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, *Mol. Hum. Reprod.*, **22**, 410–426.
67. Sexton, J.Z., Danshina, P.V., Lamson, D.R., Hughes, M., House, A.J., Yeh, L.A., O'Brien, D.A., and Williams, K.P. (2011) Development and implementation of a high throughput screen for the human sperm-specific isoform of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDHS), *Curr. Chem. Genomics*, **5**, 30–41.
68. Sevostyanova, I.A., Kulikova, K.V., Kuravsky, M.L., Schmalhausen, E.V., and Muronetz, V.I. (2012) Sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is expressed in melanoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **427**, 649–653.
69. Boradia, V.M., Malhotra, H., Thakkar, J.S., Tillu, V.A., Vuppala, B., Patil, P., Sheokand, N., Sharma, P., Chauhan, A.S., Raje, M., and Raje, C.I. (2014) Mycobacterium tuberculosis acquires iron by cell-surface sequestration and internalization of human holo-transferrin, *Nat. Commun.*, **5**, 4730.
70. Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Göhlmann, H.W.H., Neefs, J.-M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., and Jarlier, V. (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, **307**, 223–227.
71. Koul, A., Vranckx, L., Dendouga, N., Balemans, W., Van den Wyngaert, I., Vergauwen, K., Göhlmann, H.W., Willebrords, R., Poncelet, A., Guillemont, J., Bald, D., and Andries, K. (2008) Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **283**, 25273–25280.
72. Pethe, K., Bifani, P., Jang, J., Kang, S., Park, S., et al. (2013) Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis, *Nat. Med.*, **19**, 1157–1160.

73. Forte, E., Borisov, V.B., Falabella, M., Colaço, H.G., Tinajero-Trejo, M., Poole, R.K., Vicente, J.B., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2016) The terminal oxidase cytochrome bd promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, **6**, 23788.
74. Forte, E., Borisov, V.B., Vicente, J.B., and Giuffrè, A. (2017) Cytochrome bd and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microb. Physiol.*, **71**, 171–234.
75. Malhotra, O.P., and Bernhard, S.A. (1981) Role of nicotinamide adenine dinucleotide as an effector in formation and reactions of acylglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry*, **20**, 5529–5538.
76. Muronetz, V.I., Melnikova, A.K., Seferbekova, Z.N., Barinova, K.V., and Schmalhausen, E.V. (2017) Glycation, glycolysis, and neurodegenerative diseases: is there any connection? *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 874–886.
77. Lee, H.J., Howell, S.K., Sanford, R.J., and Beisswenger, P.J. (2005) Methylglyoxal can modify GAPDH activity and structure, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1043,** 135–145.
78. Muronetz, V., Barinova, K., and Schmalhausen, E. (2017) Glycation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the presence of glucose and glyceraldehyde-3-phosphate, *J. Int. Soc. Antioxid.*, **2**, 1–4.
79. Cornish-Bowden, A. (1981) Thermodynamic aspects of glycolysis, *Biochem. Educ.*, **9**, 133–137.
80. Veech, R.L., Raijman, L., Dalziel, K., and Krebs, H.A. (1969) Disequilibrium in the triose phosphate isomerase system in rat liver, *Biochem. J.*, **115**, 837–842.

INHIBITORS OF GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND UNEXPECTED EFFECTS OF ITS REDUCED ACTIVITY

Review

V. I. Muronetz[1,2*,], A. K. Melnikova[2**], K. V. Barinova[1], and E. V. Schmalhausen[1**]**

[1] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru*

[2] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119234 Moscow, Russia*

Received June 11, 2019
Revised August 11, 2019
Accepted August 14, 2019

The review describes the use of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) inhibitors to study the enzyme and suppress its activity in various cell types. The main problem of specific inhibition of GAPDH is the highly conservative nature of the enzyme active center and especially of the microenvironment of Cys150 sulfhydryl group that is important for catalysis. Numerous attempts to find inhibitors of sperm-specific GAPDH, as well as GAPDH of trypanosomes (*Trypanosoma* sp.) and mycobacteria (*Mycobacterium tuberculosis*), which would not significantly inhibit the enzyme of mammalian somatic cells, did not lead to practically important results. The search for compounds aimed at less conservative sites, located outside of the active site of GAPDH, and affecting catalytic and regulatory properties of the enzyme seems promising. Separate sections of the review are devoted to the inactivation of the enzyme by reactive oxygen species, glutathione, and glycating compounds. The final section discusses the effects of inhibition as well as inactivation of GAPDH (oxidation, S-glutathionylation and glycation) on glycolysis and related metabolic pathways (pentose phosphate pathway, “futile” cycle of glycolytic oxidation and phosphorylation uncoupling).

Keywords: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enzymatic inhibitors, oxidation, sulfhydryl group, glycation, glycolysis