

Received: 2012.06.21
Accepted: 2013.05.16
Published: 2014.03.12

Biologiczne znaczenie oksydacyjnych modyfikacji reszt cysteinowych w białkach na przykładzie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego*

The biological significance of oxidative modifications of cysteine residues in proteins illustrated with the example of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Aleksandra Rodacka, Joanna Gerszon, Mieczysław Puchała

Zakład Radiobiologii, Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) jest białkiem szczególnie podatnym na oksydacyjne modyfikacje. Na aktywność tego enzymu w dużym stopniu wpływają modyfikacje reaktywnej reszty cysteinowej występującej w centrum aktywnym (Cys-152). Modyfikacje te zachodzą m.in. w wyniku S-tiolacji, S-nitrozylacji lub w wyniku tworzenia wiązań disulfidowych prowadzących do agregacji. Oksydacyjne modyfikacje wpływają nie tylko na glikolityczne właściwości, ale także stymulują udział GAPDH w licznych procesach komórkowych. W pracy opisano w jaki sposób modyfikacje Cys-152 wpływają na przekierowanie ścieżki metabolicznej w komórce oraz przekształcają enzym szlaku glikolitycznego w czynnik proapoptyczny. Szczególnie interesującym zagadnieniem jest udział GAPDH w regulacji ekspresji endoteliny 1 oraz nitrozylacji białek jądrowych. W ostatnim rozdziale opisano udział GAPDH w procesach związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi.

Słowa kluczowe:

stres oksydacyjny • GAPDH • dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego • S-tiolacja • S-glutathionylacja • S-nitrozylacja • agregacja białek • choroby neurodegeneracyjne

Summary

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a key redox-sensitive protein, the activity of which is largely affected by oxidative modifications at its highly reactive cysteine residue in the active site of the enzyme (Cys-152). These modifications occur as a result of S-thiolation, S-nitrosylation or disulfide bonds that lead to aggregate formation. The oxidative changes not only affect the glycolytic function but also stimulate the participation of GAPDH in numerous cellular processes. In this review we describe how thiol modification of Cys-152 in GAPDH re-routes metabolic pathways in the cell and converts a metabolic enzyme into a pro-apoptotic factor. Especially interesting issue is the participation of GAPDH in the regulation of expression of endothelin 1 and nitrosylation of nuclear proteins. In the last section we describe involvement of GAPDH in the processes associated with neurodegenerative diseases.

Key words:

GAPDH • glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase • oxidative stress • S-thiolation • S-glutathionylation • S-nitrosylation • protein aggregation • neurodegenerative disease

* Praca powstała w ramach projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki nr 2012/05/B/NZ1/00701.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1093929>

Word count: 3220

Tables: –

Figures: 5

References: 60

Adres autorki: dr Aleksandra Rodacka, Zakład Radiobiologii, Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: olakow@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **ET-1** – endotelina 1; **GAPDH** – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; **GOSPEL** – cytosolowe białko wiążące się z GAPDH w kompetycji z białkiem Siah-1; **GSH** – glutation; **p300/CBP** – białko koaktywatorowe o aktywności acetylotransferazy histonowej; **NLS** – sygnał lokalizacji jądrowej; **PSH** - białka zawierające grupy –SH; **P-SOH** – kwas sulfenowy białka; **P-SO₂H** – kwas sulfinowy białka; **P-SO₃H** – kwas sulfonowy białka; **ROS** – reaktywne formy tlenu, **RNS** – reaktywne formy azotu; **NPSH** – niskocząsteczkowe związki zawierające grupy –SH; **RSH** – związki tiolowe; **Siah-1** – ligaza ubikwityny E3.

WSTĘP

Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH, EC 1.2.1.12) jest enzymem biorącym udział w jednym z etapów szlaku glikolitycznego. Występuje w komórkach w bardzo dużych stężeniach np. w drożdżach GAPDH stanowi około 20% całkowitej puli białek rozpuszczalnych (około 240 μM), u królika enzym ten występuje najobficiej w mięśniach szkieletowych i stanowi ponad 10% wszystkich białek cytoplazmatycznych (około 75 μM); dwukrotnie mniej jest go w mięśniu sercowym, a czterokrotnie mniej w wątrobie, mózgu i nerkach [52]. Enzym ten zaliczany jest do tzw. enzymów metabolizmu podstawowego (housekeeping enzyme) czyli takich, które zaangażowane są w procesy najistotniejsze dla przeżycia komórki i ulegających ekspresji na stosunkowo stałym, niezmiennym poziomie w większości tkanek organizmu.

Przeprowadzone w ostatnich latach badania wskazują, że GAPDH jest enzymem zaangażowanym nie tylko w dostarczanie komórce energii, ale jest białkiem wielofunkcyjnym biorącym udział w wielu niezależnych procesach, takich jak: fuzja błon plazmatycznych i jądrowych [36,40,46], tworzenie cytoszkieletu [46,59], powstawanie i transport pęcherzyków sekrecyjnych [8,46,58], translacyjna i transkrypcyjna kontrola ekspresji genów [46,50,57], utrzymanie integralności DNA [3,19,46]. Ponadto zmodyfikowana oksydacyjnie GAPDH uczestniczy w indukcji apoptozy [9,14,26,27,41,42,46,54]. Wiele badań wskazuje na udział dehydrogenazy w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem np. w chorobie Alzheimer'a, Parkinsona [9,14,15,27,28].

Mimo tak wielu funkcji i różnego umiejscowienia w komórce (cytoplazma, jądro komórkowe, mitochondria, aparat Golgiego, wewnętrzna błona komórkowa) ludzka dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego ma tylko jeden funkcjonalny gen zlokalizowany na chromosomie

12 (12p13.31). Analizy genetyczne potwierdziły występowanie w różnych tkankach organizmu tylko jednego rodzaju matrycowego RNA dla GAPDH [22].

Udział GAPDH w tak wielu różnych procesach komórkowych związany jest z potranslacyjnymi modyfikacjami tego enzymu, które determinują m.in. przemieszczanie się w obrębie struktur komórkowych [26,29,52,54]. Jednym z czynników indukujących modyfikacje GAPDH jest stres oksydacyjny i nitrozacyjny [9,29,41,42,54].

Ze względu na dużą zawartość w komórce oraz wyjątkową wrażliwość na oksydacyjne modyfikacje, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego uważana jest za jedno z głównych białek w największym stopniu uszkodzanych w wyniku działania stresu oksydacyjnego [29].

CZYNNIKI WYWOŁUJĄCE OKSYDACYJNE MODYFIKACJE BIAŁEK

Oksydacyjne modyfikacje białek zachodzą na skutek stresu oksydacyjnego, który może się pojawić w komórkach podczas zaburzenia procesów fizjologicznych, w wyniku działania czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie jonizujące, ultradźwięki, ksenobiotyki. Głównymi utleniaczami w organizmie są: reaktywne formy tlenu (ROS) - anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenuk wodoru, rodnik hydroksylowy, rodniki nadtlenkowe oraz reaktywne formy azotu (RNS) - tlenek azotu, nadtlenoazotyn.

Przed toksycznym działaniem ROS i RNS organizmy wykształciły dwa antyoksydacyjne systemy obronne: nieenzymatyczny i enzymatyczny. Do pierwszego zaliczamy niskocząsteczkowe związki antyoksydacyjne, takie jak: glutation (główny reduktor, powszechnie występujący w komórce), witamina C i E, β-karoten oraz białka np. albumina. Drugą linię obrony stanowią enzymy antyok-

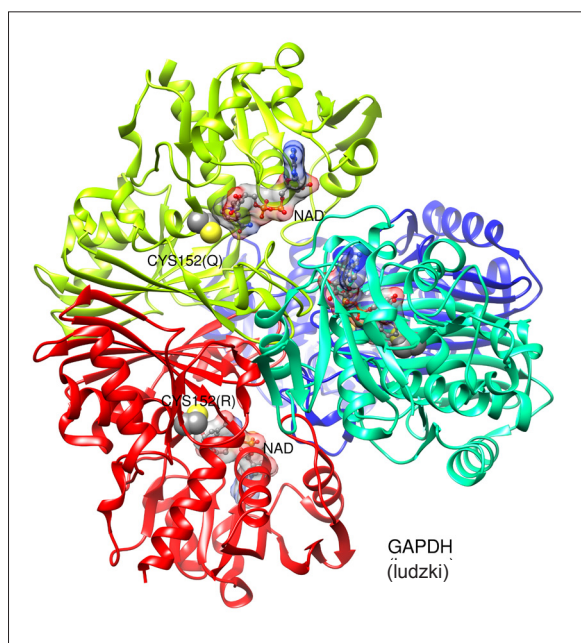
sydacyjne: katalaza, dysmutazy, peroksydazy, glutaredoksyna i tioredoksyna. Poziom poszczególne enzymów w komórce może być regulowany w zależności od potrzeb komórki i rodzaju czynnika stresogennego.

W warunkach równowagi oksydoredukcyjnej, ROS i RNS uwalniane w ilościach bezpiecznych dla komórki odgrywają rolę mediatorów i regulatorów wielu procesów komórkowych [5].

ROLA RESZT CYSTEINOWYCH W DEHYDROGENAZIE ALDEHYDU 3-FOSFOGLICERYNOWEGO

W komórce dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego występuje głównie w cytoplazmie w postaci homotetrameru o masie cząsteczkowej około 143 kDa. Niewielka pula enzymu może także występować w postaci homodimeru (mitochondria) oraz monomeru (jądro komórkowe) [9]. Stwierdzono, że aktywny katalitycznie jest jedynie enzym występujący w postaci tetrameru [39].

Każda podjednostka GAPDH złożona jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zbudowanego z 335 reszt aminokwasowych. Badania strukturalne pozwoliły wyodrębnić w podjednostkach dwie domeny funkcjonalne: domenę katalityczną (reszty aminokwasowe 152-314) oraz domenę wiążącą koenzym NAD⁺ (reszty aminokwasowe 1-151, 315-335) [31,32,46] (ryc. 1). Aktywność glikolityczna enzymu związana jest głównie z dwiema resztami aminokwasowymi: Cys-152 oraz His-179.



Ryc. 1. Struktura homotetrameru GAPDH z wbudowanym koenzymem NAD⁺ i zaznaczonymi cysteinami (Cys152) występującymi w centrach aktywnych podjednostek Q i R. Każda z czterech podjednostek wybarwiona innym kolorem. Grafika wykonana została z wykorzystaniem systemu wizualizacji Chimera VSCF na podstawie krystalograficznej struktury ludzkiej GAPDH; PDB ID 1znq [31]

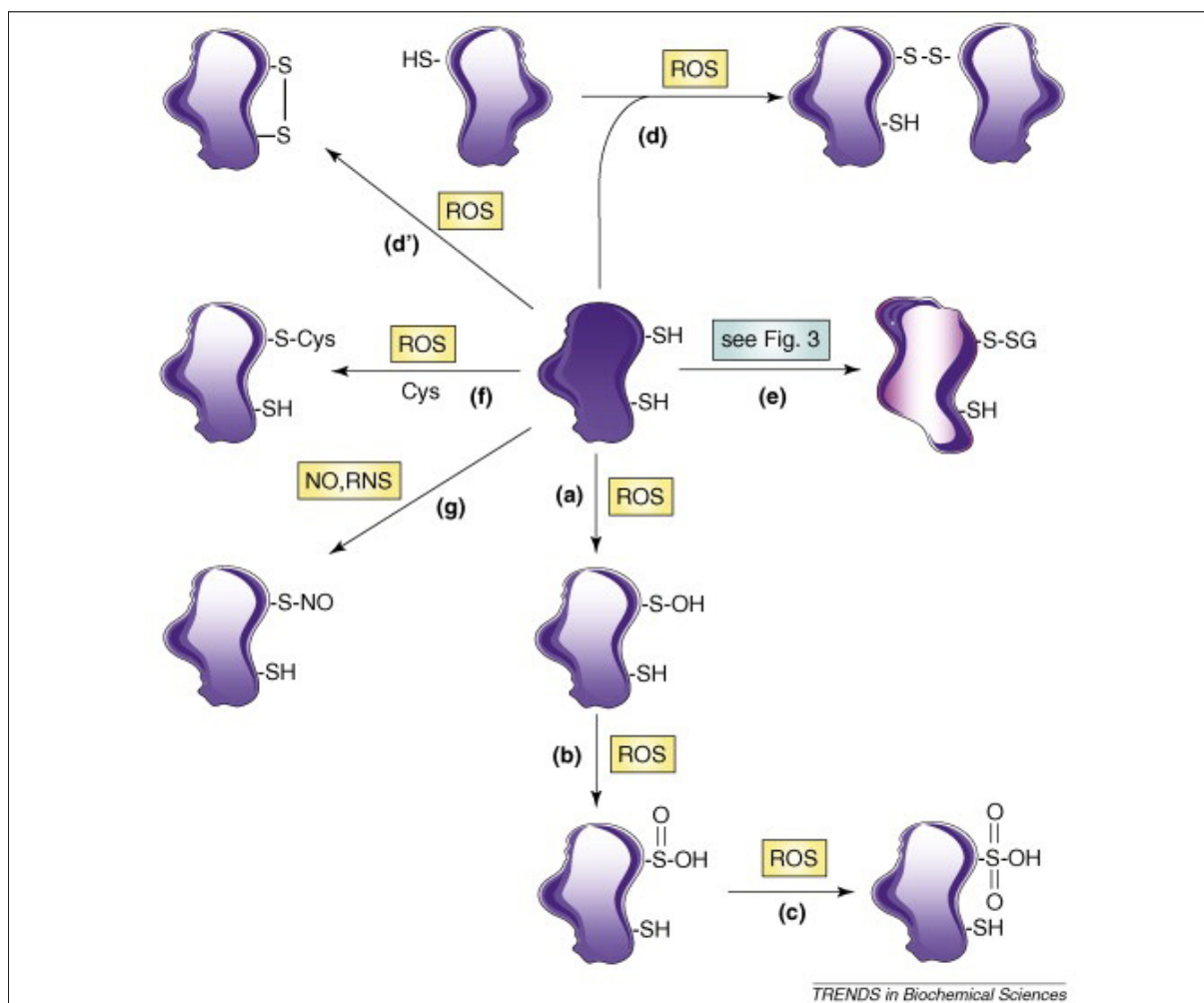
Cysteina 152 występuje w centrum aktywnym enzymu i jest bezpośrednio zaangażowana w reakcję przekształcania aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1,3-bisfosfoglicerynianu. Umiejscowiona jest w dużej kieszeni między domeną katalityczną, a domeną wiążącą NAD⁺. W natywnej cząsteczce grupa -SH tej cysteiny jest dostępna dla rozpuszczalnika (solvent-exposed) stąd może wchodzić w reakcje z niskocząsteczkowymi związkami, takimi jak: DTNB, S-nitrozoglutation, jodoacetamid [41,42]. Wykazuje także dużą reaktywność z ROS i RNS, co w konsekwencji prowadzi do utraty aktywności enzymatycznej enzymu [34,47,48,49]. W wyniku oddziaływania z dodatnio naładowaną His-179, reszta Cys-152 charakteryzuje się niskim pK_a, które wynosi około 5,4 (tzn. w pH 7,4 występuje w postaci anionu -S⁻) [37]. Oksydacyjnie zmodyfikowana Cys-152 indukuje proces agregacji GAPDH, wpływa na czwartorzędową strukturę enzymu, m.in. obniżając stabilność tetrameru, a także inicjuje przemieszczanie się GAPDH do jądra komórkowego [2,10,41,42,53,54].

Oprócz Cys-152 w podjednostce ludzkiej dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego występują jeszcze dwie inne reszty cysteinowe. Jedna z nich jest umiejscowiona w pozycji 156, natomiast druga w pozycji 247. Obydwie leżą w wewnętrznych, hydrofobowych obszarach cząsteczki i są niedostępne dla rozpuszczalnika. Ulegają oksydacyjnym modyfikacjom dopiero wtedy, gdy wcześniej dojdzie do zmian konformacyjnych białka. Cysteina 156 leży w odległości około 7,5 Å od cysteiny 152. Stwierdzono, że pod wpływem czynników utleniających, takich jak np. nadtlenek wodoru między obiema cysteinami mogą tworzyć się mostki disulfidowe (ryc. 5) [6,30].

UTLENIANIE RESZT CYSTEINOWYCH

Reaktywne formy tlenu i azotu są silnymi elektrofilami i w pierwszej kolejności reagują z grupami tiolowymi (-SH), hydroksylowymi (-OH) i aminowymi (-NH₂) występującymi w biomolekułach, takich jak DNA i białka. Grupa tiolowa (-SH) ze względu na obecność siarki jest najsilniejszym nukleofilem. W związku z tym tiole (RSH), do których zaliczamy białka zawierające grupy -SH (PSH) oraz niebiałkowe, niskocząsteczkowe związki zawierające grupy -SH (NPSH), ulegają znacznie szybciej utlenianiu w porównaniu ze związkami zawierającymi grupy hydroksylowe lub aminowe [20].

Wartość pK_a grup tiolowych większości związków występujących w cytoplazmie jest wyższa niż 8, co umożliwia utrzymanie tych grup w warunkach fizjologicznych w postaci uprotonowanej, w znacznym stopniu nieaktywnej w wewnątrzkomórkowym pH [23]. Przykładem jest cysteina i glutation, których wartość pK_a wynosi odpowiednio 8,3 i 8,8 [59]. Jednak reszty cysteinowe niektórych białek charakteryzują się znacznie niższymi wartościami pK_a, np. dla transferazy siarkowej wartość pK_a wynosi 3,5, a dla fosfatazy tyrozynowej około 5,3. Związane jest to z występowaniem w ich najbliższym otoczeniu dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych, takich jak histydyna, lizyna lub arginina [6,60].

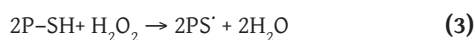
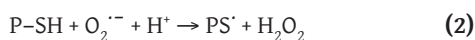


Ryc. 2. Oksydacyjne modyfikacje grup tiolowych w białkach. Grupy tiolowe białek są bardzo wrażliwe na oksydacyjne modyfikacje wywołane działaniem reaktywnych form tlenu (ROS) oraz reaktywnych form azotu (RNS). Produktami utleniania reszt cysteinowych mogą być: kwasy sulfenowe (a), sulfonowe (b) oraz kwasy sulfonowe (c). Utlenianie grup tiolowych białek może prowadzić do powstawania mostków disulfidowych między grupami -SH różnych cząsteczek białka (d, międzycząsteczkowe wiązania disulfidowe) lub między grupami -SH w obrębie tej samej cząsteczki białka (d', wewnątrzcząsteczkowe wiązania disulfidowe). Reakcje między grupami tiolowymi białek a niskocząsteczkowymi związkami, takimi jak glutation (e) lub cysteina (f) prowadzą do powstania mieszanych disulfidów. Pod wpływem reaktywnych form azotu grupy tiolowe białek ulegają S-nitrozylacji (g) (wg [18] za zgodą wydawnictwa)

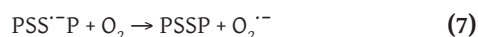
W fizjologicznym pH grupy tiolowe tych białek ulegają dysocjacji (reakcja 1) w wyniku czego powstaje anion tiolanowy ($P-S^-$), który jest znacznie bardziej reaktywny niż forma uprotonowana.



Grupy tiolowe w biomolekułach mogą ulegać jedno- lub dwuelektronowym reakcjom utlenienia. W wyniku jednoelektronowej reakcji utlenienia powstaje rodnik tiolowy ($PS^\cdot$) (reakcje 2-4).

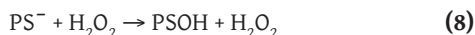


Rodnik tiolowy może wchodzić w wiele reakcji, jednak w warunkach tlenowych najczęściej oddziałuje z anionem tiolanowym (reakcja 6). Ostatecznie prowadzi to do powstawania anionorodnika disulfidowego, który w reakcji z tlenem przekształca się do disulfidu, a dodatkowo produktem tej reakcji jest anionorodnik nadtlenkowy (reakcja 7).

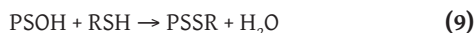


Dwuelektronowa reakcja utlenienia grup tiolowych prowadzi do powstania reaktywnego, niestabilnego kwasu sulfenowego ($P-SOH$, siarka na 0 stopniu utlenienia), który

w wyniku dalszego utleniania może zostać przekształcony do kwasu sulfinowego ($\text{P-SO}_2\text{H}$, siarka na +2 stopniu utlenienia) oraz kwasu sulfonowego ($\text{P-SO}_3\text{H}$, siarka na +4 stopniu utlenienia) (ryc. 2).



Kwas sulfenowy może następnie oddziaływać z grupami tiolowymi białek lub niskocząsteczkowych związków tworząc produkty połączone stabilnymi wiązaniami disulfidowymi (reakcja 9).



W białkach wiązania disulfidowe i kwasy sulfenowe powstałe w wyniku utleniania reszt tiolowych mogą ulegać redukcji np. w reakcji z niskocząsteczkowymi tiolami. Kwasy sulfinowe i sulfonowe powstające na skutek dużego stresu oksydacyjnego nie ulegają redukcji w warunkach fizjologicznych [5,6].

W różnych rodzajach komórek względna zawartość różnych tioli (RSH) jest prawie jednakowa, natomiast wyraźne różnice istnieją między komórką a plazmą. Wewnątrz komórek poziom NPSH (głównie glutationu) jest znacznie niższy niż poziom heterogennej populacji białek tiolowych (głównie GAPDH, kinaza keratynowa). W środowisku pozakomórkowym (plazmie) białka tiolowe zasadniczo reprezentowane są tylko przez albuminy (które mają tylko jedną grupę SH), natomiast poziom niebiałkowych związków tiolowych (cysteina, cysteinoglicyna, glutation oraz homocysteina) jest znacznie wyższy [17,18,20].

Głównymi białkami komórkowymi, w których modyfikacji ulegają reszty cysteinowe podczas stresu oksydacyjnego są: aktyna, kinaza keratynowa, anhidraza węglanowa III, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, fosforylaza glikogenu, S-transferaza glutationu oraz hemoglobina [5].

S-TIOLACJA BIAŁEK

S-tiolacja białek polega na utworzeniu mostków disulfidowych między grupami tiolowymi białek, a niskocząsteczkowymi związkami tiolowymi (25,55). Gdy glutation utworzy addukt z grupą tiolową białka (białko-S-S-glutation), S-tiolacja często określana jest mianem S-glutationylacji. Ze względu na to, że glutation w komórkach zwierzęcych jak i roślinnych występuje w bardzo dużych stężeniach (w komórkach ssaków jego stężenie mieści się w zakresie 1-10 mM) S-glutationylacja białek przeważa nad innymi modyfikacjami reszt cysteinowych z udziałem innych niskocząsteczkowych związków tiolowych [17,18,20].

Do utworzenia mieszanych disiarczków białko-S-S-glutation prowadzą dwa mechanizmy (ryc. 3) [17,18]. Pierwszy z nich polega na tworzeniu wiązania disiarczkowego między zredukowanym glutationem, a utlenionymi produktami powstałymi na reszcie cysteinowej białka, takimi jak: rodnik tiłowy ($\text{P-S}^\cdot$), kwas sulfenowy (P-SOH) lub S-nitrozotiole (P-SNO) (ryc. 3, szlak b, c, e). Drugi mechanizm S-gluta-

tionylacji związany jest z oddziaływaniem jakie zachodzi między różnymi postaciami utlenionego glutationu (rodnik tiłowy glutationu – $\text{GS}^\cdot$; S-nitrozoglutation – GSNO; kwas sulfonowy glutationu – GSOH) a grupami -SH białek (ryc. 3, szlak b', d, a) [4,17,18].

W komórce S-tiolacja białek pojawia się w warunkach umiarkowanego stresu oksydacyjnego, ale może pojawić się także w warunkach fizjologicznych, gdy zachowana jest równowaga oksydoredukcyjna (w tzw. komórkach spoczynkowych). Stwierdzono, że około 1% wszystkich białek komórkowych ulega S-tiolacji. Poziom ten może gwałtownie wzrosnąć w ciągu zaledwie kilku minut w komórkach, w których dojdzie do gwałtownego wytworzenia ROS np. na skutek wybuchu tlenowego [11,45].

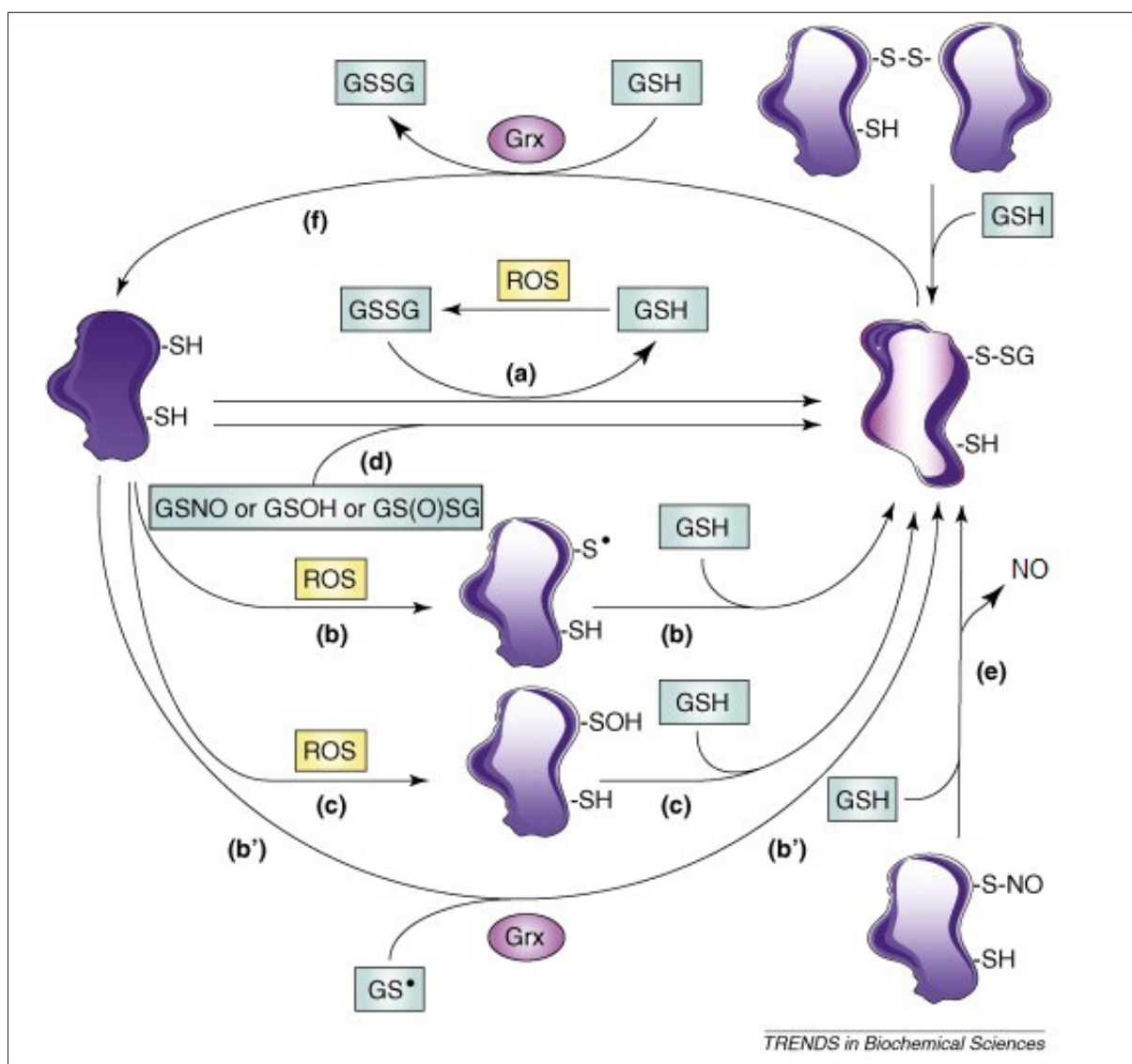
S-tiolacja wpływa na właściwości funkcjonalne białek. Jest procesem odwracalnym mającym duże znaczenie fizjologiczne, gdyż chroni grupy -SH przed nieodwracalnymi modyfikacjami np. do kwasów sufinowych i sulfonowych, bardzo często kosztem chwilowej utraty aktywności biologicznej białek [12,56].

Pierwsze dowody potwierdzające udział S-tiolacji w ochronie białek przed nadmiernym i przedłużającym się stresem oksydacyjnym w komórkach dostarczyli Dominici i wsp. [21]. Obecnie dane na ten temat są bardziej precyzyjne. Na podstawie wielu prac wiadomo, że S-glutationylacja białek reguluje aktywność białek związanych ze szlakami sygnalizacji komórkowej, uczestniczy w utrzymaniu równowagi oksydoredukcyjnej, reguluje homeostazę wapniową oraz aktywność kanałów jonowych. Ponadto reguluje proces fałdowania białka oraz chroni enzymy glikolityczne przed nieodwracalnymi uszkodzeniami [17,18].

WPLYW S-TIOLACJI NA WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE DEHYDROGENAZY ALDEHYDU 3-FOSFOGLICERYNOWEGO

Badania przeprowadzone na komórkach ssaków, a także na komórkach drożdży *Sacharomyces cerevisiae* wskazują, że pod wpływem nadtlenu wodoru GAPDH ulegała inaktywacji głównie przez S-glutationylację reszty cysteinowej występującej w centrum aktywnym i zaangażowanej w reakcję katalizy. Jest to odwracalna modyfikacja reszty cysteinowej i dzięki temu chroni enzym przed nieodwracalnym przekształceniem reaktywnej Cys-152 do kwasu sulfinowego i sulfonowego. Ponadto S-glutationylacja zmienia punkt izoelektryczny dehydrogenazy z 8,1 do 6,9 (co oznacza że w pH 7,4 ładunek białka zmienia się na bardziej ujemny) [29].

Inhibicja aktywności glikolitycznej dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego na skutek S-tiolacji może być korzystna dla komórek, gdyż może nastąpić przekierowanie glukozy-6-fosforanu ze szlaku glikolitycznego na szlak pentozofosforanowy (ryc. 5). Szlak pentozofosforanowy jest głównym źródłem wytwarzania NADPH w cytosolu komórek Eukaryota. NADPH jest donorem elektronów zarówno dla reduktazy glutationowej jak i dla reduktazy tioredoksyny, zatem jest niezbędny w przywracaniu i utrzymaniu równowagi redoks w cytosolu [24,44,45,56].

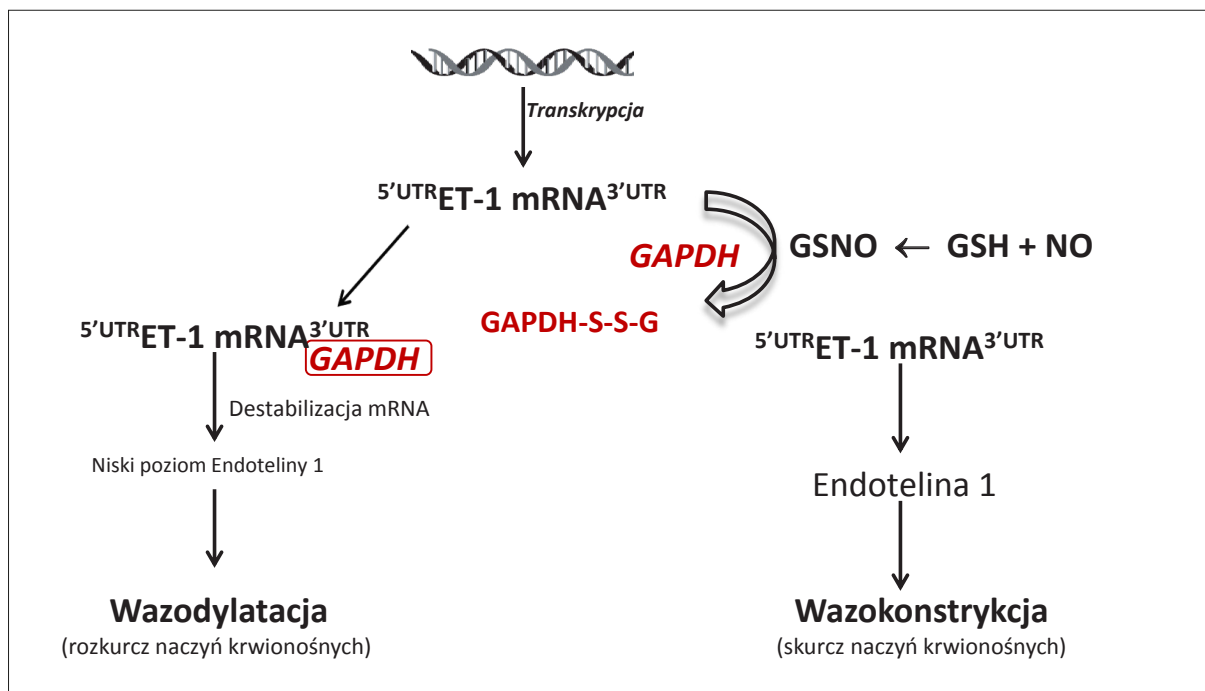


Ryc. 3. Mechanizmy prowadzące do S-glutathionylacji i detiolacji S-glutathionylowanych białek (deglutathionylacji). S-glutathionylacja białek może zachodzić w reakcji grup –SH białek z utlenioną formą glutationu (GSSG) (a), S-nitrozoglutationem (GSNO) lub innymi utlenionymi formami glutationu, takimi jak np. kwas sulfenowy glutationu (d). Grupy tiolowe białek pod wpływem reaktywnych form tlenu (ROS) mogą zostać przekształcone do rodnika tiolowego (b) lub kwasu sulfenowego (c) następnie mogą utworzyć wiązanie disulfidowe z glutationem (b i c). S-glutathionylacja białek może nastąpić także w reakcji rodnika tiolowego glutationu z grupami –SH białek. Katalizatorem tej reakcji jest glutaredoksyna (Grx) (b'). Białka, które wcześniej uległy S-nitrozylacji mogą ulec S-glutathionylacji z jednoczesnym uwolnieniem tlenu azotu (e). Procesem odwrotnym do S-glutathionylacji białek jest deglutathionylacja i przebiega z udziałem oksydaz białkowo-disulfidowych np. glutaredoksyny (f) (wg [18] za zgodą wydawnictwa)

Badania Ralsera i wsp. wykazały, że obniżenie aktywności GAPDH o 20% spowodowało znaczny wzrost poziomu metabolitów szlaku pentozofosforanowego (NADPH) [44]. Na podstawie modelowych obliczeń matematycznych oszacowano, że przy dwudziestoprocentowej inhibicji GAPDH stosunek NADPH/NADP wzrasta z 6,5 do 19 [44]. Po ustąpieniu stresu oksydacyjnego zredukowany glutation i tioredoksyna przywracają aktywność katalityczną GAPDH co w konsekwencji aktywuje proces glikolizy [5]. Według Cerne i wsp. opisany powyżej proces zachodzi w warunkach patologicznych gdy poziom stresu oksydacyjnego jest bardzo wysoki [16].

Odwracalne modyfikacje reszty cysteinowej występującej w centrum aktywnym GAPDH odgrywają także bardzo ważną rolę w regulacji homeostazy naczyniowej (ryc. 4) [50].

Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego jest białkiem, które poprzez wiązanie się do końcowych, niekodujących sekwencji mRNA (3' i 5' UTR) uczestniczy w regulacji potranskrypcyjnej ekspresji genów [51]. Przykładem białka, w ekspresji którego uczestniczy GAPDH jest endotelina 1 (ET-1). Dehydrogenaza przyłączając się do końcowej sekwencji 3'UTR mRNA endoteliny 1 obniża jej ekspresję.



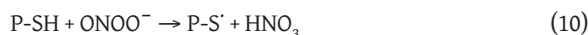
Ryc. 4. Regulacja ekspresji endoteliny 1 (ET-1) przez oksydacyjnie modyfikowaną GAPDH. GAPDH poprzez wiązanie do matrycowego RNA dla ET-1 hamuje syntezę ET-1. W konsekwencji prowadzi to do rozszerzenia naczyń krwionośnych. S-glutatylnylacja Cys-152 występującej w centrum aktywnym GAPDH przeciwdziała wiązaniu dehydrogenazy do mRNA ET-1. Zwiększony poziom endoteliny wpływa na skurcz naczyń krwionośnych (wg [56] zmodyfikowano)

Mechanizm oddziaływania enzymu z matrycowym RNA związany jest z destabilizacją kwasu nukleinowego, przez co staje się on podatny na działanie cytosolowych rybonukleaz [50]. Czynnikiem uniemożliwiającym wiązanie się GAPDH z mRNA ET-1 jest stres oksydacyjny, wywołujący S-glutatylnylację reszty Cys-152 występującej w centrum aktywnym dehydrogenazy. Skutkiem tego zwiększa się ekspresja białka ET-1. Fizjologicznie, konsekwencją zwiększonego poziomu endoteliny jest gwałtowny skurcz naczyń krwionośnych (ryc. 4) [50].

S-NITROZYLACJA BIAŁEK

S-nitrozyłacja białek jest odwracalną, potranslacyjną modyfikacją podobną do S-tiolacji i występuje właściwie we wszystkich układach biologicznych. Obydwie modyfikacje, S-nitrozyłacja i S-tiolacja, mogą występować jednocześnie w tej samej części białka w obecności odpowiednich ROS i RNS [20].

S-nitrozyłacja białek polega na kowalencyjnym przyłączeniu grupy NO do reszt cysteinowych białek. Badania potwierdziły, że modyfikacji tej ulegają tylko reszty cysteinowe charakteryzujące się niskim pK_a oraz eksponowane na powierzchni cząsteczki białka [57]. S-nitrozyłacja zachodzi na dwa sposoby: w bezpośredniej reakcji reaktywnych form azotu z resztami tiolowymi białka (reakcja 10 i 11, 13) lub w wyniku nitrozyłacji reszt cysteinowych białek w reakcji z S-nitrozowymi pochodnymi niskocząsteczkowych związków tiolowych, głównie z S-nitrozoglutationem (GSNO) (reakcja 14) [5].



Poziom S-nitrozyłacji białek w komórce zależy od równowagi między procesami nitrozyłacji i denitrozyłacji. W warunkach fizjologicznych głównie dwa układy enzymatyczne odpowiedzialne są za denitrozyłację białek: glutation/reduktaza S-nitrozoglutationu oraz tioredoksyna/reduktaza tioredoksyny [1,55].

WPLYW S-NITROZYLACJI NA WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE I LOKALIZACJĘ W KOMÓRCE DEHYDROGENAZY ALDEHYDU 3-FOSFOGLICERYNOWEGO

Białka, które uległy S-nitrozyłacji pełnią funkcję magazynującą i transportującą tlenek azotu w organizmie, uczestniczą w przekazywaniu sygnału i obronie komórek przed patogenami, modyfikują działanie kanałów jonowych. Odgrywają także dużą rolę w procesach transkrypcyjnych [7,38]. S-nitrozyłacja hamuje aktywność enzymatyczną wielu białek. Przykładem może być kaspaza 3, która w wyniku S-nitrozyłacji traci zdolność indukcji procesu apoptozy [50]. Przeciwny skutek dla komórki wywołuje S-nitrozyłacja dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego [26,41,42,54,55].

W wyniku stresu wywołanego działaniem reaktywnych form azotu GAPDH ulega S-nitrozylacji w pozycji Cys-152. Modyfikacja ta hamuje aktywność katalityczną dehydrogenazy, inicjuje przemieszczanie się enzymu do jądra komórkowego, indukuje proces apoptozy [14,26,27,54,55]. Ponadto GAPDH-SNO może pełnić rolę nitrozyłazy szczególnie w stosunku do białek jądrowych [33,35].

Przemieszczania oksydacyjnie zmodyfikowanej dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH-SNO) do jądra komórkowego odbywa się z udziałem ligazy Siah 1 (seven in absentia homolog 1) [26,54,57]. Siah 1 jest białkiem wyjątkowo niestabilnym w komórce. Jego ekspresja w fizjologicznych warunkach jest niewielka, ale bardzo wzrasta w warunkach stresowych [57]. W N-końcowym odcinku zawiera domenę RING, odpowiedzialną za właściwości ligazowe, natomiast w C-końcowym odcinku znajduje się sekwencja lokalizacji jądrowej (NLS). Stwierdzono, że 12 ostatnich reszt aminokwasowych C-końca odpowiedzialne jest za wiązanie z GAPDH [13]. Utworzenie kompleksu GAPDH-SNO-Siah 1 jest sygnałem inicjującym przemieszczenie się białek z cytoplazmy do jądra komórkowego. W jądrze GAPDH stabilizuje ligazę i ułatwia jej ubikwitynację oraz degradację supresorowych białek jądrowych (N-CoR, nuclear co-repressor). W konsekwencji dochodzi do śmierci komórki [26]. Dehydrogenaza wspomaga także autoacetylację acylotransferazy p300/CBP. Kompleks GAPDH-p300/CBP aktywuje ekspresję niektórych białek, m.in. odpowiedzialnych za apoptotyczną śmierć komórki, takich jak: p53, PUMA, Bax, p21 [26,53,54].

Przemieszczaniu się GAPDH-SNO z cytoplazmy do jądra komórkowego zapobiega cytosolowe białko GOSPEL (GADPH's competitor of Siah Protein Enhances Life). Współzawodniczy ono z białkiem Siah 1 w wiązaniu się z dehydrogenazą [43,46,53]. GOSPEL jest cytoplazmatycznym, hydrofilowym białkiem złożonym z 406 reszt aminokwasowych. Znaczną ekspresję tego białka obserwowano w tych samych tkankach, w których odnotowano wysoki poziom ekspresji GAPDH, tj. mięśniach szkieletowych, mózgu, płucach i sercu. Prawdopodobnie białko to reguluje fizjologiczne funkcje GAPDH [43,46,53].

Pod wpływem RNS białko GOSPEL ulega bardzo szybko S-nitrozylacji. Modyfikacja ta umożliwia mu wiązanie się z GAPDH-SNO w kompetycji z białkiem Siah 1. Jednak gdy poziom stresu przekroczy pewien próg, wiązanie GAPDH z Siah 1 dominuje nad wiązaniem dehydrogenazy z białkiem GOSPEL [53].

Zmodyfikowana w wyniku S-nitrozylacji dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego może być także donorem grupy NO dla innych białek. Badania zespołu Snydera dowiodły, że GAPDH może nitrozyłować białka jądrowe, takie jak: sirtuinę 1 (SIRT 1), histonową deacetylazę 1 (HDAC 2) oraz kinazę białkową zależną od DNA (DNA-PK) [33]. Stwierdzono również, że GAPDH-SNO efektywniej nitrozyluje białka (np. SIRT 1) niż np. S-nitrozoglutation [33].

Denitrozylacja GAPDH z jednoczesnym przeniesieniem grupy NO na inne białko może korzystnie wpływać na przeży-

cie komórki. Przykładem takiego procesu jest przeniesienie grupy NO z GAPDH będącej w kompleksie z białkiem Siah 1 na nukleofosminę (białko B23). S-nitrozylacja białka B23 zmniejsza siłę oddziaływania między Siah 1 a GAPDH, natomiast dochodzi do wiązania B23 z Siah 1. Białko Siah 1 w wyniku wiązania z B23 traci aktywność ligazy i nie indukuje procesów prowadzących do śmierci komórki [35].

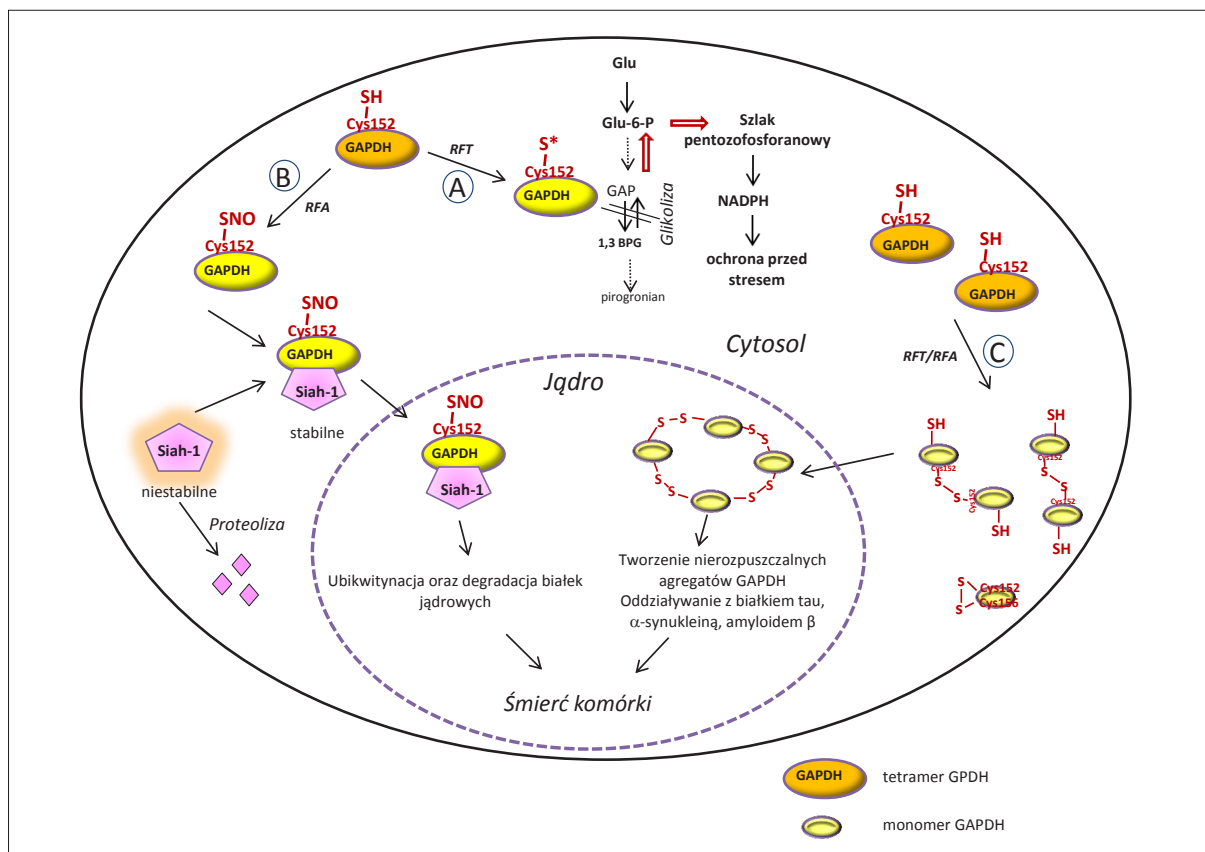
UDZIAŁ MOSTKÓW DISULFIDOWYCH W AGREGACJI GAPDH. ROLA TYCH PROCESÓW W CHOROBYCH NEURODEGENERACYJNYCH

Jak opisano wyżej, generowane w komórce reaktywne formy tlenu i azotu w wyniku oddziaływania z resztami cysteinowymi białek powodują ich S-tiolację i S-nitrozylację. Jeśli jednak ROS i RNS wytwarzane są w nadmiarze przez długi czas, to dochodzi także do modyfikacji innych reszt aminokwasowych oraz zmian konformacyjnych białka. Zaburzenia struktury przestrzennej sprzyjają procesom agregacji białek. W znacznym stopniu zachodzą one w wyniku tworzenia mostków disulfidowych między częściami tego samego białka (autoagregacja) lub między częściami różnych białek. Utlenianie i agregacja białek związane są z wieloma chorobami, w tym neurodegeneracyjnymi np. chorobą Parkinsona i chorobą Alzheimera [9,14,15,27,28,46].

Przykładem białka, które pod wpływem stresu oksydacyjnego tworzy oligomery i agregaty z udziałem mostków disulfidowych jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Dowiedziono, że agregaty te wykazują znaczne podobieństwo do fibryli tworzonych przez β -amyloid i α -synukleinę [41,42].

Badania nad modyfikowaną GAPDH, w której reszty cysteinowe podstawiono resztami alaninowymi lub serynowymi wykazały, że za tworzenie agregatów dehydrogenazy odpowiedzialne są głównie reszty cysteinowe występujące w centrach aktywnych każdego z czterech monomerów (u człowieka Cys 152). Zanim jednak powstaną mostki disulfidowe musi wcześniej zmienić się konformacja białka, gdyż stwierdzono, że w natywnej cząsteczce odległości między resztami Cys-152 poszczególnych monomerów są zbyt duże, aby mogło dojść do powstania między nimi wiązań S-S. Wiązania disulfidowe indukują dalsze zmiany konformacji cząsteczki. Następuje ekspozycja reszt cysteinowych, które w natywnym białku usytuowane są wewnątrz cząsteczki. Dochodzi do kolejnych reakcji, w wyniku których powstają nierozpuszczalne oligomery i agregaty [41,42].

Nierozpuszczalne, połączone mostkami disulfidowymi formy GAPDH zlokalizowano w tkankach mózgu pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Alzheimera (AD) oraz stwierdzono u genetycznie zmodyfikowanych myszy z wywołaną chorobą Alzheimera [15]. Tworzenie agregatów GAPDH i ich akumulację w jądrze komórkowym i cytoplazmie potwierdzono także w badaniach *in vitro*, w których wykorzystano komórki nerwowe linii HT22 oraz neurony kory mózgowej eksponowanych na działanie amyloidu β (A β), nadtlenu wodoru lub diamidu. Zaobserwowano ponadto, że długotrwała inkubacja (do 7 dni) neuronów kory mózgowej z A β skutkuje postępującym tworzeniem w cytoplazmie, złasz-



Ryc. 5. Wpływ oksydacyjnych modyfikacji Cys-152 na funkcję i lokalizację GAPDH w komórce. (A) Pod wpływem stresu oksydacyjnego dochodzi do hamowania aktywności GAPDH. W konsekwencji może nastąpić przekierowanie glukozy-6-fosforanu ze szlaku glikolitycznego na szlak pentozofosforanowy. Dzięki temu dochodzi do zwiększonego wytwarzania NADPH. NADPH stanowi główną siłę redukującą w komórce i dzięki temu chroni ją przed nadmiernym stresem oksydacyjnym. (B) Pod wpływem reaktywnych form azotu GAPDH ulega S-nitrozylacji w pozycji Cys-152. Modyfikacja ta umożliwia wiązanie dehydrogenazy z ligazą Siah 1. Kompleks GAPDH-Siah 1 przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego. GAPDH stabilizuje ligazę Siah 1 i ułatwia jej ubiquitynację oraz degradację supresorowych białek jądrowych. (C) Indukcja procesu apoptozy na skutek agregacji GAPDH. Ekspozycja GAPDH na nadmierny i przedłużający się stres oksydacyjny prowadzi do tworzenia wiązań disulfidowych między Cys-152 a Cys-156 (wiązania wewnątrzcząsteczkowe) oraz między Cys-152 różnych podjednostek. Tworzenie wiązań disulfidowych między podjednostkami prowadzi do zmian konformacyjnych cząsteczki i ekspozycji wewnętrznie usytuowanych grup –SH. Kolejne międzycząsteczkowe wiązania disulfidowe prowadzą do tworzenia i akumulacji nierozpuszczalnych agregatów zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym. W konsekwencji dochodzi do indukcji apoptotycznej śmierci komórki (wg [6] – zmodyfikowano)

cza wokół jądra komórkowego, nierozpuszczalnych wielomonomerowych struktur GAPDH [15].

Cumming i Schuber zaproponowali mechanizm wyjaśniający akumulację nierozpuszczalnych agregatów GAPDH w płytkach amyloidowych występujących w chorobie Alzheimer'a [15]. Według tego modelu wiązania disulfidowe powstające w GAPDH pod wpływem działania czynników utleniających wpływają na zmianę konformacji GAPDH, co dalej prowadzi do tworzenia nierozpuszczalnych agregatów, które same są cytotoksyczne lub mogą pośrednio indukować apoptozę w wyniku oddziaływania z innymi wewnątrzkomórkowymi białkami podatnymi na agregację (agregat-prone proteins), takimi jak białko tau, α -synukleina, amyloid β . Podczas apoptozy, nierozpuszczalna postać GAPDH jest uwalniana z jądra i gromadzi się w ciałkach inkluzyjnych w cytoplazmie. Po śmierci komórek uwolnione, nierozpuszczalne agregaty GAPDH mogą akumulować się w zewnętrznych komórkowych blaszkach [15].

PODSUMOWANIE

Reszty cysteinowe w białkach ze względu na swe właściwości chemiczne odgrywają bardzo ważną rolę w procesach biochemicznych. W niektórych białkach regulują funkcję, aktywność i lokalizację danego białka w komórce. Przykładem jest dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, której wiele funkcji zależy od stanu redoks cysteiny występującej w centrum katalitycznym – Cys152. Reszta ta jest bardzo wrażliwa na modyfikacje oksydacyjne, jak przedstawiono w niniejszej pracy, jej utlenianie z jednej strony może działać cytotoksycznie z drugiej zaś cytoprotekcyjnie na komórkę (szczegóły omówiono w podpisie pod ryciną 5).

Podziękowanie

Serdecznie dziękuję dr Eligiuszowi Serafinowi za przygotowanie ryciny przedstawiającej strukturę GAPDH.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Anand P., Stamler J.S.: Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *J. Mol. Med.*, 2012; 90: 233-244
- [2] Arutyunov D.Y., Muronetz V.I.: The activation of glycolysis performed by the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the model system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 300: 149-154
- [3] Azam S., Jouvett N., Jilani A., Vongsamphanh R., Yang X., Yang S., Ramotar D.: Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 30632-30641
- [4] Bilska A., Kryczyk A., Włodek L.: Różne oblicza biologicznej roli glutationu. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 438-453
- [5] Biswas S., Chida A.S., Rahman I.: Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem. Pharmacol.*, 2006; 71: 551-564
- [6] Brandes N., Schmitt S., Jakob U.: Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxid. Redox Signal.*, 2009; 11: 997-1014
- [7] Broillet M.C.: S-nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999; 55: 1036-1042
- [8] Bryksin A.V., Laktionov P.P.: Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from golgi apparatus to endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 2008; 73: 619-625
- [9] Butterfield D.A., Hardas S.S., Lange M.L.: Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.*, 2010; 20: 369-393
- [10] Carlile G.W., Chalmers-Redman R.M., Tatton N.A., Pong A., Borde K.E., Tatton W.G.: Reduced apoptosis after nerve growth factor and serum withdrawal: conversion of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to a dimer. *Mol. Pharmacol.*, 2000; 57: 2-12
- [11] Chai Y.C., Ashraf S.S., Rokutan K., Johnston R.B.Jr., Thomas J.A.: S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994; 310: 273-281
- [12] Chen Y.Y., Chu H.M., Pan K.T., Teng C.H., Wang D.L., Wang A.H., Khoo K.H., Meng T.C.: Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 35265-35272
- [13] Chepchumba E., Yego K., Mohr S.: Siah-1 protein is necessary for high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation and cell death in Muller cells. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 3181-3190
- [14] Chuang D.M., Hough C., Senatorov V.V.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005; 45: 269-290
- [15] Cumming R.C., Schubert D.: Amyloid- β induces disulfide bonding and aggregation of GAPDH in Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 2005; 19: 2060-2062
- [16] Cyrne L., Antunes F., Sousa-Lopes A., Diaz-Bérrio J., Marinho H.S.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is largely unresponsive to low regulatory levels of hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem.*, 2010 11: 49
- [17] Dalle-Donne I., Milzani A., Gagliano N., Colombo R., Giustarini D., Rossi R.: Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* 2008; 10: 445-473
- [18] Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo G., Giustarini D., Milzani A.: Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.*, 2009; 34: 85-96
- [19] Demarse N.A., Ponnusamy S., Spicer E.K., Apohan E., Baatz J.E., Ogretmen B., Davies C.: Direct binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to telomeric DNA protects telomeres against chemotherapy-induced rapid degradation. *J. Mol. Biol.*, 2009; 394: 789-803
- [20] Di Simplicio P., Franconi F., Frosali S., Giuseppe D.: Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids*. 2003; 25: 323-339
- [21] Dominici S., Valentini M., Maellaro E., Del Bello B., Paolicchi A., Lorenzini E., Tongiani R., Comporti M., Pompella A.: Redox modulation of cell surface protein thiols in U937 lymphoma cells: the role of γ -glutamyl transpeptidase-dependent H_2O_2 production and S thiolation. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999; 27: 623-635
- [22] Ercolani L., Florence B., Denaro M., Alexander M.: Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 15335-15341
- [23] Giles G.I., Tasker K.M., Jacob C.: Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 31: 1279-1283
- [24] Grant C.M.: Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *J. Biol.*, 2008; 7: 1
- [25] Grant C.M., Quinn K.A., Dawes I.W.: Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 2650-2656
- [26] Hara M.R., Agrawal N., Kim S.F., Cascio M.B., Fujimuro M., Ozeki Y., Takahashi M., Cheah J.H., Tankou S.K., Hester L.D., Ferris C.D., Hayward S.D., Snyder S.H., Sawa A.: S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.*, 2005; 7: 665-674
- [27] Huang J., Hao L., Xiong N., Cao X., Liang Z., Sun S., Wang T.: Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: relevance to protein misfolding and aggregation. *Brain Res.*, 2009; 1279: 1-8
- [28] Huang J., Xiong N., Chen C., Xiong J., Jia M., Zhang Z., Cao X., Liang Z., Sun S., Lin Z., Wang T.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: activity inhibition and protein overexpression in rotenone models for Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2011; 192: 598-608
- [29] Hwang N.R., Yim S.H., Kim Y.M., Jeong J., Song E.J., Lee Y., Lee J.H., Choi S., Lee K.J.: Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem. J.*, 2009; 423: 253-264
- [30] Ishii T., Sunami O., Nakajima H., Nishio H., Takeuchi T., Hata F.: Critical role of sulfenic acid formation of thiols in the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.*, 1999; 58: 133-143
- [31] Ismail S.A., Park H.W.: Structural analysis of human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2005; 61: 1508-1513
- [32] Jenkins J.L., Tanner J.J.: High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2006; 62: 290-301
- [33] Kornberg M.D., Sen N., Hara M.R., Juluri K.R., Nguyen J.V., Snowman A.M., Law L., Hester L.D., Snyder S.H.: GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nat. Cell Biol.* 2010; 12: 1094-1100
- [34] Kowalczyk A., Serafin E., Puchała M.: Inactivation of chosen dehydrogenases by the products of water radiolysis and secondary albumin and haemoglobin radicals. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008; 84: 15-22

- [35] Lee S.B., Kim C.K., Lee K.H., Ahn J.Y.: S-nitrosylation of B23/nucleophosmin by GAPDH protects cells from the SIAH1-GAPDH death cascade. *J. Cell Biol.*, 2012; 199: 65-76
- [36] López Vinals A.E., Farías R.N., Morero R.D.: Characterization of the fusogenic properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: fusion of phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987; 143: 403-409
- [37] Morgan P.E., Dean R.T., Davies M.J.: Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002; 403: 259-269
- [38] Murphy E., Kohr M., Sun J., Nguyen T., Steenbergen C.: S-Nitrosylation: a radical way to protect the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2012; 52: 568-577
- [39] Nagradova N.K.: Study of the properties of phosphorylating D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 2001; 66: 1067-1076
- [40] Nakagawa T., Hirano Y., Inomata A., Yokota S., Miyachi K., Kaneda M., Umeda M., Furukawa K., Omata S., Horigome T.: Participation of a fusogenic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in nuclear membrane assembly. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 20395-20404
- [41] Nakajima H., Amano W., Fukuhara A., Kubo T., Misaki S., Azuma Y.T., Inui T., Takeuchi T.: An aggregate-prone mutant of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase augments oxidative stress-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009; 390: 1066-1071
- [42] Nakajima H., Amano W., Kubo T., Fukuhara A., Ihara H., Azuma Y.T., Tajima H., Inui T., Sawa A., Takeuchi T.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 34331-34341
- [43] Nakamura T., Lipton S.A.: According to GOSPEL: filling in the GAP(DH) of NO-mediated neurotoxicity. *Neuron*, 2009; 63: 3-6
- [44] Ralser M., Wamelink M.M., Kowald A., Gerisch B., Heeren G., Struys E.A., Klipp E., Jakobs C., Breitenbach M., Lehrach H., Krobitsch S.: Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J. Biol.*, 2007; 6: 10
- [45] Ravichandran V., Seres T., Moriguchi T., Thomas J.A., Johnston R.B.Jr.: S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 25010-25015
- [46] Rodacka A.: Właściwości i różnorodność funkcjonalna dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 775-789
- [47] Rodacka A., Serafin E., Bubinski M., Krokosz A., Puchala M.: The influence of oxygen on radiation-induced structural and functional changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase. *Rad. Phys. and Chem.*, 2012; 81: 807-815
- [48] Rodacka A., Serafin E., Puchala M.: Efficiency of superoxide anions in the inactivation of selected dehydrogenases. *Rad. Phys. Chem.*, 2010; 79: 960-965
- [49] Rodacka A., Strumillo J., Serafin E., Puchala M.: Effect of resveratrol and tiron on the inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by superoxide anion radical. *Curr. Med. Chem.*, 2014; 21: 1061-1069
- [50] Rodríguez-Pascual F., Redondo-Horcajo M., Magán-Marchal N., Lagares D., Martínez-Ruiz A., Kleinert H., Lamas S.: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *Mol. Cell Biol.*, 2008; 28: 7139-7155
- [51] Schultz D.E., Hardin C.C., Lemon S.M.: Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 14134-14142
- [52] Seidler N.C.: Basic biology of GAPDH. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2013; 985: 1-36
- [53] Sen N., Hara M.R., Ahmad A.S., Cascio M.B., Kamiya A., Ehmsen J.T., Agrawal N., Hester L., Doré S., Snyder S.H., Sawa A.: GOSPEL: a neuroprotective protein that binds to GAPDH upon S-nitrosylation. *Neuron*, 2009; 63: 81-91
- [54] 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.: Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 2008; 10: 866-873
- [55] Shahani N., Sawa A.: Protein S-nitrosylation: role for nitric oxide signaling in neuronal death. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1820: 736-742
- [56] Shenton D., Grant C.M.: Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 2003; 374: 513-519
- [57] Sirover M.A.: On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1810: 741-751
- [58] Tisdale E.J., Azizi F., Artalejo C.R.: Rab2 utilizes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and protein kinase C δ to associate with microtubules and to recruit dynein. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 5876-5884
- [59] Volker K.W., Reinitz C.A., Knull H.R.: Glycolytic enzymes and assembly of microtubule networks. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 1995; 112: 503-514
- [60] Winterbourn C.C., Hampton M.B.: Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 45: 549-561

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.