



УДК 547.937 + 547.962.3

О РОЛИ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ
БИЛИРУБИН — АЛЬБУМИН*Кобзарева В. П., Шаповаленко Е. П., Колосов И. В.**2-й Московский государственный медицинский институт им. Н. И. Пирогова*

Методом кругового дихроизма исследованы взаимодействия в системе билирубин — альбумин в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. На основании сопоставления термодинамических данных со спектрами кругового дихроизма показано, что процесс слабого взаимодействия по мицеллярному механизму сопровождается значительными конформационными изменениями в альбумине. В процессе сильного взаимодействия особенно велика роль конформационных изменений в билирубине. При этом не исключаются частичные «микроскопические» изменения конформации белка в пределах того или иного участка макромолекулы или места связывания билирубина, о чем свидетельствуют термодинамические данные и процесс дальнейшего присоединения билирубина по механизму слабого взаимодействия.

В настоящее время все более широкое внимание привлекает проблема установления пространственного строения комплексов белков с различными органическими соединениями. Изучение физико-химических параметров связывания без исследования структуры таких комплексов явно недостаточно для выяснения молекулярных механизмов взаимодействия компонентов в комплексе и понимания роли таких комплексов в осуществлении важнейших физиологических функций в организме. Проблема определения структуры комплексов включает решение двух вопросов: о структуре белка в комплексе и конформации лиганда. Ценную информацию для выяснения этих вопросов дают методы кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения [1, 2].

Физиологически важная система билирубин — сывороточный альбумин изучена в этом отношении достаточно подробно лишь с точки зрения анализа конформационных изменений билирубина [3—6]. При взаимодействии с альбумином в билирубине индуцируется оптическая активность с появлением характерных эффектов Коттона в области длин волн поглощения билирубина (350—500 нм), связанная с диссимметричным положением его молекулы на белке и появлением в его структуре спиральной закрученности [7]. Инверсия знака эффекта Коттона в зависимости от рН [4], добавления электролитов [5] и спиртов [6] отражает значительную конформационную перестройку в билирубине. Роль конформационных изменений альбумина в этом процессе из литературных данных неясна.

Ранее методом растворимости нами было изучено гидрофобное взаимодействие билирубина с альбумином при малых концентрациях белка [8] и сильное и слабое взаимодействие при больших концентрациях белка [9]. Графическим методом Скэтчарда определены константы и число мест связывания и проведен расчет термодинамических параметров процесса.

**Термодинамические параметры для двух типов взаимодействия
билирубина с альбумином**
рН 6,75±0,05; I 0,15±0,03; 3–37° С, альбумин 20 мкМ

Тип	Т, К	n	K · 10 ⁻⁵ , M ⁻¹	ΔG°		ΔS°, кал/моль·град
				ккал/моль		
1	276	1,0	1,38±0,14	-6,47	-10,9±2,0	63,2±7,0
	293	1,0	6,21±0,66	-7,75		
	310	1,0	12,2±1,3	-8,60		
2	276	19,3±0,7	0,013±0,006	-3,93	2,6±0,3	4,6±1,0
	293	19,6±3,7	0,009±0,002	-3,94		
	310	18,8±5,3	0,008±0,003	-4,08		

Было показано, что в зависимости от рН раствора и концентраций билирубина и альбумина могут иметь место достаточно глубокие структурные изменения белка вплоть до его денатурации [8]. Представлялось интересным выяснить, какой вклад вносят конформационные превращения компонентов в системе в изменение энтропии и энтальпии процесса взаимодействия. Поэтому целью настоящей работы явился анализ спектров кругового дихроизма в области поглощения альбумина (205–240 нм) и билирубина (350–520 нм) в комплексах и сопоставление их с равновесными и термодинамическими данными в условиях максимального сродства (рН 6,75–7,0).

Для более строгих выводов был проведен машинный расчет параметров взаимодействия на ЭВМ БЭСМ-6 (из данных по растворимости [8]) для функции двух классов мест связывания вида:

$$\bar{n} = \frac{n_1 K_1 [B]}{1 + K_1 [B]} + \frac{n_2 K_2 [B]}{1 + K_2 [B]},$$

где K_1 и n_1 — константы и число мест связывания для сильного взаимодействия; K_2 , n_2 — для слабого взаимодействия; $[B]$ — концентрация несвязанного билирубина; \bar{n} — среднее координационное число. На основании рассчитанных значений K_1 и K_2 для различных температур проведен перерасчет термодинамических параметров (таблица). Следует отметить, что данные различаются несущественно и это в свою очередь подтверждает правомерность ранее сделанных расчетов для менее «строгой» (в математическом отношении) функции Скэтчарда [9]. Анализ термодинамических параметров свидетельствует, о том, что взаимодействие в системе сопровождается ростом энтропии, причем значительный выигрыш в энтропии происходит при сильном связывании первой молекулы билирубина, а при дальнейшем связывании последующих 18–20 молекул билирубина по механизму слабого взаимодействия этот эффект ослабляется.

В спектрах КД комплекса в видимой области имеются два эффекта Коттона: положительный с максимумом при 463 нм и отрицательный с минимумом при 405 нм с величиной молярной амплитуды порядка $(1-2) \cdot 10^5$ град·см²/дмоль. Вид спектра свидетельствует о консервативном эффекте КД или димерном характере оптической активности, большая величина вращательной силы говорит о наличии хромофоров не с асимметрическим центром, а скорее с внутренней диссимметрией или винтовой закрученностью [10, 11]. Молярная амплитуда эффектов Коттона комплекса имеет сложную зависимость от количества связанных с белком молекул красителя n (рис. 1), что является результатом хромофор-хромофорных взаимодействий в комплексе.

Большое значение имеет определение количества молекул красителя связанного диссимметрически на белке. Как следует из профилей спектров КД (рис. 1) при рН 7,0, максимум эллиптичности соответствует присоединению одной молекулы билирубина, представляющего собой систему двух конъюгированных дипиррольных единиц, взаимодействие

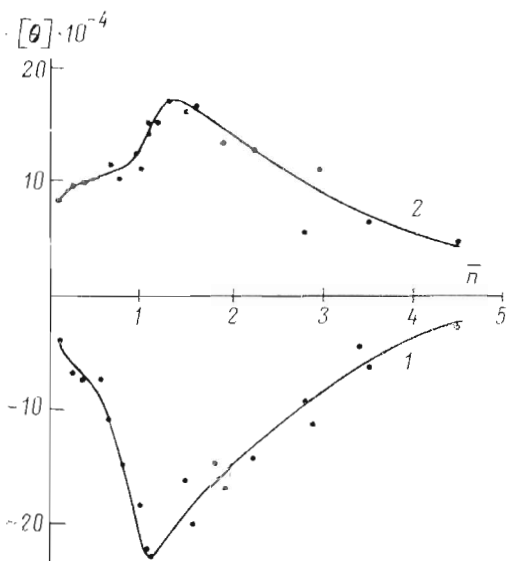


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость молярной амплитуды спектра КД комплекса билирубина с альбумином от его состава при длинах волн 405 нм (1) и 463 нм (2) (рН 7,0)

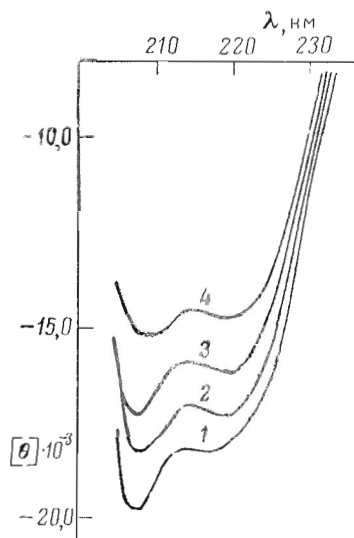


Рис. 2

Рис. 2. Спектры КД альбумина и его комплексов с билирубином. c_A и c_B : c_A — 20 мкМ и 0—15 (1); 20 мкМ и 37,2 (2); 2 мкМ и 36 (3); 2 мкМ и 45,5 (4)

между которыми будет вносить определяющий вклад в эффект Коттона в видимой области. Рост энтропии в системе при связывании первой молекулы билирубина происходит за счет разрыва внутри- и межмолекулярных водородных связей в билирубине (значительно стабилизирующих его структуру [12, 13]) и нового образования водородных связей между билирубином и α -спиралью белка. Дополнительным доказательством этого положения служит величина ΔH , равная $-10,9$ ккал/моль, что соответствует по порядку величины энергии водородных связей.

Присоединение последующих молекул билирубина к альбумину при соотношениях $c_B : c_A > 2$ (по-видимому, до 18—20 моль) не вносит дополнительного вклада в оптическую активность билирубина в комплексе (см. рис. 1) и протекает при участии гидрофобных взаимодействий с белком. Однако подготовкой к такому взаимодействию является, очевидно, сильное связывание первой молекулы билирубина.

Для выяснения роли конформационных изменений альбумина в этом процессе исследовали эффекты Коттона в области собственного поглощения пептидной связи 205—240 нм. Для чистого белка содержание α -, β -структур и клубка, рассчитанное по методу Чена — Янга [14] в области концентраций 1—60 мкМ, составляет $61,4 \pm 2,7$; $5,8 \pm 1,2$; $32,8 \pm 2,3\%$ соответственно и не зависит от концентрации белка в данной области, что согласуется с литературными данными [15].

При добавлении билирубина наблюдается уменьшение эллиптичности в области 205—240 нм без изменения общего профиля КД спектров альбумина (рис. 2). Изменения кривых КД зависят от общей концентрации альбумина и от соотношения концентраций $c_B : c_A$. При соотношениях $c_B : c_A < 10$ спектры КД комплексов практически идентичны таковым для чистого альбумина. Значительные изменения соответствуют соотношениям $c_B : c_A > 10$, при которых образуются слабые комплексы. Все это свидетельствует о сложном характере эффекта, индуцированного молекулами билирубина, и может быть связано с изменением конформации белка и с появлением консервативного эффекта КД красителя при хромофор-хромофорном взаимодействии единичных молекул.

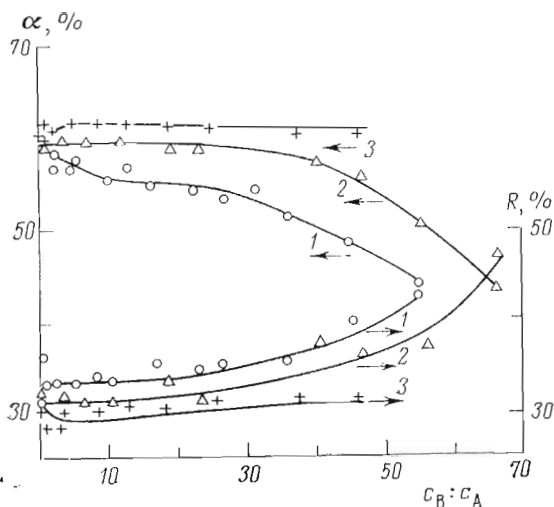


Рис. 3. Зависимость содержания α -структур и клубка (R) в альбумине от соотношения концентраций билирубина и альбумина. Альбумин 2,0 мкМ (1); 8,0 мкМ (2); 20 мкМ (3); билирубин 2—900 мкМ

Свободный билирубин ни в молекулярной, ни в мицеллярной форме оптически не активен в области 205—240 нм. Кроме того, как следует из рис. 1, комплексобразование по слабому механизму сопровождается значительным уменьшением вклада в оптическую активность билирубина в области 350—500 нм. Эти данные позволяют связать изменения спектров КД в ультрафиолетовой области с конформационным изменением белка. Расчет доли α -, β -структур и доли статистического клубка по методу Чена — Янга показывает, что конформационные изменения в альбумине связаны с уменьшением содержания спиральных структур (на 12—18%) по мере углубления комплексобразования (рис. 3).

Прирост энтропии в этих условиях невелик и определяется главным образом процессом гидрофобного связывания, сопровождаемого конформационным переходом в альбумине типа «глобула — клубок».

Гидрофобные взаимодействия с билирубином приводят к стабилизации клубковой конформации белка. Это положение согласуется с результатами работ Фельдштейна и Зезина [16, 17], изучавших конформации синтетических полипептидов в комплексах с поверхностно-активными веществами.

С увеличением общей концентрации альбумина уменьшается степень конформационных изменений в белке по мере добавления билирубина (рис. 3, 3). Очевидно, будет уменьшаться и вклад этих конформационных изменений в общий энтропийный эффект при связывании красителя. В этом случае существенный прирост энтропии в условиях сильного связывания первой молекулы билирубина будет связан прежде всего с конформационными изменениями в билирубине, т. е. образование водородных связей с единичными молекулами билирубина будет влиять на баланс электростатических и гидрофобных взаимодействий в полипептидной цепи в меньшей степени, чем гидрофобное взаимодействие с агрегатами молекул билирубина. Тем не менее нельзя исключить возможность «микроскопических» конформационных изменений в альбумине в пределах определенных его участков или места связывания первой молекулы билирубина, о чем свидетельствует процесс дальнейшего присоединения последующих 18—20 молекул билирубина по механизму слабого взаимодействия при меньшем энтропийном эффекте.

Таким образом, роль конформационных изменений микро- и макрокомпонентов в процессе их связывания различна и зависит от условий

и физико-химических параметров взаимодействия. Присоединение к белку единичных молекул красителя с большой константой сопровождается значительными конформационными изменениями микрокомпонента, гидрофобные взаимодействия с ассоциатами молекул красителя приводят в большей мере к конформационным изменениям макрокомпонента.

Экспериментальная часть

Спектры КД снимали на дихрографе-III Roussel-Jouan (Франция) в спектральных областях 205—240 и 350—520 нм. Прибор калиброван (+) — 10-камфоросульфоновой кислотой. Длина оптического пути 0,01—1 см, спектральная ширина полосы 2 нм. Исследование проводили в области концентраций альбумина и билирубина соответственно 1—60 и 1—900 мкМ. Для поддержания постоянного значения рН 6,75—7,0 использовали универсальные буферные растворы с постоянной ионной силой I $0,15 \pm 0,03$. Молекулярный вес человеческого сывороточного альбумина принимали равным 68 000, число аминокислотных остатков 580.

Количественное содержание α , β -структур и статистического клубка рассчитывали по методу Чена — Янга [14] в спектральной области 205—240 нм с интервалом 1 нм с машинной обработкой по методу наименьших квадратов. В качестве «реперных» брали спектры КД пяти белков (миоглобин, лизоцим, рибонуклеаза, папаин, β -лактогидрогеназа) с известным содержанием фрагментов (рентгеноструктурные данные) [18], близких по структуре к альбумину.

Средние молекулярные эллиптичности $[\theta]$, град·см²/дмоль) на остаток белка рассчитывали по формуле

$$[\theta] = \frac{33\Delta D\gamma_{117}}{c_A l},$$

где ΔD — разностная оптическая плотность КД; γ — чувствительность; l — длина оптического пути в дм; c_A — концентрация альбумина в г/см³; 117 — средний молекулярный вес аминокислотного остатка.

Авторы выражают искреннюю благодарность Н. В. Гнучеву и А. И. Полетаеву за помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blauer G., King T. E. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **31**, 678—684.
2. Schechter E. (1969) *Eur. J. Biochem.* **10**, 274—277.
3. Blauer G., King T. E. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 372—381.
4. Blauer G., Harmatz D., Snir J. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **278**, 68—88.
5. Blauer G., Harmatz D. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **278**, 89—100.
6. Blauer G., Lavie E. (1974) *FEBS Lett.*, **41**, 143—146.
7. Blauer G., Wagniere G. (1975) *J. Amer. Chem. Soc.*, **97**, 1949—1954.
8. Колосов И. В., Шаповаленко Е. П. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1660—1664.
9. Шаповаленко Е. П., Колосов И. В. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 514—522.
10. Beaven G. H., d'Albis A., Gratzer W. B. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **33**, 500—510.
11. Полетаев А. И. (1976) в сб.: *Молекулярная биология (Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР)*, т. 8, ч. 2, с. 180—241, М.
12. Bonnet R., Davies, J. E., Hursthouse M. B. (1976) *Nature (London)*, **262**, 326—328.
13. Manitto P., Monti D. (1976) *J. Clin. Soc. Chem. Commun.*, № 4, 122—123.
14. Chen V.-H., Yang J. T., Martinez H. M. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4120—4131.
15. Кузнецов А. Н., Гюльхаданян Г. В., Эберт Б. (1977) *Молекулярная биология*, **11**, 1057—1064.
16. Фельдштейн М. М., Зезин А. Б. (1974) *Молекулярная биология*, **8**, 142—152.
17. Фельдштейн М. М., Зезин А. Б., Кабанов В. А. (1974) *Молекулярная биология*, **8**, 218—226.
18. Болотина И. А. (1973) в сб.: *Молекулярная биология (Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР)*, т. 1, с. 61—104, М.

Поступила в редакцию
14.II.1978

После переработки
15.V.1978

ON THE ROLE OF CONFORMATIONAL CHANGES IN THE
BILIRUBIN — ALBUMIN SYSTEM

KOBZAREVA V. P., SHAPOVALENKO E. P., KOLOSOV I. V.

N. I. Pirogov 2-nd Medical State Institute, Moscow

The interactions in the system bilirubin — albumin were studied by circular dichroism method in ultraviolet and visible regions. Comparison of thermodynamic and CD data revealed that weak interactions by micellar mechanism are accompanied by considerable conformational changes in albumin. Upon strong interactions the conformational changes in bilirubin are essential, whereby partial local «microscopic» changes cannot be ruled out as evidenced by the thermodynamic data and further binding of bilirubin in frames of weak interactions.
