

KARL ÖTTL

Humanes Serum Albumin: Redox-Marker und Transportprotein

Zusammenfassung

Humanes Serumalbumin, das häufigste Protein im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten, enthält einen Cysteinrest, der nicht in eine Disulfidbrücke involviert ist. Dieses Cystein ist als Antioxidans im Serum wichtig und kann in verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen, über die man den Albumin Redox-Zustand definieren kann und die man wissenschaftlich als systemischen Marker für oxidativen Stress heranziehen kann. Bei verschiedenen Pathologien liegt Albumin vermehrt in oxidiert Form vor, bei schweren Leberkrankheiten kann das sogar als Prognosemarker dienen. Neben dem Glaskörper des Auges und dem Kammerwasser wurde der Redoxstatus von Albumin auch in der Cerebrospinalflüssigkeit untersucht. Vor allem bei Morbus Alzheimer ist die starke Oxidation von Albumin auffällig. Die Funktion des Transportproteins Albumin ist von zentraler Bedeutung und wird seit Jahrzehnten beforscht. Im Zusammenhang mit gezieltem Stofftransport z.B. an Tumorzellen, der Herstellung von Nanopartikeln, sowie der Bindung an verschiedene Rezeptoren, bleibt Albumin auch in Zukunft ein spannendes Forschungsthema.

Summary

Human serum albumin: Redox marker and transportprotein

Human serum albumin is the main protein in serum and other body fluids. It contains a cysteine which is not involved in disulfide bridges. This cysteine is an important serum antioxidant and occurs in different oxidation states which may define the redox state of the albumin molecule and serve as systemic marker for oxidative stress. During different pathologies albumin is shifted to more oxidized fractions providing a prognostic marker in severe liver disease. Besides vitreous and aqueous humor albumin redox state was investigated in cerebrospinal fluid showing pronounced oxidation in Morbus Alzheimer. The transport function of albumin is of crucial importance and has been investigated since decades. In the light of targeted drug delivery, e.g., to tumor cells and the preparation of nanoparticles as well as binding of albumin to different receptors, albumin will certainly remain an exciting topic in future.

Einleitung

Albumin ist mit etwa 40 g/L das häufigste Protein im Blutserum und, wenn auch in deutlich geringerer Konzentration, auch in anderen Körperflüssigkeiten. Es ist damit entscheidend für den kolloidosmotischen Druck im Blut. Besonders wichtig ist es aber aufgrund seiner Transportfunktionen für verschiedene endogene und exogene Stoffe, wie Bilirubin, Fettsäuren, Hormone oder diverse Pharmaka. Die genannten Stoffe sind extrem schlecht wasserlöslich und können nur in gebundener Form im wässrigen Milieu transportiert werden. Dem Albumin wird darüber hinaus auch eine entscheidende Rolle im Redox-Geschehen des Serums zugeschrieben. Aus Plasma präpariert werden Albuminlösungen für therapeutische Zwecke hergestellt, wodurch es auch einen großen wirtschaftlichen Aspekt aufzuweisen hat. Wer im biochemischen Labor arbeitet, kennt Albumin, weil es bei verschiedenen Analysentechniken als relativ billiges Protein eingesetzt wird oder weil man es loswerden muss, da es die Analyse anderer Proteine stört, die in viel kleineren Konzentrationen vorliegen. Hier sehen wir schon verschiedene Gesichtspunkte, unter denen uns Albumin begegnen kann. Wissenschaftliche Interessen zielen häufig auf Proteine ab, die in kleineren Mengen auftreten und steuernde Funktionen haben. Albumin ist lange bekannt und intensiv untersucht [1]. Dennoch hat es viele Aspekte, die es nach wie vor zu einem spannenden wissenschaftlichen Gegenstand machen. Dieser Artikel beschreibt einige davon, nämlich solche, die am Lehrstuhl für Medizinische Chemie der Medizinischen Universität Graz bearbeitet wurden und werden. Es sind Ergebnisse intensiver Zusammenarbeit mit der Klinischen Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, der Universitätsaugenklinik, der Universitätsklinik für Neurologie und mit internationalen Kooperationspartnern, die eine translationale wissenschaftliche Arbeit erst ermöglichen.

Das Protein Albumin und sein Redox-Zustand

Ein menschlicher Körper mit 70 kg Körpergewicht enthält etwa 350 g Albumin. Das entspricht, damit wir das anschaulich einschätzen können, etwa dem Trockengewicht der Leber! Albumin ist zu einem hohen Anteil in α -Helices strukturiert, β -Faltblätter sind nicht vorhanden. Die dreidimensionale Struktur wird oft als herzförmig bezeichnet (Abb. 1). Von den 585 Aminosäuren sind 35 Cysteine, von denen 34 über 17 Disulfidbrücken paarweise miteinander verbunden sind. Das Cystein an der Position 34 (Cys-34) bleibt frei. Es befindet sich in einer Nische, aber doch etwas „versteckt“, an der Oberfläche des Moleküls [1]. Das wird deshalb extra erwähnt, weil es in der weiteren Betrachtung den Redox-Zustand des Proteins definieren wird. Man kann den Redox-Zustand eines Proteins nämlich verschieden definieren, je nachdem welche Modifikation an welcher Aminosäure man betrachtet. Das Cys-34 mit seiner Thiolgruppe ist relativ leicht zugänglich und leicht oxidierbar und liegt daher auch in verschiedenen Oxidationsstufen vor. Infolge dessen ist es gut geeignet, den Redox-Zustand des ganzen Moleküls zu repräsentieren. In der reduzierten Form besitzt Cystein-34 in der Seitenkette eine Thiolgruppe, die auch als Mercapto-Gruppe oder Sulfhydryl-Gruppe bezeichnet wird. Das Albumin in diesem Zustand wird demnach als

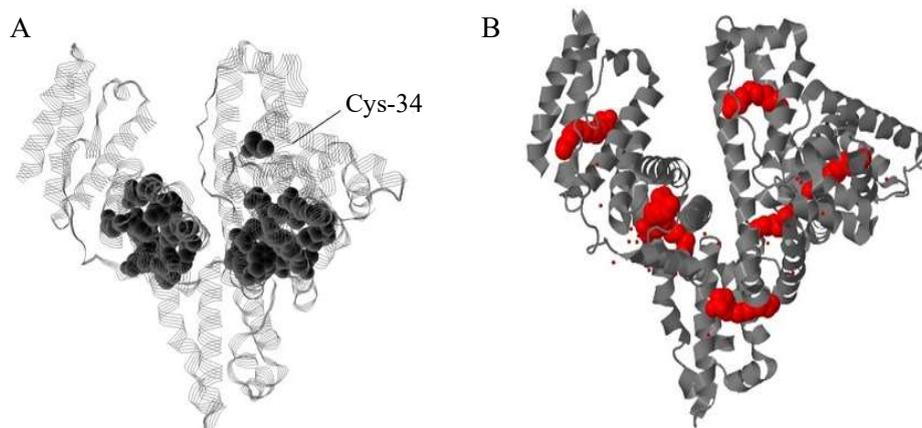


Abbildung 1: Struktur von humanem Serumalbumin. In A sind die beiden nach Sudlow benannten Bindungsstellen und Cystein-34 hervorgehoben. In B sind gebundene Fettsäuren farblich gezeigt.

humanes Mercaptalbumin (HMA) bezeichnet. Es kann milde und reversibel zu einem Disulfid oxidiert werden, durch Reaktion mit einem externen Disulfid. Das auf diese Weise modifizierte Albumin bezeichnet man als humanes Nonmercaptalbumin1 (HNA1). Durch stärkere Oxidationsmittel wie z.B. Wasserstoffperoxid wird HMA irreversibel oxidiert. Es entsteht dabei eine Sulfin- oder eine Sulfonsäure am Cys-34, wir haben jetzt humanes Nonmercaptalbumin2 vorliegen (HNA2) [2].

HMA und HNA1 sind also reversibel ineinander überführbar, während HNA2 durch Abbau entfernt werden muss. Wie viel von jeder Fraktion vorliegt, ist eine Frage des Alters, des Vorliegens von Krankheiten und welche Körperflüssigkeit man betrachtet. Im Plasma eines gesunden jungen Menschen liegt Albumin zu 70 bis eher 80% als HMA vor. 20 bis 30% sind dann HNA1, während nur einige wenige Prozent des Albumins als HNA2 vorliegen. Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil an HNA1 allmählich an, HNA2 ist davon kaum betroffen [2]. Körperliche Anstrengung kann Albumin vorübergehend von HMA in HNA1 überführen [3]. Einen außergewöhnlich starken Anstieg von HNA1 konnten wir bei Patientinnen und Patienten mit schwerer Nierenerkrankung feststellen, insbesondere bei jenen, die auf Hämodialyse angewiesen sind [4]. HNA2 dagegen steigt z.B. bei Sepsis und schwerer Leberkrankheit besonders stark an. Bei akut auf chronischem Leberversagen wurden HNA2-Werte bis über 30% festgestellt [5, 6]. Der Anteil an HNA2 bei diesen Patientinnen und Patienten kann als Marker für das 30- sowie 90-Tage-Überleben herangezogen werden [7, 8].

Auch im Glaskörper des Auges ist Albumin das Hauptprotein, allerdings in wesentlich geringerer Konzentration als im Serum. Gegenüber Plasma sind im Glaskörper die Albuminfraktionen etwas zu den oxidierten hin verschoben. Möglicherweise hat das damit zu tun, dass im Glaskörper der gelöste Sauerstoff „abgebaut“ werden muss, um die empfindliche Netzhaut zu schützen. Bewerkstelligt wird das durch eine enorm hohe Konzentration an Ascorbinsäure. Diese reagiert mit molekularem Sauerstoff,

wobei aber reaktive Sauerstoff-Spezies entstehen, allen voran Wasserstoffperoxid. Das erscheint zunächst kontraproduktiv, denn letzteres muss dann von Antioxidantien, wie z.B. dem HMA abgefangen werden, was zur Bildung von HNA führt [9, 10]. Auch andere Thiole könnten im Spiel sein, z.B. das Glutathion, dessen oxidierte Form ebenfalls zur Bildung von HNA beitragen würde (Noch sehr viel Konjunktiv!). Am Ende wird aber die Sauerstoffkonzentration im Glaskörper zur Netzhaut hin immer kleiner. Im Kammerwasser des Auges findet man ebenfalls Albumin, das hier in überraschend hohem Ausmaß, oft fast vollständig, in der reduzierten Form vorliegt. Überraschend deshalb, weil das Kammerwasser von den untersuchten Körperflüssigkeiten der Luft und damit dem Sauerstoff am nächsten ist. Der zugrunde liegende Mechanismus ist außerdem noch völlig unklar, die Ergebnisse sind bisher nicht publiziert.

Neurodegenerative Krankheiten stehen im Fokus vieler Forschergruppen und sind auch aus Sicht der Albuminforschung äußerst spannend, denn in der Cerebronalflüssigkeit (CSF) ist – in einer Konzentration von etwa 1% der Serumkonzentration – Albumin das Hauptprotein. Aufgrund der schweren Zugänglichkeit dieser Körperflüssigkeit gibt es aber nicht sehr viele Untersuchungen zum Thema Albumin-Redox-Status in CSF. In einer Gruppe von Patientinnen und Patienten mit multipler Sklerose (MS) konnten wir zwar keinen Unterschied im Albumin-Redox-Status gegenüber einer Kontrollgruppe finden, aber bestätigen, dass in CSF Albumin in signifikant reduzierterer Form vorliegt als im Serum [11]. Das ist insofern überraschend, da das Albumin in CSF aus dem Serum kommt und zwar in einem sehr dynamischen Prozess, bei dem täglich etwa 450 mL CSF gebildet werden. Im Kontrast dazu ist bei Patientinnen und Patienten mit Morbus Alzheimer Albumin in CSF z.T. extrem oxidiert, mitunter liegen die Hälfte der Albuminmoleküle in der irreversibel oxidierten Form vor und nur mehr etwa 10% als HMA.

Cystein-34 ist also ein Marker für den Redox-Zustand des Albumin-Moleküls und aufgrund seiner Häufigkeit ein systemischer Redox-Marker. Es bietet die Möglichkeit zwischen verschiedenen Arten der Oxidation zu unterscheiden. Warum hat es sich nicht als Marker durchgesetzt? Die Bestimmung des Redox-Zustands erfolgt durch chromatographische Methoden oder Massenspektrometrie. Beide Methoden finden zunehmend Eingang in die klinische Chemie, sind aber für Routinezwecke doch oft zu aufwändig. Der wichtigste Grund ist aber im Albumin selbst zu suchen. Die große Menge, in der es vorliegt, macht es erforderlich, dass schon sehr viel Oxidationsmittel entstehen muss, damit man eine Änderung des Redox-Zustands im gesamten Albumin detektieren kann. Um z.B. HMA von 80% auf 76% abzusenken, müssen um die 30 $\mu\text{mol/L}$ HMA reagieren. Das entspricht etwa der gesamten Konzentration an Vitamin C im Serum. Dass dennoch bei verschiedenen Pathologien deutliche Verschiebungen zu oxidierten Fraktionen gefunden wurden, zeugt davon, welch enormer oxidativer Stress in diesen Fällen aufgetreten ist. Eine von Cys-34 unabhängige Möglichkeit, oxidativen Stress über Albumin zu quantifizieren, wird uns im nächsten Abschnitt begegnen.

Albumin als Transportprotein

Die schon erwähnte große Menge an Albumin im Blut begründet seine große Bedeutung für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Serum. Die wesentliche Funktion des Albumins ist aber die des Transports von Substanzen, die schlecht bis praktisch gar nicht wasserlöslich sind. Dazu gehören endogene Verbindungen wie Bilirubin, freie Fettsäuren und Hormone, sowie exogen zugeführte Stoffe wie diverse Pharmaka. Kein Wunder, dass die Bindungs- und Transporteigenschaften von Albumin seit den 1970er Jahren beforscht werden [1, 12]. Markante Bindungsstellen für 2 Gruppen von Liganden wurden beschrieben, sowie für Bilirubin, kovalent als auch nicht kovalent, Bindungsstellen für Metallionen wie Eisen, Kupfer, Nickel oder Kobalt [1]. Für nicht veresterte Fettsäuren wurden 7 bis 11 Bindungsstellen beschrieben [13, 14]. Die Änderung der Struktur und Bindungseigenschaften von Albumin durch die Bindung von verschiedenen Liganden und durch den Einfluss verschiedener Krankheiten wurden intensiv untersucht. Nachdem sich die Bindungen der verschiedenen Liganden gegenseitig beeinflussen, gibt es zahlreiche Möglichkeiten der Wechselwirkung [15].

Die schon erwähnte Bindung von Metallionen durch Albumin erfüllt eine wichtige antioxidative Funktion. Diese Bindung verhindert, dass die Ionen von z.B. Eisen, Mangan oder Kupfer redox-aktiv werden, was in ihrer ungebundenen Form zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und somit zu oxidativem Stress führen würde. Andererseits verringert sich die Bindung von Metallionen durch die oxidativen Stress verursachenden Bedingungen z.B. bei Ischämie. Diese Verringerung wird analytisch genutzt zur Bestimmung des sogenannten „ischemia modified albumin“, welches als Marker für oxidativen Stress bei verschiedenen Pathologien herangezogen wird [16]. In jüngster Zeit ist das Interesse an humanem Serumalbumin im Zusammenhang mit „nano particles“ und „targeted drug delivery“ verstärkt in den Fokus gerückt [17, 18]. Albumin ist nicht allergen, was man beim Coaten von Nanopartikeln ausnützen möchte und die lange Lebensdauer von Albumin erhöht die Verweilzeit von Pharmazeutika im Blut. Eine Fusion mit Albumin ist eine wirksame Strategie, um die pharmakokinetischen Eigenschaften von z.B. Cytokinen entscheidend zu verbessern [19]. Albumin kann aber nicht nur „kleine Moleküle“ binden. Das Protein Amyloid β , dessen Ablagerungen im Gehirn eine Rolle bei der Entstehung von Morbus Alzheimer spielen, ist im Serum überwiegend an Albumin gebunden. Nachdem ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem peripheren und dem zentralen Amyloid β besteht, versucht man daher, Plasma-Austausch und Albumin-Ersatz als Therapie bei Morbus Alzheimer einzusetzen [20].

Albumin wird von verschiedenen Rezeptoren erkannt, die für die Aufnahme in die Zellen relevant sind. Dabei bevorzugen manche die oxidierte Variante von Albumin, wodurch dieses schneller als das native aus der Zirkulation entfernt wird. Der lösliche Rezeptor SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), der in vielen Tumorzellen überexprimiert wird, und gp60 (Glycoprotein60), welches in Endothelzellen exprimiert wird, helfen, Chemotherapeutika gezielt an Tumorzellen heranzuführen [21, 22].

Die Immunglobuline IgG und Albumin sind die langlebigsten Serumproteine und das

ist kein Zufall. Beide Proteine werden vom selben Rezeptor erkannt, es ist der neonatale Fc-Rezeptor (FcRn). Durch Endocytose aufgenommene Proteine werden üblicherweise in Endosomen abgebaut, damit die Aminosäuren für den Stoffwechsel zur Verfügung stehen. Albumin und IgG werden vom FcRn gebunden und wieder aus der Zelle ausgeschleust [23]. Darauf beruht die mittlere Lebensdauer eines Albuminmoleküls von etwa 4 Wochen. Auch dieser Rezeptor wird vor dem Hintergrund eines möglichen Drug-Targeting erforscht [18]. Eine Bindung an Albumin bewirkt dabei einerseits eine längere Lebensdauer, was vor allem bei therapeutischen Peptiden ein wichtiges Kriterium ist, andererseits eine gezielte Aufnahme in Zellen über einen Rezeptor. Das Designen von Proteinen mit „maßgeschneiderten“ Eigenschaften am Computer und die Expressierung rekombinanter Proteine sind die neuen mächtigen Werkzeuge auf diesem Gebiet.

Abschließende Bemerkung

Wir finden Albumin in allen Körperflüssigkeiten in unterschiedlichen Redox-Zuständen, die für wissenschaftliche Zwecke ausgesprochen interessant sind, indem sie Auskunft über die Entstehung verschiedener Pathologien geben können. Als Transportprotein ist es seit einem halben Jahrhundert bekannt und beforscht und in therapeutischem Einsatz. Trotzdem ergeben sich immer wieder neue Aspekte mit neuen Technologien und neuen Möglichkeiten der therapeutischen Nutzung. Albumin ist ein altbekanntes, immer wieder faszinierendes Protein.

Referenzen

- [1] Peters T. All about albumin, biochemistry, genetics, and medical applications. Academic Press, San Diego, 1996
- [2] Oettl K, Marsche G. Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. *Methods Enzymol* 2010;474:181-195
- [3] Lamprecht M, Greilberger JF, Schwabberger G, Hofmann P, Oettl K. Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J Appl Physiol* 2008;104(6):1611-1617
- [4] Lemesch S, Ribitsch W, Schilcher G, Spindelböck W, Hafner-Gießauf H, Marsche G, Pasterk L, Payerl D, Schmerböck B, Tawdrous M, Rosenkranz AR, Stiegler P, Kager G, Hallström S, Oettl K, Eberhard K, Horvath A, Leber B, Stadlbauer V. Mode of renal replacement therapy determines endotoxemia and neutrophil dysfunction in chronic kidney disease. *Sci Rep* 2016;4:6:34534
- [5] Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, Greilberger J, Putz-Bankuti C, Hallström S, Lackner C, Stauber RE. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:469-473
- [6] Clària J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, Amorós À, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Oettl K, Morales-Ruiz M, Angeli P, Domenicali M, Alessandria C, Gerbes A, Wendon J, Nevens F, Trebicka J, Laleman W, Saliba F, Welzel TM, Albillos A, Gustot T, Benten D, Durand F, Ginès P, Bernardi M, Arroyo V. Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology* 2016; 64:1249-1264
- [7] Oettl K, Birmer-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, Putz-

- Bankuti C, Krisper P, Graziadei I, Vogel W, Lackner C, Stauber RE. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J Hepatol* 2013;59:978-983
- [8] Stauber RE, Spindelboeck W, Haas J, Putz-Bankuti C, Stadlbauer V, Lackner C, Oettl K. Human nonmercaptalbumin-2: a novel prognostic marker in chronic liver failure. *Ther Apher Dial* 2014;18:74-78
- [9] Schwab C, Paar M, Fengler VH, Ivastinovic D, Haas A, Seidel G, Glatz W, Malle EM, Weger M, Velikay-Parel M, Faustmann G, Wedrich A, Reibnegger G, Winklhofer-Roob B, Oettl K. Gender differences in albumin and ascorbic acid in the vitreous antioxidant system. *Free Radic Biol Med* 2020;146:257-263
- [10] Schwab C, Paar M, Fengler VH, Lindner E, Haas A, Ivastinovic D, Seidel G, Weger M, Wedrich A, Oettl K. Vitreous albumin redox state in open-angle glaucoma patients and controls: a pilot study. *Int Ophthalmol* 2020;40:999-1006
- [11] Paar M, Seifried K, Cvirn G, Buchmann A, Khalil M, Oettl K. Redox state of human serum albumin in multiple sclerosis: a pilot study. *Int J Mol Sci* 2022;23:15806
- [12] Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 1975;11:824-32
- [13] Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol* 1998;5:827-35
- [14] 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
- [15] Yamasaki K, Hyodo S, Taguchi K, Nishi K, Yamaotsu N, Hirono S, Chuang VTG, Seo H, Maruyama T, Otagiri M.: Long chain fatty acids alter the interactive binding of ligands to the two principal drug binding sites of human serum albumin. *PLoS One* 2017;12:e0180404
- [16] Shevtsova A, Gordiienko I, Tkachenko V, Ushakova G. Ischemia-modified albumin: origins and clinical implications. *Dis Markers* 2021;2021:9945424
- [17] Shen X, Liu X, Li T, Chen Y, Chen Y, Wang P, Zheng L, Yang H, Wu C, Deng S, Liu Y. Recent advancements in serum albumin-based nanovehicles toward potential cancer diagnosis and therapy. *Front Chem* 2021;9:746646
- [18] Ishima Y, Maruyama T, Otagiri M, Chuang VTG, Ishida T. The new delivery strategy of albumin carrier utilizing the interaction with albumin receptors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2022;70:330-333
- [19] Li B, Chen A, Zou S, Wu J, Wang H, Chen R, Luo M. Albumin fusion improves the pharmacokinetics and in vivo antitumor efficacy of canine interferon gamma. *Int J Pharm* 2019; 558:404-412
- [20] Costa M, Páez A. Emerging insights into the role of albumin with plasma exchange in Alzheimer's disease management. *Transfus Apher Sci* 2021;60:103164
- [21] Bern M, Sand KM, Nilsen J, Sandlie I, Andersen JT. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: implications for drug delivery. *J Control Release* 2015;211:144-162
- [22] Ji Q, Zhu H, Qin Y, Zhang R, Wang L, Zhang E, Zhou X, Meng R. GP60 and SPARC as albumin receptors: key targeted sites for the delivery of antitumor drugs. *Front Pharmacol* 2024;15:1329636
- [23] Pannek A, Becker-Gotot J, Dower SK, Verhagen AM, Gleeson PA. The endosomal system of primary human vascular endothelial cells and albumin-FcRn trafficking. *J Cell Sci* 2023; 136:260912

Anschrift des Verfassers:

Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Karl Öttl
Lehrstuhl für Medizinische Chemie
Otto Loewi Forschungszentrum
Medizinische Universität Graz
Neue Stiftingtalstraße 6/III
A-8010 Graz
E-Mail: karl.oettl@medunigraz.at