

УДК 577.325.3:612.015.35:004.942
https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-3-6-14

Конформационные особенности лактатдегидрогеназы: влияние температурного фактора в присутствии малых молекул, математическая модель

Гильмиярова Ф.Н.¹, Кузьмичева В.И.¹, Колотьева Н.А.¹, Комарова М.В.², Рыскина Е.А.³, Гусьякова О.А.¹, Виноградова Д.С.⁴, Салмин В.В.⁵

¹ Самарский государственный медицинский университет (СамГМУ)
Россия, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

² Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С.П. Королева (Самарский университет)
Россия, 443086, г. Самара, Московское шоссе, 34

³ Российский университет дружбы народов (РУДН)
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

⁴ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ)
Россия, 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр. Орлова роща, 1

⁵ Красноярский государственный медицинский университет (КрасГМУ) им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследовать конформационные изменения лактатдегидрогеназы под действием различных концентраций интермедиатов (пируват, оксалоацетат) в температурном градиенте с последующим построением математической модели.

Материалы и методы. Изучение термостабильности лактатдегидрогеназы проводили с использованием метода дифференциальной сканирующей флуориметрии по изменению эндогенной флуоресценции триптофана и тирозина в условиях стабильной концентрации лактатдегидрогеназы и изменяющихся концентраций пирувата и оксалоацетата. Далее была разработана математическая модель для более углубленного рассмотрения поведения каталитического белка.

Результаты. Было выявлено, что пируват и оксалоацетат в низких концентрациях оказывают термостабилизирующее воздействие на конформацию лактатдегидрогеназы, влияние пирувата статистически более значимо в сравнении с оксалоацетатом ($p < 0,05$). Изучаемые лиганды в высоких концентрациях снижают термостабильность лактатдегидрогеназы.

Заключение. Понимание роли малых молекул в регуляции биологических и каталитических процессов долгое время оставалось в тени научного интереса, но сегодня работа в данном направлении выходит на качественно новый уровень. Полученные данные свидетельствуют о возможности малых молекул выступать в качестве лигандов при взаимодействии с каталитическими белками.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, конформация, дифференциальная сканирующая флуориметрия, оксалоацетат, пируват.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

✉ Гильмиярова Фрида Насыровна, e-mail: bio-sam@yandex.ru.

Для цитирования: Гильмиярова Ф.Н., Кузьмичева В.И., Колотьева Н.А., Комарова М.В., Рыскина Е.А., Гусьякова О.А., Виноградова Д.С., Салмин В.В. Конформационные особенности лактатдегидрогеназы: влияние температурного фактора в присутствии малых молекул, математическая модель. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (3): 6–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-3-6-14>.

Conformational features of lactate dehydrogenase: temperature effect in presence of small molecules, mathematical model

Gilmiyarova F.N.¹, Kuzmicheva V.I.¹, Kolotyeva N.A.¹, Komarova M.V.², Ryskina E.A.³, Gusyakova O.A.¹, Vinogradova D.S.⁴, Salmin V.V.⁵

¹ Samara State Medical University
89, Chapayevskaya Str., Samara, 443099, Russian Federation

² Samara National Research University
34, Moscow Highway, Samara, 443086, Russian Federation

³ Peoples Friendship University of Russia
6, Miklukho-Maklaya Str., Moscow, 117198, Russian Federation

⁴ Petersburg Nuclear Physics Institute named after B.P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute"
1, Mkr. Orlova Roscha, Gatchina, Leningradskaya Oblast, 188300, Russian Federation

⁵ Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky
1, Partizana Zeleznyaka Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of this work was to study the conformational changes of lactate dehydrogenase under the influence of different concentrations of intermediates (pyruvate, oxaloacetate) in the temperature gradient with the subsequent building of a mathematical model.

Materials and methods. Thermolability of lactate dehydrogenase was studied using the method of differential scanning fluorimetry to determine the change in endogenous fluorescence of tryptophan and tyrosine under the conditions of stable concentration of lactate dehydrogenase and changing concentrations of pyruvate and oxaloacetate. Further, a mathematical model was developed for a more in-depth consideration of the behavior of the catalytic protein.

Results. We found that pyruvate and oxaloacetate in low concentrations have a thermostabilizing effect on lactate dehydrogenase conformation; the effect of pyruvate is statistically more significant in comparison with oxaloacetate ($p < 0.05$). The studied ligands in high concentrations reduce the thermal stability of lactate dehydrogenase.

Conclusion. Understanding the role of small molecules in the regulation of biological and catalytic processes has long remained in the background of scientific interest, but today the work in this direction is reaching a new level. The data obtained indicate the possibility of small molecules acting as ligands when interacting with enzymes.

Key words: lactate dehydrogenase, conformation, differential scanning fluorimetry, oxaloacetate, pyruvate.

Conflict of interest. Authors declare no obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

For citation: Gilmiyarova F.N., Kuzmicheva V.I., Kolotyeva N.A., Komarova M.V., Ryskina E.A., Gusyakova O.A., Vinogradova D.S., Salmin V.V. Conformational features of lactate dehydrogenase: temperature effect in presence of small molecules, mathematical model. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (3): 6–14. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-3-6-14>.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы все большее внимание уделяется малым молекулам, уникальным химическим «отпечаткам пальцев», которые способны изменять экспрессию генов, потоки в путях промежуточного метаболизма, что может приводить к изменению специфических процессов, протекающих во внутри- и межклеточных пространствах [1]. Сигнальные белки, такие как каталитические, представляют собой в этой связи интересную область для изучения взаимодействия белок-лиганд, поскольку они проявляют высокую чувствительность к воздействию на них внешними стимулами, такими как эндогенные метаболиты или малые молекулы [2].

Молекулами с небольшой молекулярной массой, находящимися на точке пересечения метаболических путей обмена белков, жиров, углеводов и служащих «метаболической валютой» живой клетки, являются такие ключевые биоэнергетические интермедиаты, как пировиноградная и щавелевоуксусная кислоты.

Щавелевоуксусная кислота (оксалоацетат) – четырехуглеродная двухосновная кетокислота, которой свойственно явление таутомерии, представляет собой ценную и достаточно редкую молекулу, ее концентрация в митохондриях не превышает 10^{-6} М, участвует во многих метаболических путях, включая глюконеогенез, цикл лимонной кислоты, цикл гликоксилата, цикл мочевины и метаболизм аминокислот. Оксалоацетат является критическим компонентом в производстве аденозинтрифосфорной кислоты и должен постоянно регенерироваться, чтобы поддерживать необходимый уровень окислительных процессов в цикле трикарбоновых кислот и цепи переноса электронов [3].

Пировиноградная кислота (пируват) представляет собой один из промежуточных компонентов метаболизма, который является предшественником важнейших интермедиатов анаболических и катаболических путей. Среди них можно назвать глюконеогенез, липогенез *de novo*, синтез холестерина, а также поддержание функционирования цикла трикарбоновых кислот. Пируват образуется в результате реакций анаэробного гликолиза под действием фермента пируваткиназы, а также может быть синтезирован из различных прекурсоров: лактата под действием лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малата под действием цитозольной малатдегидрогеназы, возможен синтез пирувата из аланина в митохондриях [4]. Серин, треонин, глицин, цистеин и триптофан могут превращаться в пируват [5].

Нами был выбран фермент лактатдегидрогеназа (EC 1.1.1.27), который представляет собой тетрамерный белок с каталитической активностью, от-

носящийся к классу оксидоредуктаз, катализирует обратимое превращение пирувата в лактат, сопровождающееся окислением НАДН. Известны четыре гена, кодирующие данный фермент: *LDHA*, *LDHB*, *LDHC* и *LDHD* [6]. Транскрипция генов данного фермента регулируется более чем 20 различными факторами, в том числе активное участие в этом процессе принимает белок HIF1.

Благодаря исследованиям последних лет стало известно, что ЛДГ наряду с ферментативной активностью также способна регулировать клеточный цикл – угнетение активности ЛДГ ускоряет переход клетки в стадию G2, в то время как усиление ее активности задерживает клетку в S-периоде [7]. Молекулы фермента находятся в цитоплазме, в ядре, где играют роль транскрипционного фактора и влияют на синтез ДНК [8]. Есть указания в литературе на то, что ЛДГ оказывает прямое влияние на работу калиевых ионных каналов клеток миокарда и печени в условиях гипоксии [9].

Целью нашей работы является исследование конформационных изменений лактатдегидрогеназы под действием различных концентраций интермедиатов (пируват, оксалоацетат) в температурном градиенте с последующим построением математической модели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на базе отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ. В работе использовали следующие реактивы: лактатдегидрогеназа (EC 1.1.1.27, ЛДГ, L-Lactic Dehydrogenase, L-LDH) из мышцы кролика, тип XI, лиофилизат, 848 Ед/мг белка; пируват, оксалоацетат, буфер Трис-НСl 50мМ, рН 7,5 (Sigma-Aldrich, США). Фермент и малые молекулы разводились в трис-НСl буфере.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) проводилась на приборе Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Германия). Данный прибор позволяет быстро и точно оценивать фолдинг белка, а также его химическую и термическую стабильность. Принцип метода основан на изменении эндогенной флуоресценции триптофана и тирозина при длинах волны 330 и 350 нм соответственно. Результат регистрируется в градусах Цельсия, что соответствует температуре «разворачивания» белка (*T_m*) [10]. Отметим, что данный параметр находится в зависимости от сил нековалентного межмолекулярного взаимодействия: электростатических, гидрофобных, сил Ван-дер-Ваальса, а также от наличия и числа водородных связей.

Готовили шесть разведений, в которых конечная концентрация фермента оставалась неизменной – 1 мкМ, а конечная концентрация пирувата и оксалоацетата изменялась и составляла 16; 8; 4; 2; 1 и 0,5 мкМ соответственно. Полученный раствор (10 мкл) помещали в капилляры Prometheus NT.48 (nanoDSF grade). Сканирующая флуориметрия проводилась при интенсивности лазера 30%, диапазон нагрева от 20 до 95 °С, шаг 1 °С /мин.

Для исследования зависимости относительной флуоресценции от температуры нагревания белка и концентрации лиганда в образце применяли два подхода: анализ с использованием предустановленного программного обеспечения (Prometheus NT.48 Software), которое позволяло определить температуру плавления белка и максимальную скорость плавления (первую производную), также восстанавливали аналитическую зависимость кривых плавления с помощью нелинейной регрессии в среде статистического пакета SPSS 21 (IBM SPSS Statistics, США). Использовали четырехпараметрическую S-образную кривую следующего вида:

$$f(t) = d + \frac{c - d}{1 + e^{-a(t-b)}}$$

где $f(t)$ – зависимая переменная, соотношение флуоресценции на длинах волн 330 и 350 нм; t – независимая переменная, температура, °С; a , b , c , d – параметры уравнения, или регрессионные коэффициенты. Они имеют следующую содержательную интерпретацию.

Используемая форма аналитической зависимости относится к сигмоидальным кривым, рекомендуемым для аппроксимации явлений роста с насыщением [11], в том числе и для различных медико-биологических приложений [12–14]. Выбор данной математической модели для настоящего исследования обусловлен удобной содержательной интерпретацией ее параметров: a – отражает скорость плавления;

b – соответствует теоретической точке перегиба и температуре, при которой скорость плавления максимальна; c – асимптотически минимальное соотношение поглощений на изучаемых длинах волн; d – асимптотически максимальное соотношение поглощений на изучаемых длинах волн.

Оценку адекватности построенных моделей проводили графоаналитическим способом по анализу наблюдаемых и оцененных по регрессионному уравнению значений. Выполняли анализ регрессионных остатков и выясняли соответствие их распределения нормальному закону. Качество аппроксимации оценивали по статистической значимости моделей в целом, коэффициентам детерминации и стандартным ошибкам регрессий. После построения регрессионных моделей (по одной математической модели для каждого интермедиата в различных концентрациях) проводили содержательный анализ их параметров. По оцененным статистическим пакетам 95%-м доверительным интервалом регрессионных коэффициентов судили о статистической значимости различий между кривыми плавления ЛДГ с разными концентрациями лигандов и разными лигандами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фермент, находясь в растворе, одновременно присутствует в нем как в свернутом, так и в частично развернутом состоянии («расплавленная глобула»). При высокой температуре белки, в том числе ферменты, обладающие упорядоченной структурой, разворачиваются [15, 16], что приводит к изменению окружения ароматических остатков. Эти изменения могут быть выявлены методом дифференциальной сканирующей флуориметрии, позволяющей определить температуру плавления белка и некоторые другие параметры данного процесса.

Термостабильность лактатдегидрогеназы при добавлении оксалоацетата и пирувата имела следующие особенности (рис. 1, 2).

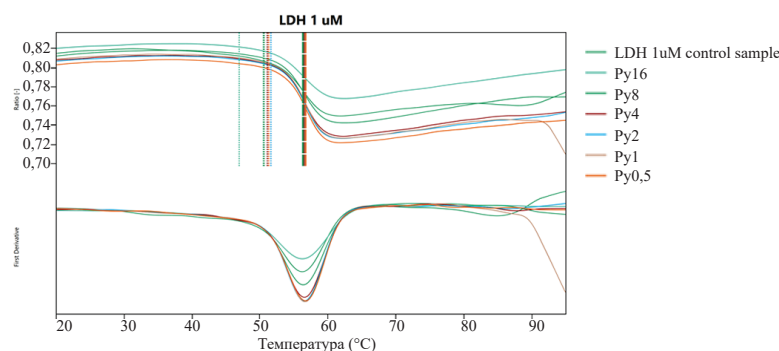


Рис. 1. Кривые плавления и первой производной лактатдегидрогеназы (1 мкМ) в комплексе с оксалоацетатом в различной концентрации (верхний график): здесь и на рис. 2 концентрация оксалоацетата в смеси составляла 16; 8; 4; 2; 1 и 0,5 мкМ соответственно. Значение флуоресценции (верхняя панель) при 350/330 нм (ось Y) представлено в зависимости от температуры (ось X). Цветные линии в точках перехода соответствуют максимумам пика T_m первой производной (нижняя панель)

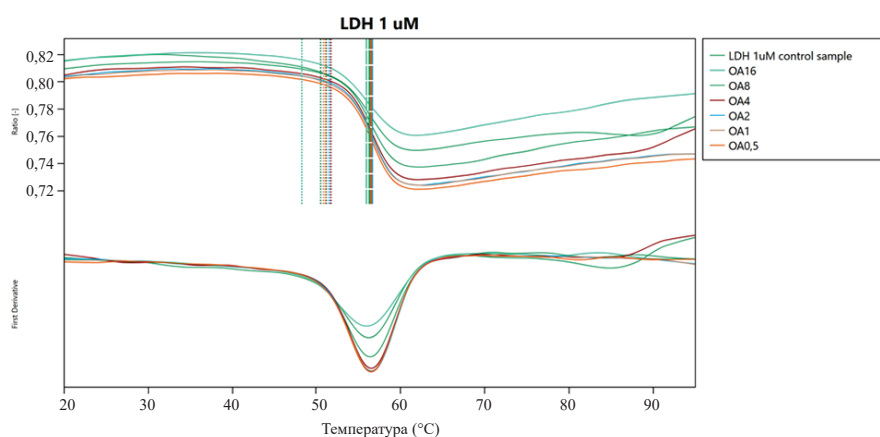


Рис. 2. Кривые плавления и первой производной лактатдегидрогеназы (1 мкМ) в комплексе с пируватом в различной концентрации (верхний график)

Высокое содержание оксалоацетата и пирувата (16 мкМ) способствует разворачиванию молекулы белка, что выражается в снижении его термостабильности: снижение температуры начала плавления (оксалоацетат – 48,3 °С, пируват – 47 °С в сравнении с 50,5 °С для контрольной пробы), более быстрое наступление точки температурного перегиба (оксалоацетат – 56,0 °С, пируват – 56,2 °С в сравнении с 56,3 °С в контрольной пробе). Напротив, добавление оксалоацетата и пирувата в минимальной концентрации (0,5 мкМ) изменяет конформацию белка в сторону более свернутой, что приводит к повышению термодинамической стабильности лактатдегидрогеназы: температура, при которой начиналось плавление белка, увеличилась в сравнении с контролем и составила 51,1 °С для оксалоацетата и 51,3 °С для пирувата, произошел сдвиг наступления температурного перегиба: 56,6 °С для оксалоацетата, 56,7 °С – для пирувата. Также значительно менялась общая амплитуда сигнала флуоресценции в течение процесса разворачивания, что свидетельствует о различном конформационном состоянии комплексов. Для более детальной характеристики поведения каталитического белка в температурном градиенте при добавлении малых молекул нами была разработана математическая модель.

Перед построением математической модели, аппроксимирующей экспериментально полученные точки соотношений флуоресценции при нагревании белка, был проведен визуальный анализ исходных скаттерграмм (рис. 3). В отличие от сглаженных программным обеспечением Prometheus NT.48 кривых, приведенных ранее для оксалоацетата и пирувата на рис. 1 и 2, обращает внимание, что разбросы соотношений флуоресценции по оси ординат были более высокими перед началом плавления и сразу после достижения температурного перегиба и

уменьшались непосредственно при достижении температуры плавления белка.

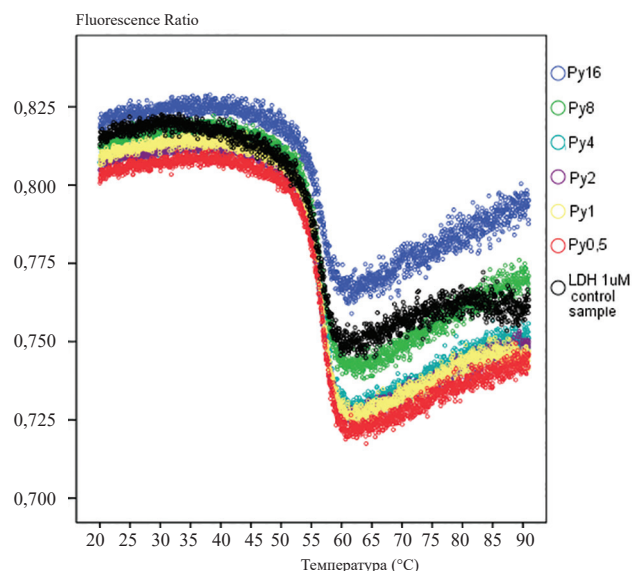


Рис. 3. Кривые плавления лактатдегидрогеназы (1 мкМ) в комплексе с пируватом в различной концентрации: несглаженные данные соотношений флуоресценции

Для построения моделей был выбран температурный диапазон 48–63 °С. Коэффициенты детерминации полученных моделей были в диапазоне 98,5–99,7%, а стандартные ошибки регрессии, соответственно, 0,0026–0,0018. Все построенные модели статистически значимы при $p < 0,001$ (табл. 1). Регрессионные коэффициенты для различных концентраций лигандов приведены в табл. 2.

Для удобства сопоставления полученных параметров моделей между различными концентрациями лигандов нами были построены графики зависимостей. Параметр b , численно равный точке температурного перегиба, рассмотрен на рис. 4.

Таблица 1

Оценка качества регрессионных моделей, аппроксимирующих кривые плавления лактатдегидрогеназы в присутствии пирувата и оксалоацетата в различных концентрациях				
Концентрация, мкМ	Пируват		Оксалоацетат	
	Коэффициент детерминации, R^2	Стандартная ошибка регрессии	Коэффициент детерминации, R^2	Стандартная ошибка регрессии
16	0,985	0,0026	0,988	0,0025
8	0,995	0,0019	0,995	0,0021
4	0,996	0,0020	0,996	0,0021
2	0,997	0,0018	0,997	0,0018
1	0,997	0,0019	0,996	0,0020
0,5	0,996	0,0020	0,996	0,0019
0	0,992	0,0022	0,992	0,0022

Таблица 2

Параметры регрессионных моделей, аппроксимирующих кривые плавления лактатдегидрогеназы в присутствии пирувата и оксалоацетата в различных концентрациях								
Концентрация, мкМ	Пируват				Оксалоацетат			
	a	b	c	d	a	b	c	d
16	0,724 (0,685–0,762)	56,2 (56,1–56,3)*	0,765 (0,765–0,766)*	0,819 (0,818–0,820)*	0,732 (0,697–0,767)	55,9 (55,8–56,0)	0,759 (0,758–0,759)	0,814 (0,814–0,815)
8	0,760 (0,737–0,783)	56,2 (56,2–56,3)	0,741 (0,740–0,741)*	0,811 (0,811–0,812)*	0,780 (0,756–0,804)	56,3 (56,2–56,3)	0,736 (0,735–0,736)	0,807 (0,807–0,808)
4	0,776 (0,755–0,797)	56,4 (56,4–56,4)	0,727 (0,726–0,727)	0,806 (0,805–0,806)*	0,788 (0,768–0,809)	56,4 (56,3–56,4)	0,726 (0,726–0,727)	0,804 (0,803–0,804)
2	0,787 (0,768–0,806)	56,4 (56,4–56,4)	0,724 (0,724–0,725)*	0,805 (0,805–0,806)*	0,778 (0,759–0,797)	56,4 (56,4–56,4)	0,722 (0,722–0,723)	0,802 (0,802–0,803)
1	0,776 (0,757–0,796)	56,5 (56,4–56,5)*	0,724 (0,724–0,725)*	0,807 (0,806–0,807)*	0,767 (0,746–0,788)	56,3 (56,3–56,4)	0,722 (0,722–0,723)	0,802 (0,801–0,802)
0,5	0,761 (0,741–0,782)	56,5 (56,4–56,5)*	0,719 (0,719–0,720)	0,801 (0,801–0,801)	0,755 (0,735–0,775)	56,3 (56,3–56,4)	0,719 (0,719–0,720)	0,800 (0,799–0,800)
0	0,728 (0,698–0,757)	56,1 (56,0–56,1)	0,748 (0,747–0,748)	0,809 (0,808–0,809)	0,728 (0,698–0,757)	56,1 (56,0–56,1)	0,748 (0,747–0,748)	0,809 (0,808–0,809)

Примечание. Приведены регрессионные коэффициенты и их 95%-е доверительные интервалы.

* статистически значимые различия между пируватом и оксалоацетатом.

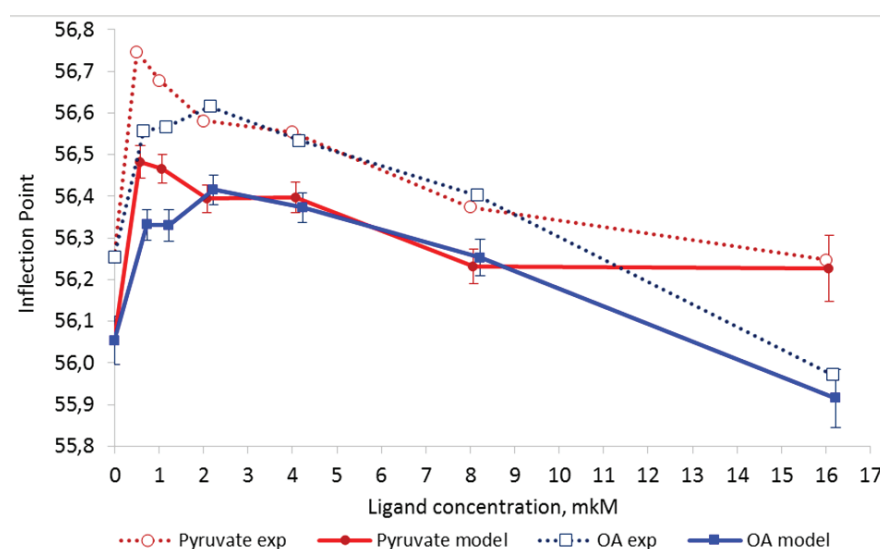


Рис. 4. Положение точек перегиба в кривых плавления лактатдегидрогеназы в комплексе с пируватом и оксалоацетатом в различных концентрациях

Приведены данные, полученные для математической модели, а также данные Prometheus NT.48 Software. Характер и величина сдвига точки температурного перегиба, оцененные различными методами, совпадают. Концентрация лигандов 0,5–8 мкМ вызывает повышение температуры плавления ЛДГ, а концентрация 16 мкМ приводит к снижению термостабильности белка. Максимальное изменение температуры плавления при добавлении пирувата отмечено при его концентрации 0,5 мкМ, а в случае добавления оксалоацетата – при 2 мкМ. Оценки сдвига, полученные нами при моделировании нелинейной регрессией и программным обеспечением Prometheus NT.48, различаются незначительно: расхождение с данными, полученными программным обеспечением прибора, составили 0,2 °С.

При сравнении влияния двух лигандов на сдвиг точки плавления установлено, что влияние оксалоацетата и пирувата различается статистически значимо в области низких концентраций (0,5 и 1 мкМ) и высоких (16 мкМ). Пируват в малых концентраци-

ях вызывает статистически значимо ($p < 0,05$) большее повышение температуры плавления, чем оксалоацетат, а при высоких концентрациях – большее снижение температуры перегиба. В концентрациях 2–8 мкМ воздействие лигандов на сдвиг температуры плавления согласно построенной регрессионной модели было неразличимым.

Для анализа максимальной скорости плавления ЛДГ в присутствии лигандов (рис. 5) из сводки результатов приборного программного обеспечения были извлечены значения первых производных в точках перегиба. Первые производные при температуре реакционной смеси $t = b$ были вычислены из параметров построенных математических моделей по формуле $f'(t) = -0,25a(d-c)$. Погрешности полученных результатов оценены по правилам расчета погрешностей арифметических операций. Отрицательные значения производных отражают уменьшение соотношения флуоресценции при разворачивании белка. Чем больше абсолютное значение первой производной, тем выше скорость плавления белка.

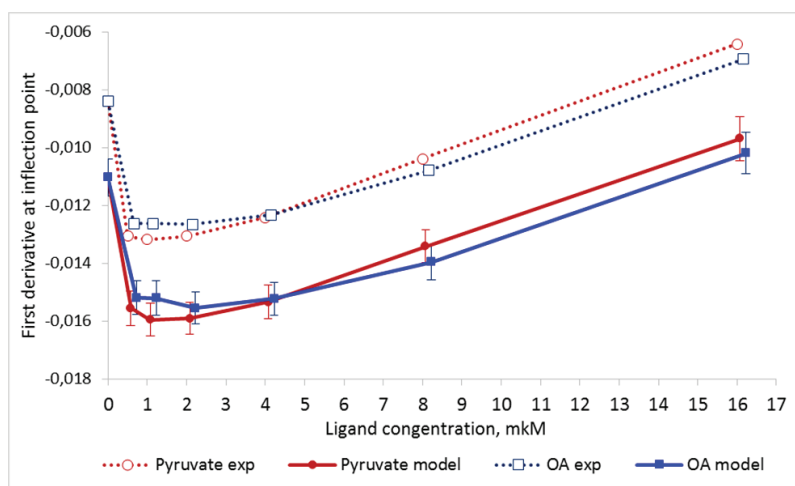


Рис. 5. Максимальные скорости плавления лактатдегидрогеназы в комплексе с пируватом и оксалоацетатом в различных концентрациях

Оба изучаемых лиганда вызвали существенное увеличение скорости плавления ЛДГ в концентрациях 0,5–4 мкМ ($p < 0,05$ по сравнению с отсутствием лигандов) с последующим его снижением в концентрации 8–16 мкМ. Характер воздействия различных концентраций пирувата и оксалоацетата на максимальную скорость плавления был одинаковым: статистически значимых различий между параметрами a , или между первыми производными в точке перегиба, для пирувата и оксалоацетата не найдено ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении максимальных скоростей плавления, полученных разными способами, по дан-

ным приборного программного обеспечения и математического моделирования, выявлено систематическое расхождение в среднем на 0,003. Вероятно, оно связано с тем, что предложенная форма аналитической зависимости хорошо соответствует эмпирическим данным только на участке с максимальной скоростью плавления, но не перед ним и не после него. Именно из-за этого при построении регрессионной модели был выбран достаточно узкий диапазон температур, при котором происходит плавление.

На рис. 6 представлены наблюдаемые в эксперименте отношения флуоресценций и теоретически рассчитанные по построенным моделям точки для концентраций пирувата 0,5 и 16 мкМ.

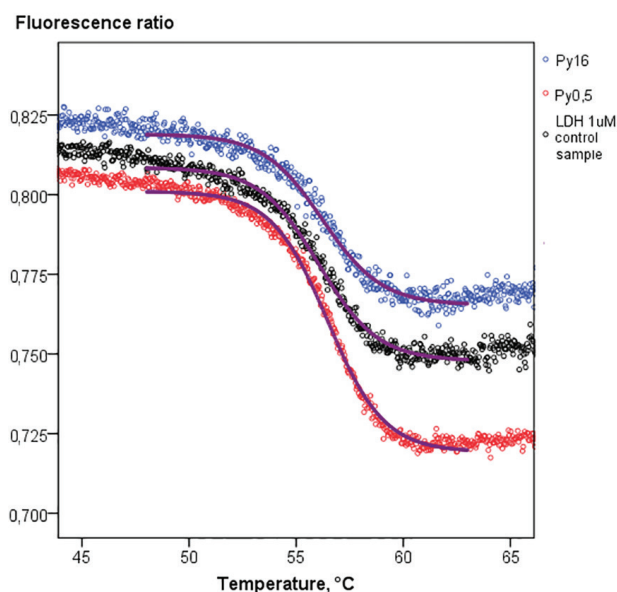


Рис. 6. Эмпирические и теоретические кривые плавления лактатдегидрогеназы без пирувата, в комплексе с пируватом в концентрации 16 и 0,5 мкМ соответственно

На рис. 6 показано, что начало теоретических кривых имеет больше расхождения с экспериментально наблюдаемыми точками, чем на участке плавления ЛДГ. Поэтому недостаточно точные оценки параметра d разработанных регрессий приводят к незначительному смещению в оценке максимальной скорости плавления. Однако с точки зрения цели настоящего исследования по изучению факторов, влияющих на характеристики кривой плавления, данные поправки не оказывают статистически значимого влияния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении конформационного состояния лактатдегидрогеназы методом дифференциальной сканирующей флуориметрии с последующим построением математической модели было выявлено, что пируват и оксалоацетат в малых концентрациях (0,5–2 мкМ) оказывают термостабилизирующее воздействие на структуру ЛДГ, а при высоких количествах (16 мкМ), напротив, снижают термостабильность ЛДГ. При этом, несмотря на сонаправленные эффекты изучаемых метаболитов, влияние пирувата оказалось более выраженным в сравнении с оксалоацетатом ($p < 0,05$).

Способность естественных интермедиатов вступать в параметаболические взаимодействия, в частности связываться и влиять на конформацию каталитических белков, определяет широкий спектр их биологического действия, механизмы которого еще предстоит изучить детальнее. Несомненный инте-

рес представляет дальнейшее изучение пирувата и оксалоацетата в качестве молекул протекторов и стабилизаторов, расширение исследуемых концентраций и белковых партнеров, что является особенно перспективным ввиду развития концепций биоэнергетической и «митохондриальной» медицины. Таковы неизвестные страницы известного фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Castoreno A.B., Ulrike U.S. Small molecule probes of cellular pathways and networks. *ACS Chem. Bio.* 2010; 6: 86–94. DOI: 10.1021/cb1002976.
2. Hörner M., Weber W. Molecular switches in animal cells. *FEBS Lett.* 2012; 586 (15): 2084–2096. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.02.032.
3. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger principles of biochemistry. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2013: 1158.
4. Mendes-Mourao J., Halestrap A.P., Crisp D.M., Pogson C.I. The involvement of mitochondrial pyruvate transport in the pathways of gluconeogenesis from serine and alanine in isolated rat and mouse liver cells. *FEBS Lett.* 1975; 53 (1): 29–32. DOI: 10.1016/0014-5793(75)80674-0.
5. McCommis K.S., Finck B.N. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochem. J.* 2015; 466 (3): 443–454. DOI: 10.1042/BJ20141171.
6. Valvona C., Fillmore H.L., Nunn P.B., Pilkington G. J. The regulation and function of lactate dehydrogenase A: therapeutic potential in brain tumor. *Brain Pathology.* 2016; 26 (1): 3–17. DOI: 10.1111/bpa.12299.
7. Zhai X., Yang Y., Wan J., Zhu R., Wu Y. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 2013; 30: 2983–2991. DOI: 10.3892/or.2013.2735.
8. Pioli P.A., Hamilton B.J., Connolly J.E., Brewer G., Rigby W.F. Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with AUF1. *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (38): 35738–35745. DOI: 10.1074/jbc.M204002200.
9. Huang L., Li B., Li W., Guo H., Zou F. ATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity. *Carcinogenesis.* 2009; 30 (5): 737–744. DOI: 10.1093/carcin/bgp034.
10. Martin L., Schwarz S., Breitsprecher D. Analyzing thermal unfolding of proteins: the prometheus NT.48. Application note NT-PR-001. NanoTemper technologies GmbH, 2014. URL: <https://resources.nanotempertech.com/application-notes/nanotemper-application-note-nt-pr-001-thermal-unfolding>.
11. Crawley M.J. The R book. John Wiley & Sons, Inc., 2007: 940.
12. Findlay J.W., Dillard R.F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS J.* 2007; 9: 260–267. DOI: 10.1208/aapsj0902029.
13. Rizzo J.M., Shi S., Li Y., Semple A., Esposito J.J., Yu S. Application of a high-throughput relative chemical stability assay to screen therapeutic protein formulations by assessment of conformational stability and correlation to aggregation

- propensity. *Pharm. Sci.* 2015; 104 (5): 1632–1640. DOI: 10.1002/jps.24408.
14. Goshu A.T., Koya P.R. Derivation of inflection points of non-linear regression curves – implications to statistics. *AJTAS.* 2013; 2 (6): 268–272. DOI: 10.11648/j.ajtas.20130206.25.
15. Magnusson A.O., Szekrenyi A., Joosten H.J., Finnigan J., Charnock S., Fessner W.D. nanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development. *FEBS J.* 2019; 286 (1): 184–204. DOI: 10.1111/febs.14696.
16. Chaudhuri R., Cheng Y., Middaugh C.R., Volkin D.B. High-throughput biophysical analysis of protein therapeutics to examine interrelationships between aggregate formation and conformational stability. *AAPS J.* 2014; 16 (1): 48–64. DOI: 10.1208/s12248-013-9539-6.

Вклад авторов

Гильмиярова Ф.Н. – фундаментальное и теоретическое обоснование проведения экспериментов, создание дизайна исследования. Кузьмичева В.И., Колотьева Н.А. – проведение экспериментов, написание текста статьи. Комарова М.В. – подбор и обоснование математической модели для аппроксимации данных. Рыскина Е.А. – анализ метаболитов, выбор низкомолекулярного лиганда. Гусякова О.А. – подбор и обоснование выбора рабочих концентраций исследуемых соединений. Виноградова Д.С. – техническое сопровождение проведения экспериментов. Салмин В.В. – консультирование при трактовке результатов экспериментов с позиции физико-химических изменений.

Сведения об авторах

Гильмиярова Фрида Насыровна, д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, кафедра фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, СамГМУ, г. Самара. ORCID 0000-0001-5992-3609.

Кузьмичева Валерия Игоревна, ординатор, кафедра фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, СамГМУ, г. Самара. ORCID 0000-0002-5232-1549.

Колотьева Наталия Александровна, канд. мед. наук, доцент, кафедра фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, СамГМУ, г. Самара. ORCID 0000-0002-7583-6222.

Комарова Марина Валерьевна, канд. биол. наук, доцент, кафедра лазерных и биотехнологических систем, Самарский университет, г. Самара. ORCID 0000-0001-6545-0035.

Рыскина Елена Анатольевна, д-р биол. наук, доцент, кафедра биохимии им. акад. Т.Т. Березова, РУДН, г. Москва. ORCID 0000-0002-8752-3837.

Гусякова Оксана Анатольевна, д-р мед. наук, зав. кафедрой фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, зав. клинико-диагностической лабораторией клиник, СамГМУ, г. Самара. ORCID 0000-0002-5619-4583.

Виноградова Дарья Сергеевна, отделение молекулярной и радиационной биофизики, НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, г. Гатчина.

Салмин Владимир Валерьевич, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. кафедрой медицинской и биологической физики, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0003-4441-9025.

(✉) Гильмиярова Фрида Насыровна, e-mail: bio-sam@yandex.ru.

Поступила в редакцию 29.07.2019

Подписана в печать 25.12.2019