

УДК УДК 547.96:[54–122+539.196.3]

МИР МАЛЫХ МОЛЕКУЛ: РОЛЬ В МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

¹Гильмиярова Ф.Н., ²Рыскина Е.А., ¹Колотьева Н.А., ¹Потехина В.И.

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Самара,
e-mail: bio-sam@yandex.ru;

²ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования РФ, Москва,
e-mail: dar31@mail.ru

Малые молекулы представляют собой актуальной предмет научных исследований в различных областях знаний. В молекулярной биологии, биохимии и фармакологии термин «малые молекулы» обозначает химические соединения со сравнительно малой молекулярной массой, то есть низкомолекулярные вещества (молекулярная масса не более 900 дальтон). В химии и фармации используются малые молекулы, такие как природные продукты и синтетические соединения, в качестве зондов для исследования внутренних процессов в клетках и тканях, в биологии и биохимии, как правило, отдается предпочтение определенному белку и выявляются эндогенные малые молекулы, которые могут с ним связываться и модулировать его активность. Интерес представляют интермедиаты, активно участвующие в метаболизме клетки, такие как лактат, пируват, этанол.

Ключевые слова: малые молекулы, белок-белковое взаимодействие, интерактом, лактат, пируват, этанол

THE WORLD OF SMALL MOLECULES: ROLE IN THE INTERMOLECULAR INTERACTION OF PROTEIN STRUCTURES

¹Gilmiyarova F.N., ²Ryskina E.A., ¹Kolotyeva N.A., ¹Potekhina V.I.

¹Samara State Medical University, Samara, e-mail: bio-sam@yandex.ru;

²Russian University of People's Friendship, Moscow, e-mail: dar31@mail.ru

Small molecules represent important subject of research in various fields of knowledge. In molecular biology, biochemistry, and pharmacology the term «small molecules» refers to chemical compounds with relatively low molecular weight, i.e. low-molecular substances (molecular weight 900 daltons). In chemistry and pharmacy we use small molecules such as natural products and synthetic compounds, as probes for the study of internal processes in the cells and tissues in biology and biochemistry, as a rule, preference is given to a particular protein and the identification of endogenous small molecules that can reach and modulate its activity. In addition, small molecules active in the metabolism of the cell, such as lactate, pyruvate, ethanol are in the area of interest.

Keywords: small molecules, protein-protein interaction, interact, lactate, pyruvate, ethanol

Малые молекулы представляют собой актуальной предмет научных исследований. Тем не менее, по данным Wiley Online Library 2011 года, изучение этих взаимодействий по количеству публикаций отстает от исследований таких типов взаимодействий как белок-белковое, белок-ДНК, белок-РНК, первые публикации о белок-метаболизме взаимодействиях появились в 2009 году. В настоящее время значительные усилия исследователей направлены на открытие малых молекул, обладающих характерными функциональными свойствами, определяющих клеточный фенотип [1–3].

В литературе описаны примеры разнонаправленного действия белок-лиганд связывающих взаимодействий на структуру белка [4–6]. С использованием метода масс-спектрометрии DARTS (Drug Affinity Responsive Target Stability), основанного на принципе, что лиганд стабилизирует структуру белковой молекулы, и она становится устойчивой к действию протеолитических ферментов, показано, что протеолиз субти-

лизином цитоплазматического белка иммунофилина явно снижается в присутствии молекулы рапамицина [7]. Белки могут дестабилизироваться в присутствии лигандов, например, фермент топоизомераза-1 и лиганд – камптотecin [8].

Метаболические пути являются динамичными и тесно взаимосвязанными, что чрезвычайно удобно для их регуляции [9–11]. Эндогенные метаболиты составляют численное большинство молекул в клетке, и взаимодействия белок-метаболизм являются распространенным явлением [12]. Метаболиты могут выступать не только в качестве субстратов и продуктов ферментативных реакций, но и служить регуляторами сигнальных путей и модуляторами функций, как отдельных молекул, так и биохимических каскадов [13–15].

Совокупность взаимодействия всех белков, характерная для данного организма, получила название «интерактом». Этот термин был предложен группой французских ученых во главе с Б. Жаком в 1999 году

[16]. Установлено, что размер интерактома у дрожжей *S. Cerevisiae*, по одним данным, может составлять до 10–17 тысяч, а по другим – 25–35 тысяч взаимодействий. Предполагается, что размер интерактома человека может быть образован примерно 650 тысячами взаимодействий белков. В человеческой клетке предположительно около 39 тысяч белок-белковых взаимодействий. Число взаимодействующих пар белков человека в 10 раз больше, чем у *Drosophila melanogaster*. Эти данные позволяют высказать предположение о том, что размер интерактома зависит от уровня сложности организма [17,18].

Определение взаимодействующих пар белков позволяет составлять интерактомные карты, которые полезны для понимания функционирования белков. В настоящее время большое количество исследований посвящено анализу и уточнению уже имеющихся данных взаимодействия белков, с использованием различных экспериментальных и компьютерных методов. Анализ интерфейсов может быть проведен в группе белков, участвующих в конкретном заболевании. Было установлено, что интерфейсы белок-белковых комплексов при раке молочной железы и колоректальном раке, а также лейкемии были меньше и более плотно упакованы. В литературе имеются данные о похожих интерфейсах, и предполагается наличие шаблонов интерфейсов [19–21].

Центральное место в регулировании метаболизма углеводов занимает пируват. В исследованиях D.K. Vrieger были выявлены два белка – митохондриальный пируват-переносчик-1 и митохондриальный пируват-переносчик-2, необходимые для транспорта пирувата в митохондрии млекопитающих. Белки функционируют как единый гетеродимерный комплекс во внутренней мембране митохондрий. Показано ингибирующее действие α -цианоцинамата – производного уксусной кислоты на транспортную функцию митохондриальных пируват-переносчиков [22].

В работах K.D. Ju показано, что пируват является эндогенным антиоксидантом и обладает противовоспалительными свойствами. Проведенные эксперименты на крысах, больных диабетом, позволили предположить, что пируват может защищать крыс от развития нефропатии путем ингибирования НАДФН-оксидазы [23].

Показано, что пируват может регулировать интенсивность взаимодействия антигена с антителом. Преинкубация эритроцитов с пируватом приводит к уменьшению экспонирования антигенов А и В на поверхности

эритроцитов или к изменению их конформации, что вызывает уменьшение скорости гемагглютинации и снижение количества комплексов антиген-антитело в эритроцитах. При этом внесение пирувата к моноклональным антителам перед началом их взаимодействия с антигенами эритроцитов А(II) и В(III) группы крови оказывает противоположный эффект, вызывая ускорение гемагглютинации [24].

Оценка антиген-антительного взаимодействия эритроцитов исследуемых групп крови методом проточной цитофлуориметрии подтверждает общую тенденцию: пируват способствует угнетению процесса агглютинации эритроцитов В(III) и АВ(IV) групп крови. При этом пируват и этанол сильнее влияют на специфичность эпитопа парато взаимодействия антигена В. Весьма вероятно, что в основе неоднотипной тенденции выявленных сдвигов лежат различия в строении антигенных детерминант антигенов А и В, обладающих различным химическим строением [25].

Изучение молекулы пирувата «in silico» с использованием компьютерной системы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), позволило выявить способность пирувата оказывать гиперхолестеролемическое, иммуномодулирующее, противовоспалительное, обезболивательное, фибринолитическое, цито- и гемопротекторное, антиоксидантное и другие действия [26].

Лактат является одним из наиболее распространенных метаболитов в организме млекопитающих и образуется во всех клетках организма. Традиционно лактат рассматривался как альтернативный глюкозе источник энергии и буферный тупик пирувата. В последнее время было показано, что лактат может пересекать гематоэнцефальный барьер и оказывать метаболическое воздействие на головной мозг, а также выступать в качестве сигнальной молекулы [27]. Важно отметить, что некоторые из нейронов в гипоталамусе чувствительны к лактату. Показано, что экзогенный лактат в концентрации 5 мМ эффективно закрывает АТФ-чувствительный калиевый канал в нейронах с повышением концентрации АТФ в клетке [28]. В работе J. Yang описана модуляция лактатом активности ионотропного рецептора глутамата (NMDA), который может быть одновременно восприимчив как к эндогенным лигандам-агонистам, так и к эндогенным лигандам-антагонистам, в отличие от других рецепторов. Лактат активирует NMDA-рецептор и сигнальный путь, содержащий одну из митоген-активируемых протеинкиназ с последующим увеличением внутриклеточного кальция. Параллельно

с этим лактат увеличивает уровень внутриклеточного НАДН, модулируя редокс-состояния нейронов. Эти данные показывают, что лактат может выступать в качестве сигнальной молекулы для нейрональной пластичности, т.е. обладает нейротропным действием. Интересно, что пируват, который должен иметь противоположный эффект на состояние окислительно-восстановительного потенциала, был полностью неактивным в этих экспериментах [29]. В 2008 и 2012 году две группы исследователей сообщили, что L-лактат выступает лигандом и агонистом G-белка рецептора 81, активация которого приводит к ингибированию липолиза в адипоцитах [30]. По мнению Hashimoto T. и Brooks G.A., лактат является сигнальной молекулой, которая вызывает адаптивную модуляцию собственного метаболизма в митохондриях за счет активации экспрессии генов синтеза митохондриального белка-транспортера лактата, митохондриальной ЛДГ и цитохромоксидазы [31].

Использование метода компьютерного прогнозирования PASS, основанного на анализе взаимосвязей «структура–активность», позволило получить многопрофильные и разнообразные данные, показывающие вероятность влияния лактата на межмолекулярные процессы поддержания метаболического баланса путем регуляции белкового, углеводного, липидного обменов, антиоксидантных процессов, тканевого дыхания [32].

Широкий спектр физиологических эффектов в организме имеет этанол, но, как именно он действует, чтобы проявлять эти эффекты, до сих пор малопонятно. В настоящее время появились публикации о дискретных, идентифицированных сайтах связывания этанола белками и о том, что белок-лигандное взаимодействие зависит от концентрации спирта [33].

Активность аденилатциклазы – фермента, запускающего цАМФ-сигнальный путь, повышается фармакологически соответствующими концентрациями этанола. Стимулирующее действие этанола на активность аденилатциклазы позволило предположить наличие структурных элементов (участков), модулированных этанолом. Выявлено, что первый участок расположен в области 28-го аминокислотного остатка домена С на N-конце фермента, а второй – в области 140-го аминокислотного остатка С-концевой области фермента [34].

Установлено, что этанол может регулировать фермент-субстратные взаимодействия дегидрогеназ: глицеральдегидфосфатдегидрогеназы, α-глицеролфосфатдегидрогеназы и лактатдегидроге-

назы. Увеличение активности исследуемых ферментов под влиянием этанола в гемолизате крови было в 2,5–3 раза выше, чем в изолированной среде (с чистыми препаратами ферментов) [35, 36].

Визуализация комплексов антиген–антитело с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа дала возможность оценить особенности действия этанола в зависимости от групповой принадлежности крови индивидуумов. Этанол по-разному влияет на специфические белок-лигандные взаимодействия: антиген А с терминальным N-ацетилгалактозамином показывает большую устойчивость к действию малых молекул, чем антиген В с терминальным моносахаридом D-галактозой [37].

Современные исследования направлены на изучение сайтов и механизмов связывания этанола рецепторами глицина. Общеизвестно, что рецептор состоит из 5 гомологичных субъединиц двух типов – α и β, каждая субъединица содержит трансмембранный домен, имеющий четыре α-спиральных участка. Показано, что аминокислотные остатки Ser 267 во втором α-спиральном участке и Ala 288 в третьем α-спиральном участке имеют решающее значение для аллостерической модуляции этанолом функционирования глицинового рецептора, и мутации в этих местах могут влиять на чувствительность к этанолу [38].

Биохимические процессы в живых клетках в значительной степени регулируются белок-лигандными взаимодействиями, которые играют важнейшую роль в жизнедеятельности клеток. Нарушение взаимодействий между белками лежит в основе многочисленных заболеваний [39]. Многие ключевые функции клетки регулируются комплексообразованием белков. Функция, активность и специфичность таких комплексов зависят от характера белок-лигандных взаимодействий. Кроме того, в постгеномной эре изучение метаболических сетей обеспечивает понимание молекулярной эволюции, реакции клеток на внешние и внутренние стимулы и помогает выяснить функции белков [40].

Список литературы

1. Zhang Y. Small molecules, big roles – the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming // Y. Zhang, W. Li, T. Laurent, S. Ding // J. Cell. Sci. – 2012. – V. 125(Pt 23). – P. 5609–20.
2. Интермедиаты в регуляции межмолекулярного взаимодействия в лигандных технологиях / Ф.Н. Гильмиярова, В.М. Радомская, Е.А. Рыскина, Н.А. Колотьева, О.А. Балдина, И.В. Горбачева, В.И. Потехина // Лаборатория. – 2016. – № 1. – С. 11–12.
3. Роль естественных интермедиаторов в межмолекулярном взаимодействии белковых структур / Ф.Н. Гильмиярова, В.М. Радомская, Е.А. Рыскина, Н.А. Колотьева, Г.М. Баишева, Ю.В. Первова // Acta Naturae (русская версия). – 2016. – № S-2. – С. 105.

4. Jupin M. NMR metabolomics profiling of blood plasma mimics shows that medium- and long-chain fatty acids differently release metabolites from human serum albumin / M. Jupin, P.J. Michiels, F.C. Girard, M. Spraul et al. // *J. Magn. Reson.* – 2014. – V. 239. – P. 34–43.
5. Orsak T. Revealing the allosterome: systematic identification of metabolite-protein interactions / T. Orsak, T.L. Smith, D. Eckert, J.E. Lindsley et al. // *Biochemistry.* – 2012. – V. 51(1). – P. 225–32.
6. Strickland E.C. Thermodynamic analysis of protein-ligand binding interactions in complex biological mixtures using the stability of proteins from rates of oxidation/E.C. Strickland, M.A. Geer, D.T. Tran, J. Adhikari et al. // *Nat. Protoc.* – 2013. – V. 8(1). – P. 148–61.
7. Lomenick B. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS) / B. Lomenick B, G. Jung, J.A. Wohlschlegel, J. Huang // *Curr. Protoc. Chem. Biol.* – 2011. – V. 3(4). – P. 163–180.
8. Wu Y. Y-box binding protein 1 enhances DNA topoisomerase 1 activity and sensitivity to camptothecin via direct interaction / Y. Wu, K.Y. Wang, Z. Li, Y.P. Liu // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2014. – V. 33. – P. 112.
9. Desquiere-Dumas, V. Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells / V. Desquiere-Dumas, N. Gueguen, G. Leman, S. Baron et al. // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288(51). – P. 36662–75.
10. Orozco H. Two-carbon metabolites, polyphenols and vitamins influence yeast chronological life span in winemaking conditions / H. Orozco, E. Matallana, A. Aranda // *Microb. Cell. Fact.* – 2012. – V. 8. – P. 111–104.
11. Finley L.W. Metabolic regulation by SIRT3: implications for tumorigenesis/L.W. Finley, M.C. Haigis // *Trends Mol. Med.* – 2012. – V. 18(9). – P. 516–23.
12. Safari-Alighiarloo N. Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases / N. Safari-Alighiarloo, M. Taghizadeh, M. Rezaei-Tavirani, B. Goliaei et al. // *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* – 2014. – V. 7(1). – P. 17–31.
13. Garma L. How many protein-protein interactions types exist in nature / L. Garma, S. Mukherjee, P. Mitra Y. Zhang // *PLoS One.* – 2012. – 7(6). – e38913 [electronic resource].
14. Kundrotas P.J. Templates are available to model nearly all complexes of structurally characterized proteins / P.J. Kundrotas, Z. Zhu, J. Janin, I.A. Vakser // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109(24). – P. 9438–9441.
15. Bhogale P.M. What makes the lac-pathway switch: identifying the fluctuations that trigger phenotype switching in gene regulatory systems / P.M. Bhogale, R.A. Sorg, J.W. Veening, J. Berg // *Nucleic. Acids Res.* – 2014. – V. 42(18). – P. 11321–8.
16. Sanchez C. Grasping at molecular interactions and genetic networks in *Drosophila melanogaster* using FlyNets, an Internet database / C. Sanchez, C. Lachaize, F. Janody, B. Bellon et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V. 27(1). – P. 89–94.
17. Stumpf M.P. Estimating the size of the human interactome / M.P. Stumpf, T. Thorne, E. de Silva, R. Stewart et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V. 105(19). – P. 6959–6964.
18. Venkatesan, K. An empirical framework for binary interactome mapping / K. Venkatesan, J.F. Rual, A. Vazquez // *Nat. Meth.* – 2009. – V. 83. – P. 90.
19. Gao, M. Structural space of protein-protein interfaces is degenerate, close to complete, and highly connected / M. Gao, J. Skolnick // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – V. 107(52). – P. 22517–22522.
20. Kundrotas P.J. Templates are available to model nearly all complexes of structurally characterized proteins / P.J. Kundrotas, Z. Zhu, J. Janin, I.A. Vakser // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109(24). – P. 9438–9441.
21. Castoreno A.B. Small molecule probes of cellular pathways and networks / A.B. Castoreno, U.S. Eggert // *ACS Chem. Biol.* – 2011. – V. 6(1). – P. 86–94.
22. Bricker D.K. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila* and humans / D.K. Bricker, E.B. Taylor, J.C. Schel et al. // *Science.* – 2012. – V. 337(6090). – P. 96–100.
23. Ju K.D. Ethyl pyruvate ameliorates albuminuria and glomerular injury in the animal model of diabetic nephropathy / K.D. Ju, E.K. Shin, E.J. Cho, H.B. Yoon, H.S. Kim et al. // *J. Physiol Renal Physiol.* – 2012. – 1; 302(5). – P. 606–13.
24. Гильмиярова Ф.Н., Радомская В.М., Гусьякова О.А., Рыскина Е.А., Колотьева Н.А., Шахнович Е.А., Нефедова Н.С., Сидорова И.Ф., Баишева Г.М., Первова Ю.В., Плетень А.П. Влияние пирувата на взаимодействие антител с группо-специфичными антигенами эритроцитов // *Биомедицинская химия.* – 2015. – Т. 61. № 1. – С. 132–140.
25. Gilmiyarova F. Role of the Metabolic Minor Components in the Regulation of Intermolecular Interaction / F. Gilmiyarova, N. Kolotyeva, V. Radomskaaya, O. Gusyakova, I. Gorbacheva, V. Potekhina // *Journal of Biosciences and Medicines*, 2016. – 4. – p. 28–35.
26. Gilmiyarova F. Role of the Metabolic Minor Components in the Regulation of Intermolecular Interaction / Gilmiyarova F., Kolotyeva N., Radomskaaya V., Gusyakova O., Gorbacheva I., Potekhina V. // *Journal of Biosciences and Medicines*, 2016. – 4. – p. 28–35.
27. Proia P. Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System / P. Proia, C.M. Di Liegro, G. Schiera, A. Fricano, I. Di Liegro // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – 17(9). Published online. doi: 10.3390/ijms17091450.
28. Ainscow, E.K. ATP-sensitive potassium channel-mediated lactate effect on orexin neurons: implications for brain energetics during arousal / E.K. Ainscow, M.P. Parsons, M. Hirasawa // *J. Neurosci.* – 2010. – V. 30(24). – P. 8061–70.
29. Yang, J. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons / J. Yang, E. Ruchti, J.M. Petit, P. Jourdain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – V. 111(33). – P. 12228–33.
30. Liu, C. 3,5-Dihydroxybenzoic acid, a specific agonist for hydroxycarboxylic acid1, inhibits lipolysis in adipocytes / C. Liu, C. Kuei, J. Zhu, J. Yu et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2012. – V. 341(3). – P. 794–801.
31. Hashimoto, T. Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production / T. Hashimoto, G.A. Brooks // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2008. – V. 40(3). – P. 486–94.
32. Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Рыскина Е.А., Радомская В.М., Гусьякова О.А., Потехина В.И., Горбачева И.В. Структурно-регуляторный потенциал лактата // *Современные проблемы науки и образования.* – 2016. – № 2. – С. 78–88.
33. Ramaswamy, S. Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with NAD⁺ and substituted benzyl alcohols / S. Ramaswamy, H. Eklund, B.V. Plapp // *Biochemistry.* – 1994. – V. 33(17). – P. 5230–7.
34. Yoshimura, M. Identification of ethanol responsive domains of adenyllyl cyclase / M. Yoshimura, S. Pearson, Y. Kadota, C.E. Gonzalez // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2006. – V. 30(11). – P. 1824–32.
35. Ryskina E.A., Gilmiyarova F.N., Baisheva G.M., Lobaeva T.A. Effect of ethanol on the enzyme-substrate interaction dehydrogenases. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* – 2016. – Т. 7. № 6. – С. 3137–3141.
36. Gilmiyarova F.N. (2014) The effect of Pyruvate on Antibody Interaction with Group-Specific Erythrocyte Antigens. *Biomedical Chemistry*, 8 (3), 260–265 <http://dx.doi.org/10.1134/S1990750814030056>.
37. Колотьева Н.А., Гильмиярова Ф.Н., Тимченко П.Е., Тимченко Е.В., Рыскина Е.А. Визуализация антиген-антительного взаимодействия с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* – 2016. – № 8–5. – С. 713–718.
38. Burgos C.F. Ethanol effects on glycinergic transmission: From molecular pharmacology to behavior responses / C.F. Burgos, B. Muñoz, L. Guzman, L.G. Aguayo // *Pharmacol Res.* – 2015. – V. 101. – P. 18–29.
39. Howard R.J. Alcohol-binding sites in distinct brain proteins: the quest for atomic level resolution / R.J. Howard, P.A. Slesinger, D.L. Davies, J. Das et al. // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2011. – V. 35(9). – P. 1561–73.
40. White S.R. Modeling the initiation of others into injection drug use, using data from 2,500 injectors surveyed in Scotland during 2008–2009 / S.R. White, S.J. Hutchinson, A. Taylo, S.M. Bird // *Am. J. Epidemiol.* – 2015. – V. 181(10). – P. 771–780.