

ОБЗОРЫ

УДК 577.152.341-51
©Кугаевская

АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ. ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА И СВОЙСТВА

Е.В. Кугаевская

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121 Москва,
Погодинская ул. 10, тел.: (495) 246-5072; факс: (495) 245-0857,
эл. почта: Elena.Kugaevskaya@ibmc.msk.ru.

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) – это Zn-зависимая протеиназа, участвующая в метаболизме важнейших вазоактивных пептидов ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем, контролирующих кровообращение в организме. Недавно было показано, что АПФ является также физиологическим регулятором гематопоэтического пептида – горалатида (N-AcSer-Asp-Lys-Pro), отрицательного регулятора гемопоэза. Молекула АПФ представляет собой одну полипептидную цепь с молекулярной массой 170 кДа и содержит два высокомолекулярных домена (N- и C- домены). Хотя оба домена АПФ содержат активный центр и ион цинка, они каталитически неравноценны. Их отличает разная скорость гидролиза пептидов, неодинаковая чувствительность к ингибиторам и профиль активации ионами хлора. Используемые в клинике ингибиторы АПФ тормозят активность обоих доменов, но отличаются по скорости диссоциации фермент-ингибиторного комплекса. Преимущественное взаимодействие ингибиторов АПФ с активным центром одного из доменов может влиять на их биологический эффект при использовании в медицинской практике. Предполагается, что каждый из доменов имеет физиологическое значение и их различия в какой-то мере обусловлены конформационными особенностями. В 2003 году были опубликованы кристаллографические данные о структуре тестискулярного АПФ человека (идентичного C-домену соматической формы АПФ), и предсказана пространственная структура N-домена. Детали структуры активного центра тАПФ, полученные из данных кристаллографии, могут быть использованы для поиска новых селективных ингибиторов АПФ.

Ключевые слова: ангиотензин-превращающий фермент, домены, структура, ингибиторы.

ВВЕДЕНИЕ. Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ; пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1) – ключевой фермент ренин-ангиотензиновой и кинин-калликреиновой систем [1-3], играет существенную роль в регуляции артериального давления (АД). АПФ освобождает C-концевые дипептиды, расщепляя пептидную связь, находящуюся во втором положении с карбоксильного конца олигопептидов. В организме его основными субстратами являются ангиотензин I (АI) и брадикинин (Бк). АПФ катализирует отщепление одного дипептида от АI, что приводит к образованию вазопрессорного октапептида ангиотензина II (АII), повышающего АД. АПФ отщепляет последовательно два дипептида от Бк, снижающего АД, тем самым инактивируя его.

В связи с тем, что АПФ вовлечен в метаболизм вазоактивных пептидов, он становится важной молекулярной мишенью в лечении гипертензии и сердечно-сосудистой недостаточности. Все более широкое распространение принимает использование ингибиторов АПФ как в качестве антигипертензивных средств, так и для терапии сердечной недостаточности. Ингибиторы АПФ обладают также и

антиатерогенной активностью, приводят к регрессии атеросклеротического процесса [4, 5].

Помимо регуляции АД АПФ вовлечен в ряд других физиологических процессов, таких как метаболизм нейропептидов, репродукцию, иммунные реакции организма. Обнаружено, что АПФ является физиологическим регулятором локальной концентрации гематопозитического пептида N-AcSer-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), влияющего на пролиферацию клеток [6, 7].

Находясь на поверхности плазматической мембраны, АПФ часто действует совместно с другими мембраносвязанными протеинами на одни и те же субстраты, являясь регулятором пептид-медирированной активности [8]. При действии на физиологические субстраты АПФ может вызывать как превращение неактивной формы в активную, так и инактивацию биологически активного пептида или трансформацию его активности. Так АПФ превращает des-Asp¹-А I в А III, инактивирует des-Arg⁹-Бк, гематопозитический пептид (AcSDKP), Met⁵- и Leu⁵-энкефалины, хемотактический пептид (fMet-Leu-Phe), нейротензин, вещество Р и люлиберин. Отщепляя дипептид Arg⁶-Phe⁷ от семичленного предшественника Met⁵-энкефалина, он превращает его в энкефалин, что приводит к снижению анальгетического эффекта. Отщепление С-концевого дипептида от атриопептина II, обладающего спазмолитической и натрийуретической активностью, приводит к образованию атриопептина I, что сопровождается потерей его свойства расслаблять гладкую мускулатуру сосудов при сохранении натрийуретического действия [9].

1. Распространение ангиотензин-превращающего фермента в организме.

АПФ – это эктофермент, существующий в организме в основном в виде мембраносвязанной формы. Он является интегральным белком (I типа) плазматической мембраны. Почти вся молекула АПФ, представляющая собой одну полипептидную цепь, расположена на внешней стороне плазматической мембраны, за исключением гидрофобного трансмембранного участка (17 аминокислотных остатков) и внутриклеточного гидрофильного С-конца (30 аминокислотных остатков). В организме человека и млекопитающих фермент присутствует практически во всех органах и тканях. АПФ обнаружен на поверхности эндотелиальных клеток всех сосудов, на эпителиальных клетках, имеющих ворсинчатую структуру и располагающихся в местах, где происходит интенсивное всасывание или выведение жидкости и солей, в репродуктивных органах, в нервных клетках, а также на мононуклеарных клетках [10-12].

Кроме мембраносвязанной, в организме присутствует и растворимая форма АПФ, отличающаяся отсутствием трансмембранного и внутриклеточного участков [13,14]. Она находится в плазме, лимфе, слезной и других биологических жидкостях (спинномозговая, внутриглазная, амниотическая и др.) [11,15,16]. Растворимая форма АПФ освобождается в результате отщепления С-концевого якорного фрагмента [14,17,18]. Эта реакция ограниченного протеолиза осуществляется мембраносвязанной специфичной металлопротеиназой (секретазой) [19,20]. В норме за 1 час секретазой освобождается около 2% от всего фермента, находящегося на мембране.

2. Свойства ангиотензин-превращающего фермента.

АПФ – гликопротеин, состоящий из одной полипептидной цепи и содержащий по данным разных авторов от 13 до 31% углеводов [21,22]. Он содержит в активном центре атом цинка и активируется ионами хлора [3,9]. В организме АПФ может существовать в нескольких изоформах:

1. Соматическая (тканевая) форма АПФ (сАПФ), содержит два высокомолекулярных домена (N- и С-домены) [23, 24]. Присутствует практически во всех органах и тканях млекопитающих.

2. Репродуктивная (тестикулярная) форма (тАПФ), содержит только С-домен соматической формы фермента [11,13,25]; синтезируется только в семенниках.

3. Форма АПФ, соответствующая N-домену соматического АПФ, найдена в “кишечной жидкости” больных, подвергнутых полостным операциям [26,27], в моче человека [28] и в культуральной жидкости мезангиальных клеток крысы [29].

2.1. *Соматическая форма АПФ.* Впервые полная кДНК сАПФ была получена из эндотелия человека [23] и почек мыши [24]. Определение последовательности нуклеотидов в кДНК позволило установить первичную структуру этих ферментов. Позднее данные о структуре кДНК были получены для кролика [30], быка [31] и крысы [32]. Многочисленные исследования выявили высокий уровень гомологии сАПФ у различных видов млекопитающих (идентичность 80 – 90%) [33].

Молекула АПФ эндотелия человека состоит из 1306 аминокислотных остатков, 14 из которых – остатки цистеина, и имеет 17 углеводсвязывающих участков [23]. Определение аминокислотной последовательности АПФ обнаружило две гидрофобные области: 1) последовательность из 29 аминокислотных остатков на N-конце, которая является удаляемым сигнальным пептидом; 2) 17 аминокислотных остатков, локализованных вблизи С-конца и представляющих собой мембранный якорь. Исследование структуры сАПФ выявило наличие в молекуле двух высокоомологичных доменов, названных N- и С-доменами, каждый из которых содержит Zn-зависимый каталитический центр. Идентичность аминокислотных остатков двух доменов молекулы АПФ человека составляет около 60%, но в области активных центров, включающей 40 аминокислотных остатков, она возрастает до 89%. Гипотеза о возникновении такой структуры молекулы АПФ в результате дупликации гена в процессе эволюции была подтверждена при определении структуры гена, кодирующего этот фермент [34].

Расположение доменов в молекуле сАПФ в настоящее время неизвестно, хотя на основании косвенных данных можно предполагать тесный контакт между ними. Их взаимное влияние изучали, сравнивая свойства полноразмерного АПФ человека, отдельно его N- и С- доменов и мутантного фермента, состоящего из первых 141 аминокислотных остатков N-домена, соединенных с активным С-доменом, содержащим трансмембранную и внутриклеточную области. Этот мутантный фермент отличался от полноразмерного по своим свойствам: активацией хлорид- и сульфат- ионами, скоростью гидролиза субстратов (как синтетических, так и эндогенных пептидов) и термостойкостью. По-видимому, N-терминальная последовательность оказывает влияние на функционирование активного центра С-домена [35].

Домены в составе полноразмерного сАПФ соединены “мостиковым” участком, расположенным в междоменной области между 442 и 559 аминокислотными остатками и чувствительным для воздействия протеаз [26]. Этим может объясняться обнаружение в кишечной жидкости подвергнутых операции больных изоформы АПФ, представляющей собой N-домен соматического фермента. По-видимому, высвобождение кишечного фермента происходит за счет протеолитического расщепления полноразмерного АПФ, либо находящегося в составе мембраны, либо после его перехода в кишечную жидкость. Принципиальная возможность разрыва “мостикового” участка была продемонстрирована несколькими группами исследователей. Оба домена АПФ были получены при ограниченном протеолизе фермента из почек человека эндопротеиназой Asp-N [36]. Каталитически активный N-домен был получен при ограниченном трипсинолизе полноразмерного АПФ из легких быка [37]. Низкомолекулярные фрагменты АПФ, имеющие N-концевую последовательность, получали из легких кролика и человека в результате денатурирующего воздействия на соматический фермент 1 М раствора аммиака с последующим протеолизом плазмином, панкреатином и тканевым калликреином [38, 39].

Предполагается, что N-домен расположен вблизи “стебелькового” участка молекулы (область между концом глобулярной части С-домена и гидрофобным трансмембранным участком). При освобождении фермента с мембраны клетки

происходит отщепления С-концевого якорного фрагмента молекулы за счет расщепления полипептидной связи Arg¹¹³⁷-Leu¹¹³⁸ [14,17,18]. Мутантный фермент, не содержащий N-домена, освобождается в 10 раз быстрее с расщеплением связи Arg¹²²⁷-Val¹²²⁸, которая находится ближе к мембранному якорю, чем в нативном полноразмерном ферменте [14, 40].

2.2. *Репродуктивная (тестикулярная) форма АПФ.* В настоящее время известно, что тАПФ, экспрессирующийся в семенниках, отличается от ферментов из других органов по размеру молекулы, но близок им иммунологически. Эти различия, не являющиеся результатом посттрансляционных модификаций, закодированы в мРНК. В яичках человека была обнаружена мРНК размером 3,0 кб, в отличие от 4,3 кб мРНК АПФ эндотелиальных клеток [41,23]. По мнению Soubrier и соавт. [23], в геноме человека присутствует один ген АПФ, а мРНК яичек отличается от мРНК других органов только размерами, обусловленными разницей в сплайсинге.

Первичная структура тАПФ была рассчитана около 15 лет назад из последовательности кДНК человека [41,25], кролика [42] и мыши [43]. Молекула тАПФ человека, содержащая 701 аминокислотный остаток, соответствует С-домену соматического АПФ и содержит всего один активный центр. Фактически, аминокислотные остатки начиная с 68 тАПФ идентичны аминокислотным остаткам начиная с 642 сАПФ человека. Уникальным для этого фермента является наличие 36 аминокислотных остатков, расположенных на N-конце (включая область О-гликозилирования, богатую остатками Ser/Thr).

В 2003 году были опубликованы данные кристаллизации [44] и рентгено-структурного анализа тАПФ человека и его комплекса со специфическим ингибитором лизиноприлом [45]. По данным рентгено-структурного анализа, молекула тАПФ человека (остатки 37-625) напоминает эллипсоид с центральной выемкой размером около 30 Å, которая делит белок на два субдомена. В структуре тАПФ преобладают спирали, почти одинаково поделенные между субдоменами. Всего в молекуле спиралей 27, из них 20 α-спиралей, и 7 3₁₀-спиралей. β-Структуры, в состав которых входит 4% всех аминокислотных остатков, встречаются как шесть относительно коротких участков, два из которых локализованы около активного центра. Длинная центральная α-спираль α15 расположена по диагонали и пересекает две петли из α-спиралей α6 и α8. Границы центральной выемки образуются α-спиралями α13, α14, α15, α17 и структурой β4. В структуре нативного фермента было идентифицировано 504 молекул воды, некоторые из них находятся в кармане активного центра. Также было показано, что все шесть участков гликозилирования тестикулярного АПФ локализованы на поверхности молекулы.

Исследование кристаллической структуры комплекса тАПФ с лизиноприлом позволило локализовать активный центр молекулы. Оказалось, что он находится в глубокой щели на расстоянии 10 Å от поверхности, над которой расположена “крышка”, образованная α-спиралями α1, α2 и α3 (все три содержат различно заряженные остатки), которая ограничивает доступ больших полипептидов (субстратов и ингибиторов) к щели активного центра. Диаметр канала, ведущего к активному центру, составляет всего 3 Å, что не подходит для большинства пептидных субстратов. Очевидно, для взаимодействия с субстратом молекула тестикулярного АПФ должна подвергаться конформационным изменениям, происходящим, по-видимому, за счет его уникальной способности к активации хлорид-ионами.

3. Структура активного центра.

Цинк – важный каталитический компонент АПФ [46,47]. Каждый из двух высокомолекулярных доменов молекулы сАПФ содержит в своем активном центре Zn-связывающий мотив His-Glu-Хаа-Хаа-His. Такой же мотив был обнаружен и у других Zn-зависимых металлопротеиназ, таких как термолизин, нейтральная эндопептидаза 24.11 [48] и эндотелин-превращающий фермент [49]. На каждую

молекулу сАПФ приходится по два атома цинка [50]. Роль иона цинка в молекуле АПФ, по-видимому, аналогична его роли в активном центре других Zn-зависимых металлопротеиназ. Мутантные формы АПФ, полученные точечной заменой аминокислотных остатков в предполагаемых активных центрах обоих доменов, были полностью неактивны [51], что подтвердило участие этих остатков в формировании активного центра АПФ.

По данным рентгеноструктурного анализа [45], молекула тАПФ содержит один ион цинка, который расположен вблизи α -спирали $\alpha 13$, содержащей цинк-связывающий мотив – HEXXH с двумя остатками гистидина – His³⁸³ и His³⁸⁷ взаимодействующими с ионом цинка. Дополнительная связь обеспечивается остатком Glu⁴¹¹ ($\alpha 14$). Роль иона цинка в катализе АПФ аналогична таковой у термолизина [23,48]. Структурные данные подтверждают, что цинк-связывающие участки в обоих белках являются действительно очень схожими. Как известно, АПФ активируется ионами хлора, причем активный центр С-домена в гораздо большей степени зависит от концентрации хлорид-ионов, чем N-домен [52–54]. В молекуле тАПФ обнаружено присутствие двух ионов хлора, разделенных расстоянием в 20,3 Å, в связывание которых (по данным кристаллографии) вовлечены лиганды обоих субдоменов. Так, первый ион хлора – Cl1 (находящийся на расстоянии 20,7 Å от иона цинка) связан с лигандами – Arg⁴⁸⁹, Arg¹⁸⁶, Trp⁴⁸⁵ и молекулой воды, и окружен гидрофобной оболочкой за счет четырех близко расположенных остатков триптофана. Второй ион хлора – Cl2, (находящийся на расстоянии 10,4 Å от иона цинка) связан с лигандами – Arg⁵²², Tyr²²⁴ и молекулой воды. Обнаружение взаимосвязи иона хлора (Cl2) с остатком Arg⁵²² согласуется с более ранними данными, показывающими, что в молекуле сАПФ остаток Arg¹⁰⁹⁸ (соответствующий остатку Arg⁵²² в тАПФ) играет критическую роль в активации АПФ ионами хлора [55]. Ранее предполагалось, что хлорид-ион может взаимодействовать с субстратом [55]. Однако расположение обоих хлорид-ионов в отдалении от активного центра делает такое взаимодействие маловероятным. Исходя из полученных структурных данных молекулярный механизм активации ионами хлора не очевиден, однако главный (основной) лиганд для иона Cl2 – Arg⁵²² лежит в той же α -спирали ($\alpha 17$), как и два остатка тирозина – Tyr⁵²⁰ и Tyr⁵²³, которые взаимодействуют с лизиноприлом, и, по-видимому, должны так же хорошо связываться с субстратами.

Исследование структуры комплекса тАПФ с ингибитором лизиноприлом ($K_i = 0,27$ нМ) [46, 56] показывает, что взаимодействие ингибитора приводит к изменению его конформации. Молекула лизиноприла удлиняется, фенильная группа вытягивается по направлению к “крышке”, а боковая цепь остатка лизина располагается при этом параллельно α -спирали $\alpha 13$, содержащей HEXXH-мотив. Следует отметить, что значительного перемещения остатков активного центра при образовании комплекса ингибитора с ферментом не наблюдалось, что показано и для ионов хлора, которые были связаны также как и в нативной структуре. Одним из основных координирующих лигандов комплекса является атом цинка активного центра, с которым связывается карбоксильная группа лизиноприла [56,57]. Второй атом кислорода этой карбоксильной группы взаимодействует посредством водородной связи с боковой цепью остатка Glu³⁸⁴ HEXXH-мотива. Фенильное кольцо ингибитора взаимодействует с S₁ областью активного центра, остаток лизина с S₁ областью, а остаток пролина занимает S₂ область активного центра. Другое существенное взаимодействие осуществляется между аминогруппой боковой цепи остатка лизина ингибитора и остатком Glu¹⁶² молекулы фермента, а также между С-концевой карбоксильной группой лизиноприла с остатками Lys⁵¹¹ и Tyr⁵²⁰ молекулы фермента (рисунок).

Недавно была установлена существенная роль остатка His¹⁰⁸⁹ в стабилизации комплекса переходного состояния. При замене в полноразмерном ферменте остатка His¹⁰⁸⁹ на остатки Ala или Leu, величина k_{cat}/K_m для гидролиза AI понижалась в 430 раз и 4000 раз соответственно, главным образом, за счет

АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ

снижения скорости катализа ($k_{\text{кат}}$). Мутантные формы фермента также в 120000 раз хуже связывались с ингибитором АПФ – лизиноприлом [58].

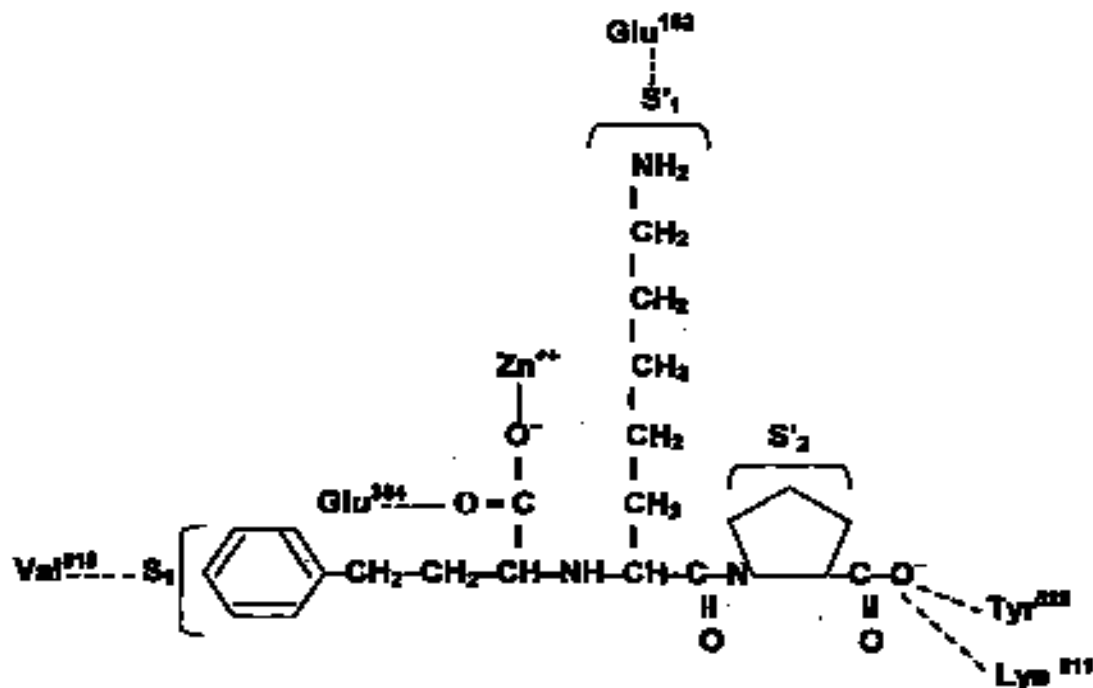


Рисунок.

Взаимодействие лизиноприла с активным центром тАПФ.

4. Каталитические свойства ангиотензин- превращающего фермента.

Специфичность действия на субстраты.

АПФ в основном отщепляет С-концевые дипептиды от олигопептидов различного строения, имеющих свободную карбоксильную группу [1,3,21]. Отщепление дипептидов АПФ зависит от конфигурации и структуры трех С-концевых остатков. Все они должны быть в *L*- форме. Сродство фермента выше к основным и ароматическим остаткам, чем к кислым и с разветвленными боковыми цепями. Хотя АПФ отличается широкой специфичностью [59], имеется ряд некоторых ограничений. АПФ не отщепляет пептиды перед остатком пролина, или имеющие остаток дикарбоновой кислоты на С-конце.

АПФ может гидролизовать некоторые пептиды с заблокированным С-концом (хотя существенно медленнее, чем их аналоги со свободной С-концевой карбоксильной группой) и отщеплять не только дипептиды, но и трипептиды. Такое действие фермента строго ограничивается структурными особенностями пептидных субстратов. К числу таких соединений относятся – вещество Р, его метиловый эфир и люлиберин. Так, от вещества Р АПФ отщепляет амиды ди- и трипептидов, после чего в обоих случаях освобождает только дипептиды [10, 60]. От люлиберина, у которого заблокированы оба конца, АПФ отщепляет не только С-концевой (Arg⁸-Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂), но и N-концевой (Glp¹-His²-Trp³) трипептиды. По-видимому, такое действие фермента на люлиберин частично объясняется отсутствием зарядов на обоих концах его молекулы [3,13,16].

Кроме того, АПФ отщепляет С-концевые трипептиды и от пептидов со свободной карбоксильной группой, имеющие остаток пролина во втором положении с карбоксильного конца и перед ним остатки серина или аланина. К таким соединениям относятся des-Arg¹⁰-Бк и его С-концевые фрагменты, не короче пятичленного пептида, а также субстрат коллагеназы Z-Gly- Pro-Gly-Gly-Pro-Ala [61,62].

5. Свойства N- и C- доменов ангиотензин-превращающего фермента.

Исследование каталитических свойств N- и C- доменов АПФ позволило выявить, что домены различаются по скорости гидролиза пептидов, степени торможения специфическими ингибиторами, профилю активации ионами хлора. Исследования проводили, либо сравнивая свойства сАПФ и тАПФ [63, 47], либо используя мутантные формы фермента, состоящие из одного N- или C-домена, и полноразмерные, имеющие точечные мутации в области активного центра одного из доменов (замена остатков Glu³⁶² или Glu⁹⁶⁰ на Asp; или остатков His³⁶¹ и His³⁶⁵ в N-домене и остатков His⁹⁵⁹ и His⁹⁶³ в C-домене на Lys) [51,54]. Активность C-домена в существенно большей степени зависела от ионов хлора, чем N-домена. В отсутствии ионов хлора все мутантные формы, содержащие интактный C-домен, были практически неактивны; их максимальная активность наблюдалась при довольно высокой концентрации ионов хлора (200-800 мМ). В то же время активность N-домена сохранялась в отсутствии ионов хлора и достигала максимальных величин при довольно низкой их концентрации (10-15 мМ). По-видимому, ионы хлора являются фактором, определяющим вклад каждого домена в общую активность фермента [13,51,54]. При нормальных физиологических условиях, когда концентрация ионов хлора составляет приблизительно 100 мМ, за большую часть превращения AI и Бк, вероятно, отвечает C-домен [9].

Каждый из доменов гидролизует одинаковые пептидные связи во всех исследованных пептидах, но с разной скоростью. Так, C-домен гидролизует AI и трипептид Hip-His-Leu с большей скоростью, чем N-домен, хотя значения K_m для обоих доменов были практически одинаковы [51]. Кинетические же константы отщепления от брадикинина последовательно дипептидов Phe⁸-Arg⁹ и Ser⁶-Pro⁷ были сопоставимы для обоих доменов [54]. Оба домена также катализировали гидролиз вещества P с образованием C-концевых дипептидов и трипептидов. Но гидролиз этого субстрата C-доменом осуществлялся с большей скоростью, чем N-доменом [13].

При сравнительном исследовании расщепления обоими доменами и полноразмерным АПФ различных энкефалинов [64] было обнаружено, что пятичленные [Leu⁵]- и [Met⁵]-энкефалины расщеплялись быстрее C-доменом, но в пептапептиде Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe связь Met⁵-Arg⁶ гидролизвалась быстрее N-доменом, причем число оборотов фермента в отношении этого субстрата (7600 мин⁻¹) было самым высоким по сравнению со всеми известными субстратами АПФ. По-видимому, в организме в превращении гептапептида в [Met⁵]-энкефалин N-домен АПФ играет преимущественную роль.

В настоящее время известно два природных субстрата N-домена. Во-первых, это пептид N-AcSer-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), тормозящий гемопоэз [65]. Пептид AcSDKP гидролизует C-доменом в 50 раз медленнее, чем N-доменом, что обусловлено различием величин k_{cat} . Значения K_m для гидролиза этого пептида нативным ферментом и полноразмерными мутантами, содержащими активный N- или C-домен, были близки. Так как нативный АПФ и мутант с активным только N-доменом гидролизуют AcSDKP почти с одинаковой скоростью, а торможение активности АПФ *in vivo* приводило к увеличению (в 6-7 раз) концентрации пептида в плазме [7], можно предположить, что в организме расщепление этого пептида происходит главным образом N-доменом. Вторым природным субстратом N-домена является пептид ангиотензин-(1-7), который гидролизует N-доменом в 100 раз быстрее, чем C-доменом [66].

Оба домена катализируют гидролиз люлиберина, но отщепление N-концевого трипептида N-доменом происходит в 30 раз быстрее, чем C-доменом [54]. Преимущественное расщепление люлиберина N-доменом подтверждено в опытах с моноклональными антителами, ингибирующими активность N-домена. Подавление активности N-домена приводило к торможению гидролиза люлиберина нативным ферментом более чем на 90% [67].

Различия в каталитических свойствах N- и C-доменов АПФ, по-видимому, связаны с их чувствительностью к различным аминокислотным остаткам,

входящим в состав пептидных субстратов [68]. При исследовании семичленных пептидов – производных Бк – Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-*Phe*-Gln и Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-*Gln*-Gln была показана различная степень их гидролиза N- и С-доменами АПФ. Как известно, Бк в одинаковой степени гидролизуется обоими доменами АПФ. В то же время пептид, содержащий остаток фенилаланина в положении P₁' гидролизировался преимущественно С-доменом, а с остатком глутамина в этом же положении – N-доменом. По-видимому, наличие ароматической аминокислоты (Phe) в положении P₁' увеличивает сродство субстратов к С-домену. Субстраты, производные гематопозитического пептида (AcSDKP), лучше гидролизуются N-доменом, если в положении P₂ находится аминокислотный остаток, содержащий гидроксильную группу [68].

Специфические ингибиторы АПФ в различной степени тормозят активность N- и С-доменов. Существенное влияние на взаимодействие активных центров доменов с ингибиторами оказывают ионы хлора, которые стабилизируют фермент-ингибиторный комплекс за счет замедления скорости его диссоциации [46]. Эффект ионов хлора более выражен для С-домена, чем для N-домена: при увеличении концентрации ионов хлора от 20 до 300 мМ, константа ингибирования (K_i) каптоприла, эналаприла, лизиноприла и трандолаприлата возрастала в среднем в 10 раз для С-домена и почти не изменялась для N-домена. По своей эффективности в отношении С-домена эти ингибиторы образуют следующий ряд: трандолаприлат > лизиноприл > эналаприл > каптоприл; в то же время для N-домена эффективность этих ингибиторов возрастает в обратном порядке, что указывает на существование структурных различий между активными центрами доменов АПФ. Этот вывод был подтвержден и другими авторами, которые исследовали взаимодействие N- и С-доменов АПФ с ингибиторами, имеющими различную длину боковой цепи – ¹²⁵I-меченые ингибиторы Ro31-8472 (производное цилазиприлата) и 351А (аналог лизиноприла) [69]. Было обнаружено, что с С-доменом связывались оба ингибитора, а с N-доменом взаимодействовал только Ro31-8472, имеющий меньшие размеры. По-видимому, N-домен имеет более глубокую щель активного центра, атом цинка которого менее доступен для связывания с ингибитором 351 А.

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о существовании структурно-функциональных различий между доменами. Однако вопрос о функциональной роли доменов до сих пор остается неясным. В настоящее время разными авторами получены данные, свидетельствующие в пользу физиологической значимости доменов. Во-первых, это обнаружение в организме двух изоформ АПФ, представляющих собой С- и N- домены полноразмерного фермента (тестикулярный АПФ и АПФ из “кишечной жидкости”). Во-вторых, это обнаружение эндогенных субстратов, гидролизующихся преимущественно N-доменом. В-третьих, это данные о разном взаимодействии доменов с ингибиторами, в том числе ингибиторами, избирательно блокирующими активные центры доменов. Кроме того, показано, что ионы хлора оказывают различное влияние на функционирование доменов. В определенных условиях это может определять вклад каждого из них в общую активность фермента. При нормальных физиологических условиях, когда концентрация ионов хлора в крови составляет около 100 мМ, гидролиз субстратов осуществляется в основном С-доменом. Однако в местах интенсивного всасывания и выведения жидкости (на ворсинках кишечника и выводящих канальцах почек), где концентрация ионов хлора сильно варьирует, могут создаваться условия для преимущественного функционирования N-домена полноразмерного фермента. Подтверждением физиологической значимости доменов могут служить и полученные недавно данные о различии в физиологических функциях сАПФ и тАПФ, несмотря на их сходные энзиматические свойства. Так, было обнаружено, что для осуществления репродуктивной функции необходимо наличие тАПФ и его роль в организме не может дублироваться соматическим ферментом [70].

6. Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента.

Ингибиторы АПФ – это соединения различной природы, обладающие способностью тормозить его активность. Интерес к этим соединениям вызван тем, что АПФ играет ключевую роль в регуляции кровообращения в организме, являясь центральным звеном регуляции сосудистого тонуса и водно-солевого обмена. В настоящее время фермент становится основной молекулярной мишенью в лечении гипертонии и сердечно-сосудистой недостаточности, а его синтетические ингибиторы находят широкое применение в клинической практике.

По происхождению ингибиторы АПФ можно разделить на две группы: природные и синтетические. К первой группе относятся соединения пептидной природы и некоторые органические соединения, ко второй – производные дипептидов (в основном Ala-Pro) и непептидные соединения – производные аминокислот, алифатических, ароматических и гетероциклических соединений.

Впервые ингибиторы АПФ были обнаружены в 1965 году в яде бразильской змеи *Bothrops jararaca* как фактор, потенцирующий действие Бк в организме. Оказалось, что это близкие по строению пептиды [71,72]. Они отличаются высоким содержанием остатков пролина (два из которых находятся на С-конце почти всех пептидов), что предохраняет их от расщепления АПФ. Кроме того, у них отсутствует свободная концевая аминогруппа (на N-конце находится остаток пироглутаминовой кислоты), что может защищать пептиды от разрушения различными протеиназами. Благодаря таким особенностям структуры, эти пептиды довольно медленно разрушаются в организме.

Наиболее эффективными ингибиторами из этой группы оказались два пептида – пентапептид (SQ 20475) pGlu-Lys-Trp-Ala-Pro ($K_i = 0,08$ мМ), гидролизующий АПФ, и нонапептид тепротид (SQ 20881) pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro ($K_i = 0,9$ мМ). Изучение большого числа аналогов этих пептидов показало, что ингибирование АПФ связано со структурой С-концевых трипептидов Trp-Ala-Pro или Ile-Pro-Pro [73]. Тепротид широко использовался в экспериментальных исследованиях, но в клинической практике не нашел применения из-за необходимости парентерального введения [1,21,74,75].

В настоящее время синтезировано большое количество высокоэффективных ингибиторов АПФ. В основе подавляющего большинства этих соединений лежит структура дипептида Ala-Pro и структурные элементы, необходимые для взаимодействия с ионом цинка активного центра фермента.

Первым синтетическим ингибитором АПФ, структура которого была предложена на основании модели гипотетического активного центра АПФ, стал каптоприл [76]. Каптоприл – это сильный конкурентный ингибитор ($K_i = 1,7$ нМ), первый из пероральных ингибиторов АПФ, который не разрушается в желудочно-кишечном тракте и широко используется в клинике. Создание каптоприла положило начало дальнейшему поиску и синтезу высокоэффективных ингибиторов АПФ. В дальнейшем были синтезированы и другие конкурентные ингибиторы АПФ на основе дипептидов Ala-Pro (МК-422 – “эналаприлат”) и Lys-Pro (МК-521 – “лизиноприл”), не содержащие в своем составе сульфгидрильной группы [56]. Эти соединения можно рассматривать как ингибиторы переходного состояния. Структура этих ингибиторов имитирует пространственное расположение, возникающее при расщеплении пептидной связи с образованием COOH- и $\text{NH}_2\text{-}$ группы у продуктов гидролиза. Все ингибиторы имеют свободную концевую карбоксильную группу, связывающуюся с аргинином активного центра, циклическую или бициклическую структуру, заполняющую карман S'_2 , и $\text{CH}_3\text{-}$ группу, расположенную как у каптоприла и эналаприла (рисунок). С атомом цинка они связываются через вторую карбоксильную группу, соответствующую тиоловой группе каптоприла. Как показали многочисленные исследования, оптимальное расстояние между этой группой и амидным карбонилем соответствует двум метиленовым группам [77]. Оптимальная стереохимия этих соединений соответствует L-L-дипептидам. Эти ингибиторы отличаются высокой

АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ

специфичностью, являются конкурентными и связываются с активным центром АПФ подобно субстратам.

Эналаприл (МК-421), который представляет собой эфир эналаприловой кислоты, получил наиболее широкое применение в клинике. Его ингибирующая активность примерно в 1000 раз меньше, чем у эналаприлата (IC_{50} эналаприла – 1200 нМ, а у эналаприлата – 1,2 нМ). Однако в печени под действием гидролаз, расщепляющих сложноэфирную связь, он превращается в активную форму – эналаприлат (дикарбоновую кислоту) [78,56].

В дальнейшем на основе дипептида Ala-Pro был получен ряд сильных конкурентных ингибиторов АПФ, также не содержащих тиоловой группы. Они были синтезированы в виде малоактивных предшественников. Как и эналаприл, эти ингибиторы хорошо всасываются в желудочно-кишечном тракте и довольно быстро превращаются в печени в активные диацидные метаболиты. К их числу относятся такие ингибиторы как рамиприл [79], периндоприл [79], пентоприл [80], квиналаприл [81], спираприл [82], цилазаприл [83], SHC 31846 [84], а также фозиноприл, который по своей химической структуре отличается от карбоксиалкильных ингибиторов АПФ [85,86].

Фозиноприл и его активный метаболит фозиноприлат являются пролиновыми производными фосфинильной кислоты. Именно посредством фосфинильной (фосфорильной) группы они связываются с ионом цинка активного центра молекулы АПФ. В отличие от других пролекарственных форм ингибиторов метаболическая трансформация фозиноприла происходит не только в печени, но и в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, в почках и кровяном русле. Кроме того, фозиноприл выделяется на фоне других ингибиторов превосходной переносимостью, и по мнению некоторых исследователей его можно отнести к третьему поколению ингибиторов АПФ (после каптоприла и карбоксиалкильных ингибиторов) [87].

Недавно в ряде лабораторий были синтезированы ингибиторы (таблица), способные различать активные центры доменов АПФ. К их числу относится новый высокоэффективный ($K_i = 12$ нМ) ингибитор RXP 407 (Ac-Asp-(L)Phepsi(PO₂-CH₂)(L)-Ala-Ala-NH₂), специфичный для N-домена [88]. Его константа диссоциации для N-домена на три порядка ниже, чем для С-домена. Специфичность RXP 407 в отношении N-домена связана с наличием С-концевой амидной группы и остатка аспарагиновой кислоты в положении Р₂. В опытах *in vitro* (с использованием AI и AcSDKP в качестве субстратов) было показано, что в условиях практически полного торможения гидролиза AcSDKP N-доменом, гидролиз AI С-доменом продолжает осуществляться.

Таблица.. Торможение активности доменов АПФ избирательными ингибиторами, K_i (нМ)

Ингибитор	NaCl (мМ)	N-домен	С-домен	Ссылка
RXP 407	200	2,0	2500,0	[88]
RXP A380	200	10000,0	3,0	[89]
BPP	200	8000,0	30,0	[90, 91]
Keto-ACE	150	1500,0	40,0	[66]
Ангиотензин(1-7)	150	3400,0	130,0	

Для С-домена обнаружено несколько соединений, избирательно тормозящих его активный центр. К их числу относятся: 1) фосфоросодержащий пептид RXP A380 (Cbz-PhePsi[PO(2)CH]Pro-Trp-OH), константа диссоциации которого для С-домена более чем на три порядка ниже, чем для N-домена АПФ [89]; 2) группа ингибиторов, производных брадикинин потенцирующего пептида – pGlu-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro (BPP), величина K_i которого для С-домена

составляет 30 нМ, для N-домена – 8 мМ [90,91]; 3) ингибитор “keto-ACE” (5-S-5-benzamido-4-охо-6-phenylhexanoyl-L-pro), который тормозит гидролиз AI и Бк С-доменом (IC₅₀ AI и Бк – 0,5 и 0,04 мкМ) при концентрациях соответственно в 38 и 48 раз ниже той, которая необходима для ингибирования активности N-домена [66]. Кроме того, нужно отметить, что ангиотензин-(1-7) оказался не только природным субстратом N-домена, но и специфическим ингибитором С-домена. Показано, что величины K_i для N- и С- доменов различаются в 26-34 раза (в зависимости от субстрата) [66].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В 2003 году были опубликованы данные о пространственной структуре тАПФ [45]. На их основе независимыми группами исследователей были построены пространственные модели N- домена АПФ человека [92] и его активного центра [93]. Детали структуры активного центра тАПФ (полученные по данным кристаллографии), как и данные моделирования активного центра N-домена, могут быть использованы для поиска новых селективных ингибиторов обоих доменов АПФ. В зависимости от преимущественного взаимодействия ингибиторов с одним из двух активных центров может быть варьирован их биологический эффект при применении в качестве лекарственных препаратов. Структурно обоснованный, рациональный поиск избирательных ингибиторов должен способствовать созданию нового поколения лекарственных препаратов (ингибиторов АПФ) – более эффективных, с наименьшим количеством побочных эффектов и возможно новым клиническим применением. Так, селективные по отношению к N-домену ингибиторы АПФ могут использоваться в контроле метаболизма гематопозитического пептида, что может иметь значение для защиты гематопозитических клеток при химиотерапии рака [94,95].

ЛИТЕРАТУРА.

1. Erdös E.G. (1979) in: *Handbook of Experimental Pharmacology*, **25**, S5, pp.438-487.
2. Soffer R.L. (1981) in: *Biochemical Regulation of Blood Pressure*. (R.L.Soffer ed.) John Wiley & Sons, New York, pp.123-164.
3. Елусеева Ю.Е. (1993) Успехи биол. химии, **33**, 106-129.
4. Kowala M.C., Recce R., Beyer S., Aberg G. (1995) *Cardiovascular Pharmacol.*, **25**, 179-186.
5. Fennessy P.A., Campbell J.H., Mendelsohn F.A.O., Campbell G.R. (1996) *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.*, **23**, S30-S32.
6. Rieger K.J., Saezservent N., Papet M.P., et al. (1993) *Biochem. J.*, **296**, 373-378.
7. Azizi M., Rousseau A., Ezan E., et al. (1996) *J. Clin. Invest.*, **97**, 839-844.
8. Stephenson S.L., Kenny A.J. (1987) *Biochem. J.*, **241**, 237-247.
9. Елусеева Ю.Е. (1998) *Биоорганическая химия*, **24** (4), 262-270.
10. Skidgel R.A., Engelbrecht S., Johnson A.R., Erdös E.G. (1984) *Peptides*, **5**, 769-776.
11. Hooper N.M. (1991) *Int. J. Biochem.*, **23**, 641-647.
12. Елусеева Ю.Е. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**(1) 43-54.
13. Williams T.A., Soubrier F., Corvol P. (1996) in: *Zinc Metalloproteases in Health and Disease*. (N. M. Hooper ed.) Taylor & Francis, pp.83-104.
14. Beldent V., Michaud A., Wei L., Chauvet M.T., & Corvol P. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 26428-26433.
15. Johnston C.I. (1992) *J. Hypertension*, **10**, S7, S13-S26.
16. Skidgel R.A. & Erdys E.G. (1987) *Clin. Hypertens.*, **A9**, 243-259.
17. Ramchandran R., Kasturi S., Douglas J.G., Sen I. (1996) *Am. J. Physiol.*, **271** (2 Pt 2), H744-H751.
18. Hooper N.M., Karran E.H., Turner A.J. (1997) *Biochem. J.*, **321**, 265-279.
19. Ehlers M.R.W., Schwager S.L., Chubb A.J., et al. (1997) *Immunopharmacology*, **36**, 271-278.
20. Sadhukham R., Sen G.C., Ramchandran R. and Sen I. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 138-143.

21. Ehlers M.R.W., Chen Y.P., Riordan J.F. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun., **183**, 123-164.
22. Ripka J.E., Ryan J.W., Valido F.A., et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun., **196**, 503-508.
23. Soubrier F., Alheng-Gelas F., Hubert C., et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 9386-9390.
24. Bernstein K.E., Martin B.M., Edwards A.S., Bernstein E.A. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 11945-11951.
25. Ehlers M.R.W., Fox E.A., Strydom D.J., Riordan J.F. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 7741-7745.
26. Deddish P.A., Wang J., Michel B., et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 7807-7811.
27. Deddish P.A., Wang L.-X., Jackman H.L., et al. (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., **279**, 1582-1589.
28. Hattori M.A., Del Ben G.L., Carmona A.K., Casarini D.E. (2000) Hypertension, **35**, 1284-1290.
29. Andrade M.C., Quinto B.M., Carmona A.K., et al. (1998) J. Hypertension, **16**, Pt. 2, 2063-2074.
30. Thekkumkara T.J., Livingston I.W., Kumar R.S., Sen G.C. (1992) Nucl. Acids Res., **20**, 683-687.
31. Shai S.Y., Fisher R.S., Martin B.M., et al. (1992) Circ. Res., **70**, 1274-1281.
32. Koike G., Krieger J.E., Jacob H.J., et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., **198**, 380-386.
33. Corvol P., Williams T.A. and Soubrier F. (1995) Methods Enzymol., **348**, 283-305.
34. Hubert C., Houot A.M., Corvol P., Soubrier F. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 15377-15388.
35. Marcic B., Deddish P.A., Jackman Y.L., et al. (2000) Hypertension, **36**, 116-121.
36. Sturrock E.D., Danilov S.M., Riordan J.F. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun., **236**, 16-19.
37. Биневский П.В., Никольская И.И., Позднеев В.Ф., Кост О.А. (2000) Биохимия, **65**, 765-774.
38. Iwata K., Blacher R., Soffer R.L. and Lai C.Y. (1983) Arch. Biochem. Biophys., **227**, 188-201.
39. Yotsumoto H., Lanzillo J.J. and Fanburg B.L. (1983) Biochim. Biophys. Acta, **749**, 180-184.
40. Beldent V., Michaud A., Bonnefoy C., Chauvet M.T., Corvol P. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 28962-28969.
41. Lattion A.L., Soubrier F., Allegrini J., et al. (1989) FEBS Lett., **252**, 99-104.
42. Kumar R.S., Kusari J., Roy S.N., Soffer R.L., Sen G.S. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 16754-16758.
43. Howard T.E., Shai S.Y., Langford K.G.L., Martin B.M., Bernstein K.E. (1990) Mol. Cell. Biol., **10**, 4294-4302.
44. Gordon K., Redelinghuys P., Schwager S.L., et al. (2003) Biochem J., **371** (Pt 2), 437-442.
45. Natesh R., Schwager S.L., Sturrock E.D., Acharya K.R. (2003) Nature, **421**, 551-554.
46. Wei L., Clauser E., Alheng-Gelas F., Corvol P. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 13398-13405.
47. Ehlers M.R.W., Riordan J.F. (1991) Biochemistry, **30**, 7118-7126.
48. Vallee B.L. & Auld D.S. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 220-224.
49. Turner A.J., Tanzawa K. (1996) in: Zinc Metalloproteases in Health and Disease (N.M. Hooper ed.) Taylor & Francis, pp. 311-331.
50. Ehlers M.R.W., Riordan J.F. (1989) Biochemistry, **28**, 5311-5318.
51. Wei L., Alheng-Gelas F., Corvol P., Clauser E. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 9002-9008.
52. Bünnig P. & Riordan J.F. (1983) Biochemistry, **22**, 110-116.

53. *Shapiro R., Holmquist B., Riordan J.F.* (1983) *Biochemistry*, **22**, 3850-3857.
54. *Jaspard E., Wei L. & Alhenc-Gelas F.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 9496-9503.
55. *Liu X., Fernandez M., Wouters M.A., Heyberger S. Hussian A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 33518-33525.
56. *Patchett A.A., Harris E., Tristram E.W. et al.* (1980) *Nature*, **288**, 280-283.
57. *Patchett A.A., Cordes E.N.* (1985) *Adv. Enzymol.*, **57**, 1-84.
58. *Fernandez M., Liu X., Wouters M.A., Heyberger S., Husain A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 4998-5004.
59. *Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н., Павлихина Л.В., Алексеенко Л.П.* (1970) *Вопр. мед. химии*, **16**, 646-649.
60. *Thiele E.A., Strittmatter S.M., Snyder S.H.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**, 317-324.
61. *Inokuchi J.J., Nagamatsu A.* (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **662**, 300-307.
62. *Oshima G., Hiraga Y., Shirono K., et al.* (1985) *Experientia*, **41**, 325-328.
63. *Williams T.A., Barnes K., Kenny A.J., Turner A.J., Hooper N.M.* (1992) *Biochem. J.*, **288** (Pt 3), 875-881.
64. *Deddish P.A., Jackman H.L., Skidgel R.A., Erdos E.G.* (1997) *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1459-1463.
65. *Rousseau A., Michaud A., Chauvet M.-T., Lenfant M., Corvol P.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 3656-3661.
66. *Deddish P.A., Marcic B., Jackman H.L., et al.* (1998) *Hypertension*, **1**, 912-917.
67. *Danilov S., Jaspard E., Churakova T., et al.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26806-26814.
68. *Araujo M.C., Melo R.L., Cesari M.H., et al.* (2000) *Biochemistry*, **39**, 8519-8525.
69. *Perich R.B., Jackson B., Rogerson F., et al.* (1992) *Mol. Pharmacol.* **42**, 286-293.
70. *Kessler S.P., Rowe T.M., Gomos J.B., Kessler P.M., Sen G.C.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 26259-26264.
71. *Ferreira S.H., Rocha E., Silva M.* (1965) *Experientia*, **21**, 347-349.
72. *Ferreira S.H., Bartelt D.C., Green L.J.* (1970) *Biochemistry*, **9**, 2583-2593.
73. *Ondetti M.A., Cushman D.W.* (1981) in: *Biochemical Regulation of Blood Pressure* (Soffer R.L. ed.) John Wiley & Sons, New York, p. 165.
74. *Soffer R.L.* (1976) *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 73-94.
75. *Eliseeva Y.E., Pavlikhina L.V., Orekhovich V.N. et al.* (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, **658**, 165-168.
76. *Ondetti M.A. and Cushman D.W.* (1982) *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 283-308.
77. *Weller H.N., Gordon E.M., Rom M.B., Pluscec J.* (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 82-89.
78. *Todd P.A., Heel R.C.* (1986) *Drugs*, **31**, 198-248.
79. *Unger T., Moursi M., Ganten D. et al.* (1986) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **8**, 276-285.
80. *Combes B.J., Turini G.A., Brunner H.R., et al.* (1983) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **286**, 216-229.
81. *Kaplan H.R., Cohen D.M., Essenburg A.D. et al.* (1984) *Federation Proc.*, **43**, 1326-1329.
82. *Sybertz E.J., Baum T., Ahn H.S. et al.* (1987) *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **268**, 216-229.
83. *Fasanella d'Amore T., Bussien J.P., et al.* (1987) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **9**, 26-31.
84. *Sybertz E.J., Baum T., Ahn H.S. et al.* (1983) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **5**, 643-654.
85. *Krapcho J., Turk C., Cushman D.W., et al.* (1988) *J. Med. Chem.*, **31**, 1148-1160.
86. *Cushman D.W., Wang F.L., Fung W.C., et al.* (1989) *Br. J. Clin. Pharmac.*, **28**, 115S-131S.
87. *Преображенский Д.В., Савченко М.В., Киктев В.Г., Сидоренко Б.А.* (2000) *Кардиология*, **5**, 75-81.
88. *Dive V., Cotton J., Yiotakas A., et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4330-4335.
89. *Georgiadis D., Beau F., Czarny B., et al.* (2003) *Circ. Res.*, **93**, 148-154.

АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ

90. Cotton J., Hayashi M.A., Cuniassse P., et al. (2002) *Biochemistry*, **41**, 6065-6071.
91. Hayashi M.A., Murbach A.F., Ianzer D., et al. (2003) *J. Neurochem.* **85**, 969-977.
92. Tzaczos A.G., Galanis A.S., Spyroulias G.A., et al. (2003) *Protein Engineering*, **16**, 993-1003.
93. Fernandez J.H., Hayashi M.A., Camargo A.C., Neshich G. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 219-226.
94. Masse A., Ramirez L.H., Bindoula G., et al. (1998) *Blood*, **91**, 441-449.
95. Jackson J.D., Ozerol E., Yan Y., et al. (2000) *Stem Cell. Res.*, **9**, 489-496.

Поступила: 02. 12. 2004

ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME. DOMAIN STRUCTURE AND PROPERTIES

E.V. Kugaevskaya

V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences (RAMS), Pogodinskaya St., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (495)246-50-72, e-mail: Elena.Kugaevskaya@ibmc.msk.ru.

Angiotensin converting enzyme (ACE) is a key enzyme of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems responsible for the regulation of blood pressure. Recently the new physiological function of ACE has been revealed: the enzyme hydrolyses *in vivo* the natural peptide (N-AcSer-Asp-Lys-Pro), a negative regulator of hematopoietic stem cell proliferation. Somatic ACE is a single-chain glycoprotein, which contains two highly homologous domains (N- and C-domains, respectively), possessing a zinc-dependent active site. The domains differ in the rate of substrate hydrolysis, interaction with ACE inhibitors and chloride activation profiles. Specific ACE inhibitors used for treatment of hypertension, inhibit both domains, but their dissociation rates of enzyme-inhibitor complex are different. Selective binding of ACE inhibitors to either N- or C-domain may influence their biological effect during treatment. Different functional significance of these domains may be due to some differences in their three-dimensional structures. X-ray structure of testicular ACE was recently solved and three-dimensional structure of N-domain was modeled. The structural features of domain active sites may be useful for construction of new selective inhibitors.

Key words: angiotensin-converting enzyme, domains, structure, inhibitors.