

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 577.112+577.322+ 577.346

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-1-46-57>

Поступила в редакцию 16.03.2020

Received 16.03.2020

В. В. Побойнев¹, В. В. Хрусталева¹, А. Н. Стожаров¹, Т. А. Хрусталева²

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ БИЛИРУБИНА СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА: ВОЗМОЖНОСТЬ ВЛИЯНИЯ НА НИХ МУТАЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ РАДИАЦИЕЙ

Аннотация. В статье проанализированы сайты связывания билирубина сывороточным альбумином человека с точки зрения нестабильности вторичной структуры, а также изучено влияние известных аминокислотных замен, вызванных радиационным воздействием, на способность альбумина связывать билирубин. Расчеты энергии связывания и констант ингибирования комплексов билирубина с альбумином до и после аминокислотных замен показали, что аминокислотные замены по-разному влияют на способность связывать билирубин сывороточным альбумином человека. Аминокислотные замены Asp269-Gly269 (Nagasaki-1), Glu354-Lys354 (Hiroshima-1), Asp375-Asn375 (Nagasaki-2) уменьшают свободную энергию связывания билирубина сывороточным альбумином человека, а аминокислотные замены His3-Gln3 (Nagasaki-3) и Glu382-Lys382 (Hiroshima-2) повышают ее по результатам молекулярного докинга с соответствующими участками поверхности белка. Константы ингибирования при этом значительно выше, чем с известными сайтами связывания. В целом же рассмотренные мутации, вызванные радиационным воздействием, не могут влиять на наиболее специфичные известные сайты связывания билирубина сывороточным альбумином человека, так как аминокислотные остатки, которые подвергаются заменам, не взаимодействуют с аминокислотными остатками этих сайтов связывания (Leu115, Arg117, Phe134, Tyr138, Ile142, Phe149, Phe157, Tyr161, Arg186, Lys190, Lys240, Arg222). Все аминокислотные остатки известных сайтов связывания располагаются в стабильных элементах вторичной структуры сывороточного альбумина человека.

Полученные данные важны для понимания влияния радиационного воздействия на развитие билирубиновой энцефалопатии у жителей стран, пострадавших от аварии на Чернобыльской атомной электростанции, и у жителей Японии.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, билирубин, радиационное воздействие, аминокислотные замены, билирубиновая энцефалопатия, сайты связывания

Для цитирования: Сайты связывания билирубина сывороточным альбумином человека: возможность влияния на них мутаций, вызванных радиацией / В. В. Побойнев [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 46–57. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-1-46-57>

Victor V. Poboinev¹, Vladislav V. Khrustalev¹, Aliaksandr N. Stojarov¹, Tatyana A. Khrustaleva²

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF MUTATIONS CAUSED BY RADIATION EXPOSURE ON THE BILIRUBIN BINDING SITES OF HUMAN SERUM ALBUMIN

Abstract. In this article we analyze the bilirubin binding sites of human serum albumin from the point of view of the secondary structure instability, as well as the effect of amino acid substitutions caused by radiation exposure on the ability of albumin to bind bilirubin-IX-alpha. Based on calculations of binding energy and inhibition constants of bilirubin-albumin complexes before and after the amino acid substitutions, it was found that amino acid substitutions have different effects on the ability of human serum albumin to bind bilirubin. Amino acid substitutions Asp269-Gly269 (Nagasaki-1), Glu354-Lys354 (Hiroshima-1), Asp375-Asn375 (Nagasaki-2) reduce the binding free energy of bilirubin with human serum albumin, and the amino acid substitutions His3-Gln3 (Nagasaki-3) and Glu382-Lys382 (Hiroshima-2) increase it during molecular docking with the corresponding areas of the protein surface. The inhibition constants are significantly higher than with known binding sites. In general, mutations caused by radiation exposure cannot effect on bilirubin binding sites of human serum albumin, since the amino acid residues that are replaced do not interact with the amino acid residues from the binding sites (Leu115, Arg117, Phe134, Tyr138, Ile142, Phe149, Phe157, Tyr161, Arg186, Lys190, Lys240, Arg222). All amino acid residues from known binding sites are located in stable elements of the secondary structure of human serum albumin.

The data obtained are important for understanding the impact of radiation exposure on the development of bilirubin encephalopathy in the population of the Chernobyl region and Japan.

Keywords: human serum albumin, bilirubin, radiation exposure, amino acid substitutions, bilirubin encephalopathy, binding sites

For citation: Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Stojarov A. N., Khrustaleva T. A. Influence of mutations caused by radiation exposure on the bilirubin binding sites of human serum albumin. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 46–57 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-1-46-57>

Введение. Сывороточный альбумин человека (HSA) является наиболее распространенным циркулирующим белком плазмы крови. Поскольку концентрация альбумина высока, а размеры его невелики, то этот белок на 70 % определяет коллоидно-осмотическое давление плазмы [1]. Общая площадь поверхности множества мелких молекул сывороточного альбумина очень велика, поэтому данный белок выполняет функции переносчика многих веществ. К веществам, связываемым сывороточным альбумином, относятся билирубин, уробилин, жирные кислоты, тироксин и другие эндогенные, а также многочисленные экзогенные вещества. Конкуренция между веществами за сайты связывания на молекуле альбумина может вызвать увеличение концентрации в свободном виде одного из них, что влияет на его физиологическое/патологическое действие. Сывороточный альбумин человека состоит из трех гомологичных доменов, каждый из которых включает два субдомена (А и В), обладающих общими структурными мотивами [2, 3]. Каждый домен альбумина состоит из 10 альфа-спиралей, 6 из которых формируют субдомен А, а 4 – субдомен В [3].

Около 75–85 % билирубина у новорожденных образуется при распаде гемоглобина эритроцитов, остальные 15–25 % поступают из незритроцитарного гема. Разрушение эритроцитов происходит в ретикуло-эндотелиальной системе. Образующийся при этом гемоглобин связывается с плазменными белками, образуя комплексы, которые вновь захватываются клетками моноцитарно-макрофагальной системы. Далее под влиянием гемоксигеназы из гема образуется вердогемоглобин. Затем от него отщепляется железо и образуется биливердин, а из биливердина, под влиянием биливердинредуктаз, – свободный билирубин (в виде нескольких изомеров – IX- α , - β , - γ , - δ). Клиническое значение имеет билирубин IX- α . Билирубин IX- α существует в свободном виде очень короткое время, так как связывается с белками плазмы (чаще с альбумином) в сосудистом русле. Это соединение билирубина и альбумина представляет собой крупное образование, которому трудно покинуть сосудистое русло. Поэтому он значительно менее токсичен, не проникает в мозг и не вызывает билирубиновую энцефалопатию. Одна молекула альбумина связывает две молекулы билирубина, а 1 г альбумина прочно связывает 14,4 мкмоль билирубина [4]. В норме в крови новорожденного 99 % билирубина связано с альбумином и только 1 % находится в свободном виде [4]. При некоторых патологических состояниях (недоношенность, незрелость, гипопротейнемия, асфиксия) уровень не связанного с альбумином билирубина может повышаться [4]. Свободный билирубин может пересекать гематоэнцефалический барьер и вызывать ядерную желтуху (билирубиновую энцефалопатию). У недоношенных детей ядерная желтуха может не иметь выраженных клинических симптомов или признаков. Ранними симптомами ядерной желтухи у доношенных новорожденных являются вялость, плохой аппетит и рвота. Могут развиваться опистотонус, парез взора, судороги и даже возможен летальный исход. Ядерная желтуха может привести к умственной отсталости, хореоатетодному ДЦП, нейросенсорной тугоухости, а позднее – к параличу взгляда вверх.

Кроме конкуренции между разными веществами за сайты связывания концентрация билирубина может повышаться и из-за изменения структуры самих сайтов связывания, причиной чего могут быть аминокислотные замены, возникающие по целому ряду причин. В Республике Беларусь и других странах, пострадавших от аварии на Чернобыльской атомной электростанции, и в Японии, пострадавшей от взрывов атомных бомб в Нагасаки и Хиросиме и от аварии на АЭС «Фукусима-1», актуальными остаются вопросы влияния радиации на здоровье человека, поэтому нами уделено особое внимание нескольким известным аминокислотным заменам, произошедшим в сывороточном альбумине человека (по данным [5], именно при радиационном воздействии), и их возможным последствиям.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили 104 рентгенологические структуры, содержащие информацию о сывороточном альбумине человека как в чистом виде, так и в комбинации с различными лигандами (табл. 1) из Protein Data Bank (www.pdb.org).

Т а б л и ц а 1. 3D структуры сывороточного альбумина человека с различными лигандами

Table 1. 3D structures of human serum albumin with different ligands

PDB-идентификатор	Разрешение, Å	Лиганд	PDB-идентификатор	Разрешение, Å	Лиганд
1AO6	2,5	–	2XW0	2,4	Дансил-L-фенилаланин
1BJ5	2,5	Миристиновая кислота	2XW1	2,5	Дансил-L-норвалин
1BKE	3,15	Миристиновая кислота и 3-йодобензойная кислота	2YDF	2,75	Ионофеноксиновая кислота
1BM0	2,5	–	3A73	2,19	Дельта 12 простагландин J2
1E7A	2,2	Пропофол	3B9L	2,6	Миристал и зидовудин
1E7B	2,38	Галотан	3B9M	2,7	Зидовудин и салициловая кислота
1E7C	2,4	Миристиновая кислота и галотан	3CX9	2,8	Миристиновая кислота и лизофосфатидилэтаноламин
1E7E	2,5	Декановая кислота	3JQZ	3,3	Лидокаин
1E7F	2,43	Додекановая кислота	3JRY	2,3	Сульфат ионы
1E7G	2,5	Миристиновая кислота	3LU6	2,7	IMX
1E7H	2,43	Пальмитиновая кислота	3LU7	2,8	IPX и фосфат ионы
1E7I	2,7	Стеариновая кислота	3LU8	2,6	IQX
1E78	2,6	–	3SQJ	2,05	Миристиновая кислота
1GNI	2,4	Олеиновая кислота	3TDL	2,6	Миристиновая кислота и DAUDA
1GNJ	2,6	Арахидоновая кислота	3UIV	2,2	Миристал-амантадин гидрохлорид
1H9Z	2,5	Миристиновая кислота и R энантиомер варфарина	4BKE	2,35	Пальмитиновая кислота
1HA2	2,5	Миристиновая кислота и S энантиомер варфарина	4E99	2,3	Перфтороктансульфоновая кислота
1HK1	2,65	Тироксин	4EMX	2,3	Хлорид ионы
1HK2	2,8	Тироксин	4G03	2,22	–
1HK3	2,8	Тироксин	4G04	2,3	–
1HK4	2,4	Тироксин и миристиновая кислота	4HGK	3,04	Антитело
1HK5	2,7	Тироксин и миристиновая кислота	4HGM	2,34	Антитело
1N5U	1,9	Гем	4IW1	2,56	Фруктоза и фосфат ионы
1O9X	3,2	Миристиновая кислота и гемин	4IW2	2,41	Глюкоза, декстроза и фосфат ионы
1TF0	2,7	Декановая кислота и лимонная кислота	4K2C	3,23	–
2BX8	2,7	Азапропазон	4K71	2,4	Сульфат-ионы
2BXA	2,35	3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фурапропионовая кислота	4L8U	2,01	9-амино камптотедин и миристиновая кислота
2BXB	3,2	Оксифенбутазон	4L9K	2,4	Камптотедин
2BXC	3,1	Фенилбутазон	4L9Q	2,7	Тенипозид
2BXD	3,05	Варфарин	4LA0	2,4	Бикалутамид
2BXE	2,95	Дифлунизал	4LB2	2,8	Идарубицин
2BXF	2,95	Диазепам	4LB9	2,7	Этопозид
2BXG	2,7	Ибупрофен	4N0F	3,02	Человеческие FcRn
2BXH	2,25	Индоксил сульфат	4N0U	3,8	Неонатальный Fc-рецептор и Fc
2BXI	2,5	Миристал, азапропазон	4S1Y	3,16	Цисплатин
2BXK	2,4	Миристал, азапропазон и индометацин	4Z69	2,19	Пальмитиновая кислота и диклофенак
2BXL	2,6	Миристал и салициловая кислота	5FUO	3,6	Fab-фрагмент
2BXM	2,5	Миристал и индометацин	5GIX	2,8	Пальмитиновая кислота – Fe(Hn3pIT)Cl ₃
2BXN	2,65	Миристал и йодипамид	5GIY	2,54	Пальмитиновая кислота – [RuCl ₃ (ind)] ²⁻

Окончание табл. 1

PDB-идентификатор	Разрешение, Å	Лиганд	PDB-идентификатор	Разрешение, Å	Лиганд
2BXO	2,6	Миристат и оксифенбутазон	5ID7	2,26	Фосфородитиоат миристоилциклической фосфатидной кислоты
2BXP	2,3	Миристат и фенилбутазон	5IFO	3,2	KP1019
2BXQ	2,6	Миристат, фенилбутазон и индометацин	5IJF	2,65	Катионы цинка
2I2Z	2,7	Миристат и аспирин	5UJB	2,7	Mcl-1 ингибитор
2I30	2,9	Миристат и салициловая кислота	5VNW	2,6	Nb.b201
2VDB	2,52	S-напроксен и декановая кислота	5X52	3,0	Октаноат и N-ацетил-L-метионин
2VUE	2,42	Билирубин	5YB1	2,62	Пальмитиновая кислота и Cu(II)-препарат
2VUF	3,05	Фузидовая кислота	5YOQ	2,65	4-фенилбутират натрия
2XSI	2,7	Дансил-L-глутамат и миристиновая кислота	5Z0B	2,17	Линолевая кислота, октановая кислота, триптофан, сульфат ионы
2XVQ	2,9	Дансил-L-саркозин	6A7P	2,28	Арипипразол
2XVU	2,6	Дансил-L-аспарагин	6EZQ	2,39	NBD-аминододекановая кислота
2XVV	2,4	Дансил-L-аспарагин и миристиновая кислота	6JE7	3,9	–
2XVW	2,65	Дансил-L-аргинин и миристиновая кислота	1UOR	2,8	–

Элементы вторичной структуры сывороточного альбумина человека определяли с помощью алгоритма DSSP (Dictionary of Secondary Structure of Proteins – словарь вторичной структуры белка), т. е. данный алгоритм не предсказывает, а именно устанавливает конкретные элементы вторичной структуры, основываясь на возможности формирования водородных связей между атомами аминокислотных остатков главных цепей (www.swift.cmbi.umcn.nl/gv/dssp). Если аминокислота во всех структурах входила в состав альфа-спирали, мы считали ее альфа-спиральной, если в состав бета-тяжа – бета-структурной. Все фрагменты полипептидной цепи, не образующие альфа-спирали и бета-тяжи, классифицировались как «петля» (C – random coil). Если данные о вторичной структуре для аминокислоты отсутствовали, аминокислоту обозначали «0» и считали ее структурно неустойчивой. С помощью алгоритма DSSP определяли и доступность сольвенту каждой аминокислоты сывороточного альбумина человека.

При рассмотрении структурной неустойчивости было выделено несколько вариантов структурного состояния для конкретной аминокислоты: альфа-спираль/петля (HC), петля/неструктурированная область (CO), альфа-спираль/неструктурированная область (HO) и альфа-спираль/петля/неструктурированная область (HCO). HC – вариант структурной нестабильности, при котором аминокислота находится в составе альфа-спирали на одной структуре белка и в петле на другой структуре белка; HO – вариант структурной нестабильности, при котором аминокислота находится или в альфа-спирали, или и в неструктурированной области белка; CO – вариант структурной нестабильности, при котором аминокислота находится в петле или в неструктурированной области белка; HCO – вариант структурной нестабильности, при котором аминокислота находится или в альфа-спирали, или в петле, или в неструктурированном участке белка. Минимальный процент сходства между структурами полноразмерного сывороточного альбумина составил 95,07 %. Неструктурированная область белка – участок белка с отсутствующей электронной плотностью на 3D модели белка.

Стабильность вторичной структуры сывороточного альбумина человека определяли с помощью оригинального алгоритма PentaFold 2.0 [6].

На основании аминокислотной последовательности структуры сывороточного альбумина человека, не содержащей никаких лигандов (4K2C), были получены модели трехмерного строения белков, содержащих одну из пяти мутаций, вызванных радиационным воздействием, с по-

мощью сервера SWISS MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). В качестве шаблона для построения модели модифицированных белков была выбрана структура 4ВКЕ, третичная структура которой на 99 % идентична исследуемой. Таким образом, получили пять модифицированных 3D структур с одной из пяти известных на сегодняшний день аминокислотных замен, обнаруженных при исследовании детского населения городов Хиросима и Нагасаки: His3-Gln3 (Nagasaki-3), Asp269-Gly269 (Nagasaki-1), Glu354-Lys354 (Hiroshima-1), Asp375-Asn375 (Nagasaki-2), Glu382-Lys382 (Hiroshima-2) [5].

Информация о структуре билирубина (bilirubin-IX alpha) была взята из базы данных PubChem [7]. Для проведения докинга билирубина со структурой как нативного, так и модифицированного сывороточного альбумина человека использовали Molecular Docking server [8]. Для определения свободной энергии связывания билирубина с альбумином в качестве связывателей использовали те аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с билирубином на единственной трехмерной структуре, представляющей собой комплекс данных веществ – 2VUE [9]. Для определения влияния аминокислотной замены на способность связывать билирубин в качестве основного связывателя выбирали только ту аминокислоту, которая подвергается замене. В результате были получены значения энергии связывания как до, так и после аминокислотной замены.

Для определения характера взаимодействия между молекулами билирубина и сывороточного альбумина использовали алгоритм PLIP [10].

Результаты исследования. Сывороточный альбумин состоит из единственной полипептидной цепи из 585 аминокислот. Это высокозаряженный белок без гликозилированных остатков, но с 17 дисульфидными мостиками и одним свободным цистеином. Изoeлектрическая точка альбумина равна 5,47. Сывороточный альбумин человека относится к белкам альфа-спирального класса [11], так как его вторичная структура представлена исключительно альфа-спиралями и койлом.

С точки зрения стабильности вторичной структуры данный белок является структурно неустойчивым, так как в нестабильных элементах вторичной структуры находится 60,417 % аминокислотных остатков, а в стабильных альфа-спиралях и стабильном койле – лишь 26,415 и 13,368 % соответственно. В сывороточном альбумине человека преобладает структурная неустойчивость типа HC (41,319 %). Структурная неустойчивость типа HC0 составляет 11,632 %, C0 – 5,035, H0 – 2,431 %.

Данные получены в результате анализа всех 3D структур, содержащих информацию о вторичной структуре сывороточного альбумина человека. Анализ структуры 4K2C с помощью алгоритма PentaFold 2.0 показал нестабильность вторичной структуры альбумина (рис. 1). Большинство альфа-спиралей являются метастабильными или нестабильными, и лишь несколько содержат стабильное ядро. То есть большое влияние на стабильность альфа-спиралей оказывает не столько аминокислотный состав той или иной альфа-спирали, сколько формирование блоков взаимодействующих альфа-спиралей [11]. Структурную неустойчивость же сывороточного альбумина можно объяснить с точки зрения его транспортной функции для многих эндо- и экзогенных веществ.

Среди всех изученных 104 структур альбумина лишь одна представляет собой комплекс альбумина с билирубином (2VUE). Это 3D модель, в которой показан так называемый гидрофобный карман, являющийся единственным

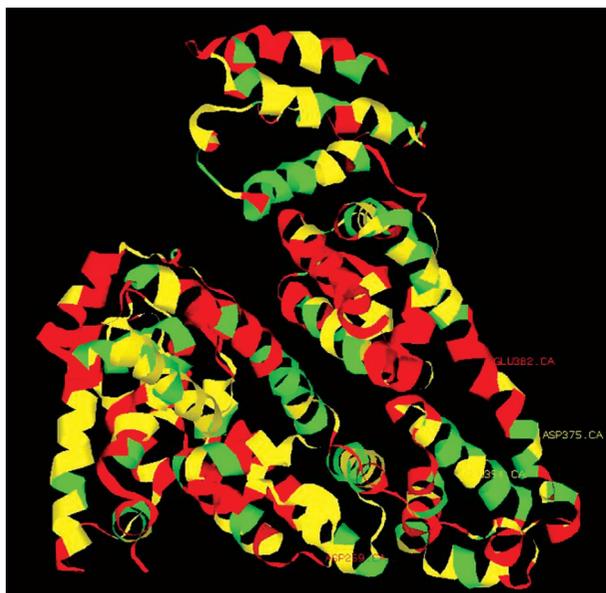


Рис. 1. Нестабильность вторичной структуры сывороточного альбумина человека (3D структура 4K2C). Зеленым обозначены стабильные элементы вторичной структуры, красным – нестабильные, желтым – метастабильные

Fig. 1. Secondary structure instability of human serum albumin (3D model – 4K2C). Green color indicates stable elements of the secondary structure, red color indicates unstable elements, yellow color indicates metastable elements

хорошо описанным сайтом связывания билирубина [9]. С помощью алгоритма PLIP было установлено, что аминокислотные остатки альбумина с билирубином образуют следующие типы взаимодействий: гидрофобные взаимодействия с Leu115, Phe134, Tyr138, Ile142, Phe149, Phe157, Tyr161, Arg186; водородные связи с Tyr138, Tyr161; катион-пи взаимодействие с Arg186 и солевые мостики с Arg117, Arg186, Lys190. То есть билирубин связывается исключительно с аминокислотными остатками из первого домена [3]. Данный сайт связывания билирубина находится в стабильной области белка: Leu115, Arg117, Phe149 – в стабильном койле; Phe134, Tyr138, Ile142, Phe157, Tyr161, Arg186 и Lys190 – в стабильных альфа-спиралях.

Из литературных данных известно, что билирубин может связываться и с Lys240 [12], и с Arg222 [13]. Lys240 и Arg222 также находятся в стабильных альфа-спиралях. Уровень доступности сольвенту данных аминокислот составляет 98 и 26 соответственно, при этом для двух аминокислот характерен длинный радикал. С помощью докинга молекулы билирубина с аминокислотами из первого сайта связывания (рис. 2, *a*) и с лизином 240 (рис. 2, *c*) нами были получены следующие значения свободной энергии связывания: $-4,61$ и $-2,44$ ккал/моль соответственно. То есть первый сайт связывания, который описан по результатам рентгеноструктурного анализа, является более предпочтительным, чем второй. В пользу специфичности первого сайта по сравнению со вторым свидетельствует тот факт, что константа ингибирования (K_i) составляет для него $417,38$ мкмоль/л, а для второго сайта связывания – $16,31$ ммоль/л.

Неожиданные результаты были получены нами после докинга билирубина с третьим сайтом связывания. Неожиданность заключалась в том, что 3D модели в PDB альбумина с билирубином в данном сайте связывания на сегодняшний день нет, а область, в которой расположен Arg222 (рис. 2, *b*), является еще более специфичной для билирубина: свободная энергия связывания равна $-5,39$ ккал/моль, а константа ингибирования (K_i) составляет $112,33$ мкмоль/л. Кроме Arg222 билирубин связывается также с Lys444, Ala291, Val293 (гидрофобные взаимодействия), Asn295, Arg218, Asp451, Lys199 (полярные взаимодействия), а с Glu294, Lys195, Glu292 он образует другие типы взаимодействий.

Сайт связывания билирубина с Arg222 интересен еще и тем, что Arg222 расположен недалеко (на расстоянии $8,44$ Å) от единственного остатка триптофана в сывороточном альбумине человека (рис. 3, *a*). Рядом с Arg222 находится и Arg218, который также может участвовать в связывании билирубина. При этом Arg218 расположен еще ближе к триптофану – на расстоянии $7,77$ Å (рис. 3, *b*). Такая близость двух положительно заряженных аминокислотных остатков к единственному флуорофору заставляет предположить, что у комплекса билирубина с альбумином максимумы на спектре флуоресценции триптофана будут смещены, а также изменится квантовый выход флуоресценции как в обычных условиях, так и при изменении температуры.

Все аминокислотные замены, вызванные радиационным воздействием, находятся в нестабильной области белка. Чтобы определить влияние данных аминокислотных замен на связывание

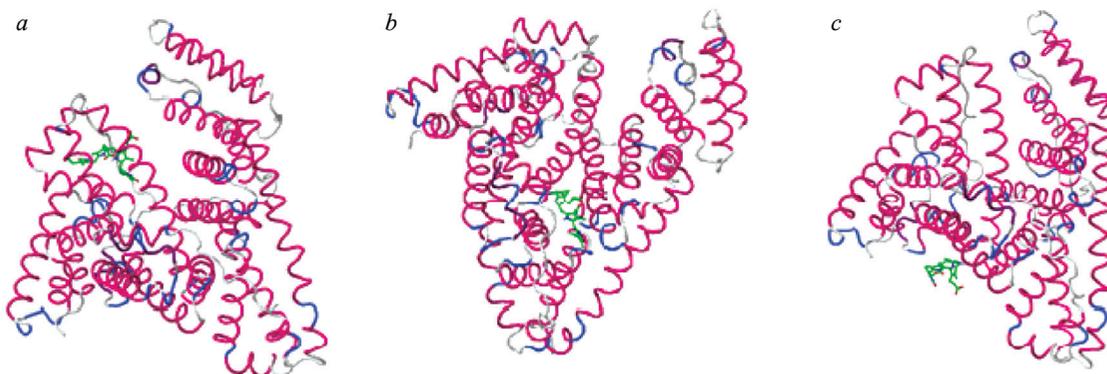


Рис. 2. Сайты связывания билирубина IX- α на сывороточном альбумине человека (4K2C): *a* – первый сайт связывания, *b* – сайт связывания с Arg222, *c* – сайт связывания с Lys240

Fig. 2. Bilirubin IX- α binding sites on human serum albumin (4K2C): *a* – the first binding site, *b* – the binding site with Arg222, *c* – the binding site with Lys240

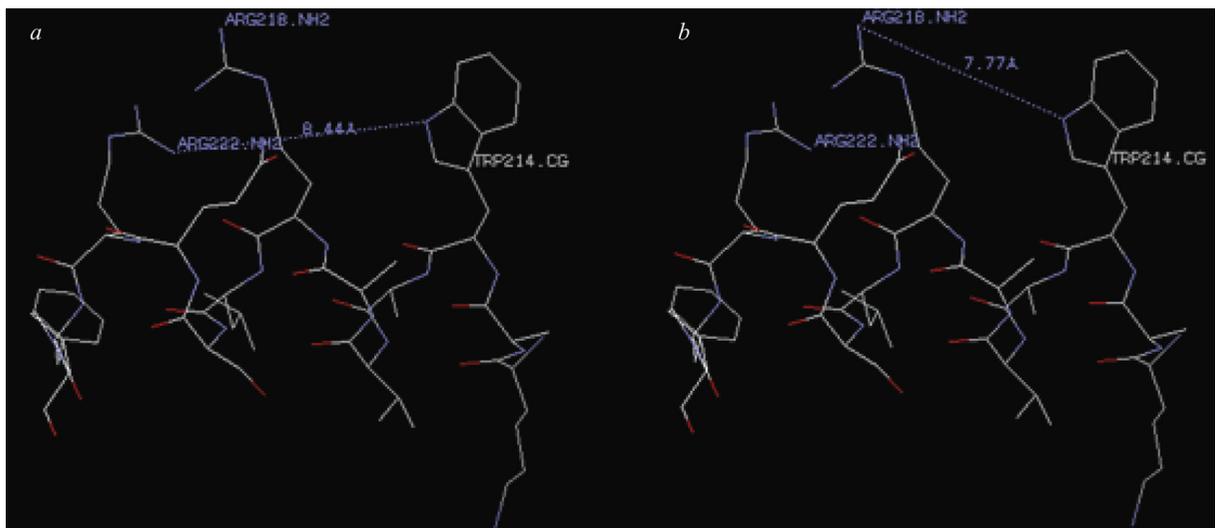


Рис. 3. Третичная структура фрагмента сывороточного альбумина человека 212–224: *a* – взаимное расположение Arg222 и Trp214; *b* – взаимное расположение Arg218 и Trp214

Fig. 3. Tertiary structure of the human serum albumin fragment 212–224: *a* – the mutual location of Arg222 and Trp214; *b* – the mutual location of Arg218 and Trp214

билирубина были изучены все возможные взаимодействия данных аминокислот как в мономере белка, так и в его тримере (структура 5Z0B). В тримере между цепями образуются следующие виды водородных связей между главной и боковой цепями: Gln170 цепи А с Lys439 цепи С; Glu280 цепи А с Pro299 и Ala300 цепи С; Glu442 цепи А с Glu266 цепи В; Asp301, Leu302 цепи С с Glu280 цепи А; Glu396 цепи С с His128 цепи А; Lys439 цепи С с Cys169 цепи А; His440 цепи С с Gln170 цепи А; между радикалами аминокислот: Lys162 цепи А с Glu442 цепи С; Gln170 цепи А с His440 цепи С; Glu442 цепи В с Glu266 цепи С; Arg445 цепи С с Glu131 цепи А; ионные взаимодействия: Arg445 цепи С с Glu131 цепи А; Glu132 цепи А с Lys389 цепи С; Lys162 цепи А с Glu442 цепи С; Lys389 цепи В с Glu266 цепи С; Lys439 цепей А и В с Glu280 цепей В и С; His440 цепей А и В с Glu280 цепей В и С; Glu442 цепей А и В с Lys262 цепей В и С; Lys444 и Lys560 цепи В с Glu280 и Asp129 цепи С.

Аминокислотная замена Asp269-Gly269 приводит к снижению отрицательного заряда, так как аспарагиновая кислота меняется на нейтральный глицин. В результате модифицированный альбумин приобретает большую способность к связыванию билирубина в данном районе белка. Если с областью нативного альбумина, в которой расположена Asp269, свободная энергия связывания составляет $-0,76$ ккал/моль, то со структурой, содержащей мутацию Asp269-Gly269, она равняется $-1,52$ ккал/моль. Константа ингибирования при этом уменьшается более чем в 3 раза (табл. 2).

Ни Asp269, ни Gly269 взаимодействий с аминокислотами из известных ранее сайтов связывания билирубина не образуют (табл. 3), поэтому замена данной аминокислоты не может влиять на структуру известных сайтов связывания.

Таблица 2. Свободная энергия связывания и константа ингибирования комплексов альбумина с билирубином до и после аминокислотной замены, вызванной радиационным воздействием

Table 2. Binding free energy and inhibition constant of the complexes of albumin with bilirubin before and after amino acid replacement caused by radiation exposure

Мутация	Свободная энергия связывания, ккал/моль		Константа ингибирования, ммоль/л	
	до мутации	после мутации	до мутации	после мутации
His3–Gln3 (Nagasaki-3)	-2,76	-2,56	9,51	13,40
Asp269–Gly269 (Nagasaki-1)	-0,76	-1,52	279,54	77,23
Glu354–Lys354 (Hiroshima-1)	-1,89	-3,17	41,12	4,73
Asp375–Asn375 (Nagasaki-2)	-1,37	-1,97	99,85	36,09
Glu382–Lys382 (Hiroshima-2)	-2,44	-1,95	16,16	37,15

Таблица 3. Аминокислотные остатки, с которыми формирует связи билирубин до и после мутации Asp269-Gly269

Table 3. Amino acid residues, with which bilirubin binds before and after the Asp269-Gly269 mutation

Показатель	Энергия взаимодействия, ккал/моль	
	до мутации	после мутации
Водородные связи	ASP269 (-1,4522)	LYS225 (-0,6501)
	SER270 (-1,1318)	
Полярные взаимодействия		GLN268 (-1,3528)
		LYS276 (-0,9818)
Другие типы взаимодействий	LYS225 (-1,0146)	SER273 (-1,2087)
	GLU227 (-0,6558)	

Следует отметить, что после возникновения аминокислотной замены билирубин начинает взаимодействовать с аминокислотными остатками, с которыми ранее связи не формировал, что может быть вызвано локальными изменениями пространственного расположения атомов сближенных аминокислот. Этот факт можно объяснить как локальным изменением заряда, так и механически – аспарагиновая кислота имеет более длинный радикал.

Аминокислотная замена Glu354-Lys354 также приводит к снижению отрицательного заряда области белка, в которой она располагается. Как и в предыдущем случае, в результате данной аминокислотной замены происходит снижение свободной энергии связывания и уменьшения константы ингибирования. По сравнению с предыдущей заменой константа ингибирования уменьшается в 8,69 раза. Ни Glu354, ни Lys354 не формируют никаких взаимодействий с аминокислотами из известных сайтов связывания билирубина, поэтому никак не могут влиять на его связывание (табл. 4).

Аминокислотная замена Asp375-Asn375 также приводит к снижению свободной энергии связывания альбумина с билирубином и к снижению константы ингибирования более чем в 2 раза. Как и две предыдущие аминокислотные замены, на структуру известного сайта связывания билирубина она повлиять не может (табл. 5).

Две другие аминокислотные замены иначе влияют на способность альбумина к связыванию билирубина. В результате аминокислотной замены His3-Gln3 константа ингибирования увеличивается в 1,41 раза (см. табл. 2), а в результате аминокислотной замены Glu382-Lys382 – в 2,30 раза (табл. 2). При этом ни His3, ни Gln3, ни Glu382, ни Lys382 (табл. 6, 7) взаимодействий с аминокислотами из известных сайтов связывания билирубина также не формируют.

Таблица 4. Аминокислотные остатки, с которыми формирует связи билирубин до и после мутации Glu354-Lys354

Table 4. Amino acid residues, with which bilirubin binds before and after the Glu354-Lys354 mutation

Показатель	Энергия взаимодействия, ккал/моль	
	до мутации	после мутации
Водородные связи	GLU354 (-0,4744)	–
Полярные взаимодействия	ARG209 (-2,3875)	ARG209 (-2,2961)
	LYS351 (-2,0627)	LYS354 (-1,5491)
		LYS351 (-1,3719)
Гидрофобные взаимодействия	LEU327 (-1,1239)	LEU327 (-0,5686)
	ALA210 (-0,6004)	ALA210 (-0,5026)
	ALA213 (-0,331)	ALA213 (-0,261)
Другие типы взаимодействий	ASP324 (-0,5652)	THR355 (-0,7654)
	LEU331 (-0,5535)	GLU358 (-0,63)
	GLU358 (-0,5169)	
	LYS323 (-0,4548)	
	ALA350 (-0,2893)	

Таблица 5. Аминокислотные остатки, с которыми формирует связи билирубин до и после мутации Asp375-Asn375

Table 5. Amino acid residues, with which bilirubin binds before and after the Asp375-Asn375 mutation

Показатель	Энергия взаимодействия, ккал/моль	
	до мутации	после мутации
Водородные связи	ALA371 (-0,4783)	PHE374 (-1,6853)
	TYR334 (-0,1313)	ASN375 (4,677)
Полярные взаимодействия	ASP375 (-2,121)	LYS372 (-1,2841)
	LYS378 (-1,0397)	–
Катион – π	PHE374 (-1,3573)	–
Гидрофобные взаимодействия	ALA306 (-0,208)	PHE377 (-0,916)
	VAL310 (-0,1848)	VAL381 (-0,4773)
Другие типы взаимодействий	LYS372 (-0,9853)	LYS378 (-5,4871)
	PHE377 (-0,5236)	PRO379 (-0,5251)
		TYR341 (-0,2967)

Таблица 6. Аминокислотные остатки, с которыми формирует связи билирубин до и после мутации His3-Gln3

Table 6. Amino acid residues, with which bilirubin binds before and after the His3-Gln3 mutation

Показатель	Энергия взаимодействия, ккал/моль	
	до мутации	после мутации
Водородные связи	ASP63 (-1,561)	GLN3 (-1,438)
		GLU6 (-1,0787)
Полярные взаимодействия	–	LYS4 (-1,4879)
	–	HIS9 (-0,4338)
Другие типы взаимодействий	LYS4 (-1,2474)	SER65 (-0,304)
	GLU6 (-0,4469)	
	SER65 (-0,2783)	

Таблица 7. Аминокислотные остатки, с которыми формирует связи билирубин до и после мутации Glu382-Lys382

Table 7. Amino acid residues, with which bilirubin binds before and after the Glu382-Lys382 mutation

Показатель	Энергия взаимодействия, ккал/моль	
	до мутации	после мутации
Водородные связи	GLU382 (-0,1526)	LYS382 (-2,3816)
		ASN386 (-1,2787)
		GLN385 (-1,0549)
Полярные взаимодействия	LYS378 (-2,7341)	–
	TYR334 (-0,1507)	–
Гидрофобные взаимодействия	VAL381 (-1,0535)	–
Другие типы взаимодействий	GLN385 (-0,4929)	LYS389 (-0,9332)
	TYR341 (-0,456)	GLU442 (-0,4624)

Таким образом, аминокислотные остатки, которые подвергаются заменам, не образуют взаимодействий с известными сайтами связывания билирубина как в его мономере, так и в его тримере, т. е. мутация в одной из цепей альбумина не может влиять на сайты связывания билирубина другой цепи.

Обсуждение. Известно пять аминокислотных замен в сывороточном альбумине, произошедших в японской популяции именно в результате радиационного воздействия. При этом ничего не известно о влиянии данных аминокислотных замен на вторичную структуру белка. Сывороточный альбумин человека является альфа-спиральным белком, поэтому приводим данные об аминокислотном (рис. 4) и пентапептидном составе (рис. 5) 100 негомологичных альфа-спиральных белков [11].

При других аминокислотных заменах (His3-Gln3 (Nagasaki-3), Glu354-Lys354 (Hiroshima-1), Asp375-Asn375 (Nagasaki-2), Glu382-Lys382 (Hiroshima-2)) изменений в пентапептидном составе белка не происходит, так как гистидин, глутамин, глутаминовая кислота, лизин, аспарагиновая кислота и аспарагин являются гидрофильными аминокислотами.

При аминокислотных заменах Glu354-Lys354 и Glu382-Lys382 глутаминовая кислота переходит в лизин. Данные замены могут привести к стабилизации вторичной структуры, так как частота встречаемости глутаминовой кислоты достоверно выше в структурно изменчивом элементе вторичной структуры, чем в бета-тяжах и койле, а частота встречаемости лизина в различных элементах вторичной структуры альфа-спиральных белков не имеет достоверных различий (см. рис. 4). При аминокислотной замене Asp375-Asn375 (Nagasaki-2) существенных различий во вторичной структуре произойти не должно, так как и аспарагиновая кислота, и аспарагин достоверно чаще встречаются в койле.

Выводы

1. Сывороточный альбумин человека имеет несколько сайтов связывания билирубина, наиболее специфичными из которых являются область с Arg222, Lys444, Ala291, Val293, Asn295, Arg218, Asp451, Lys199, Glu294, Lys195, Glu292 и гидрофобный карман с аминокислотами Leu115, Arg117, Phe134, Tyr138, Ile142, Phe149, Phe157, Tyr161, Arg186, Lys190.

2. Все аминокислотные остатки из сайтов связывания располагаются в стабильных элементах вторичной структуры сывороточного альбумина человека.

3. Аминокислотные замены Asp269-Gly269 (Nagasaki-1), Glu354-Lys354 (Hiroshima-1), Asp375-Asn375 (Nagasaki-2) уменьшают свободную энергию связывания билирубина сывороточным альбумином человека, а аминокислотные замены His3-Gln3 (Nagasaki-3) и Glu382-Lys382 (Hiroshima-2) – повышают.

4. Обнаруженные ранее у детей Хиросимы и Нагасаки мутации не могут влиять на вторичную структуру и на известные сайты связывания билирубина сывороточным альбумином человека. То есть серьезные структурные перестройки, способные влиять на связывание билирубина отдаленными сайтами, не могут вызывать эти мутации. В результате данных мутаций не возникают и новые сайты связывания, обладающие большим сродством с билирубином, чем наиболее специфичные известные.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Clinical indications for the albumin use: still a controversial issue / P. Caraceni [et al.] // *Eur. J. Int. Med.* – 2013. – Vol. 24, N 8. – P. 721–728. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.05.015>
2. He, X. M. Atomic structure and chemistry of human serum albumin / X. M. He, D. C. Carter // *Nature.* – 1992. – Vol. 358, N 6383. – P. 209–215. <https://doi.org/10.1038/358209a0>
3. Colmenarejo, G. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin / G. Colmenarejo // *Med. Res. Rev.* – 2003. – Vol. 23, N 3. – P. 275–301. <https://doi.org/10.1002/med.10039>
4. Желтухи неонатального периода: учеб.-метод. пособие / А. К. Ткаченко [и др.]. – Минск : БГМУ, 2017. – 68 с.
5. Point substitutions in Japanese alloalbumins / K. Arai [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – Vol. 86, N 16. – P. 6092–6096. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6092>
6. Khrustalev, V. V. Amino acid content of beta strands and alpha helices depends on their flanking secondary structure elements / V. V. Khrustalev, T. A. Khrustaleva, V. V. Poboinev // *Biosystems.* – 2018. – Vol. 168. – P. 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2018.04.002>
7. PubChem 2019 update: improved access to chemical data / S. Kim [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2019. – Vol. 47, N D1. – P. D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
8. Bikadi, Z. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock / Z. Bikadi, E. Hazai // *J. Cheminf.* – 2009. – Vol. 1. – Art. 15. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-1-15>
9. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha / P. A. Zunszain [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 381, N 2. – P. 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.016>
10. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler / S. Salentin [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2015. – Vol. 43, N W1. – P. W443–W447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>
11. Побойнев, В. В. Структурная изменчивость альфа-спиральных белков / В. В. Побойнев, В. В. Хрусталева, Т. А. Хрусталева // *Инновационные технологии в фармации : сб. науч. тр. / под общ. ред. Е. Г. Приваловой.* – Иркутск,

2019. – Вып. 6 : материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 100-летию со дня образования Иркутск. гос. мед. ун-та (Иркутск, 14–15 июня 2019 г.). – С. 118–127.

12. The structural characterization and bilirubin-binding properties of albumin Herborn, a [Lys240→Glu] albumin mutant / L. Minchiotti [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – Vol. 214, N 2. – P. 437–444. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17939.x>

13. Jacobsen, J. Studies of the affinity of human serum albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength / J. Jacobsen // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1977. – Vol. 9, N 3. – P. 235–239. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1977.tb03486.x>

References

1. Caraceni P., Domenicali M., Tovoli A., Napoli L., Ricci C. S., Tufoni M., Bernardi M. Clinical indications for the albumin use: still a controversial issue. *European Journal of Internal Medicine*, 2013, vol. 24, no. 8, pp. 721–728. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.05.015>

2. He X. M., Carter D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 1992, vol. 358, no. 6383, pp. 209–215. <https://doi.org/10.1038/358209a0>

3. Colmenarejo G. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. *Medicinal Research Reviews*, 2003, vol. 23, no. 3, pp. 275–301. <https://doi.org/10.1002/med.10039>

4. Tkachenko A. K., Ustinovich A. A., Romanova O. N., Klyuchareva A. A., Novak L. V. *Jaundice of the neonatal period: a teaching aid*. Minsk, Belarusian State Medical University, 2017. 68 p. (in Russian).

5. Arai K., Madison J., Huss K., Ishioka N., Satoh C., Fujita M., Neel J. V., Sakurabayashi I., Putnam F. W. Point substitutions in Japanese alloalbumins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, vol. 86, no. 16, pp. 6092–6096. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6092>

6. Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A., Poboinev V. V. Amino acid content of beta strands and alpha helices depends on their flanking secondary structure elements. *Biosystems*, 2018, vol. 168, pp. 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2018.04.002>

7. Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S. [et al.]. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, 2019, vol. 47, no. D1, pp. D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>

8. Bikadi Z., Hazai E. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *Journal of Cheminformatics*, 2009, vol. 1, art. 15. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-1-15>

9. Zunszain P. A., Ghuman J., McDonagh A. F., Curry S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. *Journal of Molecular Biology*, 2008, vol. 381, no. 2, pp. 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.016>

10. Salentin S., Schreiber S., Haupt V. J., Adasme M., Schroeder M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*, 2015, vol. 43, no. W1, pp. W443–W447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>

11. Poboinev V. V., Khrustalev V. V., Khrustaleva T. A. Structural variability of alpha-helical proteins. *Innovatsionnye tekhnologii v farmatsii: sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 6. Materialy Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii c mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 100-letiyu so dnya obrazovaniya Irkutskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta (Irkutsk, 14–15 iyunya 2019 goda)* [Innovative technologies in pharmacy: collection of scientific papers. Issue 6. Proceedings of the All-Russian scientific and practical conference with international participation, dedicated to the 100th anniversary of the founding of Irkutsk State Medical University (Irkutsk, June 14–15, 2019)]. Irkutsk, 2019, pp. 118–127 (in Russian).

12. Minchiotti L., Galliano M., Zapponi M. C., Tenni R. The structural characterization and bilirubin-binding properties of albumin Herborn, a [Lys240→Glu] albumin mutant. *European Journal of Biochemistry*, 1993, vol. 214, no. 2, pp. 437–444. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17939.x>

13. Jacobsen J. Studies of the affinity of human serum albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 1977, vol. 9, no. 3, pp. 235–239. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1977.tb03486.x>

Информация об авторах

Побойнев Виктор Витольдович – аспирант, ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dremozzew@mail.ru

Хрусталеv Владислав Викторович – доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

Стожаров Александр Николаевич – профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: stojarov@mail.ru

Хрусталева Татьяна Александровна – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tanissia.lir@gmail.com

Information about the authors

Victor V. Poboinev – Postgraduate student, Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dremozzew@mail.ru

Vladislav V. Khrustalev – Associate Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vvkhrustalev@mail.ru

Aliaksandr N. Stojarov – Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: stojarov@mail.ru

Tatyana A. Khrustaleva – Senior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanissia.lir@gmail.com