

УДК 577.336

ВЛИЯНИЕ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА НА КОНФОРМАЦИЮ АЛЬБУМИНА

© 2021 Э.С. Аллахвердиев^{1,2*}, Г.В. Максимов^{1,3*}, О.В. Родненков², О.Г. Лунева¹,
Г.В. Цораев¹, А.Д. Иванов³, А.И. Юсипович¹, Т.В. Мартынюк²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: elvin21128@gmail.com; gmaxsimov@mail.ru

² Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, 121552 Москва, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»», 119049 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.02.2021

После доработки 12.03.2021

Принята к публикации 22.03.2021

Связывание динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ) с альбумином изучали с помощью методов флуоресценции с временным разрешением (пикосекундная флуоресценция, ПФ) и электронного парамагнитного резонанса. Установлено, что время жизни флуоресценции бычьего сывороточного альбумина (БСА) и сывороточного альбумина человека (ЧСА) уменьшается при связывании с ДНКЖ и зависит от концентрации ДНКЖ. Кинетика изменения амплитуды ПФ БСА обусловлена наличием в молекуле белка двух остатков триптофана. Вероятно, ДНКЖ образует в домене I альбумина устойчивые комплексы с остатком цистеина (Cys34). Показано, что время жизни флуоресценции Trp, входящего в БСА, уменьшалось при совместной инкубации с ДНКЖ и глутатионом. *In vitro* исследовали действие ДНКЖ на связывание спин-меченых жирных кислот с ЧСА плазмы крови человека. ДНКЖ в плазме крови не конкурирует за места связывания жирных кислот доменов II и III альбумина. Вероятно, взаимодействие между ДНКЖ и альбумином осуществляется без изменения конформации белка, а за счёт нитрозилирования остатка цистеина в домене I.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альбумин, динитрозильный комплекс железа, ЭПР, оксид азота, пикосекундная флуоресцентная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972521050092

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что альбумин регулирует изменение онкотического давления плазмы, а также транспорт ряда низкомолекулярных молекул (например, каротиноидов) и жирных кислот [1, 2]. Способность альбумина связывать широкий спектр лигандов напрямую зависит от конформации белка, поэтому разработка новых методологий оценки конформации альбумина важна для клинического применения. Гипертензия является заболеванием с высоким фактором риска. Динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ) относится к группе препаратов, обладающих сосудорасширяющим, антиагрегационным и рядом других свойств. В состав ДНКЖ входит оксид азота, и в плазме крови комплекс переносится альбумином. Оксид азота и S-нитрозоглутатион (GS-NO) обладают гипотензивным действием на эндотелиальные клетки [3, 4]. ДНКЖ и глутатион (GSH) использовали в качестве основных соединений для синтеза нового гипотензивного препарата (коммерческое название «Охасом»), не имеющего серьёзных побочных эффектов. Способность S-нитрозотиолов (S-НТ) формировать ДНКЖ в реакции с двухвалентным железом важна для эффективного взаимодействия ДНКЖ и S-нитрозотиолов. Ионы нитрозония, входящие в состав ДНКЖ, способны к S-нитрозилированию тиолов. Это было определено за счёт окисления железа и высвобождения четырёх ионов нитрозония (NO^+). Связывание NO^+ с тиоловыми группами глутатиона инициирует синтез GS-NO [5, 6]. Альбумин плазмы крови способствует потере гипотензивного эффекта ДНКЖ, что может быть нивелировано путём модификации цистеин-тиолового остатка альбумина (рис. 1).

Принятые сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ДНКЖ – динитрозильный комплекс железа; ПФ – пикосекундная флуоресценция; ЧСА – сывороточный альбумин человека; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; GSH – глутатион; GS-NO – S-нитрозоглутатион; S-НТ – S-нитрозотиол.

* Адресат для корреспонденции.

следует альбумином. Оксид азота и S-нитрозоглутатион (GS-NO) обладают гипотензивным действием на эндотелиальные клетки [3, 4]. ДНКЖ и глутатион (GSH) использовали в качестве основных соединений для синтеза нового гипотензивного препарата (коммерческое название «Охасом»), не имеющего серьёзных побочных эффектов. Способность S-нитрозотиолов (S-НТ) формировать ДНКЖ в реакции с двухвалентным железом важна для эффективного взаимодействия ДНКЖ и S-нитрозотиолов. Ионы нитрозония, входящие в состав ДНКЖ, способны к S-нитрозилированию тиолов. Это было определено за счёт окисления железа и высвобождения четырёх ионов нитрозония (NO^+). Связывание NO^+ с тиоловыми группами глутатиона инициирует синтез GS-NO [5, 6]. Альбумин плазмы крови способствует потере гипотензивного эффекта ДНКЖ, что может быть нивелировано путём модификации цистеин-тиолового остатка альбумина (рис. 1).

Следовательно, в присутствии NO образование тиоловых радикалов из GSH или белков может способствовать формированию GS-NO

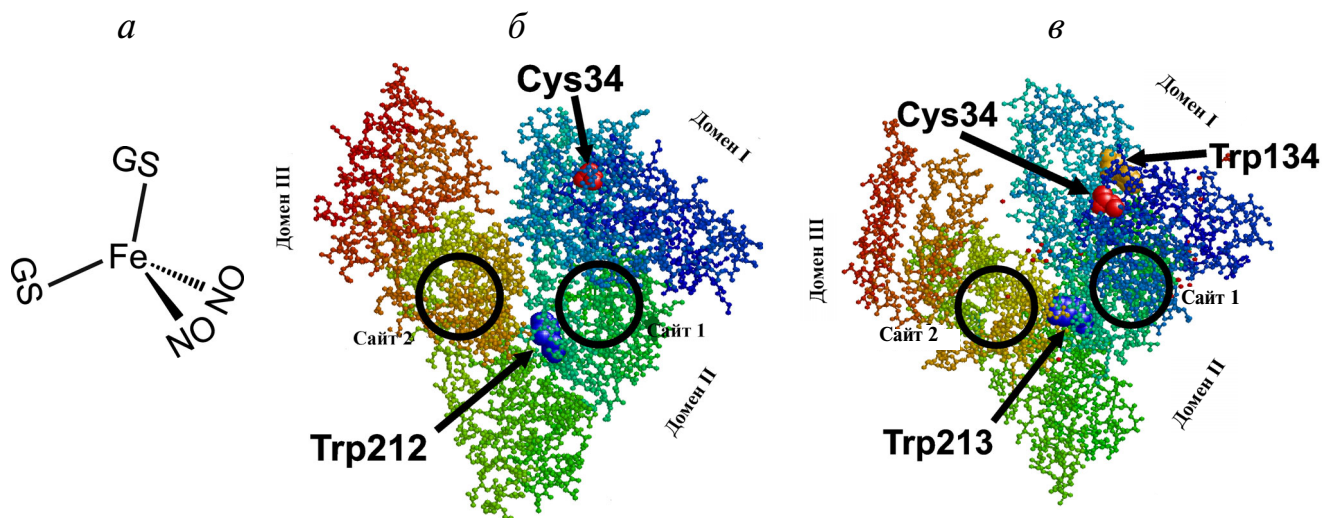


Рис. 1. Молекулярные структуры ДНКЖ (а), человеческого (б) и бычьего (в) сывороточного альбумина. а – ДНКЖ содержит атом железа, две молекулы оксида азота и тиоловый лиганд, глутатион; б – молекула сывороточного альбумина человека; в – молекула бычьего сывороточного альбумина. В альбумине обнаружены два основных сайта связывания жирных кислот и свободный остаток цистеина [3]. Координаты атомов получены из кристаллической структуры рекомбинантного сывороточного альбумина человека (PDB ID: 1UOR) и бычьего сывороточного альбумина (PDB ID: 3V03, биологическая сборка 2). Иллюстрация сделана с помощью RasMOL, версия 2.7.5.2. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>.)

или S-НТ. Динитрозильные комплексы негемового железа находятся в динамическом равновесии с S-нитрозотиолами, продуктами взаимодействия оксида азота и тиолов, хотя их время жизни намного короче. Как и динитрозильные комплексы негемового железа, S-НТ являются одной из форм поддержания стационарной концентрации NO в клетках. Наиболее стабильными среди них являются S-нитрозопротеины, так что ~95% S-НТ плазмы представлено нитрозилированным альбумином. Концентрация S-НТ в плазме на 3–4 порядка выше концентрации свободного NO; расщепление нитрозопротеинов катализируется ионами металлов с переменной валентностью, в первую очередь ионами железа. Gow et al. [7] предположили механизм образования S-НТ за счёт взаимодействия NO с тиолом (RSH) с образованием промежуточного радикала и его окислением кислородом или другим одноэлектронным акцептором (например, NAD^+). GS-NO способен медленно реагировать с тиолами с образованием дисульфида, приводящего к S-глутатиолированию [7]. В неклеточных системах некоторые тиоловые группы белков скорее могут быть S-тиолированными, чем S-НТ. Например, значительное S-нитрозирование происходит после инкубации БСА с GS-NO. В аэробной среде условием для получения GS-NO является окисление NO, а нитрозирование осуществляется либо при синтезе триоксида диазота, либо путём присоединения NO к образующемуся в ходе реакции ради-

калу глутатиона. Клинический эффект ДНКЖ-GS опосредован переносом $[\text{Fe}(\text{NO})_2]$ на тиоловые группы белков миокарда, формирующие внутриклеточные пулы ДНКЖ [8].

Молекула ДНКЖ имеет плоскую квадратную структуру с неспаренным электроном, локализованным на $d(z^2)$ -орбитали атома железа $d(7)$ (рис. 1). Результаты жидкостной хроматографии, УФ- и видимой спектроскопии, а также масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что группа NO присоединена к индолльному азоту триптофана. Вероятно, гидрофобные сайты белков или фосфолипидов мембраны, представляют собой удобные участки для образования нитрозированных соединений [9]. Например, в присутствии липопротеинов низкой плотности образование GS-NO из GSH и NO, производного Proli/NO, более эффективно [10].

Как правило, исследования изменений конформации альбумина проводятся в модельных растворах *in vitro*, а данные *in vivo* практически отсутствуют. В сравнении с другими методами флуоресцентная спектроскопия широко используется как чувствительный метод исследования изменений конформации белка. Собственная флуоресценция остатков триптофана в белке является подходящим маркером для наблюдения за изменениями в молекулярной структуре благодаря высокой разрешающей способности метода и анализу ряда фотофизических параметров Trp (время жизни и квантовый выход флуоресценции, положение макси-

му спектра флуоресценции) по сравнению с его локальным окружением в молекуле белка [11]. В тканях, когда флуоресценция Trp не позволяла выявить изменения в конформации молекулы белка, используют спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) плазмы крови человека [12, 13].

В данной работе исследовали молекулярный механизм действия ДНКЖ, учитывая как его прямое действие, так и косвенное влияние производных оксида азота (S-нитрозотиолов) на молекулу альбумина. Целью данной работы было изучение влияния ДНКЖ и S-нитрозоглутатиона на сайты связывания ДНКЖ в альбумине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В настоящей работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА, без жирных кислот, «Sigma-Aldrich», США), сывороточный альбумин человека (ЧСА, без жирных кислот, «Sigma-Aldrich»), додецилсульфат натрия (SDS, «Sigma-Aldrich») и Tris-(гидроксиметил)-аминометан (Tris, «Диа-М», Россия) без предварительной очистки. Все растворы готовили на бидистиллированной воде. Буфер Tris-HCl (0,1 M) использовали для поддержания pH $7,40 \pm 0,05$. Все измерения проводили при комнатной температуре (25 ± 1 °C) без температурной стабилизации. В качестве донора оксида азота (источник динитрозильного комплекса железа) использовали препарат Охасом® (Российский медицинский исследовательский центр кардиологии, Россия) [6]. Охасом® растворяли в физиологическом растворе и добавляли к плазме крови человека или раствору альбумина непосредственно перед экспериментом [14].

Выделение плазмы крови. В данном исследовании были использованы образцы крови 16 пациентов мужского пола (35–73 года) с систолическим артериальным давлением менее 120 мм рт. ст. и диастолическим артериальным давлением менее 84 мм рт. ст. В исследовании ни один из пациентов никогда не проходил антигипертензивную терапию. Забор крови производили в Российском национальном медицинском исследовательском центре кардиологии. Плазму получали из образцов цельной крови тройным центрифугированием в цитратном буфере [15] при 1500 g в течение 10 мин при 4 °C. Плазму крови хранили при –80 °C и использовали в течение двух часов после разморозки.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса со спиновыми метками. Данный метод основан на измерении параметров связывания

альбумина со спин-мечеными жирными кислотами. В качестве спиновой метки использовали коммерческую 16-доксил-стеариновую кислоту («Sigma-Aldrich», Германия). Это соединение характеризуется высокой константой связывания альбумина со стеариновой кислотой ($6,9 \times 10^7$ моль/литр), что приводит к $> 99,9\%$ связывания спиновой метки с альбумином при концентрации 0,58; 0,7 и 0,77 mM. Плазму получали центрифугированием (3000 g) в течение 10 мин и хранили при –20 °C. Плазму крови инкубировали с Охасом® (ДНКЖ – 0,1 и 2 мкМ, в течение 20 и 120 мин) и инкубировали с 16-доксил-стеариновой кислотой в концентрации 0,58; 0,7 и 0,77 mM в течение 10 мин. Образцы плазмы помещали в стеклянный капилляр (диаметр 1 мм) и регистрировали ЭПР-спектры с помощью прибора MMS 01-08 ESR-Analyzer (ESR-Analyzer/MMS, «Medin Medical Innovation GmbH», Германия) [15]. Полученные ЭПР-спектры были разложены на компоненты, соответствующие связыванию метки с сайтами альбумина высокого и низкого сродства, а также с мицеллами, и несвязанную метку. Значения параметров C1 и C2 означают процент молекул метки, связанных с сайтами связывания альбумина I и II соответственно.

УФ-поглощение. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре USB 2000, оснащённом дейтериево-вольфрамовой галогенной лампой DT-MINI-2-GS («Ocean Optics», США), излучающей в диапазоне длин волн 250–500 нм при комнатной температуре.

Стационарная флуоресценция. Спектры флуоресценции растворов БСА (0,14 мг/мл) регистрировали в кварцевых 10-мм кюветах при комнатной температуре на спектрофлуориметре Fluorolog-3 («Horiba Jobin Yvon», США). Флуоресценцию аминокислот возбуждали лазером с длиной волны 280 нм (совместное возбуждение флуоресценции Tyr и Trp) и регистрировали в диапазоне длин волн 300–500 нм, ширина полосы обеих щелей составляла 2 нм.

Флуоресценция с временным разрешением (пикосекундная флуоресценция). Снижение амплитуды флуоресценции регистрировали с помощью системы однофотонного счёта SimpleTau 140 с пикосекундным разрешением («BeckerHickl», Германия). Измерение снижения флуоресценции плазмы или белка крови (100 мкл) проводили в термостатированной кювете (длина оптического пути 2 мм). Возбуждение осуществлялось импульсным светоизлучающим диодом с длиной волны 280 нм («Edinburgh Instruments», Великобритания), генерирующим импульсы длительностью 700 пс FWHM (полная ширина на уровне величины

амплитуды) средней мощности 0,8 мкВт с частотой 10 МГц. Для получения оптимального сигнала для процедуры его деконволюции сбор данных производился в течение 30 с для всех измерений. Зависимость снижения амплитуды флуоресценции Trp регистрировали в канале, соответствующем длине волны флуоресценции (~ 355 нм), что близко к максимуму излучения флуоресценции нативного белка. Предполагалось, что возможный вклад флуоресценции Tug на этой длине волны мал. Минимальное значение остатков затухания флуоресценции Trp было достигнуто путём аппроксимации с использованием суммы двух экспоненциальных функций затухания.

Кинетику затухания флуоресценции аппроксимировали с помощью программы SPC Image. Параметры τ_1 , τ_2 , a_1 , a_2 были рассчитаны с помощью следующего уравнения:

$$I = a_1 \cdot (\tau_1/\tau) + a_2 \cdot (\tau_2/\tau), \quad (1)$$

где τ_1 и τ_2 обозначают время жизни флуоресценции изоформ Trp, а параметры a_1 и a_2 соответствуют доле Trp в соответствующей таутомерной форме [16]. Для анализа спектров Trp использовали среднее время жизни флуоресценции, рассчитанное следующим образом:

$$\tau_m = (a_1 \cdot \tau_1 + a_2 \cdot \tau_2)/a_1 + a_2. \quad (2)$$

Расчет радиуса Фёрстера. Фёрстеровский резонансный перенос энергии (FRET) происходит, когда расстояние между донором (флуорофором) и акцептором находится в пределах 10 нм [17, 18]. Этот метод применяется при исследовании собственной флуоресценции белка, преимущественно Trp ($\lambda_{ex} \approx 280$ нм, $\lambda_{em} \approx 350$ нм). Известно, что длины волны и интенсивности флуоресценции триптофана зависят от молекулярного окружения, и это используется для изучения конформационных изменений белка. Используемый нами метод оценки резонансного переноса энергии Фёрстера за счёт изменений флуоресценции Trp сывороточного альбумина свидетельствует о том, что альбумин человека имеет один триптофан в домене II, тогда как бычий альбумин имеет дополнительный Trp134 в домене I. Согласно теории диполь-дипольной передачи энергии Фёрстера, эффективность передачи энергии можно использовать для оценки расстояния (R) между ДНКЖ и Trp. R_0 — это критическое расстояние, необходимое для передачи 50% энергии, которое можно рассчитать следующим образом:

$$R_0 = 0,2108 \times (\kappa^2 n^{-4} \Phi_D J)^{1/4}, \quad (3)$$

где κ — фактор ориентации диполя, Φ_D — квантовый выход донора флуоресценции, n — показатель преломления среды, J — интеграл перекрытия спектра флуоресценции донора со спектром поглощения акцептора. Спектральный анализ проводился при использовании программы Photochemcad 2.1.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного пакета Origin, версия 2018 («Origin Lab Corporation», США). Все данные характеризовались нормальным распределением, что было показано с помощью теста Шапиро—Уилка на нормальность, $p < 0,05$. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. В данных ЭПР-спектроскопии статистическая значимость различий для C1 и C2 была рассчитана с использованием однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями ANOVA, $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с целью работы исследовали возможность связывания ДНКЖ и GS-NO в молекуле альбумина с помощью двух типов флуоресценции — стационарной и с ПФ. Среди флуорофоров альбумина (триптофан, тирозин и фенилаланин) чаще всего используются фотофизические параметры триптофана, поскольку осуществляется селективное возбуждение при длине волны 280 нм, а её квантовый выход максимален [19]. Гипотеза о взаимодействии альбумина и ДНКЖ через Cys34 была проверена путём сравнения времени жизни флуоресценции триптофана БСА и ЧСА при инкубации с различными концентрациями ДНКЖ (рис. 2).

Домен II ЧСА содержит единственный остаток триптофана (Trp212). Вполне вероятно, что два высокоаффинных сайта связывания ДНКЖ локализованы рядом с этим а.о.; таким образом, изменения флуоресценции Trp можно использовать как индикатор изменения связывания ДНКЖ с этими сайтами. В то же время в состав ЧСА входит 18 а.о. Tug, в БСА — 20 а.о. Tug. Таким образом, распределение Tug в структуре альбумина более равномерное по сравнению с распределением Trp. Вероятно, помимо конформационных изменений, связывание ДНКЖ с белком может приводить к снижению эффективности затухания флуоресценции Tug из-за возможного увеличения расстояния между некоторыми остатками тирозина и триптофана [20].

В этих экспериментах сумму двух экспоненциальных функций затухания использовали для аппроксимации кривых затухания флуоресценции Trp, соответствующих максимуму флуорес-

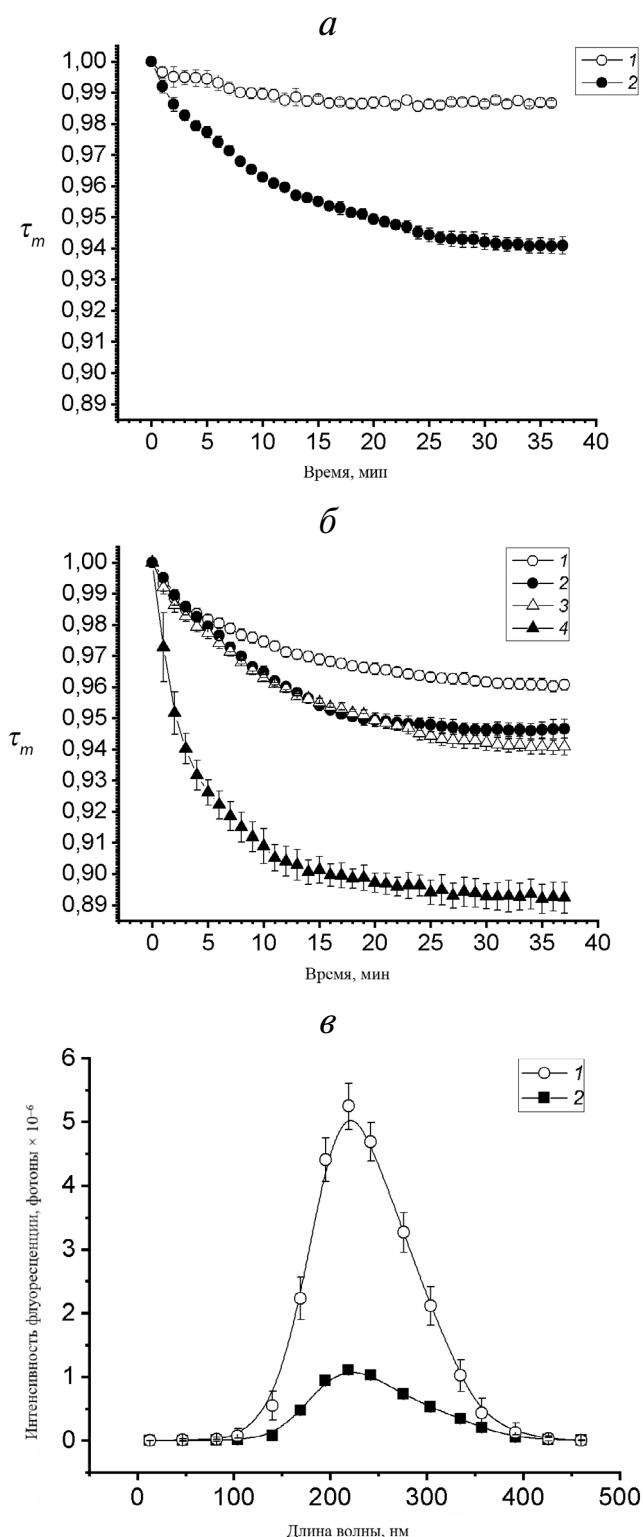


Рис. 2. а – Кинетика константы времени жизни флуоресценции (τ_m) в ЧСА (1) и БСА (2) при действии 1 мкМ ДНКЖ; б – кинетика константы времени жизни флуоресценции (τ_m) в БСА при действии 0,5; 0,75; 1 и 2 мкМ ДНКЖ (1–4 соответственно); в – спектры поглощения раствора БСА (1) и раствора БСА при действии 2 мкМ ДНКЖ (2). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 6$)

ценции альбумина. Наличие двух Тгр в БСА с различным окружением, скорее всего, объясняет биэкспоненциальный характер затухания флуоресценции Тгр. Однако наличие ротамеров триптофана в водном растворе также вызывает биэкспоненциальное затухание флуоресценции свободного Тгр. Было установлено, что константа времени жизни флуоресценции БСА снижается сильнее, чем у ЧСА, и процесс зависит от концентрации ДНКЖ (рис. 2, б). Вероятно, что обнаруженные различия в кинетике флуоресценции альбумина обусловлены связыванием ДНКЖ с доменом I альбумина, расположенным близко к Trp134, взаимодействующим с Cys34 домена I: расстояние между Trp134 и Cys34 составляет около 17 Å, что достаточно для передачи энергии, хотя расстояние между Trp213 и Cys34 > 100 Å [17] (рис. 1). Учитывая, что спектр поглощения ДНКЖ и спектр флуоресценции Тгр альбумина перекрываются в области 290–450 нм, между этими молекулами возможна миграция энергии, в том числе эффективный перенос энергии альбумина Туг–Тгр. На основе интеграла перекрытия спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора ($6,07 \cdot \exp(-15)$), фактора ориентации k (принятого за 2/3), времени затухания флуоресценции (4,5 нс) и квантового выхода БСА (Φ_D), равного 0,13 [17], был рассчитан радиус Фёрстера, который составил 24,3 Å. Очевидно, что такой величины радиуса Фёрстера достаточно для эффективной передачи энергии от триптофана к ДНКЖ. Это косвенно подтверждает связывание ДНКЖ с этой аминокислотой. Для пары Туг–Тгр радиус Фёрстера составляет ≈ 10 –18 Å, что является стандартным расстоянием между этими а.о. в белках, и здесь также возможен перенос энергии.

Основываясь на результатах по флуоресценции Тгр, можно сделать вывод, что связывание ДНКЖ с БСА значительно отличается от связывания с его гомологом ЧСА. Предположительно, это различие объясняется расположением остатков Тгр (Trp212 в ЧСА; Trp134 и Trp213 в БСА) и высокой аффинностью сайтов связывания ДНКЖ (рис. 1). В наших экспериментах использовался спиртовой раствор ДНКЖ (2%-ный (v/v) этанол). Известно, что зависимость флуоресценции Туг от концентрации спирта сходна для БСА и ЧСА, тогда как флуоресценция Тгр существенно отличается. Полученные результаты выявили корреляцию между связыванием с альбумином с изменением эффективности внутримолекулярного переноса энергии от Туг к Тгр, поскольку перенос энергии возбуждения между остатками в альбумине не является преобладающим механизмом затухания флуоресценции Туг [20, 21].

Уменьшение времени жизни флуоресценции может быть вызвано не только передачей энергии ДНКЖ или молекулам GS-NO. В зависимости от полярности среды максимум спектра флуоресценции Трп изменяется в диапазоне от 308 нм (в азурине) до 360 нм (в воде). В наших экспериментах снижение интенсивности флуоресценции не сопровождалось сдвигом максимума длины волны (рис. 2, в), что, возможно, указывает на отсутствие изменений полярности микроокружения триптофана и, как следствие, существенных изменений конформации альбумина. Следовательно, уменьшение интенсивности флуоресценции зависит от концентрации ДНКЖ и, возможно, от его связывания с Cys34 домена I альбумина [10]. Согласно нашим данным, время жизни флуоресценции триптофана БСА изменилось менее чем на 10%. ДНКЖ синтезируется в среде, содержащей железо, тиолы и NO и, предположительно, опосредует образование S-НТ [22]. Наличие этих комплексов в клетках позволяет считать их стабильными метаболитами NO, а также возможными медиаторами его активности. Для проверки гипотезы о том, что ДНКЖ являются предшественниками S-НТ, было продемонстрировано, что нитрозирование БСА происходит в присутствии железа и глутатиона, основных компонентов ДНКЖ. Установлено, что инкубация БСА с ДНКЖ и глутатионом в течение 25 мин снижала скорость замедления времени жизни флуоресценции Трп (рис. 3), а интенсивность флуоресценции Трп БСА практически не изменилась.

Возможно и другое объяснение эффекта, представленного на рис. 3: переход из связанных с белком ДНКЖ в ДНКЖ с глутатионом инициирован избытком глутатиона (5 мМ) по сравнению с содержанием тиола (Cys34) в растворе белка (2 мМ). Это делает передачу энергии от Трп134 к низкомолекулярному ДНКЖ-GSH в растворе незначительной.

Установлено, что даже в присутствии 10-кратного избытка глутатиона, не связанного с ДНКЖ при нейтральном pH, ДНКЖ вместе с глутатионом преимущественно представлены диамагнитной биядерной формой [22]. Прямые окислительно-восстановительные реакции NO с GSH протекают медленно [9, 12] и, вероятно, не вносят существенный вклад в биологическое потребление NO. Однако константы скорости обратимой ассоциации NO с GSH, приводящей к образованию тионитроксида, неизвестны [23]. Учитывая отсутствие взаимодействия между глутатионом и альбумином [24], мы предполагаем наличие конкуренции между БСА и глутатионом за связывание с ДНКЖ, что уменьшает ко-

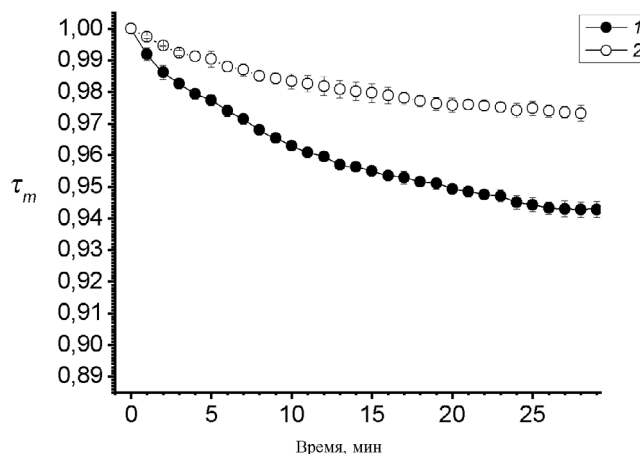


Рис. 3. Время жизни флуоресценции триптофана БСА при инкубации с 1 мкМ ДНКЖ (1), а также 1 мкМ ДНКЖ и 5 мМ глутатиона (2)

личество ДНКЖ, способных образовывать стабильные комплексы с альбумином.

Использование спиновых меток в сочетании с ЭПР-спектроскопией является эффективным методом для изучения структурных изменений альбумина. Изменения подвижности и доступности спиновых меток и расстояний между спиновыми метками позволяют исследовать изменения вторичной и третичной структуры белков. В наших экспериментах в качестве спинового зонда использовали коммерческую 16-доксил-стеариновую кислоту, так как альбумин проявляет чрезвычайно высокое сродство к стеариновой кислоте ($6,9 \times 10^7$ моль/литр), что обеспечивает >99,9% связывания спиновой метки с альбумином в концентрациях 0,58; 0,7 и 0,77 мМ [15]. Как было указано ранее, альбумин содержит специфические сайты связывания для определенных жирных кислот (рис. 1), проявляющих высокое сродство к многочисленным лекарством. Вероятно, ДНКЖ также может связываться с этими сайтами [6]. Чтобы проверить гипотезу о наличии конкуренции в связывании между ДНКЖ и жирной кислоты с конкретным сайтом альбумина, мы использовали спиновый зонд, способный образовывать комплекс с сайтами альбумина 1 и 2. В этих экспериментах было обнаружено, что сродство к жирным кислотам в сайте 1 было выше по сравнению с сайтом 2, но присутствие ДНКЖ (1 и 2 мкМ) в течение 20 или 120 мин инкубации на связывание метки не влияло (таблица).

Факт, что связывание меток жирных кислот не зависит от концентрации ДНКЖ, указывает на то, что метка не может соединяться с сайтом связывания ДНКЖ. Согласно полученным данным, присутствие ДНКЖ в плазме крови изменяет конформацию доменов альбумина II и III

Динамика связывания спин-меченых жирных кислот с сайтами альбумина плазмы крови в присутствии ДНКЖ

Динамика связывания спин-меченых жирных кислот с сайтами альбумина	Время, мин	Альбумин, сайт 1	Альбумин, сайт 2
ЧСА в плазме в отсутствие ДНКЖ, %	0	$60,1 \pm 0,8$	$34,4 \pm 1,1$
ЧСА в плазме с 1 мкМ ДНКЖ, %	20	$60,6 \pm 0,5$	$36,0 \pm 0,8$
ЧСА в плазме с 1 мкМ ДНКЖ, %	120	$60,3 \pm 0,6$	$36,5 \pm 0,7$
ЧСА в плазме с 2 мкМ ДНКЖ, %	20	$60,4 \pm 0,9$	$35,1 \pm 1,4$
ЧСА в плазме с 2 мкМ ДНКЖ, %	120	$60,0 \pm 0,9$	$36,3 \pm 1,1$

не за счёт связывания с участками связывания жирных кислот на поверхности этих доменов. Количество спиновых меток в 1-м и 2-м гидрофобных карманах альбумина не зависело от присутствия ДНКЖ. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что ДНКЖ имеет низкое сродство к сайтам связывания 1 и 2 в доменах II и III альбумина.

Различные стадии взаимодействия между сайтами связывания ДНКЖ и доменами альбумина демонстрируют разнообразие кооперативности, энергии связывания и, как следствие, механизмов и типов сайтов связывания, а также влияния на вторичную и третичную структуру альбумина. Чтобы объяснить эти различия, Gelamo и Tabak [25] показали, что сайты связывания первичных гасителей флуоресценции (сурфактантов) локализованы рядом с Trp134 в домене I БСА, но не были обнаружены вблизи остатка триптофана (Trp212 в ЧСА и Trp213 в БСА) домена II альбумина. Для тушения флуоресценции БСА необходим прямой контакт молекулы сурфактанта с индолом Trp134. Для анализа механизмов связывания ДНКЖ с альбумином часто используются данные по связыванию миристиновой кислоты с альбумином. Считается, что с помощью флуоресценция Trp при связывании миристиновой кислоты можно обнаружить изменения не вторичной, а третичной структуры альбумина [21]. Мы предполагаем, что наиболее вероятным механизмом взаимодействия ДНКЖ с альбумином является образование комплексов за счёт нитрозирования остатка цистеина домена I альбумина. Однако это не меняет конформацию альбумина. Вероятно, это можно объяснить тем, что, как и при действии этанола, наблюдаемые изменения конформации ЧСА в присутствии низких концентрациях этанола (2%) могут быть вызваны как изменениями в сети водородных связей в первой гидратной сфере молекулы белка, так и связыванием молекул этанола. Действительно, молекулы этанола способны вытеснять воду в первой гидратной сфере и образовывать водо-

родные связи с боковыми цепями аминокислот [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Связывание ДНКЖ с альбумином изучали с помощью флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением (ПФ) и электронного парамагнитного резонанса. Было выявлено, что время жизни флуоресценции БСА уменьшается больше, чем у ЧСА, и зависит от концентрации ДНКЖ. Биэкспоненциальный характер затухания флуоресценции триптофана БСА объясняется наличием в молекуле белка двух остатков этой аминокислоты. Вероятно, ДНКЖ образует комплексы за счёт нитрозирования цистеинового остатка домена I альбумина. В поддержку гипотезы о том, что ДНКЖ являются предшественниками S-НТ, было показано, что нитрозирование БСА происходит в присутствии железа и глутатиона, находящихся в ядре ДНКЖ. Влияние ДНКЖ на связывание конкретных спин-меченых жирных кислот с альбумином в плазме крови человека изучали *in vitro*. Результаты этого эксперимента свидетельствуют о том, что наличие ДНКЖ в плазме крови влияет на конформацию белка не за счёт связывания с участками связывания жирных кислот.

Благодарности. Авторы выражают свою благодарность д-ру Маргарите Родионовой за её незаменимый вклад в подготовку данной статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-79-30062, полученный Максимовым Г.В. и Юсиповичем А.И.), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского Университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполняемые в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального исследовательского комитета, а также Хельсин-

кской декларации 1964 года и более поздним поправкам к ней, или сопоставимым этическим стандартам. Перед забором крови от всех пациентов или их законных представителей было получено письменное информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Souza, T. C. F., Périssé, A. R. S., and Moura, M. (2015) Noise exposure and hypertension: investigation of a silent relationship, *BMC Public Health*, **15**, 328.
- Diao, D., Wright, J. M., Cundiff, D. K., and Gueyffier, F. (2012) Pharmacotherapy for mild hypertension, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **8**, CD006742.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., and Gladwin, M. T. (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **7**, 156.
- Broniowska, K. A., Diers, A. R., and Hogg, N. (2013) S-nitrosoglutathione, *Biochim. Biophys. Acta*, **5**, 3173-3181.
- Liu, T., Zhang, M., Terry, M. H., Schroeder, H., Wilson, S., et al. (2018) Hemodynamic effects of glutathione-liganded binuclear dinitrosyl iron complex: evidence for nitroxyl generation and modulation by plasma albumin, *Mol. Pharmacol.*, **5**, 427-437.
- Chazov, E. I., Rodnenkov, O. V., Zorin, A. V., Lakomkin, V. L., Gramovich, V. V., et al. (2012) Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers, *Nitric Oxide*, **26**, 148-156.
- Gow, A. J., Buerk, D. G., and Ischiropoulos, H. (1997) A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **5**, 2841-2845.
- Lakomkin, V. L., Vanin, A. F., Timoshin, A. A., Kapelko, V. I., and Chazov, E. I. (2007) Long-lasting hypotensive action of stable preparations of dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats, *Nitric Oxide*, **16**, 413-418.
- Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Thomas, D. D., and Lancaster, J. R. Jr. (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2175-2179.
- Moller, M. N., Li, Q., Vitturi, D. A., Robinson, J. M., Lancaster, J. R., and Denicola, A. (2007) Membrane "lens" effect: focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the NO/O₂ reaction, *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 709-714.
- Burstein, A., Vedenkina, N. S., and Ivkova, M. N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 263-279.
- Birkett, D. J., Myers, S. P., and Sudlow, G. (1977) Effects of fatty acids on two specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.*, **13**, 987-992.
- Zhang, Y. Y., Xu, A. M., Nomen, M., Walsh, M., Keaney, J. F. Jr., and Loscalzo, J. (1996) Nitrosation of tryptophan residue(s) in serum albumin and model dipeptides. Biochemical characterization and bioactivity, *J. Biol. Chem.*, **271**, 14271-14279.
- Borodulin, R. R., Kubrina, L. N., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Mikoyan, V. D., and Vanin, A. F. (2013) Redox conversions of dinitrosyl iron complexes with natural thiol-containing ligands, *Nitric Oxide*, **35**, 35-41.
- Kazmierczak, S. C., Gurachevsky, A., Matthes, G., and Muravsky, V. (2006) Electron spin resonance spectroscopy of serum albumin: a novel new test for cancer diagnosis and monitoring, *Clin. Chem.*, **52**, 2129-2134.
- Alcala, J. R., Gratton, E., and Prendergast, F. G. (1987) Fluorescence lifetime distributions in proteins, *Biophys. J.*, **51**, 597-604.
- Yukio, Y., and Jiro, T. (1972) Polarized absorption spectra of crystals of indole and its related compounds, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **45**, 1362-1366.
- Amar, B. T. G., and Sang, J. C. (2014) Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 22518-22538.
- Lakowicz, J. (2007) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 3rd Edn.
- Zhdanova, N. G., Shirshin, E. A., Maksimov, E. G., Panchishin, I. M., Saletsky, A. M., and Fadeev, V. V., (2015) Tyrosine fluorescence probing of surfactant-induced conformational changes of albumin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **14**, 897-908.
- Anand, U., Jash, C., and Mukherjee, S. (2010) Spectroscopic probing of the microenvironment in a protein-surfactant assembly, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 15839-15845.
- Boese, M., Mordvintsev, P., Vanin, A. F., Busse, R., and Mülsch, A. (1995) S-Nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex, *J. Biol. Chem.*, **270**, 29244-29249.
- Vanin, A. F., Lozinsky, V. I., and Kapel'ko, V. I. (2005) Polymeric composition for designing a stabilized form of dinitrosyl-iron complex and the method of this complex form synthesis, *Russ. Pat.*, No. 2,291,880.
- Noble, D. R., Swift, H. R., and Williams, D. L. H. (1999) Nitric oxide release from S-nitrosoglutathione (GSNO), *Chem. Commun.*, **22**, 2317-2318.
- Gelamo, E. L., and Tabak, M. (2000) Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants, *Spectrochim. Acta Part A*, **56**, 2255-2271.

EFFECT OF DINITROSYL IRON COMPLEX ON ALBUMIN CONFORMATION

**E. S. Allakhverdiev^{1,2*}, G. V. Maksimov^{1,3*}, O. V. Rodnenkov², O. G. Luneva¹,
G. V. Tsoraev¹, A. D. Ivanov³, A. I. Yusipovich¹, and T. V. Martynyuk²**

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia;
E-mail: elvin21128@gmail.com; gmaksimov@mail.ru

² National Medical Research Center of Cardiology Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

³ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
"National Research Technological University 'MISIS'", 119049 Moscow, Russia

Binding of dinitrosyl iron complex (DNIC) to albumin was studied using time-resolved fluorescence and electron spin resonance spectroscopy. It was found that the fluorescence lifetime of bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin decreases with binding and depends on DNIC concentration. The observed biexponential pattern of the BSA tryptophan fluorescence decay is explained by the presence of two tryptophan residues in the protein molecule. We believe that DNIC forms stable complexes with the cysteine (Cys34) residue in the domain I of albumin. It was shown that the lifetime of albumin tryptophan fluorescence decreased during co-incubation of BSA with DNICs and glutathione. Effects of DNIC on the binding of specific spin-labeled fatty acids with albumin in human blood plasma were studied *in vitro*. The presence of DNIC in blood plasma does not change conformation of albumin domains II and III. We suggest that the most possible interaction between DNICs and albumin is the formation of a complex; and nitrosylation of the cysteine residue in the albumin domain I occurs without the changes in albumin conformation.

Keywords: albumin, dinitrosyl iron complex, electron spin resonance, nitrogen oxide, time-resolved fluorescence