

Влияние внутримолекулярных дисульфидных связей бычьего сывороточного альбумина на его связывающую и псевдоэстеразную активность по данным компьютерного моделирования

Белинская Д.А.¹, Баталова А.А.¹, Гончаров Н.В.^{1,2}

¹ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

²ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

daria.belinskaya@iephb.ru

Сывороточный альбумин (СА) – это главный белок крови млекопитающих, способный связывать практически все известные лекарственные препараты и токсические вещества. Накапливаются данные и о ферментативной активности СА. Молекула СА содержит в своей структуре семнадцать дисульфидных связей и одну свободную тиоловую группу в составе аминокислотного остатка Cys34. В условиях *in vivo* взаимодействие СА с низкомолекулярными тиолами плазмы крови может приводить к тиолированию Cys34 и некоторых цистеинов в составе дисульфидных связей с её разрывом. Цель представленного исследования – на примере модельного субстрата *p*-нитрофенилацетата (НФА) методами молекулярного моделирования впервые оценить влияние внутримолекулярных дисульфидных связей на связывающую и псевдоэстеразную активность бычьего СА (БСА). Конформационные характеристики комплексов БСА-НФА изучали методами молекулярного докинга и молекулярной динамики, свободную энергию образования комплексов оценивали методом ММ/ПБСА. Согласно результатам вычислительных экспериментов, цистеинилирование Cys34 и целостность дисульфидной связи Cys475-Cys486, находящейся в непосредственной близости от основного сайта псевдоэстеразной активности белка, не оказывают существенного влияния на взаимодействие БСА с НФА. Полученные данные могут быть использованы в клинической токсикологии при разработке и совершенствовании адъювантной терапии отравлений фосфорорганическими соединениями.

Ключевые слова: сывороточный альбумин, псевдоэстеразная активность альбумина, *p*-нитрофенилацетат, дисульфидные связи, молекулярная динамика.

Effect of Intramolecular Disulfide Bonds of Bovine Serum Albumin on Its Binding and Pseudo-Esterase Activity According To Computer Modeling Data

Belinskaia D.A.¹, Batalova A.A.¹, Goncharov N.V.^{1,2}

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences

²Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology

Serum albumin (SA) is the main blood protein in mammals which can bind almost all known drugs and toxic substances. Data on enzymatic activity of SA have been accumulated as well. The SA molecule contains seventeen disulfide bonds and one free thiol group within the Cys34 residue. Under *in vivo* conditions, the interaction of SA with low-molecular-weight thiols of blood plasma can lead to thiolation of Cys34 and some cysteines within the disulfide bonds resulting in their breakage. The aim of this study is to evaluate for the first time the effect of intramolecular disulfide bonds on the binding and pseudo-esterase activity of bovine SA (BSA) towards the model substrate *p*-nitrophenyl acetate (NPA) using molecular modeling methods. The conformational characteristics of BSA-NPA complexes were studied by molecular docking and molecular dynamics methods; the values of free binding energy were estimated by the MM/PBSA approach. According to the results of the computational experiments, the cysteinylolation of Cys34 and the state of the Cys475-Cys486 disulfide bond located in the vicinity of the main site of the pseudoesterase activity of BSA do not significantly affect the interaction of the protein with NPA. The data obtained can be used in clinical toxicology for the development and improvement of adjuvant therapy for organophosphate poisoning.

Key words: serum albumin, pseudo-esterase activity of albumin, *p*-nitrophenyl acetate, disulfide bonds, molecular dynamics.

1. Введение

Сывороточный альбумин (СА) – это главный белок крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500–700 мкМ. Молекула белка может связывать практически все известные лекарственные препараты и токсические вещества, в значительной степени определяя их фармако- и токсикокинетику. Накапливаются данные и о ферментативной активности СА [1–2]. Известно, что сайт Садлоу II с каталитическим аминокислотным остатком Туг411 (в СА человека, ЧСА) или Туг410 (в СА быка, БСА) является основным сайтом псевдоэстеразной активности белка [3]. Молекула СА содержит в своей структуре семнадцать дисульфидных связей и одну свободную тиоловую группу в составе Cys34, которая способна образовывать дисульфиды с низкомолекулярными тиолами, преимущественно с цистеином, или окисляться до сульфеновой и сульфинового кислот [4]. Согласно различным экспериментальным данным, взаимодействие ЧСА с тиолами плазмы крови затрагивает не только Cys34, но и некоторые остатки цистеина в составе дисульфидных связей [5], один из которых, Cys487 (Cys486 в молекуле БСА), находится в непосредственной близости от сайта Садлоу II. Влияние модификации Cys34 и других остатков цистеина на связывающие и каталитические свойства СА практически не изучалось. Цель представленного исследования – на примере модельного субстрата *n*-нитрофенилацетата (НФА) методами молекулярного моделирования впервые оценить влияние внутримолекулярных дисульфидных связей на связывающую и псевдоэстеразную активность БСА. Были изучены три модели БСА: нативный белок со свободной тиоловой группой в составе Cys34 и семнадцатью дисульфидными связями (Cys34-SH, БСА1), БСА с цистеинилированным Cys34 (Cys34-S-S-Cys, БСА2) и БСА с разорванной дисульфидной связью Cys475-Cys486 (Cys486-SH, БСА3). Был проведен молекулярный докинг молекулы НФА в сайт Садлоу II БСА, методом молекулярной динамики изучены геометрические характеристики комплексов БСА-НФА и оценены значения свободной энергии образования этих комплексов.

2. Методы

2.1. Подготовка трехмерных моделей молекул.

Трёхмерную модель НФА строили с помощью программы NuregChem 8.0.8 [6]. В качестве трёхмерной модели БСА использовали данные рентгеноструктурного анализа из базы данных белковых структур PDB, код модели 4jk4 [7]. Структуру оптимизировали методом минимизации энергии [8] с помощью программного пакета GROMACS 2018.1 [9]. Модель

цистеинилированного БСА конструировали следующим образом. На основании имеющейся информации о зарядах на атомах, длинах связей, значениях валентных и торсионных углов для разных типов атомов и атомных групп, представленной в базе данных программного пакета GROMACS [9], была описана топология аминокислотного остатка цистеина, связанного через дисульфидную связь со свободным цистеином. Подготовленная топология была добавлена в библиотеку структур аминокислот этого пакета. Затем провели молекулярный докинг молекулы свободного цистеина в сайт Cys34 молекулы БСА. На основании внесенной в библиотеку топологии из полученного методом молекулярного докинга комплекса программой GROMACS была сгенерирована структура цистеинилированного БСА, которую затем оптимизировали методом минимизации энергии. Для конструирования модели БСА с разрушенной дисульфидной связью в исходном pdb-файле БСА аминокислотные остатки Cys475 и Cys486 обозначали как цистеины со свободной тиоловой группой. На основании данных библиотеки топологий аминокислот программы GROMACS достраивали атомы водородов, затем сгенерированную структуру оптимизировали методом минимизации энергии.

2.2. Молекулярный докинг

Молекулярный докинг свободного цистеина и НФА в центры связывания БСА проводили с помощью программного пакета Autodock Vina 1.1.2 [10]. В качестве трехмерной структуры белка использовали модель БСА1. В исследуемом сайте связывания белка задавали область поиска размером $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$. Число запусков (exhaustiveness) принимали равным 10. Дозволяемый максимум разброса значений энергий конформаций в выходном файле (energy_range) принимали равным 3 ккал/моль. Количество наиболее оптимальных (энергетически выгодных) конформаций в выходном файле (num_modes) задавали равным 20. Конформацию комплекса белок-лиганд с минимальным значением (максимальным по модулю) энергии связывания отбирали для дальнейшего анализа. Для исследования комплексов НФА с БСА2 и БСА3 использовали те же координаты НФА, что и в комплексе НФА-БСА1. Продуктивность фермент-субстратного комплекса оценивали по расстоянию между карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода Туг410. Для того чтобы могла произойти нуклеофильная атака кислорода каталитической аминокислоты на атом фосфора параоксона, значение distP-O должно составлять примерно 0.4 нм или меньше.

2.3. Молекулярная динамика

Конформационные изменения комплексов БСА с НФА во времени рассчитывали методом молекулярной динамики в водном растворе с помощью программного пакета GROMACS в силовом поле GROMOS 56ab [9]. Использовали те же параметры вычислений, что и в [11]. Для поддержания в расчетном эксперименте постоянной температуры 300 К и постоянного давления 1 бар применяли термостат с масштабируемыми скоростями «V-rescale» [12] и баростат Паринелло-Рамана [13] с временными константами 0.1 пс и 2 пс, соответственно. Расчету предшествовала минимизация энергии системы методом скорейшего спуска [8] и релаксация системы длиной 1 нс. Время симуляции конформационных изменений комплексов методом молекулярной динамики (длина траектории) составило 30 нс с шагом интегрирования 0.002 пс.

2.3. Оценка свободной энергии образования белок-лигандных комплексов

Расчет свободной энергии связывания НФА с БСА проводили методом, сочетающим использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона – Больцмана (molecular mechanics – Poisson Boltzman surface area, MM-PBSA) [14] с помощью модуля g_mmpbsa [15], встроенного в программный пакет GROMACS. В этом подходе свободная энергия связывания ΔG_{bind} рассчитывается по формуле (1):

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{RL}} - (G_{\text{R}} + G_{\text{L}}) \quad (1),$$

где G – свободная энергия системы, индекс R ссылается на рецептор, L – лиганд, RL – комплекс рецептор-лиганд. Свободная энергия каждой молекулы или комплекса рассчитывается по формуле (2):

$$G_{\text{X}} = E_{\text{MM}} + G_{\text{solv}} - TS_{\text{MM}} \quad (2),$$

где индекс X ссылается на рецептор, лиганд или их комплекс, E_{MM} – потенциальная энергия молекулы или комплекса, рассчитанная методом молекулярной механики в вакууме, G_{solv} – свободная энергия сольватации, TS_{MM} – энтропийная составляющая свободной энергии системы в вакууме, T и S – температура и энтропия соответственно. Свободная энергия сольватации рассчитывается по формуле (3):

$$G_{\text{solv}} = G_{\text{polar}} + G_{\text{non-polar}} \quad (3),$$

где G_{polar} и $G_{\text{non-polar}}$ – вклад полярных и неполярных взаимодействий, соответственно, в свободную энергию сольватации. E_{MM} рассчитывается как сумма энергий электростатических взаимодействий и ван-дер-ваальсовых сил. Предыдущие исследования выявили, что расчет только энтальпийного компонента лучше коррелирует с экспериментальными данными, чем расчет полной свободной энергии [15]. Поэтому в нашей работе

мы не учитывали энтропийный компонент. Значение свободной энергии образования комплекса рассчитывали каждые 100 пс в течение симуляции. Итоговое значение рассчитывали как среднее \pm стандартное среднее отклонение.

3. Результаты и обсуждение

На первом этапе был проведен молекулярный докинг НФА в сайт Садлоу II БСА (рис. 1,а). Ароматическое кольцо и нитрогруппа НФА в полученном комплексе связываются в окружении алифатических аминокислот Leu490, Val425, Phe427, Leu459. В полученном комплексе расстояние между карбонильным атомом углерода НФА и гидроксильным атомом кислорода каталитического Tyr410 (distC-O) составляет 0.37 нм. При таком значении возможна нуклеофильная атака гидроксильного атома кислорода Tyr410 на карбонильный атом углерода НФА и ацетилирование каталитического тирозина.

Конформационные изменения комплексов БСА-НФА были рассчитаны методом молекулярной динамики. По полученным траекториям была построена зависимость значения distC-O от времени (рис. 1,б–1,г). Согласно полученным данным, комплекс НФА со всеми моделями БСА стабилен, положение НФА не меняется с течением времени, значение distC-O колеблется около 0.4 нм. По всей видимости, ни цистеинилирование Cys34, ни разрушение дисульфидной связи Cys475-Cys486 не влияет на вероятность псевдоэстеразной реакции в сайте Садлоу II.

Значения свободных энергий образования комплексов БСА-НФА, характеризующие аффинность белка по отношению к субстрату, составили -22.8 ± 1.8 , -22.5 ± 1.6 и -24.1 ± 1.5 ккал/моль для моделей БСА1, БСА2 и БСА3 соответственно. Таким образом, не было выявлено существенной зависимости сродства БСА к НФА от редокс-статуса Cys34 и Cys486. Можно отметить, что в случае модели БСА3 связывание чуть более сильное, чем в моделях БСА1 и БСА2 за счет усиления ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Наибольший вклад в энергию взаимодействия между НФА и сайтом Садлоу II вносят аминокислоты Tyr410, Phe487, Val425, Leu429 и Leu459.

Согласно полученным данным, состояние дисульфидной связи Cys475-Cys486 и цистеинилирование тиоловой группы Cys34 не оказывает существенного влияния на взаимодействие БСА с НФА. Схожий результат был получен в экспериментах *in vitro* с ЧСА [16]: окисление Cys34 пероксидом водорода слабо влияло на скорость гидролиза НФА альбумином человека. Наши предыдущие вычислительные эксперименты также показали, что окисление Cys34 до сульфеновой и сульфеновой кислоты практически не влияет на взаимодействие параоксона с сайтом Садлоу II ЧСА и БСА [11, 17].

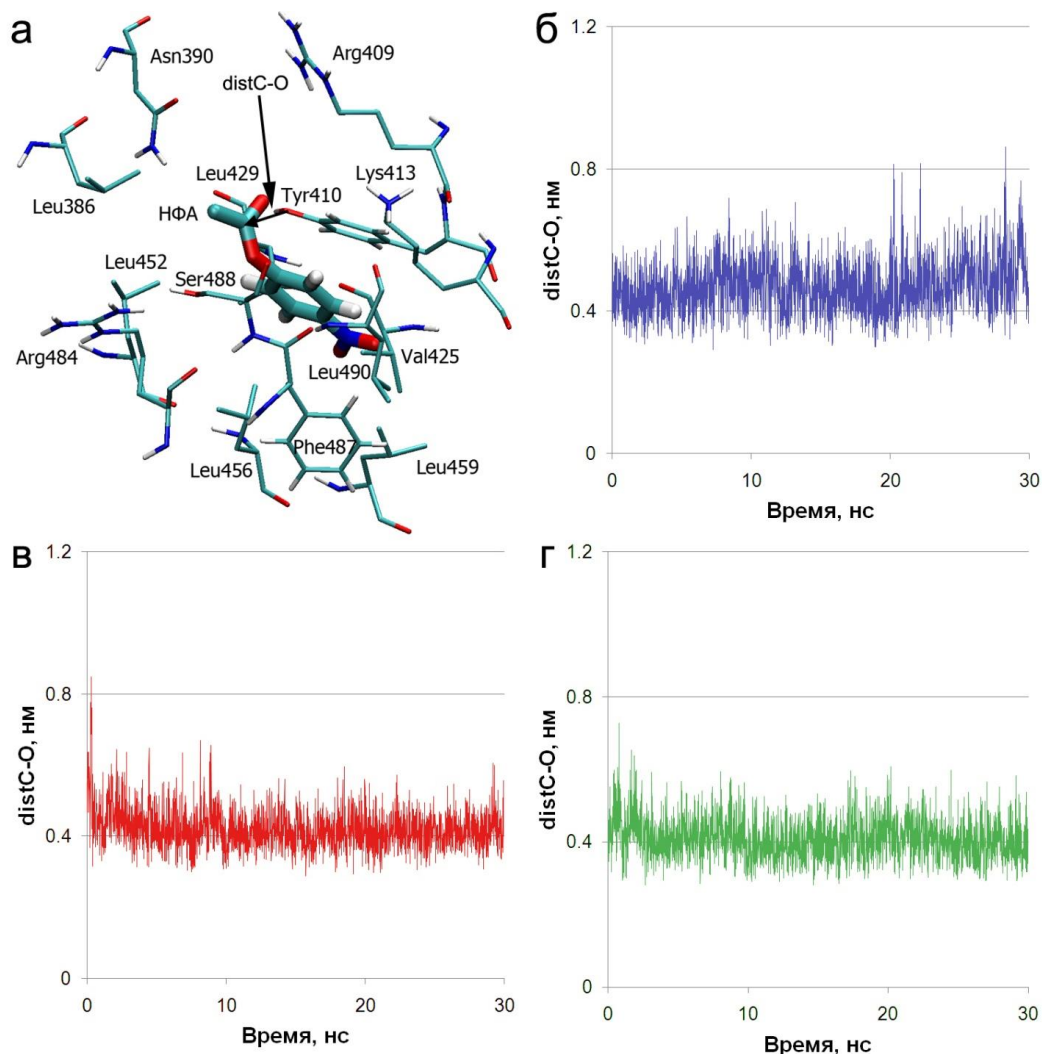


Рис. 1. Взаимодействие *p*-нитрофенилацетата (НФА) с сайтом Садлоу II бычьего сывороточного альбумина (БСА). (а) – конформация молекулы НФА в сайте Садлоу II БСА по данным молекулярного докинга; (а, б, в) – зависимость от времени расстояния между карбонильным атомом кислорода НФА и гидроксильным атомом кислорода Tyr410 сайта Садлоу II БСА с разной степенью окисления Cys34 и Cys486 (distC-O): (б) – нативный белок со свободной тиоловой группой в составе Cys34 и семнадцать дисульфидными связями, (в) – БСА с цистеинилированным Cys34, (г) – БСА с разорванной дисульфидной связью Cys475-Cys486.

Мы полагаем, что полученный результат может иметь значение с прикладной точки зрения. В плазме крови здоровых людей содержание альбумина с модифицированным остатком Cys34 составляет примерно 30 % [18]. При патологических состояниях, таких как заболевания почек или печени, уровень окисленного альбумина может возрасти до 70 % [19]. С другой стороны коммерческий альбумин, используемый в биохимических экспериментах, может быть частично окислен [20]. Поскольку модификация Cys34 и Cys486 слабо влияет на характеристики сайта Садлоу II по отношению к НФА, результаты биохимических экспериментов по изучению взаимодействия СА с НФА и схожими соединениями, можно экстраполировать на условия *in vivo*. Особый интерес представляет способность альбумина гидролизовать фосфорорганические

соединения (ФОС), в том числе параоксон, близкий по своей структуре к НФА [3]. Полученные в представленной работе данные могут быть использованы в клинической токсикологии при разработке адъювантной терапии отравлений и предупреждении их последствий.

4. Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290142-9 и поддержке гранта РФФИ № 19-34-90026.

5. Список литературы

1. Гончаров Н.В., Белинская Д.А., Разыграев А.В., Уколов А.И. О

- ферментативной активности альбумина. *Биоорг. химия*. 2015. Т. 41. № 2. С. 131–134.
2. Rabbani G., Ahn S.N. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 123. P. 979–990. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2018.11.053](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.053).
 3. 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. биох. физиол.* 2017. Т. 53. № 4. С. 241–250.
 4. Белинская Д.А., Гончаров Н.В. Теоретические и прикладные аспекты эстеразной активности альбумина. *Биоорг. химия*. 2020. Т. 46. № 3. С. 247–260.
 5. Nakashima F., Shibata T., Uchida K. A unique mechanism for thiolation of serum albumins by disulphide molecules. *J. Biochem.* 2020. V. 167. № 2. P. 165–171. doi: [10.1093/jb/mvz084](https://doi.org/10.1093/jb/mvz084).
 6. Froimowitz M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. *Biotechniques*. 1993. V. 14. P. 1010–1013.
 7. Sekula B., Zielinski K., Bujacz A. Crystallographic studies of the complexes of bovine and equine serum albumin with 3,5-diiodosalicylic acid. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013. V. 60. P. 316–324. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2013.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.004).
 8. Jensen J.H. *Molecular Modeling Basics*. Boca Raton: CRC Press, 2010. 190 p.
 9. 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*. 2015. V. 1–2. P. 19–25. doi: [10.1016/j.softx.2015.06.001](https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001).
 10. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. № 2. P. 455–461. doi: [10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334).
 11. Белинская Д.А., Баталова А.А., Гончаров Н.В. Влияние редокс-статуса бычьего сывороточного альбумина на его взаимодействие с параоксоном по данным молекулярного моделирования. *Ж. эвол. биох. физиол.* 2020. Т. 56. № 5. С. 376–379. doi: [10.31857/S004445292003002X](https://doi.org/10.31857/S004445292003002X).
 12. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 2007. V. 126. Article No. e014101. doi: [10.1063/1.2408420](https://doi.org/10.1063/1.2408420).
 13. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* 1981. V. 52. № 12. P. 7182–7190. doi: [10.1063/1.328693](https://doi.org/10.1063/1.328693).
 14. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 2015. V. 10. P. 449–461. doi: [10.1517/17460441.2015.1032936](https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936).
 15. 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.* 2014. V. 54. P. 1951–1962. doi: [10.1021/ci500020m](https://doi.org/10.1021/ci500020m).
 16. Anraku M., Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm Res.* 2001. V. 18. № 5. P. 632–639. doi: [10.1023/a:1011029226072](https://doi.org/10.1023/a:1011029226072).
 17. 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. *Биоорг. химия*. 2019. Т. 45. № 6. С. 640–649.
 18. Bocedi A., Cattani G., Stella L., Massoud R., Ricci G. Thiol disulfide exchange reactions in human serum albumin: the apparent paradox of the redox transitions of Cys34. *FEBS J.* 2018. V. 285. № 17. P. 3225–3237. doi: [10.1111/febs.14609](https://doi.org/10.1111/febs.14609).
 19. Nagumo K., Tanaka M., Chuang V.T., Setoyama H., Watanabe H., Yamada N., Kubota K., Tanaka M., Matsushita K., Yoshida A., Jinnouchi H., Anraku M., Kadowaki D., Ishima Y., Sasaki Y., Otagiri M., Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One.* 2014. V. 9. № 1. Article No. e85216. doi: [10.1371/journal.pone.0085216](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085216).
 20. 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.* 2017. V. 4. № 3. P. 251–254. doi: [10.1002/ams2.259](https://doi.org/10.1002/ams2.259).