

УДК 577.152.341*51
©Елисеева, Кугаевская

СТРУКТУРА И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ДОМЕНОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

Ю.Е. Елисеева, Е.В. Кугаевская*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва,
Погодинская ул., 10; тел.: (499) 246-50-72; факс (499) 245-08-57;
эл.почта: Yulia.Eliseeva@ibmc.msk.ru

Молекула соматического ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) содержит два высокомолекулярных каталитически активных домена (N- и C- домены), которые различаются по некоторым свойствам. В организме обнаружены активные изоформы АПФ, состоящие только из одного домена. Для выяснения молекулярной природы различий доменов были получены кристаллические структуры доменов, содержащие специфичные ингибиторы АПФ.

Физиологические функции АПФ не ограничиваются его ролью в регуляции сердечно-сосудистой системы. Получены данные, свидетельствующие в пользу физиологической значимости доменов. С-домен является основным местом превращения ангиотензина в организме, т.е. именно он участвует в регуляции кровяного давления. Роль N-домена менее связана с функцией ренин-ангиотензиновой системы и больше связана с обменом биологически активных пептидов, имеющих высокое сродство к этому домену (горалатид, люлиберин, энкефалин-гептапептид, пептидный бета-амилоид). Получены селективные ингибиторы, способные различать активные центры доменов.

Ключевые слова: ангиотензин-превращающий фермент, домены, кристаллическая структура, специфичные субстраты, селективные ингибиторы доменов.

ВВЕДЕНИЕ. Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1), хорошо известен как фермент, регулирующий кровяное давление и водно-солевой обмен [1-3]. Он превращает неактивный пептид ангиотензин I (AI) в ангиотензин II (AII), вызывающий повышение кровяного давления и инактивирует сосудорасширяющий пептид брадикинин (Бк) (рис. 1). Ведущая роль АПФ в регуляции артериального давления подтверждается широким и успешным применением ингибиторов этого фермента в клиниках всего мира для лечения различных форм гипертонии а также других сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз [4-7]. Ингибиторы АПФ тормозят превращение AI в AII и предотвращают разрушение Бк.

* - адресат для переписки

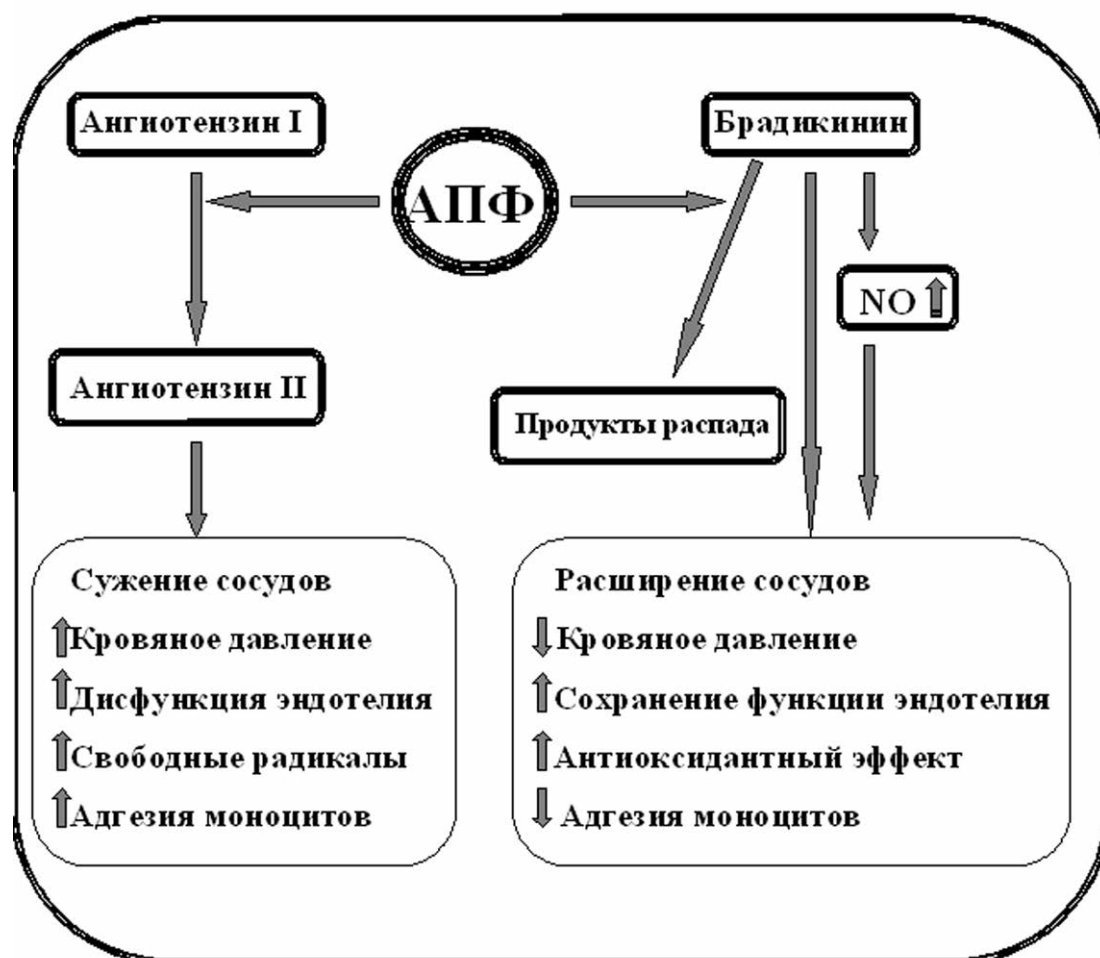


Рисунок 1.
Действие АПФ в организме.

АПФ широко распространен в организме. АПФ – интегральный белок плазматической мембраны, располагающийся на ее внешней поверхности. Основная масса синтезируемого в организме фермента (примерно 90%) находится в мембранно-связанном состоянии [8]. Почти вся молекула АПФ локализована экстрацеллюлярно на поверхности клеток эндотелиальных, специализированных эпителиальных, находящихся в местах интенсивного всасывания или выделения жидкости и солей, нейроэпителиальных, на нервных окончаниях, на клетках мононуклеарного ряда, а также в органах репродуктивной системы. Имеется и свободная (растворенная) форма фермента, которая присутствует практически во всех биологических жидкостях [9].

Значение мембранно-связанного АПФ в организме было показано на мышах, у которых синтезировалась только секретируемая (растворимая) форма АПФ. При отсутствии мембранно-связанного фермента, у них наблюдались такие же нарушения, как и у мышей полностью лишенных гена АПФ, хотя и отмечался достаточно высокий уровень активности АПФ в плазме [10].

В организме синтезируются две формы АПФ. Большая форма (150-190 кДа) – соматический фермент, который присутствует практически во всех органах, и меньшая форма (90-100 кДа) – тестикулярный фермент, который синтезируется только в семенниках. Соматический АПФ (сАПФ) отличается характерной структурной особенностью. Молекула сАПФ, состоящая из одной полипептидной цепи (1277 аминокислотных остатков, а.о.), характеризуется высокой степенью внутренней гомологии между двумя большими (по 357 а.о.) N- и С-доменами [11] (рис. 2). Тестикулярная форма (тАПФ) состоит из одного домена (701 а.о.), идентичного С-домену соматического АПФ (рис. 2), за исключением 36 а.о., находящихся на N-конце молекулы [12]. А.о. 37-701 тестикулярного АПФ идентичны а.о. 613-1277 соматического фермента. Обе формы кодируются одним геном, содержащим 26 экзонов, меньшая форма АПФ кодируется экзонами 13-26 [13].

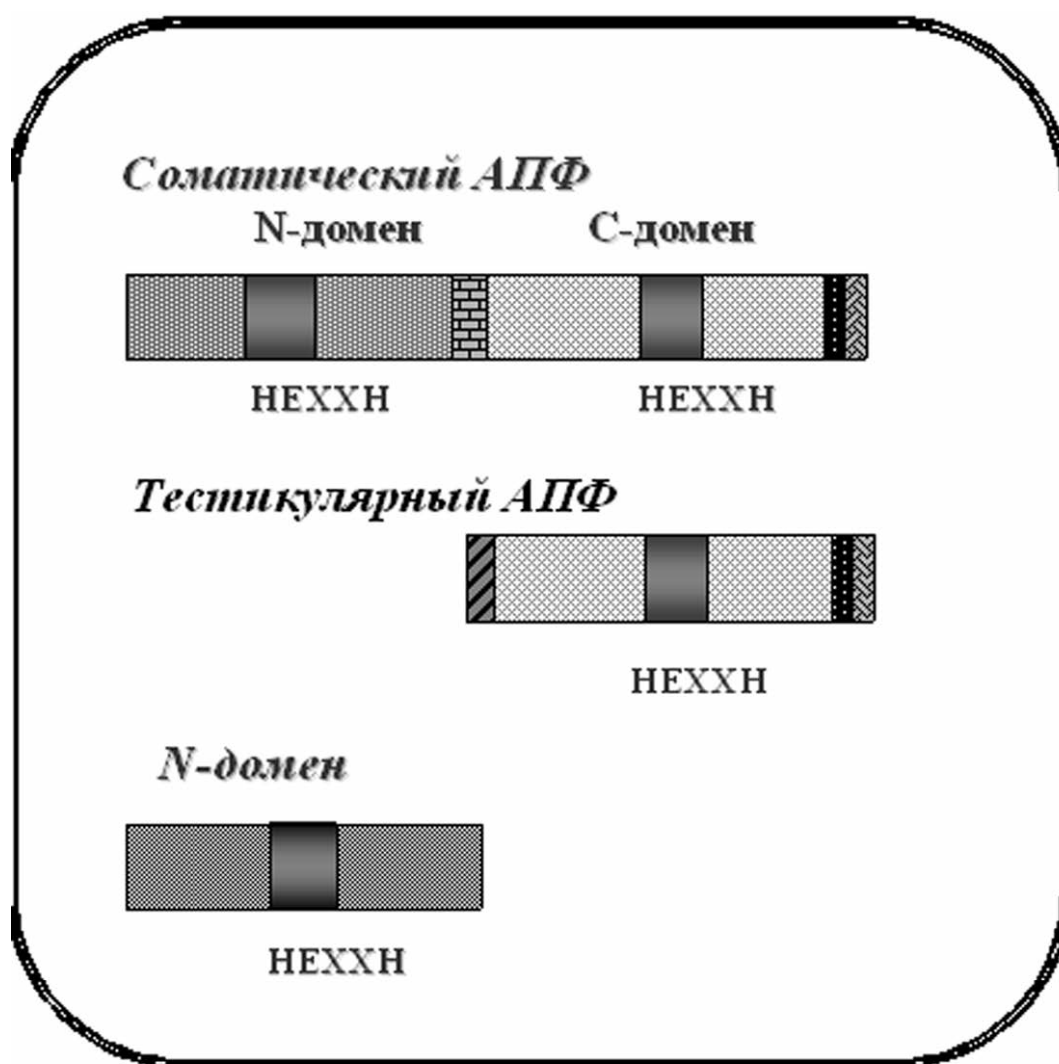


Рисунок 2.

Доменная структура молекулы АПФ.

Мембранный якорь, расположенный на карбоксильном конце соматического АПФ и тестикулярного АПФ, выделен чёрным цветом; аминоконцевой участок тестикулярного АПФ из 36 уникальных аминокислотных остатков отмечен полосами; активные центры (HEXXH) доменов выделены тёмно серым цветом.

Свободный N-домен АПФ, не имеющий гидрофобного якоря (65-90 кДа), сначала был обнаружен в биологических жидкостях – в кишечной жидкости [14] и в моче человека [15] и крыс [16]. Затем было обнаружено, что он (69-96 кДа) экспрессируется в различных тканях нормотензивных и гипертензивных крыс [17]. Кроме того, была показана локализация N-домена в ядрах мезангиальных клеток крыс [18]. Молекулярный механизм возникновения этой формы пока неясен, хотя предполагается, что она является продуктом ограниченного протеолиза соматической формы АПФ. Известно, что между доменами имеется подвижный участок, состоящий примерно из 100 а.о., где может происходить протеолиз с освобождением N-домена. Присутствие N-домена в тканях позволяет предположить, что он может осуществлять в них метаболизм своих субстратов.

АПФ – металлопротеиназа, относящаяся к группе цинкинов. Каждый из доменов содержит активный центр, в котором присутствует атом цинка и короткая последовательность (HEXXH, где XX – любые а.о.), сходная с Zn-связывающими мотивами активных центров ряда цинк-металлопротеиназ [19]. Домены каталитически активны, но не равноценны. Они отличаются по профилю активации ионами хлора, по скорости гидролиза пептидов и по степени торможения различными ингибиторами [8, 20].

1. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ДОМЕНОВ АПФ.

1.1. Активация ионами хлора.

АПФ отличается уникальной среди металлопротеиназ особенностью активироваться ионами хлора, которые являются аллостерическим активатором. Кинетический анализ показал, что связывание ионов хлора приводит к конформационным изменениям, влияющим на связывание субстрата, что приводит к повышению сродства к целому ряду субстратов, которые в отсутствие ионов хлора практически не взаимодействуют с АПФ [1-3, 21].

Активность С-домена сильно зависит от концентрации ионов хлора. В отсутствие ионов хлора С-домен теряет активность, максимальная активность наблюдается при их концентрации 200-800 мМ в зависимости от субстрата и pH. В то же время N-домен сохраняет активность в отсутствие ионов хлора и полностью активируется при весьма низкой их концентрации (10-15 мМ). Предполагается, что эти отличия имеют существенное физиологическое значение [22]. Можно предполагать, что ионы хлора являются фактором, определяющим вклад каждого домена в общую активность фермента. При нормальных физиологических условиях в крови (концентрация ионов хлора 95-112 мМ). С-домен, вероятно, ответственен за большую часть превращения AI. Однако следует иметь в виду, что большое количество АПФ находится на ворсинках стенки кишечника и выводящих канальцев почек, где концентрация ионов хлора сильно варьирует, а также на нервных окончаниях, где N-домен полноразмерного фермента, как не требующий для своей активности ионов хлора, может иметь при определенных условиях преимущественное значение.

1.2. Структура АПФ.

Существенный прогресс в изучении АПФ был достигнут в последние годы (2003-2006), когда были получены кристаллические структуры его доменов [23, 24], на основании которых стала возможной идентификация аминокислотных остатков активных центров, определяющих селективность доменов и их разные функции.

1.2.1. Кристаллическая структура тестикулярного АПФ (С-домена).

По данным кристаллографии, молекула тестикулярного фермента имеет эллипсоидную форму (примерно 72×57×48 Å) с центральным каналом протяжённостью около 30 Å с сужением в середине, образующим активный центр и разделяющим канал на две камеры. Этот канал делит молекулу на два субдомена [23]. Вход в канал прикрывается N-концевой областью домена состоящей из трёх α -спиралей ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$), которые ограничивают доступ в канал к активному центру молекулы больших пептидов (рис. 3). Это объясняет, почему АПФ может

гидролизовать только небольшие пептиды, содержащие не более 25-30 а.о. Молекула тАПФ преимущественно состоит из спиральных участков: 27 спиралей, примерно одинаково распределены в обоих субдоменах. Всего 4% всех остатков составляют β -структуры, занимая короткие участки, два из которых расположены вблизи активного центра.



Рисунок 3.

Пространственная структура тестикулярного АПФ.

Данные взяты из белкового банка данных PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>), файл 2iu[1]msv.

ДОМЕНЫ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

Внутри молекулы обнаружены два иона хлора – один (Cl-1), находящийся на расстоянии 20,7 Å от иона цинка, связан с четырьмя аминокислотными остатками и молекулой воды и окружен четырьмя гидрофобными остатками триптофана. Второй (Cl-2) – на расстоянии 10,4 Å от иона цинка связан с Arg⁵²², который ранее предполагался как остаток, определяющий зависимость активности АПФ от ионов хлора. Кроме того, Cl-2 связан с Tyr⁵²⁴ и молекулой воды и находится в той же спирали, что и два остатка Tyr⁵²⁰ и Tyr⁵²³, которые взаимодействуют с ингибитором АПФ лизиноприлом, а возможно и с субстратом. Следует отметить, что в связывании обоих ионов хлора вовлечены остатки, находящиеся в разных субдоменах АПФ.

1.2.2. Кристаллическая структура N-домена АПФ.

Кристаллическая структура N-домена в целом довольно схожа со структурой С-домена [24]. Он тоже имеет эллипсоидную форму, центральный канал, разделяющий молекулу на два субдомена, прикрывающую вход в канал N-концевую область, состоящую из трех спиралей. Однако имеются различия. В N-доме области, закрывающей вход в канал, имеет больше отрицательно заряженных аминокислотных остатков, чем в С-доме. Предполагается, что особенности конформации этой области могут оказывать влияние на субстратную специфичность обоих доменов. Известно, что N-домен активируется существенно более низкими концентрациями ионов хлора и в меньшей степени, чем С-домен. С этим согласуется обнаружение в молекуле N-домена только одного иона хлора, по положению соответствующего Cl-2 в С-доме, в котором присутствуют два иона хлора. Кроме того, некоторые различия имеются в расположении подвижных петель в структуре молекулы и в том, что на карбоксильном конце N-домена располагается междоменный участок полипептидной цепи АПФ.

Для выяснения молекулярной природы различий доменов по субстратной специфичности были получены кристаллические структуры доменов, содержащие специфичный ингибитор АПФ лизиноприл, что дало возможность определить различия в структуре активных центров доменов [23-25]. В активных центрах обоих доменов лизиноприл был ориентирован одинаково. Фенильная группа, находящаяся на N-конце ингибитора, вытянута по направлению к “крышке”, а боковая цепь лизина располагается параллельно спирали, содержащей цинк-связывающий мотив. Центральная карбоксильная группа лизиноприла расположена вблизи цинка активного центра и связана с ним. Однако наблюдались заметные различия в связывании с аминокислотными остатками активных центров доменов (табл. 1).

Таблица 1. Аминокислотные остатки, входящие в состав активных центров N- и С-доменов АПФ.

	N-домен	тАПФ/С-домен
S2	Arg ³⁸¹ Tyr ³⁶⁹ Thr ⁴⁹⁶	Glu ⁴⁰³ Phe ³⁹¹ Val ⁵¹⁸
S1	Thr ⁴⁹⁶ Asn ⁴⁹⁴ Ser ¹¹⁹	Val ⁵¹⁸ Ser ⁵¹⁶ Glu ¹⁴³
S1'	Asp ¹⁴⁰ Asp ²⁵⁵ Glu ²⁶² Arg ³⁵⁰ Thr ³⁵² Asp ³⁵⁴ Asn ³⁵⁵ Thr ³⁵⁸	Glu ¹⁶² Asn ²⁷⁷ Ser ²⁸⁴ Glu ³⁷² Asn ³⁷⁴ Glu ³⁷⁶ Asp ³⁷⁷ Val ³⁸⁰
S2'	Ser ²⁶⁰ Asp ²⁶² Asp ³⁵⁴ Ser ³⁵⁷ Thr ³⁵⁸ Glu ⁴³¹	Thr ²⁸² Ser ²⁸⁴ Glu ³⁷⁶ Val ³⁷⁹ Val ³⁸⁰ Asp ⁴⁵³

Примечание. Нумерация аминокислотных остатков С-домена соответствует нумерации тестикулярного АПФ.

1.3. Субстратная специфичность доменов.

АПФ в основном отщепляет С-концевые дипептиды от олигопептидов различного строения, имеющих свободную карбоксильную группу [1-3]. Классические субстраты АПФ – АІ и Бк – пептиды, участвующие в регуляции сосудистого тонуса, водно-солевого обмена и кровяного давления. Кроме того, физиологические функции АПФ не ограничиваются его ролью в регуляции сердечно-сосудистой системы. Он участвует в метаболизме ряда биологически активных пептидов (табл. 2). Причем в некоторых случаях он может гидролизовать и пептиды с заблокированным С-концом и отщеплять не только дипептиды, но и трипептиды. Однако подобное действие фермента строго ограничено особенностями структуры самого пептида [8, 26, 27]. Относительно недавно была установлена новая физиологическая роль АПФ – регуляция гематопоза. Был обнаружен еще один его физиологический субстрат. Показано, что АПФ регулирует концентрацию не только АІ и Бк, но еще и пептида горалатида (N-AcSer-Asp-Lys-Pro - AcSDKP), который является природным отрицательным регулятором гематопоза [28, 29].

Таблица 2. Гидролиз природных субстратов доменами АПФ.

Субстрат	Структура и место гидролиза	Относительная скорость гидролиза	
		N-домен	C-домен
ГОРАЛАТИД	↓ AcSD-KP	50	1
ЛЮЛИБЕРИН	↓ PyrEHW-YGLRPG-NH ₂	30	1
	↓ PyrEHWSYGL-RPG-NH ₂	≈	
ЭНКЕФАЛИН-ГЫПТАПЕПТИД	↓ YGGFM-RF	5	1
ВЕЩЕСТВО Р	↓ RPKPQQFF-GLM-NH ₂	1	4
	↓ RPKPQQFFG-LM-NH ₂	1	2
АНГИОТЕНЗИН I	↓ DRVYIHPF-HL	1	3
	↓ ZF-HL	≈	
	↓ BzG-HL	1	10
БРАДИКИНИН	↓ RPPGFSP-FR	≈	
	↓ RPPGF-SP	≈	

Присутствие двух функционально активных центров в молекуле АПФ привело к предположению о существовании природных субстратов, которые специфично расщепляются каждым из доменов. Активные центры обоих доменов способны гидролизовать одни и те же пептиды, но с разной скоростью [8, 30]. Так, AI и Bk гидролизуются обоими доменами, но если Bk гидролизуется обоими доменами примерно с одинаковой скоростью (табл. 2), то AI *in vitro* гидролизуетс С-доменом в 3 раза быстрее. Горалатид, напротив, является специфичным природным субстратом N-домена. Он расщепляется активным центром N-домена в 50 раз быстрее, чем активным центром С-домена.

Следует отметить, что N-домен отличается необычной для АПФ эндопептидазной активностью – он отщепляет N-концевой трипептид регуляторного пептида люлиберина (гонадотропин-релизинг гормон, GnRH или LHRH) – Pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Cly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ [31]. Моноклональные антитела, ингибирующие активность N-домена, тормозили гидролиз люлиберина нативным полноразмерным ферментом более чем на 90% [32]. Отщепление же С-концевого трипептида от люлиберина происходит под действием обоих доменов. Это подтверждает, что существуют физиологически важные различия между активными центрами доменов и различная субстратная специфичность несмотря на высокую степень гомологии. Недавно была предложена модель активного центра каждого из доменов в комплексе с этим пептидом [33]. Предпочтение в отщеплении N-концевого трипептида можно объяснить дополнительным электростатическим взаимодействием N-домена с субстратом, который заходит в щель активного центра N-концом. Предполагается, что блокированный N-концевой дипептид люлиберина взаимодействует с N-доменом сильнее, чем его блокированный С-концевой дипептид. Превращение семичленного предшественника энкефалина Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Met⁵-Arg⁶-Phe⁷ в пентапептид Met₅-энкефалин осуществляется также преимущественно N-доменом [34]. Весьма вероятно, что и *in vivo* в этом превращении N-домен играет преимущественную роль. В то же время пятичленные Leu₅- и Met₅-энкефалины расщепляются быстрее С-доменом.

В пользу физиологической значимости доменов свидетельствуют полученные к настоящему времени данные об обнаружении природных субстратов, специфичных для N-домена, и о разном взаимодействии ингибиторов АПФ с доменами.

1.4. Роль С-домена.

С-домен является основным местом превращения ангиотензина в организме, т.е. именно он участвует в регуляции кровяного давления [35]. Специфичные для С-домена ингибиторы в низких концентрациях полностью тормозили образование АП мембрано-связанным ферментом. Торможение N-домена его специфичным ингибитором RXP407 не блокировало превращение AI в АП находящимся на мембране АПФ и не влияло на уровень кровяного давления [35, 36]. Это было подтверждено на мутантных мышах, у которых N-домен был неактивен в результате точечной мутации (His³⁹⁵Lys и His³⁹⁹Lys) в его активном центре [37, 38], в то время как С-домен полностью сохранял свою активность. Присутствие активного С-домена было достаточно для того, чтобы поддерживать функцию ренин-ангиотензиновой системы (РАС). По уровню кровяного давления, содержанию АП в крови и функции почек эти животные не отличались от здоровых. У них был нормальный уровень АП в крови. Об отсутствии активности N-домена свидетельствовало то, что уровень специфичного для N-домена субстрата – гематопозитического пептида горалатида был повышен и в плазме и в моче вследствие того, что гидролиз его был резко снижен и составлял всего лишь 3%.

Несмотря на близкие энзиматические свойства, соматический и тестикулярный АПФ не являются взаимозаменяемыми по физиологическим функциям [39]. Для репродуктивной функции важно присутствие тестикулярного АПФ. Отсутствие соматического АПФ не нарушало репродуктивную функцию самцов.

Самцы крыс, у которых отсутствовал только соматический АПФ, но сохранялся тестикулярный фермент, сохраняли нормальную репродуктивную функцию. Это указывало на то, что соматический АПФ у самцов не является существенным для их способности воспроизводить потомство.

1.5. Роль N-домена.

Роль N-домена, судя по всему, менее связана с функцией РАС и больше связана с обменом биологически активных пептидов, которые имеют высокое сродство к этому домену. По крайней мере четыре физиологически важных пептида гидролизуются преимущественно или исключительно N-доменом. К ним относятся: горалатид (N-AcSer-Asp-Lys-Pro), отрицательный регулятор гемопоэза [8, 28, 29, 40]; люлиберин Pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Cly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (отщепление N-концевого трипептида Glp¹-His²-Trp³) [31, 32]; ангиотензин 1-7 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro), антагонист АП [41]; и бета-амилоид (Aβ), накапливающийся при болезни Альцгеймера [42, 43].

Горалатид тормозит пролиферацию гематопозитических стволовых клеток, а также участвует в гомеостазе клеточного роста различных типов клеток. Он блокирует переход нормальных покоящихся стволовых клеток и ранних прогениторов в S-фазу из G1 фазы клеточного цикла. Этот пептид секретируется костным мозгом, обнаруживается в плазме, циркулирующих мононуклеарных клетках и в тех же тканях, что и АПФ [44, 45].

Действие АПФ на горалатид полностью определяется N-доменом, что подтверждается торможением его гидролиза моноклональными антителами специфичными к N-домену.

Торможение активности АПФ введением его ингибиторов здоровым людям приводило к повышению концентрации горалатида в плазме в 5-6 раз, в моче – в 40 раз [46, 47]. Разрушая AcSDKP, АПФ поддерживает его локальную концентрацию на низком уровне. Предполагается, что при тех концентрациях, в которых пептид присутствует в плазме (3 нМ), он может регулировать пролиферацию клеток. В итоге АПФ может быть вовлечен в процесс регуляции пролиферации стволовых клеток (регуляции гемопоэза).

Горалатид рассматривается как важный эндогенный регулятор пролиферации фибробластов и синтеза коллагена в сердце [48]. Ограничивая пролиферацию фибробластов и продукцию коллагена, он влияет на процесс развития фиброза у больных гипертензией. Он предотвращает пролиферацию клеток и повышенное отложение коллагена в сердце и почках, т.е. предотвращает фиброз сердечной и почечной ткани. Поскольку ингибиторы АПФ повышают содержание горалатида в плазме и тканях и вызывают снижение фиброза сердца и почек, а также фиброза печени, предполагается, что в кардиопротективном антифиброзном эффекте ингибиторов АПФ (при гипертензии) участвует горалатид [49].

Кроме того, была отмечена уникальная способность горалатида защищать нормальные гематопозитические стволовые клетки и их предшественники от токсических последствий действия противоопухолевых лекарств и облучения, повышать их выживаемость [50]. Это обусловлено тем, что горалатид блокируя клеточный цикл на ранней стадии, поддерживает примитивные гематопозитические клетки в состоянии покоя, что и предотвращает их истощение.

Чтобы защитить горалатид в этой ситуации от быстрого разрушения АПФ, активность которого повышается при химиотерапии, были синтезированы его аналоги, резистентные к действию АПФ. Защитный эффект таких соединений должен был быть сильнее, чем природного пептида. Как и предполагалось, концентрация в плазме такого аналога с блокированной карбоксильной группой (AcSDKP-NH₂) была выше, чем нативного горалатида [51].

A-(1-7), являясь субстратом N-домена АПФ, в то же время тормозит активность С-домена [41]. Он ограничивает прессорное и пролиферативное действие АП. Как антагонист АП, A-(1-7) вызывает расширение кровеносных сосудов, вследствие увеличения продукции сосудорасширяющих простагландинов и оксида азота в

ДОМЕНЫ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

дозах, эквивалентных сокращающему действию АП, что может быть следствием потенцирования действия Бк [52, 53]. Время полужизни А-(1-7) в циркуляции нормотензивных и гипертензивных крыс в четыре раза меньше, чем АП [54]. Преимущественное расщепление этого пептида осуществляется в организме за счёт АПФ, который превращает его в А-(1-5) [55]. Введение различных ингибиторов АПФ существенно (в 5–25 раз) повышает уровень А-(1-7) в крови [56].

Концентрация этого пептида в крови и тканях увеличивается как при увеличении содержания А I при торможении активности АПФ, так и при увеличении содержания АП при блокировании его рецепторов [57]. Превращение А I в А-(1-7) происходит в циркуляции и в эндотелии (рис. 4) в основном под действием неприлизина (нейтральная эндопептидаза, КФ 3.4.24.11) и тормозится его ингибитором тиорфаном, а также под действием пролилэндопептидазы. Образование А-(1-7) из АП происходит в результате отщепления С-концевого остатка Phe⁸ гомологом АПФ – пептидазой АПФ2 [58] и тормозится его специфичным ингибитором С 16 [59]. В превращении АП в А-(1-7) участвуют также пролилкарбоксипептидаза и пролилэндопептидаза [60].

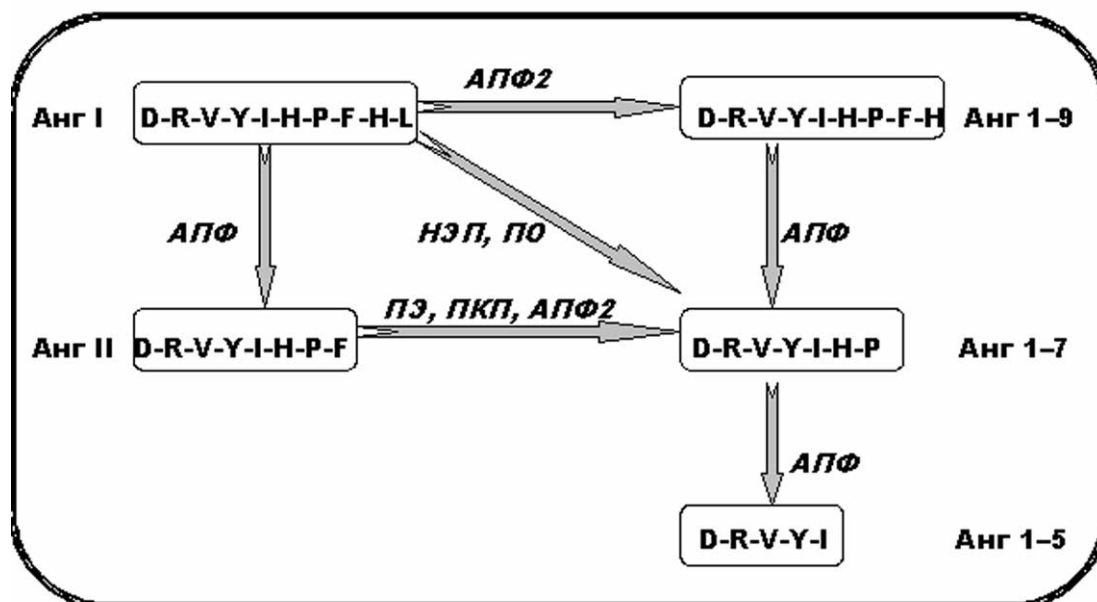


Рисунок 4.

Участие различных протеиназ в образовании ангиотензина 1-7.

АПФ-ангиотензин превращающий фермент; АПФ-2 - гомолог ангиотензин превращающего фермента; НЭП - нейтральная эндопептидаза; ПО - пролилолигопептидаза;

ПЭ - пролилэндопептидаза; ПКП - пролилкарбоксипептидаза.

Недавно было обнаружено, что N-домен гидролизует пептидный бета-амилоид (Аβ), накапливающийся при болезни Альцгеймера. При этой болезни наблюдается агрегация Аβ, состоящего из 40-42 аминокислотных остатков, и его отложение в виде фибрилл, образующих так называемые “сенильные бляшки” особенно в областях мозга, ответственных за процессы обучения и памяти. Это заболевание характеризуется прогрессирующим снижением интеллекта, расстройством памяти и изменением поведения [61]. Гидролизуя Аβ, N-домен предотвращает его агрегацию и цитотоксичность [43, 62]. Основным местом расщепления Аβ(1-40) рассматривалась связь между седьмым и восьмым аминокислотными остатками [43, 63]. В то же время мы обнаружили, что цинк-связывающий домен Аβ (остатки 1-16) расщепляется N-доменом АПФ только в положении между Arg⁵-His⁶ [42].

В настоящее время синтезировано большое количество ингибиторов АПФ, отличающихся высоким сродством к ферменту. Все они построены по одной и той же модели на основе дипептида Ala-Pro, ответственного за специфическое взаимодействие ингибитора с активным центром АПФ, но отличаются природой Zn-связывающего лиганда и другими группировками (табл. 3).

Активные центры обоих доменов эффективно взаимодействуют с конкурентными ингибиторами АПФ. Используемые в клинике специфичные ингибиторы АПФ тормозят активность обоих доменов [69], несколько различаясь по эффективности (табл. 4), что обусловлено в основном различием в скорости диссоциации. В зависимости от преимущественного взаимодействия ингибиторов с одним из двух активных центров может варьировать их биологический эффект при применении их как лекарств. В свете этого, возможность получения ингибиторов, специфичных для активного центра каждого из доменов, имеет существенное значение.

Недавно были синтезированы новые ингибиторы (рис. 5), способные различать активные центры доменов: RXP 407 [70] и RXPA 380 [71].



Структура селективных ингибиторов N- и С-доменов АПФ.

ДОМЕНЫ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

Таблица 3. Структура синтетических ингибиторов АПФ, применяемых в клинике.

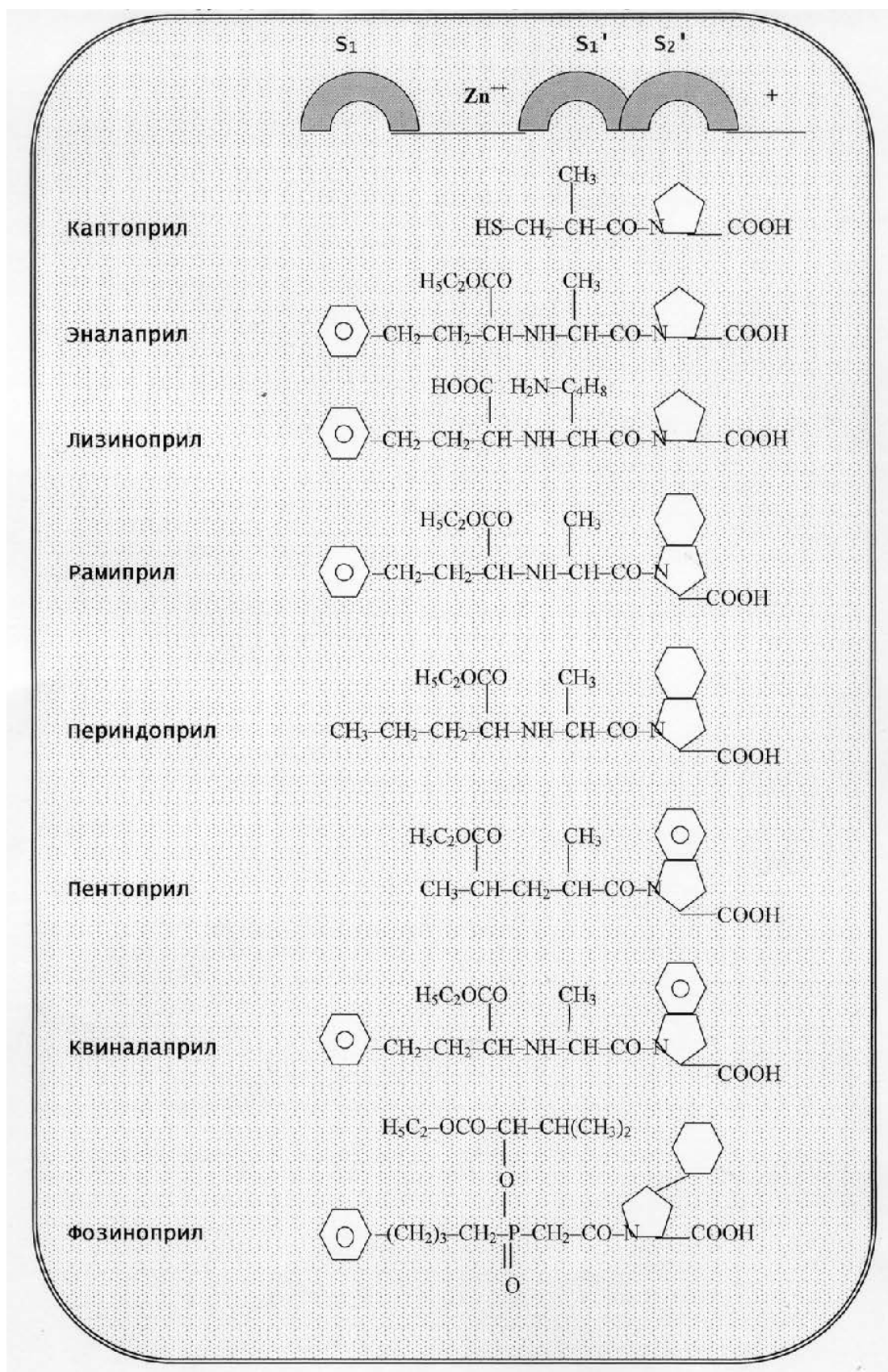


Таблица 4. Торможение активности доменов АПФ ингибиторами, применяемыми в клинике.

Ингибитор	$K_i \cdot 10^{-10} \text{M}$	
	N-домен	C-домен
Каптоприл	8,9	14
Эналаприлат	26	6,3
Лизиноприл	44	2.4
Трандолаприлат	3,1	0,29

2.1. Селективный ингибитор N-домена RXP 407.

Специфичный к N-домену высокоэффективный ингибитор фосфиновый пептид RXP 407 (Ac-Asp-(L)Phepsi(PO₂-CH₂)(L)-Ala-Ala-NH₂) (K_i - 12 нМ) имеет константу диссоциации для N-домена на 3 порядка ниже, чем для C-домена [70]. Его структура отличается от структуры классических ингибиторов АПФ. Селективный ингибитор активного центра N-домена устойчив в организме. При введении в организм он вызывал существенное (в 4-6 раз) увеличение в плазме концентрации горалатида, физиологического субстрата N-домена АПФ, т.е. вызывал торможение активности N-домена плазмы, но не тормозил активность C-домена, не влияя при этом на метаболизм AI *in vivo* [36], не влиял на повышение кровяного давления в ответ на внутривенное введение AI мышам. Таким образом, RXP 407 является первым ингибитором АПФ, который может избирательно контролировать метаболизм AcSDKP, повышая его концентрацию в плазме, не влияя при этом на уровень кровяного давления, в противоположность, например, лизиноприлу, который влияет на метаболизм и горалатида и AI. RXP 407 может оказаться родоначальником нового поколения ингибиторов АПФ, способных блокировать только определенные функции фермента.

2.2. Селективные ингибиторы C-домена.

Первый высокоэффективный селективный ингибитор C-домена RXPA 380 (Cbz-PheΨ[PO₂CH]Pro-Trp-OH) (рис. 4) был синтезирован позднее [71]. При введении в организм RXPA 380 тормозит превращение AI в API и не влияет на гидролиз субстрата N-домена AcSDKP [72]. Селективность ингибитора обусловлена различием в структуре активных центров доменов [73], что объясняется не столько предпочтительным связыванием с C-доменом, сколько весьма слабой связью с N-доменом (K_i – 3 нМ и 10 мкМ соответственно).

Недавно была получена кристаллическая структура тестикулярного АПФ вместе с RXPA 380 [73]. Молекула RXPA 380 занимает большее пространство в активном центре домена, чем другие ранее исследованные ингибиторы. Решающая роль во взаимодействии ингибитора с доменами принадлежит остатку триптофана, находящемуся в положении P₂' ингибитора. Из двенадцати аминокислотных остатков, которые окружают боковую цепь триптофана ингибитора (RXPA 380) в C-домене в положении S₂', в N-домене отличаются пять остатков. Благодаря замене объемных гидрофобных остатков Phe⁹⁶⁷, Val⁹⁵⁵ и Val⁹⁵⁶ в C-домене на меньшие по размеру и гидрофильные остатки Tyr³⁶⁹, Ser³⁵⁷ и Thr³⁵⁸ в N-домене снижается гидрофобное взаимодействие, что приводит к снижению сродства к N-домену [73].

ДОМЕНЫ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

Другой, более слабый ингибитор – keto-ACE (5-S-5-benzamido-4-охо-6-phenylhexanoyl-L-Pro) - тормозит С-домен (K_i - 1,8 мкМ) сильнее, чем N-домен, примерно в 25 раз [41]. Введение остатка триптофана в положение P_2' привело к существенному увеличению взаимодействия с С-доменом (глубокий S_2' карман) – селективность ингибитора увеличилась с 25 до 245 раз [74, 75]. Кристаллизация тестикулярного АПФ с двумя новыми кетометиленовыми ингибиторами – (5S)-5-[(N-benzoyl)amino]-4-охо-6-phenylhexanoyl-L-Trp и (5S)-5-[(N-benzoyl)amino]-4-охо-6-phenylhexanoyl-L-Phe, кетоновые группы которых связываются с ионом цинка, позволила идентифицировать аминокислотные остатки активного центра, определяющие селективность этих ингибиторов [76].

Субстрат N-домена A-(1-7) является ингибитором для С-домена (K_i - 0,13 мкМ) при более низкой концентрации, чем для взаимодействия с N-доменом. Он тормозит гидролиз AI С-доменом [41]. Также было показано, что A-(1-7) существенно тормозит разрушение Бк, повышая его уровень [77].

К достаточно сильным селективным ингибиторам С-домена [78] относятся некоторые девяти и одиннадцатичленные ингибиторы АПФ, так называемые брадикинин-потенцирующие пептиды (БПП), обнаруженные в яде змеи [79]. Наиболее селективным ингибитором среди них является пептид pGlu-Gly-Leu-Pro-ProArg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro (K_i для С-домена – 30 нМ, для N-домена - 8 мкМ), что объясняется очень низким сродством пептида к N-домену. Снижение сродства пептида к N-домену, по-видимому, обусловлено остатком лизина в 4-м положении с С-конца (табл. 5).

Таблица 5. Торможение активности доменов АПФ селективными ингибиторами.

Ингибитор	K_i нмоль/л	
	N-домен	С-домен
RXP 407	7	7500
RXP A380	10000	3
Кето-АПФ	45 200	1800
A-(1-7)	3400	130
БПП	8000	30

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Несмотря на высокую степень гомологии первичной структуры N- и С-доменов, между активными центрами обоих доменов существуют структурные и функциональные различия. Они отличаются по профилю активации ионами хлора, по скорости гидролиза пептидов и по степени торможения различными ингибиторами. N-домен отличается необычной для АПФ эндопептидазной активностью: отщепляет N-концевые трипептид от регуляторного пептида люлиберина и пентапептид от бета-амилоида, накапливающегося при болезни Альцгеймера.

В организме обнаружены низкомолекулярные активные изоформы АПФ, состоящие только из одного домена. Свободный N-домен был обнаружен в биологических жидкостях человека и в различных тканях нормотензивных и

гипертензивных крыс. Форма АПФ, соответствующая С-домену, синтезируется в семенниках человека и млекопитающих.

Основным местом превращения ангиотензина в организме является С-домен, который участвует в регуляции кровяного давления. Роль N-домена менее связана с функцией ренин-ангиотензиновой системы, он участвует в метаболизме ряда биологически активных пептидов, которые имеют к нему высокое сродство. К ним относятся гемопоэтический пептид горалатид, отрицательный регулятор гемопоэза, люлиберин (отщепление N-концевого трипептида), ангиотензин 1-7 (антагонист АП), и бета-амилоид. Предполагается, что А 1-7 может быть ангиогенным фактором при заживлении ран, при хронических воспалительных процессах и при росте и развитии опухолей. Гидролизую бета-амилоид, N-домен предотвращает его агрегацию и цитотоксичность, наблюдаемые при болезни Альцгеймера.

Полученные недавно трехмерные структуры обоих доменов в целом довольно схожи, однако имеются четкие различия. Кристаллические структуры доменов, содержащие специфичные ингибиторы, способствовали выяснению молекулярной природы различий доменов. Получение кристаллических структур доменов АПФ дало возможность определить взаимодействие активного центра с ингибиторами и субстратами АПФ и открыло перспективу создания домен-селективных ингибиторов нового поколения, имеющих сродство к одному из двух доменов и специфичный фармакологический профиль. Селективные по отношению к N-домену ингибиторы АПФ могут использоваться в контроле метаболизма горалатида не влияя на уровень кровяного давления. Это может иметь значение для защиты гематопоэтических клеток при химиотерапии рака, поскольку была отмечена уникальная способность горалатида защищать нормальные гематопоэтические стволовые клетки и их предшественники от токсических последствий противоопухолевых лекарств и облучения, повышать их выживаемость.

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. *Елисеева Ю.Е.* (1993) Успехи биол. химии, **33**, 106-129.
4. *Halkin A., Keren G.* (2002) Am. J. Med., **112**, 126-134.
5. *Wong J., Patel R.A., Kowey P.R.* (2004) Prog. Cardiovasc. Dis., **47**, 116-130.
6. *Dell'Italia L.J., Rocic P., Lucchesi P.A.* (2002) Current Problems in Cardiology, **27**, 6-36.
7. *Zaman M.A., Oparil S., Calhoun D.A.* (2002) Nature Rew. Drug Discov., **1**, 621-636.
8. *Елисеева Ю.Е.* (1998) Биоорг. хим., **24**, 232-240.
9. *Hooper N.M.* (1991) Int. J. Biochem., **23**, 641-647.
10. *Esther C.R., Marino E.M., Howard T.E., Machaud S., Corvol P., Capecchi M.R., Bernstein K.E.* (1997) J. Clin. Invest., **99**, 2375-2385.
11. *Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., Allegrini J., John M., Tregear G., Corvol P.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 9386-9390.
12. *Ehlers M.R.W., Fox E.A., Strydom D.J., Riordan J.F.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 7741-7745.
13. *Hubert C., Houot A.-M., Corvol P., Soubrier F.* (1991) J. Biol. Chem., **266**, 15377-15383.
14. *Deddish P.A., Wang L., Jackman H.L., Michel B., Wang J., Skidgel R.A., Erdös E.G.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 7807-7811.
15. *Casarini D.E., Plavink F.L., Zanella M.T., Marson O., Krieger J.E., Hirata I.Y., Stella R.C.R.* (2001) Int. J. Biochem. Cell. Biol., **33**, 75-85.

16. *Marques G.D., Quinto B.M., Plavinik F.L., Krieger J.E., Marson O., Casarini D.E.* (2003) *Hypertension*, **42**, 693-701.
17. *Ronchi F.A., Andrade M.C.C., Carmona A.K., Krieger J.E., Casarini D.E.* (2005) *J. Hypertension*, **23**, 1869-1878.
18. *Andrade C., Di Marco G.S., Teixeira V.P.C., Mortara R.A., Sabatini R.A., Pesquero J.B., Boim M.A., Carmona A.K., Schor N., Casarini D.E.* (2006) *Am J. Physiol. Renal. Physiol.*, **290**, F364-F375.
19. *Hooper N.M.* (1996) in: *Zinc Metalloproteases in Health and Disease* (Hooper N.M., ed.), Taylor & Francis, London, pp. 1-21.
20. *Jaspard E., Wei L., Alhenc-Gelas F.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 9496-9503.
21. *Williams T.A., Soubrier F., Corvol P.* (1996) in: *Zinc Metalloproteases in Health and Disease* (Hooper N.M., Ed.) Taylor and Francis, London, pp. 83-104.
22. *Wei L., Alhenc-Gelas F., Corvol P., Clauser E.* (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 9002-9008.
23. *Natesh R., Schwager S.L., Sturrock E.D., Acharya K.R.* (2003) *Nature*, **421**, 551-554.
24. *Corradi H.R., Schwager S.L., Nchinda A.T., Sturrock E.D., Acharya K.R.* (2006) *J. Mol. Biol.*, **357**, 964-974.
25. *Fernandez J.H., Hayashi M.A., Camargo A.C., Neshich G.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 219-226.
26. *Skidgel R.A., Erdos E.G.* (1987) *Clin. Exp. Hypert., A.*, **9**, 243-259.
27. *Williams T.A., Soubrier F., Corvol P.* (1996) in: *Zinc Metalloproteases in Health and Disease* (Hooper N.M., Ed.) Taylor and Francis, London, pp. 83-104.
28. *Rousseau A., Michaud A., Chauvet M.-T., Lenfant M., Corvol P.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 3656-3661.
29. *Azizi M., Rousseau A., Ezan E., Guyene T.T., Michelet S., Grognet J.M., Lenfant M., Corvol P., Menard J.* (1996) *J. Clin. Invest.*, **97**, 839-844.
30. *Wei L., Alhenc-Gelas F., Corvol P., Clauser E.* (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 9002-9008.
31. *Jaspard E., Wei L., Alhenc-Gelas F.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 9496-9503.
32. *Danilov S., Jaspard E., Churakova T., Towbin H., Savoie F., Wei L., Alhenc-Gelas F.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26806-26814.
33. *Papakyriakou A., Spyroulias G.A., Sturrock E.D., Manessi-Zoupa E., Cordopatis P.* (2007) *Biochemistry*, **46**, 8753-8765.
34. *Deddish P.A., Jackman H.L., Skidgel R.A., Erdos E.G.* (1997) *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 1459-1463.
35. *van Esch J.H., Tom B., Dive V., Batenburg W.W., Georgiadis D., Yiotakis A., van Gool J.M., de Bruijn R.J., de Vries R., Danser A.H.* (2005) *Hypertension*, **45**, 120-125.
36. *Junot C., Gonzales M.-F., Ezan E., Cotton J., Vazeux G., Michaud A., Azizi M., Vassiliou S., Yiotakis A., Corvol P., Dive V.* (2001) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 606-611.
37. *Fuchs S., Xiao H.D., Adams J.W., Frenzel K., Keshelava G., Capecchi M.R., Corvol P., Bernstein K.E.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 15946-15953.
38. *Bernstein K.E.* (2006) *Hypertension*, **47**, 509-514.
39. *Hagaman J.R., Moyer J.S., Bachman E.S., Sibony M., Magyar P.L., Welch J.E., Smithies O., Krege J.H., O'Brien D.A.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2552-2557.
40. *Rieger K.J., Saezservent N., Papet M.P., Wdzieczakbakala J., Morgat J.L., Thierry J., Voelter W., Lenfant M.* (1993) *Biochem. J.*, **296**, 373-378.
41. *Deddish P.A., Marcic B., Jackman H.L., Wang H.Z., Skidgel R.A., Erdös E.G.* (1998) *Hypertension*, **31**, 912-917.
42. *Toropygin I.Y., Kugaevskaya E.V., Mirgorodskaya O.A., Elisseeva Y.E., Kozmin Y.P., Popov I.A., Nikolaev E.N., Makarov A.A., Kozin S.A.* (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 231-239.

43. Oba R., Igarashi A., Kamata M., Nagata K., Takano S., Nakagawa H. (2005) Eur. J. Neurosci., **21**, 733-740.
44. Pradelles P., Frobert Y., Creminon C., Massé A., Frindel E. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., **170**, 986-993.
45. Pradelles P., Frobert Y., Creminon C., Ivonine H., Frindel E. (1991) FEBS. Lett. **289**, 171-175.
46. Azizi M., Ezan E., Nicolet L., Grognet J.M., Menard J. (1997) Hypertension, **30**, 1015-1019
47. Azizi M., Ezan E., Reny J.-L., Wdzieczak-Bakala J., Gerineau V., Menard J. (1999) Hypertension, **33**, 879-886.
48. Rhaleb N.E., Peng H., Harding P., Tayeh M., LaPointe M.C., Carretero O.A. (2001) Hypertension, **37**, 827-832.
49. Peng H., Carretero O.A., Vuljaj N., Liao T.D., Motivala A., Peterson E.L., Rhaleb N.E. (2005) Circulation, **112**, 2436-2445.
50. Massé A., Ramirez L.H., Bindoula G., Grillon C., Wdzieczak-Bakala J., Raddassi K., Deschamps de Paillette E., Mencia-Huerta J.M., Koscielny S., Potier P., Sainteny F., Carde P. (1998) Blood, **91**, 441-449.
51. Gaudron S., Adeline M.-T., Potier P., Thierry J. (1997) J. Med. Chem., **40**, 3963-3968.
52. Brosnihan K.B., Li P., Tallant E.A., Ferrario C.M. (1998) Biol. Res., **31**, 227-234.
53. Ueda S., Masumori-Maemoto S., Wada A., Ishii M., Brosnihan K.B., Umemura S. (2001) Journal of Hypertension, **19**, 2001-2009.
54. Iyer S.N., Chappell M.C. Brosnihan K.B., Ferrario C.M. (1998) J. Cardiovasc. Pharmacol., **31**, 464-469.
55. Yamada K., Iyer S.N., Chappell M.C., Ganten D., Ferrario C.M. (1998) Hypertension, **32**, 496-502.
56. Luque M., Martin P., Martell N., Fernandez C., Brosnihan K.B., Ferrario C.M. (1996) J. Hypertens., **14**, 799-805.
57. Ferrario C.M., Jessup J., Chappell M.C., Averill D.B., Brosnihan K.B., Tallant E.A., Diz D.I., Gallagher P.E. (2005) Circulation, **111**, 2605-2610.
58. Lambert D.W., Hooper N.M., Turner A.J. (2008) Biochem Pharmacol., **75**, 781-786.
59. Ferrario C.M., Chappell M.C. (2004) Cell. Mol. Life. Sci., **61**, 2720-2727.
60. Ferrario C.M., Chappell M.C., Tallant E.A., Brosnihan K.B., Diz D.I. (1997) Hypertension, **30**, 535-541.
61. Selkoe D.J. (1991) Neuron, **6**, 487-498.
62. Hemming M.L., Selkoe D.J. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 37644-37650.
63. Hu J., Igarashi A., Kamata M., and Nakagawa H. (2001) J. Biol.Chem., **276**, 47863-47868.
64. Kuo Y.-M., Kokjohn T.A., Watson M.D., Woods A.S., Cotter R.J., Sue L.I., Emmerling M.R., Beach T.G., Roher A.E. (2000) Am. J. Pathol., **156**, 797-805.
65. Miners J.S., Ashby E., Van Helmond Z., Chalmers K.A., Palmer L.E., Love S., Kehoe P.G. (2008) Neuropathol. Appl. Neurobiol., **34**, 181-193.
66. Lehmann D.J., Cortina-Borja M., Warden D.R., Smith A.D., Slegers K., Prince J.A., van Duijn C.M., Kehoe P.G. (2005) Am. J. Epidemiol., **162**, 305-317.
67. Кудинова Н.В., Березов Т.Т., Кудинов А.Р. (1999) Биохимия, **64**, 752-757.
68. Rozga M., Kloniecki M., Jablonowska A., Dandlez M., Bal W. (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun., **364**, 714-718.
69. Wei L., Clauser E., Alhenc-Gelas F., Corvol P. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 13398-13405.
70. Dive V., Cotton J., Yiotakis A., Michaud A., Vassiliou S., Jiracek J., Vazeux G., Chauvet M.-T., Cuniasse P., Corvol P. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 4330-4335.
71. Georgiadis D., Cuniasse P., Cotton J., Yiotakis A., Dive V. (2004) Biochemistry, **43**, 8048-8054.
72. Georgiadis D., Beau F., Czarny B., Cotton J., Yiotakis A., Dive V. (2003) Circ. Res., **93**, 148-154.

ДОМЕНЫ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

73. Corradi H.R., Chitapi I., Sewell B.T., Georgiadis D., Dive V., Sturrock E.D., Acharya K.R. (2007) *Biochemistry*, **46**, 5473-5478.
74. Nchinda A.T., Chibale K., Redelinguys P., Sturrock E.D. (2006) *Bioorganic & Med. Chem. Lett.*, **16**, 4612-4615.
75. Redelinguys P., Nchinda A.T., Chibale K., Sturrock E.D. (2006) *Biol. Chem.*, **387**, 461-466.
76. Watermeyer J.M., Kruger W.L., O'Neill H.G., Sewell B.T., Sturrock E.D. (2008) *Biochemistry*, **47**, 5942-5950.
77. Li P., Chappell M.C., Ferrario C.M., Brosnihan K.B. (1997) *Hypertension*, **29**, 394-400.
78. Cotton J., Hayashi M.A., Cuniasse P., Vazeux G., Ianzer D., Camargo A.C.M., Dive V. (2002) *Biochemistry*, **41**, 6065-6071.
79. Ondetti M.A., Williams N.J., Sabo E.F., Pluscec J., Weaver E.R., Kocy O. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4033-4039.

Поступила: 26. 12. 2007.

STRUCTURE AND PHYSIOLOGIC SIGNIFICANCE OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME DOMAINS

Yu.E. Elisseeva, E.V. Kugaevskaya

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119992 Russia; tel.: (499) 246 50 72; e-mail: Yulia.Eliseeva@ibmc.msk.ru

Somatic angiotensin converting enzyme (ACE) consists of two homologous catalytic domains (N- and C-domain), each of which bears an active site exhibiting different biochemical properties. The ACE isoforms consisted of one domain were also detected in mammals. Substantial progress in ACE domain research was achieved during the last years, when crystal their structures were determined. The crystal structures of domains in complex with diverse potent ACE inhibitors provided new insights into structure-based differences of the domain active sites.

Physiological functions of ACE are not limited by regulation of the cardiovascular system. Recent evidence suggests that the ACE domains may be also involved into control distinct physiological functions. The C-terminal catalytic domain, playing important role in regulation of blood pressure, catalyzes angiotensin I cleavage *in vivo*. The N-domain contributes to processing of other bioactive peptides for which it exhibits high affinity. Domain-selective inhibitors able to block selectively either the N- or C-domain of ACE have been developed.

Key words: angiotensin converting enzyme; domains; crystal structure; domain-specific substrates; domain-selective inhibitors.