

# Влияние изменений рН и фармакологических модуляторов аденилатциклазной системы на конформацию сывороточного альбумина человека

А. И. Луйк, Ю. Н. Набока, С. М. Могилевич, Т. О. Гуца, Н. И. Мищенко<sup>1</sup>

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины  
Ул. Мурманская, 1, Киев, 253094, Украина

<sup>1</sup> Химический факультет, Левенский католический университет  
Челестиненлаан 200F, В-3001, Хеврели, Бельгия

*Методом динамического рассеяния света определены гидродинамические параметры альбумина при различных значениях рН и взаимодействии с шестью физиологически активными веществами. Обнаружены два типа изменений конформации альбумина, каждый из которых характерен для веществ с одинаковым типом действия на аденилатциклазную сигнальную систему клетки.*

**Введение.** Обратимое связывание низкомолекулярных физиологически активных веществ (ФАВ) с сывороточным альбумином постоянно вызывает интерес широкого круга ученых. Многочисленные публикации по данному вопросу посвящены, главным образом, определению стехиометрических и термодинамических констант [1—6]. Изменения третичной структуры белка в процессе комплексообразования изучены в значительно меньшей степени [7, 8].

Структура сывороточного альбумина человека (САЧ) образована последовательностью из девяти петель. Гомологичность петель позволяет выделить в САЧ три основных домена, каждый из которых, в свою очередь, может быть разделен на два субдомена. Дисульфидные мостики между петлями обеспечивают некоторую жесткость молекулы в пределах каждого субдомена, однако допускают значительные изменения размеров и формы САЧ при изменениях величины рН и других воздействиях [9]. Результаты недавних кристаллографических исследований [10] показали, что в пределах рН 5,5—7,2 субъединицы САЧ соединены в молекулу, форма которой приближается к равностороннему треугольнику со стороной ~ 80 и толщиной

~ 30 Å. На основе данных по малоугловому рентгеновскому рассеянию [11] получен радиус инерции молекулы САЧ, составляющий в указанном выше интервале рН 31,3—32,8 Å. Предложенные авторами работы [11] структурные модели САЧ при различных рН построены из шести субдоменов с диаметром, достигающим 40 Å.

В настоящей работе изучали влияние на размеры глобулы САЧ и его субмолекулярную структуру шести ФАВ — изадрина, иохимбина, теофиллина, пропранолола, клонидина, карбахолина (рис. 1). Эти вещества по-разному действуют на активность аденилатциклазной системы (АдЦ) передачи клеточного сигнала [12—15]. Изадрин, иохимбин и теофиллин активируют АдЦ за счет агонистического влияния на  $\beta$ -адренорецепторы, блокады  $\alpha_2$ -адренорецепторов и ингибирования цАМФ-фосфодиэстеразы соответственно. Пропранолол, клонидин и карбахолин тормозят АдЦ вследствие блокады  $\beta$ -адренорецепторов, активации  $\alpha_2$ -адренорецепторов и  $M_2$ -рецепторов ацетилхолина соответственно. Задачей настоящего исследования явилось выявление особенностей влияния данных веществ на конформацию альбумина. Для этого использовали метод динамического рассеяния света [16, 17].

**Материалы и методы.** Лиофилизированный альбумин («Reanal», Венгрия) человеческой сыворотки (> 95 %) предварительно освобождали от

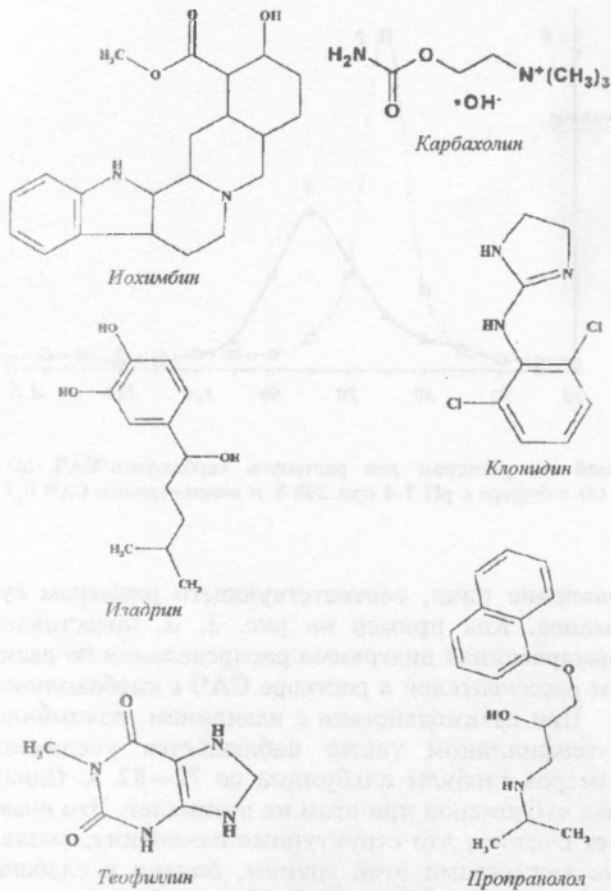
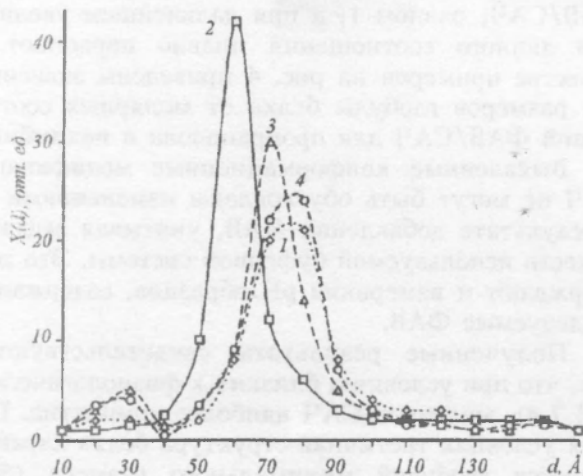


Рис. 1. Структурные формулы исследованных ФАВ

Рис. 2. Нормированные функции распределения  $X(d)$  рассеивателей по размерам, полученные из спектров динамического рассеяния света с помощью метода регуляризации для растворов САЧ в буфере при 298 К и различных значениях pH: 1 — 8,0; 2 — 7,4; 3 — 6,4; 4 — 5,4

эксимерных фракций гель-хроматографией на сефадексе G-150. Белок растворяли в смеси 0,9 %-го NaCl с 0,15 М натрий-фосфатным буфером. Взаимодействие альбумина с ФАВ («Sigma», США, > 99 %) исследовали в растворе, содержащем 0,5 % (в/об) САЧ при физиологическом значении pH 7,4. Молярное отношение ФАВ/САЧ изменяли в пределах от 1 до 100. Молекулярную массу альбумина принимали равной 68 кДа [9]. Для сравнения проведены также исследования растворов САЧ при различных pH в пределах от 5,4 до 8,0 без добавления ФАВ. Концентрацию альбумина в этих экспериментах изменяли от 0,2 до 1,0 % (в/об).

В экспериментах с помощью 64-канального коррелятора Malvern Digital Correlator type 7023 измеряли автокорреляционную функцию интенсивности излучения аргонового лазера, рассеянного исследуемым образцом под углом  $\Theta = 90^\circ$ . Температуру образца 298 К выдерживали с точностью до 0,1 К. По экспериментальным данным рассчитывали нормализованную корреляционную функцию первого порядка, которую затем анализировали методом регуляризации по Тихонову для получения средней скорости затухания  $\Gamma$  корреляционной функции поля. Эффективный коэффициент диффузии рассчитывали из соотношения

$$D = \Gamma / k^2,$$

где  $k = 4\pi n \sin(\Theta/2)/\lambda$  — величина рассеянного вектора;  $n$  — показатель преломления растворителя;  $\lambda = 514,5$  нм — длина волны падающего света. Затем был рассчитан гидродинамический диаметр эквивалентной сферы в предположении справедливости уравнения Стокса—Эйнштейна:

$$d = kT / 3\pi\eta D,$$

где  $k$  — постоянная Больцмана;  $T$  — абсолютная температура;  $\eta$  — вязкость буферного раствора, измерявшаяся капиллярным вискозиметром.

**Результаты и обсуждение.** На рис. 2 и в табл. 1 приведены результаты анализа спектров динамического светорассеяния для растворов САЧ в буферных растворах с различными значениями pH. При физиологическом значении pH 7,4 на диаграмме присутствует только один пик (рис. 1, кривая 2), соответствующий диффузии глобулы белка с эффективным диаметром 59—62 Å в буферном растворе. При слабощелочном pH 8,0 также регистрируется только один пик, но эффективный диаметр возрастает до 72—81 Å (рис. 1, кривая 1). При смещениях в кислую сторону (pH 6,4 и 5,4) размеры глобулы вновь повышаются до 68—80 Å. Однако при этом на диаграмме появляется допол-

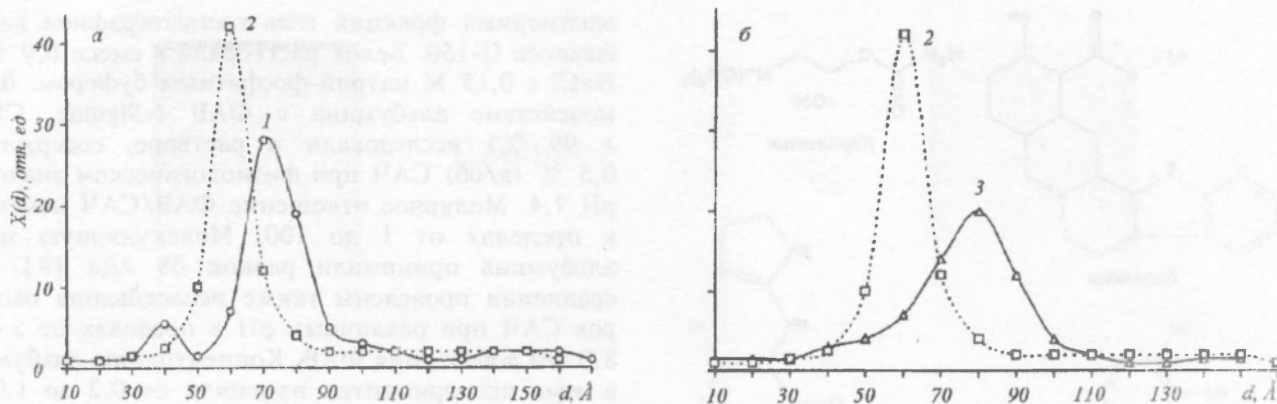


Рис. 3. Нормированные функции распределения  $X(d)$  рассеивателей по размерам для растворов карбахолина/САЧ (а) и теофиллин/САЧ (б) с молярным отношением 1 (1) и САЧ без добавок (2) в буфере с рН 7,4 при 298 К и концентрации САЧ 0,5 %

Таблица 1  
Стоксовский диаметр (Å) глобулы САЧ при различных концентрациях белка и значениях рН

Концентрация САЧ, % (в/об)	рН 5,4	рН 6,4	рН 7,4	рН 8,0
0,1	80±2	74±3	62±1	81±1
0,5	76±1	69±2	61±1	75±2
1,0	74±1	68±2	59±2	73±1
2,0	74±1	68±2	62±1	72±2

нигельный пик (рис. 1, кривые 3, 4), отвечающий диффузии частиц с эффективным гидродинамическим диаметром 32—40 Å. Это согласуется с размерами субдоменов САЧ, вычисленными рентгеновскими методами [10, 11]. Таким образом, дополнительный пик может быть отнесен за счет рассеяния света на субдоменах альбумина. Заметной зависимости размеров глобулы от концентрации белка в исследованном диапазоне не обнаружено (табл. 1).

Дальнейшие исследования с лекарственными веществами проводили, как уже отмечалось, только в условиях, наиболее близких к физиологическим: рН 7,4, концентрация белка 0,5 % (в/об). Полученные данные приведены в табл. 2.

При введении в систему пропранолола, клонидина и карбахолина отмечены структурные изменения молекулы САЧ, аналогичные тем, что происходят при закислении среды: наблюдается увеличение размеров глобулы от 61 до 73—83 Å и

появление пика, соответствующего размерам субдоменов. Как пример на рис. 3, а, представлена нормированная диаграмма распределения по размерам рассеивателей в растворе САЧ с карбахолином.

При взаимодействии с изадрином, исхимбином и теофиллином также наблюдается увеличение размеров глобулы альбумина до 72—82 Å. Однако пика субдоменов при этом не возникает. Это позволяет считать, что структурные изменения, вызванные веществами этой группы, близки к слабощелочным перестройкам САЧ. На рис. 3, б, приведена нормированная диаграмма распределения по размерам рассеивателей в растворе САЧ с теофиллином.

Во всех случаях основные структурные перестройки возникают уже при молярном отношении ФАВ/САЧ, равном 1, а при дальнейшем увеличении данного соотношения плавно нарастают. В качестве примеров на рис. 4 приведены зависимости размеров глобулы белка от молярных соотношений ФАВ/САЧ для пропранолола и иохимбина.

Выявленные конформационные модификации САЧ не могут быть обусловлены изменениями рН в результате добавления ФАВ, учитывая высокую емкость используемой буферной системы. Это подтверждают и измерения рН образцов, содержащих исследуемые ФАВ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при условиях, близких к физиологическим (рН 7,4), молекула САЧ наиболее компактна. При этих условиях третичная структура белка характеризуется глобулой минимального размера (59—62 Å). Умеренные отклонения рН от физиологических значений в ту или иную сторону ведут к увеличению размеров глобулы САЧ. Это подтверждает предположения Фостера [9] об изменениях

Таблица 2

Характеристики диаграмм распределения диаметров рассеивателей в растворе САЧ при взаимодействии с исследуемыми ФАВ

Исследуемое вещество	Диапазон от 0 до 50 Å		Диапазон от 50 до 150 Å	
	Положение максимума, Å	Площадь под кривой, %	Положение максимума, Å	Площадь под кривой, %
Контроль (без вещества)	—	5,2	61	94,8
Пропранолол	32	11,1	80	88,9
Клонидин	36	14,4	83	85,6
Карбахолин	35	15,5	79	84,5
Изадрин	—	4,9	82	95,1
Иохимбин	—	7,2	81	92,8
Теofilлин	—	7,6	76	92,4

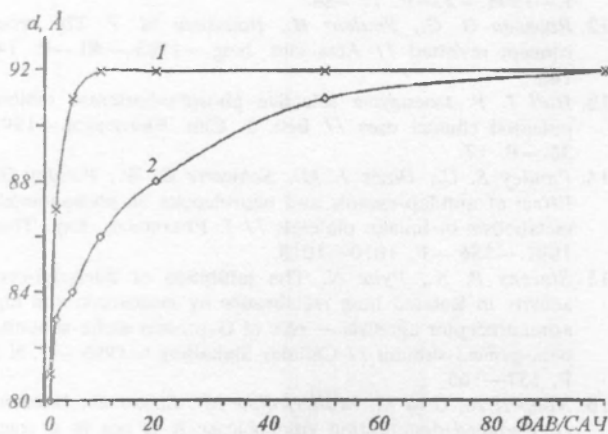


Рис. 4. Зависимость стоксовского диаметра глобулы альбумина от молярного отношения иохимбин/САЧ (1) и пропранолол/САЧ (2) при pH 7,4

структуры альбумина при так называемых А-N-B конформационных переходах. Последние возникают при смещениях pH в диапазоне 5,5—7,0—9,0 соответственно. При кислых N-A переходах, по-видимому, ослабляются взаимодействия между субдоменами, что и приводит к проявлению структуры отдельных субъединиц в спектрах динамического светорассеяния. Основные N-B переходы, судя по полученным данным, вызывают увеличение гидродинамического диаметра глобулы белка за счет других механизмов.

Взаимодействие с пропранололом, клонидином, карбахолином, как было показано, инициирует перестройки, близкие к кислым переходам, а с изад-

рином, иохимбином, теofilлином — к основным. Таким образом, можно предположить наличие качественных различий в механизмах взаимодействия с САЧ препаратов данных двух групп и некоторой общности в пределах каждой группы. С учетом упоминавшейся выше направленности действия исследуемых веществ на АдЦ клеточный сигнальный каскад можно заключить, что к первой группе относятся вещества, тормозящие АдЦ, в то время как вторую группу представляют вещества с противоположной направленностью действия на эту сигнальную систему.

Характер конформационных перестроек САЧ определяется совокупностью физико-химических свойств молекул лигандов. Поэтому результаты настоящей работы свидетельствуют в пользу того, что, несмотря на широкое многообразие структур, имеются определенные физико-химические характеристики, общие для веществ, либо активирующих, либо тормозящих АдЦ, и качественно отличающие эти классы друг от друга.

Данная работа получила поддержку грантом INTAS 96-1115.

О. I. Луйк, Ю. Н. Набока, С. М. Могилевич, Т. О. Гуца,  
Н. I. Мищенко

Вплив змін pH і фармакологічних модуляторів аденілатциклазної системи на конформацію сироваткового альбуміну людини

#### Резюме

Методом динамічного розсіяння світла визначено ідентифікаційні параметри альбуміну при різних значеннях величин pH і взаємодії з шістьма фізіологічно активними речовинами. Виявлено два типи змін конформації альбуміну, кожний з яких є притаманним для речовин з однаковою типом дії на аденілатциклазну сигнальну систему клітин.



A. I. Luik, Yu. N. Naboka, S. M. Mogilevich, T. O. Hushcha, N. I. Mishchenko

The influence of pH alteration and pharmacological modulators of adenylate cyclase system on human serum albumin conformation

#### Summary

Using the dynamic light scattering method it was found that albumin globule has the most compact configuration (Stokes diameter 59–62 Å) at physiological pH 7.4. The changes in pH, both increase to 8.0 and decrease to 5.4, resulted in the growth of globule size to 72–81 Å. At acidic shift of pH an additional peak arose in the correlation spectra caused by the light scattering on the structures with the Stokes diameters of 29–37 Å. Those conform to the sizes of the albumin subdomains. The indicated peak is not displayed at basic shift of pH. The interaction with propranolol, clonidine and carbachol, which hinder adenylate cyclase signaling system of a cell initiated structural rearrangements similar to acidic transitions. Isoproterenol, yohimbine and theophylline, which activate AdC, caused the conformational changes of HSA similar to basic transitions.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Epps D. E., Raub T. J., Kezdy F. J. A general, wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin // *Analyt. Biochem.*—1995.—227.—P. 342—350.
2. Tang P. Z., Schweizer M. P., Bradshaw K. M., Bauer W. F. B-11 nuclear-magnetic-resonance studies of the interaction of borocaptate sodium with serum albumin // *Biochem. Pharmacol.*—1995.—49, N 5.—P. 625—632.
3. Aubry A. F., Markoglou N., Mcgann A. Comparison of drug-binding interactions on human, rat and rabbit serum albumin using high-performance displacement chromatography // *Comparative Biochem. and Physiol.*—1995.—112, N 3.—P. 257—266.
4. Cheruvallath V. K., Riley C. M., Narayanan S. R., Lindenbaum K. The effect of octanoic acid on the binding of the enantiomers of ibuprofen and naproxen to human serum albumin — a chromatographic implication // *Pharmac. Res.*—1996.—13, N 1.—P. 173—178.
5. Gonzalezjimenez J., Frutos G., Cayre I. A 2nd-order polynomial to compare the fluorescence quenching of human serum albumin by xanthines // *ACH-Models Chem.*—1994.—131, N 2.—P. 193—201.
6. Mi Z. H., Burke T. Marked interspecies variations concerning the interactions of camptothecin with serum albumins a frequency domain fluorescence spectroscopic study // *Biochemistry.*—1994.—33, N 42.—P. 12540—12545.
7. Walji F., Rosen A., Hider R. C. The existence of conformationally labile (performed) drug binding sites in human serum albumin as evidenced by optical rotation measurements // *J. Pharm. Pharmacol.*—1993.—45.—P. 551—558.
8. Bree F., Urein S., Nguyen P., Tillement J. P., Steiner A., Vallat-Mollet C., Testa, Visy J., Simonyi M. Human serum albumin conformational changes as induced by tenoxicam and modified by simultaneous diazepam binding // *Ibid.*—P. 1050—1053.
9. Foster J. F. Some aspects of the structure and conformational properties of serum albumin // *Albumin structure, function and uses* / Eds V. M. Rosener, M. Oratz, M. A. Rothschild.—Oxford: Pergamon press, 1977.—327 p.
10. He X. M., Carter D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin // *Nature.*—1992.—358.—P. 209—215.
11. Olivieri J. R., Craievich A. F. The subdomain structure of human serum albumin in solution under different pH conditions studied by small angle X-ray scattering // *Eur. Biophys. J.*—1995.—2.—P. 77—84.
12. Rouseau G. G., Pouleur H., Rouseau M. F. The receptor concept revisited // *Acta clin. belg.*—1985.—40.—P. 143—148.
13. Hall I. P. Isoenzyme selective phosphodiesterase inhibitors: potential clinical uses // *Brit. J. Clin. Pharmacol.*—1993.—35.—P. 17.
14. Pandey S. C., Davis J. M., Schwertz D. W., Pandey G. N. Effect of antidepressants and neuroleptics on phosphoinositide metabolism in human platelets // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*—1991.—256.—P. 1010—1018.
15. Stevens P. A., Pyne N. The inhibition of adenylate cyclase activity in isolated lung membranes by muscarinic and alpha-adrenoreceptor agonists — role of G-protein alpha-subunit and beta-gamma-subunit // *Cellular Signalling.*—1995.—7, N 2.—P. 157—163.
16. Noppert A., Gast K., Mullerfrohe M., Zirwer D., Damaschun G. Reduced-denatured ribonuclease-A is not in a compact state // *FEBS Lett.*—1996.—380, N 1—2.—P. 179—182.
17. Harding S. E. On the hydrodynamic analysis of macromolecular conformation // *Biophys. Chem.*—1995.—55, N 1—2.—P. 69—93.

УДК 577.112.824 + 577.322.3 + 577.322.5

Поступила в редакцию 06.04.98