

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛИКИРОВАННОГО АЛЬБУМИНА С РЕЦЕПТОРОМ
КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ ПО ДАННЫМ
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

© 2023 г. Д. А. Белинская^{1, *}, Н. В. Гончаров^{1, 2}

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

²*НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека,
Ленинградская обл., г.п. Кузьмоловский, Россия*

*E-mail: d_belinskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 04.09.2023 г.

После доработки 13.10.2023 г.

Принята к публикации 16.10.2023 г.

У больных сахарным диабетом (СД) накопление конечных продуктов гликирования (AGE – advanced glycation end products) ведет к воспалению и оксидативному стрессу посредством активации специфических рецепторов AGE (RAGE). Гликированный альбумин (gHSA) вносит существенный вклад в общий уровень AGE в организме и, как следствие, в патогенез диабета и сопутствующих заболеваний. Механизм взаимодействия gHSA с RAGE практически не изучен. Цель представленного исследования – методами молекулярного моделирования изучить связывание gHSA с RAGE, определить основные участки взаимодействия и структурные особенности сайтов гликирования, определяющие эффективность образования комплекса с RAGE. Методами молекулярного докинга и молекулярной динамики (МД) были сконструированы десять моделей gHSA, каждой модели соответствовал один модифицированный остаток лизина (карбоксиметил-лизин): Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573, Lys574. Методом макромолекулярного докинга построены комплексы gHSA с V-доменом RAGE, методом МД изучена их стабильность. В построенных моделях gHSA карбоксильные группы гликированных Lys317 и Lys525 образуют внутримолекулярные солевые мостики с окружающими аминокислотами, в остальных случаях карбоксильные группы модифицированных лизинов свободны для взаимодействия с положительно заряженными аминокислотными остатками на поверхности RAGE. Согласно данным макромолекулярного докинга и последующей симуляции МД, самым эффективным с точки зрения прочности и специфичности является комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys233. Специфические комплексы RAGE с gHSA, гликированным по Lys317 и Lys574, не образуются. Полученные данные о взаимодействии gHSA с RAGE помогут понять роль альбумина в патофизиологии СД и продвинутся на пути профилактики и создания эффективной терапии этого заболевания.

Ключевые слова: сахарный диабет, гликированный альбумин, карбоксиметил-лизин, рецептор конечных продуктов гликирования, молекулярное моделирование

DOI: 10.31857/S0869813923120026, EDN: ZJCOKS

ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость сахарным диабетом (СД) достигла уровня глобальной эпидемии, которая является одним из главных факторов смертности населения. В настоящее время количество больных СД во всем мире составляет более 400 миллионов человек, а к 2045 г. эта цифра превысит 600 миллионов [1]. У диабетиков имеет место усиление процесса неферментативной конденсации сахаров с нуклеиновыми кислотами, белками и липидами, что в конечном итоге формирует конечные продукты гликирования (AGE – advanced glycation end products). Гликирование изменяет их структуру и функцию, что приводит к нарушению функции клеток и цитотоксическим эффектам, вследствие чего AGE получили название гликотоксины. По некоторым оценкам в нормогликемической крови от 10 до 18% циркулирующих белков гликируются *in vivo*, тогда как у диабетиков этот процесс выражен гораздо сильнее и достигает 40% [2, 3].

Накопление AGE ведет к нарастанию воспалительных процессов и оксидативному стрессу, причем это во многом зависит от активации и/или повышения экспрессии специфических рецепторов AGE (RAGE) [4], впервые описанных в 1992 г. RAGE – это мультигандный рецептор, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов; его лиганд-связывающий домен распознает помимо AGE большое количество молекул, среди которых наиболее важными являются белки S100, белок бокс-1 группы высокой подвижности (HMGB1 – high mobility group box), β -амилоид и антигенный комплекс макрофагов 1 (Mac-1) [5]. Гликированные продукты и активация RAGE связаны с патофизиологией многих метаболических заболеваний, таких как сахарный диабет 2-го типа (СД2), пищевая аллергия, астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), острая почечная недостаточность (ОПН), болезнь Альцгеймера, синдром поликистозных яичников (СПКЯ), ожирение и метаболический синдром [6–10]. AGE способствуют канцерогенезу при хроническом местном воспалении, индуцированном *Helicobacter pylori* [11].

Сывороточный альбумин является мажорным белком крови млекопитающих, где его концентрация составляет 500–700 мкМ. Молекула альбумина не покрыта углеводной оболочкой и может связывать самые разные молекулы и атомы: воду и катионы металлов, жирорастворимые гормоны, жирные кислоты (FA), металлопорфирины, неконъюгированный билирубин, окись азота, аспирин и другие лекарственные средства, токсины [12, 13]. Благодаря своим экстраординарным связывающим свойствам, альбумин существенно влияет на фармакокинетику лекарственных средств, токсикокинетику природных и синтетических ядов, скорость метаболизма. Отличие сывороточного альбумина человека (HSA) от других белков крови состоит в том, что в норме он не гликозилирован (не гликирован, если иметь в виду исключительно неферментативное гликозилирование). Однако количество альбумина существенно превышает количество других белков плазмы крови, поэтому даже небольшой процент гликированного альбумина (gHSA) вносит существенный вклад в общий уровень AGE в организме и позволяет прогнозировать риск развития диабета даже в случае эугликемии [14]. Одним из главных реагентов, обнаруженных *in vivo* в аддуктах с альбумином, является карбоксиметил-лизин (CML, рис. 1) [15].

К настоящему времени идентифицировано более 60 сайтов гликирования HSA [16], но механизм взаимодействия gHSA с RAGE остается практически не изученным. Xie и соавт. с применением метода ЯМР-спектроскопии высокого разрешения изучили взаимодействие различных AGE, включая гликированный альбумин быка (gBSA), с RAGE, выявили участки связывания AGE на поверхности RAGE и предложили свою архитектуру комплекса RAGE с альбумином [17], однако в работе не рассматривали, какие именно лизины альбумина принимают участие во взаимо-

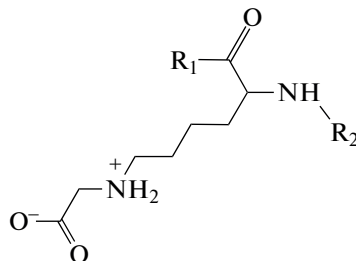


Рис. 1. Химическая структура карбоксиметил-лизина (CML) в составе полипептидной цепи. Состояние протонирования атомов кислорода и азота соответствует физиологическим значениям pH.

действию с RAGE. Tramarin и соавт. в экспериментах *in vitro* и *in silico* изучали взаимодействие gHSA с RAGE, но при этом объектом исследования были продукты Амадори, предшествующие образованию AGE [18]. Цель представленного исследования – методами молекулярного моделирования изучить связывание gHSA с RAGE, определить основные участки взаимодействия и структурные особенности сайтов гликирования, определяющие эффективность образования комплекса с RAGE.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка трехмерных моделей белков и низкомолекулярных лигандов

Трехмерные модели низкомолекулярных лигандов строили и оптимизировали методом минимизации энергии в вакууме с помощью программного пакета Avogadro v1.2.0 [19]. В качестве трехмерной модели HSA использовали кристаллическую структуру белка из базы данных белковых структур (protein data bank, PDB), код структуры 3JQZ, цепь А [20]. RAGE состоит из трех основных доменов – экстраклеточного лиганд-связывающего, содержащего иммуноглобулиноподобные регионы V (аминокислотные остатки 23–119), C1 (120–233) и C2 (234–325), одинарной трансмембранной спирали (343–363) и короткого С-терминального цитоплазматического домена (364–404). Известно, что несмотря на свое структурное разнообразие, AGE (в том числе и AGE-белки) связываются только с V-доменом RAGE [21]. Считается, что связывание лиганда и последующая активация RAGE, приводящая к передаче сигнала, требуют олигомеризации рецептора [22]. Логичным шагом является для начала смоделировать взаимодействие молекулы альбумина с мономером V-домена, определить самые вероятные (самые прочные) комплексы этих двух белков, чтобы на следующих этапах скомпоновать полученные структуры в димер и определить наиболее вероятную архитектуру комплекса gHSA-RAGE. В качестве трехмерной модели мономера V-домена RAGE использовали структуру, полученную методом ЯМР, из базы данных белковых структур PDB, код структуры 2M1K, цепь А [23]. Молекулы воды, лигандов и неиспользуемые цепи были удалены из структур 3JQZ и 2M1K, пропущенные атомы были достроены с помощью программного пакета Visual Molecular Dynamics v.1.9.4a53 (VMD, University of Illinois Urbana-Champaign, США) [24].

Построение модели гликированного альбумина

Процесс гликирования белков нацелен в основном на боковые цепи аргинина, лизина, тиоловые группы цистеина и N-концевые аминокислоты, однако именно гликированные лизины лизин-богатых белков (в том числе альбумина) являются

маркерами возрастных и связанных с возрастом патологий [25]. Как было отмечено выше, конечные продукты гликирования лизина представляют собой преимущественно CML (рис. 1) [15], поэтому в нашей работе мы моделировали именно этот тип гликирования.

Всего в молекуле HSA 59 лизинов, и логично предположить, что RAGE взаимодействует с теми гликированными лизинами, которые находятся на поверхности белка и доступны для взаимодействия. Визуальная инспекция показала, что на поверхности HSA находятся следующие лизины: 4, 20, 41, 51, 64, 73, 136, 137, 159, 162, 174, 212, 225, 233, 240, 262, 313, 317, 323, 359, 372, 378, 389, 444, 475, 545, 557, 560, 564, 573, 574. В обзоре [16] собраны данные литературы о том, какие лизины HSA оказались гликированы при исследовании здоровых испытуемых и пациентов с диабетом. Практически все перечисленные выше лизины, согласно обзору [16], могут быть гликированы. Наиболее часто встречается гликирование следующих лизинов: Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys573, Lys574. Поэтому именно эти девять остатков лизина мы отобрали для построения моделей gHSA. Интересно отметить, что, согласно многочисленным исследованиям, самым реактивным лизином является Lys525 [16]. По этой причине, хотя этот аминокислотный остаток не находится на поверхности белка, мы также включили его в наше исследование.

Модели гликированного альбумина были построены 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 2019.4 [26], была описана топология CML. Карбоксильную группу CML задавали депротонированной и отрицательно заряженной, а группу атома азота бокового радикала – дважды протонированной и положительно заряженной (рис. 1). Подготовленная топология была добавлена в библиотеку структур аминокислот этого пакета. Затем был проведен молекулярный докинг карбоксиметильной группы в сайты модификации HSA (возле аминокислотных остатков выбранных лизинов). Детали метода молекулярного докинга описаны ниже в разделе “Молекулярный докинг”. На основании внесенных в библиотеку топологий, из комплексов HSA с карбоксиметильной группой, полученных докингом, программой GROMACS были сгенерированы структуры модифицированных лизинов. Полученные структуры gHSA были оптимизированы методом молекулярной динамики (МД). Детали метода МД описаны ниже в разделе “Молекулярная динамика гликированного альбумина и комплексов альбумина с V-доменом RAGE”.

Молекулярный докинг

Для докинга карбоксиметильной группы в сайты гликирования HSA использовали программный пакет Autodock Vina 1.1.2 [27]. В исследуемом сайте связывания белка задавали область поиска размером $15 \times 15 \times 15 \text{ \AA}$. Число запусков (exhaustiveness) принимали равным 10. Количество наиболее оптимальных (энергетически выгодных) конформаций в выходном файле (num_modes) задавали равным 10. Конформация лигандов варьировалась, белок оставался жестким. Для дальнейшей оптимизации отбирали те конформации комплексов, в которых расстояние между функционально значимыми атомами (атом азота бокового радикала лизинов и атом углерода карбоксиметильной группы) было минимальным.

Макромолекулярный докинг

Подготовленные модели gHSA и V-домена RAGE использовали для процедуры макромолекулярного (белок–белкового) докинга. Докинг проводили с помощью онлайн-сервиса ZDOCK 3.0.2 (<https://zdock.umassmed.edu/>) [28]. В качестве сайта

связывания на поверхности gHSA задавали модифицированный лизин, для V-домена RAGE (обозначим его сокращенно V) областью поиска задавали всю поверхность белка. Программа ZDOCK ранжирует все найденные конформации белкового комплекса по величине оценочной функции (ОФ), которая отражает энергетические характеристики комплекса и определяет вероятность его нахождения в данной конформации. ОФ базируется на статистическом потенциале контакта атомов на поверхности белков (interface atomic contact energy statistical potential), комплементарности поверхности (shape complementarity) и электростатических взаимодействиях [29]. Чем выше значение ОФ, тем выше вероятность нахождения комплекса именно в этой конформации. Результатом запуска программы ZDOCK для каждой пары gHSA-V является набор из 10 наиболее энергетически выгодных конформаций комплекса. Для каждой пары gHSA-V из полученных конформаций мы отбирали наиболее вероятную конформацию на основании двух критериев. Первый критерий заключается в том, что при наложении полученного докингом комплекса gHSA-V на экспериментальную трехмерную структуру VC1-домена RAGE (код PDB 4O17 [30]) молекула альбумина не должна накладываться на C1-домен (то есть, альбумин должен пристыковаться не со стороны C1-домена). Второй критерий состоит в том, что в полученном докингом комплексе гликированный лизин должен взаимодействовать с одним из сайтов IS (interaction surface) на поверхности V-домена (рис. 2): IS1 (Leu36, Lys37, Cys38, Lys39, Gly40, Ala41, Lys43, Leu49, Asn81, Cys99), IS2 (Arg48, Glu50, Arg98, Met102, Asn105, Gly106, Lys107) или IS3 (Arg28, Arg29, Ile30, Ile91, Glu94, Gly95). IS – это области взаимодействия гликированного лизина в составе AGE-пептидов и gBSA с поверхностью V-домена, выявленных экспериментально в работе с применением метода ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [17].

Стабильность полученных комплексов проверяли методом МД, детали метода описаны ниже.

Молекулярная динамика гликированного альбумина и комплексов альбумина с V-доменом RAGE

Конформационные изменения gHSA, а также комплексов gHSA с V-доменом RAGE во времени рассчитывали методом МД с помощью программного пакета GROMACS 2019.4 [26] с использованием силового поля CHARMM27 [31]. Молекулу gHSA (или комплекс gHSA-V) виртуально помещали в периодическую кубическую ячейку, заполненную молекулами воды. Для описания молекул воды использовали потенциал TIP3P (transferable intermolecular potential with 3 points) [32]. Для нейтрализации заряда в систему были добавлены ионы натрия. В расчетном эксперименте поддерживалась постоянная температура 300 К и постоянное давление 1 бар с помощью термостата “V-rescale” [33] и баростата Паринелло–Рамана [34]. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [35]. При межатомном расстоянии больше 1 нм взаимодействиями Леннарда-Джонса пренебрегали. Длины связей в молекулах поддерживали постоянными с помощью алгоритма LINCS [36]. Перед расчетом конформационных изменений система подвергалась релаксации продолжительностью 6 нс. Время симуляции конформационных изменений составило 50 нс для молекул gHSA и 100 нс для комплексов gHSA-V с шагом интегрирования 0.002 пс.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Построение моделей гликированного альбумина

Методами молекулярного докинга и МД мы построили десять моделей gHSA, в каждой из которой гликирован соответствующий аминокислотный остаток лизина:

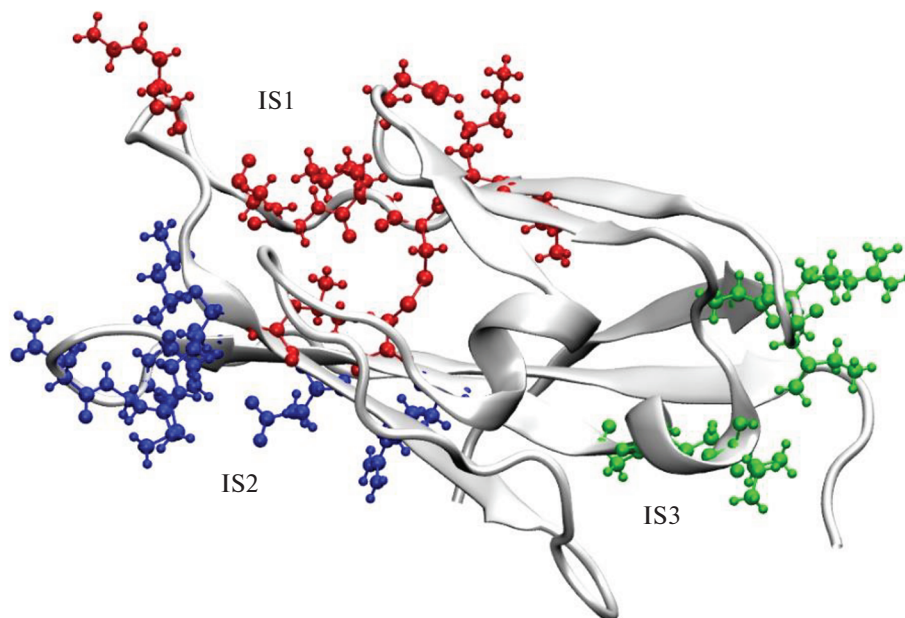


Рис. 2. Области взаимодействия (IS – interaction surface) гликированного лизина в составе AGE-пептидов и gBSA с поверхностью V-домена, выявленные экспериментально [17]. IS1 (Leu36, Lys37, Cys38, Lys39, Gly40, Ala41, Lys43, Leu49, Asn81, Cys99, выделены красным цветом), IS2 (Arg48, Glu50, Arg98, Met102, Asn105, Gly106, Lys107, выделены синим цветом) и IS3 (Arg28, Arg29, Ile30, Ile91, Glu94, Gly95, выделены зеленым цветом).

Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573 и Lys574. Более подробно процедура подготовки моделей описана в разделе “Методы исследования”, подразделе “Молекулярная динамика гликированного альбумина и комплексов альбумина с V-доменом RAGE”. На рис. 3 представлено наложение полученных моделей.

Ожидаемо, в процессе симуляции МД все изученные модифицированные лизины благодаря гидрофильной карбоксильной группе занимают такие конформации, в которых их боковой радикал максимально доступен растворителю. Даже боковой радикал Lys525, который в кристаллической структуре HSA погружен в глобулу белка, после модификации за счет удлинения цепочки бокового радикала на два атома углерода оказывается на поверхности, становится доступен растворителю (карбоксильная группа модифицированного Lys525 после 100 нс симуляции окружена четырьмя молекулами воды) и потенциально может контактировать с RAGE. Поэтому на данном этапе мы не стали исключать ни один из рассмотренных лизинов и на следующем шаге провели макромолекулярный докинг десяти вариантов gHSA (гликированного по десяти рассмотренным лизинам) с V-доменом RAGE. Однако стоит отметить, что в случае модифицированных Lys317 и Lys525, карбоксильная группа CML вовлечена в образование солевых мостиков с соседними аминокислотами (Lys313 и Arg521 соответственно), что потенциально может затруднить взаимодействие этих гликированных лизинов с аминокислотами поверхности RAGE. В случае других моделей gHSA, карбоксильная группа CML не вовлечена в близкие контакты с окружающими аминокислотными остатками.

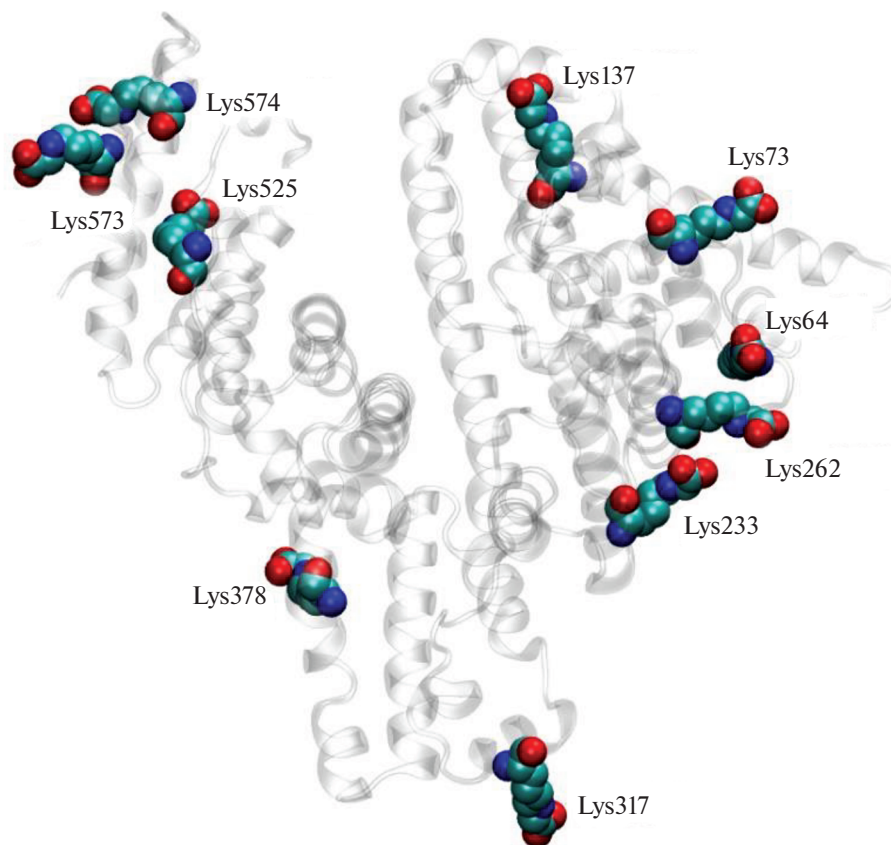


Рис. 3. Наложение трехмерных структур gHSA, гликированного по аминокислотным остаткам Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573 и Lys574, полученных методом МД. Модифицированные лизины показаны цветными сферами, остов молекулы gHSA – серой лентой. Атомы водорода не показаны для четкости рисунка.

Макромолекулярный докинг гликированного альбумина с V-доменом RAGE

Результаты макромолекулярного докинга gHSA с V-доменом RAGE представлены на рис. 4 и в табл. 1. В случае гликирования по Lys64, CML в полученном комплексе взаимодействует с Lys52 и Arg98 RAGE, при этом с Arg98, который является частью IS2, Lys64 образует солевой мостик (рис. 4а). Гликированный Lys73 в комплексе с RAGE взаимодействует с Lys107, Glu108, Thr109, и в этой тройке Lys107 также является частью IS2 (рис. 4б). В случае гликирования Lys137, модифицированный лизин взаимодействует с Arg48 сайта IS2 RAGE (рис. 4с). Гликированный Lys233 связывается в окружении аминокислот Tyr113, Cys38, Cys99, Lys39 RAGE (все, кроме Tyr113, входят в состав IS1) (рис. 4д). Модифицированный Lys262 в комплексе с RAGE взаимодействует с Lys39, Ala41, Pro42 (первые два остатка являются частью IS1) (рис. 4е). В случае гликированных Lys317 и Lys378 методом молекулярного докинга не удалось выявить конформации, в которых бы эти лизины взаимодействовали с IS1, IS2 или IS3. Поэтому для дальнейшего анализа мы отобрали самые вероятные (по оценочной функции ZDOCK) конформации из тех, в которых нет наложения на C1-домен. В этих конформациях гликированный Lys317

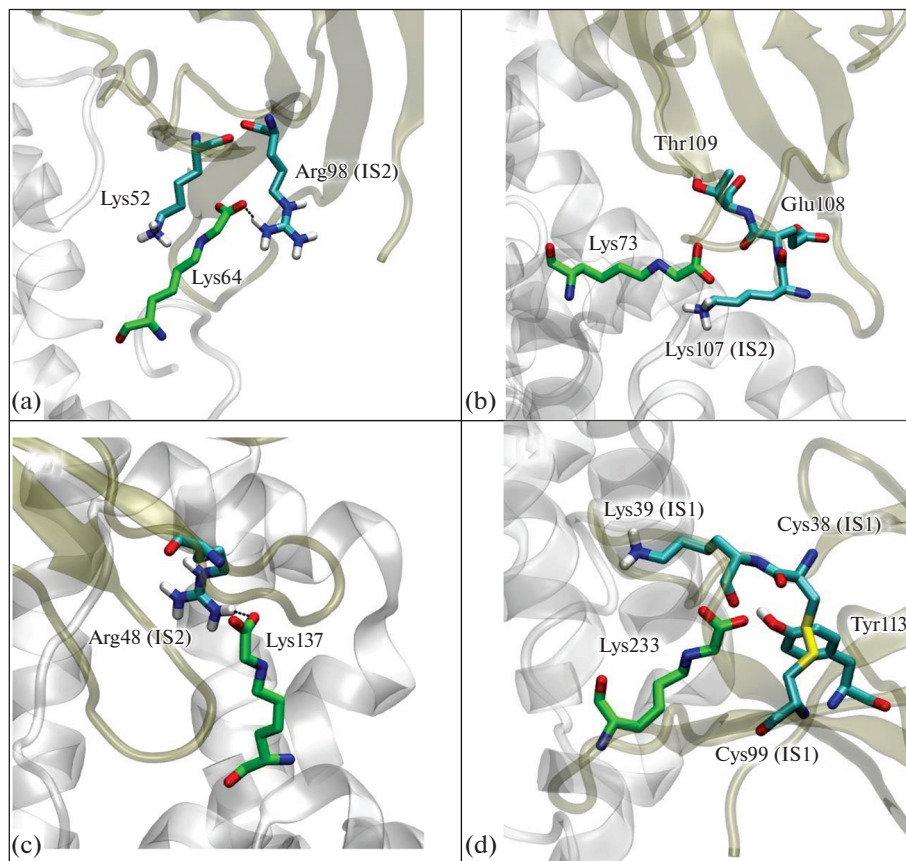


Рис. 4. Взаимодействие gHSA с поверхностью V-домена RAGE по данным макромолекулярного докинга. Изучены модели gHSA, гликированного по Lys64 (a), Lys73 (b), Lys137 (c), Lys233 (d), Lys262 (e), Lys317 (f), Lys378 (g), Lys525 (h), Lys573 (i), Lys574 (j). Зеленым цветом отмечены атомы углерода модифицированных лизинов. Остов HSA показан серой лентой, остов V-домена RAGE – коричневой лентой. Второстепенные атомы водорода не показаны для четкости рисунка. IS1 и IS2 (interaction surface 1 и 2) – экспериментально выявленные области взаимодействия гликированного лизина (в составе AGE-пептидов и gBSA) с RAGE по данным Xie и соавт. [17].

взаимодействует с Arg116, Ile120 и Pro121 (образуя при этом внутримолекулярный солевой мостик с Lys313 HSA, рис. 4f), а Lys378 – с Arg77 (солевой мостик), Val78 и Leu79 (рис. 4g). Гликированный Lys525 связывается недалеко от аминокислот Glu50, Lys52 и Trp61 RAGE (Glu50 включен в IS2) (рис. 4h), однако из-за внутримолекулярного солевого мостика с Arg521 модифицированный Lys525 не образует близких контактов с аминокислотами RAGE. И, наконец, модифицированные Lys573 и Lys574 ни в одном из найденных докингком комплексов вообще не взаимодействуют с поверхностью RAGE. Поэтому в случае Lys573 и Lys574 мы отобрали самые вероятные конформации из тех, в которых нет наложения на C1-домен (рис. 4i и 4j).

В табл. 1 для отобранных конформаций приведены значения ОФ, которые, как было упомянуто в разделе “Методы”, характеризует вероятность нахождения белкового комплекса в данной конформации: чем выше значение ОФ, тем выше вероятность. Согласно данным, представленным в табл. 1, самые энергетически выгодные конформации были найдены для гликированных Lys137, Lys233, Lys262 и Lys317.

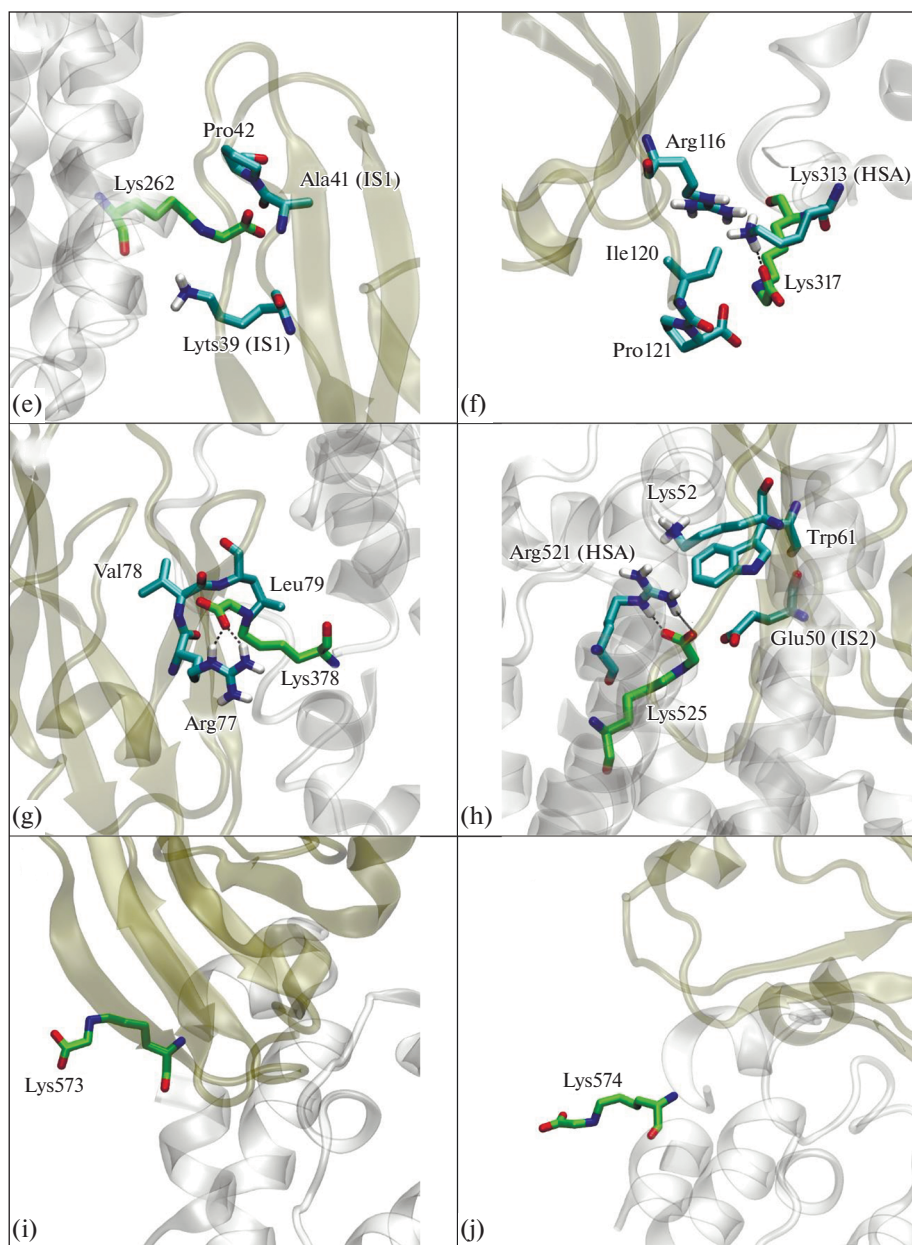


Рис. 4. Окончание.

На следующем этапе методом МД мы проверили стабильность комплексов gHSA-V, полученных методом макромолекулярного докинга. Несмотря на то, что по данным докинга гликированные Lys573 и Lys574 не взаимодействуют с поверхностью RAGE, мы не стали исключать их, чтобы проверить, не перейдет ли молекула gHSA, гликированная по Lys573 и Lys574, в процессе симуляции МД в конформацию, в которой эти лизины смогут контактировать с RAGE.

Таблица 1. Значения оценочной функции (ОФ) конформаций gHSA-RAGE по данным макромолекулярного докинга

Модифицированный Lys	ОФ
Lys64	741.025
Lys73	888.287
Lys137	1011.244
Lys233	1059.251
Lys262	963.003
Lys317	1034.777
Lys378	878.667
Lys525	828.496
Lys573	895.530
Lys574	828.557

Взаимодействие gHSA с V-доменом RAGE по данным метода молекулярной динамики

В вычислительных экспериментах принято оценивать эффективность взаимодействия лиганда с рецептором по величине свободной энергии связывания ΔG . Одна из основных проблем при вычислении ΔG состоит в том, что очень сложно с хорошей точностью оценить энтропийный компонент, что особенно критично для макромолекулярных комплексов. Поэтому для комплексов белок–белок более разумным представляется оценивать прочность связывания по количеству контактов между белками. Такой способ применили в работе [37] для оценки эффективности взаимодействия S-белка SARS-CoV-2 и ACE2 в гипергликемической среде. В нашей работе мы также использовали этот подход и оценивали прочность комплексов gHSA и RAGE по числу атомов, образующих близкие контакты между белками (на расстоянии не больше 3.5 ангстремов). В табл. 2 приведена информация о количестве атомов, образующих контакты в комплексах gHSA с RAGE по данным МД, показаны основные аминокислоты, участвующие во взаимодействии, а также перечислены специфические контакты между белками и время их жизни в процентном отношении к длине симуляции.

На рис. 5 представлены трехмерные модели комплексов gHSA с RAGE по данным МД. Согласно полученным данным, в восьми комплексах (из десяти изученных) модифицированный лизин взаимодействует с RAGE. В случае гликирования Lys64 (рис. 5a), CML образует два долгоживущих солевых мостика с Lys52 и Arg98 RAGE, при этом Arg98 является частью сайта IS2. Белки образуют семь солевых мостиков, пять из которых существуют на протяжении более чем 70 нс симуляции (табл. 2). Важно отметить, что пять аминокислот из тех, что участвуют в связывании gHSA, гликированного по Lys64, находятся в близком контакте с димером белка S100P (а именно Arg48, Lys52, Trp61, Lys62, Arg98) в структуре, полученной экспериментально методом ЯМР [38].

При гликировании Lys73 (рис. 5b) CML вовлечен в солевой мостик с Lys39 RAGE, который является частью сайта IS1, однако этот контакт образуется лишь на последних 30 нс симуляции. Всего же между RAGE и gHSA, гликированным по Lys73, формируется семь специфических контактов (шесть солевых мостиков и одна водородная связь), три из которых существуют 50 нс и дольше. В случае гликирования Lys137 (рис. 5c) CML на протяжении 95% симуляции образует солевой мостик с Arg48 RAGE, который является частью сайта IS2. В этом комплексе белки образуют семь специфических взаимодействий (пять солевых мостиков и две водо-

Таблица 2. Количество атомов, образующих контакты в комплексах gHSA с RAGE по данным МД, специфические контакты gHSA-RAGE и время их жизни в процентном отношении к длине симуляции

CML	Количество контактов (gHSA/RAGE) Специфические контакты gHSA-RAGE и время их жизни
Lys64	63/73 Glu45-Arg48 ^{IS2} (CM, 100%); Glu48-Lys107 ^{IS2} (CM, 30%); Lys64-Lys52 (CM, 80%); Lys64-Arg98 ^{IS2} (CM, 95%); Asp72-Lys52 (CM, 80%); Glu86-Lys62 (CM, 50%); Glu95-Lys52 (CM, 70%)
Lys73	66/68 Glu37-Gln24 (BC, 40%); Asp38-Lys37 ^{IS1} (CM, 40%); Glu45-Lys39 ^{IS1} (CM, 65%); Lys73-Lys39 ^{IS1} (CM, 30%); Glu82-Lys37 ^{IS1} (CM, 40%); Asp129-Arg114 (CM, 85%); Asp129-Arg116 (CM, 60%)
Lys137	68/58 Glu37-Arg48 ^{IS2} (CM, 5%); Asp38-Arg104 (CM, 50%); Asp38-Gln47 (BC, 10%); Glu82-Lys44 (CM, 5%); Glu83-Asn105 (BC, 5%); Arg114-Glu108 (CM, 20%); Lys137-Arg48 (CM, 95%)
Lys233	118/111 His3-Asn81 (BC, 95%); Glu6-Lys83 (CM, 95%); Glu208-Lys107 ^{IS2} (CM, 95%); Lys212-Glu108 (CM, 75%); Glu230-Lys110 (CM, 20%); Lys233-Lys39 ^{IS1} (CM, 80%); Lys233-Ser111 (BC, 65%); Lys233-Tyr113 (BC, 40%); Thr236-Glu108 (BC, 60%); Asp237-Lys39 ^{IS1} (CM, 80%); Glu252-Lys43 ^{IS1} (CM, 98%); Asp255-Lys37 ^{IS1} (CM, 60%); Asp256-Lys37 ^{IS1} (CM, 60%); Asp259-Lys37 ^{IS1} (CM, 60%)
Lys262	65/54 Asp13-Lys43 ^{IS1} (CM, 90%); Lys233-Glu108 (CM, 90%); Thr236-Asn105 (BC, 90%); Glu252-Lys44 (CM, 70%); Asp255-Lys43 ^{IS1} (CM, 90%); Asp256-Lys44 (CM, 75%); Asp259-Lys107 ^{IS2} (CM, 10%); Lys262-Lys39 ^{IS1} (CM, 10%); Tyr263-Glu108 (BC, 90%); Glu266-Lys39 ^{IS1} (CM, 70%)
Lys317	30/36 Glu230-Lys39 ^{IS1} (CM, 2%); Lys233-Ser111 (BC, 10%); Asp259-Lys107 (CM, 70%)
Lys378	116/109 Glu297-Lys39 ^{IS1} (CM, 50%); Glu311-Arg29 ^{IS3} (CM, 80%); Phe374-Phe85 (CB, 20%); Asp375-Arg77 (CM, 95%); Lys378-Arg77 (CM, 20%); Gln385-Pro80 (BC, 60%); Glu442-Arg48 ^{IS2} (CM, 30%)
Lys525	101/109 Glu119-Lys107 ^{IS1} (CM, 80%); Asp173-Lys39 ^{IS1} (CM, 90%); Asp183-Asn105 ^{IS2} (BC, 60%); Glu184-Lys44 (CM, 65%); Glu518-Lys52 (CM, 80%); Lys519-Glu108 (CM, 90%); Glu520-Arg104 (CM, 80%); Lys525-Arg48 ^{IS1} (CM, 5%); Asp562-Arg57 (CM, 90%)
Lys573	47/59 Val116-Pro66 (BC, 5%); Asp512-Arg77 (CM, 50%); Lys573-Arg29 ^{IS3} (CM, 30%); Glu565-Arg77 (CM, 70%)
Lys574	142/139 Asp129-Arg104 (CM, 80%); Asp121-Lys43 ^{IS1} (CM, 20%); Glu37-Arg48 ^{IS2} (CM, 60%); Glu565-Lys37 ^{IS1} (CM, 90%); Glu505-Arg77 (CM, 70%); Phe36-Gln67 (BC, 30%); Tyr140-Gln67 (BC, 60%); Lys573-Gly31 (BC, 80%); Arg114-Ser74 (BC, 10%)

Символами IS1, IS2 и IS2 отмечены аминокислоты, принадлежащие экспериментально выявленным сайтам взаимодействия RAGE с AGE-пептидами и gBSA [17]. CM – солевой мостик, BC – водородная связь, CB – стэкинг-взаимодействие.

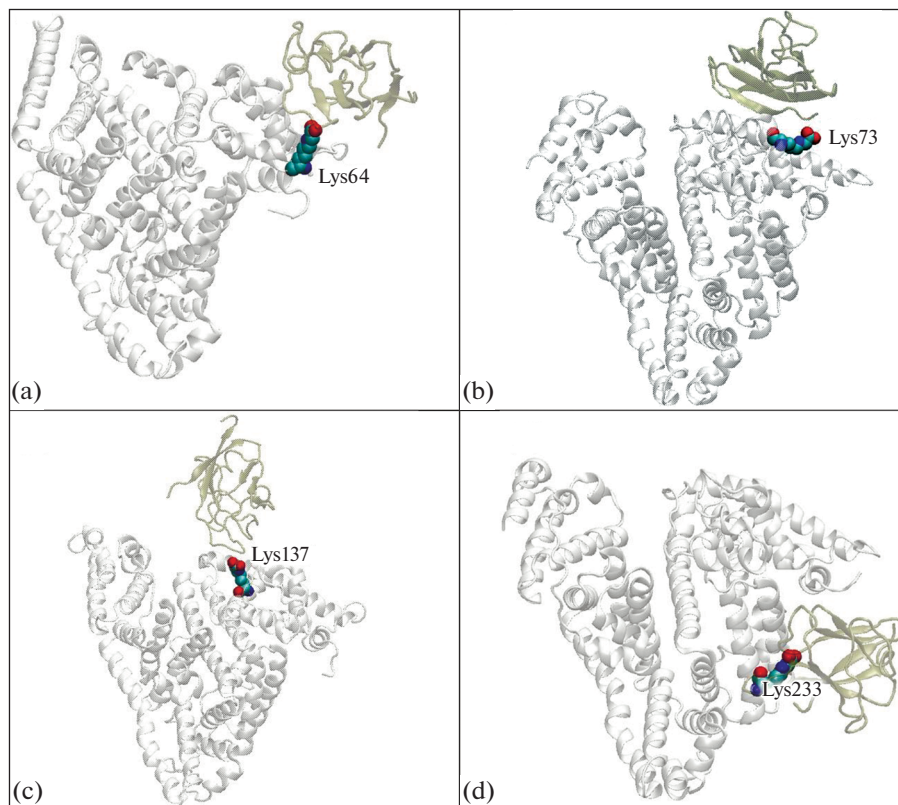


Рис. 5. Взаимодействие gHSA с поверхностью RAGE по данным МД. Изучены модели gHSA, гликированного по Lys64 (a), Lys73 (b), Lys137 (c), Lys233 (d), Lys262 (e), Lys317 (f), Lys378 (g), Lys525 (h), Lys573 (i), Lys574 (j). Остов HSA показан серой лентой, остов V-домена RAGE – коричневой лентой. Модифицированные лизины показаны цветными сферами. Атомы водорода не показаны для четкости рисунка.

родные связи), но большая часть из них формируется уже на последнем этапе симуляции (табл. 2).

При гликировании Lys233 (рис. 5d) CML на протяжении 80 нс вовлечен в солевой мостик с Lys39 сайта IS1 RAGE, а также образует водородные связи с Ser111 и Tyr113 на протяжении 65 и 40 нс соответственно, при этом Lys39 является частью сайта IS1. По количеству близких контактов (более ста) и специфических взаимодействий (десять солевых мостиков и четыре водородные связи, большая часть из которых существует на протяжении почти всей симуляции) этот комплекс является лидером по эффективности взаимодействия (табл. 2). Важно отметить, что аминокислотные остатки Asp256 и Asp259 gHSA, участвующие во взаимодействии с RAGE, вплотную примыкают к сайту Садлоу I альбумина, в котором связываются такие вещества, как тироксин, варфарин, азидотимидин, индометацин [39]. Более того, известно, что Asp256 принимает участие в связывании катиона кобальта [40]. Не исключено, что гликирование Lys233 HSA и последующее связывание белка с V-доменом RAGE может значительно повлиять на взаимодействие перечисленных веществ с альбумином.

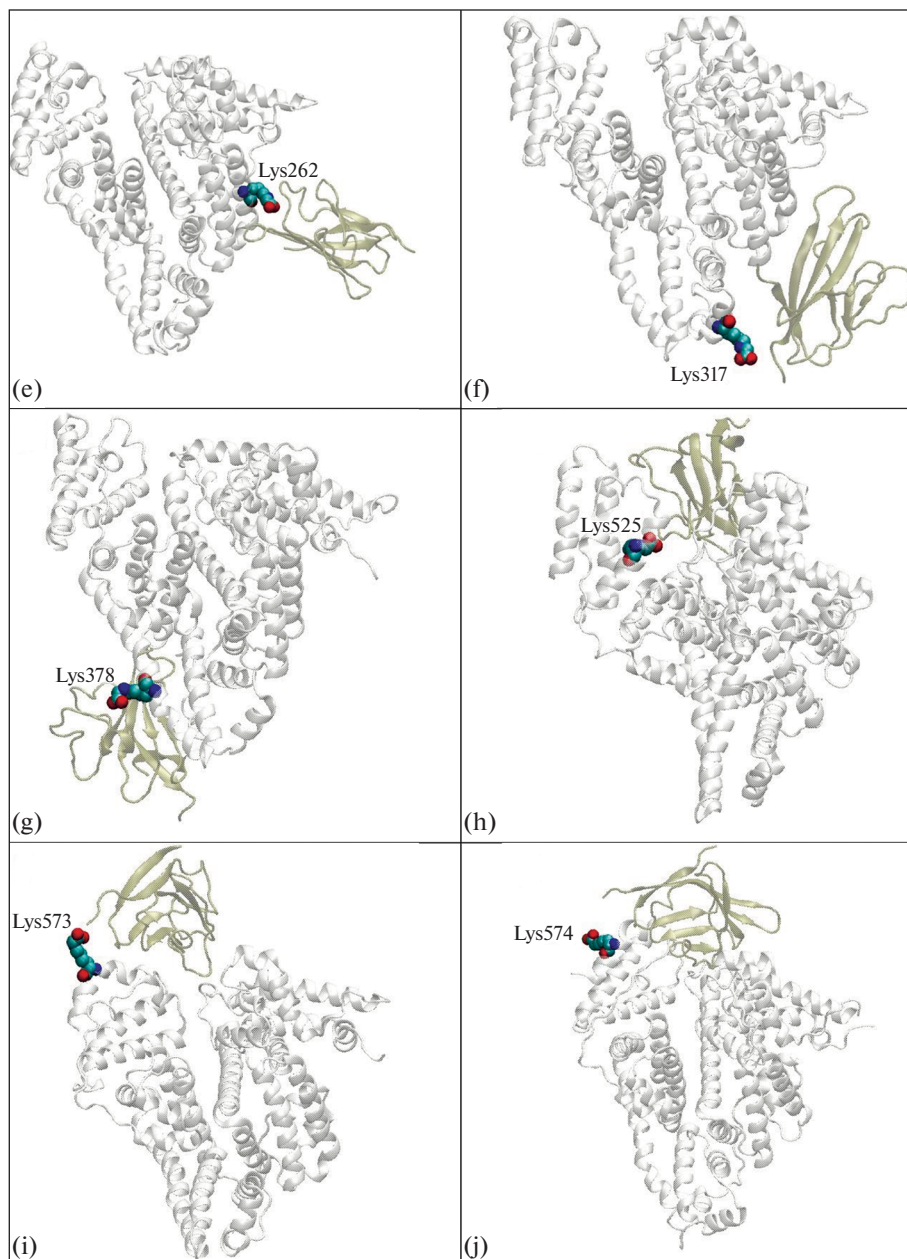


Рис. 5. Окончание.

Поскольку Lys233 и Lys262 расположены близко друг к другу на поверхности альбумина (рис. 3), в случае гликирования Lys262 V-домен связывается с gHSA примерно в той же области, что и в случае гликирования Lys233 (рис. 5e). CML образует солевой мостик с Lys39 RAGE, являющегося частью сайта IS1. Однако этот контакт слабее аналогичного контакта CML233-Lys39, описанного выше, и суще-

ствуется лишь на протяжении 10 нс симуляции. В общей сложности в этом комплексе формируется восемь солевых мостиков и две водородные связи, почти все они сохраняются на протяжении 70 нс и дольше (табл. 2).

По данным макромолекулярного докинга, модифицированный Lys317 взаимодействовал с Arg116, Ile120 и Pro121 RAGE, но, согласно данным МД, этот комплекс оказался нестабильным. В конформации, полученной методом МД (рис. 5f), аминокислоты Lys39 (IS1) и Lys107 (IS2) участвуют во взаимодействии с альбумином, но при этом сам карбоксиметил-лизин не взаимодействует ни с одной аминокислотой RAGE. По количеству контактов этот комплекс также оказался самым непрочным (табл. 2). Поэтому можно сделать вывод, что в реальности RAGE не взаимодействует с гликированным Lys317. Мы полагаем, что эта особенность связана с образованием внутримолекулярного солевого мостика между Lys317 и Lys313 gHSA (рис. 4f), который не позволяет модифицированному Lys317 взаимодействовать с положительно заряженными аминокислотами на поверхности V-домена.

В случае гликирования Lys378 (рис. 5g) CML образует солевой мостик с Arg77 и стерическое взаимодействие с Val78 RAGE. Эти аминокислоты не принадлежат сайтам взаимодействия IS, описанным в [17], более того, стабильное взаимодействие с Arg77 существует только в течение 20 нс симуляции (первые и последние 10 нс). Однако в этом комплексе целых пять аминокислот сайтов IS, а именно Arg29 (IS3), Lys37 (IS1), Lys39 (IS1), Arg48 (IS2) и Asn81 (IS1) принимают участие во взаимодействии с gHSA. Белки образуют пять солевых мостиков, одну водородную связь и одно стэкинг-взаимодействие; четыре из семи описанных контактов сохраняются на протяжении 60 нс и более. По количеству неспецифических контактов (стерических взаимодействий) этот комплекс – один из лидеров (табл. 2). Поэтому, мы полагаем, этот комплекс специфичный (CML принимает участие во взаимодействии с RAGE) и прочный (много близких контактов между белками и участие пяти аминокислот сайтов IS во взаимодействии).

По данным макромолекулярного докинга, модифицированный Lys525 связывался недалеко от Lys52 RAGE. Образованию солевого мостика с Lys52 мешал внутримолекулярный солевой мостик между Lys525 и Arg521. В процессе симуляции конформация комплекса поменялась (рис. 5h). По данным МД, в конечной точке траектории Lys525 взаимодействует с Arg48 RAGE, относящегося к сайту IS2. Однако сближение между этими аминокислотами происходит лишь на последних наносекундах симуляции, образованию прочной ионной связи Lys525-Arg48 препятствует внутримолекулярное взаимодействие между модифицированным Lys525 и аминокислотами Arg521 и Gln522 альбумина. Тем не менее, комплекс оказался достаточно прочным, образуя больше сотни близких контактов между gHSA и RAGE. В комплексе формируется восемь солевых мостиков и одна водородная связь, большинство из них сохраняются длительный период симуляции (табл. 2). Важно отметить, что аминокислоты Glu119, Pro180 и Asp183 HSA, участвующие во взаимодействии с V-доменом, примыкают к лиганд-связывающему сайту III альбумина, в котором связываются такие вещества, как гемин, билирубин, лидокаин [39]. Взаимодействие RAGE с этой областью альбумина может повлиять на метаболизм и фармакокинетику этих лигандов.

В случае гликирования Lys573 (рис. 5i) CML контактирует с Arg29 сайта IS3 RAGE на протяжении 30 нс симуляции, другие аминокислоты сайтов IS во взаимодействии с gHSA не участвуют. Специфических взаимодействий между белками также практически не образуется (табл. 2). В случае гликирования Lys574 (рис. 5j), несмотря на прочность комплекса (более 100 близких контактов между gHSA и RAGE, пять солевых мостиков и четыре водородные связи, табл. 2), это взаимодействие носит неспецифический характер, поскольку в этом комплексе CML не контактирует ни с одной аминокислотой RAGE.

Таким образом, согласно полученным данным, безусловным лидером по эффективности взаимодействия является комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys233. Также весомой специфичностью (долгий прочный контакт CML с V-доменом и большое число специфических взаимодействий) обладает комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys64. Следующими в списке можно отметить случаи модификации Lys262 и Lys525 – в этих комплексах много долгоживущих ионных взаимодействий, но слабый контакт непосредственно между CML и V-доменом. И, наконец, заслуживает внимания комплекс RAGE с gHSA, гликированным по Lys378, который характеризуется невысокой специфичностью, но при этом большим количеством вандерваальсовых взаимодействий. Остальные комплексы отличаются как низкой специфичностью, так и меньшим количеством стерических контактов, а в случае гликирования Lys317 и Lys574 специфические комплексы RAGE с gHSA и вовсе не образуются (CML вообще не взаимодействует ни с одной из аминокислот на поверхности V-домена).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Работы, доказывающие взаимодействие gHSA с RAGE эндотелиальных клеток (ЭК), появились в 1990-е годы [21, 41], существенно позже были опубликованы данные о взаимодействии gHSA с RAGE адипоцитов [42]. С тех пор накапливаются данные о ключевой роли взаимодействия gHSA с RAGE в патогенезе многих заболеваний, в первую очередь СД и сопутствующих патологий [43]. Интересно отметить, что в плазме крови человека обнаружена растворимая форма RAGE (sRAGE), состоящая из внеклеточных доменов V, C1 и C2 [44], более того, уровень sRAGE повышен при СД [45, 46]. sRAGE может связывать AGE, тем самым предотвращая их взаимодействие с клеточным RAGE. Таким образом, если бы удалось найти способ ингибирования процесса взаимодействия gHSA с RAGE и/или усиления взаимодействия с sRAGE, это могло бы стать средством подавления клеточной активации и ограничения долгосрочного повреждения тканей при хронических заболеваниях.

Для этой цели первоочередной задачей является выявление молекулярного механизма взаимодействия gHSA с RAGE. Однако исследований, посвященных этой задаче, пока очень мало. Так, Xie и соавт. [17] методом ЯМР изучая взаимодействие AGE-пептидов и gBSA с RAGE, установили, что только V-домен RAGE участвует в связывании AGE-пептидов и gBSA, а также выявили аминокислоты на поверхности V-домена, принимающие участие в этом взаимодействии (аминокислоты перечислены выше в подразделе “Макромолекулярный докинг” раздела “Методы”). Более того, Xie и соавт. показали, что аффинность альбумина к мономеру V-домена ниже, чем к полному рецептору RAGE, и предположили, что в реальности альбумин связывается не с одной, а с несколькими молекулами RAGE, то есть происходит димеризация или даже олигомеризация рецептора. Таким образом, ключевым отличием взаимодействия gHSA с RAGE от взаимодействия с sRAGE, по всей видимости, является этап олигомеризации клеточной формы рецептора. По этой причине важно определить структуру комплексов gHSA-V: зная механизм взаимодействия gHSA с V-доменом, можно в дальнейшем получить информацию о механизме олигомеризации рецептора и попытаться найти способ предотвратить этот процесс.

Несмотря на существенный вклад в изучение механизма взаимодействия альбумина с RAGE, Xie и соавт. в своей работе [17] не рассматривали, какие именно лизины альбумина принимают участие во взаимодействии с RAGE. Такую попытку предприняли Tramatin и соавт. в своем исследовании [18]. Согласно данным, полученным в работе [18] (комбинируя эксперименты *in vitro* и *in silico*), ключе-

вую роль во взаимодействии gHSA с RAGE играют гликированный Lys525 альбумина и Arg98 V-домена RAGE (здесь и дальше при обсуждении мы приводим нумерацию аминокислот, соответствующую первичной последовательности RAGE из базы данных Uniprot [47], код структуры Q15109, тогда как авторы работы [18] используют нумерацию, не включающую сигнальную последовательность). Также, согласно данным Tramatin и соавт. [18], во взаимодействии gHSA с RAGE со стороны альбумина принимают участие аминокислоты Glu184, Glu188, Glu400, Lys432, Glu518 и Glu556, а со стороны RAGE – Lys107, Glu108, Lys110, Arg114. Это частично согласуется с нашими данными: согласно нашим расчетам, во взаимодействии RAGE с gHSA, гликированным по Lys525, участвуют Glu184 и Glu518 альбумина, а также Lys107 и Glu108 V-домена RAGE. Другие аминокислоты, упомянутые Tramatin и соавт., тоже принимают участие во взаимодействии с альбумином, но гликированному по другим лизинам (Lys64, Lys73, Lys233 и Lys262). Возможно, частичное несоответствие может быть связано с тем, что Tramatin и соавт. изучали другой тип гликирования Lys525 (аддукты Амадори, более ранняя стадия гликирования белков). Тем не менее, и в работе [18], и в наших исследованиях показано, что во взаимодействии гликированного по Lys525 gHSA с RAGE участвуют домены IB и IIВ альбумина.

Можно также сравнить полученные нами *in silico* комплексы gHSA-V с полученной экспериментально структурой V-домена RAGE в комплексе с фрагментом BSA Asp¹²⁴-Glu¹²⁵-Phe¹²⁶-CEL¹²⁷-Ala¹²⁸-Asp¹²⁹-Glu¹³⁰ (BSA¹²⁴⁻¹³⁰), где CEL – это карбоксиэтил-лизин (структура PDB 2L7U [48], получена методом ЯМР). В этом комплексе CEL взаимодействует с остатками Arg98, Gln100 и Lys110 (по нумерации UniProt). В альбумине человека этому фрагменту соответствует фрагмент Thr¹²⁵-Ala¹²⁶-Phe¹²⁷-His¹²⁸-Asp¹²⁹-Asn¹³⁰-Glu¹³¹, то есть в соответствующем пептиде HSA лизин заменен на гистидин. Остатки гистидина также могут быть подвержены гликированию, в дальнейших исследованиях мы планируем изучить взаимодействие гликированного His128 gHSA с RAGE. Пока же можно отметить, что комплекс V-домена с gHSA, гликированным по Lys64, наиболее близок к структуре 2L7U. В обеих структурах модифицированный лизин взаимодействует с Arg98. Однако в комплексе gHSA-V модифицированный лизин Lys64, в отличие от структуры 2L7U, не взаимодействует с Gln100 и Lys110 RAGE. Наложение этих структур представлено на рис. 6а. Как можно увидеть, положение CML относительно RAGE в комплексе с gHSA-V, полученном *in silico*, не совпадает с положением CEL в комплексе с BSA, полученном методом NMR [48]. Однако, мы полагаем, что дело тут не только в ограничениях методов молекулярного моделирования. Пептид, состоящий из 7 аминокислот, – не то же самое, что целая молекула альбумина, состоящая из более чем 580 аминокислот. На рис. 6б представлено наложение структуры 2L7U с полной молекулой BSA (структура PDB 6QS9, цепь А [49]) и структурой VC1-домена RAGE (структура PDB 4OI8, цепь А [30]). При наложении этих структур молекула BSA существенно перекрывается с C1-доменом of RAGE (рис. 6б), то есть конформация комплекса RAGE с BSA, гликированным по Lys127, должна отличаться от конформации комплекса V-домена с пептидом BSA¹²⁴⁻¹³⁰. В отсутствие экспериментальных данных о строении комплекса gHSA с RAGE, только метод макромолекулярного докинга с последующей оптимизацией методом МД может дать первичное представление об этой структуре (с пониманием того, что методы *in silico* имеют свои ограничения, и это представление будет лишь оценочным).

Можно отметить еще один пункт прикладной значимости полученных результатов. Известно, что HSA, с одной стороны, является транспортным белком для многих эндогенных и экзогенных лигандов, с другой стороны – подвержен аллостерической модуляции (связывание лигандов в одном сайте влияет на связывание в

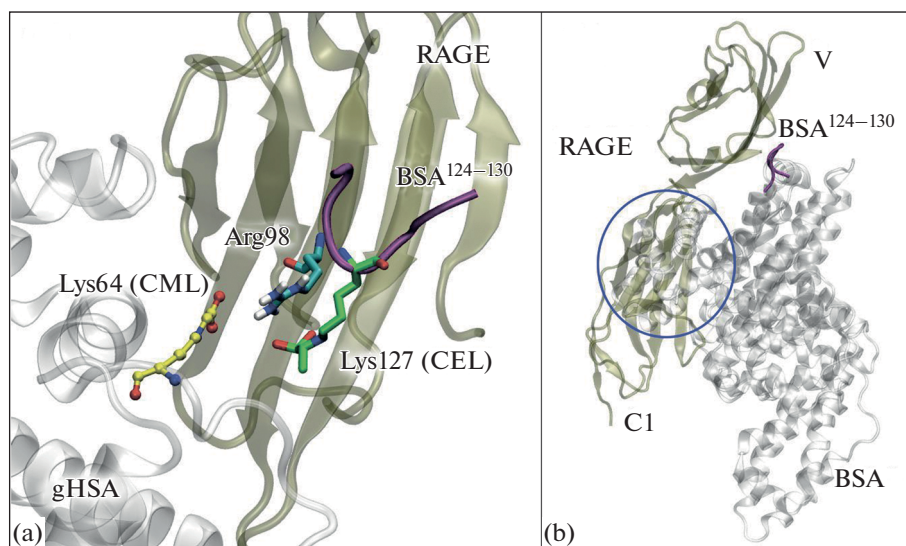


Рис. 6. Взаимодействие RAGE с гликированными лизинами в составе белков и пептидов по данным *in silico* и *in vitro*.

(a) – выравнивание комплекса V-домена с gHSA, гликированным по Lys64, полученного *in silico* в представленной работе, и комплекса V-домена с Lys127-гликированным фрагментом бычьего сывороточного альбумина (аминокислотные остатки 124–130, BSA^{124–130}), полученного методом ЯМР [48]. Атомы углерода CML gHSA и карбоксиэтил-лизина (CEL) BSA^{124–130} выделены желтым и зеленым цветом соответственно. Остов gHSA, V-домен RAGE и пептид BSA^{124–130} показаны серой, коричневой и фиолетовой лентой соответственно. Второстепенные атомы водорода не показаны для четкости рисунка.

(b) – выравнивание структур комплекса V-домена RAGE с BSA^{124–130} [48], полной молекулы BSA [49] и VC1-доменами RAGE [30]. Остов BSA, V-домен RAGE и пептид BSA^{124–130} показаны серой, коричневой и фиолетовой лентой соответственно. Символами V и C1 обозначены V- и C1-домены RAGE соответственно. Перекрытие BSA и C1-домена обведено синим цветом.

другом) [50]. Установлено, что гликирование снижает аффинность альбумина к лигандам сайтов Садлоу I и II [51] и к жирным кислотам [52–55]. Будет ли связывание gHSA с RAGE и sRAGE еще больше менять его связывающую активность, остается невыясненным. С другой стороны, подверженность альбумина аллостерической модуляции может стать ключом к модуляции его взаимодействия с RAGE и sRAGE.

Таким образом, в представленном исследовании мы изучили механизм взаимодействия гликированного альбумина с RAGE, выявили мажорные и минорные сайты взаимодействия. Новая информация о взаимодействии gHSA с RAGE поможет понять роль альбумина в патофизиологии СД и сопутствующих заболеваний и продвинуться на пути создания эффективной патогенетической и симптоматической терапии, а также профилактики этой патологии.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные ограничения представленной работы связаны с несовершенством оценочных функций макромолекулярного докинга. В нашей работе мы использо-

вали программу ZDOCK, авторы которой регулярно публикуют отчеты критической оценки прогнозируемых взаимодействий (reports of critical assessment of predicted interactions, CAPRI reports) [56–58]. Согласно публикуемым отчетам, часть белок–белковых комплексов предсказывается неправильно [58]. Таким образом, про полученные в нашей работе комплексы gHSA-RAGE мы можем утверждать, что это лишь возможные конформации комплексов. Из стека полученных конформаций мы отбирали наиболее вероятные по оценочной функции ZDOCK, а дополнительным критерием отбора служили экспериментальные данные Xie и соавт. [17] об участках RAGE, взаимодействующих с CML в составе пептидов и BSA. Кроме того, стабильность комплексов мы проверяли методом МД. Тем не менее, не исключено, что реальная конформация gHSA-RAGE не соответствует наиболее вероятной по оценочной функции ZDOCK. При этом важно понимать, что никакая другая программа не обладает 100%-ной предсказательной способностью, так что в будущем представляется разумным рассмотреть менее вероятные конформации из числа тех, в которых CML взаимодействует с IS, а также провести сравнительный анализ с применением других программ для макромолекулярного докинга. Из ограничений представленной работы можно также отметить, что мы рассмотрели только 10 остатков лизина из 59 и исследовали только один тип гликирования (карбоксиметил-лизины). Пока что неизученным остается механизм взаимодействия других видов gHSA (карбоксиэтил-лизинов, глиоксаль-лизин-амидов, карбоксиметил-аргининов и др.) с RAGE. Это входит в задачи наших ближайших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00155).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.А.Б. и Н.В.Г.), проведение вычислительного эксперимента (Д.А.Б.), написание и редактирование манускрипта (Д.А.Б. и Н.В.Г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Расчетные эксперименты проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gounden V, Ngu M, Anastasopoulou C, Jialal I (2020) Fructosamine. In: Stat Pearls. StatPearls Publ. Treasure Island (FL).
2. Vlassopoulos A, Lean MEJ, Combet E (2013) Role of oxidative stress in physiological albumin glycation: A neglected interaction. *Free Radic Biol Med* 60: 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.010>
3. Belsare S, Coté G (2021) Development of a colorimetric paper fluidic dipstick assay for measurement of glycated albumin to monitor gestational diabetes at the point-of-care. *Talanta*

- 223(Pt 1): 121728.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121728>
4. *Bettiga A, Fiorio F, Di Marco F, Trevisani F, Romani A, Porrini E, Salonia A, Montorsi F, Vago R* (2019) The modern western diet rich in advanced glycation end-products (AGEs): An overview of its impact on obesity and early progression of renal pathology. *Nutrients* 11(8): 1748.
<https://doi.org/10.3390/nu11081748>
 5. *Fritz G* (2011) RAGE: A single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci* 36: 625–632.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.08.008>
 6. *Гаврилова АО, Северина АС, Шамхалова МШ, Шестакова МВ* (2021) Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе диабетической нефропатии. *Сахарный диабет* 24(5): 461–469. [*Gavrilova AO, Severina AS, Shamkhalova MSH, Shestakova MV* (2021) The role of advanced glycation end products in pathogenesis of diabetic nephropathy. *Sakharnyy diabet* 24(5): 461–469. (In Russ)].
<https://doi.org/10.14341/DM12784>
 7. *Gill V, Kumar V, Singh K, Kumar A, Kim JJ* (2019) Advanced glycation end products (AGEs) may be a striking link between modern diet and health. *Biomolecules* 9(12): 888.
<https://doi.org/10.3390/biom9120888>
 8. *Smith PK* (2017) Do advanced glycation end-products cause food allergy? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 17: 325–331.
<https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000385>
 9. *Sukkar MB, Wood LG, Tooze M, Simpson JL, McDonald VM, Gibson PG, Wark PAB* (2012) Soluble RAGE is deficient in neutrophilic asthma and COPD. *Eur Respir J* 39: 721–729.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00022011>
 10. *Gutowska K, Czajkowski K, Kuryłowicz A* (2023) Receptor for the Advanced Glycation End Products (RAGE) Pathway in Adipose Tissue Metabolism. *Int J Mol Sci* 24(13): 10982.
<https://doi.org/10.3390/ijms241310982>
 11. *Morales ME, Rojas RA, Monasterio AV, González BI, Figueroa CI, Manques M B, Romero EJ, Llanos LJ, Valdés ME, Cofré LC* (2013) Lesiones gástricas en pacientes infectados con *Helicobacter pylori*: Expresión de RAGE (receptor de productos de glicosilización avanzada) y otros inmunomarcadores. *Rev Med Chil* 141: 1240–1248.
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872013001000002>
 12. *Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, Notari S, Ascenzi P* (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life* 57(12): 787–796.
<https://doi.org/10.1080/15216540500404093>
 13. *van der Vusse GJ* (2009) Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet* 24(4): 300–307.
<https://doi.org/10.2133/dmpk.24.300>
 14. *Giglio RV, Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, Maniscalco R, Ligi D, Mannello F, Ciaccio M* (2020) Recent Updates and Advances in the Use of Glycated Albumin for the Diagnosis and Monitoring of Diabetes and Renal, Cerebro- and Cardio-Metabolic Diseases. *J Clin Med* 9: 3634.
<https://doi.org/10.3390/jcm9113634>
 15. *Arasteh A, Farahi S, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA* (2014) Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. *J Diabetes Metab Disord* 13: 49.
<https://doi.org/10.1186/2251-6581-13-49>
 16. *Qiu HY, Hou NN, Shi JF, Liu YP, Kan CX, Han F, Sun XD* (2021) Comprehensive overview of human serum albumin glycation in diabetes mellitus. *World J Diabetes* 12(7): 1057–1069.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i7.1057>
 17. *Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A* (2008) Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem* 283(40): 27255–27269.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801622200>
 18. *Tramarin A, Naldi M, Degani G, Lupu L, Wiegand P, Mazzolari A, Altomare A, Aldini G, Popolo L, Vistoli G, Przybylski M, Bartolini M* (2020) Unveiling the molecular mechanisms underpinning biorecognition of early-glycated human serum albumin and receptor for advanced glycation end products. *Anal Bioanal Chem* 412(18): 4245–4259.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02674-w>
 19. *Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR* (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 4(1): 17.
<https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
 20. *Hein KL, Kragh-Hansen U, Morth JP, Jeppesen MD, Otzen D, Møller JV, Nissen P* (2010) Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. *J Struct Biol* 171(3): 353–360.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.03.014>
 21. *Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM* (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands

- for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 274(44): 31740–31749.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31740>
22. *Yatime L, Andersen GR* (2013) Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products. *FEBS J* 280(24): 6556–6568.
<https://doi.org/10.1111/febs.12556>
 23. *Mohan SK, Gupta AA, Yu C* (2013) Interaction of the S100A6 mutant (C3S) with the V domain of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Biochem Biophys Res Commun* 434(2): 328–333.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.049>
 24. *Humphrey W, Dalke A, Schulten K* (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 28–33.
[https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
 25. *Ansari NA, Moinuddin, Ali R* (2011) Glycated lysine residues: a marker for non-enzymatic protein glycation in age-related diseases. *Dis Markers* 30(6): 317–324.
<https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0791>
 26. *Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E* (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2: 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
 27. *Trott O, Olson AJ* (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem* 31(2): 455–461.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
 28. *Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim BH, Vreven T, Weng Z* (2014) ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics* 30(12): 1771–1773.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu097>
 29. *Pierce BG, Hourai Y, Weng Z* (2011) Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library. *PLoS One* 6(9): e24657.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024657>
 30. *Sirois CM, Jin T, Miller AL, Bertheloot D, Nakamura H, Horvath GL, Mian A, Jiang J, Schrum J, Bossaller L, Pelka K, Garbi N, Brewah Y, Tian J, Chang C, Chowdhury PS, Sims GP, Kolbeck R, Coyle AJ, Humbles AA, Xiao TS, Latz E* (2013) RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA. *J Exp Med* 210(11): 2447–2463.
<https://doi.org/10.1084/jem.20120201>
 31. *Foloppe N, MacKerell AD Jr* (2000) All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J Comput Chem* 21: 86–104.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(20000130\)21:2%3C86::AID-JCC2%3E3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(20000130)21:2%3C86::AID-JCC2%3E3.0.CO;2-G)
 32. *Jorgensen WL* (1981) Quantum and statistical mechanical studies of liquids. 10. Transferable intermolecular potential functions for water, alcohols, and ethers. Application to liquid water. *J Am Chem Soc* 103(2): 335–340.
<https://doi.org/10.1021/ja00392a016>
 33. *Bussi G, Zylova-Timan T, Parrinello M* (2009) Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling. *J Chem Phys* 130(7): 074101.
<https://doi.org/10.1063/1.3073889>
 34. *Parrinello M, Rahman A* (1980) Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study. *Phys Rev Lett* 45: 1196–1199.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.1196>
 35. *Darden T, York D, Pedersen L* (1993) Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 3: 10089–10092.
<https://doi.org/10.1063/1.464397>
 36. *Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM* (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 18: 1463–1473.
 37. *Sartore G, Bassani D, Ragazzi E, Traldi P, Lapolla A, Moro S* (2021) In silico evaluation of the interaction between ACE2 and SARS-CoV-2 Spike protein in a hyperglycemic environment. *Sci Rep* 11(1): 22860.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-02297-w>
 38. *Penumatchu SR, Chou RH, Yu C* (2014) Structural insights into calcium-bound S100P and the V domain of the RAGE complex. *PLoS One* 2014 9(8): e103947.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103947>
 39. *Sand KM, Bern M, Nilsen J, Noordzij HT, Sandlie I, Andersen JT* (2015) Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. *Front Immunol* 5: 682.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00682>

40. Wu D, Gucwa M, Czub MP, Cooper DR, Shabalin IG, Fritzen R, Arya S, Schwarz-Linek U, Bliņdauer CA, Minor W, Stewart AJ (2023) Structural and biochemical characterisation of Co²⁺-binding sites on serum albumins and their interplay with fatty acids. *Chem Sci* 14(23): 6244–6258.
<https://doi.org/10.1039/d3sc01723k>
41. Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G, Simionescu N, Simionescu M, Stern D (1994) Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19): 8807–8811.
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8807>
42. Chen CY, Abell AM, Moon YS, Kim KH (2012) An advanced glycation end product (AGE)-receptor for AGEs (RAGE) axis restores adipogenic potential of senescent preadipocytes through modulation of p53 protein function. *J Biol Chem* 287(53): 44498–44507.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.399790>
43. Belinskaia DA, Voronina PA, Shmurak VI, Jenkins RO, Goncharov NV (2021) Serum Albumin in Health and Disease: Esterase, Antioxidant, Transporting and Signaling Properties. *Int J Mol Sci* 22(19): 10318.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910318>
44. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108(7): 949–955.
<https://doi.org/10.1172/JCI14002>
45. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Yoshida T, Imaizumi T (2007) Serum levels of sRAGE, the soluble form of receptor for advanced glycation end products, are associated with inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *Mol Med* 13(3–4): 185–189.
<https://doi.org/10.2119/2006-00090>
46. Steenbeke M, De Bruyne S, De Buyzere M, Lapauw B, Speeckaert R, Petrovic M, Delanghe JR, Speeckaert MM (2021) The role of soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) in the general population and patients with diabetes mellitus with a focus on renal function and overall outcome. *Crit Rev Clin Lab Sci* 58(2): 113–130.
<https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1791045>
47. UniProt Consortium (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47(D1): D506–D515.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
48. Xue J, Rai V, Singer D, Chabierski S, Xie J, Reverdatto S, Burz DS, Schmidt AM, Hoffmann R, Shekhtman A (2011) Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs. *Structure* 19(5): 722–732.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.013>
49. Castagna R, Donini S, Colnago P, Serafini A, Parisini E, Bertarelli C (2019) Biohybrid Electrospun Membrane for the Filtration of Ketoprofen Drug from Water. *ACS Omega* 4(8): 13270–13278.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01442>
50. Ascenzi P, Fasano M (2010) Allosterism in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophys Chem* 148(1–3): 16–22.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2010.03.001>
51. Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Bourdon E, Rondeau P (2012) Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycosylated albumin. *Biochimie* 94(9): 1960–1967.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.05.017>
52. Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 259(6): 3812–3817.
53. Yamazaki E, Inagaki M, Kurita O, Inoue T (2005) Kinetics of fatty acid binding ability of glycosylated human serum albumin. *J Biosci* 30(4): 475–481.
<https://doi.org/10.1007/BF02703721>
54. Blache D, Bourdon E, Salloignon P, Lucchi G, Ducoroy P, Petit JM, Verges B, Lagrost L (2015) Glycosylated albumin with loss of fatty acid binding capacity contributes to enhanced arachidonate oxygenation and platelet hyperactivity: relevance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 64(3): 960–972.
<https://doi.org/10.2337/db14-0879>
55. Henning C, Stübner C, Arabi SH, Reichenwallner J, Hinderberger D, Fiedler R, Girndt M, Di Sanzo S, Ori A, Glomb MA (2022) Glycation Alters the Fatty Acid Binding Capacity of Human Serum Albumin. *J Agric Food Chem* 70(9): 3033–3046.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07218>
56. Vreven T, Pierce BG, Hwang H, Weng Z (2013) Performance of ZDOCK in CAPRI rounds 20–26. *Proteins* 81(12): 2175–2182.
<https://doi.org/10.1002/prot.24432>

57. Vreven T, Pierce BG, Borrmann TM, Weng Z (2017) Performance of ZDOCK and IRAD in CAPRI rounds 28-34. *Proteins* 85(3): 408–416.
<https://doi.org/10.1002/prot.25186>
58. Vreven T, Vangaveti S, Borrmann TM, Gaines JC, Weng Z (2020) Performance of ZDOCK and IRAD in CAPRI rounds 39-45. *Proteins* 88(8): 1050–1054.
<https://doi.org/10.1002/prot.25873>

Interaction of Glycated Albumin with Receptor for Glycation End Products According to Molecular Modeling Data

D. A. Belinskaia^{a, *} and N. V. Goncharov^{a, b}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Leningradsky Region, p.o. Kuz'molovsky, Russia*

*e-mail: d_belinskaya@mail.ru

In diabetes mellitus (DM) patients, the accumulation of advanced glycation end products (AGE) leads to inflammation and oxidative stress through the activation of specific receptors for AGE (RAGE). Glycated albumin (gHSA) makes a significant contribution to the overall level of AGE in human body and, as a result, to the pathogenesis of DM and concomitant diseases. The mechanism of interaction of gHSA with RAGE is practically not studied. The purpose of the present paper is to study the binding of gHSA to RAGE using molecular modeling methods, to find the main sites of interaction and structural features of glycation sites that determine the efficiency of complex formation with RAGE. Ten gHSA models were constructed using molecular docking and molecular dynamics (MD) methods; each model corresponded to one modified lysine residue (carboxymethyl-lysine): Lys64, Lys73, Lys137, Lys233, Lys262, Lys317, Lys378, Lys525, Lys573, Lys574. Complexes of gHSA with the V-domain of RAGE were constructed using the macromolecular docking method, and their stability was studied using MD simulation. In the constructed gHSA models, the carboxyl groups of glycated Lys317 and Lys525 form intramolecular salt bridges with surrounding amino acids; in other cases, the carboxyl groups of the modified lysines are free to interact with positively charged amino acid residues on the RAGE surface. According to the macromolecular docking data and subsequent MD simulation, the complex of RAGE with gHSA glycated at Lys233 is most effective in terms of strength and specificity. Specific RAGE complexes with gHSA glycated at Lys317 and Lys574 are not formed. The obtained data on the interaction of gHSA with RAGE will help to understand the role of albumin in the pathophysiology of DM and advance towards the prevention and development of effective therapy for this disease.

Keywords: diabetes mellitus, glycated albumin, carboxymethyl-lysine, receptor for advanced glycation end products, fatty acids, molecular modeling