

Биоинформатический поиск низкомолекулярных лигандов гликированной формы человеческого сывороточного альбумина, способных модулировать его взаимодействие с β -амилоидным пептидом

Литус Е.^{1*}, Шевелёва М.¹, Мачулин А.², Дерюшева Е.¹

¹ ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН, Институт биологического приборостроения, Пушкино, Московская область, Россия

² ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пушкино, Московская область, Россия

* ealitus@gmail.com

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин; гликированная форма; β -амилоидный пептид; низкомолекулярные лиганды; модулирование взаимодействий

Мотивация и цель: Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой серьезную проблему в обществе, являясь одной из наиболее распространенных форм деменции. Смертность от БА стремительно растет: по данным ВОЗ, она входит в десятку основных причин смертности в мире. Ключевым механизмом развития БА является накопление β -амилоидного пептида (А β) в тканях головного мозга, что приводит к образованию амилоидных бляшек. Этот процесс вызывает нарушение нейронной функции и приводит к постепенной деградации когнитивных способностей [1]. Исследования показывают, что увеличение скорости выведения А β может использоваться для замедления прогрессирования БА. Один из перспективных методов в данном направлении – воздействие на человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), который играет биологически значимую роль в транспортировке А β [2]. ЧСА связывает около 90 % А β в сыворотке крови, а в цереброспинальной жидкости от 40 до 94 %. ЧСА подавляет агрегацию А β и снижает риск развития БА и ее прогрессию. По этой причине ЧСА рассматривается как терапевтическая мишень для лечения БА. Одним из разрабатываемых подходов в данном направлении является увеличение сродства ЧСА к А β путем изменения концентрации низкомолекулярных лигандов ЧСА в крови. Наши исследования показывают возможность увеличения сродства ЧСА к А β с помощью таких низкомолекулярных лигандов ЧСА как линолевая кислота, серотонин, ибупрофен и преднизон. Кроме того, некоторые из лигандов ЧСА (рисперидон, мефенаминовая кислота) стоит рассматривать как потенциально опасные. Наши данные показывают, что они способны уменьшать константу связывания мономерной формы А β с ЧСА. Это может привести к увеличению «свободной» фракции А β , что в свою очередь способствует образованию амилоидных фибрилл [3]. Отметим, что полученные нами данные *in vitro* согласуются с результатами клинических и эпидемиологических исследований. Для дальнейшего развития данного направления необходимо проведение экспериментов в условиях, более полно соответствующих условиям *in vivo*. Так, например, не изучено влияния модификаций самого ЧСА на его функциональную активность по отношению к А β . Известно, что уровень гликированной фракции

ЧСА повышен у пациентов с диагнозом БА [4]. Уровень гликированного ЧСА в сыворотке пациентов с сахарным диабетом, ассоциированным с БА, может достигать 30 % от общей фракции ЧСА [5]. В данной работе проведен поиск низкомолекулярных лигандов гликированной формы ЧСА, способных модулировать его взаимодействие с Аβ.

Методы и алгоритмы: Для формирования панели низкомолекулярных веществ – лигандов гликированной фракции ЧСА, потенциально способных модулировать образование комплекса ЧСА-Аβ, в качестве основного источника данных была использована база данных DrugBank (<https://go.drugbank.com>). Алгоритм выбора веществ подробно описан в [3]. Отметим, что в качестве критериев отбора были использованы физико-химические характеристики веществ, а также их строгая ассоциация с БА. Конечная панель веществ содержит 100 наименований. Для оценки специфичности сайтов связывания исследуемых лигандов были смоделированы трехмерные комплексы низкомолекулярных лигандов с ЧСА. Трехмерная структура ЧСА была получена из Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>, PDB ID: 1ao6, chain A). Для подготовки ЧСА к моделированию использовалось программное обеспечение AutoDockTools (ADT) (http://autodock.scripps.edu/resources/adtd/index_html). Трехмерные (3D) структуры панели лигандов были получены в формате sdf с сервера PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) и преобразованы в файлы pdb с помощью PyMOL v.1.6.9.0. (<https://pymol.org/2/>). Программа Auto Dock Vina (<http://vina.scripps.edu/index.html>) использовалась для молекулярного докинга выбранных лигандов с ЧСА. Комплексы белок-лиганд были визуализированы с помощью PyMOL v. 1.6.9.0. (<https://pymol.org/2/>). Характеристики взаимодействий в комплексах белок-лиганд были получены с помощью специализированного сервиса PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>). Для каждого комплекса лиганд-ЧСА были взяты три модели, соответствующие комплексам с наименьшей энергией. Число рассматриваемых далее комплексов было выбрано оптимальным, исходя из анализа литературных данных и доступных трехмерных структур комплексов ЧСА-низкомолекулярный лиганд: у одного и того же лиганда число сайтов связывания варьируется от одного до трех [6]. Для каждого вещества панели (по трем моделям) был рассчитан процент содержания аминокислот, входящий в сайт связывания. Реализация обработки полученных данных была осуществлена на свободно распространяемом высокоуровневом языке программирования Python 3.6, а также языке статистической обработки данных R.

Результаты: Известно, что N-конец и 59 остатков лизина могут выступать в качестве потенциальных мест для образования гликированной формы ЧСА [7, 8]. Также, ЧСА содержит 24 остатка аргинина, которые, наряду с лизинами и N-концом, потенциально могут быть задействованы в формировании гликированной формы ЧСА [7]. Анализ наличия в сайтах связывания веществ нашей панели низкомолекулярных лигандов (по трем моделям) остатков лизина и аргинина позволил выявить вещества с наименьшим содержанием этих остатков в сайтах связывания с ЧСА: тестостерон (Drug Bank ID: DB00624, 7.4 % Lys, 3.7 % Arg), флурбипрофен (Drug Bank ID: DB00712, 11.1 % Lys, 7.4 % Arg), абиратерон (Drug Bank ID: DB05812, 23.1% Lys, 0 % Arg), эналаприл (Drug Bank ID: DB00584, 14.8% Lys, 11.1% Arg), фторурацил (Drug Bank ID: DB00544, 11.1% Lys, 14.8% Arg), салициловая кислота (Drug Bank ID: DB00936, 14.8% Lys, 14.8 % Arg), эстрадиол (Drug Bank ID: DB00783, 18.5 % Lys, 11.1 % Arg), метопролол (Drug Bank ID:

DB00264, 7.4 % Lys, 29.6 % Arg). Можно предположить, что эти лиганды в большей степени смогут модулировать взаимодействие гликированной формы ЧСА с Аβ вследствие уменьшения конкуренции за связывание ЧСА с глюкозой в сравнении с теми лигандами, центр связывания которых затронут гликированием. Отметим, что выбранные вещества по полученным моделям связаны с разными участками ЧСА и, вероятно, могут по-разному влиять на взаимодействие модифицированной формы ЧСА с Аβ.

Выводы: Таким образом, в данной работе были выбраны 8 лекарственных препаратов, потенциально способных модулировать взаимодействие гликированной формы ЧСА с Аβ. Полученные данные могут использоваться для рационального перепрофилирования лекарственных препаратов при разработке персонализированного подхода к лечению и профилактики БА у пациентов с сопутствующим сахарным диабетом.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (№ 20-74-10072, <https://rscf.ru/project/20-74-10072/>).

Bioinformatic search for low-molecular-weight ligands of the glycated form of human serum albumin capable of modulating its interaction with amyloid β peptide

Litus E.^{1*}, Shevelyova M.¹, Machulin A.², Deryusheva E.¹

¹ *Institute for Biological Instrumentation, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

² *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

* elitus@gmail.com

Key words: human serum albumin; glycated form; amyloid β peptide; low-molecular-weight ligands; modulation of interactions

Motivation and Aim: Alzheimer disease (AD) is one of the most prevalent dementia forms that pose a serious society problem. According to WHO data mortality from AD increases rapidly and now it is one of the ten leading causes of death in the world. The key mechanism of AD development is amyloid β peptide (Aβ) accumulation in brain tissue leading to amyloid plaque formation. The process causes neuronal dysfunction and leads to gradual degradation of cognitive abilities [1]. It was demonstrated earlier that increasing the rate of Aβ clearance may be used to slowing down AD progression. One of the perspective methods is the influence on human serum albumin (HSA) which plays biologically important role in the Aβ transport [2]. HSA binds about 90 % of Aβ in serum and decreases AD risk and its development. Due to this HSA is considered as therapeutic target during AD treatment. One of the approaches being developed in this direction is increase of HSA-Aβ affinity by changing of low-molecular weight HSA ligands concentration in plasma. Our recent studies demonstrate possibility of the affinity increase using such low-molecular weight HSA ligands as linoleic acid, serotonin, ibuprofen and prednisone. Moreover, some of the HSA ligands (risperidone, mefenamic acid) should be considered as potentially dangerous. Our data show that they

are capable of reducing the binding constant of the monomeric A β to HSA. This can lead to an increase of the “free” A β fraction, which in turn promotes the formation of amyloid fibrils [3]. This *in vitro* data agree with the results of clinical and epidemiological studies. For further development, the experiment conditions should more fully correspond to *in vivo* conditions. For example, the effect of HSA modifications on its functional activity towards A β has not been studied. It is known that the level of the glycosylated HSA fraction is increased in AD patients [4]. The level of glycosylated HSA in the serum of patients with diabetes mellitus associated with AD can reach 30% of the total HSA fraction [5]. In this work, we searched for low-molecular weight ligands of the glycosylated HSA that can modulate its interaction with A β .

Methods and Algorithms: To form a panel of low-molecular weight ligands of the glycosylated HSA potentially capable of modulating the HSA-A β complex formation, the DrugBank database (<https://go.drugbank.com>) was used as the main data source. The selecting algorithm is described in detail in [3]. The physicochemical characteristics of the substances, as well as their strong association with AD, were used as selection criteria. The final panel of substances contains 100 items. In order to evaluate the specificity of the binding sites of the studied ligands, three-dimensional complexes of the ligands with HSA were modeled. The three-dimensional structure of HSA was obtained from the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>, PDB ID: 1ao6, chain A). AutoDockTools (ADT) software (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt/index.html>) was used to prepare the HSA for modeling. Three-dimensional (3D) structures of the ligands were obtained in sdf format from the PubChem server (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) and converted to pdb files using PyMOL v.1.6.9.0. (<https://pymol.org/2/>). The Auto Dock Vina program (<http://vina.scripps.edu/index.html>) was used for molecular docking of the selected ligands with HSA. Protein-ligand complexes were visualized using PyMOL v. 1.6.9.0. (<https://pymol.org/2/>). Characteristics of interactions in protein-ligand complexes were obtained using the specialized PLIP service (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>). For each ligand-HSA complex, three models with the lowest energy were taken. The number of complexes considered below was chosen as optimal based on an analysis of literature data and available three-dimensional structures of HSA-low molecular weight ligand complexes: for each ligand, the number of binding sites varies from one to three [6]. For each substance in the panel (according to three models), the percentage of amino acid content included in the binding site was calculated. The implementation of processing the obtained data was carried out in the freely distributed high-level programming language Python 3.6, as well as the statistical data processing R language.

Results: N-terminus and 59 lysine residues of HSA are known to be potential sites for glycation [7, 8]. Moreover, HSA contains 24 arginine residues which could also be involved in the formation of the glycosylated form [7]. Analysis of the presence of lysine and arginine residues in the binding sites of the low-molecular weight ligands involved in the panel (according to three models) allowed us to identify substances with the lowest content of these residues in the HSA binding sites: testosterone (Drug Bank ID: DB00624, 7.4 % Lys, 3.7 % Arg), flurbiprofen (Drug Bank ID: DB00712, 11.1 % Lys, 7.4 % Arg), abiraterone (Drug Bank ID: DB05812, 23.1 % Lys, 0 % Arg), enalapril (Drug Bank ID: DB00584, 14.8 % Lys, 11.1 % Arg), fluorouracil (Drug Bank ID: DB00544, 11.1 % Lys, 14.8 % Arg), salicylic acid (Drug Bank ID: DB00936, 14.8 % Lys, 14.8 % Arg), estradiol (Drug Bank ID: DB00783, 18.5 % Lys, 11.1 % Arg),

metoprolol (Drug Bank ID: DB00264, 7.4 % Lys, 29.6 % Arg). It is worth to assume that according to the obtained models the chosen ligands bind to different regions of HSA molecule and, consequently, may have different effect on the interaction of modified HSA and A β .

Conclusion: 8 drugs potentially capable of modulating interaction between glycosylated HSA and A β were chosen in this work. The obtained data can be used for repurposing of drugs in the development of personalized approach to the treatment and prevention AD in patients with concomitant diabetes mellitus.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (No. 20-74-10072, <https://rscf.ru/project/20-74-10072/>).

Список литературы/References

1. Boada M., Kiprov D., Anaya F. et al. Feasibility, safety, and tolerability of two modalities of plasma exchange with albumin replacement to treat elderly patients with Alzheimer's disease in the AMBAR study. *J Clin Apher.* 2023;38(1):45-54. doi 10.1002/jca.22026
2. Shevelyova M.P., Deryusheva E.I., Nemashkalova E.L. et al. Role of human Serum albumin in the prevention and treatment of Alzheimer's Disease. *Biol Bull Rev.* 2024;14(1):29-42. doi 10.1134/S2079086424010109
3. Deryusheva E.I., Shevelyova M.P., Rastrygina V.A. et al. In search for Low-Molecular-weight Ligands of human Serum albumin That affect Its affinity for monomeric Amyloid β Peptide. *Int J Mol Sci.* 2024;25(9):4975. doi 10.3390/ijms25094975
4. Costa M., Mestre A., Horrillo R. et al. Cross-sectional characterization of albumin glycation state in cerebrospinal fluid and plasma from Alzheimer's disease patients. *J Prev Alzheimer's Dis.* 2019;6(2):139-143. doi 10.14283/jpad.2018.48
5. Wu W.C., Ma W.Y., Wei J.N. et al. Serum Glycated Albumin to Guide the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146780. doi 10.1371/journal.pone.0146780
6. Ghuman J., Zunsain P.A., Petitpas I. et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol.* 2005;353:38-52. doi 10.1016/j.jmb.2005.07.075
7. Shaklai N., Garlick R.L., Bunn H. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem.* 1984;259(6):3812-17. doi 10.1016/S0021-9258(17)43168-1
8. Anguizola J., Matsuda R., Barnaby O.S. et al. Review: glycation of human serum albumin. *Clinica Chimica Acta.* 2013;425:64-76. doi 10.1016/j.cca.2013.07.013