

УДК 575.112

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МАННОЗНОГО РЕЦЕПТОРА CD206 В СРАВНЕНИИ С МОДЕЛЬНЫМ ЛЕКТИНОМ КОНКАНАВАЛИНОМ А

© 2022 И.Д. Злотников, Е.В. Кудряшова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: helenakoudriachova@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.08.2021

После доработки 07.12.2021

Принята к публикации 16.12.2021

С использованием методов молекулярной динамики и нейросетевого анализа впервые проведено компьютерное моделирование комплексообразования моно- и олигосахаридных лигандов с основным (четвёртым) углеводсвязывающим доменом маннозного рецептора CD206 (CRD4), а также с модельным рецептором конканавалином А (ConA). Показано, что ConA является релевантной моделью CD206 (CRD4) вследствие сходства структурной организации сайтов связывания и высокой корреляции значений свободных энергий комплексообразования $r > 0,9$, согласно литературным данным и компьютерному моделированию. Обсуждается роль основных факторов, влияющих на аффинность взаимодействий лиганд–рецептор: количество и природа углеводных остатков, наличие Me-группы в O1-положении, тип гликозидной связи в диманнозе. Показано, что комплексообразование ConA и CD206 с лигандами энергетически обусловлено электростатическими взаимодействиями заряженных остатков (Asn, Asp, Arg) с атомами кислорода и водорода в углеводах; меньший вклад вносит гидрофобная и ван-дер-ваальсова составляющая. Рассмотрен возможный вариант дополнительной стабилизации комплексов за счёт СН-π стекинг-взаимодействий Туг с плоскостью Man-остатка. Изучена роль ионов кальция и марганца в процессах связывания лигандов. Рассчитанные в ходе молекулярной динамики свободные энергии комплексообразования коррелируют с экспериментальными данными (опубликованными для модельного ConA): коэффициент корреляции $r = 0,68$. Проведено обучение нейросети Раfнису на основе набора комплексов лиганд–рецептор PDBbind2020, что позволило увеличить точность предсказаний энергий до $r = 0,8$ и $0,82$ для рецепторов CD206 и ConA соответственно. Предложена модель нормирования значений энергий комплексообразования для вычисления релевантных значений ΔG_{bind} и K_d . На основе разработанной методики определены значения констант диссоциации серии комплексов CD206 с 9 углеводными лигандами различной структуры, ранее не охарактеризованными. Полученные данные открывают перспективы применения компьютерного моделирования для разработки оптимальных носителей лекарств с функцией активного нацеливания на макрофаги, а также определяют границы применимости использования ConA в качестве релевантной модели для исследования параметров связывания CD206 с различными углеводными лигандами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: молекулярная динамика, искусственная нейросеть, CD206, конканавалин А, макрофаги.

DOI: 10.31857/S0320972522010055

ВВЕДЕНИЕ

В представленной работе исследованы возможности метода молекулярной динамики и искусственной нейросети Раfнису [1] для выявления закономерностей в комплексообразовании

маннозного (Man) рецептора макрофагов (МФ) с углеводными лигандами, что необходимо для конструирования носителей лекарств с функцией адресного нацеленного на маннозные рецепторы (МР) макрофага.

Важной задачей для создания эффективных методик лечения различных заболеваний, в том числе болезней дыхательных путей, является не только разработка новых лекарственных средств, но и их направленная доставка к пораженным тканям и клеткам [2]. Целевым объектом могут служить МФ, которые играют важную роль в иммунном ответе за счёт распознавания и уничтожения патогенов [3]. В то же время МФ могут служить резервуаром для роста и размножения бактерий и вирусов, чем сильно ограни-

Принятые сокращения: МД – молекулярная динамика; МР – маннозный рецептор; МФ – макрофаги; НС – нейросеть; ConA – конканавалин А; CRD – углеводраспознающий домен; diMan – α -D-маннопиранозил- α -D-манноза; E – электростатические взаимодействия; Man – манноза; MeMan – метил- α -D-маннопиранозид; NP – неполярная сольватация; P – полярная сольватация; triMan – триманнозид; vdW – ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

* Адресат для корреспонденции.

чивают эффективность антибиотико- и антивирусной терапии [4–5]. Антигенпрезентирующие клетки, в том числе МФ, вносят главный вклад в создание иммуносупрессивного микроокружения опухолей, при этом снижают иммунный ответ [6]. Перспективный путь решения этой проблемы – реполяризация иммуносупрессорных опухоль-ассоциированных макрофагов (M2) в провоспалительные (M1) [7]. Напротив, избыточная провоспалительная активность макрофагов является причиной аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, остеоартрит, рассеянный склероз). Специфическая активация макрофагов предполагается эффективным инструментом для лечения нейродегенеративных заболеваний [8]. Исходя из вышеперечисленного, адресная доставка в макрофаги антибактериальных препаратов или веществ, способных регулировать статус активации МФ в зависимости от задач лечения [9], представляется перспективным подходом для повышения эффективности лекарственной терапии различных заболеваний.

Воздействовать на макрофаги потенциально возможно с помощью связывания биоактивных молекул с рецепторами распознавания образов (pattern recognition receptors), включающими toll-подобные рецепторы (связывают гликолипиды, липополисахариды, липотейхоевые кислоты, пептидогликаны), рецепторы комплемента (распознают опсонизирующие фрагменты C3b, iC3b и C3dg), рецепторы-мусорщики (распознают глико- и липопротеины) и лектиновые рецепторы [3]. Воздействие на последние при таргетировании макрофагов позволяет активировать целевые ветви Т-хелперных лимфоцитов, Th1, Th2 или Th17 [10–11].

Примечательно, что нацеливание на МФ через задействование маннозных рецепторов, которые распознают Man-, Fuc- и GlcNAc-остатки олигосахаридов клеточной стенки патогенных микроорганизмов [12], имеет ряд преимуществ в сравнении со стратегией таргетирования иных рецепторов: воздействие только на болезнетворные макрофаги, снижение риска резистентности и осложнений и повышенная эффективность (<https://www.macrophagetx.com>). Основным маннозным рецептором МФ является CD206 – лектин С-типа, который представляет собой трансмембранный белок (175 кДа). С-Концевая часть CD206 содержит короткую (45 а.о.) цитоплазматическую часть [3]. Связывание углеводов МР происходит за счёт лектиноподобного участка С-типа, состоящего из 8 доменов. Однако способность связывать углеводы изолированно от других частей доказана только для четвёртого углеводраспознающего

домена (CRD4) [13–14]. Поэтому в данной работе для моделирования свойств МР и выявления наиболее специфичных маннозных лигандов использовался CRD4. Следует отметить, что, по результатам экспериментальных данных [15], параметры связывания олигосахаридов парой доменов CRD(4–5) во многом совпадают с таковыми для целого МР CD206, что показано на примере олигосахарида Man23 (23 маннозных остатка в молекуле).

Однако, поскольку сами МР труднодоступны, а экспериментальных данных по комплексам CD206 в литературе крайне мало, для определения основных тенденций в связывании маннозных лигандов часто используются модельные белки-рецепторы. Предполагается, что CD206 демонстрирует высокое сходство с конканавалином А (ConA) в закономерностях связывания углеводов [3]. Одной из задач данной работы является сравнение указанных рецепторов для выявления границ применимости ConA в качестве модели МР. ConA состоит из четырёх субъединиц (26,5 кДа, 237 а.о. каждая), сильно гликирован, связывает углеводы в присутствии катионов металлов (обычно Mn^{2+} и Ca^{2+}) [16–17]. Катион Ca^{2+} координирует аминокислотные остатки и «подготавливает» рецептор к распознаванию углеводов: Ca^{2+} в CD206, в отличие от конканавалина А, участвует в непосредственном комплексообразовании с лигандом. В сайте ConA присутствует второй катион, в данном случае Mn^{2+} (иногда встречается Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}), который фиксирует положение Ca^{2+} , снижая подвижность аминокислотных остатков в сайте связывания. Включение обоих катионов в ConA необходимо для активирования связывающей способности белка [18–19].

Поиск высокоаффинных взаимодействий лиганд–рецептор может быть выполнен с помощью различных физико-химических методов [20]: изотермическая калориметрия титрования [21–22], флуоресцентные методы [23–24], ИК-спектроскопия Фурье [25], метод ингибирования Ландштейнера [26]. Применяются также проточная цитометрия для определения экспрессии антигенов МФ и путей их активации [27], конфокальная микроскопия для визуализации клеточного поглощения носителей лекарств [28]. Активно развивающимся методом является компьютерное моделирование. Молекулярная динамика (МД) и искусственные нейросети (НС) позволяют моделировать разнообразные химические процессы, включая лиганд-рецепторные взаимодействия. Методы *in silico* делают возможным изучение широкого круга соединений с вариабельной структурой и пространственной организацией, синтез которых в

лаборатории является трудоёмким, требует значительных временных затрат и, зачастую, не всегда возможен.

МД позволяет изучать механизмы взаимодействия белков-рецепторов с лигандами: пути протекания [29–31] и кинетику процессов диссоциации комплексов [32], а также связывание лигандов с рецептором [33–35]. МД даёт возможность оценить параметры комплексообразования: свободную энергию взаимодействия, вклад водородных связей, ван-дер-ваальсовых (vdW) и электростатических (E) взаимодействий, энергии растворения и десольватации [33, 36–37]. МД является хорошим инструментом для изучения и уточнения кристаллических структур белков и их комплексов, а именно: моделирование выявляет значимые взаимодействия лиганд–рецептор, которые отсутствуют в кристалле [34]. МД выявляет взаимосвязь гидрофобности/гидрофильности лиганда, его формы (вытянутая, Т-образная, изогнутая) со стабильностью комплекса и кинетикой связывания [38]. Однако МД-подход требует значительных вычислительных мощностей и времени моделирования, что обоснованно в случаях, когда важно выявление механизма взаимодействия исследуемых молекул. В то же время для проведения высокопродуктивного скрининга широкого круга лигандов комплементарным методом (или заменой МД) оценки сродства лигандов к рецептору является искусственная нейросеть.

Известно несколько нейросетей, предсказывающих константы диссоциации (ассоциации) комплексов лиганд–рецептор или константы ингибирования на основе базы данных PDBbind: SE-OnionNet [39], Pafnucy [1], Nnscore 2.0 [40]. Главное преимущество нейросетей перед МД – малое время работы (несколько минут против дней-недель моделирования), а также альтернативный принцип работы НС, который заключается в «сравнении» данной пары лиганд–рецептор с известными из литературных данных (PDBbind) по целому ряду (в данной работе по 19) параметров, включая типы составляющих атомов, валентности, гибридизации, заряды. Точность предсказания аффинности зависит от «обученности» сети, количества слоёв и нейронов в сети и сложности алгоритма. Стоит отметить, что компьютерные методы активно совершенствуются, что открывает перспективы использования МД и НС как значимых инструментов в биохимии.

В последнее время в литературе появился ряд работ, ярко демонстрирующих потенциал нейросетей. Так, в работе Lahey и Rowley [41] с использованием НС предсказана стабильность молекулярных конформаций с точностью, со-

поставимой с квантово-химическими расчётами, при значительном снижении вычислительных затрат симуляции лиганд–рецепторных взаимодействий (например, фосфодиэстераза 5А с тадалафилом). НС способна предсказывать положение рецептора и лиганда при связывании, а также величины энергии Гиббса (с большей корреляцией с экспериментальными данными) для ряда биомолекул, например, биотин карбоксилаза, дегидрофолат редуктаза [42]. С помощью НС и технологий искусственного интеллекта выполнен поиск потенциальных лекарств среди используемых в медицине или проходящих клинические испытания: фалдапревир – гепатит С, иммунодепрессант циклоспорин, ремдисевир, мефупариб и другие. Данные терапевтические агенты могут быть перепрофилированы для снижения вирусной нагрузки, облегчения симптомов COVID-19 и эффективного лечения вирусной инфекции [43].

Однако методы *in silico*, в том числе технология нейросетей, для исследований непосредственно биосистем только начинают использоваться учёными. В то же время значительный потенциал компьютерного моделирования уже продемонстрирован в ряде работ [44–46]. Поэтому одной из задач данной работы является демонстрация перспективности использования НС, а также МД для изучения лиганд–рецепторных взаимодействий моно- и олигосахаридов с CRD4 маннозного рецептора CD206, а также с модельным лектином конканавалином А. Для ряда комплексов ConA–лиганд в литературе определены экспериментальные константы, что позволило валидировать и оптимизировать методику моделирования и на этой основе изучить взаимодействия серии лигандов с четвёртым углеводсвязывающим доменом (CRD4) маннозного рецептора CD206, для которого параметры комплексов ранее не были описаны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Структуры комплексов. Пространственные структуры молекул рецептора ConA и 15 углеводных лигандов были построены с использованием кристаллографических данных PDB (таблица). Варьировали структуру и пространственную организацию лигандов **1–15**: тип углеводных остатков, количество Man- и GlcNAc-остатков в углеводе (от 1 до 5), наличие Me-группы в O1-положении углеводов, тип гликозидной связи ($\alpha 1 \rightarrow 2$, $1 \rightarrow 3$, $1 \rightarrow 6$). Рассмотрены 4 субъединицы белка по 237 а.о. каждая, катионы Ca^{2+} и Mn^{2+} в сайтах связывания лигандов, кристал-

логографическая вода. Структура четвёртого углеводсвязывающего домена маннозного рецептора CD206 построена на основе кристаллографических данных PDB (Асс. No. 7JUF). Рецептор состоит из 135 а.о. и катиона Ca^{2+} . Для Ca^{2+} и Mn^{2+} использовали несвязанную модель 12-6-4 потенциала Леннарда–Джонса. Структуры лигандов к CD206 сгенерированы и подведены к сайту связывания вручную с применением средства визуализации PyMol (<https://pymol.org/2/>) (таблица).

Структуры подготовлены с использованием tLeaP из AmberTools20, 21 [47]: добавлены недостающие атомы водорода, ионы Na^+ для нейтрализации общего заряда комплекса. Система была сольватирована молекулами воды TIP3P [48] с минимальным расстоянием между границей ячейки и белком 10 Å. В среднем размер ячейки с тетрамером ConA составлял $90 \times 95 \times 90 \text{ Å}^3$ с доменом CD206 $60 \times 65 \times 60 \text{ Å}^3$. Силовые поля Amber ff14SBonlysc, GLYCAM_06j1 использовались для описания взаимодействий атомов.

Проведение молекулярной динамики. Моделирование проводилось с использованием пакета молекулярной динамики Amber20. Системы (комплексы рецепторов с лигандами) в водном растворе сначала были минимизированы с использованием 5000 шагов алгоритма наискорейшего спуска с последующими 5000 шагами сопряжённого градиентного алгоритма. Систему нагревали от 0 до 300 К в течение 0,1 нс по модели Ланжевена с использованием частоты столкновений $2,0 \text{ пс}^{-1}$ и при периодических граничных условиях постоянного объёма. Затем была проведена симуляция 100 пс с постоянным давлением 1 атм. Далее – уравнивание системы в течение 100 пс и непосредственно МД (production). Для каждой модели выполнено три независимых цикла с поддержанием температуры на уровне 300 К термостатом Ланжевена ($\text{ntt} = 3$). В случае тетрамера ConA проводилась МД 10 нс (cut-off 8 Å, шаг 2 фс). Моделирование четвёртого домена MP CD206 проводили 50–250 нс (cut-off 8 Å, шаг 2 фс). Увеличение длительности моделирования для маннозного рецептора обусловлено неточностью начальных координат, в некоторых случаях снижение шага до 0,5–1,0 фс предпринято во избежание технических ошибок. Все связи, содержащие атомы водорода, были ограничены алгоритмом SHAKE [49].

Анализ траекторий и топологических файлов комплексов. Анализ траекторий выполнен с помощью MMPBSA.py [50] и cpptraj [51]. Расчёт энергий комплексообразования проведён на основе равновесной (заключительной) части тра-

ектории 3–5 нс при концентрации соли 1,0 М для минимизации неспецифических электростатических взаимодействий с использованием моделей generalized born и Пуассона–Больцмана.

Нейросетевой анализ комплексов. Выбор нейросети Pafnucy [1] обусловлен её лидирующей позицией в рейтинге алгоритмов по предсказыванию аффинностей рецептор–лиганд (CASF-2016). С помощью HC Pafnucy анализировались все пространственные структуры комплексов рецептор–лиганд, полученные после проведения МД. В качестве входных файлов использовались структуры, усреднённые по 30 фреймам заключительной части траектории (ConA), а также единичные структуры из траектории, минимизированные с использованием 10 000 шагов алгоритма наискорейшего спуска с последующими 10 000 шагами сопряжённого градиентного алгоритма (CD206). С помощью prepare.py подготовлен набор из 30 комплексов (по 15 на рецептор) в формате hdf.

Использованы 2 конфигурации нейросети Pafnucy: 1) исходная HC, обученная на основе PDBbind2016 [<https://gitlab.com/cheminflBB/pafnucy>; <http://www.pdbbind.org.cn/index.php>]; 2) нейросеть на основе п.1, с обучающим набором на основе PDBbind2020, включая 14 107 комплексов в general set, 5109 – validation, 226 – core set. Подготовлена авторами настоящей статьи с использованием pdbbind data.ipynb и скриптов split_dataset.py, training.py. Обучение проводилось с параметрами, установленными по умолчанию, кроме числа циклов (эпох) равного 25 (рис. S1, табл. S1 в Приложении). Ошибка проверки (validation error) снижается примерно до пятой эпохи, далее оптимизируется точность только для обучающей выборки.

HC предсказывает значение K_d или K_i на основе анализа 19 характеристик атомов: тип атома (В, С, N, О, Р, S, Se, галоген или металл (9 вариантов)), гибридизация и валентность (3 варианта), связи с тяжёлыми или гетероатомами, дополнительные параметры (гидрофобность, ароматичность, акцепторные/донорные свойства, входит в состав цикла), частичный заряд и принадлежность атома рецептору (–1) или лиганду (1).

Математическая обработка данных. Значения свободных энергий рассчитаны на основе трёх независимых циклов моделирования путём усреднения, для ConA-тетрамера расчёты проведены по четырём субъединицам и затем усреднены. Нормирование полученных данных на экспериментальные проводили по уравнению: $\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{bind (исх)}} k + b$ (ккал/моль). В случае ConA: $k = 0,1125$ и $b = 2,07$ ($R^2 = 0,71$) по методу Пуассона–Больцмана для МД; $k = 2,1961$ и

$b = -9,05$ ($R^2 = 0,67$) – оптимизация нейросети. Для CRD4 CD206 использовались коэффициенты: $k = 0,0137$ и $b = 2,99$ ($R^2 = 0,47$) по методу Пуассона–Больцмана МД; $k = 0,3855$ и $b = 1,33$ ($R^2 = 0,78$) – НС. Более высокая корреляция данных НС по рецептору ConA достигнута при нормировании не энергий, а констант: $K_d = 8,24 \cdot K_{d(\text{исх})} + 10^{-5}$ (М).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Энергетические характеристики комплексообразования ConA и домена CD206 с углеводными лигандами. Для определения параметров лиганда, увеличивающих сродство к маннозным рецепторам, проведено моделирование взаимодействия углеводов, состоящих из Man-, Gal-, Glc-, Fuc- или GlcNAc-остатков (рис. 1, таблица, табл. S2 и S3 в Приложении). Релевантность определённых в ходе моделирования значений констант и свободных энергий подтверждена путём сравнения с литературными данными

для ConA, полученными методом изотермической калориметрии [21], и для домена MP CD206 по сдвигам в спектрах ЯМР [52–53] и конкурентному связыванию (рис. 1) [13]. Абсолютные значения свободных энергий ожидаемо не совпадают, однако прослеживается достаточная высокая для методов *in silico* степень корреляции, что визуально можно определить из сходства зависимостей свободных энергий (рис. 1). Коэффициент корреляции Пирсона с литературными данными $r = 0,82$ для ConA и $r = 0,58$ для CD206, что достаточно с учётом малой изученности маннозного рецептора. Причём наиболее приближёнными к экспериментальным оказались значения, полученные в ходе нейросетевого анализа комплексов рецептор–лиганд после МД. CD206 практически невозможно получить в виде, пригодном для скрининга *in vitro*, а следовательно, компьютерные методы применительно к данным системам обладают значительным потенциалом.

Отметим, что экспериментальные литературные данные по комплексообразованию MP

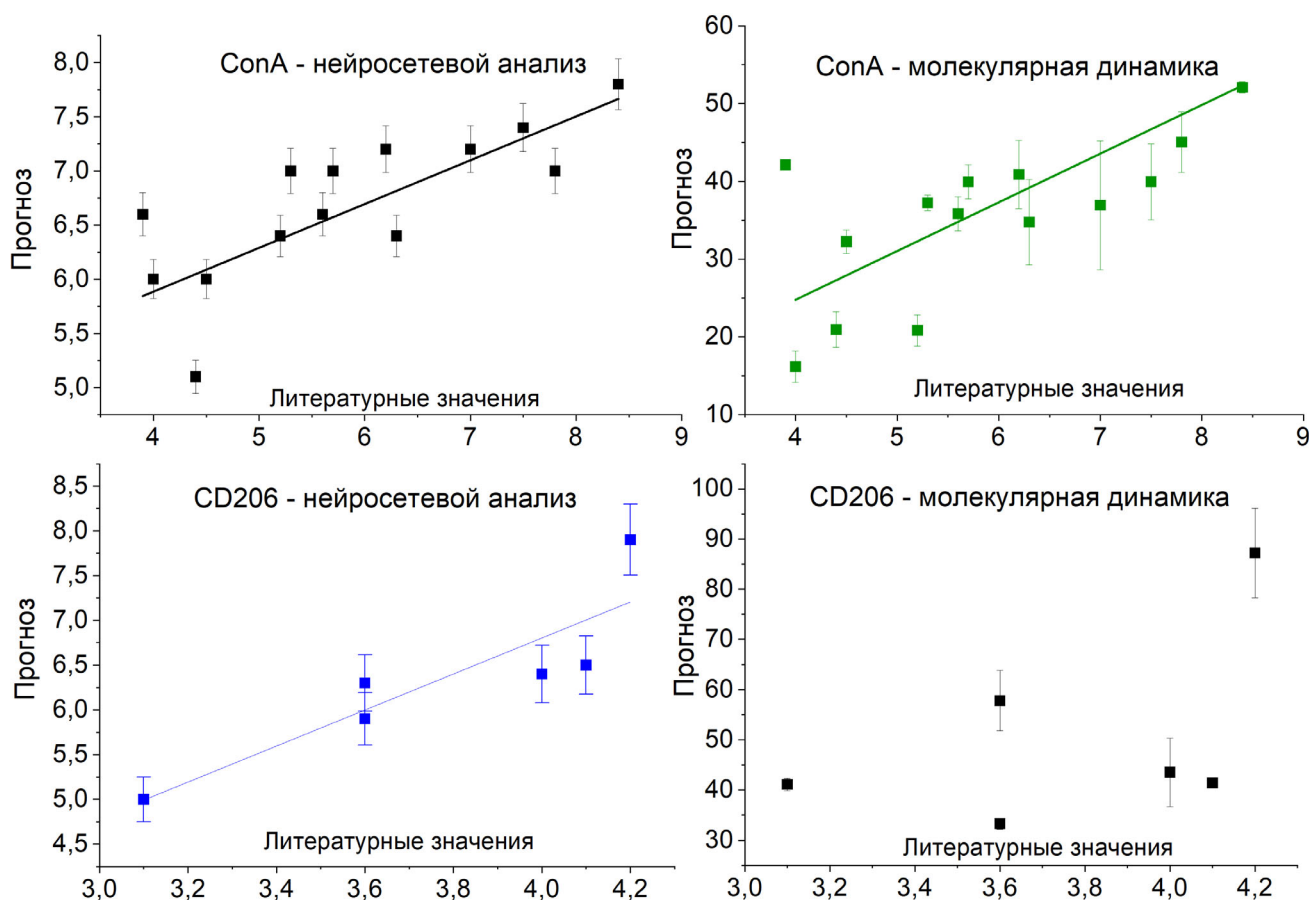


Рис. 1. Энергии комплексообразования ConA и домена маннозного рецептора CRD4 CD206 с углеводными лигандами, рассчитанные с помощью компьютерного моделирования, в сравнении с литературными данными [13, 20, 21, 26, 52, 53]. Для ConA представлены усреднённые по субъединицам значения. T = 300 K. pH = 7. Концентрация NaCl – 1M

Константы диссоциации комплексов ConA и домена маннозного рецептора CRD4 CD206 с углеводными лигандами

Номер	Название лиганда, код PDB комплекса с ConA и номер иллюстрации	K_d (ConA–лиганд), мкМ			$*K_d$ (CD206 CRD4–лиганд), мкМ		
		Молекулярная динамика	Лит. данные	Нейросеть	Молекулярная динамика	Лит. данные	Нейросеть
1	α -маннопираноза [5CNA]; рис. 5 и рис. S5 в Приложении	1450	1100	360	3450	—	3700
2	Me-маннопиранозид [5CNA]; рис. 5, 7, и рис. S3, S5 в Приложении	600	160	190	2900	2400	2360
3	Me- $\alpha(1\rightarrow2)$ -диманнопиранозид [1BXH]; рис. 4	30	7	60	1700	—	20
4	$\alpha(1\rightarrow2)$ -диманнопиранозид [1BXH]; рис. S4 в Приложении	43	24	190	2290	1280	1700
5	Me- $\alpha(1\rightarrow3)$ -диманнопиранозид [1QDO/C]; рис. 4	14	30	56	1800	—	2860
6	$\alpha(1\rightarrow3)$ -диманнопиранозид; рис. S4 в Приложении	16	71	78	1600	2290	1800
7	$\alpha(1\rightarrow6)$ -диманнопиранозид; рис. S4, S7 в Приложении	35	75	145	2400	1010	1600
8	Me- $\alpha(1\rightarrow6)$ -диманнопиранозид; рис. 4, рис. S2 в Приложении	27	120	80	1500	—	1500
9	Me-3,6-ди-O-(маннопиранозил)- α -маннопиранозид [1ONA]	6	2	70	1080	—	2860
10	3,6-ди-O-(маннопиранозил)- α -маннопираноза; рис. 2	16	3	40	780	—	650
11	3,6-ди-O-($\beta(1\rightarrow2)$ -N-ацетилглюкозамин-маннопиранозил)- α -маннопираноза [1TEI]; рис. S6 в Приложении	2	0,7	30	480	—	1000
12	Me- α -глюкопиранозид [1GIC]; рис. S2 в Приложении	590	560	200	>6000*	>6000*	>6000*
13	Me- α -галактопиранозид [1GIC]; рис. 3, рис. S2 в Приложении	70	500	370	>6000*	>6000*	>6000*
14	Me-GlcNAc	11	1350	150	2400	5300	4200
15	Fuc- $\alpha(1\rightarrow3)$ -GlcNAc	3	—	170	2300	—	1400

Примечание. Значения рассчитаны с помощью компьютерного моделирования, в сравнении с литературными данными по методам изотермической калориметрии [21] и ингибированию Ландштейнера [26], а также рассчитанные по сдвигам в спектрах ЯМР [52–53] и конкурентному связыванию [13]. T = 300 K. pH = 7. Концентрация NaCl – 1M.

* Неспецифическое взаимодействие.

описаны лишь для ограниченного круга лигандов: по ЯМР-сдвигам и конкурентному связыванию [13, 52, 53] – 4 из 15 рассмотренных в данной работе. Компьютерное моделирование CD206 или его углеводсвязывающего домена ранее не проводилось, кроме работы Ascutto et al. [54], в которой изучалась часть MP CysRD-CTLD2/3 (домены, которые не играют важной роли в связывании углеводов [55]). Для домена маннозного рецептора CD206

(CRD4) нами рассчитаны 9 значений констант, ранее не опубликованных в статьях.

Роль МД в оптимизации структуры комплексов. Несмотря на то что для 9 комплексов ConA и 4 комплексов CD206 с лигандами в качестве исходных координат использовались структуры из PDB, компьютерное моделирование даже таких систем позволяет значительно оптимизировать пространственное расположение рецептора и лиганда. Экспериментальное определение

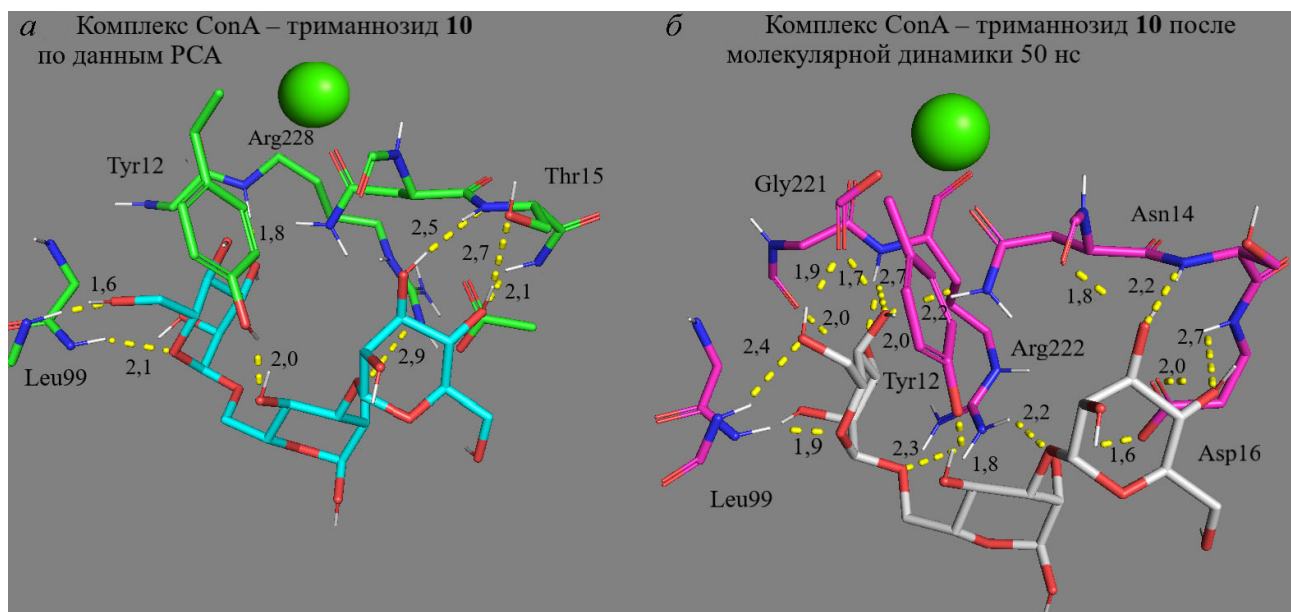


Рис. 2. Поиск оптимального положения лиганда с помощью молекулярной динамики. Показаны комплексы ConA – триманнозид **10** по данным PCA (а) и после молекулярной динамики 50 нс (б). Зелёный шар – Ca^{2+}

структур комплексов проводится методом рентгеноструктурного анализа (РСА) кристалла [56]. Однако данный метод имеет определенные ограничения, связанные с несоответствием условий кристаллизации белка с лигандом и проведением экспериментов по комплексообразованию, неопределённостью положений атомов водорода [57] и различием структур рецептора в растворе и в кристалле. Метод МД позволяет устранить эти недостатки и выявить значимые взаимодействия лиганд–рецептор, которые отсутствуют в кристалле [34]. Роль МД в оптимизации структуры комплекса белок–лиганд продемонстрирована на рис. 2, где сопоставлены положения триманнозида **10** в комплексе с ConA по данным PCA и после моделирования 50 нс. При связывании с рецептором триманноза **10** (рис. 2) взаимодействует центральным Ман-остатком с Arg222 (3 значимые водородные связи 1,8–2,3 Å). Левый ($\alpha 1 \rightarrow 6$) Ман-остаток координируется большим числом аминокислот, в том числе Asn14, Gly221 за счёт образования высокоэнергетических водородных связей атомов O4,5,6 (1,7–2,7 Å). Правый ($\alpha 1 \rightarrow 3$) Ман-остаток сближается с Thr15 на 0,3 Å и Asp. С помощью моделирования показано более энергетически выгодное положение лиганда в сайте связывания относительно комплекса PDB (1ONA).

ConA имеет сходные с CD206 мотивы структуры углеводсвязывающего домена. Насколько структурное сходство транслируется в функциональное, показано далее. Механизм связывания

лигандов четвёртым доменом MP CD206 покажем на примере взаимодействия диманнозы **8** с рецептором (рис. S2 в Приложении). В исходном положении лиганд не образует водородных связей с аминокислотными остатками. В ходе моделирования наблюдается оптимизация пространственного расположения диманнозы: маннозный остаток $\alpha 1$ сближается с рецептором, происходит связывание с Glu107, Asn121, Hie127 (рис. S2 в Приложении). В то же время остаток $\alpha 6$ проворачивается вокруг гликозидной связи, чтобы образовать дополнительные взаимодействия с MP. Отметим, что при использовании в качестве исходного положения рецептора с вручную подведённым лигандом требуется увеличение времени моделирования в сравнении со случаем исходной PDB-структуры: от 10–30 нс до 50–250 нс. Из рис. S2 в Приложении следует, что 30 нс в первом случае недостаточно для оптимизации структуры комплекса. Необходимо не менее 100 нс МД.

Основные закономерности связывания углеводсодержащих лигандов CRD4 CD206 и модельным лектином ConA. На основании рассчитанных с помощью МД и НС констант диссоциации комплексов лиганд–рецептор (таблица, табл. S2 и S3 в Приложении) [58] и механизмов комплексообразования (рис. 2–5 и рис. S2–S8 в Приложении) можно выявить следующие закономерности. По данным МД, наиболее низкие значения констант диссоциации характерны для комплексов рецепторов с биантенными лигандами **9–11** и **15**: K_d (ConA – $(\text{GlcNAc})_2$ –

triMan) = 2 мкМ, K_d (ConA – Fuc- α (1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc) = 3 мкМ. Аналогично домен маннозного рецептора образует наиболее прочные комплексы с лигандами **9–11** с K_d 1080, 780 и 480 мкМ соответственно.

Специфичность рецепторов к типу углеводного остатка. По данным нейросетевого анализа комплексов, сродство углеводных остатков к ConA возрастает в ряду (Gal $\approx$ Fuc) < (Glc $\approx$ Man) < GlcNAc, что коррелирует с литературными данными [20–21]. Несколько отличная закономерность характерна для четвертого домена MP CD206: аффинность к лигандам увеличивается в ряду (Glc $\approx$ Gal) < GlcNAc < (Fuc $\approx$ Man) (таблица). Отметим, что метилированные производные α -D-глюкозы **12** и галактозы **13** (рис. 3) крайне слабо взаимодействуют с MP, но более аффинно связываются с ConA (рис. S3 в Приложении). В ходе моделирования CD206 происходит выход лиганда (**12**, **13**) из сайта связывания и дальнейшее неспецифическое взаимодействие с боковыми аминокислотными остатками (рис. 3). Для остальных исследуемых лигандов наблюдается специфичное связывание в сайте распознавания углеводов.

Аффинность рецепторов к лигандам в зависимости от количества Ман-остатков. Углеводы, содержащие только одно маннопиранозильное кольцо (рис. S4 в Приложении) – Man **1** и MeMan **2** (метил- α -D-маннопиранозид), не обладают высокой аффинностью к ConA – необ-

ходима кластеризация большего количества концевых Man/GlcNAc-остатков. Однако, по данным калориметрического титрования [21], гликопептиды Man7–9, которые моделируют олигосахариды клеточной стенки микроорганизмов, практически не превосходят в сродстве к ConA лиганд **11** (производное triMan – триманнозида), т.е. существует оптимальное количество углеводных остатков, задействованных в связывании. Иными словами, модельный лектин ConA имеет наибольшее сродство к консервативному ядру триманнозида, следовательно, достигнут предел специфичности лиганд–рецептор. В случае CRD4 с увеличением количества доступных Man-остатков, по данным МД и НС, сродство лигандов к MP растёт, однако менее выражено. Что также следует из данных, полученных методом конкурентного связывания в работе Feinberg et al. [13]: Man9 специфичнее MeMan более чем на порядок, а триманнозид – всего лишь в 3 раза специфичнее MeMan. Аффинность MP к маннозосодержащим лигандам возрастает, начиная от 1–2 остатков и вплоть до крупных олигосахаридов и полимеров (например, Man23, маннан) [15].

Влияние типа гликозидной связи в диманнозидах на сродство к рецептору. Рецептор ConA распознаёт диманнозиды **3–8** (рис. 4 и рис. S2 в Приложении) с аффинностью, возрастающей в ряду: α 1 $\rightarrow$ 2 < α 1 $\rightarrow$ 6 < Me- α 1 $\rightarrow$ 6 < α 1 $\rightarrow$ 3 < << Me- α 1 $\rightarrow$ 3 $\approx$ Me- α 1 $\rightarrow$ 2, в котором приведены

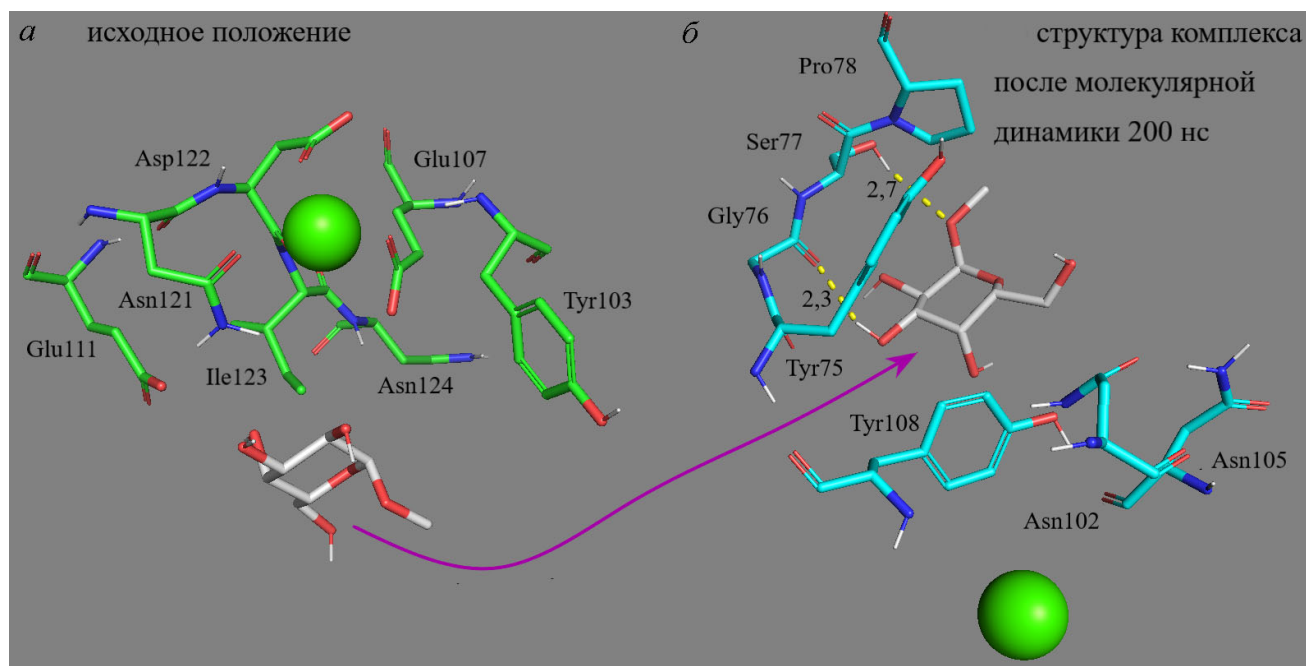


Рис. 3. Неспецифическое взаимодействие метил- α -D-галактопиранозида **13** (белый) с доменом маннозного рецептора CD206. *а* – Исходное положение. *б* – Структура комплекса после молекулярной динамики 200 нс. Зелёный шар – Ca^{2+}

условные обозначения диманнозидов и их метилированных производных (нейросеть, таблица). Таким образом, связь Ман-остатков через атомы кислорода у C1 и C2/3 оптимальная. Однако, исходя из структур комплексов, можно сделать вывод, что в случае $\alpha 1 \rightarrow 2$ и $\alpha 1 \rightarrow 6$ гликозидной связи в α -D-маннопиранозил- α -D-маннозе (diMan) достигается эффект вилки или биантенны, связывание бóльшим количеством атомов (рис. 4) и задействованы 2 Ман-остатка. Общие мотивы в комплексах diMan–ConA: остатки 0MA (терминальные маннопиранозиды) образуют водородные связи с Leu99, Tyr100, Asn14, Asp208, Arg228 – консервативные для большинства комплексов. Вклад в свободную энергию данных взаимодействий таков: Leu и Tyr – 3,95 и 2,45 ккал/моль (vdW, E, NP); Asn и Asp – 3,0 и 4,62 (E); Arg – 3,79 (P); где vdW – ван-дер-ваальсовы взаимодействия, E – электростатические, P – полярная сольватация и NP – неполярная сольватация. Однако для остатка 2MA (Ман с позицией для связи $\alpha 2$) наблюдаются различия в комплексах изомеров диманнозы с ConA. Так, в $\alpha 1 \rightarrow 3$ изомере (рис. 4) 2MA практически не задействован в связывании. В других изомерах реализуются водородные связи с Tyr12 (3,5 ккал/моль; E, NP), Asn14 и Thr15 (5,6 и 3,8 ккал/моль; vdW, E, NP), Asp16 (7,0 ккал/моль; E). Наиболее энергетически выгодные взаимодействия обусловлены электростатическим притяжением к остаткам Asp и Asn. Таким образом, $\alpha 1 \rightarrow 6$ гликозидная связь в diMan делает Ман-остатки дос-

тупными для рецептора и повышает аффинность.

Напротив, биантенным становится $\alpha 1 \rightarrow 2$ -диманнопиранозид при взаимодействии с CRD4 CD206 (рис. S5 в Приложении). При этом рецептор связывает второй Ман-остаток за счёт дополнительных взаимодействий Lys113 (3,3 ккал/моль; vdW, E, NP) и Glu111 (4,5 ккал/моль; E). По данным НС (таблица), аффинность МР к диманнозе 3 с $\alpha 1 \rightarrow 2$ гликозидной связью практически на 2 порядка выше, чем к диманнозам 6–7 с $\alpha 1 \rightarrow 3$ или $\alpha 1 \rightarrow 6$.

Роль CH_3 -группы в O1-положении. Метилирование ОН-групп у O1-атомов углеводов, по данным МД, увеличивает сродство к лектину ConA (рис. S6 в Приложении): в случае маннозы 1–2 – в 2,4 раза; диманнозы 3–4 – в 1,4 раза; диманнозы 5–6 – в 1,14 раза; диманнозы 7–8 – в 1,3 раза; триманнозидов 9–10 – в 2,7 раза соответственно. Для домена CD206 наблюдается похожая картина (рис. 5) для маннозы и $\alpha 1 \rightarrow 2$ и $\alpha 1 \rightarrow 6$ изомеров диманнозы, однако метилирование $\alpha 1 \rightarrow 3$ изомера и триманнозы приводит к снижению аффинности. Таким образом, метильная группа в олигосахаридах мешает связыванию с CD206, что хорошо согласуется с отсутствием таковой в гликанах микроорганизмов, которые распознаёт МР.

Интересен механизм увеличения аффинности моносахаридов к МР за счёт введения гидрофобной группы и блокировки O1-атома от потенциального образования водородных связей.

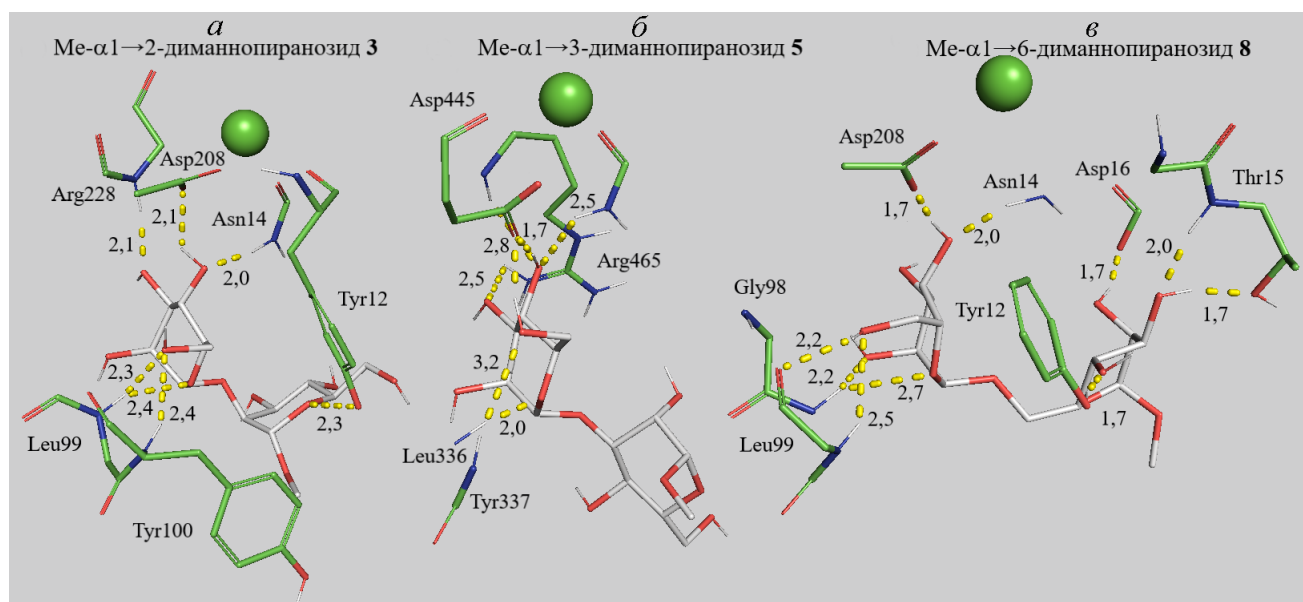


Рис. 4. Влияние типа гликозидной связи на связывание диманнозы (белый) ConA (зелёный). а – Me- $\alpha 1 \rightarrow 2$ -диманнопиранозид 3 – субъединица А. б – Me- $\alpha 1 \rightarrow 3$ -диманнопиранозид 5 – субъединица В. в – Me- $\alpha 1 \rightarrow 6$ -диманнопиранозид 8 – субъединица А. Зелёный шар – Ca^{2+} . Молекулярная динамика 10 нс

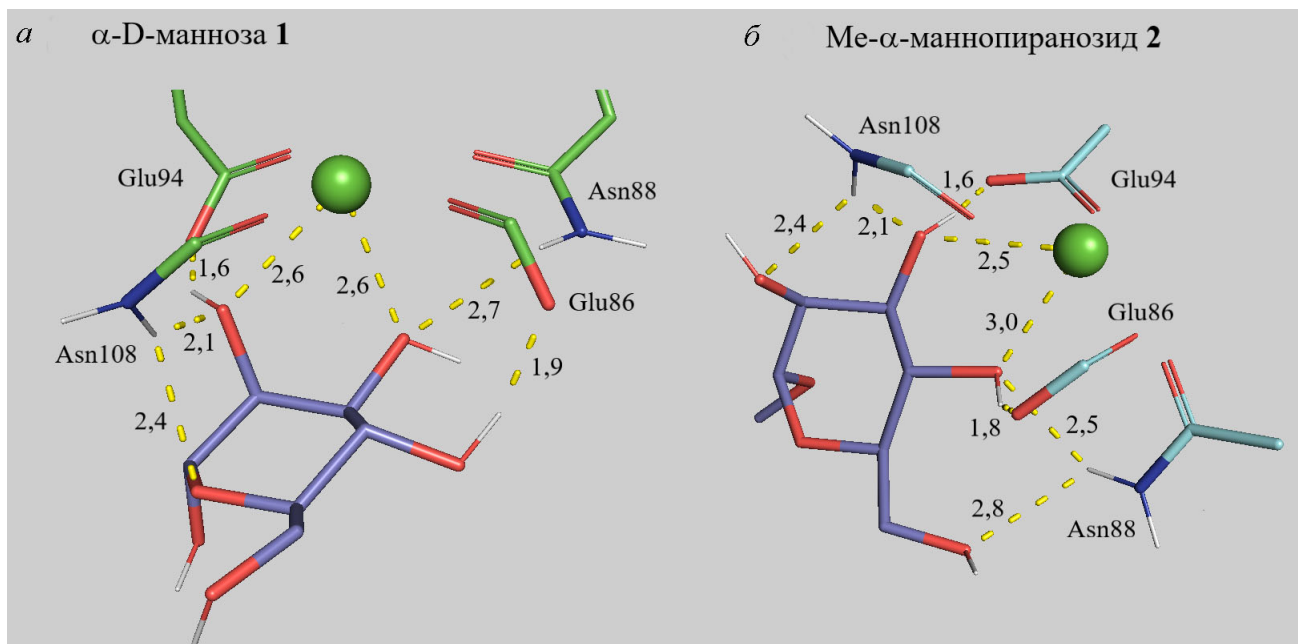


Рис. 5. Влияние метилирования атома O1 на связывание маннозы четвёртым доменом маннозного рецептора CD206. *а* – α-D-манноза **1**. *б* – Me-α-маннопиранозид **2**. Молекулярная динамика 200 нс

CH₃-группа непосредственно не участвует во взаимодействии с рецептором (рис. 5 и рис. S6 в Приложении), однако уменьшает возможность образования взаимодействий O1H-группы с рецептором, что приводит к изменению пространственной ориентации Man-остатка примерно на 90° и, соответственно, к оптимизации связывания маннозы аминокислотными остатками CD206, включая Asn108, Asn88 и Glu94, а также изменяется координация катионом кальция.

Мультивалентное связывание триманнозидов. Триманнозид является природным лигандом к ConA, консервативное ядро triMan в олигосахаридах высокоаффинно к рецептору [20, 21]. Рассмотрим связывание триманнозидов **9–11** (рис. S2 в Приложении) ConA: две плоскости маннопиранозильных остатков перпендикулярны, а третья наклонена примерно под углом 45° к центральной. В данном случае связывание происходит по «улучшенному механизму»: образуется в среднем 15 водородных связей и 5–9 дополнительно опосредованы водой. Сайт лектина расширяется: дополнительно к упомянутым выше задействованы следующие аминокислотные остатки: Asp16, Thr15, Pro13, Tyr12, Asp208. Это обуславливает прочность комплексов с ConA.

Введение терминальных GlcNAc-остатков к triMan приводит к взаимодействию с Thr226, Glu98, Arg228 и Gly224 (рис. S7 в Приложении).

Лиганд **11**, в котором к консервативному ядру триманнозида прикреплены через гликозидную связь β(1→2) два терминальных остатка GlcNAc, оказался самым специфичным к ConA и CD206 среди представленных: K_d (ConA – лиганд **11**) = 2 мкМ; K_d (CRD4 – лиганд **11**) = 480 мкМ.

Термодинамические параметры комплексообразования рецептор–лиганд. Декомпозиция энергии. Как обсуждалось выше, с увеличением количества Man- или GlcNAc-остатков сродство лигандов к ConA и CD206 увеличивается. Рассмотрены водородные связи, образующиеся в комплексе между аминокислотными остатками белка и лигандом. Их количество коррелирует с аффинностью взаимодействия, однако данный параметр не исчерпывающий. Необходимо дополнительно учитывать ван-дер-ваальсовы (vdW) и электростатические (E) взаимодействия, полярную (P) и неполярную (NP) сольватацию. Большое количество ароматических остатков (особенно Tyr) в сайтах связывания углеводов, по-видимому, облегчает связывание за счёт CH-π взаимодействий [59]: например, целлюлозо-синтаза, *Escherichia coli* β-galactosidase (PDB 1JZ8) [60].

Нами проведено разложение свободной энергии комплексообразования на 4 составляющие, указанные выше, для аминокислотных остатков, которые задействованы в связывании (рис. 6).

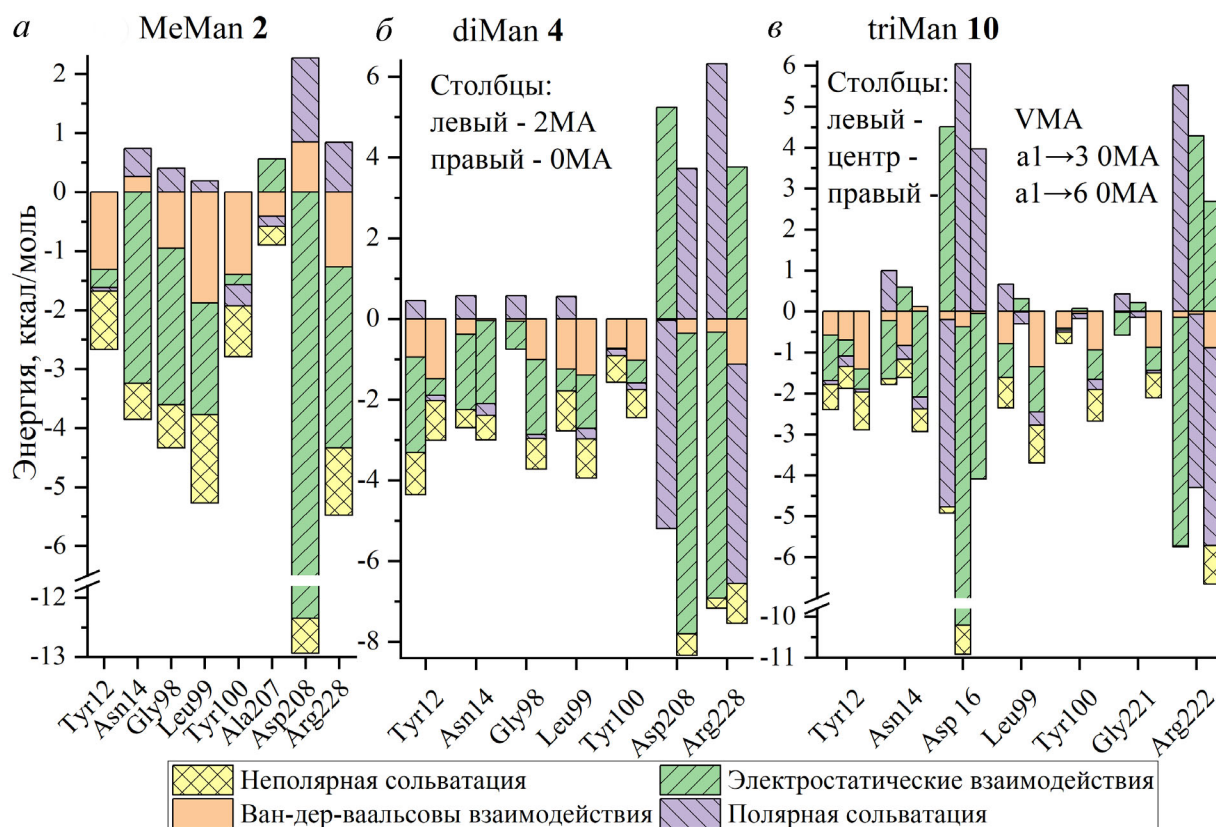


Рис. 6. Компоненты свободной энергии взаимодействия аминокислотных остатков ConA с лигандами MeMan 2 (*a*), diMan 4 (*б*) и MetriMan 10 (*в*). Значения приведены в ккал/моль. Для лигандов 4 и 10 показано разложение по составляющим Ман-остаткам: 0MA – концевой остаток, 2MA – Ман с $\alpha 2$ -позицией для связи, VMA – центральный Ман-остаток в триманнозиде

При связывании моносахаридов (рис. 6, *a*) с ConA наибольший вклад в свободную энергию вносят электростатические взаимодействия (70%) атомов H, O пептидных связей и заряженных групп Asp, Asn, Arg с атомами лиганда. Дополнительная стабилизация связывания моносахарида достигается за счёт vdW-взаимодействий (18%) и неполярной сольватации (20%). Мешающим фактором является полярная сольватация – 8% затраты энергии.

При комплексообразовании действительно могут осуществляться стекинг-взаимодействия (CH- π) между Tyr и Ман-остатком с вкладом в свободную энергию 1–2 ккал/моль. Так, при переходе от Ман к diMan и triMan каждый новый углеводный остаток взаимодействует с Tyr, хотя и с меньшей термодинамической выгодой, однако общее значение энергетического вклада увеличивается от 2,3 до 4,4 ккал/моль.

Связывание диманнозы (рис. 6, *б*), как и в случае MeMan, обеспечивается электростатическими взаимодействиями заряженных групп Asp, Asn, Arg, но с меньшей долей (47%), так как проявляется сглаживание общей энергии за счёт

отталкивания второго остатка (2MA или 0MA). Большее значение приобретают гидрофобные взаимодействия с Tyr12, Tyr100 (включая CH- π стекинг с плоскостями Ман-остатков), Leu99.

Комплексообразование биантенного триманнозида (рис. 6, *в*) по компонентам энергии аналогично диманнозиду. Таким образом, связывание углеводных лигандов в значительной мере обусловлено электростатическими взаимодействиями [35], что согласуется с фактом потери углеводсвязывающей способности ConA при $pH < 4$. Однако велика роль гидрофобных остатков, в том числе ароматических, для увеличения аффинности за счёт CH- π -взаимодействий.

Вытеснение молекул воды. Кроме того, с помощью GIST [61–62] показано, что вблизи сайта связывания ConA и CRD4 энергии взаимодействия молекул воды с аминокислотными остатками рецептора неблагоприятны, $E_{sw} = -2$ ккал/(моль $\text{\AA}^3$), в то время как энергии растворитель–растворитель энергетически выгоднее, $E_{ww} = -18$ ккал/(моль $\text{\AA}^3$). При комплексообразовании триманнозида 9 с доменом CD206 происходит снижение ориентационной

энтропии воды с 4,4 до 0,7 ккал/(моль Å³) и увеличение позиционной компоненты с –139 до –102 ккал/(моль Å³) за счёт перераспределения молекул растворителя. Значит, вытеснение молекул воды лигандом при комплексообразовании обеспечивает дополнительную стабилизирующую термодинамическую составляющую [63–64].

Сравнение домена CD206 и ConA. Одна из задач работы состоит в определении границ применимости ConA в качестве модельного маннозного рецептора. Знание аспектов сходства и отличия рецепторов позволит апробировать системы доставки лекарств на доступном лектине и лишь после этого этапа на самих МР, что позволит значительно оптимизировать эксперименты *in vitro* и *in vivo* [3, 20]. Нами рассмотрены режимы комплексообразования, структуры сайтов связывания, механизмы задействования катионов металлов в связывании углеводов, значения энергий комплексообразования и константы диссоциации комплексов лиганд–рецептор, а также литературные примеры.

Наиболее веским подтверждением сходства закономерностей связывания углеводов ConA и CD206 является *близость относительных изменений констант диссоциаций комплексов* (таблица), что обуславливает обоснованность использования модельного лектина для оптимизации экспериментов *in vitro* и *in vivo* в пользу изучения большего количества лигандов и апробации потенциальных носителей лекарств. Так, коэффициент корреляции между свободными энергиями комплексообразования для шести описанных в литературе комплексов лигандов (№ 2, 4, 6–7, 10, 14) с CD206 и ConA составляет 0,90. В ходе моделирования получены достаточно релевантные значения энергий с высокой взаимосвязью между комплексами обоих рецепторов: данные МД по комплексообразованию CRD4 коррелируют с таковыми для нейросетевого анализа ConA с коэффициентом $r = 0,91$. Таким образом, ConA в закономерностях связывания моно- и олигосахаридов является хорошей моделью маннозного рецептора.

Режимы комплексообразования маннозосодержащих лигандов с рецептором. Главное отличие ConA от домена CD206 – тетрамерная структура. Считается, что все субъединицы ConA взаимодействуют с лигандами одинаково [65], что было поставлено под сомнение в ходе моделирования (табл. S2 в Приложении). Можно предположить, что это связано с возможностью взаимодействия лигандов с различными аминокислотными остатками, а не только определёнными (например, Gly98 и Leu99, расположенными в сайте связывания, вместо Arg228). Такая под-

вижность лигандов (особенно моносахаридов) заметна при моделировании в пс–нс временных интервалах, однако в экспериментах *in vitro* наблюдается усреднённая картина.

Для объяснения различий в субъединицах следует рассмотреть детали механизма комплексообразования. Заметно общее сходство в связывании Me-Man (рис. S4 в Приложении) в четырёх субъединицах, однако в А и В только по одной водородной связи, опосредованной водой, в субъединице С нет связи O3 с Arg228, но есть O2–Leu99. Кроме того, расстояния в субъединице D в основном больше, чем в других – сродство ниже.

Отличающиеся механизмы комплексообразования свидетельствуют о нескольких режимах связывания, реализующихся в субъединицах А–D ConA. Возможность вариативного связывания лигандов CRD4 CD206 не описана в литературе, но, вероятно, проявляется в аспектах задействования катиона кальция и конкретных а.о. с лигандом. Предполагается, что такая вариативность особенно заметна при участии как минимум нескольких углеводовсвязывающих доменов (CRD4–8). В литературе описано подобное явление на примере маннозо-специфичного лектина ERGIC-53 [66], а также ConA [67]. Хотя все 4 субъединицы в ConA идентичны по составляющим аминокислотам, существуют небольшие отличия в их структурной организации (относительное расположение цепей) в результате формирования четвертичной структуры белка, что обуславливает обсуждаемые выше явления. Поэтому наиболее корректные параметры можно получить, усредняя значения энергий связывания для всех четырёх субъединиц, поскольку на практике реализуются все варианты связывания.

Сравнение структур домена CD206 и ConA (рис. S8 в Приложении). Ключевые сходства структурной организации ConA и CRD4 CD206 следующие: примерно одинаковое пространственное расположение аминокислот, близкий аминокислотный состав сайтов связывания углеводов (2 остатка Tyr, Asn, Asp, Ala, Leu, Pro), что обеспечивает реализацию связывания за счёт высокоэнергетических электростатических взаимодействий заряженных остатков аминокислот и дополнительной стабилизации гидрофобными и СН-π стекинг-взаимодействиями, обязательно присутствие Ca²⁺ (зелёный шар) для формирования сайта связывания.

Роль катионов Ca²⁺ и Mn²⁺ в связывающем центре рецепторов ConA и CD206 (рис. 7 в Приложении). Как обсуждалось выше, наличие катиона металла в сайте связывания необходимо для поддержания пространственной ориентации аминокислотных остатков рецептора.

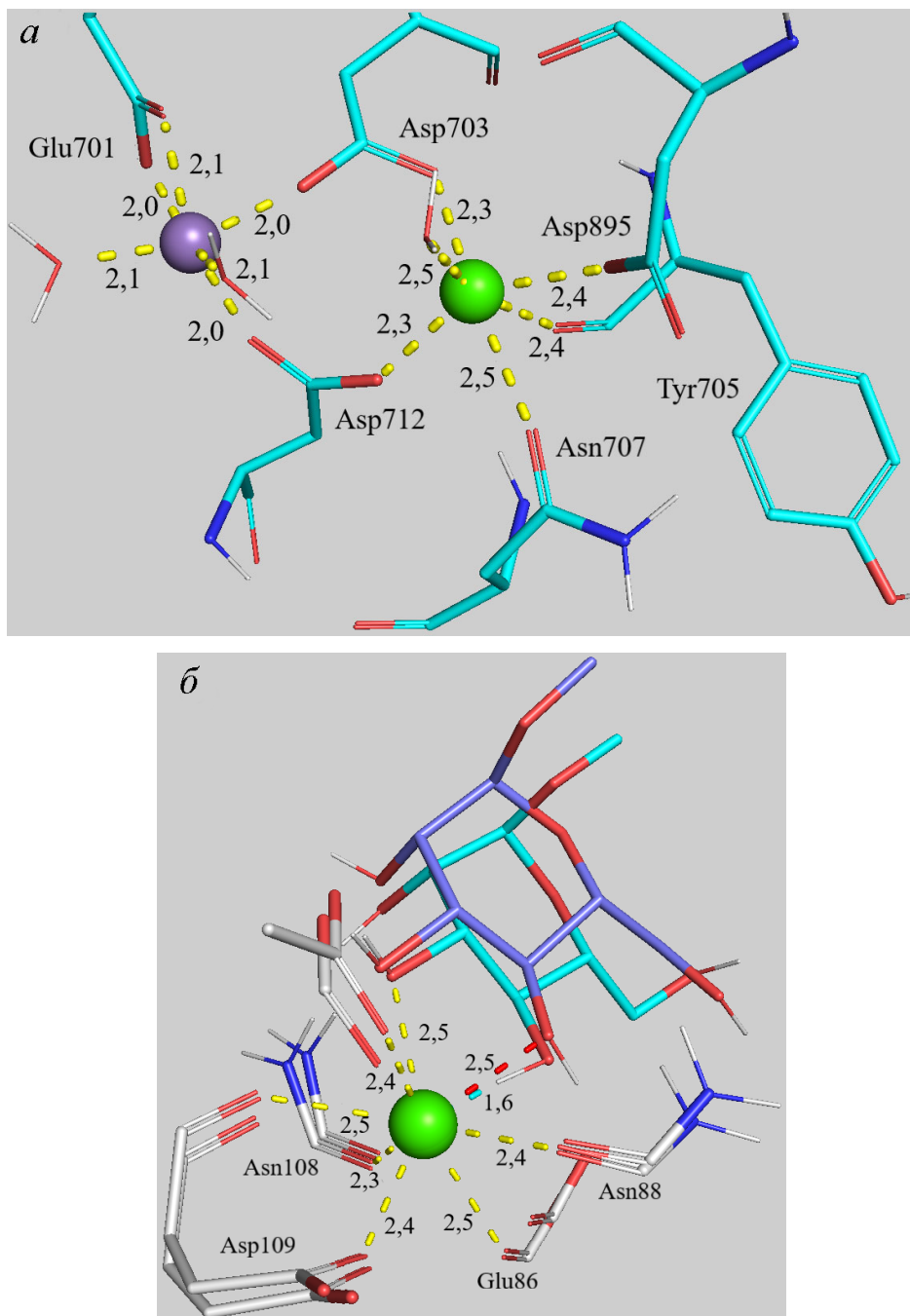


Рис. 7. *a* — Координационное окружение Mn^{2+} , Ca^{2+} в сайте ConA (субъединица C) при связывании триманнозида **9** (PDB Acc. No. 1ONA) по данным молекулярной динамики 10 нс. *б* — Координационное окружение Ca^{2+} в сайте домена CD206 при связывании метилманнозида **2** (PDB Acc. No. 7JUB). Сравнение исходных координат PDB (голубой) и структуры после молекулярной динамики 100 нс (фиолетовый)

В ConA роль опоры играет Ca^{2+} , который фиксирует остатки Asp703, Asp712 и Asp895, Asn707, Tyr705 и водой (рис. 7, *a*). Координационный полиэдр для катиона кальция — искажённый октаэдр (координационное число (КЧ) равно 6, ионный радиус 100 пм). Более того, дополнительная стабилизация положений аминокислот-

ных остатков и кальция достигается за счёт расположенного на расстоянии 4,2–4,4 Å от Ca^{2+} катиона Mn^{2+} , координирующего остатки Glu701, Asp703 и Asp712, а также две молекулы воды (рис. 7, *a*). Благодаря этому формируется сайт связывания высокоаффинный к консервативному ядру триманнозида [68–70].

Специфичность маннозного рецептора CD206 к Man-, Fuc- и GlcNAc-остаткам в гликанах обеспечивается механизмом, аналогичным рассмотренному выше для ConA. Ca^{2+} координирует Asn88, Asn108, Asp109 и Glu86, но в отличие от сайта в ConA с большими координационными числами, равным 8, и ионным радиусом 112 пм. Кроме того, катион Ca^{2+} в CRD4 играет важную роль в непосредственном связывании лиганда. На рис. 7, б показано взаимодействие метилманнозида **2** с Ca^{2+} . При моделировании связывания на основе исходных координат из PDB продемонстрировано изменение координационного окружения кальция атомами O2,3 MeMan до среднего расстояния 2,5 Å с образованием устойчивой квадратной антипризмы (рис. 7, б).

Литературные данные о сходстве CRD4 с ConA. Согласно литературным данным, CRD4 демонстрирует высокое сходство с маннан-связывающим лектином А, который, в свою очередь, похож на ConA в закономерностях связывания углеводов [71]. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* при использовании маннозосодержащих лигандов, высокоспецифичных к ConA, для модификации средств доставки лекарственных препаратов к макрофагам путём нацеливания на МР наблюдаются положительные эффекты [20]: поглощение маннозилированных частиц клетками [72, 73], увеличение времени циркуляции лекарства в кровотоке и повышение концентрации в макрофагах [3], биораспределение маннозилированных липосом, преимущественно в лёгкие [74]. Все эти данные обуславливают релевантность применения ConA в качестве модели МР.

Настоящая ситуация и перспективы методов молекулярной динамики и нейросетевого анализа. Значения энергий комплексообразования и соответственно констант диссоциации комплексов рецептор–лиганд были рассчитаны для 15 лигандов с двумя рецепторами ConA и CRD4 CD206. Из них ранее в литературе не представлены 1 для конканавалина А и 9 – для маннозного рецептора. Достоверность полученных данных показана относительно экспериментальных данных из литературы. Коэффициенты корреляции свободных энергий для ConA и CRD4 CD206 по методу МД (анализ mmpbsa.py) соответственно равны 0,68 и 0,52, что можно считать хорошим результатом, учитывая количество изученных лигандов и новизну исследований МР.

Нужно отметить, что существующие алгоритмы далеко не совершенны, и компьютерное моделирование редко коррелирует с абсолютными значениями, полученными эксперимен-

тальными методами. Однако с развитием технологий эта проблема постепенно решается. Нейросети активно совершенствуются, что следует из результатов «соревнований CASF-2013» [75, 76]. Нами выбрана НС Pafnysu вследствие её лидирующей позиции среди алгоритмов по предсказанию аффинности лиганд–рецептор. Однако исходный алгоритм, обученный разработчиками на основе PDBbind2016, показал низкую точность применительно к рассматриваемым системам. Коэффициенты корреляции свободных энергий для ConA и CRD4 CD206 (нейросетевой анализ № 1) оказались не превосходящими 0,50, что, вероятно, связано с неподходящими весами в слоях НС для рассматриваемых систем. Поэтому авторы настоящей работы подготовили обучающий набор на основе PDBbind2020, увеличив количество циклов обучения до 25 и выбрав подходящие коэффициенты (раздел Методы, рис. S1 и табл. S1 в Приложении). Нейросеть с новыми параметрами показала более высокую точность предсказаний, превосходящую метод МД: коэффициенты корреляции энергий для ConA и CRD4 CD206 (нейросетевой анализ № 2) соответственно равны 0,82 и 0,8. Достигнутая точность в среднем совпадает с таковой для алгоритмов, описанных в литературе [77], хотя может быть увеличена.

Перспективы методов *in silico* широки. Усовершенствование алгоритмов НС и подготовка обучающих наборов с большим количеством релевантных данных о комплексах позволят увеличить точность предсказаний, что было показано выше. Применение молекулярной динамики с уточнёнными силовыми полями (amber) и увеличенным временем моделирования позволяет точнее определять термодинамические величины и структуры молекул, в том числе комплексов белок–лиганд, в условиях, приближенных к реальным (раствор, концентрация соли, температура).

Таким образом, с помощью молекулярной динамики и искусственных нейросетей определены параметры лектин-лигандных взаимодействий с учётом модели оптимизации. Компьютерные методы позволили получить пространственные структуры комплексов ConA и CRD4 CD206 с углеводными лигандами, большая часть которых ранее не описана. Кроме того, изучено комплексообразование маннозного рецептора, что крайне затруднительно *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нацеливание средств доставки терапевтических агентов на маннозные рецепторы макро-

фагов представляется перспективным методом повышения эффективности лечения целого ряда опасных заболеваний, включая аутоиммунные, онкологические и инфекционные. Поэтому требуется создание высокоселективных маннозилированных носителей лекарственных средств, оптимальная конфигурация которых может быть найдена с помощью компьютерного моделирования. В данной работе с помощью молекулярной динамики и искусственной нейросети Pafnysu проведено моделирование комплексообразования 15 углеводных лигандов, которые могут выступать в качестве адресной метки на молекуле для таргетирования макрофагов, с модельным тетрамером ConA и четвёртым доменом (вносящим наибольший вклад в углеводсвязывающую способность) маннозного рецептора CD206. Искусственные нейросети активно разрабатываются и развиваются, однако их применение в биологических системах пока не так широко. В данной работе продемонстрировано, что обученная на основе PDBbind2020 нейросеть, наряду с молекулярной динамикой, является эффективным инструментом для изучения механизмов взаимодействия лиганд–рецептор. В ходе компьютерного моделирования нами рассчитаны константы диссоциации комплексов лиганд–ConA, коррелирующие с литературными данными. С использованием отработанной модели впервые изучалось комплексообразование домена маннозного рецептора CD206 с лигандами, более того, нами рассчитаны 9 констант диссоциации комплексов, ранее не представленных в статьях. Показано, что ConA демонстрирует сходство с четвёртым доменом CD206 в закономерностях связывания углеводов, однако выявлены и отличия. Лектин ConA высокоспецифичен к ядру триманнозида

и его производным, а МР наиболее прочно связывает разветвлённые олигосахариды, состоящие из Ман-остатков, подобные поверхностным углеводам клеточной стенки микроорганизмов. Открывается возможность моделировать комплексообразование маннозного рецептора CD206 с олиго- и полимерными молекулами, модифицированными наиболее аффинными лигандами среди рассмотренных в данной работе, например, высокоманнозилированными циклодекстринами и хитозанами – перспективными носителями лекарств с функцией адресного нацеливания на маннозные рецепторы макрофагов.

Благодарности. Авторы выражают искренние благодарности Дроботу Виктору Валерьевичу (МГУ имени М.В. Ломоносова, НИИ им. Белозерского, химический факультет, НИВЦ) за консультации и советы по проведению молекулярной динамики; к.х.н. Виноградову Алексею Александровичу за концептуальные, методические и стилистические предложения по улучшению представленного материала; Злотникову Дмитрию Николаевичу за реализацию технической платформы для проведения молекулярных симуляций и нейросетевого анализа с использованием технологии докеризации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>) том 87, вып. 1, 2022.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stepniewska-Dziubinska, M. M., Zielenkiewicz, P., and Siedlecki, P. (2018) Development and evaluation of a deep learning model for protein–ligand binding affinity prediction, *Bioinformatics*, **34**, 3666–3674, doi: 10.1093/bioinformatics/bty374.
2. Banerjee, S., and Roy, S. (2019) Polysaccharide installed lipid nanoparticles in targeted antituberculosis drug delivery applications, in *Polysaccharide Carriers for Drug Delivery*, pp. 397–411, doi: 10.1016/b978-0-08-102553-6.00014-3.
3. Filatova, L. Y., Klyachko, N. L., and Kudryashova, E. V. (2018) Targeted delivery of anti-tuberculosis drugs to macrophages: targeting mannose receptors, *Russ. Chem. Rev.*, **87**, 374–391, doi: 10.1070/rcr4740.
4. Wong, M. E., Jaworowski, A., and Hearps, A. C. (2019) The HIV reservoir in monocytes and macrophages, *Front. Immunol.*, **10**, 1435–1450, doi: 10.3389/fimmu.2019.01435.
5. Nikitina, E., Larionova, I., Choinzonov, E., and Kzhyshkowska, J. (2018) Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2821–2845, doi: 10.3390/ijms19092821.
6. Tormoen, G. W., Crittenden, M. R., and Gough, M. J. (2018) Role of the immunosuppressive microenvironment in immunotherapy, *Adv. Rad. Oncol.*, **3**, 520–526, doi: 10.1016/j.adro.2018.08.018.
7. Shan, H., Dou, W., Zhang, Y., and Qi, M. (2020) Targeted ferritin nanoparticle encapsulating CpG oligodeoxynucleotides induces tumor-associated macrophage M2 phenotype polarization into M1 phenotype and inhibits tumor growth, *Nanoscale*, **12**, 22268–22280, doi: 10.1039/d0nr04520a.
8. Le Menn, G., and Neels, J. (2018) Regulation of immune cell function by PPARs and the connection with metabolic and neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1575, doi: 10.3390/ijms19061575.

9. Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P., and Syed, M. A. (2018) Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases, *Immunobiology*, **223**, 383-396, doi: 10.1016/j.imbio.2017.11.001.
10. Lyadova, I. V., and Pantelev, A. V. (2015) Th1 and Th17 cells in tuberculosis: Protection, pathology, and biomarkers, *Med. Inflamm.*, **2015**, 854507, doi: 10.1155/2015/854507.
11. Zhang, H.-L., Zheng, X.-Y., and Zhu, J. (2013) Th1/Th2/Th17/Treg cytokines in Guillain-Barré syndrome and experimental autoimmune neuritis, *Cyt. Grow. Fact. Rev.*, **24**, 443-453, doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.05.005.
12. Stahl, P. D. (1990) The macrophage mannose receptor: Current status, *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **2**, 317-318, doi: 10.1165/ajrcmb/2.4.317.
13. Feinberg, H., Jegouzo, S. A. F., Lasanajak, Y., Smith, D. F., Drickamer, K., et al. (2021) Structural analysis of carbohydrate binding by the macrophage mannose receptor CD206, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100368-100385, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100368.
14. Feinberg, H., Park-Snyder, S., Kolatkar, A. R., Heise, C. T., Taylor, M. E., et al. (2000) Structure of a C-type carbohydrate recognition domain from the macrophage mannose receptor, *J. Biol. Chem.*, **275**, 21539-21548, doi: 10.1074/jbc.m002366200.
15. Taylor, M. E., and Drickamer, K. (1993) Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor, *J. Biol. Chem.*, **268**, 399-404, doi: 10.1016/S0021-9258(18)54164-8.
16. Naismith, J. H., Emmerich, C., Habash, J., Harrop, S. J., Helliwell, J. R., et al. (1994) Refined structure of concanavalin A complexed with methyl α -D-mannopyranoside at 2.0 Å resolution and comparison with the saccharide-free structure, *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.*, **50**, 847-858, doi: 10.1107/s0907444994005287.
17. Derewenda, Z., Yariv, J., Helliwell, J. R., Kalb, A. J., Dodson, E. J., et al. (1989) The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A, *EMBO J.*, **8**, 2189-2193, doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08341.x.
18. Brewer, C. F., Brown, R. D., and Koenig, S. H. (1983) Metal ion binding and conformational transitions in concanavalin-A: A structure-function study, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1**, 961-997, doi: 10.1080/07391102.1983.10507497.
19. Kaushik, S., Mohanty, D., and Surolia, A. (2009) The role of metal ions in substrate recognition and stability of concanavalin A: A molecular dynamics study, *Biophys. J.*, **96**, 21-34, doi: 10.1529/biophysj.108.134601.
20. Zlotnikov, I. D., and Kudryashova, E. V. (2022) Mannose receptors of alveolar macrophages as a target for delivery of medicines to the lungs, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **48**, doi: 10.1134/S1068162022010150.
21. Mandal, D. K., Kishore, N., and Brewer, C. F. (1994) Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions. Titration microcalorimetry measurements of the binding of N-linked carbohydrates and ovalbumin to concanavalin A, *Biochemistry*, **33**, 1149-1156, doi: 10.1021/bi00171a014.
22. Dam, T. K., Roy, R., Das, S. K., Oscarson, S., and Brewer, C. F. (2000) Binding of multivalent carbohydrates to concanavalin A and *Dioscorea grandiflora* lectin, *J. Biol. Chem.*, **275**, 14223-14230, doi: 10.1074/jbc.275.19.14223.
23. Landschoot, A., Loontjens, F. G., and Bruyne, C. K. (1980) Binding of manno-oligosaccharides to concanavalin A. Substitution titration with a fluorescent-indicator ligand, *Eur. J. Biochem.*, **103**, 307-312, doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04316.x.
24. Злотников И. Д., Ваничкин Д. А., Кудряшова Е. В. (2021) Методы определения параметров рецептор-лигандных взаимодействий на модели конканавалина А и маннозилированных хитозанов – перспективных носителей для доставки лекарственных средств к альвеолярным макрофагам, *Биотехнология*, **37**, 28-40, doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-5-28-40.
25. Le-Deygen, I. M., Mamaeva, P. V., Skuredina, A. A., and Kudryashova, E. V. (2020) A spectral approach to study interaction between chitosan modified with mannose and concanavalin A for the creation of address delivery systems of antituberculosis drugs, *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **75**, 213-217, doi: 10.3103/S0027131420040045.
26. Goldstein, I. J., and Poretz, R. D., (1986) *The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, Academic Press.
27. Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages, *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 23-35, doi: 10.1038/nri978.
28. Sharma, A., Porterfield, J. E., Smith, E., Sharma, R., Kannan, S., et al. (2018) Effect of mannose targeting of hydroxyl PAMAM dendrimers on cellular and organ biodistribution in a neonatal brain injury model, *J. Control. Rel.*, **283**, 175-189, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.06.003.
29. Tran, D. P., and Kitao, A. (2019) Dissociation process of MDM2/p53 complex investigated by parallel cascade selection molecular dynamics and Markov state model, *J. Phys. Chem. B.*, **123**, 2469-2478, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b10309.
30. Hollingsworth, S. A., Nguyen, B. D., Chreifi, G., Arce, A. P., and Poulos, T. L. (2017) Insights into the dynamics and dissociation mechanism of a protein redox complex using molecular dynamics, *J. Chem. Inf. Model.*, **57**, 2344-2350, doi: 10.1021/acs.jcim.7b00421.
31. Tran, D. P., Takemura, K., Kuwata, K., and Kitao, A. (2017) Protein-Ligand dissociation simulated by parallel cascade selection molecular dynamics, *J. Chem. Theory Comput.*, **14**, 404-417, doi: 10.1021/acs.jctc.7b00504.
32. Mollica, L., Decherchi, S., Zia, S. R., Gaspari, R., Cavalli, A., et al. (2015) Kinetics of protein-ligand unbinding via smoothed potential molecular dynamics simulations, *Sci. Rep.*, **5**, doi: 10.1038/srep11539.
33. Fu, Y., Zhao, J., and Chen, Z. (2018) Insights into the molecular mechanisms of protein-ligand interactions by molecular docking and molecular dynamics simulation: a case of oligopeptide binding protein, *Comput. Math. Meth. Med.*, **2018**, 1-12, doi: 10.1155/2018/3502514.
34. Bradbrook, G. M., Gleichmann, T., Harrop, S. J., Habash, J., Raftery, J., et al. (1998) X-Ray and molecular dynamics studies of concanavalin-A glucoside and mannoside complexes relating structure to thermodynamics of binding, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **94**, 1603-1611, doi: 10.1039/a800429c.
35. Bryce, R. A., Hillier, I. H., and Naismith, J. H. (2001) Carbohydrate-protein recognition: Molecular dynamics simulations and free energy analysis of oligosaccharide binding to concanavalin A, *Biophys. J.*, **81**, 1373-1388, doi: 10.1016/s0006-3495(01)75793-1.
36. Arcon, J. P., Defelipe, L. A., Modenutti, C. P., Lopez, E. D., Alvarez-Garcia, D., et al. (2017) Molecular dynamics in mixed solvents reveals protein-ligand interactions, improves docking, and allows accurate binding free energy predictions, *J. Chem. Inf. Model.*, **57**, 846-863, doi: 10.1021/acs.jcim.6b00678.
37. Zacharias, M. (2004) Rapid protein-ligand docking using soft modes from molecular dynamics simulations to account for protein deformability: binding of FK506 to FKBP, *Prot. Str. Fun. Bioinf.*, **54**, 759-767, doi: 10.1002/prot.10637.
38. Mollica, L., Theret, I., Antoine, M., Perron-Sierra, F., Charton, Y., et al. (2016) Molecular dynamics simulations and kinetic measurements to estimate and predict protein-ligand residence times, *J. Med. Chem.*, **59**, 7167-7176, doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00632.

39. Wang, S., Liu, D., Ding, M., Du, Z., Zhong, Y., et al. (2021) SE-OnionNet: a convolution neural network for protein–ligand binding affinity prediction, *Front. Gen.*, **11**, 607824, doi: 10.3389/fgene.2020.607824.
40. Durrant, J. D., and McCammon, J. A. (2011) NNScore 2.0: A neural-network receptor–ligand scoring function, *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 2897–2903, doi: 10.1021/ci2003889.
41. Lahey, S.-L. J., and Rowley, C. N. (2020) Simulating protein–ligand binding with neural network potentials, *Chem. Sci.*, **11**, 2362–2368, doi: 10.1039/c9sc06017k.
42. Zhou, Y., Wang, F., Tang, J., Nussinov, R., and Cheng, F. (2020) Artificial intelligence in COVID-19 drug repurposing, *Lanc. Dig. Heal.*, **2**, 667–676, doi: 10.1016/s2589-7500(20)30192-8.
43. Pham, T.-H., Qiu, Y., Zeng, J., Xie, L., and Zhang, P. (2021) A deep learning framework for high-throughput mechanism-driven phenotype compound screening and its application to COVID-19 drug repurposing, *Nat. Mach. Intel.*, **3**, 247–257, doi: 10.1038/s42256-020-00285-9.
44. Книга А. Е., Поляков И. В., Немухин А. В. (2021) *In silico* определение специфичности неоантиген-реактивных Т-лимфоцитов, *Биомедицинская химия*, **67**, 251–258, doi: 10.18097/pbmc20216703251.
45. Manasaryan, G., Suplatov, D., Pushkarev, S., Drobot, V., Kuimov, A., et al. (2021) Bioinformatic analysis of the nicotinamide binding site in Poly(ADP-ribose) polymerase family proteins, *Cancers*, **13**, 1201, doi: 10.3390/cancers13061201.
46. Timonina, D., Sharapova, Y., Švedas, V., and Suplatov, D. (2021) Bioinformatic analysis of subfamily-specific regions in 3D-structures of homologs to study functional diversity and conformational plasticity in protein superfamilies, *Comput. Struct. Biotech. J.*, **19**, 1302–1311, doi: 10.1016/j.csbj.2021.02.005.
47. Case, D. A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., et al. (2021) *Amber 2021: Reference Manual*, University of California, San Francisco.
48. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, **79**, 926–935, doi: 10.1063/1.445869.
49. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes, *J. Comput. Phys.*, **23**, 327–334, doi: 10.1016/0021-9991(77)90098-5.
50. Miller, B. R., McGee, T. D., Swails, J. M., Homeyer, N., Gohlke, H., et al. (2012) MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations, *J. Chem. Theory Comput.*, **8**, 3314–3321, doi: 10.1021/ct300418h.
51. Roe, D. R., and Cheatham, T. E. (2013) PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data, *J. Chem. Theory Comput.*, **9**, 3084–3095, doi: 10.1021/ct400341p.
52. Hitchen, P. G., Mullin, N. P., and Taylor, M. E. (1998) Orientation of sugars bound to the principal C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor, *Biochem. J.*, **333**, 601–608, doi: 10.1042/bj3330601.
53. Mullin, N. P., Hitchen, P. G., and Taylor, M. E. (1997) Mechanism of Ca²⁺ and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor, *J. Biol. Chem.*, **272**, 5668–5681, doi: 10.1074/jbc.272.9.5668.
54. Ascianto, E. K., Kopanchuk, S., Lepland, A., Simón-Gracia, L., Aleman, C., et al. (2019) A phage display-derived peptide binds to human CD206 and modeling reveals a new binding site in the receptor, *J. Phys. Chem. B.*, **123**, 1973–1982, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b11876.
55. Taylor, M. E., Bezouska, K., and Drickamer, K. (1992) Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor, *J. Biol. Chem.*, **267**, 1719–1726, doi: 10.1016/S0021-9258(18)46005-X.
56. Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., et al. (2002) The protein data bank, *Acta Cryst. Sect. D Biol. Cryst.*, **58**, 899–907, doi: 10.1107/s0907444902003451.
57. Böhm, H. J., and Schneider, G. (2003) Protein–Ligand Interactions, in *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, pp. 3–20, doi: 10.1002/3527601813.
58. Huang, K., Luo, S., Cong, Y., Zhong, S., Zhang, J. Z. H., et al. (2020) Accurate free energy estimator: Based on MM/PBSA combined with interaction entropy for protein–ligand binding affinity, *Nanoscale*, **12**, 10737–10750, doi: 10.1039/c9nr10638c.
59. Spiwok, V. (2017) CH/π interactions in carbohydrate recognition, *Molecules*, **22**, 1038, doi: 10.3390/molecules22071038.
60. Spiwok, V., Lipovova, P., Skalova, T., Buchtelova, E., Hasek, J., et al. (2004) Role of CH/π interactions in substrate binding by *Escherichia coli* β-galactosidase, *Carb. Res.*, **339**, 2275–2280, doi: 10.1016/j.carres.2004.06.016.
61. Lazaridis, T. (1998) Inhomogeneous fluid approach to solvation thermodynamics. 1. Theory, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3531–3541, doi: 10.1021/jp9723574.
62. Nguyen, C. N., Young, T. K., and Gilson, M. K. (2012) Grid inhomogeneous solvation theory: hydration structure and thermodynamics of the miniature receptor cucurbit[7]uril, *J. Chem. Phys.*, **137**, 044101, doi: 10.1063/1.4733951.
63. Hüfner-Wulsdorf, T., and Klebe, G. (2020) Protein–ligand complex solvation thermodynamics: Development, parameterization, and testing of GIST-based solvent functionals, *J. Chem. Inf. Model.*, **60**, 1409–1423, doi: 10.1021/acs.jcim.9b01109.
64. Ramsey, S., Nguyen, C., Salomon-Ferrer, R., Walker, R. C., Gilson, M. K., et al. (2016) Solvation thermodynamic mapping of molecular surfaces in AmberTools: GIST, *J. Comp. Chem.*, **37**, 2029–2037, doi: 10.1002/jcc.24417.
65. Dimick, S. M., Powell, S. C., McMahon, S. A., Moothoo, D. N., Naismith, J. H., et al. (1999) On the meaning of affinity: Cluster glycoside effects and concanavalin A, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10286–10296, doi: 10.1021/ja991729e.
66. Satoh, T., Suzuki, K., Yamaguchi, T., and Kato, K. (2014) Structural basis for disparate sugar-binding specificities in the homologous cargo receptors ERGIC-53 and VIP36, *PLoS One*, **9**, 87963, doi: 10.1371/journal.pone.0087963.
67. Moothoo, D. N., Canan, B., Field, R. A., and Naismith, J. H. (1999) Man α1-2 Man α-OMe-concanavalin A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition, *Glycobiology*, **9**, 539–545, doi: 10.1093/glycob/9.6.539.
68. Naismith, J. H., and Field, R. A. (1996) Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A, *J. Biol. Chem.*, **271**, 972–976, doi: 10.1074/jbc.271.2.972.
69. Gupta, D., Dam, T. K., Oscarson, S., and Brewer, C. F. (1997) Thermodynamics of lectin–carbohydrate interactions, *J. Biol. Chem.*, **272**, 6388–6392, doi: 10.1074/jbc.272.10.6388.
70. Mandal, D. K., Bhattacharyya, L., Koenig, S. H., Brown, R. D., Oscarson, S., et al. (1994) Studies of the binding specificity of concanavalin A. Nature of the extended binding site for asparagine-linked carbohydrates, *Biochemistry*, **33**, 1157–1162, doi: 10.1021/bi00171a015.
71. Weis, W. I., and Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin–carbohydrate recognition, *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 441–473, doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002301.

72. Ghotbi, Z., Haddadi, A., Hamdy, S., Hung, R. W., Samuel, J., et al. (2010) Active targeting of dendritic cells with mannan-decorated PLGA nanoparticles, *J. Drug Target*, **19**, 281-292, doi: 10.3109/1061186X.2010.499463.
73. Chen, P., Zhang, X., Jia, L., Prud'homme, R. K., Szekely, Z., et al. (2014) Optimal structural design of mannosylated nanocarriers for macrophage targeting, *J. Control. Rel.*, **194**, 341-349, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.09.006.
74. Nimje, N., Agarwal, A., Saraogi, G. K., Lariya, N., Rai, G., et al. (2009) Mannosylated nanoparticulate carriers of rifabutin for alveolar targeting, *J. Drug Target*, **17**, 777-787, doi: 10.3109/10611860903115308.
75. Li, Y., Liu, Z., Li, J., and Wang, R. (2014) Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 1. Compilation of the test set, *J. Chem. Inf. Model.*, **54**, 1700-1716, doi: 10.1021/ci500080q.
76. Li, Y., Han, L., Liu, Z., and Wang, R. (2014) Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 2. Evaluation methods and general results, *J. Chem. Inf. Model.*, **54**, 1717-1736, doi: 10.1021/ci500081m.
77. Nguyen, D. D., Xiao, T., Wang, M., and Wei, G.-W. (2017) Rigidity strengthening: A mechanism for protein-ligand binding, *J. Chem. Inf. Model.*, **57**, 1715-1721, doi: 10.1021/acs.jcim.7b00226.

COMPUTER SIMULATION OF RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS MANNOSE RECEPTOR CD206 IN COMPARISON WITH THE MODEL LECTIN CONCAVALIN A

I. D. Zlotnikov and E. V. Kudryashova*

*Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: helenakoudriachova@yandex.ru*

With using the methods of molecular dynamics and neural network analysis, computer modeling of the complexation of mono- and oligosaccharide ligands with the main (fourth) carbohydrate-binding domain of the mannose receptor CD206 (CRD4), as well as with the model receptor concanavalin A (ConA), was carried out for the first time. It is shown that Con is a relevant CD206 (CRD4) model due to the similarity of the structural organization of the binding sites and the high correlation of the values of the free energies of complexation $r > 0.9$ according to literature data and computer modeling. The role of the main factors affecting the affinity of ligand-receptor interactions is discussed: the number and nature of carbohydrate residues, the presence of the Me-group in the O1 position, the type of glycoside bond in the dimannose. It is shown that the complexation of ConA and CD206 with ligands is energetically caused by the electrostatic interactions of charged residues (Asn, Asp, Arg) with oxygen and hydrogen atoms in carbohydrates; the hydrophobic and van der Waals components contribute less. A possible variant of additional stabilization of complexes due to CH- π stacking interactions of Tyr with the Man plane is discussed. The role of calcium and manganese ions in ligand binding processes has been studied. The free energies of complexation calculated in the course of molecular dynamics correlate with experimental data (published for the model ConA): correlation coefficient $r = 0.68$. The Pafnucy neural network was trained based on a set of PDBbind2020 ligand-receptor complexes, which significantly increased the accuracy of energy predictions to $r = 0.8$ and 0.82 , respectively, for CD206 and ConA receptors. A model of normalization of the complexation energy values for calculating the relevant values of ΔG_{bind} , K_d is proposed. Based on the developed technique, the values of the dissociation constants of a series of CD206 complexes with 9 carbohydrate ligands of different structures not previously characterized were determined. The obtained data open up prospects for using of computer modeling for the development of optimal drug carriers with the function of active targeting of macrophages, and also determine the limits of the applicability of using ConA as a relevant model for studying the parameters of CD206 binding to various carbohydrate ligands.

Keywords: molecular dynamics, artificial neural network, CD206, concanavalin A, macrophages