

The registration of dynamic contraction performances was done by conducting an acute experiment using non-anion anesthesia, dermatome, fasciotomy and denervation methods. The isolated muscle force and contraction productivity were studied by using a strain-gauge method to determine the stress-strain state of an isolated muscular preparation on the basis of an electric strain gage. Experimental chronic alcohol myopathy in laboratory rats was conducted the method of enterogastral injection with a catheter for 30 days. The study showed that chronic 30 day alcohol intoxicated rats results in at least 2 functional changes of contraction performances. The first is the need to increase the relaxation time for the possibility of an adequate muscular response to stimulating pulls. The second is the increase of the time of pre-tetanic periods of muscle force response under condition of modulated stimulation. This functional feature of myopathic muscles will be important for the adequate and correct realization of the central motor commands in a muscular system. This result illustrates that alcoholic myopathy will be primarily developed when performing accurate positioning movements and correcting precise, targeted changes in articular angles.

In addition, the insufficient length of relaxation period may be increased by fluctuational disorders of muscle dynamics meaning, the muscles inability to accurately fix the stationary sites of contraction. On the background of an increase in the pre-tetanic phase of contraction that will lead to systematic errors in precise positioning.

The research results can be used in clinical condition to characterize the locomotor dysfunction in patients with chronic alcoholic myopathy.

**Key words:** alcohol intoxication, muscle contraction, isolated muscle preparation, m. Gastrocnemius.

Стаття надійшла до редколегії  
22.04.2017 р.

УДК: 577.1:615

Ігор Щечкін,  
Тетяна Гуща

### Роль петлеподібних структур у конформаційній адаптації сироваткового альбуміну людини до зв'язування лігандів

Методами теоретичного конформаційного аналізу знайдено нову конформацію молекули сироваткового альбуміну людини, у якій переорієнтація субдомену Ia у глобулі пов'язана з конформаційним переходом петлеподібної ділянки 106–177. Аргументовано важливу роль такого переходу при утворенні комплексів білка з лігандом.

**Ключові слова:** глобула білка, домен, петлеподібна ділянка ланцюга, конформаційний аналіз, молекулярне моделювання.

**Постановка наукової проблеми та її значення.** Петлі та петлеподібні структури відіграють важливу роль у функціонуванні білків. Завдяки конформаційній гнучкості, петлі можуть самостійно зв'язувати ліганди або забезпечувати доступ лігандів до активних центрів [1]. У цьому дослідженні нас цікавило, наскільки тісно конформаційні зміни таких структурних елементів можуть бути пов'язані з перебудовою структури в більш крупних масштабах, зокрема впливати на переміщення один відносно іншого доменів білка.

Дослідження проводили на сироватковому альбуміні людини (САЛ), найпоширенішому білку системи кровообігу, відомому своєю винятковою здатністю до зв'язування й транспортування великого ряду лігандів – жирних кислот, метаболітів, ліків й інших хімічно різномірних сполук [2]. На сьогодні САЛ як важливий чинник фармакокінетичної поведінки багатьох лікарських препаратів став стандартною моделлю під час розробки та тестування *in silico* нових фізіологічно активних сполук [3]. Проте застосування такого підходу значною мірою залежить від доступності точних даних про конформаційні стани цього плазматичного білка.

**Аналіз досліджень цієї проблеми.** САЛ являє собою мономерний глобулярний білок і містить три структурно подібні спіральні домени I – III. Кожен із них поділяють на два субдомени – *a* і *b* [4]. Молекула сироваткового альбуміну людини, а також сироваткового альбуміну інших видів має гнучку структуру й легко змінює свою конформацію. Конформаційну гнучкість сироваткового альбуміну в різних умовах часто пов'язують із рухливістю його структурних доменів. Кристалграфічний аналіз

показав, що в молекулі САЛ існує більше десяти місць зв'язування жирних кислот, адсорбція яких приводить до глобальної зміни конформації білка [4]. Цей конформаційний перехід полягає в повороті доменів *I* і *III* як жорстких тіл відносно домену *II* як центра обертання та сприяє формуванню додаткових сайтів зв'язування завдяки звуженню щілини між рухомими доменами. Середнє відхилення кристалографічних координат крайніх субдоменів *Ia* і *IIIb* при повороті досягає 10 Å [4]. Цікаво, що при змінах рН і зв'язуванні фармакологічних лігандів гідродинамічний радіус молекул сироваткових альбумінів у розчині також змінюється на величину до 10 Å [5, 6]. Виникає питання: які структурні рухи ланцюга можуть забезпечити таке суттєве переміщення доменів в альбуміні? Адже досі нам був відомий лише один конформаційний стан незв'язаного з лігандами САЛ. Крім того, незважаючи на численні дослідження, невідома картина рухів окремих сегментів поліпептидного ланцюга САЛ.

У попередніх дослідженнях ми звернули увагу на особливе просторове розташування в нативній структурі субдомену *Ib* САЛ відрізка поліпептидного ланцюга 125–167, що містить як спіральні, так і неупорядковані елементи вторинної структури. У третинній структурі САЛ відрізок 125–167 має вигляд петлі. Тому далі такі відрізки первинної послідовності білка ми називатимемо *петлеподібними ділянками (ППД)*. Із допомогою числових методів моделювання нами знайдено відмінні від нативної конформації ППД 125–167 при незмінній просторовій структурі решти молекули [7]. У цих альтернативних конформаціях картина контактів ППД 125–167 із глобулою білка, зокрема із сусіднім субдоменом *Ia*, суттєво змінювалася, що може впливати на розміщення доменів в альбуміні.

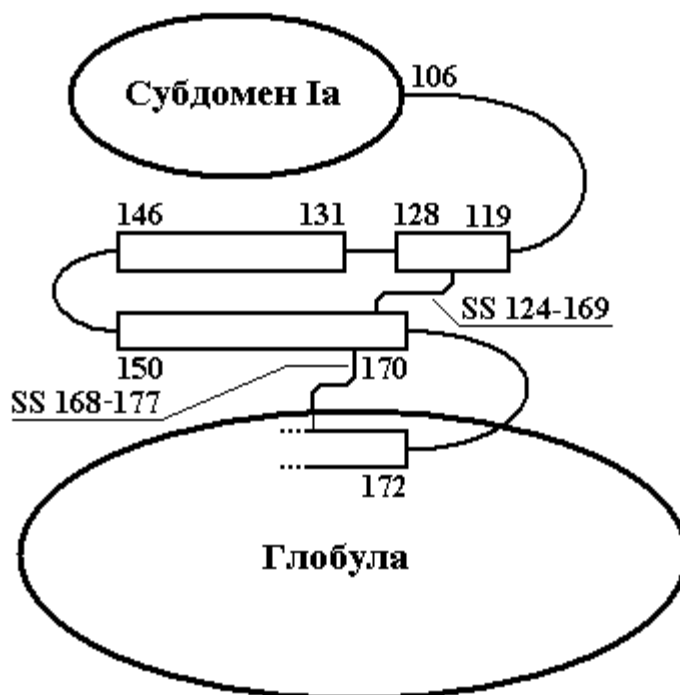
**Мета дослідження** – знайти можливе інше просторове розташування субдомена *Ia* в глобулі САЛ після зміни конформації міждоменної ППД.

**Матеріали й методи.** Дослідження проводили за допомогою комп'ютерних моделювань конформації сольватованого САЛ, саморобного програмного пакета *FlexiChain*. Програма *FlexiChain* призначена для конформаційного аналізу молекули в просторі двограних кутів. Рух у цьому просторі здійснюється на основі локальної градієнтної мінімізації. У розрахунках використано атомні координати САЛ із банку даних білкових структур *Brookhaven Protein Data Bank* з ідентифікатором 1АОБ, молекули А.

Ми шукали низькоенергетичну, тобто сумірну за енергією з нативною, конформацію модельної системи, що складається з жорсткого субдомену *Ia* і жорсткої решти частини молекули – *глобули*, сполучених гнучкою ППД 106–177, як показано на рис. 1. ППД 106–177 містить спіралі *Ib-h1*, *Ib-h2*, *Ib-h3* і частину 173–177 спіралі *Ib-h4* уключно з тіоловим містком, а також фрагменти 106–118, 129–130, 147–149, 171–172 без певної вторинної структури. У моделі повністю варіюються конформації всіх указаних елементів ППД за виключенням відрізка 173–177, у якому гнучкими залишено лише бічні ланцюги. Отже, ППД 106–177 уключає окреслену вище ППД 125–167 й охоплює разом із частково гнучким фрагментом 173–177 майже весь субдомен *Ib*. Субдомен *Ia* в такій моделі має можливість переміщуватися відносно решти білка й змінювати глобальну конформацію молекули.

У вихідній структурі ППД 106–177 ми використали одну з отриманих раніше [7] конформацій її складової ППД 125–167, у якій ППД не утворює жодного контакту з *глобулою* білка. Однак у цій конформації вторинна спіральна структура ділянки зруйнована. Ураховуючи відому стабільність елементів вторинної структури, ми прагнули відновити елементи спіральної вторинної структури при пошуку нової конформації. Для цього перетворили вихідну конформацію ППД 106–177, відновивши вторинну спіральну структуру на ділянці 125–167 шляхом прямого завдання відповідних значень двограних кутів основного ланцюга. Кінці петлі стягнули мінімізацією параболічного потенціалу, варіюючи лише ті торсійні кути основного ланцюга, які не належать до спіральних ділянок. При цьому вся решта білка залишалася жорсткою, а субдомен *Ia* не зміщувався відносно *глобули*. Отримана таким чином структура САЛ суттєво відрізняється від нативної тим, що ППД 106–177 має витягнуту форму й експонована в зовнішнє середовище.

Заново побудована структура САЛ виявилася суттєво неоптимальною з погляду енергії. Її проста оптимізація могла б привести до небажаного значного розгортання поліпептидного ланцюга білка. Тому на першому етапі ми здійснили релаксацію внутрішньомолекулярної енергії власне ППД 106–177, зафіксувавши її кінці. Після цього конформаційний аналіз проводили в рамках моделі, у якій ППД 106–177 розглядали як гнучку зв'язку між жорстким субдоменом *Ia* і рештою молекули.



**Рис. 1.** Схематичне зображення використаної моделі молекули САЛ. Прямокутники – елементи вторинної структури з відновленою спіральністю; лінії – ділянки білкового ланцюга без певної вторинної структури та тіолові містки (SS), які варіювались; еліпси – фрагменти молекули, структура яких не варіювалась у процесі розрахунків і відповідала рентгеноструктурним координатам

Локальна мінімізація енергії, що стартує з певної випадкової конформації, зазвичай, швидко закінчується в найближчому до стартової точки мінімумі, який відповідає так само енергетично сильно напруженому стану. Для подолання цієї перешкоди ми використали оригінальний метод пошуку стабільної конформації, запропонований нами раніше [7]. Метод полягає в *альтернуванні* складових частин функції, яка підлягає мінімізації. У ролі таких компонентів для вибраної тут модельної системи ми взяли три наступні: 1) енергію  $E$  парних внутрішньомолекулярних взаємодій; 2) потенціал  $C$ , що стягує кінці ППД 106–177 та 3) спеціальний потенціал  $H$  для утримання спіральності вторинної структури. Отже, функцію, яка підлягає мінімізації, представлено у вигляді суми:

$$f = k_c C + k_e E + k_h H, \quad (1)$$

де  $k_c$ ,  $k_e$ ,  $k_h$  – коефіцієнти ослаблення.

У співвідношенні (1) енергію  $E$  розраховували з використанням силового поля AMBER, файл параметрів – *amber96.prm* [http://amber.scripps.edu]. На завершальному етапі до внутрішньобілкової енергії додано енергію сольватації, яку обчислювали відповідно до моделі неявного розчинника GB/SA [8, 9]. Значення  $C$  визначали як суму потенціалів стягування двох існуючих у моделі тіолових містків 124–169 і 168–177 між залишками цистеїну, а на етапі релаксації ППД 106–177 до них також додавали потенціал, який притягає кінець ППД 106–177 до відповідного місця на *глобулі*. Для розрахунку  $H$  використано параболічний стягуючий потенціал.

У ролі засобу мінімізації функції  $f$  ми застосували комбінацію стандартного градієнтного методу (Флетчера-Давидона-Пауелла) і методу ярів [10], що, як показує наш досвід, дає змогу досягти більш низьких значень мінімізованої функції, ніж ті, які отримуються при використанні самого лише градієнтного методу.

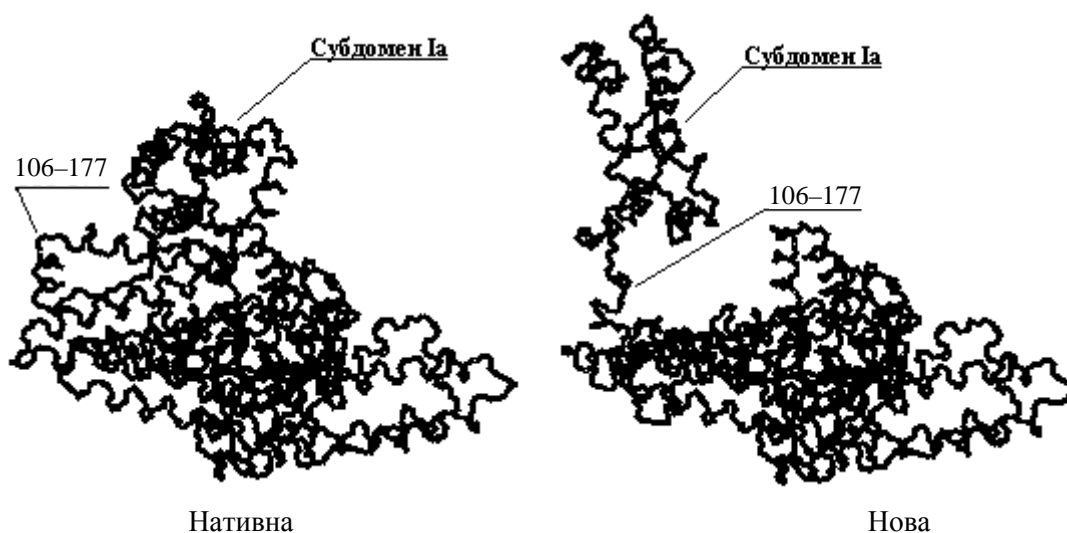
Проведено серію сеансів мінімізації, у яких коефіцієнти ослаблення у співвідношенні (1) змінювались у діапазоні від 0 до 1. Сеанси мінімізації згруповано по три, тобто за числом складових у

рівнянні (1). У сеансах однієї групи кожному з коефіцієнтів ослаблення по черзі надавали одне й те саме постійне значення. При переході від однієї групи до наступної постійне значення коефіцієнта ослаблення змінювалося. При цьому реалізовано два варіанти. В одному варіанті лише один виділений коефіцієнт задавався меншим за одиницю, ослаблюючи таким чином внесок відповідної компоненти функції  $f$ , у той же час інші компоненти брали участь у функції повністю. В іншому випадку – навпаки, однаковою мірою ослаблялися всі, крім однієї, виділеної компоненти. Варто вказати, що значення 0 коефіцієнта ослаблення відповідає режиму конформаційного пошуку методом *альтернування* [7], а значення 1 – режиму локальної мінімізації повної цільової функції. Тому запропонований алгоритм мінімізації з варіацією коефіцієнтів має характер визначення глобального мінімуму й певним чином нагадує алгоритм модельного відпау.

Потрібно зазначити, що в запропонованій нами процедурі *альтернування* енергії важливе значення має режим зміни коефіцієнта ослаблення залежно від порядкового номера сеансу мінімізації. Так, на етапі релаксації ППД 106–177 ми задавали лінійну залежність коефіцієнта ослаблення від номера сеансу, а на етапі оптимізації положення субдомену  $Ia$  коефіцієнт ослаблення змінювався пропорційно другому й навіть четвертому ступеню від номера сеансу мінімізації. При використанні останнього варіанта зміни коефіцієнта ослаблення значна частина початкових сеансів мінімізації відбувалась у режимі конформаційного пошуку.

Крім оптимізації геометрії структури, у якій ППД 106-177 попередньо виведено назовні з білка, нами проведено мінімізацію енергії нативної конформації в такій самій моделі. Для нативної конформації процес мінімізації закінчився швидко, при цьому ні геометрія системи, ні її енергія суттєво не змінилися, що дає підставу бути впевненим в адекватності використаного силового поля експериментально отриманим структурним даним.

**Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження.** На рис. 2 зображено отримані нами оптимізовані структури САЛ у новій стабільній і нативній конформаціях. Спиральна вторинна структура в новій конформації відсутня, а субдомен  $Ia$  повернутий відносно решти молекули. При цьому контакти, які існували між субдоменом і ППД 106–177 у нативній конформації, у новій конформації відсутні.



**Рис. 2.** Просторова структура САЛ у нативній і новій конформаціях. Показано розміщення петлеподібної ділянки 106–177 та субдомену  $Ia$

Результати розрахунків повної потенціальної енергії та її складових для обох конформацій наведено в табл. 1. Ці дані свідчать, що повна потенціальна енергія нової конформації дещо нижча, ніж енергія нативної, що зумовлено більш ефективною поляризаційною взаємодією з розчинником. Водночас стерична напруженість (ван-дер-ваальсова взаємодія) нової структури вища, ніж у нативної, а електростатичні й гідрофобні взаємодії залишилися майже без змін.

Таблиця 1

**Повна потенціальна енергія та її складники для двох конформацій молекули САЛ (ккал/моль)**

Конформація	Повна енергія	Вандер-ваальсова	Електро-статична	Сольватація	
				поляризаційна	гідрофобна
Нативна	-35622.5	-30.5	-3.1	-36456.5	523.0
Нова	-41514.9	470.0	-2.48	-42934.8	529.4

У табл. 2 представлено розраховані значення різних складників енергії взаємодії між окремими фрагментами молекули САЛ для кожної з конформацій. Внутрішньобілковий складник енергії визначався сумуванням атом-атомних взаємодій між атомами молекули білка та торсійного потенціалу ланцюга. Поляризаційний компонент розраховувалася як енергія поляризації розчинника атомами білка. Гідрофобний складник визначався взаємодіями, пов'язаними з доступністю для розчинника тих чи інших ділянок поверхні білка. Порівняння величин цих складових частин у двох конформаціях показує, що стерична напруженість зазнає найбільших змін усередині ППД 106–177, а різниця в поляризаційній взаємодії з розчинником зумовлена переважно змінами взаємного розміщення ППД 106–177 та субдомену *Ia* відносно глобули.

Таблиця 2

**Енергія взаємодій між різними фрагментами молекули САЛ**

Пара фрагментів	Вид взаємодій	Енергії взаємодії, ккал/моль	
		у нативній конформації	у новій конформації
<i>Ia-ППД</i>	Внутрішньобілкові	-1.2	-0.56
	Поляризаційні	421.6	-440.4
	Гідрофобні	6.0	-4.0
<i>Ia-Глобула</i>	Внутрішньобілкові	-0.99	41.5
	Поляризаційні	3315.5	-3575.2
	Гідрофобні	6.7	-13.1
<i>ППД-ППД</i>	Внутрішньобілкові	-4.7	297.3
	Поляризаційні	398.5	-2900.2
	Гідрофобні	13.2	-9.5
<i>ППД-Глобула</i>	Внутрішньобілкові	-2.1	83.8
	Поляризаційні	6764.7	-9695.2
	Гідрофобні	18.1	-4.6

**Висновки та перспективи подальшого дослідження.** У результаті проведеного конформаційного пошуку отримано нову конформацію молекули САЛ, яка за просторовою структурою суттєво відрізняється від нативної, але за рівнем стабільності близька до неї. При переході від нативної до нової конформації відбувається перерозподіл взаємодій у системі білок–вода. При цьому спостерігається зростання напруженості внутрішньобілкових взаємодій, яке компенсується за рахунок більш ефективної сольватації молекули. При конформаційному переході зміна просторової структури петлеподібної ділянки 106–177 і її розміщення відносно глобули супроводжується зміною розташування субдомену *Ia* відносно решти молекули й зміною енергії взаємодії між цими структурними одиницями. Це дає підставу припустити, що петлеподібні ділянки в білках можуть служити «защипками», які модулюють доменну рухливість. Зокрема, такий механізм може відігравати суттєву роль у глобальній зміні конформації САЛ під час утворення ним комплексів із жирними кислотами.

Подальше використання моделі взаємної переорієнтації гнучкої ППД і жорстких *Ia* та глобули дасть змогу краще зрозуміти механізм адаптації структури САЛ до зв'язування лігандів.

Автори висловлюють подяку Обчислювальному центру Київського національного університету ім. Т. Г. Шевченка за надані обчислювальні ресурси.

Джерела та література

1. Hu X., Stebbins C. E. Dynamics of the WPD loop of the Yersinia protein tyrosine phosphatase / X. Hu, C. E. Stebbins // *Biophys. J.* – 2006. – V. 91, N 3. – P. 948–956.
2. Ascenzi P. Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin / Paolo Ascenzi, Alessio Bocedi, Stefania Notari [et al.] // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* – 2006. – N 6. – P. 483–489.
3. Zsila F. Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking / F. Zsila, Z. Bikadi, D. Malik [et al.] // *Bioinformatics.* – 2011. – V. 27, N 13. – P. 1806–1813.
4. Bhattacharya A. A. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin / A. A. Bhattacharya, T. Grune, S. Curry // *J. Mol. Biol.* – 2000. – N 303. – P. 721–732.
5. Varga N. Comprehensive study on the structure of the BSA from extended-to aged form in wide (2–12) pH range / N. Varga, V. Hornok, D. Sebok [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2016. – N 88. – P. 51–58.
6. Ferrer M. L. The conformation of serum albumin in solution: A combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modeling study / M. L. Ferrer, R. Duchowicz, B. Carraso [et al.] // *Biophys. Journal.* – 2001. – N 80. – P. 2422–2430.
7. Щечкин И. Е. Метод конформационного поиска для длинных полипептидных цепей, основанный на анализе энергетической функции / И. Е. Щечкин, Т. О. Гуца // *Доповіді НАН України.* – 2007. – № 8. – С. 176–182.
8. Qiu D. The GB/SA Continuum Model for Solvation. A Fast Analytical Method for the Calculation of Approximate Born Radii / D. Qiu, P. S. Shenkin, F. P. Hollinger [et al.] // *J. Phys. Chem. A.* – 1997. – N 101. – P. 3005–3014.
9. Still W. C. Semiempirical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics / W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1990. – N 112. – P. 6127–6129.
10. Гельфанд И. М. Принцип нелокального поиска в системах автоматической оптимизации / И. М. Гельфанд, М. Л. Цейтлин // *Доклады Академии наук СССР.* – 1961. – Т. 137, № 2. – С. 295–298.

**Щечкин Игорь, Гуца Татьяна. Роль петлеобразных структур в конформационной адаптации сывороточного альбумина человека к связыванию лигандов.** Методами теоретического конформационного анализа найдена новая конформация молекулы сывороточного альбумина человека, в которой изменение пространственного расположения субдомена Ia в глобуле белка сопровождается конформационным переходом петлеобразного участка 106–177, принадлежащего субдомену Ib и непосредственно примыкающего к субдомену Ia. Новая конформация отличается от исходной отсутствием контактов между участком 106–177 и субдоменом Ia, меньшей потенциальной энергией и большей сольватацией молекулы. Показано, что петлеобразные структуры в белках могут служить пусковым механизмом, модулирующим доменную подвижность, а конформационный переход участка 106–177 может играть существенную роль в глобальном изменении конформации САЧ при образовании им комплексов с жирными кислотами. Последующее применение построенной молекулярной модели САЧ позволит лучше понять механизм адаптации его структуры к связыванию лиганда.

**Ключевые слова:** глобула белка, домен, петлеобразный участок цепи, конформационный анализ, молекулярное моделирование.

**Shchekhin Igor, Hushcha Tetyana. The Role of Loop-like Structures in the Conformational Adaptation of Human Serum Albumin to Ligands Binding.** A new conformation of human serum albumin molecule has been found using theoretical conformational analysis methods. One peculiarity of the new conformation as compared to the native structure is a change of Ia domain spatial location with respect to the whole protein globule that is accompanied with a conformational change of the loop-like chain fragment 106–177. The fragment belongs to subdomain Ib and is adjacent to subdomain Ia. The new conformation differs from the original one by the absence of contacts between the fragment 106–177 and subdomain Ia, as well as by lower potential energy and higher solvation. It has been revealed that loop-like structures in proteins may possibly initiate and modulate mobility of domains, and the conformational transition of the chain fragment 106–177 may play essential role in the global conformational change of HSA when binding fatty acids. Further application of the developed model of HSA molecule will allow better understanding the mechanism of the protein structure adaptation to ligand binding.

**Key words:** protein globule, domain, loop-like chain fragment, conformational analysis, molecular modeling.

Стаття надійшла до редколегії  
19.04.2017 р.