

УДК 577.322.75

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛЬБУМИНА С АНГИОТЕНЗИН-I-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ ПО ДАННЫМ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

© 2025 г. Д. А. Белинская^а, Н. В. Гончаров^{а, *}

^аИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

*e-mail: ngoncharov@gmail.com

Поступила в редакцию 19.08.2024

После доработки 04.10.2024

Принята к публикации 07.10.2024

Сывороточный альбумин человека (HSA) является эндогенным ингибитором ангиотензин-I-превращающего фермента (ACE) – интегрального мембранного белка, катализирующего расщепление декапептида ангиотензина I до октапептида ангиотензина II. Ингибируя ACE, HSA играет одну из ключевых ролей в ренин-ангиотензин-альдостероновой системе (RAAS). Однако о механизме взаимодействия между этими белками известно немного, структура комплекса HSA–ACE экспериментально еще не получена. Цель представленной работы – в эксперименте *in silico* исследовать взаимодействие HSA с ACE. Методом макромолекулярного докинга получены 10 возможных комплексов HSA–ACE. По количеству стерических и полярных контактов между белками выбран комплекс-лидер, его стабильность была проверена методом молекулярной динамики (МД). Проведен анализ возможного влияния модификаций в молекуле альбумина на его взаимодействие с ACE. Проведен сравнительный анализ структуры полученного нами комплекса HSA–ACE с известной кристаллической структурой комплекса HSA с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Полученные результаты молекулярного моделирования очерчивают направление для дальнейшего изучения механизмов взаимодействия HSA–ACE в экспериментах *in vitro*. Знание этих механизмов поможет в разработке и совершенствовании фармакотерапии, направленной на модуляцию физиологической активности ACE.

Ключевые слова: сывороточный альбумин, ангиотензин-I-превращающий фермент, ренин-ангиотензин-альдостероновая система, точечные мутации, молекулярное моделирование

DOI: 10.31857/S0233475525010025, EDN: uugxfe

ВВЕДЕНИЕ

Ингибиторы ангиотензин-I-превращающего фермента (angiotensin-I-converting enzyme, ACE) рекомендованы в качестве препаратов первой линии для антигипертензивной терапии, особенно у пациентов с сахарным диабетом и сердечно-сосудистыми заболеваниями [1]. Еще в 1970-х годах врачи-реаниматологи обратили внимание на то, что у некоторых пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии развивалась парадоксальная гипотония после инфузии 4% сывороточного альбумина человека (Human Serum Albumin, HSA). Позже была найдена связь между развитием гипотонии и приемом этими пациентами ингибиторов ACE [2]. ACE – это интегральный мембранный белок, Zn-зависимая протеиназа, которая в межклеточном пространстве катализирует расщепление декапептида ангиотензина

I до октапептида ангиотензина II, играя ключевую роль в ренин-ангиотензин-альдостероновой системе (Renin-Angiotensin-Aldosterone System, RAAS) – одной из ключевых гормональных систем человека и млекопитающих, отвечающей за регуляцию артериального давления и системного кровообращения. Позже было опубликовано еще одно исследование на тему связи между HSA и ACE: масштабный скрининг жителей Японских островов выявил, что пониженный уровень сывороточного альбумина является значимым фактором развития гипертензии [3]. Таким образом, накопилось достаточное количество данных, указывающих на участие альбумина в RAAS. Впервые данные о том, что альбумин может напрямую взаимодействовать с ACE, были опубликованы в 1979 году [4], но эта работа осталась практически незамеченной. Переоткрытие ингибирующей активности альбумина по отношению к ACE произошло в 2014 году [5]. Fagyas

et al., отдавая должное авторам статьи 1979 года как первооткрывателям, расширили представления о взаимодействии HSA и ACE. В частности, было установлено, что HSA в большей степени ингибирует активность С-домена ACE, нежели активность N-домена.

Последние несколько лет научная группа под руководством С.М. Данилова проводит комплексное исследование, частью которого является фенотипирование доступных мутаций ACE [6–9]. Особый интерес представляет анализ того, могут ли эти мутации повлиять на взаимодействие HSA–ACE. В одной из недавних работ [9] описан пациент с уникальным фенотипом ACE, особенностью которого является сниженная способность альбумина ингибировать активность ACE. Конкретно в этом случае такая особенность оказалась следствием конкуренции между HSA и другим белком (предположительно хемокином CCL18) за связывание с ACE, вероятно, из-за высокой концентрации CCL18 у этого пациента. Тем не менее в работе было высказано предположение, что изменения в локальной конформации ACE вблизи щели между доменами N и C, вызванное некоторыми мутациями в аминокислотной последовательности фермента, могут иметь клиническое значение, поскольку у носителей этого фенотипа ACE будет ослаблен эффект ингибирования ACE альбумином. Эти пациенты из-за высокой концентрации ангиотензина II подвержены различным сердечно-сосудистым осложнениям.

Что касается мутаций альбумина, существуют десятки генетических вариантов HSA (полный список представлен на сайте albumin.org). В 1980–90-х годах был всплеск публикаций, посвященных обнаружению новых вариаций первичной последовательности белка. Появились работы, посвященные исследованию того, как мутации влияют на функциональные свойства белка. Kragh-Hansen et al. исследовали возможные эффекты некоторых точечных мутаций на лиганд-связывающую способность HSA при взаимодействии пяти структурно охарактеризованных генетических вариантов белка с высокоаффинными к альбумину фармпрепаратами варфарином, салицилатом и диазепамом [10]. Точечные мутации могут влиять на способность альбумина связывать катионы металлов [11], его термостабильность [12], аффинность белка к билирубину, простагландинам, жирным кислотам, гормонам [13, 14]. Однако ни молекулярные механизмы взаимодействия HSA–ACE, ни влияние мутаций или модификаций альбумина (окисление, гликирование) на это взаимодействие еще

никогда не изучены. Знание этих механизмов помогло бы разработать новую эффективную и безопасную фармакотерапию, направленную на опосредованное ингибирование ACE, а именно на стабилизацию взаимодействия между ACE и HSA, что позволит снизить активность ACE на длительный период без лишних побочных эффектов. С другой стороны, информация о молекулярных механизмах связывания HSA с ACE даст возможность скорректировать терапию для пациентов с патологиями, сопровождающимися усиленным окислением и/или гликированием HSA, а также для пациентов-носителей генетических мутаций в структуре HSA и/или ACE.

Пока структура комплекса HSA–ACE не получена экспериментально, некоторые предварительные детали о механизме взаимодействия между белками можно получить с помощью инструментов *in silico*. Цель представленной работы — методами компьютерного моделирования исследовать взаимодействие нативного альбумина с ACE.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка трехмерных моделей. В качестве трехмерной модели HSA использовали кристаллическую структуру белка из базы данных белковых структур (protein data bank, PDB), код структуры 3JQZ, цепь A [15]. В качестве трехмерной модели ACE использовали структуру полноразмерного цитоплазматического сегмента белка, полученную методом криоэлектронной микроскопии, код структуры 7Q3Y [16]. Молекулы лиганда и неиспользуемой цепи альбумина были удалены из структуры 3JQZ. В структуре же 7Q3Y молекулы сахаров, ионы цинка и натрия, а также молекула воды в активном центре были сохранены. Пропущенные атомы были достроены с помощью программного пакета Visual Molecular Dynamics v.1.9.4a53 (VMD, University of Illinois Urbana-Champaign, США) [17].

Макромолекулярный докинг. Подготовленные модели HSA и ACE использовали для процедуры макромолекулярного (белок-белкового) докинга. Докинг проводили с помощью онлайн-сервиса GRAMM [18]. Молекула ACE была задана как рецептор, молекула HSA — как лиганд.

Молекулярная динамика. Конформационные изменения комплексов HSA–ACE во времени были рассчитаны методом молекулярной динамики (МД) с помощью программного пакета GROMACS 2022.2 [19] с использованием силового поля CHARMM27 [20]. Каждый комплекс

виртуально был помещен в периодическую кубическую ячейку, заполненную молекулами воды. Для описания молекул воды использовали модельный потенциал TIP3P (transferable intermolecular potential with 3 points) [21]. Для нейтрализации заряда в систему добавляли ионы натрия. Перед запуском симуляции структуру комплексов HSA–ACE оптимизировали методом минимизации энергии и подвергали релаксации продолжительностью 6 нс. В расчетном эксперименте поддерживали постоянную температуру 300 К и постоянное давление 1 бар с помощью термостата «V-rescale» [22] и баростата Паринелло–Рамана [23]. Дальние электростатические взаимодействия рассчитывали методом Эвальда [24]. При межатомном расстоянии больше 1 нм взаимодействиями Леннарда–Джонса пренебрегали. Длины связей в молекулах поддерживали постоянными с помощью алгоритма LINCS [25]. Время симуляции конформационных изменений составило 100 нс с шагом интегрирования 0.002 пс.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Макромолекулярный докинг HSA на поверхность ACE. Трехмерная структура HSA впервые была получена в 1992 году [26]. Три гомологичных домена (DI, DII и DIII), состоящие из двух субдоменов (A, B), включающих соответственно 6 и 4 α -спирали, образуют трехмерную структуру белка, которая является довольно лабильной (рис. 1).

Альбумин может связывать широкий спектр эндогенных и экзогенных лигандов [27]. Связывание низкомолекулярных лигандов происходит в двух основных сайтах: сайты Sudlow I (граница доменов DI и DII) и Sudlow II (домен DIII) [28]. Эти же сайты (рис. 1) ответственны за истинно эстеразную (Tyr150 в Sudlow I) и псевдоэстеразную (Tyr411 в Sudlow II) активность белка по отношению к сложным эфирам [29]. Помимо нековалентного связывания различных веществ, альбумин может быть подвержен ковалентным модификациям. Так, в молекуле альбумина содержится свободная тиоловая группа в составе цистеина Cys34 (домен DI, рис. 1), наличие которой обуславливает редокс-модификации альбумина: цистеинилирование, гомоцистеинилирование и сульфенилирование [30]. Другой известный тип модификации — присоединение сахаров по лизинам и аргининам. Lys525 (домен DIII, рис. 1) известен как самый реактивный сайт гликирования [31].

В 2022 году методом криоэлектронной микроскопии была получена трехмерная структура

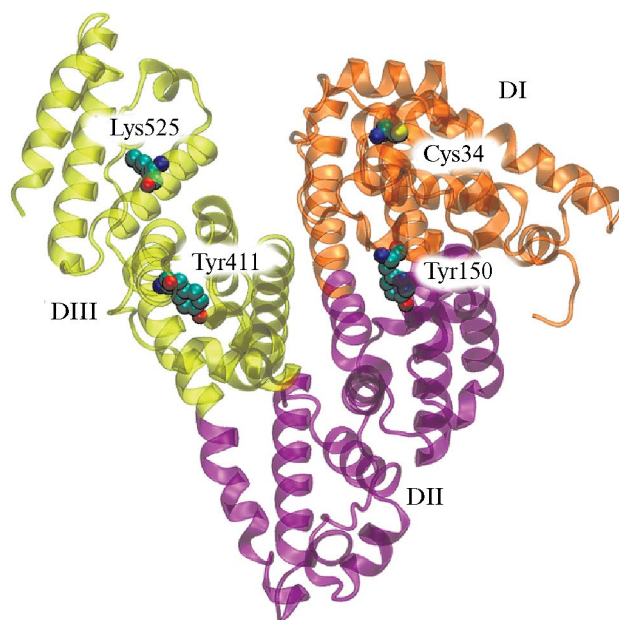


Рис. 1. Структурная организация сывороточного альбумина человека (HSA). Домены DI, DII и DIII HSA представлены оранжевой, фиолетовой и желтой лентой соответственно. Сферами показаны ключевые аминокислоты HSA: редокс-сайт Cys34, основной сайт гликирования Lys525, а также Tyr150 сайта Sudlow I и Tyr411 сайта Sudlow II, играющие ключевую роль в связывающей и (псевдо)эстеразной активности альбумина.

мономера цитоплазматического сегмента рекомбинантного ACE человека (код PDB 7Q3Y [16]). Молекула ACE представляет собой одну полипептидную цепь с молекулярной массой примерно 150–180 кДа и содержит два высокоомологичных домена (N- и C-домены, рис. 2). Хотя оба домена ACE содержат активный центр и ион цинка, они каталитически неравноценны. Их отличает разная скорость гидролиза пептидов, неодинаковая чувствительность к ингибиторам и профиль активации ионами хлора [32–36].

На первом этапе с помощью онлайн-сервиса GRAMM [18] был проведен молекулярный докинг молекулы немодифицированного и свободного от жирных кислот HSA на поверхность ACE. Результатом запуска программы GRAMM являлось 10 наиболее вероятных конформаций комплексов HSA–ACE. 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 энтропийную компоненту, что особенно критично для макромолекулярных комплексов. Поэтому для комплексов

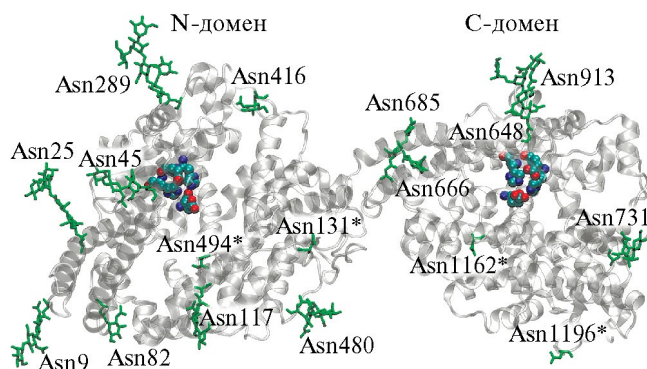


Рис. 2. Структурная организация ангиотензин-1-превращающего фермента (ACE). Молекула ACE представлена серой лентой. Сайты гликозилирования ACE показаны зелеными палочками. Символом * отмечены остатки аспарагина, которые потенциально могут быть гликозилированы в нативном ACE человека, но не гликозилированы в рекомбинантном ACE (код PDB 7Q3Y [16]). Активные центры ACE (His361, Glu362, His365, Glu389 в N-домене и His959, Glu960, His963, Glu987 в C-домене) показаны сферами.

белок-белок рациональнее оценивать силу связывания по контактам между белками — их количеству и типу (стерические или полярные). Чем больше атомов участвует в образовании полярных взаимодействий между белками, тем прочнее и специфичнее комплекс. В нашей работе мы использовали именно этот подход и оценивали прочность комплексов HSA и ACE по числу атомов, образующих близкие контакты между белками (на расстоянии не больше 3.5 Å). С одной стороны, известно, что расстояние 3.5 Å является максимально возможным для существования водородной связи [37]. С другой стороны, энергия сил Ван-дер-Ваальса между атомом водорода и атомом углерода становится отрицательной начиная с расстояния 3.0 Å, а между двумя атомами углерода — начиная с 3.3 Å [38]. Силы Ван-дер-Ваальса действуют и на большем расстоянии, но слабее. Поэтому для ранжирования полученных конформаций мы выбрали «дистанцию отсечения» 3.5 Å, чтобы, с одной стороны, охватить основные взаимодействия, с другой стороны, отсеять более слабые взаимодействия на более дальних расстояниях, сделав число анализируемых контактов адекватным. На рис. 3 представлена структура комплекса-лидера (далее просто комплекс HSA–ACE).

Как видно из рис. 3, в комплексе HSA–ACE, полученным методом макромолекулярного докинга, домен DI HSA связывается в углублении между N- и C-доменами ACE, домен DII HSA — с N-доменом ACE, домен DIII

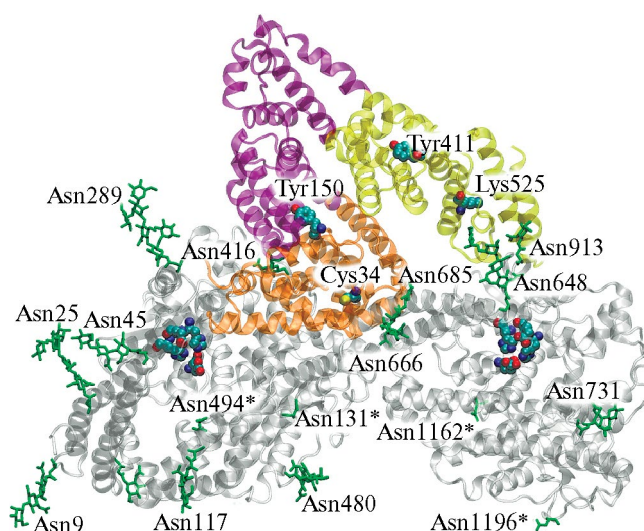


Рис. 3. Наиболее вероятная конформация комплекса HSA–ACE по данным макромолекулярного докинга. Домены DI, DII и DIII HSA представлены оранжевой, фиолетовой и желтой лентой соответственно. Молекула ACE представлена серой лентой. Сайты гликозилирования ACE показаны зелеными палочками. Символом * отмечены остатки аспарагина, которые потенциально могут быть гликозилированы в нативном ACE человека, но не гликозилированы в рекомбинантном ACE (код PDB 7Q3Y [16]). Ключевые аминокислоты HSA и активные центры ACE (His361, Glu362, His365, Glu389 в N-домене и His959, Glu960, His963, Glu987 в C-домене) показаны сферами.

HSA — с C-доменом ACE (рис. 3). Альбумин взаимодействует с гликозилированными остатками Asn685 и Asn913 ACE; впрочем, эти взаимодействия исключительно стерические, полярных взаимодействий между альбумином и сахарами не образуется. Между белками образуется 20 водородных связей и 11 солевых мостиков, всего со стороны HSA в контакте между белками участвуют 540 атомов и 65 аминокислот, а со стороны ACE — 543 атома и 62 аминокислоты. Стабильность этой структуры на следующем этапе мы проверили методом молекулярной динамики.

Молекулярная динамика комплексов HSA–ACE.

В табл. 1 суммирован результат анализа конформации комплекса HSA–ACE по данным МД-симуляции: число атомов в молекулах HSA и ACE, образующих близкие контакты между белками, и основные аминокислоты HSA и ACE, участвующие в этих контактах в финальной конформации после 100 нс симуляции, а также аминокислоты, вовлеченные в специфичные взаимодействия, и время жизни этих взаимодействий в процентном отношении к суммарному времени симуляции.

Таблица 1. Структурные характеристики комплекса HSA–ACE, полученного методом молекулярной динамики: число атомов в молекулах HSA и ACE, образующих близкие контакты между белками (на расстоянии не больше 3.5 Å) в конечной точке симуляции, основные аминокислоты HSA и ACE, участвующие в этих контактах, а также аминокислоты, вовлеченные в специфичные взаимодействия (водородные связи и солевые мостики) и время их жизни в процентах от общего времени симуляции (100 нс)

Число взаимодействующих атомов, HSA/ACE	HSA	ACE	Специфичные взаимодействия HSA–ACE и время их жизни
278/259	Asp1, His9, Lys12, Asp13, Glu16, Glu17, Asn18, Lys20, Gln33, Pro35, Glu37, Asp38, Lys41, Asn44, Glu45, Glu48, Thr52, Val54, Ala55, Asp56, Glu57, Leu80, Thr83, Tyr84, Asn111, Leu112, Pro113, Asp129, Asn130, Glu131, Glu132, Leu135, Lys159, Lys162, Glu280, Pro282, Ala504, Glu505, Thr508, His510, Asp512, Glu565, Thr566, Ala569, Gly572, Lys573, Gln580	Pro141, Asn145, Ala148, Ser149, Arg235, Arg236, Thr280, Ser281, Leu284, Glu320, Lys321, Arg350, Thr352, Arg413, Lys622, Glu625, Arg629, Asn666 , Lys670, Thr673, Gln674, Lys893, Thr900, Pro906, Pro908, Pro909, Glu910, Trp912, Asn913 , Lys914, Lys939, Lys971, Lys1132	Asp1 ^{NH} -Glu320 (SB, 29%) Asp13-Ser281 (HB, 75%) Glu17-Tyr265 (HB, 65%) Glu17-Asn423 (HB, 18%) Lys20-Asp266 (SB, 86%) Glu37-Arg236 (SB, 66%) Glu37-Lys622 (SB, 19%) Asp38-Lys622 (SB, 91%) Lys41-Asp616 (SB, 17%) Ala55 ^O -Arg350 (HB, 67%) Glu57-Arg350 (SB, 76%) Thr79-Glu619 (HB, 5%) Asn111 ^O -Arg629 (HB, 5%) His128 ^O -Asn588 (HB, 30%) Asp129-Arg235 (SB, 96%) Lys159-Asp273 (SB, 63%) Lys162-Asp273 (SB, 89%) Glu280-Arg413 (SB, 67%) Lys286-Asp412 (SB, 11%) Glu505-Lys914 (SB, 71%) Glu505 ^O -Lys939 (HB, 43%) Asp512-Lys971 (SB, 86%) Glu565-Lys1132 (SB, 34%)

Примечание. Жирным шрифтом выделены гликозилированные остатки Asn в молекуле ACE; HB – водородная связь; SB – солевой мостик; верхними индексами O и NH обозначены аминокислоты, у которых в образовании взаимодействий участвуют атомы остова.

Как видно из табл. 1, число контактов между HSA и ACE уменьшается в водном растворе, большинство специфичных взаимодействий в комплексе, полученном методом докинга, теряется на первых этапах симуляции (контакты с временем жизни менее 20% в табл. 1 – это именно те контакты, которые существуют в комплексе HSA–ACE, полученном методом докинга, но распадаются в процессе симуляции МД). Однако в течение симуляции образуются новые взаимодействия. Архитектура комплекса HSA–ACE не меняется в течение симуляции: домен DI HSA остается связанным в углублении между N- и C-доменами ACE, домен DII HSA – с N-доменом ACE, домен DIII HSA – с C-доменом ACE. В комплексе 13 специфичных взаимодействий сохраняются более 50 нс симуляции (табл. 1). Используемый нами подход может быть применен для моделирования взаимодействия между другими белками:

макромолекулярный докинг позволяет отобрать наиболее «перспективную» структуру белок-белкового комплекса, которую затем необходимо уточнить методом молекулярной динамики.

Конформационный анализ комплекса HSA с ACE. Как видно из табл. 1 и рис. 3, максимальный контакт между HSA и ACE приходится на домен DI, субдомен A (аминокислоты 1–197). Существенная часть взаимодействий происходит в области, прилегающей к редокс-сайту Cys34 альбумина. Так, в образовании контактов с ACE участвуют аминокислоты Gln33, Pro35, Glu37 и Asp38, расположенные рядом с Cys34 в полипептидной цепи HSA, а также Tyr84, который сближен с Cys34 в трехмерном пространстве [39]. В конечной точке симуляции Glu37 и Asp38 альбумина вовлечены в образование солевых мостиков с Arg236 и Lys622 ACE (табл. 1), Gln33 связывается

на расстоянии 2.1 Å от Arg629, Pro35 — на расстоянии 2.4 Å от Lys622, а Tyr84 — на расстоянии 2.5 Å от Lys670. Поэтому можно ожидать, что редокс-модификация Cys34 изменит характер связывания HSA с ACE, и наоборот, максимальное влияние связывание ACE окажет на редокс-активность HSA (остальные сайты находятся существенно дальше от области контакта HSA–ACE). Asp38 HSA, взаимодействуя с Lys622 ACE (табл. 1), закрывает доступ к тиоловой группе Cys34. Более того, мы полагаем, что редокс-активность Cys34 будет дополнительно снижена из-за того, что в свободном HSA Asp38, наряду с Tyr84, стабилизирует реактивную тиолатную (депротонированную) форму цистеина, оттягивая на себя протон SH-группы [40]. В комплексе с ACE карбоксильная группа Asp38 взаимодействует с аминокислотами фермента, снижая таким образом реактивность Cys34. Возможен и противоположный эффект: окисление альбумина по тиоловой группе Cys34 повлияет на локальную конформацию домена DI и, как следствие, повлияет на сродство альбумина к ACE. Гипотеза обоснована тем, что, согласно известным экспериментальным данным, окисление Cys34 снижает сродство HSA к другой макромолекуле, а именно к неонатальному Fc-рецептору (neonatal fragment crystallizable receptor, FcRn) [41]. Другие центры активности HSA (каталитические тирозины Tyr150 и Tyr411 в сайтах Sudlow, а также сайт гликирования Lys525) не затронуты напрямую взаимодействием с ACE. Интересно отметить, что, согласно известным экспериментальным данным, гликирование Lys525 ослабляет взаимодействие HSA с FcRn [41, 42], хотя по данным PCA Lys525 напрямую не контактирует с FcRn [43]; следовательно, имеет место аллостерическое влияние

гликирования на сродство к рецептору. Поэтому, несмотря на то что в полученных нами комплексах HSA–ACE нет прямого контакта между Lys525 и поверхностью фермента, мы не исключаем такого же аллостерического эффекта гликирования и для взаимодействия HSA–ACE. Анализ аллостерических эффектов требует дополнительных экспериментов.

Что касается влияния мутаций на взаимодействие HSA–ACE, в работе [8] приведен список известных мутаций ACE, ассоциированных с различными заболеваниями. Согласно результату молекулярной динамики, ни одна из этих аминокислот не задействована во взаимодействии с HSA, поэтому эти мутации, по всей видимости, не повлияют на взаимодействие HSA–ACE. В случае альбумина, среди аминокислот, участвующих в его взаимодействии с ACE (табл. 1), известны мутации Asp13Asn, Glu505Lys и Glu565Lys. На рис. 4 показаны взаимодействия, в которые вовлечены эти аминокислотные остатки.

В случае водородной связи Asp13–Ser281 при замене Asp13 на Asn, водородная связь между этими аминокислотами (рис. 4а), по всей видимости, сохранится, и такая замена не повлияет на эффективность взаимодействия HSA–ACE. Замена же отрицательно заряженных Glu505 и Glu565 (рис. 4б, 4в) на положительно заряженные лизины окажет существенное влияние на взаимодействия Glu505–Lys914 и Glu565–Lys1132, что гипотетически может ослабить прочность комплекса HSA–ACE.

Что касается обратной ситуации (то есть когда какая-либо мутация может привести к усилению взаимодействия), можно отметить аминокислоту Lys573 в HSA. В комплексе HSA–ACE этот

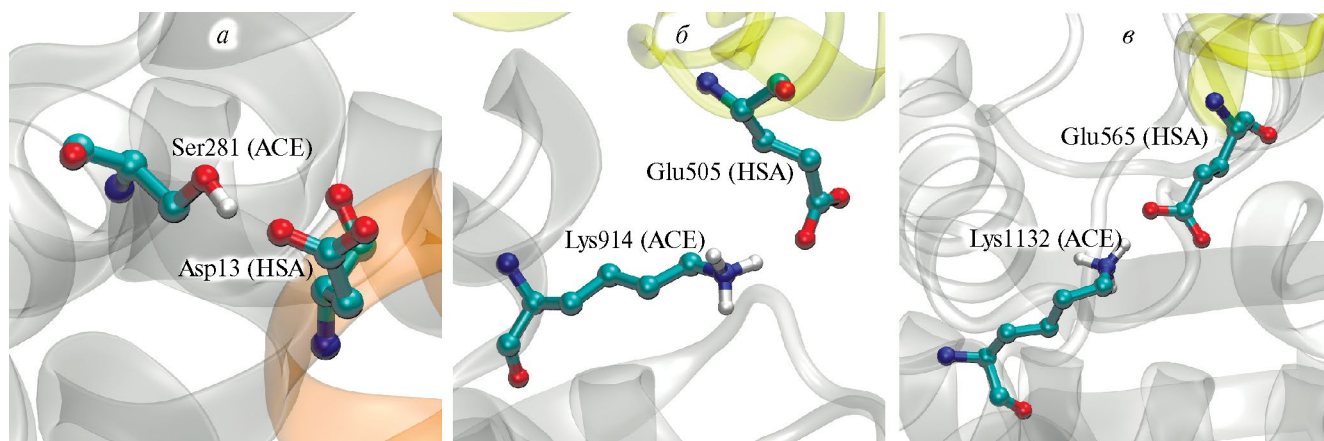


Рис. 4. Специфичные взаимодействия в комплексе HSA–ACE, которые потенциально могут быть затронуты мутациями в молекуле альбумина: Asp13Asn (а), Glu505Lys (б) и Glu565Lys (в). Домены DI и DIII HSA представлены оранжевой и желтой лентой соответственно. Молекула ACE представлена серой лентой.

лизин находится близко к поверхности ACE, но не образует никаких специфичных взаимодействий (табл. 1). В литературе описана мутация Lys573Glu в молекуле HSA. В ближайшем окружении Lys573 HSA в комплексе HSA–ACE расположен Lys893 ACE. Замена лизина на глутамат может привести к образованию солевого мостика между этим глутаматом и Lys893 ACE, что может усилить взаимодействие HSA–ACE.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как отмечалось выше, достоверно подтверждено, что альбумин является эндогенным ингибитором ACE [5], однако о механизме взаимодействия между этими белками известно немного. Нет никаких экспериментальных данных ни о том, какие аминокислоты принимают участие в связывании, ни о том, как меняется эффективность связывания у модифицированных белков. В представленной работе методами макромолекулярного докинга и впервые с применением метода молекулярной динамики мы представили модели комплекса HSA–ACE, но пока нет возможности оценить реалистичность полученных нами структур. Недавно был проведен молекулярный докинг молекулы HSA на поверхность ACE [9]. В полученном авторами комплексе домен DI HSA связывается между N- и C-доменами ACE, домен DII HSA взаимодействует с C-доменом ACE, а домен DIII HSA не взаимодействует с поверхностью фермента. Ни один из комплексов HSA–ACE, полученных нами в представленной работе, не похож на структуру из работы

Enyedi et al. Мы полагаем, это может быть связано с тем, что авторы работы [9] для молекулярного докинга использовали структуру альбумина, загруженную семью молекулами пальмитиновой кислоты, мы же в наших исследованиях проводили докинг альбумина, свободного от жирных кислот. Известно, что связывание с жирными кислотами существенно влияет на конформацию HSA и, как следствие, может повлиять на его взаимодействие с ACE. Мы сочли необходимым на первом этапе использовать именно свободный альбумин по той причине, что суммарная концентрация мажорных жирных кислот в здоровом организме не превышает 100 мкМ, поэтому часть молекул альбумина (концентрация которого в плазме составляет 500–700 мкМ) в любом случае будет находиться в свободном состоянии. На следующих этапах, разумеется, представляется важным более основательно, с применением МД, изучить взаимодействие ACE с альбумином, загруженным жирными кислотами (равно как с окисленным и гликированным HSA), чтобы изучить, как модификации альбумина, отражающие различные патологии, повлияют на его взаимодействие с ACE.

В отсутствие экспериментальных данных о механизме взаимодействия HSA–ACE можно пока сравнить наши результаты с известными экспериментальными данными о взаимодействии альбумина с другой макромолекулярной структурой, а именно с неонатальным Fc-рецептором – внутриклеточным рецептором, который необходим для доставки вновь синтезированного альбумина к базолатеральной стороне клеток

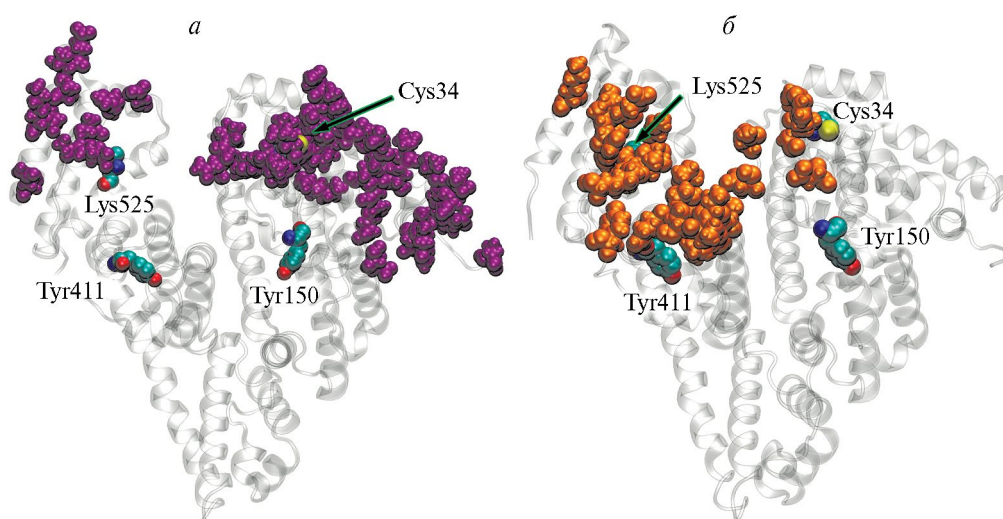


Рис. 5. Топология сайтов взаимодействия HSA с макромолекулами. Поверхность альбумина показана серым цветом, поверхности сайтов – цветными сферами. *а* – Сайт взаимодействия (фиолетовым) нативного HSA с ACE по данным МД; *б* – сайт взаимодействия (оранжевым) нативного HSA с рецептором FcRn по данным PCA [43].

и последующей секреции альбумина в кровоток. Механизм взаимодействия альбумина с FcRn хорошо изучен, в 2014 году методом PCA получена структура их комплекса (код PDB 4N0F [43]).

На рис. 5 представлено сравнение топологий полученного нами комплекса HSA–ACE и экспериментальной структуры комплекса HSA–FcRn. Как видно из рис. 5, во взаимодействии HSA с ACE (рис. 5a) и FcRn (рис. 5б) в целом задействованы схожие участки на поверхности альбумина. Конечно, эти участки не идентичны, но и размеры ACE и FcRn также существенно различаются: длина полипептидной цепи ACE в структуре 7Q3Y составляет 1201 аминокислоту, а длина FcRn в структуре 4N0F – 267 аминокислот. Тем не менее в обоих случаях во взаимодействии принимают участие домены DI и DIII альбумина.

Выше, в разделе «Конформационный анализ комплекса HSA с ACE» мы высказали предположение, что окисление HSA по тиоловой группе Cys34 может повлиять на его взаимодействие с ACE. Гипотеза обоснована тем, что окисление Cys34 снижает сродство HSA и к FcRn [41]. Интересно отметить, что, согласно известным экспериментальным данным, гликирование Lys525 также ослабляет взаимодействие HSA с FcRn [41, 42], хотя по данным PCA Lys525 напрямую не контактирует с FcRn, то есть имеет место аллостерическое влияние гликирования на сродство к рецептору. Поэтому, несмотря на то что в полученном нами комплексе HSA–ACE нет прямого контакта между Lys525 и поверхностью фермента, мы не исключаем такого же аллостерического эффекта гликирования и для взаимодействия HSA–ACE.

Что касается мутаций в молекуле альбумина, то сложно представить, что точечная мутация может существенно повлиять на взаимодействие двух таких массивных белков с большой площадью взаимодействия. Тем не менее известно, что некоторые точечные мутации в молекуле альбумина человека изменяют характеристики его взаимодействия с FcRn [44]. Без сомнения, такая восприимчивость связана с тем, что трехмерная структура альбумина обладает достаточно высокой конформационной лабильностью, и в его молекуле могут возникать характерные для мультимерных белков явления кооперативности и аллостерической модуляции [45, 46]. Поэтому мы полагаем, что мутации в молекуле альбумина могут повлиять на эффективность взаимодействия HSA–ACE и, как следствие, на состояние здоровья носителей этих мутаций. Исследования

в этой области еще никем не проводились, интересные открытия еще впереди.

Благодарности. Расчетные эксперименты проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого. Авторы выражают благодарность С. М. Данилову за обсуждение результатов работы и ценные советы.

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

Источники финансирования. Работа выполнена по Госзаданию ИЭФБ РАН № 075-00263-25-00.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных или с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Whelton P.K., Carey R.M., Aronow W.S., Casey D.E. Jr., Collins K.J., Dennison Himmelfarb C., DePalma S.M., Gidding S., Jamerson K.A., Jones D.W., MacLaughlin E.J., Muntner P., Ovbiagele B., Smith S.C. Jr., Spencer C.C., Stafford R.S., Taler S.J., Thomas R.J., Williams K.A. Sr., Williamson J.D., Wright J.T. Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71** (19), e127–e248. doi 10.1016/j.jacc.2017.11.006
2. Howard G., Downward G., Bowie D. 2001. Human serum albumin induced hypotension in the postoperative phase of cardiac surgery. *Anaesth. Intensive Care* **29** (6), 591–594. doi 10.1177/0310057X0102900604
3. Oda E. 2014. Decreased serum albumin predicts hypertension in a Japanese health screening population. *Intern. Med.* **53** (7), 655–660. doi 10.2169/internalmedicine.53.1894
4. Klauser R.J., Robinson C.J., Marinkovic D.V., Erdős E.G. 1979. Inhibition of human peptidyl dipeptidase (angiotensin I converting enzyme: kininase II) by human serum albumin and its fragments. *Hypertension* **1** (3), 281–286. doi 10.1161/01.hyp.1.3.281
5. Fagyas M., Úri K., Siket I.M., Fülöp G.Á., Csató V., Daragó A., Boczán J., Bányai E., Szentkirályi I.E., Maros T.M., Szeráfin T., Édes I., Papp Z., Tóth A. 2014. New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) II: Albumin suppresses

- angiotensin converting enzyme (ACE) activity in human. *PLoS One* **9** (4), e87844. doi 10.1371/journal.pone.0087844
6. Danilov S.M., Jain M.S., Petukhov P.A., Kurilova O.V., Ilinsky V.V., Trakhtman P.E., Dadali E.L., Samokhodskaya L.M., Kamalov A.A., Kost O.A. 2023. Blood ACE phenotyping for personalized medicine: Revelation of patients with conformationally altered ACE. *Biomedicines* **11** (2), 534. doi 10.3390/biomedicines11020534
 7. Kozuch A.J., Petukhov P.A., Fagyas M., Popova I.A., Lindeblad M.O., Bobkov A.P., Kamalov A.A., Toth A., Dudek S.M., Danilov S.M. 2023. Urinary ACE phenotyping as a research and diagnostic tool: Identification of sex-dependent ACE immunoreactivity. *Biomedicines* **11** (3), 953. doi 10.3390/biomedicines11030953
 8. Danilov S.M., Adzhubei I.A., Kozuch A.J., Petukhov P.A., Popova I.A., Choudhury A., Sengupta D., Dudek S.M. 2024. Carriers of heterozygous loss-of-function ACE mutations are at risk for Alzheimer's disease. *Biomedicines* **12** (1), 162. doi 10.3390/biomedicines12010162
 9. Enyedi E.E., Petukhov P.A., Kozuch A.J., Dudek S.M., Toth A., Fagyas M., Danilov S.M. 2024. ACE phenotyping in human blood and tissues: Revelation of ACE outliers and sex differences in ACE sialylation. *Biomedicines* **1** (5), 940. doi 10.3390/biomedicines12050940
 10. Kragh-Hansen U. 1990. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan. Med. Bull.* **37** (1), 57–84.
 11. Kragh-Hansen U., Brennan S.O., Minchiotti L., Galliano M. 1994. Modified high-affinity binding of Ni^{2+} , Ca^{2+} and Zn^{2+} to natural mutants of human serum albumin and proalbumin. *Biochem. J.* **301** (Pt 1), 217–223. doi 10.1042/bj3010217
 12. Kragh-Hansen U., Saito S., Nishi K., Anraku M., Otagiri M. 2005. Effect of genetic variation on the thermal stability of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1747** (1), 81–88. doi 10.1016/j.bbapap.2004.09.025
 13. Kragh-Hansen U., Minchiotti L., Galliano M., Peters T. Jr. 2013. Human serum albumin isoforms: Genetic and molecular aspects and functional consequences. *Biochim. Biophys. Acta.* **1830** (12), 5405–5417. doi 10.1016/j.bbagen.2013.03.026
 14. Caridi G., Lugani F., Angeletti A., Campagnoli M., Galliano M., Minchiotti L. 2022. Variations in the human serum albumin gene: Molecular and functional aspects. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (3), 1159. doi 10.3390/ijms23031159
 15. Hein K.L., Kragh-Hansen U., Morth J.P., Jeppesen M.D., Otzen D., Møller J.V., Nissen P. 2010. Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. *J. Struct. Biol.* **171** (3), 353–360. doi 10.1016/j.jsb.2010.03.014
 16. Lubbe L., Sewell B.T., Woodward J.D., Sturrock E.D. 2022. Cryo-EM reveals mechanisms of angiotensin I-converting enzyme allostery and dimerization. *EMBO J.* **41** (16), e110550. doi 10.15252/embj.2021110550
 17. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14** (1), 33–38. doi 10.1016/0263-7855(96)00018-5
 18. Singh A., Copeland M.M., Kundrotas P.J., Vakser I.A. 2024. GRAMM Web server for protein docking. *Methods Mol. Biol.* **2714**, 101–112. doi 10.1007/978-1-0716-3441-7_5
 19. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25. doi 10.1016/j.softx.2015.06.001
 20. Foloppe N., MacKerell A.D. 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. doi 10.1002/(SICI)1096-987X(20000130)21:2%3C86::AID-JCC2%3E3.0.CO;2-G
 21. Jorgensen W.L. 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**, 335–340.
 22. Bussi G., Zykova-Timan T., Parrinello M. 2009. Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **130** (7), 074101. doi 10.1063/1.3073889
 23. Parrinello M., Rahman A. 1980. Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. *Phys. Rev. Lett.* **45**, 1196–1199. doi 10.1103/PhysRevLett.45.1196
 24. Darden T., York D., Pedersen L. 1993. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **3**, 10089–10092. doi 10.1063/1.464397
 25. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. 1997. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.* **18**, 1463–1473. doi 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12%3C1463::AID-JCC4%3E3.0.CO;2-H
 26. He X.M., Carter D.C. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209–215. doi 10.1038/358209a0
 27. 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**, 787–796. doi 10.1080/15216540500404093
 28. Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **12** (6), 1052–1061.

29. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Vovk M.A., Shmurak V.I., Batalova A.A., Jenkins R.O., Goncharov N.V. 2021. Esterase activity of serum albumin studied by ^1H NMR spectroscopy and molecular modelling. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (19), 10593. doi 10.3390/ijms221910593
30. Nakashima F., Shibata T., Kamiya K., Yoshitake J., Kikuchi R., Matsushita T., Ishii I., Giménez-Bastida J.A., Schneider C., Uchida K. 2018. Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins. *Sci. Rep.* **8** (1), 932. doi 10.1038/s41598-018-19610-9
31. Qiu H.Y., Hou N.N., Shi J.F., Liu Y.P., Kan C.X., Han F., Sun X.D. 2021. Comprehensive overview of human serum albumin glycation in diabetes mellitus. *World J. Diabetes.* **12**, 1057–1069. doi 10.4239/wjd.v12.i7.1057
32. Wei L., Alhenc-Gelas F., Corvol P., Clauser E. 1991. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.* **266** (14), 9002–9008.
33. Wei L., Clauser E., Alhenc-Gelas F., Corvol P. 1992. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J. Biol. Chem.* **267** (19), 13398–13405.
34. Jaspard E., Wei L., Alhenc-Gelas F. 1993. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J. Biol. Chem.* **268** (13), 9496–9503.
35. Кугаевская Е.В. 2005. Ангиотензин-превращающий фермент. Доменная структура и свойства. *Биомед. хим.* **51** (6), 567–580.
36. Cozier G.E., Lubbe L., Sturrock E.D., Acharya K.R. 2020. ACE-domain selectivity extends beyond direct interacting residues at the active site. *Biochem. J.* **477** (7), 1241–1259. doi 10.1042/BCJ20200060
37. Tan K.P., Singh K., Hazra A., Madhusudhan M.S. 2020. Peptide bond planarity constrains hydrogen bond geometry and influences secondary structure conformations. *Curr. Res. Struct. Biol.* **3**, 1–8. doi 10.1016/j.crstbi.2020.11.002
38. Li S., Chesnutt D.B. 1985. Intramolecular van der Waals interactions and chemical shifts: A model for β - and γ -effects. *Magn. Reson. Chem.* **23**, 625–638.
39. Belinskaia D.A., Voronina P.A., Shmurak V.I., Jenkins R.O., Goncharov N.V. 2021. Serum albumin in health and disease: Esterase, antioxidant, transporting and signaling properties. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (19), 10318. doi 10.3390/ijms221910318
40. Stewart A.J., Blindauer C.A., Berezenko S., Sleep D., Tooth D., Sadler P.J. 2005. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *FEBS J.* **272** (2), 353–362. doi 10.1111/j.1742-4658.2004.04474.x
41. Leblanc Y., Berger M., Seifert A., Bihoreau N., Chevreux G. 2019. Human serum albumin presents isoform variants with altered neonatal Fc receptor interactions. *Protein Sci.* **28** (11), 1982–1992. doi 10.1002/pro.3733
42. Wagner M.C., Myslinski J., Pratap S., Flores B., Rhodes G., Campos-Bilderback S.B., Sandoval R.M., Kumar S., Patel M., Ashish, Molitoris B.A. 2016. Mechanism of increased clearance of glycated albumin by proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **310** (10), F1089–1102. doi 10.1152/ajprenal.00605.2015
43. Oganessian V., Damschroder M.M., Cook K.E., Li Q., Gao C., Wu H., Dall'Acqua W.F. 2014. Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J. Biol. Chem.* **289** (11), 7812–7824. doi 10.1074/jbc.M113.537563
44. Sand K.M., Bern M., Nilsen J., Dalhus B., Gunnarsen K.S., Cameron J., Grevys A., Bunting K., Sandlie I., Andersen J.T. 2014. Interaction with both domain I and III of albumin is required for optimal pH-dependent binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J. Biol. Chem.* **289** (50), 34583–34594. doi 10.1074/jbc.M114.587675
45. Ascenzi P., Bocedi A., Notari S., Fanali G., Fesce R., Fasano M. 2006. Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin. *Mini Rev. Med. Chem.* **6**, 483–489. doi 10.2174/138955706776361448
46. Ascenzi P., Fasano M. 2010. Allostery in a monomeric protein: The case of human serum albumin. *Biophys. Chem.* **48**, 16–22. doi 10.1016/j.bpc.2010.03.001

Interaction of Albumin with Angiotensin-I-Converting Enzyme According to Molecular Modeling Data

D. A. Belinskaia¹, N. V. Goncharov¹, *

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

**e-mail: ngoncharov@gmail.com*

Human serum albumin (HSA) is an endogenous inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme (ACE), an integral membrane protein that catalyzes the cleavage of angiotensin I decapeptide to angiotensin II octapeptide. By inhibiting ACE, HSA plays a key role in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). However, little is known about the mechanism of interaction between these proteins; the structure of the HSA–ACE complex has not yet been obtained experimentally. The purpose of the present work is to investigate the interaction of HSA with ACE *in silico*. Ten possible HSA–ACE complexes were obtained by the procedure of macromolecular docking. Based on the number of steric and polar contacts between the proteins, the leading complex was selected, the stability of which was then tested by molecular dynamics (MD) simulation. An analysis of the possible effect of modifications in the albumin molecule on its interaction with ACE was performed. A comparative analysis of the structure of the HSA–ACE complex obtained by us, was performed with the known crystal structure of the HSA complex with neonatal Fc receptor (FcRn). The molecular modeling data outline the direction for further study of the mechanisms of HSA–ACE interaction *in vitro*. Information about these mechanisms will help in the design and improvement of pharmacotherapy aimed at modulating the physiological activity of ACE.

Keywords: serum albumin, angiotensin-I-converting enzyme, renin-angiotensin-aldosterone system, point mutations, molecular modeling