

Теоретическая оценка подвижности участков пептидной цепи молекулы сывороточного альбумина человека

И. Е. Щечкин, Т. О. Гуца

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
Ул. Мурманская, 1, Киев, 02660, Украина

shch406@bpci.kiev.ua

Предложен метод оценки подвижности участков пептидной цепи молекул глобулярных белков, основанный на анализе рыхлости трехмерной структуры белка и величин невалентных взаимодействий между его остатками. При этом молекула рассматривается в единственной конформации, взятой из данных рентгеноструктурного анализа. Применение предложенного метода к молекуле сывороточного альбумина человека показало, что наибольшую подвижность можно ожидать от участков, находящихся как на концах цепи (в диапазоне остатков 33–137 и 500–582), так и в ее середине (остатки 257–304). Полученные результаты могут быть использованы для выбора модели подвижности при изучении динамики альбуминов.

Ключевые слова: сывороточный альбумин человека, конформационная подвижность, пептидная цепь, рыхлость трехмерной структуры.

Введение. Сывороточный альбумин человека (САЧ) относится к глобулярным белкам, его единственная пептидная цепь состоит из 585 аминокислотных остатков. В структуре САЧ выделяют три основных домена — I, II и III — со схожей трехмерной структурой [1, 2]. Каждый из доменов, в свою очередь, можно подразделить на два субдомена, а и б, состоящих соответственно из шести и четырех α -спиралей. Спиральные кластеры субдоменов а и б соединены между собой длинной вытянутой петлей [1, 2].

Многочисленными физико-химическими исследованиями показано, что САЧ является гибким белком и легко меняет свою конформацию [1]. Существует предположение, что молекулярная гибкость САЧ в различных условиях связана, в основном, с относительным движением его доменов [2–4]. Так, измерения деполяризации флуорес-

ценции и фосфоресценции в растворах сывороточного альбумина свидетельствуют об отсутствии независимых движений больших сегментов белка во временном интервале от наносекунд до долей миллисекунд, а в субнаносекундном интервале обнаруживают лишь локальные движения аминокислотных остатков [5]. В то же время в диэлектрических [6] и акустических [7] спектрах растворов САЧ наблюдалась релаксация в микросекундном диапазоне, природа которой может быть связана с сегментным движением в макромолекуле [7].

Таким образом, несмотря на обилие данных о статической структуре САЧ, остается еще много вопросов о его динамическом поведении в растворе. Понимание природы движений и конформационных изменений в этой молекуле особенно важно при изучении связывания лигандов, так как САЧ играет центральную роль в доставке лекарств и других веществ системой кровообращения [1].

В целом детали внутренних движений белка могут быть выяснены теоретически прямым моделированием динамики и/или анализа нормальных мод с использованием эмпирических потенциалов для всех атомов. Однако такой расчет требует весьма значительных вычислительных ресурсов и становится неэффективным, а зачастую и практически неосуществимым при возрастании размеров системы.

В частности, при быстром скрининге on-line обнаружен единственный результат по расчету молекулярной динамики САЧ, к тому же ограниченный моделированием лишь одной активной зоны (Па), ответственной за связывание лигандов, в течение интервала времени 0,6 нс [8].

Поэтому в последнее время интенсивно разрабатываются упрощенные модели описания динамики белка, учитывающие только определенные составляющие его подвижности. Такие приближения позволяют исключить из рассмотрения часть несущественных для данного биохимического процесса степеней свободы и взаимодействий. В результате моделирование биохимических процессов в крупных молекулярных агрегатах может быть проведено даже при наличии умеренных вычислительных ресурсов. При этом, однако, возникает необходимость обоснованного выбора наиболее важных составляющих движения на основе методов, требующих значительно меньшего объема вычислений по сравнению с динамическим моделированием или конформационным анализом.

Примером биологически значимой составляющей динамики служит изменение конформации некоторого участка пептидной цепи при неизменности пространственной структуры остальной части молекулы. Такие движения происходят при связывании антитела с антигеном, в процессе которого активный сайт меняет свою конформацию [9—11], а также при взаимодействии субстрат—фермент, где поверхностные петли выступают в качестве «крышек» над активными сайтами [12—14]. При этом подвижность вдоль остальных степеней свободы молекулы не играет значительной роли в процессе. Существуют различные подходы к выделению подобных относительно автономных частей молекулы белка. Большинство из них использует анализ пространственной топологии [15—17], а остальные — расчеты локальных динамических свойств нативной конформации [18, 19].

В настоящей работе предложены простые мето-

ды оценки возможной конформационной подвижности непрерывных участков свернутой полипептидной цепи. Они основаны на исследовании пространственной топологии нативной конформации молекулы и предполагают анализ рыхлости трехмерной структуры, а также расчет величин невалентных взаимодействий между аминокислотными остатками. Разработанные методы применены для анализа молекулы САЧ.

Материалы и методы. В расчетах использованы атомные координаты САЧ, молекула А из кристаллической структуры, полученной в работе [2] и содержащейся в Brookhaven Protein Data Bank в виде PDB файла 1AO6. Как показывают исследования, в растворе при нейтральных рН сывороточный альбумин сохраняет основные черты конформации, наблюдаемой в кристаллах [5].

Рассмотрим некоторый участок пептидной цепи, находящийся в жестком окружении, т. е. в условиях, при которых пространственная структура остальной части молекулы может быть представлена неизменным во времени кластером атомов. Логично предположить, что подвижность этого участка зависит от следующих факторов:

во-первых, она определяется тем, насколько атомы кластера не препятствуют перемещениям участка и насколько пространственно далеко участок отстоит от остальной части молекулы, иными словами, подвижность зависит от степени занятости окружающего участка пространства атомами остальной части молекулы, то есть от рыхлости белковой глобулы в области расположения данного участка;

во-вторых, на подвижность участка влияет степень связанности его с кластером, что определяется невалентным притяжением данного участка к остальной части молекулы;

в-третьих, следует учитывать тот факт, что участок соединен с кластером валентными связями на своих концах, которые в процессе конформационных переходов не разрываются. Поэтому при прочих равных условиях более длинный участок имеет бóльшую подвижность в рамках выбранной модели, чем более короткий.

Эти три критерия, основанные на данных о нативной структуре белка, приняты за основу при определения потенциальной подвижности участка. Соответствующие расчеты проведены только для одной конформации молекулы и поэтому занимают время значительно меньшее, чем требуется для

выполнения моделирования с вариацией трехмерной структуры.

Рыхлость структуры в области заданного участка цепи оценивали по среднему значению незанятости пространства вокруг его атомов. Незанятость пространства, окружающего каждый атом, вычисляли как количество свободных мест вокруг него, в которых может свободно расположиться зондирующая сфера заданного радиуса, касательная к ван-дер-ваальсовой сфере атома. Для этого использовали алгоритм [20] расчета площади поверхности молекулы, доступной растворителю.

Связанность участка цепи с кластером оценивали по величине энергии его невалентного взаимодействия с кластером, усредненной по всем атомам участка. Взаимодействие между атомами участка и кластером вычисляли в рамках метода атом-атомных потенциалов с силовым полем Шераги *ESEPP/2* [21—24]. Поле Шераги предназначено для моделирования полипептидов с замороженными длинами связей и валентными углами, поэтому его целесообразно использовать для оценки межатомных взаимодействий в единственной конформации молекулы.

Вычисления проводили для всех возможных участков пептидной цепи длиной от 5 до 40 остатков при всех возможных вариантах расположения на цепи участка данной длины. Из всего множества участков отбирали те, которые имели наилучшие оценочные характеристики. При исследовании рыхлости роль такой характеристики играла степень незанятости окружающего участок пространства, и лучшими считались наибольшие значения (выше некоторого порогового значения). При расчете связанности в качестве оценочного параметра использовали энергию невалентного взаимодействия участка с остальной частью молекулы, а лучшими считались наименьшие значения энергии (ниже некоторого порогового значения).

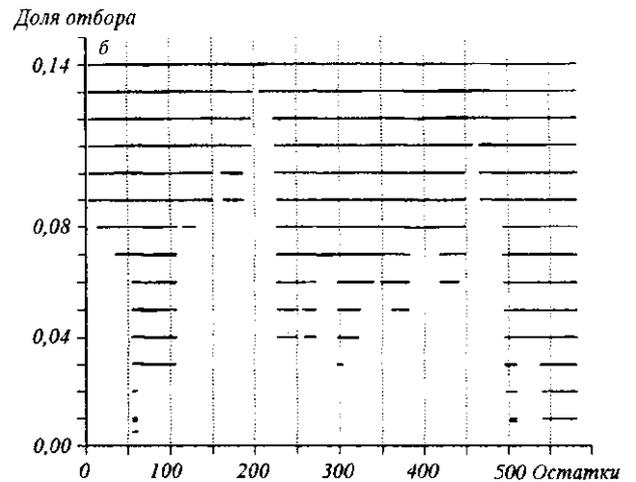
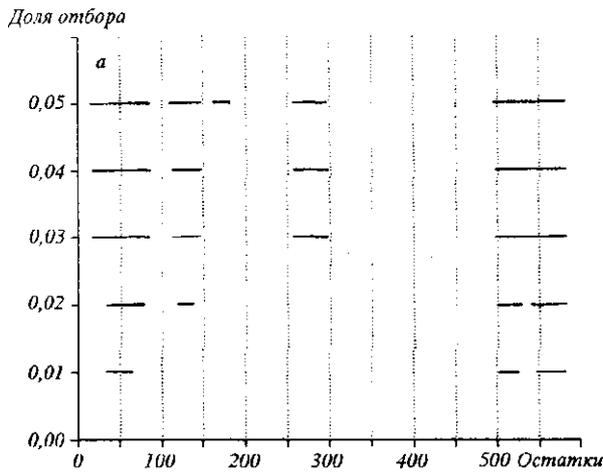
Проводя отбор, мы использовали относительные пороговые значения t_{rel} в виде безразмерной доли всего диапазона значений, полученных в результате расчетов для каждой из рассматриваемых характеристик. Абсолютное значение порога отбора t_{abs} при исследовании рыхлости вычисляли по формуле $t_{abs} = x_2 - t_{rel}(x_2 - x_1)$, а при исследовании невалентных взаимодействий — по формуле $t_{abs} = x_1 + t_{rel}(x_2 - x_1)$, где $x_1 - x_2$ — границы диапазона значений рассматриваемой характеристики. Отбор проводили для разных величин доли отбора в

эффективном ее диапазоне, т. е. начиная со значения, для которого отобранных остатков очень мало, и кончая значением, при котором порог отбора преодолевает почти вся белковая цепь. Выбранные таким образом участки объединяли в один в том случае, если они пересекались. После этого соответствующие оценочные характеристики для объединенных участков вычисляли заново.

Численное моделирование производили при помощи программ, входящих в состав программного комплекса *FlexiChain*, разработанного в лаборатории структуры и динамики биомолекул ИБОНХ НАН Украины. Расчеты осуществляли на кластере Вычислительного центра Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, созданного при поддержке компании Intel.

Результаты и обсуждение. Расчеты незанятости окрестности участков САЧ проводили при двух размерах зондирующей сферы. В первом случае радиус сферы был выбран равным радиусу молекулы воды — 1,4 Å, а во втором — был вдвое большим (2,8 Å). При использовании зондирующей сферы с радиусом 1,4 Å почти все атомы белка оказались одинаково доступными для ее размещения, поэтому диапазон значений количества свободных направлений вокруг участка получился весьма узким и малоинформативным. При зондировании сферой с радиусом 2,8 Å этот диапазон значительно расширился и картина стала рельефнее. Здесь следует отметить, что при чрезмерном увеличении размера зондирующей сферы она будет располагаться только возле поверхностных атомов белка. Такое исследование скорее дает информацию о том, лежит ли рассматриваемый участок на поверхности глобулы, чем о локальной ее рыхлости в окрестности данного участка.

Результаты зондирования рыхлости САЧ для сферы 2,8 Å отображены на рисунке, а. Общая картина такова: в начале и в конце белковой цепи структура глобулы наиболее рыхла, здесь окрестности участков цепей свободны даже при минимальном значении доли отбора, в то же время в средней части цепи свободные участки появляются только при более мягких порогах. Наибольшая рыхлость глобулы отмечается вокруг участка, содержащего две терминальные спирали домена III. Этот результат хорошо согласуется с рентгеноструктурными данными, свидетельствующими о высоком значении температурного фактора для указанных спиралей, а также об изменении их конформации при



Наиболее доступные (а) и наименее связанные (б) участки пептидной цепи САЧ для различных значений доли отбора

образовании комплекса САЧ с жирной кислотой [2, 3].

Данные расчета степени связанности участков САЧ по энергии взаимодействия участка с остальной частью глобулы отображены на рисунке, б. При отборе участков цепи, имеющих наименьшее притяжение к остальной части молекулы, эффективным оказался диапазон значений доли отбора от 0,01 до 0,06. Так же, как и при исследовании рыхлости, наиболее жесткому критерию по степени слабости связанности удовлетворяют участки, расположенные в начале и в конце цепи. При среднем значении доли отбора 0,03 появляется слабосвязанный участок в центре — 298—304, он пересекается с участком 257—297, квалифицированным как свободный для среднего значения доли отбора при зондировании сферой с радиусом 2,8 Å.

Полученные качественные результаты показали, что сильная связь участка с остальной частью молекулы осуществляется скорее за счет нескольких сильных невалентных взаимодействий, чем вследствие накопления большого числа связей средней силы. Поэтому среди наиболее связанных присутствуют только цепи минимальной длины, содержащие пять остатков. Это хорошо видно при визуальном просмотре невалентных взаимодействий в системе отображения, встроенной в программный комплекс *FlexiChain*.

Выводы. Разработан теоретический метод оценки динамических возможностей отдельных фрагментов пептидной цепи белковой молекулы на основе рентгеновских данных о его трехмерной

структуре. Расчеты, проведенные для молекулы САЧ, показали, что его глобула имеет различную степень рыхлости трехмерной структуры в окрестности разных участков ее пептидной цепи, а также неодинаковую степень связанности отдельных участков цепи с остальной частью молекулы, что свидетельствует о различной потенциальной подвижности этих участков.

По результатам анализа рыхлости окружения, наиболее потенциально подвижными представляются терминальные области: в начале цепи — это спирали 3, 3—4, 4 субдомена Ia (остатки 33—78), спирали 1, 2 субдомена Ib (остатки 118—137); в конце цепи — поворот между субдоменами а—b домена III, спирали 1, 2 субдомена IIIb (остатки 500—528), а также спирали 3, 4 субдомена IIIb (остатки 541—582).

При более мягком критерии отбора проявился свободный отрезок в середине цепи — спирали 4, 5, 6 субдомена IIa (остатки 257—297) и поворот между субдоменами IIa и IIb. Обозначения элементов вторичной структуры, входящих в участок, соответствуют работе [2].

С точки зрения связанности с глобулой силами невалентного притяжения, наибольшая потенциальная подвижность ожидается у спиралей 3, 4, 5 субдомена Ia (остатки 55—105), особенно в области поворота между спиралью 3 и 4 (остатки 56—60), а также спиралей 3, 4 субдомена IIIb (остатки 540—582). Несколько худший результат продемонстрировала петля IIa—b в середине цепи белка (остатки 298—304).

Прослеживается корреляция между расположением на цепи наиболее свободных в смысле окружения участков и участков с наименьшей связанностью. Выделенные по обоим указанным признакам петля между субдоменами IIa и IIb и спирали 3, 4 субдомена IIIb соответствуют также участкам с наиболее высокими значениями рентгеновских температурных факторов. Полученные результаты могут быть использованы для выбора модели подвижности при проведении расчетов динамики альбумина.

Авторы благодарны сотрудникам Вычислительного центра Киевского национального университета имени Тараса Шевченко за предоставленные вычислительные ресурсы.

I. E. Shchekhin, T. O. Hushcha

Theoretical evaluation of the peptide chain segmental mobility in the molecule of human serum albumin

Summary

The method for evaluation of mobility of the peptide chain fragments in globular proteins is proposed. The method is based on the analysis of both the protein 3D structure friability and the values of nonbonded interactions between protein chain residues. The analysis is performed for a single protein conformation obtained from X-ray structural data. Application of the proposed method to the molecule of human serum albumin has shown that the best mobility may be expected for the terminal chain segments (residues 33-137 and 500-582), as well as for the segments located in the middle of the chain (residues 257-304). The obtained results may be used for selection of mobility model in the studies of albumins dynamics.

Key words: human serum albumin, conformational mobility, peptide chain, 3D structure friability.

I. E. Щечкін, Т. О. Гуца

Теоретична оцінка рухливості ділянок пептидного ланцюга молекули сироваткового альбуміну людини

Резюме

Запропоновано метод оцінки рухливості ділянок пептидного ланцюга молекул глобулярних білків, який ґрунтується на аналізі пухкості тривимірної структури білка та величин невалентних взаємодій між його залишками. При цьому молекула розглядається в єдиній конформації, взятій із даних рентгеноструктурного аналізу. Застосування запропонованого методу до молекули сироваткового альбуміну людини показало, що найбільшу рухливість можна очікувати як для ділянок, розташованих на кінцях ланцюга (в діапазоні залишків 33-137 і 500-582,) так і в його середині (залишки 257-304). Отримані результати можуть бути використані для вибору моделі рухливості при вивченні динаміки альбумінів.

Ключові слова: сироватковий альбумін людини, конформаційна рухливість, пептидний ланцюг, пухкість тривимірної структури.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. He X. M., Carter D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin // *Nature*.—1992.—358.—P. 209—215.
2. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution // *Prot. Eng.*—1999.—12.—P. 439—446.
3. Curry S., Mandelkow H., Brick P., Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acids reveals an assymmetric distribution of binding sites // *Nat. Struct. Biol.*—1998.—5.—P. 827—835.
4. 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.—24.—P. 77—84.
5. Ferrer M. L., Duchowicz R., Carraso B., Torre J. G., Acuna A. U. The conformation of serum albumin in solution: A combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study // *Biophys. J.*—2001.—80.—P. 2422—2430.
6. Fukuzaki M., Miura N., Shinyashiki N., Kurita D., Shioya S., Haida M., Mashimo S. Comparison of water relaxation time in serum albumin solution using nuclear magnetic resonance and time domain reflectometry // *J. Phys. Chem.*—1995.—99.—P. 431—435.
7. Hushcha T., Kaatze U., Peytcheva A. Dynamics of human serum albumin studied by acoustic relaxation spectroscopy // *Biopolymers*.—2004.—74.—P. 32—36.
8. Diaz N., Suarez D., Sordo T. L., Merz K. M. Molecular dynamics study of the IIA binding site in human serum albumin: influence of the protonation state of Lys195 and Lys199 // *J. Med. Chem.*—2001.—44.—P. 250—260.
9. Getzoff E. D., Geysen H. M., Rodda S. J., Alexander H., Tainer J. A., Lerner R. A. Mechanisms of antibody binding to a protein // *Science*.—1992.—235.—P. 1191—1196.
10. Rini J. M., Schulze-Gahmen U., Wilson I. A. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition // *Science*.—1992.—255.—P. 959—965.
11. Constantine K. L., Friedrichs M. S., Wittekind M., Jamil H., Chu C.-H., Parker R. A., Goldfarb B., Muller L., Farmer I. I. T. Backbone and side chain dynamics of uncomplexed human adipocyte and muscle fatty acid-binding proteins // *Biochemistry*.—1998.—37.—P. 7965—7980.
12. Nicholson L. K., Yamazaki T., Torchia D. A., Grzesiek S., Bax A., Stahl S. J., Kaufman J. D., Wingfield P. T., Lam P. Y. S., Jadhav P. K., Hodge C. N., Domaille P. J. Chang C-H flexibility and function in HIV-1 protease // *Struct. Biol.*—1995.—2.—P. 274—280.
13. Collins J. R., Burt S. K., Erickson J. W. Flap opening in HIV-1 protease simulated by «activated» molecular dynamics // *Struct. Biol.*—1995.—2.—P. 334—338.
14. Wagner G. The importance of being floppy // *Struct. Biol.*—1995.—2.—P. 255—257.
15. Ancelmi C., Bocchinfuso G., Scipioni A., De Santis P. Identification of protein domains on topological basis // *Biopolymers*.—2001.—58.—P. 218—229.
16. Fischer K. F., Marqusee S. A rapid test for identification of autonomously folding units in proteins // *J. Mol. Biol.*—2000.—302.—P. 701—712.
17. Wodak S. J., Janin J. Location of structural domains in protein // *Biochemistry*.—1981.—N 20.—P. 6544—6552.
18. Kundu S., Sorensen D. C., Philips G. N. Automatic domain decomposition of proteins by a gaussian network model // *Proteins*.—2004.—57.—P. 725—733.

19. *Yesylevskyy S. O., Kharkyanen V. N., Demchenko A. P.* Hierarchical clustering of the correlation patterns: new method of domain identification in proteins // *Biophys. Chem.*—2006.—119.—P. 84—93.
20. *Ooi T., Oobatake M., Nemethy G., Scheraga H. A.* Accessible surface areas as measure of the thermodynamic parameters of hydration of peptides // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84.—P. 3086—3090.
21. *Momany F. A., Carruthers L. M., Scheraga H. A.* Intermolecular potential from crystal data // *J. Phys. Chem.*—1974.—78.—P. 1621—1630.
22. *Momany F. A., McGuire R. F., Burgess A. W., Scheraga H. A.* Energy parameters in polypeptides. 7. Geometric parameters, partial charges, non-bonded interactions, hydrogen bond interactions and intrinsic torsional potentials for naturally occurring amino acids // *J. Phys. Chem.*—1975.—79.—P. 2361—2381.
23. *Nemethy G., Pottle M. S., Scheraga H. A.* Energy parameters in polypeptides. 9. Updating of geometrical parameters, non-bonding interactions and hydrogen bonding interactions for naturally occurring amino acids // *J. Phys. Chem.*—1983.—87.—P. 1883—1887.
24. *Sippl M. J., Nemethy G., Scheraga H. A.* Intermolecular potentials for crystal data. 6. Determination of empirical potentials for O-H-O=C. Hydrogen bonds for packing configurations // *J. Phys. Chem.*—1984.—88.—P. 6231—6633.

УДК 577.112.824

Поступила в редакцию 12.04.05