

© Е. М. Остоловский, А. Д. Боцянский, С. Н. Борисенко,
Н. В. Толкачева, 1990

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА

С помощью комплекса физико-химических методов (ИК- и ЯМР-спектроскопия, круговой дихроизм и др.) в работе установлено, что молекула сывороточного альбумина человека представляет собой весьма компактную глобулу со значительным вкладом доли упорядоченных и неупорядоченных структур.

Введение. Известно, что сывороточный альбумин является простым глобулярным белком с единственной полипептидной цепью, состоящей из 585 аминокислотных остатков с молекулярной массой 66 438 [1, 2]. Отмеченная регулярность цис-цис-последовательности послужила причиной предположения того, что в основе молекулярной организации альбумина лежит повторяющаяся структура из петель, составляющих домены [3, 4].

Последние данные о полной нуклеотидной последовательности мРНК сывороточного альбумина человека подтвердили и уточнили повторяющуюся гомологию в доменной структуре альбумина [5]. Браун [6] предложил трехдоменную ковалентную структуру альбумина быка и человека, состоящую из субдоменных гомологических участков. Позже данные о доменной организации альбумина были подтверждены экспериментально [7], хотя и описаны четыре его кристаллические формы, существенно различающиеся между собой, что, скорее всего, связано с необычайно сложной гетерогенностью этого белка [8].

Несмотря на вышеизложенное, вопрос о молекулярной структурной организации молекулы альбумина еще не решен окончательно. Поэтому в настоящей работе с помощью ряда современных физико-химических методов были продолжены исследования в этом направлении, позволяющие расширить и дополнить уже существующие представления об этом биополимере.

Материалы и методы. Мономерные, иммунохимически чистые препараты альбумина (ЧСА) выделяли препаративным электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) [9].

ИК-спектры поглощения лиофилизированного препарата записывали в области 4 000—700 см⁻¹ на спектрофотометре ИКС-22 в прессовках с бромистым калием в соотношении белок : бромистый калий 1 : 100 [10].

Вторичную структуру свежeweделенных препаратов ЧСА изучали методами дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД) с помощью спектрополяриметра «Perkin-Elmer 241-МС» (Швеция) и дихрографа «Dichrograph III» фирмы «Joben Yvon» (Франция). Содержание упорядоченных структур рассчитывали по расширенному уравнению Моффита по спектрам КД [11, 12]. Температурно-пертурбационные дифференциальные спектры записывали с помощью двухлучевого регистрирующего спектрофотометра «Specord UV-VIS» (ГДР) в области длин волн 240—340 нм. Расчет пертурбируемых остатков тирозина проводили по методу Демченко и Зимы [13]. Расположение α -спиральных участков рассчитывали по общепринятому методу предсказания вторичной структуры [14].

Солюбилизацию бензола препаратами альбумина изучали рефрактометрическим методом [15]. Определяли общий объем гидрофобных полостей и солюбилизирующую способность белка, т. е. связывание углеводов белком.

Запись спектров протонного магнитного резонанса молекул Н₂О, остающихся локализованными в структуре лиофилизированного белка, осуществляли на ЯМР-спектрометре широких линий марки РЯ-2301 производства НИО «Аналитприбор» (СССР), модернизированном для проведения биологических исследований в интервале температур от -50 до +30 °С [16]. Размеры гидрофильных каналов, т. е. диаметр (\emptyset) микропор, в которых локализованы молекулы «связанной воды», рассчитывали

по данным ЯМР путем анализа гистерезисной кривой, используя уравнение Ма-зура [17].

Способность нековалентного связывания белка с люминесцирующими веществами определяли с помощью флуоресцентных зондов 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС), его магниевого производного (АНС)₂-Mg и N-фенилнафтиламина (ФНА) в кварцевой кювете на спектрофлуориметрической установке конструкции Туроверова [18]. Концентрация рабочих растворов белка во всех случаях составляла $3,7 \cdot 10^{-6}$ М, зондов — $1,7 \cdot 10^{-5}$ М. Белки и АНС растворяли в воде, ФНА — в небольших количествах спирта, после чего доводили водой до конечной концентрации этанола 0,8 %. Интенсивность свечения измеряли в максимуме полосы флуоресценции при комнатной температуре, длина волны света возбуждения для всех зондов составляла 365 нм. Микровязкость различных участков белковой молекулы исследовали методом поляризации люминесценции зондов [19].

Степень анизотропии (A) люминесцентного излучения определяли по интенсивности свечения измеренной в максимуме соответствующей полосы флуоресценции при параллельном (||) и перпендикулярном (⊥) расположении поляризаторов. Время затухания флуоресценции (τ) определяли методом фазовой флуориметрии по измеренной разности фаз (φ) между возбуждаемым и испускаемым светом по формуле $\text{tg} \varphi = \omega \tau$. Угловая частота (ω) модулированного возбуждающего света составляла 15 и 25 мГц. Полученные значения времен жизни возбужденного состояния используемых люминофоров довольно близки и составляют 9,2 нс для АНС и 7,25 нс для ФНА.

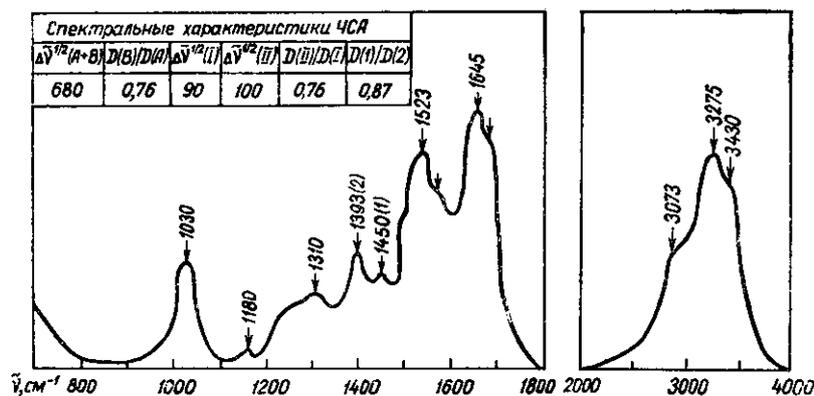
Объем 1 моля зондов (V) рассчитывали в зависимости от их плотности. Для АНС он составил $2,3 \cdot 10^{-4}$, для ФНА — $1,68 \cdot 10^{-4}$ м³/моль. Модифицируя уравнение Перрена можно видеть, что поскольку вязкость среды (η) связана с анизотропией (A), временем жизни возбужденного состояния (τ) и объемом моля зонда (V) соотношением $\eta = \frac{A}{A_0 - A} \frac{\tau RT}{V}$ (A₀ — анизотропия флуоресценции для неподвижных неориентированных молекул зондов (эти величины для АНС и ФНА соответственно составляли 0,37 и 0,27); R — универсальная газовая постоянная; T — температура по шкале Кельвина), то, определив экспериментально A и τ, по вышеприведенной формуле можно рассчитать микровязкость непосредственного окружения зондов в белке.

Для каждого вида исследований значения получены из не менее чем пяти независимых опытов. Оценку точности измерений проводили методами математической статистики. При доверительной вероятности α=0,95 методики обеспечивали погрешность не более 2 %.

Результаты и обсуждение. Анализ ИК-спектров показал наличие в них характеристических полос, свойственных белкам Амид А (~3300 см⁻¹), Амид В (~3100 см⁻¹), Амид I (~1650 см⁻¹), Амид II (~1550 см⁻¹), а также области в интервале 1450—1030 см⁻¹, захватывающей полосу Амид III [20]. Для спектров ЧСА характерно также сильное перекрытие полос поглощения Амид А и Амид В, а также диффузного поглощения вблизи 700 см⁻¹ (рисунок).

Ряд особенностей ИК-спектров альбумина сыворотки крови человека позволяет сделать заключение о том, что в его пространственной структуре отмечается неупорядоченная форма укладки полипептидной цепи (~30—35 %), о чем можно судить по частотам наиболее интенсивных компонент полос поглощения Амид А, Амид I и Амид II, а также большой полуширине суммарной полосы Амид А+Амид В [21]. В данном образце отмечена и доля α-спиральных участков, на превалирование которых в конформации ЧСА указывает относительно сильная полоса около 1660 см⁻¹ и максимум полосы Амид II [22, 23]. Положение максимума полосы Амид В свидетельствует о том, что в исследуемом белке доля β-структур весьма незначительна и это подтверждается отсутствием компоненты в контурах полосы Амид II при 1520 см⁻¹ и незначительной интенсивностью при 1630 см⁻¹ полосы Амид I [24]. О «рыхлости» структуры данного белка свидетельствует и тот факт, что в его ИК-спектрах четко выражено поглощение вблизи 3400 см⁻¹, а это служит определенным указанием на наличие в структуре данного образца свободных NH₂- и NH-групп, не участвующих в

образовании водородных связей [22, 23]. Кроме того, в исследуемом белке имеются и протонированные NH_2 -группы, которые четко идентифицируются выделяемыми компонентами при 1580 и 1500 cm^{-1} в полосе поглощения Амид II. Это также указывает на незначительное участие NH_2 -групп исследуемого белка в структурообразовании. Естественно, что структура макромолекул с меньшим числом водородных связей должна быть менее жесткой по отношению к гомологичным белкам крысы и морской свинки, где поглощение вблизи 3400 cm^{-1} выра-



ИК-спектры и спектральные характеристики ЧСА
IR spectra and spectral characteristics of HSA

жено весьма слабо [23]. Данные по ИК-спектроскопии прямо согласуются с нашими спектральными исследованиями. Как следует из данных табл. 1, молекула альбумина представляет собой довольно компактную глобулу приблизительно с 50 %-ной спиральностью, по данным ДОВ и КД, и экспонированием на ее поверхности около половины имеющих тирозилов, по данным ДТПС [25—29].

Известно, что образование глобулярных структур возможно лишь при достаточном количестве гидрофобных боковых цепей, в результате чего образуется гидрофобное ядро и гидрофильная оболочка. При этом явление солюбилизации в белковых системах представляет интерес как с точки зрения строения белка, так и в отношении изучения его функ-

Таблица 1

Спектральные характеристики молекулы ЧСА по данным ДОВ, КД и ДТПС
The spectral characteristics of the molecules HSA by DOR, CD and TPDS

Показатели ДОВ			Показатели КД		Показатели ДТПС
$-a_0$	$-b_0$	Спиральные структуры, %	O_{210}	Спиральные структуры, %	Доступность остатков тирозина, %
306 ± 5	313 ± 7	$49,8 \pm 2,6$	18000 ± 172	$48,4 \pm 0,56$	$50,2 \pm 0,32$

Примечание. $-a_0$, $-b_0$ — параметры ДОВ для расчета структур; O_{210} — удельная эллиптичность по КД-спектрам.

Таблица 2

Солюбилизация бензола сывороточным альбумином
Solubilization of benzene by serum albumin

Показатели преломления		Растворимость углеводорода в водном растворе белка, 1 мл/100 мл	Связывание углеводорода белком, моль/моль	Общий объем гидрофобных полостей, nm^3
Раствора белка	Раствора углеводорода в растворе белка			
1,33376	1,33414	0,2411	$56 \pm 0,32$	$818,0 \pm 2,5$

циональных свойств. Важная роль отводится и структуре связанной воды [15, 30]. Поскольку речь идет о геометрических объемах молекулы белка, интересно сопоставить полученные данные физическими методами с реальными объемами гидрофобных областей и количеством «связанной» воды, т. е. факторами, определяющими конформационную структуру биополимера. Солюбилизация бензола препаратами альбумина свидетельствует о том, что одна молекула ЧСА связывает 56 молей бензола и имеет общий объем гидрофобных полостей, равный 818 нм³ (табл. 2). По таким параметрам он занимает промежуточное положение между весьма компактными белками типа лизоцима (90 нм³) и довольно рыхлыми типа γ -глобулина (1337,0 нм³), при этом ЧСА довольно близко приближен к последнему.

Таким образом, согласно нашим данным, ЧСА является белком с менее жесткой, т. е. сравнительно рыхлой структурой, что обуславливается также довольно значительным объемом его гидрофобных областей.

Пространственная конфигурация белковых молекул зависит от целого ряда сложных взаимоотношений, но в итоге определяется конкурирующими между собой гидрофобно-гидрофильными взаимодействиями. Оценка соотношения эффективных гидрофобных и гидрофильных поверхностей может также служить фактором, определяющим (характеризующим) конформационную структуру образца.

С помощью ЯМР-спектроскопии проведен расчет размеров диаметра каналов, в которых находятся молекулы Н₂О. Для исследуемого образца это составило 0,24 нм, что явно недостаточно для формирования с помощью связанной Н₂О жесткой структуры белка, так как явно видно, что в такие малые объемы вряд ли может вписаться достаточное число молекул воды для образования льдоподобной структуры [30, 31]. Это также позволяет предположить, что конформационная структура ЧСА не отличается особой жесткостью.

Результаты флуоресценции позволяют анализировать свойства микроокружения люминофоров в белке. Благодаря этому можно определить, где в макромолекуле белка локализована флуоресцирующая группа. В частности, различные зонды располагаются на разной глубине белковой глобулы. В результате этого одни зонды реагируют на перестройки в области гидрофобного ядра, другие — на поверхностные перестройки, в связи с чем эти свойства можно использовать для изучения внутримолекулярной организации макромолекул. Если исходить из представлений о существовании в молекуле белка гидрофобных областей, по крайней мере, двух типов: плотного гидрофобного ядра и таких же периферийных участков, расположенных на поверхности глобулы, то наибольшим сродством к такому ядру обладал зонд ФНА. Это обусловлено его химическими особенностями и строением (табл. 3). Из анализа интенсивности флуоресценции следует, что области, заполняемые ФНА, являются «универсальными» для гомологичных белков [32].

Результаты, полученные при использовании зонда АНС, по интенсивности флуоресценции значительно ниже по сравнению с ФНА. При этом механизмы связывания АНС и локализация его в белке отличаются

Таблица 3
Интенсивность флуоресценции, анизотропия и микровязкость зон сорбции люминофоров для ЧСА
Intensity of fluorescence (F, %), anisotropy (A) and microviscosity (η) zones of sorption luminophores for HSA

Интенсивность флуоресценции (F), %			Анизотропия (A)			Микровязкость (η), Па·с		
ФНА	АНС	(АНС) ₂ -Mg	ФНА	АНС	(АНС) ₂ -Mg	ФНА	АНС	(АНС) ₂ -Mg
91	66	100	0,21	0,043	0,031	0,0368	0,0014	0,009

ся от таковых для ФНА. По всей вероятности, АНС взаимодействует, вначале ориентируясь на положительный заряд молекулы белка, и лишь затем связывается с поверхностными гидрофобными областями ЧСА, которые не входят в зону «универсального» гидрофобного ядра.

Зонд (АНС)₂-Mg диссоциирует в водном растворе на две молекулы АНС и ионы магния и позволяет рассмотреть влияние Mg²⁺ на ЧСА при концентрации АНС, равной предыдущему опыту. Оказалось, что при использовании данного зонда отмечен положительный эффект, т. е. значительное увеличение интенсивности флюоресценции, связанное, очевидно, со сродством данного препарата к ионам магния. Следует также предположить, что существует зависимость между интенсивностью флюоресценции, общим объемом гидрофобных полостей и количеством воды в препарате. Особенно это четко прослеживается с зондом АНС. При насыщении белка водой и изменении объема полостей интенсивность флюоресценции резко падала.

Величины параметров поляризации флюоресцентных зондов для АНС и ФНА различны и это отражается на микровязкости зон сорбции этих люминофоров (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что микровязкость зон сорбции ФНА существенно превосходит таковую зон локализации АНС (более чем в 20 раз).

На основании данных физико-химических методов исследования препаратов ЧСА, проведенного в настоящей работе, можно предположить определенную внутримолекулярную структурную организацию этого белка. Так, по нашим представлениям, внутри глобулы ЧСА находится плотное «универсальное» для альбуминов гидрофобное ядро, основу которого поддерживают и создают инвариабельные аминокислоты, и именно они ответственны за структурную доменную организацию. Скорее всего, спиральные участки молекулы ЧСА в основном входят в состав данного ядра. На поверхности молекулы сывороточного альбумина располагаются гидрофобные области (или участки) с минимальными показателями микровязкости. Именно эти области, по всей вероятности, могут наиболее активно участвовать в процессах связывания с самыми различными лигандами в связи с их доступностью для транспортируемых веществ.

MOLECULAR ORGANIZATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN STRUCTURE

E. M. Ostolovsky, A. D. Botsyansky, S. N. Borisenko, N. V. Tolkachova

M. V. Frunze State University, Simferopol

S u m m a r y

Physicochemical methods (IR- and NMR-spectroscopy, circular dichroism, etc.) that human serum albumin molecule is a compact globule with 50 % spiral structure and with exposition of a half of tyrozil on its surface. At the same time considerable percent of polypeptide chain with disordely packed form and with small contribution of β -structure part is observed in the molecule space structure. Theoretical calculations of α -spiral parts localization in serum albumin molecule indicate that approximately equal number of amino acids residues is found in every of three domains.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Behrens P. Q., Spiekerman A. M., Brown J. R.* Structure of human serum albumin // Fed. Proc.—1975.—34, N 5.— P. 591.
2. *Melown B., Moravek L., Kostka H.* Complete amino acid of serum albumin // FEBS Lett.—1975.—58, N 2.— P. 134—137.
3. *Geisow M. J., Beaven G. H.* Large fragments of human serum albumin // Biochem. J.—1977.—101, N 3.— P. 619—625.
4. *Brown J. R.* Structure of serum albumin: disulfide ridges // Fed. Proc.—1974.—38, N 4.— P. 33.
5. *Dugaiczuk C., Law S., Deunison O.* Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin in RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1972.—79, N 1.— P. 71—75.

6. *Brown J. R.* Structural originals of mammalian albumin // Fed. Proc.—1978.—35, N 10.—P. 2141—2144.
7. *Микрокалориметрическое* исследование доменной организации сывороточного альбумина / *Е. И. Тиктопуло, П. Л. Привалов, С. Н. Борисенко, Г. В. Троицкий* // Молекуляр. биология.—1985.—19, № 4.—С. 1072—1078.
8. *Mepherston A.* Crystallisation of protein form in polyethylene glycol // J. Biol. Chem.—1976.—252, N 9.—P. 6300—6303.
9. *Ажицкий Г. Ю., Багдасарьян С. Н.* О возможности выделения мономерного иммунохимически чистого альбумина // Лаб. дело.—1975.—66, № 1.—С. 712—714.
10. *Остоловский Е. М., Задорожный Б. А., Бочаров Л. П.* Гидрофобная структура альбумина сыворотки крови и печени кроликов разного возраста // Журн. эволюц. биохимии и физиологии.—1982.—18, № 5.—С. 522—526.
11. *Троицкий Г. В.* Новая система расчетов конформации белка по спектрополяриметрическим данным // Биоэнергетика и биол. спектроскопия.—М.: Наука, 1967.—С. 260.
12. *Chen J. H., Young J. T., Nartinez H.* Determinant ion of the secondary structures of protein by C. D. // Biochemistry.—1972.—11, N 22.—P. 4120—4131.
13. *Демченко А. П., Зима В. Л.* Ультрафиолетовая спектроскопия и структура белков.—Киев: Наук. думка, 1981.—208 с.
14. *Завьялов В. П., Троицкий Г. В.* Гипотетическая конформация иммуноглобулина G // Молекуляр. биология.—1973.—6, № 7.—С. 833—840.
15. *Измайлова В. Н., Ребиндер П. А.* Структурирование в белковых системах.—М.: Наука, 1974.—329 с.
16. *Габуда С. П., Ржавин А. Ф.* Ядерный магнитный резонанс в кристаллогидратах и гидратированных белках.—Новосибирск: Наука, 1978.—135 с.
17. *Остоловский Е. М., Мишин Е. Н., Шадрин Г. Н.* Изменение гидратационных свойств сывороточного альбумина кролика в онтогенезе // Биофизика.—1983.—28, № 5.—С. 874—875.
18. *Гусев Е. В., Туровец К. К., Розанов Ю. М.* Установка для измерения спектральных и поляризационных характеристик люминесценции // Функцион. морфология, генетика и биохимия клетки.—Л.: Наука, 1974.—С. 364—370.
19. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.—М.: Наука, 1980.—320 с.
20. *Чиргадзе Ю. Н.* Инфракрасная спектроскопия полипептидов и белков // Итоги науки и техники.—М.: ВИНТИ, 1973.—С. 9—61.—(Сер. молекуляр. биология; Т. 1).
21. *Сузи Г.* Инфракрасная спектроскопия макромолекул и модельных соединений.—М.: Мир, 1973.—345 с.
22. *Беллами Д.* Инфракрасная спектроскопия сложных молекул.—М.: Мир, 1963.—260 с.
23. *Остоловский Е. М., Афанасьев С. М., Задорожный Б. А.* Инфракрасные спектры альбумина сыворотки некоторых млекопитающих // Природ. комплексы Крыма, их оптимизация и охрана.—Симферополь, 1984.—С. 91—95.
24. *Элиот А.* Инфракрасные спектры сложных молекул.—М.: Изд-во иностр. лит., 1963.—382 с.
25. *Троицкий Г. В.* Электрофорез белков.—Харьков: Изд-во Харьк. ун-та, 1962.—323 с.
26. *Белки сыворотки крови при спортивной тренировке* / *А. М. Ефименко, Н. В. Толкачева, Е. М. Остоловский, А. В. Станевич* // Укр. биохим. журн.—1978.—50, № 6.—С. 723—726.
27. *Дальнейшее* изучение гетерогенности электрофоретической фракции альбумина при патологии / *Г. В. Троицкий, И. Ф. Кирюхин, Н. В. Толкачева, Г. Ю. Ажицкий* // Вопр. мед. химии.—1974.—20, № 1.—С. 24—31.
28. *Особенности* транспортной функции альбумина сыворотки крови при физических нагрузках / *Н. В. Толкачева, С. Н. Багдасарьян, А. М. Ефименко, Г. В. Троицкий* // Укр. биохим. журн.—1981.—53, № 4.—С. 26—29.
29. *Багдасарьян С. Н., Троицкий Г. В.* Изучение денатурации сывороточного альбумина методами ДТПС и спектрополяриметрии // Биофизика.—1979.—24, № 5.—С. 821—825.
30. *Аксенов С. И., Харчук О. А.* О состоянии воды в растворах белков и вирусов // Связан. вода в дисперсных системах.—М.: Изд-во Моск. ун-та, 1977.—Вып. 4.—С. 118—138.
31. *Остоловский Е. М., Мишин Е. Н., Щербаков В. Н.* Видовые особенности конформационной структуры альбумина сыворотки крови по данным ЯМР- и ИК-спектроскопии // Тез. докл. I Всесоюз. биофиз. съезда.—М., 1982.—Ч. 1.—С. 87—88.
32. *Остоловский Е. М., Боцянский А. Д., Задорожный Б. А.* Исследование структуры сывороточного альбумина млекопитающих методом флуоресцентных зондов // Биофизика.—1988.—33, № 2.—С. 356—358.

Симфероп. гос. ун-т им. М. В. Фрунзе

Получено 05.04.89