

УДК 577.112.824:615.917

## ВЛИЯНИЕ РЕДОКС-СТАТУСА БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА НА ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПАРАОКСОНОМ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2020 г. Д. А. Белинская<sup>1,\*</sup>, А. А. Баталова<sup>1</sup>, Н. В. Гончаров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, проспект Тореза 44, Россия

<sup>2</sup> ФГУП “НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека” ФМБА России, 188663 Ленинградская обл., г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. 93, Россия

\*e-mail: d\_belinskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2018 г.

После доработки 05.01.2020 г.

Принята к публикации 20.01.2020 г.

DOI: 10.31857/S004445292003002X

Сокращения: ФОС – фосфорорганические соединения; БСА – бычий сывороточный альбумин; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин; ММ-РБСА – метод расчета свободной энергии, сочетающий использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона–Больцмана (molecular mechanics/Poisson–Boltzmann surface area); distP-O – расстояние между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода Tyr149 или Tyr410.

Альбумин является мажорным белком плазмы крови млекопитающих. Он поддерживает ее коллоидно-осмотическое давление, выполняет резервную функцию, играет важную роль в транспорте воды, различных ионов и соединений. Накапливаются данные о ферментативной активности альбумина: истинно эстеразной (связывание субстрата с активным центром альбумина с последующим распадом комплекса на фермент и продукт) и псевдоэстеразной (необратимое связывание субстрата с ферментом). Выявлены два основных сайта гидролитической активности белка. Сайт Садлоу I с каталитическим аминокислотным остатком Tyr150 отвечает за истинно эстеразную активность альбумина, сайт Садлоу II с каталитическим аминокислотным остатком Tyr411 – за псевдоэстеразную. Установлена гидролитическая активность альбумина и по отношению к некоторым фосфорорганическим соединениям (ФОС) [1].

Трехмерная структура альбумина достаточно лабильна, и при взаимодействии с разными веществами имеют место кооперативность и аллостерическая модуляция, присущие мультимерным белкам. Молекула альбумина содержит в своей структуре одну свободную тиоловую группу в составе аминокислотного остатка цистеина Cys34, которая способна образовывать дисульфиды со свободным

цистеином и другими тиолами плазмы крови или окисляться до сульфеновой и сульфиновой кислот [1]. Влияние степени окисления Cys34 на связывающие и каталитические свойства альбумина практически не изучалось, а в работах, посвященных этому вопросу, получены противоречивые данные. Цель представленного исследования – на примере параоксона (диэтил-*n*-нитрофенилфосфата) методами молекулярного моделирования оценить влияние степени окисления Cys34 на связывающую и (псевдо)эстеразную активность бычьего сывороточного альбумина (БСА) по отношению к ФОС и сравнить с результатом аналогичного исследования, проведенного нами ранее для альбумина человека (ЧСА).

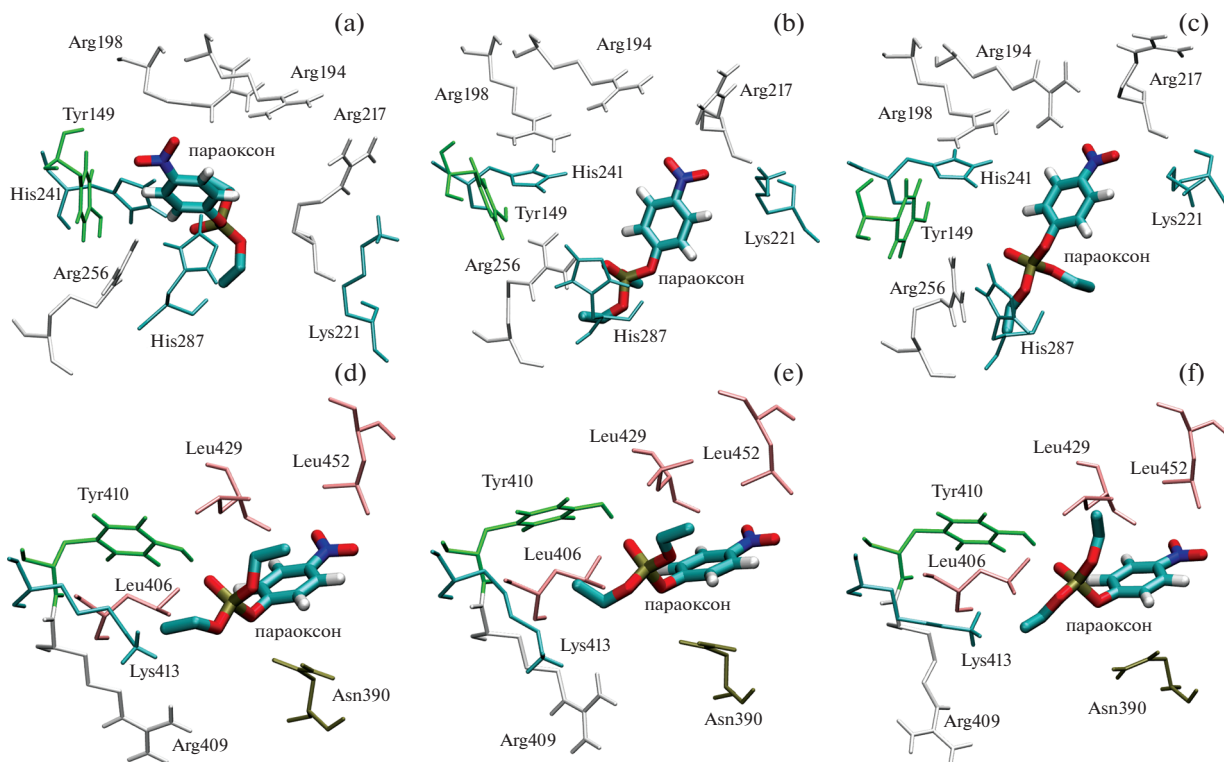
Были подготовлены 3 модели БСА, соответствующие разной степени окисления Cys34.

Модель 1: Cys34 восстановлен (Cys34-SH).

Модель 2: Cys34 окислен до сульфеновой кислоты (Cys34-SOH).

Модель 3: Cys34 окислен до сульфиновой кислоты (Cys34-S(O)O<sup>-</sup>).

Каталитическим тирозинам Tyr150 и Tyr411 в ЧСА соответствуют Tyr149 и Tyr410 в БСА. Ранее мы провели молекулярный докинг молекулы параоксона в сайты Садлоу I и Садлоу II бычьего альбумина с Cys34 в восстановленном состоянии (модель 1) [2]. Подготовка моделей 2 и 3 альбумина описана в наших предыдущих работах [3]. Стабильность комплексов альбумина с параоксоном во времени была проверена методом молекулярной динамики с помощью программного пакета GROMACS 2018.1 [4]. Были использованы те же параметры вычислительного эксперимента, что и в наших предыдущих исследованиях [3]. Для нейтрализации заряда в систему были добавлены ионы натрия: 16 ионов для моделей 1 и 2, 17 ионов – для



**Рис. 1.** Устойчивые конформации параоксона в сайте Садлоу I (a, b, c) и Садлоу II (d, e, f) бычьего альбумина с разной степенью окисления тиоловой группы Cys34: (a, d) Cys34 восстановлен; (b, e) Cys34 окислен до сульфеновой кислоты; (c, f) Cys34 окислен до сульфеновой кислоты.

**Fig. 1.** Paraoxon stable conformations at Sudlow site I (a, b, c) and Sudlow site II (d, e, f) of bovine serum albumin with different oxidation state of the Cys34 thiol group: (a, d) Cys34 reduced; (b, e) Cys34 oxidized to sulfenic acid; (c, f) Cys34 oxidized to sulfinic acid.

модели 3. Время симуляции конформационных изменений комплексов методом молекулярной динамики (длина траектории) составило 10 нс с шагом интегрирования 0.002 пс. По полученным траекториям были рассчитаны зависимости значений расстояния между атомом фосфора параоксона и гидроксильным атомом кислорода Tyr149 и Tyr410 ( $\text{distP-O}$ ) от времени. Для того чтобы могла произойти нуклеофильная атака кислорода каталитической аминокислоты на атом фосфора параоксона, значение  $\text{distP-O}$  не должно превышать 0.4 нм. Оценка свободной энергии связывания параоксона с альбумином  $\Delta G$  проводилась методом, сочетающим использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона–Больцмана (molecular mechanics – Poisson–Boltzmann surface area, MM-PBSA) с помощью модуля *g\_mmpbsa* [5], встроенного в программный пакет GROMACS.

Конформационный анализ исследуемых комплексов показал, что в сайте Садлоу I полученный методом молекулярного докинга продуктивный комплекс параоксона с альбумином (то есть комплекс, в котором значение  $\text{distP-O}$  меньше 0.4 нм) [2] нестабилен в зависимости от редокс-статуса Cys34. Для всех степеней окисления тиоловой группы цистеина молекула параоксона отдалается от Tyr149 за первые 100 пс симуляции, затем за 2–4 нс

параоксон и аминокислоты сайта Садлоу I переходят в устойчивую конформацию, в которой остаются до конца периода симуляции. Анализ этих устойчивых конформаций выявил, что в случае восстановленного остатка цистеина Cys34 нитрогруппа параоксона взаимодействует с боковым радикалом аминокислотного остатка Arg194, а фосфорильный кислород лиганда – с атомом водорода имидазольного кольца His241 (рис. 1a). В случае сульфеновой кислоты нитрогруппа параоксона взаимодействует с Arg217, а фосфорильный кислород – с Arg256 (рис. 1b). В случае сульфеновой кислоты фосфорильный кислород также контактирует с Arg256, а нитрогруппа равноудалена от NH-группы остова Arg217 и имидазольного кольца His241, однако расстояние между лигандом и этими аминокислотами превышает 0.4 нм (рис. 1c). Таким образом, положение параоксона различно для всех трех моделей альбумина, но следует отметить, что конформации сайта Садлоу I в моделях 2 и 3 более близки между собой по сравнению с моделью 1. В модели 1 параоксон расположен на дне сайта Садлоу I, а в моделях 2 и 3 вытянут вдоль полости так, что нитрогруппа лиганда направлена к входу в сайт, ограниченному аминокислотами Arg194, Arg198 и Arg217 (рис. 1). Анализ конформации Cys34 и его окружения выявил, что в модели 1

**Таблица 1.** Свободные энергии образования комплексов параоксона с сывороточным альбумином быка (БСА) и человека (ЧСА) ( $\Delta G$ , ккал/моль) при разных степенях окисления тиоловой группы Cys34  
**Table 1.** Free energies of the formation of paraoxon complexes with bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA) ( $\Delta G$ , kcal/mol) at different Cys34 oxidation states

Сайт/Site	Степень окисления Cys34/Cys34 oxidation state	БСА/BSA	ЧСА [3]/HSA [3]
Сайт Садлоу I/Sudlow site I	Модель/Model 1 (Cys34-SH)	$-11.2 \pm 3.4$	$-20.8 \pm 2.5$
	Модель/Model 2 (Cys34-SOH)	$-16.0 \pm 6.9$	$-20.6 \pm 2.0$
	Модель/Model 3 (Cys34-S(O)O <sup>-</sup> )	$-22.4 \pm 3.4$	$-20.3 \pm 2.0$
Сайт Садлоу II/Sudlow site II	Модель/Model 1 (Cys34-SH)	$-23.9 \pm 3.0$	$-25.2 \pm 2.8$
	Модель/Model 2 (Cys34-SOH)	$-25.4 \pm 3.1$	$-26.1 \pm 2.2$
	Модель/Model 3 (Cys34-S(O)O <sup>-</sup> )	$-25.3 \pm 2.2$	$-24.8 \pm 2.4$

Cys34 взаимодействует с имидазольным кольцом His39, а в моделях 2 и 3 – нет. В модели 1 ориентация имидазольного кольца His39 относительно Tyr139 иная, чем в моделях 2 и 3. Это кардинальное отличие модели 1 от моделей 2 и 3 в “цистеиновом” сайте коррелирует с отличием положения параоксона в модели 1 от моделей 2 и 3 в сайте Садлоу I. Схожая зависимость конформации сайта Садлоу I от конформации окружения Cys34 была выявлена нами ранее для альбумина человека [3].

Что касается сайта Садлоу II, в случае восстановленного остатка цистеина Cys34 участки стабильности, на которых значение distP-O колеблется около 0.4 нм, чередуются с участками нестабильности, на которых молекула параоксона отдалается от тирозина Tyr410. На всех стабильных участках положение параоксона одинаково: молекула лиганда стабилизируется образованием водородной связи между группой OH тирозина Tyr410 и фосфорильным атомом кислорода параоксона (рис. 1d–1f). Анализ зависимости расстояния между гидроксильным атомом водорода Tyr410 и фосфорильным атомом кислорода лиганда показал, что периоды стабильного положения параоксона в сайте связывания совпадают с периодами существования водородной связи между этими атомами. А увеличению расстояния между параоксоном и тирозином предшествует разрыв этой водородной связи. В случае сульфеновой и сульфеновой кислоты зависимость значения distP-O от времени выглядит схожим с моделью 1 образом. Однако в случае сульфеновой кислоты период нестабильности существенно длиннее, чем в случае моделей 1 и 2, т.е. окисление Cys34 до сульфеновой кислоты дестабилизирует продуктивную конформацию параоксона в сайте Садлоу II. Продуктивные конформации сайта Садлоу II близки между собой для разных степеней окисления тиоловой группы цистеина (рис. 1d–1f). Аналогичная независимость конформации сайта Садлоу II от степени окисления остатка цистеина Cys34 была продемонстрирована нами и для альбумина человека [3]. По аналогии с сайтом Садлоу I мы проанализировали конформацию Cys34 и его окружения. В модели 2 Cys34 взаимодействует с имидазольным кольцом His39, в моделях 1 и 3 – нет, что влияет

на положение гидроксильной группы Tyr139. Таким образом, конформация Cys34 и его окружения не коррелирует с конформацией параоксона в сайте Садлоу II. Следует отметить, что конформация “цистеинового” сайта зависит от того, связан ли параоксон в сайте Садлоу I или Садлоу II, что указывает и на обратное влияние лиганда на конформацию Cys34 и его окружения.

По полученным траекториям методом ММ-PBSA были оценены свободные энергии образования комплексов альбумин–параоксон (табл. 1). Для сайта Садлоу I значения свободных энергий образования комплексов альбумина с параоксоном существенно снижаются с увеличением степени окисления Cys34. Основной вклад в разницу значений  $\Delta G$  вносит слагаемое  $\Delta G_{\text{polar}}$ , характеризующее вклад полярных взаимодействий в свободную энергию сольватации, тогда как значения энергий электростатических и ван-дер-ваальсовых сил практически не отличаются в моделях 1, 2 и 3. Этим БСА кардинально отличается от ЧСА, где для сайта Садлоу I значения свободных энергий образования комплексов альбумина с параоксоном практически идентичны (табл. 1). Мы полагаем, что этот эффект может быть связан с тем, что Lys195 и Lys199 в структуре сайта Садлоу I ЧСА заменены на более разветвленные аргинины Arg194 и Arg198 в молекуле БСА. Ранее мы высказывали предположение, что в случае более массивных и менее гибких лигандов изменения в конформации сайта Садлоу I ЧСА, вызванные окислением тиоловой группы цистеина, будут существенно влиять на эффективность связывания [3]. За счет замен остатков лизина на остатки аргинина стерические размеры сайта Садлоу I БСА меньше, чем в молекуле ЧСА, и, по всей видимости, по этой причине степень окисления остатка цистеина Cys34 сильнее влияет на аффинность сайта Садлоу I БСА к параоксону.

Что касается сайта Садлоу II, сродство к параоксону несколько ниже в случае восстановленной тиоловой группы цистеина, но целом, как и в случае ЧСА, аффинность сайта Садлоу II к параоксону слабо зависит от редокс-статуса Cys34.

Подводя итог, можно отметить, что в комплексе человеческого и бычьего альбумина с молекулой параоксона в сайте Садлоу I конформация окружения Cys34 коррелирует с конформацией сайта Садлоу I и параоксона. В БСА, в отличие от ЧСА, окисление тиоловой группы цистеина существенно влияет на связывающую активность сайта Садлоу I по отношению к параоксону. Мы полагаем, что такое отличие связано с меньшими стерическими размерами сайта в БСА по сравнению с ЧСА. Окисление аминокислотного остатка Cys34 никак не влияет на стабилизацию параоксона в продуктивной конформации, т.е., по всей видимости, не влияет на истинно эстеразную активность альбумина по отношению к параоксону. Модификация Cys34 и в БСА, и в ЧСА не влияет на конформацию молекулы параоксона в сайте Садлоу II. Окисление тиоловой группы цистеина не оказывает значительного влияния на связывающую активность сайта Садлоу II по отношению к параоксону, хотя в случае БСА (в отличие от ЧСА) аффинность сайта несколько возрастает с увеличением степени окисления Cys34.

Ранее экспериментальными биохимическими методами мы показали, что среди альбуминов человека, быка и крысы наилучшим сродством к параоксону (для обоих сайтов Садлоу) обладает бычий альбумин [6]. Важно отметить, что, касательно связывающей активности ЧСА и БСА по отношению к параоксону, именно для модели 3 (Cys34 окислен до сульфинового кислоты) результаты расчетных экспериментов лучше всего коррелируют с нашими экспериментальными данными *in vitro* (табл. 1). Это согласуется с литературными данными [7] и нашими собственными экспериментами *in vitro*, указывающими на то, что в коммерческом альбумине Cys34 находится преимущественно в окисленной форме.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290142-9 при поддержке РФФИ (проект № 19-34-90026).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров Н.В., Белинская Д.А., Разыграев А.В., Уколов А.И. О ферментативной активности альбумина. Биорг. химия. 41 (2): 131–144. 2015. [Goncharov N.V., Belinskaya D.A., Ukolov A.I., Razygraev A.V. On the enzymatic activity of albumin. Russ. J. Bioorg. Chem. 41 (2): 131–144. 2015.]
2. Белинская Д.А., Шмурак В.И., Таборская К.И., Авдонин П.П., Авдонин П.В., Гончаров Н.В. Сравнительный анализ *in silico* связывания параоксона сывороточным альбумином человека и быка. Ж. эвол. биохим. и физиол. 53 (3): 170–177. 2017. [Belinskaya D.A., Taborskaya K.I., Goncharov N.V., Shmurak V.I., Avdonin P.P., Avdonin P.V. In silico analysis of paraoxon binding by human and bovine serum albumin. J. Evol. Biochem. Physiol. 53 (3): 191–199. 2017.]
3. Белинская Д.А., Терпиловский М.А., Баталова А.А., Гончаров Н.В. Влияние степени окисления остатка Cys34 альбумина на взаимодействие белка с параоксоном по данным молекулярного моделирования. Биорг. Химия. 45 (6): 640–649. 2019. [Belinskaia D.A., Terpilovskii M.A., Batalova A.A., Goncharov N.V. Effect of Cys34 oxidation state of albumin on its interaction with paraoxon according to molecular modeling data. Russ. J. Bioorg. Chem. 45 (6): 535–544. 2019.]
4. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 1–2: 19–25. 2015.
5. Kumari R., Kumar R. Open Source Drug Discovery Consortium, Lynn A. g\_mmpbsa – a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. J. Chem. Inf. Model. 54: 1951–1962. 2014.
6. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Белинская Д.А., Авдонин П.В. Сравнительный анализ эстеразной и параоксоназной активности различных видов альбумина. Ж. эвол. биохим. и физиол. 53 (4): 241–250. 2017. [Goncharov N.V., Terpilovskii M.A., Belinskaya D.A., Shmurak V.I., Avdonin P.V. Comparative analysis of esterase and paraoxonase activities of different serum albumin species. J. Evol. Biochem. Physiol. 53 (4): 271–281. 2017.]
7. Nakae H., Tomida K., Kikuya Y., Okuyama M., Igarashi T. Comparison of quality of human serum albumin preparations in two pharmaceutical products. Acute Med. Surg. 4: 251–254. 2017.

## EFFECT OF THE BOVINE SERUM ALBUMIN REDOX STATE ON ITS INTERACTION WITH PARAOXON AS DETERMINED BY MOLECULAR MODELING

D. A. Belinskaia<sup>a,#</sup>, A. A. Batalova<sup>a</sup>, and N. V. Goncharov<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: d\_belinskaya@mail.ru