

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ЭКСПРЕССИЯ СПЕРМОСПЕЦИФИЧНОЙ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МЕЛАНОМНЫХ КЛЕТКАХ ИЗМЕНЯЕТ ИХ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ОБМЕН

А.К. Мельникова^{1}, М.Л. Куравский², К.В. Куликова³, И.А. Севостьянова², В.И. Муронец^{1,2}*

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73; *эл. почта: alksmelnikova@gmail.com

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва

³Институт биологии гена РАН, 119334, Москва

Соматическая форма гликолитического фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД; КФ 1.2.1.12) вовлечена в такие важные для развития раковых клеток механизмы, как индукция апоптоза и регуляция гликолиза. В то же время, спермоспецифичная ГАФД (ГАФДс) не обладает всем набором функций соматического фермента. Обнаруженный нами ранее факт экспрессии в некоторых меланомных клеточных линиях спермоспецифичной ГАФД без N-концевого домена наряду с соматической формой позволил предположить возможное участие этой необычной формы в регуляции метаболизма раковых клеток. В данной работе мы протестировали продукцию ГАФДс методом иммуноблоттинга в ещё 13 клеточных линиях меланомы. Мы также получили данные об основных особенностях энергетического обмена в выбранных пяти клеточных линиях путём оценки скорости поглощения глюкозы и продукции лактата в разных условиях. Нами показано, что в стандартных условиях культивации поглощение глюкозы в клетках MelP, продуцирующих большие количества ГАФДс, было выше, чем в MelKor, в которых продукция ГАФДс была ниже; в остальных исследованных линиях, не продуцирующих ГАФДс (MelMS, MelSi и Malme3M), скорость поглощения глюкозы была ещё ниже.

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; спермоспецифичные ферменты; меланома; гликолиз

DOI: 10.18097/PBMC20206605372

ВВЕДЕНИЕ

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД; КФ 1.2.1.12) — один из самых изученных и распространённых ферментов. К настоящему времени механизм реакции окисления глицеральдегид-3-фосфата и строение соматической формы фермента детально исследованы [1]. Долгое время было принято считать, что никакой регуляторной роли ГАФД не играет и какая-либо связь между активностью этого фермента и изменением энергетического метаболизма отсутствует. Однако постепенно стало накапливаться все больше фактов о участии ГАФД в развитии патологических состояний, как за счет изменения её активности, так и благодаря различным негликолитическим функциям этого фермента. Например, наряду с разнообразными особенностями раковых клеток, для них характерно нарушение индукции апоптоза и регуляции гликолиза [2,3], причём в оба эти процесса может быть вовлечена ГАФД [4-6].

Так, известно, что эффект Пастера, заключающийся в подавлении гликолиза в аэробных условиях, не характерен для раковых клеток. В раковых клетках наблюдается активное протекание гликолиза, скорость которого не замедляется в присутствии кислорода. Такое изменение регуляции энергетического обмена известно как эффект Варбурга. Переход на бескислородный способ энергетики, согласно Варбургу, приводит к автономному бесконтрольному существованию клетки: она начинает вести себя как самостоятельный организм, стремящийся

к воспроизведению [7]. Обнаруженное в нашей лаборатории появление ацилфосфатазной активности у частично окисленной ГАФД при сохранении основной гликолитической функции может играть определённую роль в сопряжении гликолиза и дыхания: в нормальных клетках частичное окисление ГАФД приводит к разобщению окисления и фосфорилирования в гликолизе, что позволяет скоординировать процессы, происходящие при дыхательном фосфорилировании с гликолитическими реакциями [5, 6].

Кроме того, как в наших работах, так и в работах других исследователей было показано, что ГАФД образует комплексы с различными гликолитическими ферментами [8, 9], а также со структурными элементами клетки, что позволяет регулировать скорость протекания гликолиза [10, 11]. Очевидно, что изменение свойств ГАФД или появление её изоферментов при онкологических патологиях может изменять сопряжение гликолиза и дыхательного фосфорилирования, а также характерные для ГАФД белок-белковые взаимодействия, участвуя тем самым в возникновении эффекта Варбурга и в иных нарушениях энергетического метаболизма. Отсутствие любого признака, характерного для соматического фермента, должно кардинальным образом изменять как энергетический метаболизм, так и те элементы апоптического пути клеток, в которые он вовлечён.

Спермоспецифичная ГАФД (ГАФДс) приспособлена для осуществления гликолиза с целью обеспечения энергией подвижности хвоста сперматозоида. У этого фермента отсутствуют почти все негликолитические функции, характерные для соматической формы.

Известно, что различные белки семенников могут быть маркерами отдельных типов онкологических заболеваний. Есть данные о присутствии необычных форм ГАФД при некоторых видах злокачественных опухолей [12]. Нами было показано, что белок, который был нами обнаружен в лизатах меланомных клеточных линий, специфически взаимодействующий с антителами против ГАФДс, является спермоспецифичной формой ГАФД без N-концевой аминокислотной последовательности с цитоплазматической локализацией, подтверждённой иммуноцитохимически [13]. Такая форма ГАФДс встречается в активно делящихся соматических клетках (эмбриональные клетки и клетки регенерирующих тканей) у некоторых позвоночных [14].

Таким образом, целью данной работы было изучение продукции ГАФДс в 13 клеточных линиях меланомы с разной степенью дифференцировки, а также соотношение этих данных с особенностями протекания гликолиза в данных клетках.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: антитела козы против IgG кролика или мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена ("Имтек", Россия), глицин, Tween-20, Тритон X100, азид натрия, сульфат никеля (II) гексагидрат (все "Sigma-Aldrich", США), хлорид натрия, хлорид калия, Tris (трис(гидроксиметил)аминометан), фосфат калия однозамещённый, додецилсульфат натрия, фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в таблетках, коктейль ингибиторов протеаз (все "Amresco", США). В качестве компонентов клеточной среды использовали RPMI-1640 без глутамин ("ПанЭко", Россия), эмбриональную бычью сыворотку ("HyClone", США), L-глутамин, пенициллин/стрептомицин (все "ПанЭко").

Рекомбинантная спермоспецифичная ГАФД с удалёнными 68 а.о. на N-конце была получена как описано ранее [15]. ГАФД из скелетных мышц кролика выделяли по Scopes и Stoter [16] с последующей гель-фильтрацией на G-100 сефарозе ("GE Healthcare", США).

Культивирование клеток меланомы

Материалом для исследования послужили клеточные линии меланомы человека, полученные в Российском онкологическом научном центре имени Н.Н. Блохина и НИИ онкологии имени проф. Н.Н. Петрова [17]. Первичные культуры, выделенные ранее из метастатических узлов пациентов, страдающих меланомой, культивировали на среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки по объёму, 2 mM L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 7% CO₂ при повышенной влажности и температуре 37°C.

Получение клеточных лизатов

Клетки лизировали в 100 мкл буфера для лизиса (50 mM Трис-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1%-ный по объёму Тритон X100, коктейль ингибиторов

протеаз); и концентрацию общего белка в лизатах измеряли по методу Брэдфорд.

Измерение концентрации лактата и глюкозы в культуральной среде

На следующий день после рассадки клеток в 12-луночные культуральные планшеты отбирали культуральную среду, лунки промывали ФСБ и прибавляли 1 мл свежей среды с необходимыми добавками. Свежая среда была использована для получения исходных значений концентрации лактата и глюкозы в среде. Через 4 ч из каждой лунки были отобраны аликвоты среды по 200 мкл, в которых определяли концентрацию лактата и глюкозы. Концентрацию лактата определяли энзиматически с помощью реакции с лактатдегидрогеназой, измеряя накопление NADH спектрофотометрически при длине волны 340 нм ("Shimadzu", Япония), как описано ранее [18]. Концентрацию глюкозы определяли энзиматически, используя набор Glucose Assay Kit ("Sigma-Aldrich"), согласно инструкции производителя. Для расчёта скорости продукции лактата или поглощения глюкозы изменение их концентрации в пробах за 4 ч нормализовали на содержание общего белка в пробе и время инкубации.

Иммуноблоттинг

После ДСН-электрофореза по методу Лэммли в восстанавливающих условиях [19] в 12,5% разделяющем геле белки с геля переносили на мембрану из поливинилиденфторида ("GE Healthcare") в буфере для переноса (25 mM Трис-HCl, 192 mM глицин, 20%-ный этанол, pH 8,3) (100 mA, 1 ч). В одну лунку наносили 10 мкг общего белка или 1-2 мкг очищенных рекомбинантных белков в качестве положительных контролей. После переноса мембрану блокировали 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока в ФСБ, содержащем 0,05% Tween-20 (ФСБТ) (10 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05% Tween-20) в течение 1 ч при постоянном перемешивании. После блокировки и удаления избытка молока мембрану помещали в раствор первичных антител, специфичных к денатурированной форме ГАФДс (2 мкг/мл в ФСБТ с 1%-м молоком), полученных как описано в [20], и специфичных к соматической форме ГАФД мышечных моноклональных антител 6C5, полученных как описано в [21] (1 мкг/мл в ФСБТ с 1%-м молоком), на 1 ч при 20°C и постоянном перемешивании. Тщательно отмыв мембрану от первичных антител, её помещали в раствор вторичных антител козы против IgG кролика или мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (1 мкг/мл в ФСБТ с 1%-м молоком). Инкубацию осуществляли при 20°C и постоянном перемешивании в течение 1 ч. После инкубации со вторичными антителами мембрану промывали ФСБТ и проявляли с помощью метода усиленной хемилюминесценции набором Immobilon Western kit ("Millipore", США) согласно протоколу производителя с детекцией в гель-документирующей системе Universal Hood II device ("BioRad", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Высокоагрессивный характер развития меланомы, прежде всего, связан с высокой метастатической активностью клеток этого новообразования, и, как было упомянуто ранее, ГАФДс без N-концевого фрагмента встречается в активно делящихся соматических клетках [14].

Для более полного исследования продукции ГАФДс в клетках меланомы мы проанализировали дополнительно 13 линий меланомных клеток. По степени дифференцировки проанализированные линии опухолевых клеток могут быть разделены на три типа: 1) высоко дифференцированные MelSi, MelMe; 2) умеренно дифференцированные MelIL, MelP, MelR, MelKsen, Malme3M; 3) низко дифференцированные MelCher, MelKor.

При поведении стандартного иммуноблотинга с окрашиванием антителами, специфичными к соматической форме ГАФД, и антителами, специфичными к ГАФДс, наличие значительного количества белкового продукта ГАФДс удалось обнаружить лишь в клетках линий MelP, Mel82, Mel226 и Mel335.1 (рис. 1). В клетках линии MelKor белковый продукт ГАФДс выявить не удалось, а в клетках линии MelII он был представлен в следовых количествах. При этом, полученные ранее данные показывают, что более чувствительным методом иммунопреципитации можно выявить даже небольшое количество белкового продукта ГАФДс в клетках линий MelKor и MelII [13]. Приведённые на рисунке 1 данные свидетельствуют также о том, что в тех линиях клеток, в которых белковый продукт ГАФДс выявляется стандартным иммуноблотингом, содержатся достаточно высокие его концентрации.

На основании полученных данных можно заключить, что практически все случаи обнаружения ГАФДс относятся к линиям, соответствующим умеренно дифференцированным клеткам. Полученные данные согласуются с результатами исследования, которое выявило ген ГАФДс среди генов, регулируемых фактором транскрипции MITF в клетках меланомы [22]. Согласно данным других авторов, экспрессия MITF способствует клеточной дифференцировке и формированию менее агрессивного фенотипа [23]. Для поздних стадий

развития меланомы характерно уменьшение экспрессии гена, кодирующего белок MITF, и, следовательно, снижение продукции ГАФДс.

Как было показано ранее, рекомбинантный белок ГАФДс без N-концевого домена сохраняет ферментативную активность и к тому же проявляет повышенную стабильность [15]. Таким образом, продукция этого белка в клетках может влиять на энергетический метаболизм. Поэтому было проведено сравнение интенсивности гликолиза в клетках меланомы, продуцирующих ГАФДс, и в тех клетках, где этого белка нет.

Измерение скорости поглощения глюкозы и продукции лактата проводили непосредственно в культуральной среде клеточной линии MelP, в которой были обнаружены большие количества ГАФДс, MelKor, в которой белок ГАФДс был обнаружен, но в гораздо меньших количествах, и линии Malme3M, MelMS, MelSi, в которых экспрессии ГАФДс не было (рис. 2А,Б).

В клеточных линиях MelP и MelKor продукция лактата и поглощение глюкозы было выше, чем в остальных исследованных линиях. Возможно, это связано именно с наличием ГАФДс. Следует отметить, что ГАФДс может также влиять на негликолитические функции ГАФД, например, предотвращать участие соматической формы фермента в индукции апоптоза, взаимодействуя с её субъединицами и образуя прочные гетерологические тетрамеры. Ранее было показано, что ГАФДс может образовывать гетеротетрамеры с ГАФД, состоящие из субъединиц двух форм фермента. Так, при иммунопреципитации ГАФДс из лизатов MelP происходила ко-преципитация соматической формы ГАФД, то есть ГАФД и ГАФДс образовывали в клетке гетерологические функциональные тетрамеры [13].

Мы продолжили исследование организации метаболизма в исследуемых клеточных линиях меланомы, а именно: MelP, в которой были обнаружены большие количества ГАФДс, MelKor, в которой белок ГАФДс был обнаружен, но в гораздо меньших количествах, и линии Malme3M, MelMS, MelSi, в которых экспрессии ГАФДс не было обнаружено. Необходимо отметить, что в опухолевых клетках, как правило, активны два основных пути получения

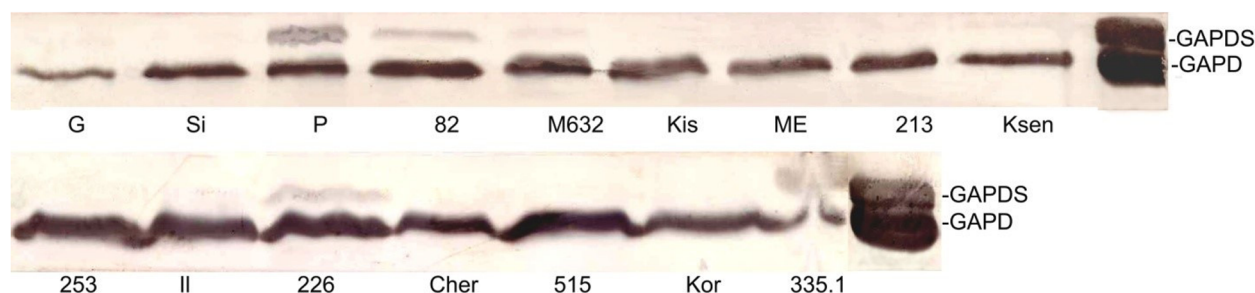


Рисунок 1. Анализ клеточных линий меланомы на присутствие белка ГАФДс методом иммуноблоттинга. В качестве маркера для сперматозоидной изоформы белка использовали рекомбинантный белок без N-концевого домена (GAPDS) с молекулярной массой 37 кДа, для соматической ГАФД (GAPD) — очищенный фермент из мышц кролика (36 кДа).

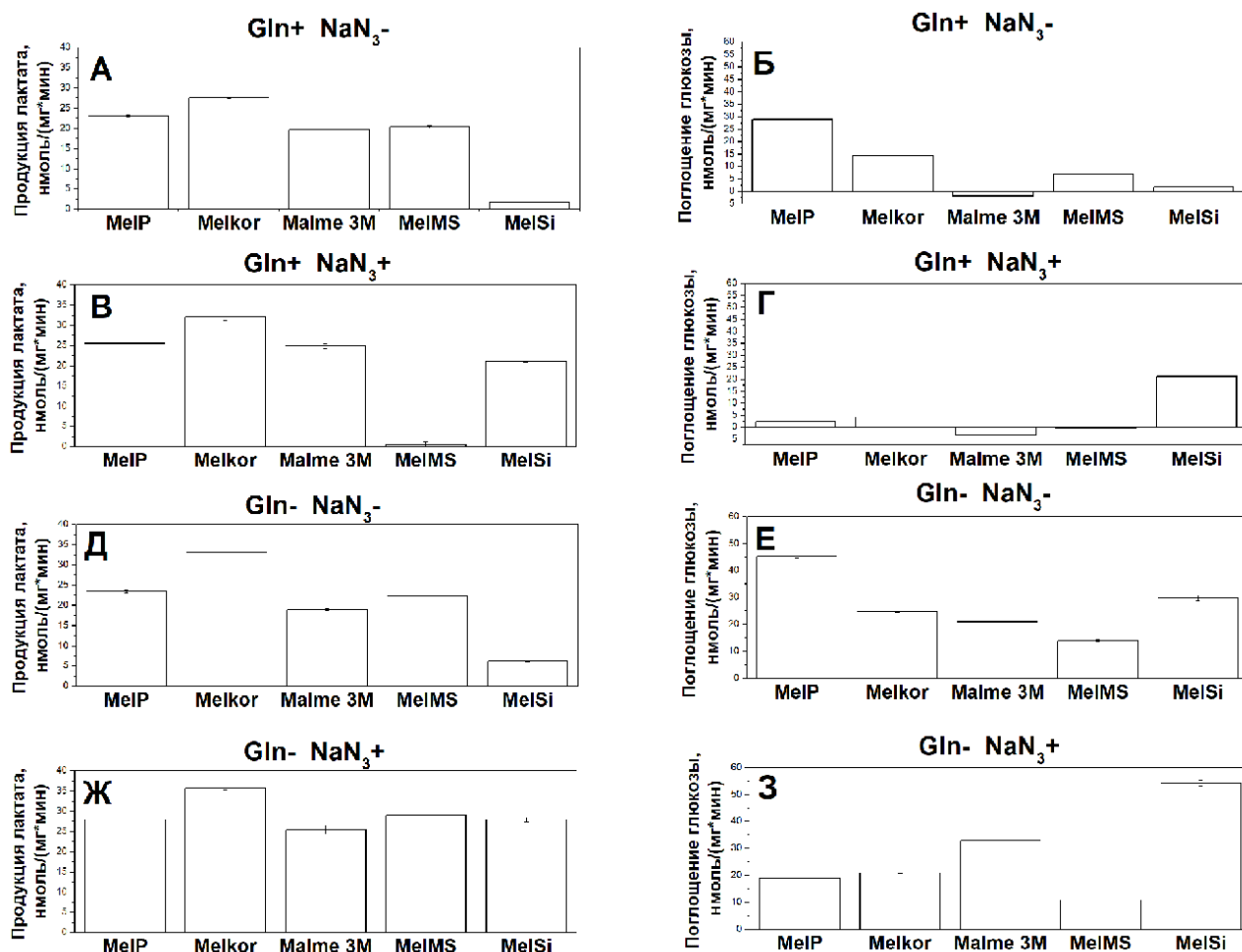


Рисунок 2. Продукция лактата (А, В, Д, Ж) и поглощение глюкозы (Б, Г, Е, 3) клеточными линиями меланомы в присутствии (+) или отсутствии (-) в среде глутамина (Gln) и/или азид натрия (NaN₃), ингибитора окислительного фосфорилирования. Приведены результаты измерения скорости продукции лактата и поглощения глюкозы клетками меланомы MelP и MelKor, в лизатах которых была обнаружена ГАФДс, а также клетками Malme3M, MelMS и MelSi, в лизатах которых ГАФДс не была обнаружена. Данные представлены как среднее трёх измерений ± стандартное отклонение.

энергии. Первый — гликолиз, который приводит к генерации лактата даже в аэробных условиях (эффект Варбурга) [7], второй — глутаминализ, который также приводит к образованию лактата и часто усилен из-за нарушения цикла трикарбоновых кислот, а именно ингибирования аконитазы [24].

Для оценки характера потребления глюкозы клетками мы провели измерение скорости поглощения глюкозы и продукции лактата непосредственно в культуральной среде при разных условиях. В качестве стандартных условий использовали культуральную среду RPMI-1640 с 10% эмбриональной бычьей сывороткой и 2 мМ глутамином. Для оценки вклада глутаминализа в энергетический метаболизм мы использовали среду без глутамин; для оценки вклада окислительного фосфорилирования — добавление в культуральную среду ингибитора цитохромоксидазы 0,9 мМ азид натрия [25]. Таким образом, мы протестировали скорость секреции лактата и поглощения глюкозы в четырёх типах среды: 1) с 2 мМ глутамином, без азид натрия (рис. 2А,Б); 2) с 2 мМ глутамином,

с 0,9 мМ азидом натрия (рис. 2В,Г); 3) без глутамин, без азид натрия (рис. 2Д,Е); 4) без глутамин, с 0,9 мМ азидом натрия (рис. 2Ж,3).

Как видно из рисунка 2, драматически продукция лактата в разных условиях изменялась только в случае клеток MelSi, не экспрессирующих ГАФДс, которые начинают продукцию лактата только в присутствии ингибитора окислительного фосфорилирования азид натрия (рис. 2В,Ж). То есть, в стандартных условиях данные высокодифференцированные меланомные клетки в основном получают энергию за счёт окислительного фосфорилирования и переключаются на гликолиз и/или глутаминализ только при необходимости. В остальных использованных клеточных линиях (MelP, MelKor, MelMS, Malme3M) продукция лактата в разных условиях практически не изменялась, что говорит о том, что клетки в основном живут за счёт независимых от окислительного фосфорилирования путей метаболизма, в частности гликолиза и глутаминализа. В случае этих клеточных линий стоит обратить внимание на изменения

в потреблении глюкозы, которые отражают интенсивность гликолиза или глутаминолиза, двух основных путей получения энергии для опухолевых клеток в различных условиях.

Сходная картина наблюдается для MelP и MelKor, в которых была обнаружена экспрессия ГАФДс, и для MelMS, в которой экспрессии ГАФДс обнаружено не было (рис. 2). Продукция лактата во всех этих клеточных линиях немного возрастает при ингибировании окислительного фосфорилирования азидом натрия (рис. 2В,Ж). Судя по увеличению потребления глюкозы при отсутствии глутамин в среде (рис. 2Е,З), в стандартных условиях они генерируют энергию как за счёт гликолиза, так и за счёт глутаминолиза. Также можно отметить, что падение потребления глюкозы при ингибировании окислительного фосфорилирования более резкое при наличии глутамин в среде (до 0-29% от исходного уровня потребления глюкозы) (рис. 2Г), чем при отсутствии глутамин (42-77% от исходного уровня потребления глюкозы) (рис. 23), что говорит о том, что глутамин — предпочитаемый данными клетками субстрат при ингибировании дыхательной цепи. Поскольку сходный характер метаболизма глюкозы был обнаружен для клеток, как продуцирующих (MelP, MelKor), так и не продуцирующих (MelMS) ГАФДс, в дальнейшем исследовании представляется важной оценка изменений метаболизма MelP и MelKor при нокдауне ГАФДс.

В случае Malme3М поглощение глюкозы из среды происходило только в отсутствие глутамин (рис. 2Е,З), из чего можно сделать вывод, что в основном данные клетки получают энергию за счёт глутаминолиза.

Таким образом, мы охарактеризовали используемые клеточные линии по способу получения энергии в стандартных условиях, в отсутствие глутамин и при ингибировании окислительного фосфорилирования. Эти данные, вместе с информацией о наличии или отсутствии экспрессии в них ГАФДс, позволяют нам сделать вывод о том, что только лишь продукция ГАФДс не коррелирует с предпочтением данными клетками гликолиза: MelP и MelKor не показали предпочтения глюкозы в качестве субстрата при ингибировании окислительного фосфорилирования по сравнению с MelMS (рис. 2Г,З). Однако в стандартных условиях в клеточных линиях поглощение глюкозы в клетках MelP, продуцирующих большие количества ГАФДс, было выше, чем в MelKor, в которых продукция ГАФДс была ниже, а в остальных исследованных линиях, не продуцирующих ГАФДс (MelMS, MelSi и Malme3М), она была ещё ниже (рис. 2Б).

Важной в дальнейшем исследовании представляется оценка изменений в метаболизме MelSi при индуцированной экспрессии ГАФДс и прояснение того, будет ли эта экспрессия вызывать переход в сторону увеличения продукции лактата и поглощения глюкозы при стандартных условиях, а также увеличение скорости пролиферации и переход к умеренно дифференцированному фенотипу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проанализированы клеточные линии меланомы, соответствующие разным стадиям дифференцировки опухоли. Все случаи обнаружения продукции белка ГАФДс относятся к умеренно дифференцированным линиям. На поздних стадиях развития опухоли (MelSi и MelME) белка ГАФДс обнаружено не было. Определение скорости гликолиза в экстрактах разных линий меланомы показало, что клетки, продуцирующие ГАФДс, отличаются более высокой скоростью гликолиза по сравнению с клетками, в которых продукция ГАФДс не обнаружена. Очевидно, что обнаруженное нами появление белка ГАФДс по крайней мере в некоторых клеточных линиях меланомы позволяет надеяться на использование этого белка в качестве нового, причем, достаточно специфического онкомаркера. Участие ГАФД и ГАФДс в регуляции метаболизма и индукции апоптоза в нормальных и злокачественных клетках создаёт предпосылки для создания противоопухолевых препаратов на основе специфических ингибиторов этих ферментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была поддержана грантом РФФИ №18-34-00132 мол_а.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муронец В.И., Мельникова А.К., Барина К.В., Шмальгаузен Е.В. (2019) Биохимия, **84**, 1268-1279. [Muronetz V.I., Melnikova A.K., Barinova K.V., Schmalhausen E.V. (2019) Biochemistry (Moscow), **84**, 1268-1279.]
2. Pistrutto G., Triscioglio D., Ceci C., Garufi A., D'Orazi G. (2016) Aging, **8**, 603-619.
3. Akram M. (2013) J. Cancer Education, **28**, 454-457.
4. Sirover M.A. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1432**, 159-184.
5. Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. (1997) Biosci. Rep., **17**, 521-527. DOI:10.1023/a:1027356106330
6. Schmalhausen E.V., Nagradova N.K., Boschi-Muller S., Branlant G., Muronetz V.I. (1999) FEBS Letts., **452**, 219-222.
7. Warburg O. (1956) Science, **123**, 309-314.
8. Tompa P., Batke J. (1990) Biochem. Int., **20**, 487-494.
9. Fokina K.V., Dainyak M.B., Nagradova N.K., Muronetz V.I. (1997) Arch. Biochem. Biophys., **345**, 185-192.
10. Walsh J.L., Keith T.J., Knull H.R. (1989) Biochim. Biophys. Acta, **999**, 64-70.
11. Muronetz V.I., Wang Z.X., Keith T.J., Knull H.R., Srivastava D.K. (1994) Arch. Biochem. Biophys., **313**, 253-260.

12. Patra S., Ghosh S., Bera S., Roy A., Ray S., Ray M. (2009) *Biochemistry* (Moscow), **74**, 717-727.
13. Sevostyanova I.A., Kulikova K.V., Kuravsky M.L., Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **427**, 649-653.
14. Kuravsky M.L., Aleshin V.V., Frishman D., Muronetz V.I. (2011) *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 160. DOI: 10.1186/1471-2148-11-16
15. Elkina Y.L., Kuravsky M.L., El'darov M.A., Stogov S.V., Muronetz V.I., Schmalhausen E.V. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 2207-2212.
16. Scopes R.K., Stoter A. (1982) *Methods Enzymol.*, **90**, 479-490.
17. Mikhaylova I.N., Kovalevsky D.A., Morozova L.F., Golubeva V.A., Cheremushkin E.A., Lukashina M.I. et al. (2008) *Melanoma Research*, **18**, 303-313.
18. Danshina P.V., Schmalhausen E.V., Avetisyan A.V., Muronetz V.I. (2001) *IUBMB Life*, **51**, 309-314.
19. Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
20. Kuravsky M.L., Schmalhausen E.V., Pozdnyakova N.V., Muronetz V.I. (2012) *Anal. Biochem.*, **426**, 47-53.
21. Grigorieva J.A., Dainiak M.B., Katrukha A.G., Muronetz V.I. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **369**, 252-260.
22. Hoek K.S., Schlegel N.C., Eichhoff O.M., Widmer D.S., Praetorius C., Einarsson S.O. et al. (2008) *Pigment Cell Melanoma Research*, **21**, 665-676.
23. Lekmine F., Chang C.K., Sethakorn N., Das Gupta T.K., Salti G.I. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 830-835.
24. Sajani K., Islam F., Smith R.A., Gopalan V., Lam A.K.-Y. (2017) *Biochimie*, **135**, 164-172.
25. Tsubaki M., Yoshikawa S. (1993) *Biochemistry*, **32**, 174-182.

Поступила в редакцию: 15. 04. 2020.
После доработки: 03. 09. 2020.
Принята к печати: 03. 09. 2020.

EXPRESSION OF SPERM-SPECIFIC GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN MELANOMA CELLS CHANGES THEIR ENERGY METABOLISM

A.K. Melnikova^{1*}, M. L. Kuravsky², K.V. Kulikova³, I.A. Sevostyanova², V.I. Muronetz^{1,2}

¹Faculty of Bioengineering and Bioinformatics Moscow State University,
1 bldg. 73, Leninskie Gory, Moscow, 119234 Russia; *e-mail: alksmelnikova@gmail.com

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

The somatic isoform of the glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; EC 1.2.1.12) is involved in such crucial for cancer cells development pathways as induction of apoptosis and glycolytic regulation. At the same time, sperm-specific isoform (GAPDHS) does not exhibit all the same functions as somatic enzyme. The expression of sperm-specific GAPDH without N-terminal domain in some melanoma cells along with somatic isoenzyme, shown in our previous work, has led to the proposal of this unusual enzyme's possible role in regulation of cancer cells glycolysis. In the presented work we have tested production of GAPDHS in 13 additional melanoma cell lines by immunoblotting. We have also gathered data on energy metabolism in 5 selected cell lines by evaluation of glucose uptake and lactate production in differing conditions. We have demonstrated that in standard cultivation media glucose uptake by MelP cells, producing substantial amounts of GAPDHS protein was higher than in MelKor cells, producing lesser amounts of GAPDHS. All other analyzed cell lines that do not produce GAPDHS (MelMS, MelSi and Malme3M) had even a lower glucose uptake rate.

Key words: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; sperm-specific enzymes; melanoma; glycolysis

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-34-00132).

Received: 15.04.2020; revised: 03.09.2020; accepted: 03.09.2020.