

Humant serumalbumin: nyt om en gammel bekendt

Lektor Ulrich Kragh-Hansen

Aarhus Universitet, Institut for Medicinsk Biokemi

Resume

Humant serumalbumin er et vigtigt transport- og depotprotein for en lang række endogene og eksogene forbindelser. Liganderne er især positivt ladede uorganiske ioner og negativt ladede eller elektronegative organiske molekyler. Binding til albumin af en ikke-bindende forbindelse kan opnås ved at koble denne til en ligand, såsom en fedtsyre. Proteinet kan bruges til ekstrakorporal afgiftning. Især arbejder med albuminmutanter og krystallografiske studier af albumin-ligand-komplekser har givet meget ny viden om bindingssteders lokalisation og struktur og om mulige ligandinteraktioner. Albumin ser endvidere ud til at være den kvantitativt vigtigste cirkulerende antioxidant. Det multifunktionelle protein har desuden enzymatiske egenskaber, der formentlig kan udnyttes til at konvertere prodrugs til aktive lægemidler.

Humant serumalbumin (HSA) er det kvantitativt vigtigste protein i blodplasma. Det produceres i leveren, som syntetiserer og secerer ca. 14 g albumin pr. døgn. En voksen person indeholder ca. 360 g af proteinet med en tredjedel i plasma og to tredjedele i interstitielvæsken. Selv om det meste HSA således befinder sig ekstravaskulært, er proteinets koncentration dog højest i blodbanen (ca. 40 g/l plasma, ca. 0,6 mM). Dette er baggrunden for, at det kan bidrage med ca. 80% af plasmas kolloidosmotiske tryk [1]. HSA er et globulært molekyle dannet af en enkelt polypeptidkæde bestående af 585 aminosyrer. Otteoghalvfems af aminosyrerne er sure, og 83 er basiske [1]. Ud over at disse samt de 16 histidiner giver proteinet en vis bufferkapacitet, bevirker de også, at HSA er meget vandopløseligt. Forskellen i antallet af sure og basiske aminosyrer er baggrunden for, at molekylet har en netto negativ ladning ved fysiologisk pH; nettoladningen er ca. -15. Denne nettoladning og den høje koncentration gør, at HSA er hovedårsagen til Donnan-effekten i kapillærene.

At HSA's ligandbindende egenskaber har stor fysiologisk, farmakologisk og farmaceutisk betydning, afspejles i det store antal artikler, der i tidens løb er blevet publiceret om emnet; for oversigtsartikler, se for eksempel [1-4]. Denne egenskab bevirker, at proteinet kan fungere som et transportprotein for f.eks. fedtsyrer og bilirubin, men også som et depotprotein over for andre ligander såsom Ca^{2+} . Set fra ligandernes side kan bindingen bevirke øget opløselighed i vandigt miljø (fedtsyrer), reduceret eller ophævet toksicitet (bilirubin) og beskyttelse mod oxidation (umættede fedtsyrer). Inden for de

senere år har albumins bindende egenskaber dannet grundlaget for udvikling af forskellige metoder af klinisk interesse. Desuden har arbejder med især rekombinante mutanter og røntgenkrystallografiske studier over albumin-ligand-komplekser givet meget ny viden på det molekylære plan. Man er også blevet klar over, at proteinet er en meget vigtig antioxidant, og at det udøver denne funktion på forskellig vis. Desuden er HSA's enzymatiske egenskaber blevet studeret nøjere, for selv om det enkelte albuminmolekyle måske ikke er så effektivt, bevirker den høje albuminkoncentration i blodet, at den samlede effekt er ganske betragtelig. Så betragtelig, at HSA formentlig kan bruges til at konvertere *prodrugs* til aktive terapeutika.

Metode

Denne artikel er baseret på egne arbejder samt på database-søgninger i PubMed. Som søgeord er brugt *albumin* kombineret med navnet på de enkelte ligander eller med *ligand*, *binding*, *fatty acid*, *oxidant* eller *enzyme*.

Ligandbinding

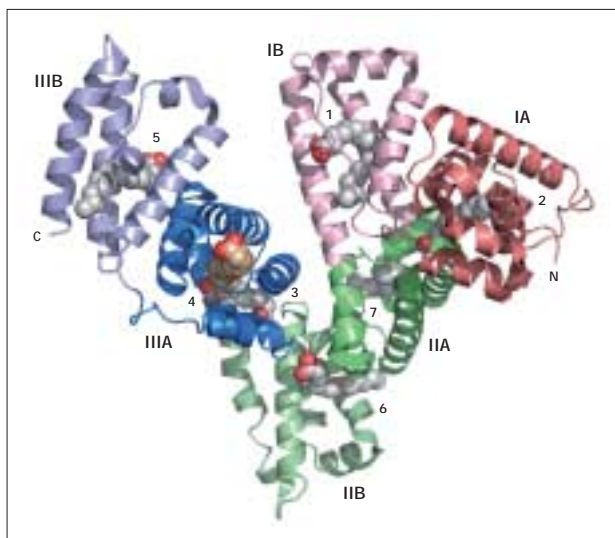
Uorganiske ioner

HSA kan binde uorganiske kationer på mindst fire forskellige måder: 1) Cu^{2+} , Ni^{2+} og Co^{2+} bindes til et velkarakteriseret sæde i den N-terminale ende af proteinet [1, 5], 2) Ag^+ , Au^+ og Hg^{2+} bindes til HSA's eneste frie cysteinrest (position 34) [1, 3], 3) Zn^{2+} bindes med høj affinitet ($K_A = 10^7$ - 10^8 M^{-1}) til et sted dannet mellem domæne I og domæne II (HSA har tre domæner, herom senere) [6] og 4) Ca^{2+} og Mg^{2+} associeres med lav affinitet til en serie bindingssteder, hvis lokalisation endnu ikke er klarlagt [1, 7].

Selv om det kun er ca. 10% af plasmas kobberioner, der bindes til HSA, har bindingen dog praktisk betydning. For eksempel er hunde, hvis albumin ikke har ovennævnte høj-

Albuminfunktioner

- Ligandbinding
- Antioxidation
- Katalyse
- Kolloid osmotisk tryk
- Donnan-effekt
- Buffervirkning



Figur 1. Krystalstrukturen af rekombinant humant serumalbumin med bundet oleat. Nummereringen af de syv bindingssteder er taget fra [11]. Fedtsyrens kulstof- og iltatomer er farvet henholdsvis grå/brun og rød. Albumins tre domæner er angivet med farverne rød (I), grøn (II) og blå (III); A-subdomænerne har en mørkere farve end de tilsvarende B-subdomæner. Proteinet har dimensionerne $80 \times 80 \times 80 \text{ \AA}$ og en tykkelse på 30 \AA . N og C repræsenterer henholdsvis den N-terminale og den C-terminale ende. Figuren er lavet med PyMol på basis af atomkoordinaterne 1gni fra Brookhaven Protein Data Bank.

affinitetsbindingssted ($K_A = 10^{16} \text{ M}^{-1}$ [1]), mere udsatte for kobberforgiftning end mennesker [1]. Proteinets evne til at binde Co^{2+} kan formentlig danne grundlaget for en diagnostisk test. Myokardial iskæmi resulterer nemlig i en betydelig nedsættelse af HSA's Co^{2+} -bindende evne, som er hurtigt og nemt at bestemme, allerede inden nekrose indtræder [8].

I modsætning til kationer bindes så godt som ingen anioner til HSA. Dog kan det nævnes, at Cl^- bindes med lav affinitet ($K_A = 10^2\text{-}10^3 \text{ M}^{-1}$).

Endogene ligander

Røntgenkrystallografiske studier af HSA og af dets rekombinante form (rHSA) viser, at proteinet er opbygget af tre domæner (I-III), som hver især kan opdeles i to subdomæner (A og B) (Figur 1). 67% af polypeptidkæden er udformet som α -helix, hvorimod proteinet ikke indeholder foldebladsstruktur (β -sheet) [3]. Tilstedeværelsen af 17 disulfidbroer er i høj grad med til at udforme og stabilisere molekylet. Resultaterne af andre studier tyder på, at albumins struktur i neutral opløsning ligner den krystalinske meget – eller måske er magen til [9]. En af de kendte typer ligander, som HSA kan binde, er alifatiske fedtsyrer, og man kender nu den krystalinske struktur af syv fedtsyre-HSA-komplekser [10-11]. Figur 1 viser strukturen af rHSA med den kvantitativt vigtige oliesyre (egentlig oleat). Som figuren viser, har man fundet syv bindingssteder for oleat. Palmitat, stearat og arakidonat bindes til de samme syv steder. Laurat og myristat kan bindes til yderligere et sted, hvorimod decanoat kan bindes til tre ekstra steder. Af de syv steder befinder nummer 1, 4 og 7 sig i et enkelt subdomæne,

mens de resterende fire er dannet af aminosyresidekæder fra mere end et subdomæne. Nummer 6 er udformet som en rende på proteinets overflade, hvorimod de øvrige steder er placeret i det indre af molekylet. Bindingsstederne er typisk dannet af hydrofobe og polære/ladete aminosyresidekæder, som kan interagere med henholdsvis den alifatiske kæde og carboxylatgruppen af fedtsyrerne.

Bindingskonstanterne for mættede fedtsyrer stiger med kædelængden, hvorimod dobbeltbindinger reducerer konstanten [1]. I blodbanen bærer HSA typisk 1-2 molekyler fedtsyrer. Antallet kan dog stige op til seks molekyler under kraftigt muskelarbejde eller anden adrenerg stimulation [1]. Dette betyder, at fedtsyrerne typisk binder sig til deres højaffinitetsbindingssteder ($K_A = 10^6\text{-}10^8 \text{ M}^{-1}$) og ikke til alle de steder, som man har fundet krystallografisk. Nyere forsøg med rHSA-mutanter tyder på, at fedtsyrernes kædelængde også har betydning for hvilke(t) sted(er), der er højaffine/t. For eksempel bindes octanoat og decanoat højaffint til sted 4 (Figur 1), laurat til stederne 4 og 5 og myristat til stederne 5 og 1 (eller 2) [12]. Denne type oplysninger er meget relevante, når man skal vurdere risikoen for ligandinteraktioner.

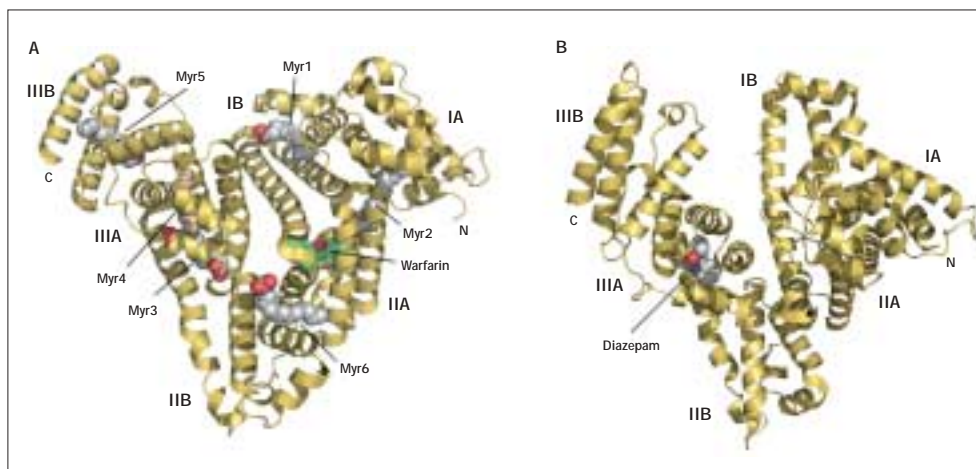
Selv om hæmopexin og især tyroxinbindende globulin er de primære transport- og depotproteiner for henholdsvis hæmin og L-tyroxin bindes forbindelserne også til HSA, og krystalstrukturene af disse komplekser er nu også klarlagte. Hæmin bindes med høj affinitet ($K_A = 10^8 \text{ M}^{-1}$) i subdomæne IB – i konkurrence med fedtsyrer [13]. L-tyroxin bindes til fire steder, højaffint ($K_A = 10^6 \text{ M}^{-1}$) til subdomæne IIA – ligeledes i konkurrence med fedtsyrer [14]. HSA binder også bilirubin, biliverdin, ioner af galde-syrer og L-tryptofan samt visse steroider og eicosanoider, men krystalstrukturene af disse komplekser er endnu ikke blevet studeret. Resultaterne af andre typer studier tyder dog på, at bilirubin bindes højaffint ($K_A = 10^8 \text{ M}^{-1}$) i subdomæne IIA, og at L-tryptofan ($K_A = 10^4 \text{ M}^{-1}$) bindes i subdomæne IIIA [4]. HSA fungerer også som cirkulerende depot for nitrogenoxid (NO). Molekylet bindes ved at danne en S-nitrosotiol med proteinets enlige frie cysteinrest i position 34. Endelig kan det nævnes, at grampositive bakterier kan bindes til albumin via overfladeproteiner og dermed øge deres virulens. Visse streptokokker bindes således ved hjælp af et såkaldt GA-modul (*protein G-like albumin binding module*) til ydersiden af HSA's domæne II [15].

Eksogene ligander

HSA kan binde en lang række farmaka og dermed påvirke deres fordeling, metabolisme og udskillelse. Proteinets har et begrænset antal bindingssteder for organiske ligander, så farmaka bindes typisk til steder, som også kan binde fedtsyrer. Højaffin binding af et stort antal negativt ladete eller elektro-negative farmaka sker som regel til et af to områder [4, 16]. Det ene har centrum i subdomæne IIA og kan bl.a. binde phenylbutazon, tolbutamid, indomethacin, valproat og iodipamid samt warfarin (Figur 2A). Af figuren ses også, at war-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

Figur 2. A. Krystalstrukturen af rekombinant humant serumalbumin (rHSA) med bundet R-(+)-warfarin og myristat (Myr1-Myr6) [17]. Atomerne i warfarin har følgende farver: kulstof er grøn og ilt er rød. R-(+) og S-(-) formerne af warfarin bindes stort set på samme måde [17]. B. Krystalstrukturen af rHSA med bundet diazepam [16]. Atomerne i diazepam har følgende farver: kulstof er grå, ilt er rød, kvælstof er blå og klor er grøn. Figureerne er lavet med PyMol på basis af atomkoordinaterne 1h9z (A) og 2bxf (B) fra Brookhaven Protein Data Bank.



farin displacerer fedtsyren (myristat), da denne kun bindes med lav affinitet til dette sted. Andre farmaka, såsom diflunisal, ibuprofen, halothan, propofol og ketoprofen samt diazepam (Figur 2B) bindes til subdomæne IIIA, hvor de har svært ved at displacere fedtsyrer. K_A for højaffin binding af farmaka er typisk 10^4 - 10^6 M^{-1} . På nuværende tidspunkt kender man krystalstrukturen af 12 forskellige HSA-farmakakomplekser [16, 18]. Denne detaljerede viden kan bruges til at forudsige mulige ligandinteraktioner med, men den kan også bruges ved syntese af farmaka med modificerede albuminbindende egenskaber. Selv om modellen med de to områder for højaffin binding af farmaka er meget nyttig, kan den dog ikke forklare al farmakabinding. For eksempel kan albumin også binde et mindre antal positivt ladede farmaka [2], men man ved endnu ikke, hvor i proteinet disse bindes.

Den detaljerede viden om ligandbinding kan som nævnt bruges til at vurdere risikoen for ligandinteraktioner med. I den forbindelse skal man dog huske, at ligandinteraktioner også kan skyldes konformationsændringer i proteinet. Disse ændringer, der er forårsaget af binding af en ligand, kan enten fremme eller hæmme bindingen af en anden ligand. Konformationsændringer forårsaget af f.eks. farmakabinding er som regel lokale ændringer i nærheden af bindingsstedet [16]. I modsætning hertil er de ændringer, som fedtsyrebinding inducerer, idet de er af både lokal og global karakter. Sidstnævnte viser sig blandt andet ved, at domæne I og domæne III roterer i forhold til domæne II med det resultat, at proteinet bliver lidt større, når det binder fedtsyrer [3, 10].

Praktiske aspekter

HSA's halveringstid på 19 dage [1] er terapeutisk interessant. Den forholdsvis lange halveringstid kan udnyttes direkte, hvis det pågældende terapeutikum bindes til proteinet. Hvis dette ikke er tilfældet, kan lægemidlet kobles til en ligand og dermed opnå albuminbinding. Som eksempel kan nævnes, at insulin ikke bindes til albumin, hvorimod insulin, hvortil man

har koblet en fedtsyre (myristinsyre), bindes reversibelt. Denne binding er med til at forlænge insulinets virkning (insulin detemir) [19].

Albuminbinding indgår i flere ekstrakorporale metoder, hvormed man kan befri kroppen for endogene toksiner eller (kraftig) overdosering med farmaka [4]. Princippet i disse metoder er, at blod dialyseres mod en opløsning, som indeholder albumin, der så »overtager« de(n) uønskede ligand(er). Albuminet kan regenereres online ved blandt andet søjlekromatografi, se for eksempel *molecular adsorbent recirculating system* (MARS)-systemet i [20].

Isomere former af ligander bindes som regel med forskellig affinitet til albumin. Denne forskel kan anvendes til at adskille disse former. Albumin kan nemlig kobles kovalent til silica eller et andet materiale, hvorefter de isomere former kan adskilles ved kiral kromatografi eller kiral kapillærelektroforese; blandingsopløsningen af liganden sættes til søjlen eller kapillærrøret, og de isomere former elueres med forskellig hastighed, fordi de bindes med forskellig styrke til det immobiliserede albumin [4, 21]. En sådan adskillelse er ofte ønskværdig, fordi enantiomere former kan have meget forskellige terapeutiske og toksiske effekter.

Antioxidante effekter

Kroppens lipider, proteiner og andre makrostrukturer bliver hele tiden udsat for oxidativt stress. Denne påvirkning har betydning for aldringsprocesser og kan resultere i forskellige patologiske tilstande. Albumin er et led i vores antioxidante forsvar, og det er faktisk vores kvantitativt vigtigste cirkulerende antioxidant [22]. Albumin kan udøve sin antioxidante funktion på forskellig vis: 1) Albumin kan binde kobberioner, men for eksempel ikke jernioner, med høj affinitet og dermed hæmme/forhindre dem i at starte en oxidativ proces [22, 23]. Selv om bindingen måske ikke er så kvantitativ vigtig, har den signifikant betydning, fordi oxidative processer typisk er skadeeffekter, 2) albumin kan binde og dermed beskytte li-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

gander. Det gælder for eksempel for umættede fedtsyrer [23], og 3) albumin kan interagere med og dermed neutralisere en række frie radikaler. Proteinets funktion i denne sammenhæng beror især på dets frie cysteinrest og de tilgængelige methioninrester; flere af de andre aminosyrer bidrager dog også til de antioxiderende egenskaber [22, 24]. Interaktionen med frie radikaler resulterer i beskadigelse af proteinet selv, og selv mild oxidation påvirker flere af albumins øvrige funktioner [22, 24].

Enzymatiske egenskaber

HSA udviser enzymatiske egenskaber over for både endogene og eksogene forbindelser [4]. Således kan proteinet isomerisere prostaglandin H2 til prostaglandin D2 [25], katalysere dehydratation af prostaglandin D2 [26] og katalysere dehydratation og efterfølgende isomerisation af 15-ketoprostaglandin E2 til 15-ketoprostaglandin B2 [27]. Endvidere kan albumins enolaseaktivitet omdanne 3-ketodihydrotestosteron til dets 3-enol form [28].

Albumin kan også udøve enzymaktivitet over for lægemidler. For eksempel bevirker den enlige frie cysteinrest, at proteinet kan fungere som en thioesterase, der kan nedbryde disulfiram (Antabus) til diethyldithiocarbamat [29]. Det har også været kendt længe, at HSA har esteraseslignende egenskaber og kan katalysere spaltningen af acetylsalicylsyre til en acetylgruppe og salicylat. Acetylgruppen bindes kovalent til en lysinrest i proteinet [4]. Den kraftigste enzymaktivitet er formentlig esteraseaktiviteten forårsaget af en gunstig rumlig placering af arginin og tyrosin i positionerne 410 og 411 [30]. Denne aktivitet er blevet studeret i detaljer, blandt andet ved hjælp af en række nitrophenylestre [31].

Esteraseaktiviteten er så udtalt, at man nu er begyndt at undersøge, om den kan bruges til at aktivere *prodrugs* til aktive farmaka. In vitro-forsøg tyder på, at dette er muligt, idet både serum og isoleret HSA hurtigt kan aktivere olmesartan medoxomil til olmesartan, som er et antihypertensivum [32].

Korrespondance: Ulrich Kragh-Hansen, Institut for Medicinsk Biokemi, Aarhus Universitet, Ole Worms Alle, Bygning 1170, DK-8000 Århus C. E-mail: ukh@biokemi.au.dk

Antaget: 7. januar 2007
Interessekonflikter: Ingen angivet

Taksigelse: Tak til Kim Langmach Hein for hjælp ved udarbejdelsen af figurerne.

Litteratur

- Peters T Jr. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego: Academic Press, 1996.
- Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev* 1981;33:17-53.
- Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 1994;45:153-203.
- Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* 2002;25:695-704.
- Bar-Or D, Curtis G, Rao N et al. Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia. *Eur J Biochem* 2001;268:42-7.
- Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S et al. Interdomain zinc site on human albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3701-6.
- Kragh-Hansen U, Vorum H. Quantitative analyses of the interaction between calcium ions and human serum albumin. *Clin Chem* 1993;39:202-8.
- Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin Chem* 2003;49:581-5.
- Ferrer ML, Duchowicz R, Carrasco B et al. The conformation of serum albumin in solution: a combined phosphorescence depolarization-hydrodynamic modelling study. *Biophys J* 2001;80:2422-30.
- Bhattacharya AA, Grüne T, Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 2000;303:721-32.
- Petitpas I, Grüne T, Bhattacharya AA et al. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J Mol Biol* 2001;314:955-60.
- Kragh-Hansen U, Watanabe H, Nakajou K et al. Chain length-dependent binding of fatty acid anions to human serum albumin studied by site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* 2006;363:702-12.
- Zunzain P, Ghuman J, Komatsu T et al. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with heme and fatty acid. *BMC Struct Biol* 2003;3:artikel 6.
- Petitpas I, Petersen CE, Ha C-E et al. Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6440-5.
- Lejon S, Frick I-M, Björck L et al. Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin. *J Biol Chem* 2004;279:42924-8.
- Ghuman J, Zunzain PA, Petitpas I et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol* 2005;353:38-52.
- Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S et al. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin. Anatomy of drug site I. *J Biol Chem* 2001;276:22804-9.
- Bhattacharya AA, Curry S, Franks NP. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures. *J Biol Chem* 2000;275:38731-8.
- Soran H, Younis N. Insulin detemir: a new basal insulin analogue. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:26-30.
- Miltzner S, Klamm S, Stange J et al. Albumin regeneration in liver support – comparison of different methods. *Ther Apher Dial* 2006;10:108-17.
- Millot MC. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. *J Chromatogr B* 2003;797:131-59.
- Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:293-311.
- Halliwel B. Albumin – an important extracellular antioxidant. *Biochem Pharmacol* 1988;37:569-71.
- Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T et al. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm Res* 2001;18:632-9.
- Watanabe T, Narumiya S, Shimizu T et al. Characterization of the biosynthetic pathway of prostaglandin D2 in human platelet-rich plasma. *J Biol Chem* 1982;257:14847-53.
- Fitzpatrick FA, Wynalda MA. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem* 1983;258:11713-8.
- Yang J, Petersen CE, Ha C-E et al. Structural insights into human serum albumin-mediated prostaglandin catalysis. *Protein Sci* 2002;11:538-45.
- Drmanovic Z, Voyatzis S, Kouretas D et al. Albumin possesses intrinsic enolase activity towards dihydrotestosterone which can differentiate benign from malignant breast tumors. *Anticancer Res* 1999;19:4113-24.
- Agarwal RP, Phillips M, McPherson RA et al. Serum albumin and the metabolism of disulfiram. *Biochem Pharmacol* 1986;35:3341-7.
- Watanabe H, Tanase S, Nakajou K et al. Role of Arg-410 and Tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem J* 2000;349:813-9.
- Sakurai Y, Ma S-F, Watanabe H et al. Esterase-like activity of serum albumin: characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates. *Pharm Res* 2004;21:285-92.
- Ma S-F, Anraku M, Iwao Y et al. Hydrolysis of angiotensin II receptor blocker prodrug olmesartan medoxomil by human serum albumin and identification of its catalytic active sites. *Drug Metab Dispos* 2005;33:1911-9.