

ОБЗОРЫ

УДК 577.152.341*51

©Коллектив авторов

АНГИОТЕНЗИН ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ: АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ДОМЕНОВ, РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ ПЕПТИДА БЕТА-АМИЛОИДА И ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ✓

Е.В. Кугаевская, О.С. Тимошенко, Н.И. Соловьева*

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

Ангиотензин превращающий фермент (АПФ, КФ 3.4.15.1) был обнаружен и охарактеризован в лаборатории биохимии и химической патологии белков под руководством академика В.Н. Ореховича, где впервые была расшифрована его физиологическая функция, связанная с ключевой ролью в регуляции ренин-ангиотензиновой (РАС) и калликреин-кининовой систем, контролирующих в организме кровообращение и гомеостаз. Дальнейшие исследования касались поиска структурных различий между двумя высокгомологичными доменами (N- и С-доменами) соматического АПФ человека (сАПФ), который базировался на сравнительном анализе экспериментально обнаруженных нами антигенных детерминант (или В-эпитопов) обоих доменов. Выявленные эпитопы были соотнесены с вариабельными и консервативными областями АПФ, а также функционально важными участками молекулы. Обнаружены существенные различия в расположении эпитопов в N- и С- доменах АПФ, что согласуется с предположением о существовании структурных различий между доменами фермента.

Исследована роль доменов АПФ в метаболизме пептида бета-амилоида (Аβ) – главного компонента сенильных бляшек, обнаруживаемых в мозге пациентов при болезни Альцгеймера (БА). Изучено влияние пост-трансляционных модификаций в Аβ на его гидролиз АПФ. Показано, что только N-домен АПФ участвует в гидролизе Аβ, расщепляя пептидную связь R⁵–H⁶. С-домен не гидролизует Аβ. Замещение остатка D7 на isoD в Аβ, которое наблюдается при старении организма и при БА, не снижает сродство пептида к N-домену АПФ, а наоборот, повышает его. Судя по нашим данным, роль АПФ в метаболизме Аβ становится более существенной именно при развитии БА.

РАС вовлечена в злокачественную трансформацию и опухолевую прогрессию. В различных злокачественных опухолях человека экспрессированы основные компоненты РАС, такие как АПФ и рецепторы ангиотензина II типа 1 (AT1R). Нами обнаружено существенное повышение уровня активности АПФ в опухолевой ткани при плоскоклеточной карциноме шейки матки. Мы предполагаем, что повышение активности АПФ может стать маркером, прогнозирующим ухудшение клинического исхода заболевания.

Ключевые слова: ангиотензин превращающий фермент, антигенные детерминанты, болезнь Альцгеймера, пептид бета-амилоид, опухолевая прогрессия, плоскоклеточная карцинома шейки матки.

DOI: 10.18097/PBMC20156103301

ВВЕДЕНИЕ

Ангиотензин превращающий фермент (АПФ, КФ 3.4.15.1) был обнаружен и охарактеризован в лаборатории биохимии и химической патологии белков под руководством академика В.Н. Ореховича, где впервые была расшифрована его физиологическая

функция, связанная с ключевой ролью в регуляции ренин-ангиотензиновой (РАС) и калликреин-кининовой систем, контролирующих в организме кровообращение и гомеостаз [1, 2]. Классическими природными субстратами АПФ являются ангиотензин I и брадикинин, однако в последнее время были обнаружены новые субстраты АПФ, что открывает

* - адресат для переписки

✓ Обзор заказан редколлегией к юбилею журнала и ИБМХ

потенциальную роль фермента в ряде других физиологических и патофизиологических процессов. Помимо регуляции артериального давления АПФ вовлечён в обмен нейропептидов, репродуктивные процессы, защитные и иммунные реакции организма. Основная масса синтезируемого в организме АПФ находится в мембраносвязанном состоянии. Почти вся молекула АПФ локализована на наружной поверхности эндотелиальных и эпителиальных клеток (находящихся в местах интенсивного всасывания или выделения жидкости и солей), нейроэпителиальных клеток, на нервных окончаниях, на клетках мононуклеарного ряда, а также в органах репродуктивной системы. В организме имеется свободная (растворённая) форма АПФ, которая присутствует практически во всех биологических жидкостях [3].

Молекула соматического АПФ (сАПФ) состоит из одной полипептидной цепи, включающей 1277 аминокислотных остатков (а.о.), и содержит два высокоомологичных каталитически активных домена (N- и C-домены) [4]. Каждый из доменов включает 357 а.о. и содержит активный центр, в котором присутствует атом цинка. Домены различаются по профилю активации ионами хлора, по скорости гидролиза пептидов и по степени торможения различными ингибиторами [5, 6]. В отличие от C-домена, N-домен обладает необычной для АПФ эндопептидазной активностью – отщепляет N-концевой трипептид от регуляторного пептида люлиберина (гонадотропин-релизинг гормон, GnRH или LHRH) – <EHWSYGLRPG-NH₂ [5]. В организме обнаружены активные изоформы АПФ, состоящие только из одного домена. Тестикулярная форма (тАПФ) идентична C-домену сАПФ [7]. Свободный N-домен АПФ, не имеющий гидрофобного якоря, обнаружен в кишечной жидкости и моче человека [8, 9], в моче и различных тканях нормотензивных и гипертензивных крыс [10, 11], а также в ядрах мезангиальных клеток крыс [12]. Синтезированы селективные ингибиторы N- и C-доменов, блокирующие один из двух активных центров АПФ [13, 14], получены кристаллические структуры доменов [15-17].

АПФ является карбоксипептидазой, отщепляющей в основном C-концевые дипептиды от олигопептидов различного строения, имеющих свободную карбоксильную группу. В некоторых случаях он может гидролизовать пептиды с заблокированным C-концом и отщеплять не только дипептиды, но и трипептиды, однако подобное действие фермента строго ограничено особенностями структуры самого пептида. Данные, полученные нами и другими авторами, представлены в обзоре [3]. Классические субстраты АПФ – ангиотензин I и брадикинин – пептиды, участвующие в регуляции сосудистого тонуса, водно-солевого обмена и кровяного давления. Биохимические различия доменов имеют существенное физиологическое значение. Образование вазоактивного ангиотензина II (АП) из ангиотензина I (AI) происходит в основном

в активном центре C-домена АПФ. Роль N-домена в основном связана с обменом биологически активных пептидов, имеющих к нему высокое сродство. К ним относятся отрицательный регулятор гемопоэза горалатид (AcSDKP), люлиберин <EHWSYGLRPG-NH₂, ангиотензин 1-7 (DRVYIHP), а также пептид бета-амилоид (Aβ) – главный компонент сенильных или амилоидных бляшек, обнаруживаемых в мозге пациентов при болезни Альцгеймера [18]. Интерес к роли АПФ в процессах деградации Aβ связан с тем, что назначение ингибиторов АПФ (иАПФ) является основным терапевтическим подходом, применяемым при лечении различных форм гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний.

Установлено, что РАС принимает участие в процессах иммунного ответа, репродукции, воспаления, апоптоза, фиброза, ремоделирования, развития эндотелиальной дисфункции [19, 20]. На клеточном уровне РАС отвечает за процессы дифференцировки, пролиферации, программирования стволовых и гематopoэтических клеток [21-23]. В настоящее время доказано, что РАС относится к числу систем организма вовлеченных в сложные пути канцерогенеза [24]. Основным механизмом проопухолевого влияния РАС является ангиогенез, который опосредуется преимущественно через АП-АТ1P-зависимый сигналинг: АП, образующийся под действием АПФ, активирует рецепторы ангиотензина II типа I (АТ1P), которые стимулируют экспрессию нескольких проангиогенных факторов и факторов роста, включая фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтин 2, фактор роста фибробластов (FGF-α) и фактор роста тромбоцитов (PDGF) [25]. В противоположность этому, селективная стимуляция рецепторов ангиотензина II типа 2 (АТ2R) вызывает торможение ангиогенеза [26]. Обсуждается вопрос о применении препаратов, тормозящих РАС, для терапии рака. Ретроспективные клинические исследования показывают, что долгосрочное использование иАПФ и блокаторов АТ1P (БРА) может замедлять опухолевую прогрессию. Предполагается, что противоопухолевое действие иАПФ, связано не только с торможением АП-АТ1P-зависимого ангиогенеза [27], но также с блокированием АП-независимого действия АПФ в качестве трансмембранной протеазы, участвующей в деградации внеклеточного матрикса [28].

В течение последнего времени изучение АПФ проводилось нами в трёх основных направлениях. Во-первых, проводился поиск структурных различий между доменами сАПФ, который базировался на сравнительном анализе экспериментально обнаруженных нами антигенных детерминант (или В-эпитопов) N- и C-доменов АПФ человека. В различных этапах работы принимали участие сотрудники ИБМХ из лаборатории пептидной инженерии и лаборатории структурной биоинформатики [29].

Во-вторых, была исследована способность N- и C-доменов АПФ расщеплять природные

варианты пептида бета-амилоида (A β), что дало возможность проанализировать роль АПФ в развитии болезни Альцгеймера. В работе принимали участие сотрудники ИБМХ из группы масс-спектрометрии и лаборатории медицинской протеомики [30].

В-третьих, исследовалось участие ряда компонентов РАС (АПФ, АТ1Р и АТ2Р) в процессах ангиогенеза и инвазии при опухолевой прогрессии на примере плоскоклеточной карциномы шейки матки. Исследования, касающиеся роли РАС в опухолевой прогрессии в настоящее время являются приоритетными.

1. АНТИГЕННОЕ КАРТИРОВАНИЕ N- И C-ДОМЕНОВ АПФ ЧЕЛОВЕКА

Молекула соматического АПФ человека состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 1306 а.о., имеет 17 углеводсвязывающих участков и две гидрофобные области: последовательность из 29 а.о. на N-конце – удаляемый сигнальный пептид, и последовательность из 17 а.о. вблизи C-конца – мембранный якорь [4]. Исследование структуры АПФ выявило наличие в молекуле двух высокоомологичных доменов, названных N- и C-доменами, каждый из которых содержит Zn-зависимый каталитический центр. Идентичность а.о. двух доменов молекулы АПФ человека составляет около 60%, но в области активных центров, включающей 40 аминокислотных остатков, она возрастает до 89% [31]. Гипотеза о возникновении такой структуры молекулы АПФ в результате дупликации гена в процессе эволюции была подтверждена при определении структуры гена АПФ [32]. Исследование каталитических свойств доменов АПФ показало, что они различаются по скорости гидролиза пептидов, степени торможения специфическими ингибиторами, профилю активации ионами хлора [3, 5, 6]. Первые данные о кристаллизации тАПФ [16] и рентгено-структурном анализе его комплекса со специфическим ингибитором лизиноприлом [15] были опубликованы только 2003 году, а данные о пространственной структуре N-домена – в 2006 году [33].

На момент начала нашего исследования пространственная структура доменов сАПФ не была известна. Опираясь на имеющиеся литературные данные, мы предположили, что функциональные различия доменов обусловлены их конформационными особенностями. В связи с этим, нами была предпринята попытка сравнить домены АПФ человека посредством сравнения их линейных антигенных детерминант или В-эпитопов. В-эпитопы находятся на поверхности белка, являются носителями его функциональных свойств, формируют участки взаимодействия с рецепторами, то есть отвечают за процессы молекулярного узнавания. Определение таких экспонированных на поверхности белка участков полипептидной цепи позволяет сравнивать белки, пространственная структура которых неизвестна. Особенно это касается родственных

или близких по первичной структуре белков, обладающих сходными функциями. Таким образом, выявление В-эпитопов (или антигенное картирование) обоих доменов АПФ человека было проведено с целью их сравнительного изучения, которое могло объяснить различия их функциональных свойств. Экспериментальное определение антигенных детерминант (В-эпитопов) было проведено методом пептидного сканирования “PEPSCAN” [29]. Для АПФ исследования подобного рода не проводились.

1.1. Предсказание вероятных линейных антигенных детерминант (В-эпитопов) N- и C-доменов АПФ человека

Предсказание нами линейных антигенных детерминант было основано на данных о первичной структуре соматического АПФ человека. На основе данных компьютерного анализа были получены профили гидрофильности, подвижности, вероятности поверхностного расположения а.о. и предсказана вероятная вторичная структура молекулы АПФ человека. Предсказание линейных антигенных детерминант N- и C-доменов было проведено двумя различными методами – методом антигенного индекса (AIDX) [34-36] и методом антигенных мотивов (ESC) [37]. Методом AIDX было предсказано 13 антигенных детерминант для N-домена и 14 для C-домена, методом ESC – 15 для N-домена и 17 для C-домена. Из них обоими методами было предсказано 8 антигенных детерминант для N-домена и 10 для C-домена (около 60% от числа антигенных детерминант, предсказанных каждым из двух методов) [29].

1.2. Выявление линейных антигенных детерминант методом пептидного сканирования

Линейные антигенные детерминанты двух доменов АПФ человека, предсказанные двумя методами, экспериментально определяли методом пептидного сканирования (“PEPSCAN”), включающим синтез гексапептидов, охватывающих аминокислотные последовательности, предсказанные двумя методами, и их тестирование методом сорбционного иммуноферментного анализа (ELISA) по взаимодействию с поликлональной сывороткой к АПФ человека. Всего был синтезирован 221 гексапептид – 110 для N-домена, и 111 для C-домена. При помощи ELISA было показано, что антигенными свойствами обладают 95 гексапептидов; из них 51 гексапептид был обнаружен в N-домене, и 43 гексапептида – в C-домене. Антигенные гексапептиды каждого из доменов были сгруппированы в линейные антигенные участки или В-эпитопы – в N-домене 17 эпитопов с длиной от 6 до 16 аминокислотных остатков (рис. 1), в C-домене – 14 эпитопов с длиной от 6 до 15 аминокислотных остатков (рис. 1, рис. 2). Сравнение экспериментально найденных и предсказанных двумя методами (AIDX и ESC) эпитопов показало, что их совпадение составляет около 70% [29].

АПФ: АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА, РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ Аβ И КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

	200	10	20	30	40	50	60	70	80	90	300				
N-дом	WRS	WYNSPTFF	EDDLEHLY	QQLLEPLYNL	HAFVVR	RALHRRYGD	RYIN	LRGPIPA	HLLGDMWAQSW	ENIYDMV	VFPDPKPN	LDVSTMTL	QCGWNA	THMFRVAEEF	898
C-дом	...	M.ET.SL.Q...	R.F.E.Q.Y.....	H..AQH...E.N...	T.S...	L...	..SA.S	M.T.EA.	K...TPRR...E	DD.			
	301														400
N-дом	FTSLELSPMPPEFWEGSML	EKPADG	REVV	CHASAWDFYNR	KDFRIKQ	CTRV	TMDQLSTVH	HEMCHI	QYYLQ	YKDL	PVSLRRGANPGE	HEAIGD	VLLALSVS		998
C-дом	...	G.L.V.	NK...	..T...G...	T.NLED.VVA.	HEMCH	...FM...	...A..E	E...D	
	401														500
N-дом	TPENHLKIGLLDRVTNDTESDINYLKMALEKIA	FLPFGYL	V	DWRWG	V	FSGRTPPSRYNFD	WWYL	RTKYQGI	CPFVTRNE	THFDAGAKF	HVPNVTE	YIR			1098
C-дом	...	K...SLN	..SSE	CGSD.H	...F.M...	D....I..S.....	R..D.SIT	KEN..QE..	S..L..	L	...P.TQG	D..P....I.SSV....			
	501														554
N-дом	YFVSFVLQFQFHEALCKEAGYEGPLHQCDIYR	STKAGAKLR	KVLOA	GSSRPWQE											1152
C-домII.....	QA..HT...	K...	Q.KE..QR.ATAM	KL.F....P									

Рисунок 1. Гомология N- и C-доменов АПФ человека и линейные антигенные детерминанты. Последовательности выровнены, идентичные аминокислотные остатки показаны точками. Нумерация соответствует соматическому АПФ человека [4]. Выявленные антигенные детерминанты обведены. Не совпадающие антигенные детерминанты N- и C-доменов выделены серым цветом. Цинк-связывающий мотив и третий цинк-связывающий лиганд (E) выделены курсивом и жирным шрифтом. Остатки цистеина подчеркнуты.

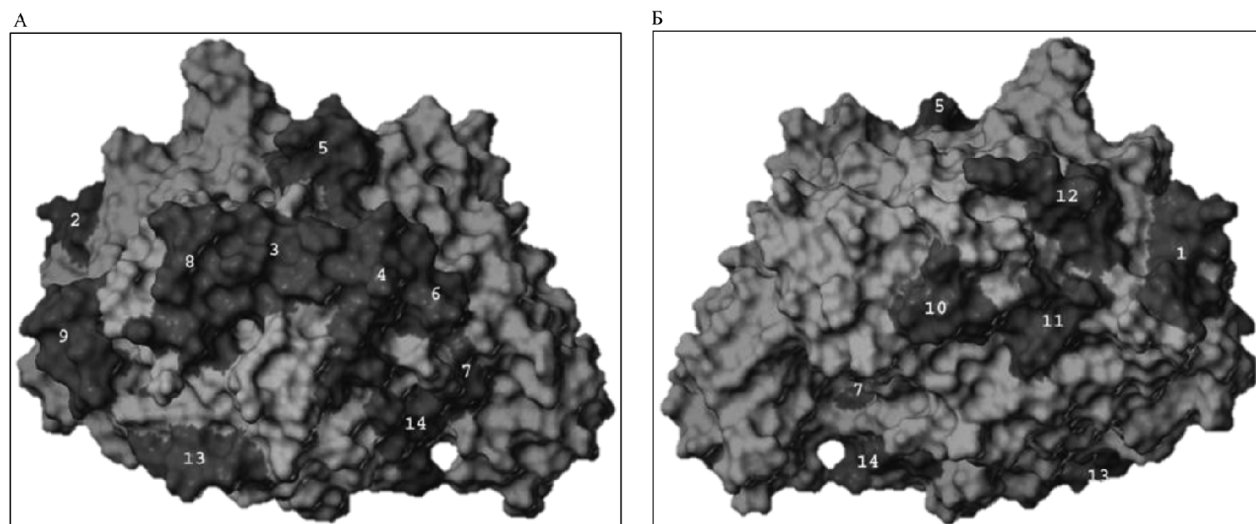


Рисунок 2. Трёхмерная структура молекулы тАПФ. Молекулярная поверхность показана серым цветом, эпитопы окрашены тёмно серым цветом. Позиция Б повернута на 180° по отношению к позиции А.

1.3. Сравнительный анализ локализации эпитопов N- и C-доменов АПФ человека

Сравнение расположения эпитопов N- и C- доменов в первичной структуре АПФ человека (рис. 1) позволило обнаружить эпитопы, отличающиеся по расположению: в N-доме их было 6, в C-доме – 4. Мы предположили, что именно эти участки доменов имеют конформационные различия. В остальных случаях эпитопы были расположены в схожих участках доменов, и, по-видимому, конформационно близких. В обоих доменах не было обнаружено ни одного эпитопа, расположенного вблизи активных центров доменов. Остатки цистеина, принимающие участие в формировании петель в белковых молекулах

за счёт образования дисульфидных связей, не вошли в состав эпитопов: в обоих доменах они располагаются за их пределами.

После появления данных о пространственной структуре тАПФ человека, который полностью идентичен C-дому АПФ [16], мы локализовали выявленные эпитопы на поверхности молекулы тАПФ [29]. Оказалось, что все они, как и ожидалось, расположены на поверхности белковой глобулы (рис. 2). Анализ распределения эпитопов на поверхности белка показал, что некоторые из них образуют большие непрерывные кластеры. Расчёт доступности аминокислотных остатков, входящих в эпитопы, для молекул воды подтвердил, что большинство из них контактирует с окружающей средой.

1.4. Сравнение эпитопов N- и C доменов АПФ человека с аминокислотными последовательностями АПФ млекопитающих

При выравнивании структуры N- и C-доменов АПФ человека и аминокислотных последовательностей четырёх видов млекопитающих (крысы, мыши, кролика и быка) были определены консервативные и переменные области, что дало возможность распределить между ними выявленные эпитопы [19]. При этом оказалось, что 6 из 17 эпитопов N-домена расположены в консервативных участках последовательности АПФ, общих для всех млекопитающих. В C-домене, в отличие от N-домена, только 2 эпитопа из 14 расположены в консервативных участках аминокислотной последовательности. В нескольких эпитопах обоих доменов (1 эпитоп в N-домене и 3 эпитопа в C-домене) имеются единичные замены а.о., которые не оказывают существенного влияния на их антигенные свойства [38]. 10 эпитопов в N-домене и 9 эпитопов в C-домене являются уникальными для АПФ человека [29].

1.5. Анализ расположения эпитопов C-домена относительно элементов вторичной структуры тАПФ

Поскольку структура тАПФ [15] совпадает со структурой C-домена АПФ, нами было проанализировано расположения эпитопов C-домена по отношению различных элементов вторичной структуры тАПФ. Анализ показал, что большинство эпитопов находится в местах неупорядоченной структуры и в местах перехода от одной структуры к другой [29]. Тринадцать из четырнадцати эпитопов содержат элементы неупорядоченной вторичной структуры, причём два из них целиком расположены на таких участках. В остальных случаях эпитопы располагаются на участках перехода неупорядоченной структуры в α -спирали. И только два эпитопа расположены на участках, представляющих α -спирали. Кроме того, следует отметить, что два эпитопа входят в состав петель, образованных за счёт парных остатков цистеина. Как показывает рентгеноструктурная кристаллография белковых антигенов и комплексов антиген-антитело, большинство В-эпитопов располагается в местах поворотов и петлеобразных структур полипептидных цепей. Это связано с более высокой мобильностью таких участков за счёт подвижности боковых групп аминокислотных остатков, что увеличивает вероятность проявления антигенных свойств.

1.6. Анализ расположения выявленных эпитопов относительно функционально важных участков АПФ

Анализ выявленных нами эпитопов относительно функционально важных участков АПФ был проведён на основе данных рентгеноструктурного анализа комплекса тАПФ с молекулой специфического ингибитора лизиноприла, полученных Natesh et al. [15]. Расположение дисульфидных связей в молекуле тАПФ, идентифицированных ранее [39], было

подтверждено рентгеноструктурным анализом тАПФ [15]. Анализ положения эпитопов относительно остатков цистеина, образующих дисульфидные связи в молекуле АПФ, показал, что ни один из спаренных остатков цистеина в обоих доменах не лежит в пределах выявленных антигенных детерминант (рис. 1). Остатки цистеина, не принимающие участия в формировании дисульфидных связей, расположены в области эпитопов в обоих доменах [29].

Каждый из доменов имеет консервативный цинк-связывающий мотив HEXXH, выявленный во многих цинк-зависимых металлопептидазах [15, 40]. Лигандами цинка в C-домене являются два остатка гистидина (H959 и H963) и остаток глутаминовой кислоты (G987). Нами были обнаружены некоторые различия в расположении эпитопов, относительно активных центров доменов [29]. Эпитоп, локализованный в N-домене (372-387 а.о.), находится вблизи остатка G389 (рис. 1). Аналогичный эпитоп в C-домене (973-979 а.о.) короче и находится на некотором расстоянии от остатка G987.

Анализ расположения эпитопов относительно а.о., ответственных за связывание со специфическим ингибитором лизиноприлом [15], показал, что ни один из них не входит в состав эпитопов C-домена [29]. Эти данные согласуются с представлением о том, что антигенные участки белков располагаются на поверхности молекулы.

В кристаллической структуре тАПФ были определены два иона хлора – Cl1 и Cl2, существенные для активации АПФ; они располагаются за пределами активного центра. Каждый ион хлора связан с различными аминокислотными остатками [15]. Принимая во внимание идентичность тАПФ и C-домена АПФ, соответствующими остатками в C-домене являются: R1065, R762, W1061 для Cl1 и R1098 и Y800 для Cl2. В C-домене остаток R1065 входит в состав эпитопа (рис. 1). Аналогичный остаток R467 в N-домене также входит в эпитоп. Оба эпитопа расположены в консервативных участках домена [29].

Предсказанные нами линейные антигенные детерминанты были определены экспериментально на основе их взаимодействия с АПФ-специфической антисывороткой [29]. Различия в количестве и расположении антигенных детерминант обоих доменов подтвердило предположение о том, что в третичной структуре доменов имеются различия. Анализ расположения антигенных детерминант по отношению к различным структурным элементам и функционально важным участкам C-домена АПФ человека показал, что большинство антигенных участков C-домена расположены в областях с неупорядоченной вторичной структурой или в местах переходов от одного элемента вторичной структуры к другому. Не было обнаружено ни одного эпитопа рядом с функционально важными участками АПФ, расположенными внутри белковой молекулы. Эти данные согласуются с тем, что все выявленные эпитопы расположены на поверхности белковой

молекулы. Эпитопы, находящиеся на поверхности тАПФ, формируют несколько кластеров. Выявленные антигенные детерминанты были соотнесены с вариабельными и консервативными областями молекулы АПФ. Полученные результаты дают возможность получать различные моно- и групп-специфические антипептидные сыворотки или моноклональные антитела [41]. Домен- и эпитоп-специфические антитела являются полезными инструментами в структурно-функциональных исследованиях АПФ, а также в разработке и развитии домен-специфических ингибиторов.

2. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ АПФ В МЕТАБОЛИЗМЕ ПЕПТИДА БЕТА-АМИЛОИДА

Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют в пользу вовлечения АПФ в патогенез БА. Болезнь Альцгеймера (БА) – один из наиболее распространённых случаев деменции. В основе БА лежит нейродегенеративный процесс, связанный с образованием в мозге нейрофибриллярных клубков и отложением сенильных или амилоидных бляшек, главным компонентом которых является пептид бета-амилоид (Аβ). Предполагается, что существует взаимосвязь между полиморфизмом гена *APP* и риском развития БА. Установленными факторами риска БА являются гипертензия, атеросклероз, диабет – заболевания, в патогенез которых вовлечён АПФ. Данные гистопатологических исследований демонстрируют положительную корреляцию между стадиями БА (Braak stages), отложением Аβ в виде сенильных бляшек в паренхиме и кровеносных сосудах мозга и увеличением активности АПФ мозга [18].

Образование Аβ – это нормальный процесс, протекающий в организме. Аβ-пептиды образуются из трансмембранного белка-предшественника (β-АПБ), под действием двух аспартильных протеаз – β- и γ-секретаз (рис. 3). В зависимости от места

гидролиза β-АПБ γ-секретазой образуются три основные формы Аβ, состоящие из 38, 40 и 42 а.о. (Аβ₃₈, Аβ₄₀, Аβ₄₂). Аβ содержит в своем составе два домена: металл-связывающий домен, включающий 16 а.о., расположенных на N-конце молекулы (принимает участие во взаимодействии с ионами цинка и меди), и основной домен, образующий бета-слои [18]. Изучение состава сенильных бляшек мозга показало, что их основными компонентами являются пептиды Аβ₄₀ и Аβ₄₂, которые часто имеют многочисленные эндогенные пост-трансляционные модификации [42, 43]. Ведущая роль Аβ₄₂ в патогенезе БА была подтверждена в ряде гистопатологических, генетических и биохимических исследований [44]. Дегградация Аβ осуществляется различными системами организма, в частности цинковыми металлопептидазами, к числу которых относится АПФ [45]. Предполагается, что хронический дисбаланс между образованием и дегградацией Аβ может играть важную роль в патогенезе БА.

В последнее десятилетие было обнаружено, что АПФ участвует в метаболизме Аβ как один из Аβ-деградирующих ферментов [18]. Первые данные, полученные *in vitro*, об участии АПФ в дегградации Аβ появились в 2001 году [46]. В культуре клеток феохромоцитомы крысы, предварительно проинкубированных с Аβ₄₀, очищенный препарат сАПФ предотвращал агрегацию и ингибировал цитотоксичность за счёт расщепления Аβ₄₀ на два фрагмента – Аβ₁₋₇ и Аβ₈₋₄₀; фрагмент Аβ₁₋₇ не обладал ни способностью к агрегации, ни цитотоксичностью, а аналогичные свойства Аβ₈₋₄₀ были выражены существенно слабее, чем у исходного пептида. Этот эффект блокировался добавлением к клеткам иАПФ – лизиноприла. В 2005 году аналогичные данные были получены на клеточной культуре нейробластомы человека, а методом точечного мутагенеза было показано, что за снижение уровня Аβ в клетках отвечают оба домена полноразмерной молекулы АПФ [47]. Однако в другом исследовании было продемонстрировано

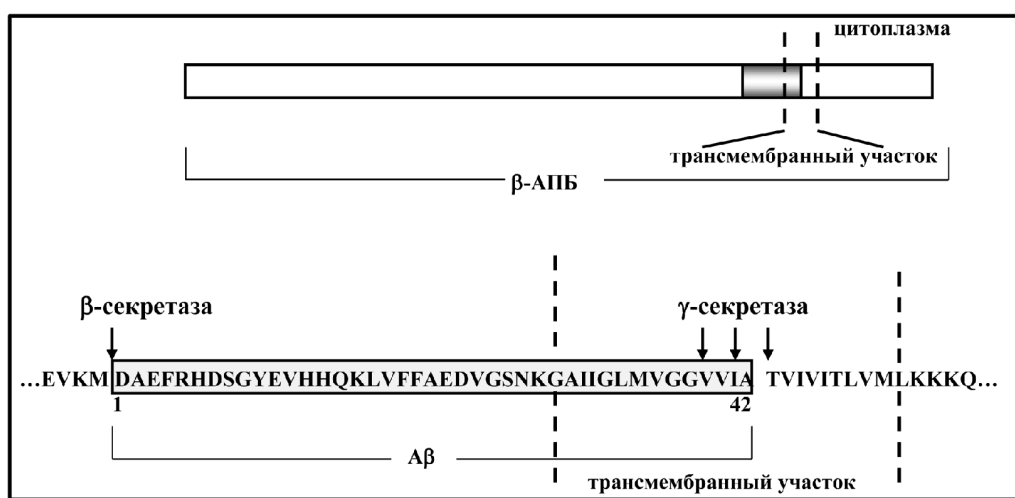


Рисунок 3. Образование Аβ из предшественника β-АПБ. Пунктирная линия показывает границы клеточной мембраны.

торможение агрегации и цитотоксичности $A\beta_{40}$ в клетках феохромоцитомы крысы под влиянием N-домена АПФ; в экспериментах *in vitro* были обнаружены фрагменты $A\beta_{40}$, предполагающие расщепление связи D7–S8 [48].

Опираясь на опубликованные данные, мы предположили, что активные изоформы АПФ, имеющиеся в организме человека, соответствующие его N- и C- доменам, принимают различное участие в гидролизе $A\beta$. Это предположение согласовывалось с данными о том, что для каждого из доменов АПФ имеются специфические природные субстраты и ингибиторы. Целью предпринятого исследования стало, во-первых, определение роли каждого отдельного домена АПФ в разрушении $A\beta$ человека, и, во-вторых, изучение влияния пост-трансляционных модификаций $A\beta$ на его протеолиз доменами АПФ.

Конкретная задача включала сравнительный анализ гидролиза N- и C-доменами АПФ двух вариантов $A\beta$ человека, в одном из которых имела место изомеризация аминокислотного остатка аспарагиновой кислоты в положении 7 (isoD7). Выбор такой модификации $A\beta$ был связан с тем, что количество подобных модификаций в пептидах и белках увеличивается с возрастом, а также при БА [42]. Появление isoD в белках обычно происходит вследствие неферментативной пост-трансляционной модификации остатка аспарагиновой кислоты посредством внутримолекулярной сукцинимидной перегруппировки в процессе белкового старения. Показано, что замещение остатка D7 на isoD в $A\beta$ приводит к значительным изменениям его конформации, которая может влиять на взаимодействие с другими молекулами, и, в частности, с протеазами. При развитии БА количество $A\beta_{42}$, включающего остатки isoD7, увеличивается до 75% [42, 43]. Мы предположили, что изомеризация D7 в $A\beta$ может оказать негативное влияние на способность АПФ гидролизовать $A\beta$.

2.1. Исследование гидролиза $A\beta_{16}$ человека N- и C-доменами АПФ

В работе были использованы синтетические пептиды, соответствующие цинк-связывающему домену бета-амилоида – $A\beta_{16}$, включающие D7 или isoD7 [30]. Выбор укороченных вариантов $A\beta$ – $A\beta_{16}(D7)$ и $A\beta_{16}(isoD7)$ был обоснован полной растворимостью этих пептидов в водных растворах, где они присутствовали в мономерном состоянии. Пептиды не различались по молекулярной массе, однако, по сравнению с $A\beta_{16}(D7)$ у $A\beta_{16}(isoD7)$ основная цепь была длиннее на одну метиленовую группу, а боковая цепь короче на одну метиленовую группу.

Анализ масс-спектров проб, содержащих $A\beta_{16}(D7)$ или $A\beta_{16}(isoD7)$ и N-домен АПФ, показал присутствие $A\beta_{1-5}$ и $A\beta_{6-16}(D7)$ или $A\beta_{1-5}$ и $A\beta_{6-16}(isoD7)$ (соответственно). Анализ проб, содержащих пептиды $A\beta_{16}(D7)$ или $A\beta_{16}(isoD7)$ и C-домен АПФ, показал полное отсутствие каких-либо продуктов

гидролиза. Таким образом, было установлено, что в отличие от C-домена, N-домен АПФ участвует в метаболизме $A\beta_{16}(D7)$ и $A\beta_{16}(isoD7)$, расщепляя в этих пептидах связь между 5 и 6 а.о. R5–H6 (рис. 4). Эти результаты показывают, что изомеризация D7 в $A\beta_{16}$ не оказывает влияния на способность N-домена АПФ к расщеплению связи R5–H6. Специфичность взаимодействия пептидов с N-доменом была подтверждена с помощью иАПФ лизиноприла, который полностью блокировал гидролиз обоих пептидов.

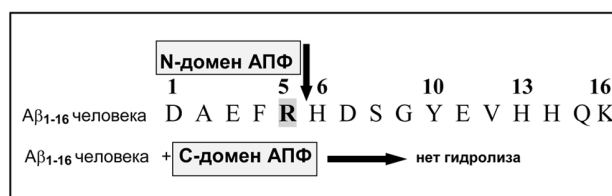


Рисунок 4. Гидролиз цинк-связывающего фрагмента пептида бета-амилоида $A\beta_{16}$ человека N- и C-доменами АПФ.

Замещение D7 на isoD в $A\beta$ существенно повышало сродство $A\beta$ к N-домену АПФ, что было показано при помощи количественной масс-спектрометрии [49] (рис. 5). По-видимому, это связано со структурой $A\beta_{16}$ [50]. Обычно введение β-аминокислот приводит к образованию более жесткой структуры белка, ограничивая тем самым доступность для расщепления протеиназами. Однако это справедливо для тех случаев, когда замещение β-аминокислотами происходит в структурах, расположенных на поверхности белка [51]. В пептиде $A\beta_{16}(isoD)$ остаток isoD находится в положении 7, который относится к неструктурированной области пептида, и таким образом, не может участвовать в создании более жесткой конструкции. Также важно обратить внимание на то, что в связывании с активным центром АПФ важную роль играют два аминокислотных остатка, расположенные справа и слева от расщепляемой связи [52]. D7 является одним из таковых, поэтому его изомеризации должно оказывать влияние на эффективность гидролиза связи R5–H6 N-доменом АПФ. Замена D7 на isoD7 удлиняет основную цепь пептида и сокращает его боковую цепь, что, по-видимому, делает пептид более гибким, структурно менее громоздким, облегчая его взаимодействие с активным центром фермента.

Полученные результаты демонстрируют новую эндопептидазную активность N-домена АПФ, а также предпочтительный гидролиз N-доменом изомеризованного аналога $A\beta$, который, как предполагается, может отвечать за возникновение БА. Данные проведенного исследования свидетельствуют в пользу участия АПФ в патогенезе БА. По-видимому, роль АПФ в метаболизме $A\beta$ становится более существенной именно при развитии БА, когда в мозге увеличивается количество $A\beta$, включающего остатки isoD.

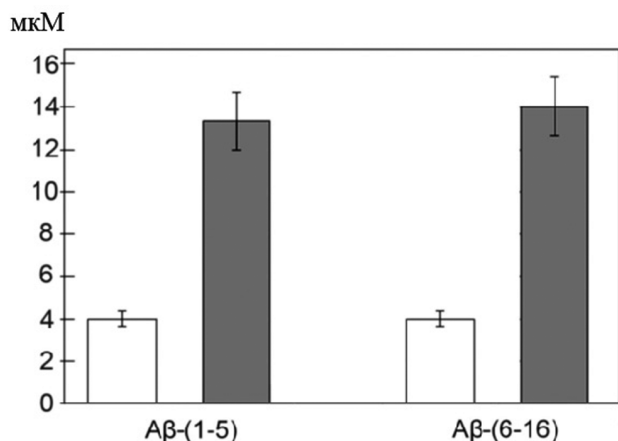


Рисунок 5. Концентрация пептидов А β ₁₋₅ и А β ₆₋₁₆ в реакционной смеси, содержащей 20 мкМ А β ₁₆(D7) (белые столбики) или А β ₁₆(isoD7) (серые столбики) после инкубации с N-доменом АПФ [29].

3. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ АПФ ПРИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЕ ШЕЙКИ МАТКИ

В широком спектре опухолей человека, включая глиобластому, карциному печени, молочной железы, гортани, простаты и плоскоклеточную карциному кожи, обнаружены локальные РАС [53]. Опухолевая прогрессия сопровождается повышенной экспрессией таких компонентов РАС, как ангиотензиноген, ренин, АПФ и АТ1R. Показано, что АПФ и другие компоненты РАС экспрессируются всеми типами клеток, находящимися в микроокружении опухоли, в том числе эндотелиальными клетками, моноцитами, макрофагами, дендритными клетками, фибробластами и Т-клетками [54]. АП, образующийся под действием АПФ, активирует рецепторы АТ1R, которые стимулируют в клетках экспрессию нескольких проангиогенных веществ и факторов роста, включая VEGF, ангиопоэтин 2, FGF- α и PDGF [25]. VEGF считается одним из главнейших регуляторов ангиогенеза, который стимулирует в клетках процессы пролиферации и дифференцировки, приводящие к образованию и созреванию новых сосудов; действие VEGF опосредуется через рецептор VEGFR2 (KDR/Flk-1) [55]. Избыточная экспрессия VEGF наблюдается в большинстве опухолей [56]. Имеются данные, что уровень VEGF коррелирует с клиническими и патологическими особенностями опухолевой прогрессии при карциноме шейки матки [57-59]. Показано, что VEGF-сигналинг, индуцируемый АТ1R, является одним из ключевых регуляторов роста опухоли и опухолевого ангиогенеза не только в опухолевых тканях, но также в тканях организма-хозяина [60]. Таким образом, в опухолевых и окружающих опухоль клетках АП-АТ1R-сигналинг направлен на ускорение процесса пролиферации и переходу к злокачественности, а также

вовлечён в модулирование ангиогенеза, который рассматривается в качестве одного из основных механизмов проопухолевого влияния РАС.

Имеются данные, что РАС вовлечена в злокачественную трансформацию и опухолевую прогрессию при некоторых видах гинекологического рака [53]. При раке эндометрия в образцах опухолевых тканей экспрессия АТ1R и АП обнаруживалась параллельно с гиперэкспрессией VEGF; экспрессия АТ1R и АП имела положительную корреляцию со снижением выживаемости пациентов и без признаков рака эндометрия [61-62]. Данные, касающиеся опухолей яичников, показывают, что повышенная экспрессия АТ1R сопутствует переходу пограничной формы цистаденомы в инвазивную злокачественную форму и положительно коррелирует с экспрессией VEGF и плотностью микрососудов в опухолевой ткани яичников, а также со снижением выживаемости пациентов [63-64]. При карциноме яичников обработка опухолевых клеток блокатором АТ1R (БРА) и агонистом АТ2R (лозартаном и CGP42112A соответственно) приводила к снижению выживаемости раковых клеток и торможению ангиогенеза; предполагается, что стратегия, включающая одновременное использование БРА и агонистов АТ2R, при раке яичников может иметь практическое применение [65]. Однако, что касается карциномы шейки матки, имеются лишь единичные данные о повышенной экспрессии в опухолевой ткани АТ1R [65, 66]. Данные об экспрессии АПФ, основного фермента, продуцирующего АП, отсутствуют. Также следует отметить, что практически нет данных об экспрессии при карциноме шейки матки рецепторов АТ2R, которые проявляют функциональный антагонизм по отношению к АТ1R в таких тканях организма, как эндотелий, гладкие мышцы сосудов, а также в нервных клетках [67].

В настоящее время нами проводится исследование уровня активности АПФ [68] при плоскоклеточной карциноме шейки матки в опухолевых тканях и в прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани, а также в тканевых лентах, расположенных на протяжении от стенки влагалища до дна полости матки, отобранных на базе отдела патологической анатомии. Активность АПФ в большинстве была существенно выше в опухолях, чем в ткани, прилегающей к опухоли (на 30%–300%) (рис. 6) [69]. В большинстве тканевых лент активность АПФ снижалась в направлении от шейки матки, включающей плоскоклеточную карциному, к морфологически нормальной ткани – дну полости матки. Обнаруженная нами повышенная активность АПФ в опухолевой ткани подтверждает участие АПФ в развитии опухолевой прогрессии при плоскоклеточной карциноме шейки матки. Поскольку АПФ является основным ферментом, продуцирующим АП, большинство эффектов которого опосредуется через АТ1R, повышение его активности может стать маркером, прогнозирующим ухудшение клинического исхода заболевания.

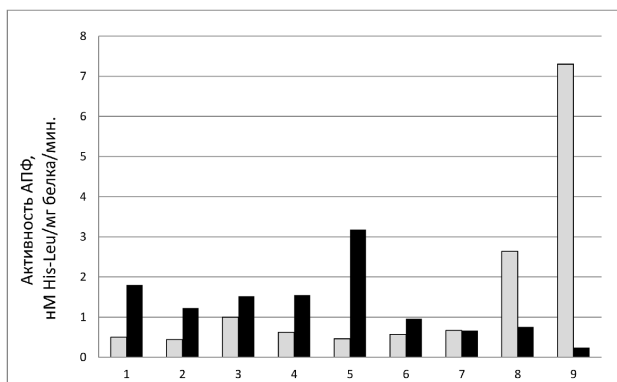


Рисунок 6. Удельная активность АПФ в образцах опухолевой ткани (чёрные столбики) и прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани (серые столбики).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение последних лет нами продолжается изучение АПФ, обнаруженного и охарактеризованного в лаборатории биохимии и химической патологии белков. АПФ является ключевым ферментом ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем, контролирующих кровообращение в организме. Молекула соматического АПФ содержит два высокомолекулярных домена (N- и C-домены), которые различаются по физико-химическим свойствам. Поиск структурных различий между доменами соматического АПФ человека выявил существенные различия в расположении эпитопов в N- и C-доменах АПФ, что согласуется с предположением о существовании структурных различий между доменами АПФ. Все выявленные эпитопы C-домена АПФ расположены на поверхности белковой молекулы и формируют несколько кластеров, большинство из которых находится в областях с неупорядоченной вторичной структурой или в местах переходов от одного элемента вторичной структуры к другому. Выявленные эпитопы были соотнесены с функционально-важными участками молекулы, а также с варибельными и консервативными областями молекулы АПФ. Полученные результаты дают возможность получать различные моно- и групп-специфические антипептидные сыворотки или моноклональные антитела.

Исследована роль доменов АПФ в протеолитической деградации Аβ. Известно, что АПФ, наряду с другими металлопептидазами, принимает участие в метаболизме Аβ, играющем важную роль в возникновении и прогрессировании БА. Изучение гидролиза цинк-связывающего фрагмента Аβ (Аβ₁₋₁₆) двумя доменами АПФ показало, что только N-домен АПФ участвует в его деградации, расщепляя пептидную связь R5–N6. Замещение D7 на isoD в Аβ (Аβ₁₋₁₆) существенно повышало сродство Аβ к N-домену АПФ. Мы предполагаем, что роль АПФ в метаболизме Аβ становится более существенной именно при развитии БА, сопровождающейся

увеличением количества пептидов и белков, имеющих подобные пост-трансляционные модификации. Полученные данные свидетельствуют в пользу участия АПФ в патогенезе БА.

РАС вовлечена в злокачественную трансформацию и опухолевую прогрессию. АПФ и его рецептор – АТ1R экспрессированы в различных злокачественных опухолях человека, в том числе при разных видах гинекологического рака. Мы обнаружили, что активность АПФ была существенно выше в образцах опухолей, по сравнению с образцами морфологически нормальной ткани. Обнаруженная нами повышенная активность АПФ в опухолевой ткани подтверждает участие АПФ в развитии опухолевой прогрессии при плоскоклеточной карциноме шейки матки. Мы предполагаем, что повышение активности АПФ может стать маркером, прогнозирующим ухудшение клинического исхода заболевания.

Результаты собственных исследований, суммированные в обзоре, получены в рамках “Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы”, а также при поддержке грантов РФФИ 03-04-48524а, 07-04-01233а, 11-04-01367а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елисеева Ю.Е., Орехович В. Н. (1963) Докл. АН СССР, **153**, 954-956.
2. Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н., Павлюхина Л.В., Алексеенко Л.П. (1970) Вopr. мед. химии, **16**, 646-649.
3. Елисеева Ю.Е., Кугаевская Е.В. (2009) Биомед. химия, **55**, 397-414.
4. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 9386-9390.
5. Jaspard E., Wei L., Alhenc-Gelas F. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 9496-9503.
6. Бинеvский П.В., Никольская И.И., Позднев В.Ф., Кост О.А. (2000) Биохимия, **65**, 765-774.
7. Ehlers M.R.W., Fox E.A., Strydom D.J., Riordan J.F. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 7741-7745.
8. 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.
9. 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.
10. Marques G.D., Quinto B.M., Plavink F.L., Krieger J.E., Marson O., Casarini D.E. (2003) Hypertension, **42**, 693-701.
11. Ronchi F.A., Andrade M.C.C., Carmona A.K., Krieger J.E., Casarini D.E. (2005) J. Hypertension, **23**, 1869-1878.
12. 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.
13. Dive V., Cotton J., Yiotakis A., Michaud A., Vassiliou S., Jiracek J., Vazeux G., Chauvet M.T., Cuniassé P., Corvol P. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 4330-4335.
14. Georgiadis D., Cuniassé P., Cotton J., Yiotakis A., Dive V. (2004) Biochemistry, **43**, 8048-8054.

15. Natesh R., Schwager S.L., Sturrock E.D., Acharya K.R. (2003) *Nature*, **421**, 551-554.
16. Gordon K., Redelinghuys P., Schwager S.L., Ehlers M.R., Papageorgiou A.C., Natesh R., Acharya K.R., Sturrock E.D. (2003) *Biochem J.*, **371**(Pt 2), 437-442.
17. Corradi H.R., Schwager S.L., Nchinda A.T., Sturrock E.D., Acharya K.R. (2006) *J. Mol. Biol.* **357**, 964-974.
18. Кугаевская Е.В. (2013) *Биомед. химия*, **59**, 5-24.
19. Bernstein K.E., Ong F.S., Blackwell W.L., Shah K.H., Giani J.F., Gonzalez-Villalobos R.A., Shen X.Z., Fuchs S., Touyz R.M. (2013) *Pharmacol. Rev.*, **65**, 1-46.
20. Shen X.Z., Ong F.S., Bernstein E.A., Janjulia T., Blackwell W.L., Shah K.H., Taylor B.L., Gonzalez-Villalobos R.A., Fuchs S., Bernstein K.E. (2012) *Hypertension*, **59**, 763-768.
21. Heringer-Walther S., Eckert K., Schumacher S.M., Uharek L., Wulf-Goldenberg A., Gembardt F., Fichtner I., Schultheiss H.P., Rodgers K., Walther T. (2009) *Haematologica*, **94**, 857-860.
22. Park T.S., Zambidis E.T. (2009) *Haematologica*, **94**, 745-747.
23. Zambidis E.T., Park T.S., Yu W., Tam A., Levine M., Yuan X., Pryzhkova M., Peault B. (2008) *Blood*, **112**, 3601-3614.
24. Wegman-Ostrosky T., Soto-Reyes E., Vidal-Millán S., Sánchez-Corona J. (2013) *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, DOI: 10.1177/1470320313496852
25. Hunyady L., Catt K.J. (2006) *Molecular Endocrinology*, **20**, 953-970.
26. Carbajo-Lozoya J., Lutz S., Feng Y., Kroll J., Hammes H.P., Wieland T. (2012) *Cell Signal.*, **24**, 1261-1269.
27. Volpert O.V., Ward W.F., Lingen M.W., Chesler L., Solt D.B., Johnson M.D., Molteni A., Polverini P.J., Bouck N.P. (1996) *J. Clin. Invest.*, **98**, 671-679.
28. Bauvois B. (2004) *Oncogene*, **23**, 317-329.
29. Kugaevskaya E.V., Kolesanova E.F., Dedinsky I.R., Kozin S.A., Elisseeva Yu.E. (2006) *Biochim.Biophys. Acta, General Subjects*, **1760**, 959-965.
30. 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.
31. Кугаевская Е.В. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 567-580.
32. Hubert C., Houot A.M., Corvol P., Soubrier F. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 15377-15388.
33. Corradi H.R., Chitapi I., Sewell B.T., Georgiadis D., Dive V., Sturrock E.D., Acharya K.R. (2007) *Biochemistry*, **46**, 5473-5478.
34. Jameson B.A., Wolf H. (1988) *Comput. Appl. Biosci.*, **4**, 181-186.
35. Chou P.Y., Fasman G.D. (1978) *Adv. Enzymol.*, **4**, 145-148.
36. Garnier J., Osguthorpe D.J., Robson B. (1978) *J. Mol. Biol.*, **120**, 97-120.
37. Dedinsky I.R., Kozin S.A., Archakov A.I. (1994) in: *Proceedings of 8th International Conference on Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology* (Lechner M.C., ed.), Lisbon, Portugal, 24-28 October 1993, John Libbey Eurotext, Paris, pp. 603-610.
38. Geysen H.M., Mason T.J., Rodda S.J. (1988) *J. Mol. Recognit.*, **1**, 32-41.
39. Sturrock E.D., Yu X.C., Wu Z., Biemann K., Riordan J.F. (1996) *Biochemistry*, **35**, 9560-9566.
40. Vallee B.L., Auld D.S. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 220-224.
41. Danilov S.M., Watermeyer J.M., Balyasnikova I.V., Gordon K., Kugaevskaya E.V., Elisseeva Y.E., Albrecht R.F., Sturrock E.D. (2007) *Biochemistry*, **46**, 9019-9031.
42. Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S., Wolkow C., Wang R., Cotter R.J., Reardon I.M., Zurcher-Neely H.A., Heinrichson R.L., Ball M.J. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 3072-3083.
43. Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S., Woods A.S., Cotter R.J., Gowing E., Ball M.J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10836-10840.
44. Findeis M.A. (2007) *Pharmacol. Ther.*, **116**, 266-286.
45. Miners J.S., Baig S., Palmer J., Palmer L.E., Kehoe P.G., Love S. (2008) *Brain Pathol.*, **18**, 240-252.
46. Hu J., Igarashi A., Kamata M., Nakagawa H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 47863-47868.
47. Hemming M.L., Selkoe D.J. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 37644-37650.
48. Oba R., Igarashi A., Kamata M., Nagata K., Takano S., Nakagawa H. (2005) *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 733-740.
49. Jespersen S., Niessen W.M., Tjaden U.R., van der Greef J. (1995) *J. Mass Spectrom.*, **30**, 357-364.
50. Zirah S., Kozin S.A., Mazur A.K., Blond A., Cheminant M., Segalas-Milazzo I., Debey P., Rebuffat S. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 2151-2161.
51. Frackenpohl J., Arvidsson P.I., Schreiber J.V., Sebach D. (2001) *Chem. Bio. Chem.*, **2**, 445-455.
52. Acharya K.R., Sturrock E.D., Riordan J.F., Ehlers M.R. (2003) *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**, 891-902.
53. Ino K., Shibata K., Yamamoto E., Kajiyama H., Nawa A., Mabuchi Y., Yagi S., Minami I., Tanizaki Y., Kobayashi A., Kikkawa F. (2011) *Current Cancer Drug Targets*, **11**, 405-411.
54. Okwan-Duodu D., Landry J., Shen X.Z., Diaz R. (2013) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **305**, R 205-215.
55. Deshayes F., Nahmias C. (2005) *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, **16**, 293-299.
56. Roskoski R. (2007) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **62**, 179-213.
57. Jach R., Dulinska-Litewka J., Laidler P., Szczudrawa A., Kopera A., Szczudlik L., Pawlik M., Zajac K., Mak M., Basta A. (2010) *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, **2**, 411-423.
58. Belfort-Mattos P.N., Focchi G.R., Speck N.M., Taha N.S., Carvalho C.R., Ribalta J.C. (2010) *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **31**, 459-461.
59. Mandic A.I., Knezevic U.S., Ivovic K.T. (2014) *J. BUON*, **19**, 958-964.
60. Imai N., Hashimoto T., Kihara M., Yoshida S., Kawana I., Yazawa T., Kitamura H., Umemura S. (2007) *Lab. Invest.*, **87**, 189-198.
61. Watanabe Y., Shibata K., Kikkawa F., Kajiyama H., Ino K., Hattori A., Tsujimoto M., Mizutani S. (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**, 6497-6503.
62. Shibata K., Kikkawa F., Mizokami Y., Kajiyama H., Ino K., Nomura S., Mizutani S. (2005) *Tumour Biol.*, **26**, 9-16.
63. Suganuma T., Ino K., Shibata K., Kajiyama H., Nagasaka T., Mizutani S., Kikkawa F. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 2686-2694.
64. Ino K., Shibata K., Kajiyama H., Yamamoto E., Nagasaka T., Nawa A., Nomura S., Kikkawa F. (2006) *Br. J. Cancer*, **94**, 552-560.
65. Park Y.A., Choi C.H., Do I.G., Song S.Y., Lee J.K., Cho Y.J., Choi J.J., Jeon H.K., Ryu J.Y., Lee Y.Y., Kim T.J., Bae D.S., Lee J.W., Kim B.G. (2014) *Gynecol. Oncol.*, **135**, 108-117.
66. Kikkawa F., Mizuno M., Shibata K., Kajiyama H., Morita T., Ino K., Nomura S., Mizutani S. (2004) *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **190**, 1258-1263.
67. Carbajo-Lozoya J., Lutz S., Feng Y., Kroll J., Hammes H.-P., Wieland T. (2012) *Cellular Signalling*, **24**, 1261-1269.

68. Elisseeva Y.E., Pavlikhina L.V., Orekhovich V.N., Giacomello A., Salerno C., Fasella P. (1981) Biochim. Biophys. Acta, **658**, 165-168.

69. Соловьева Н.И., Тимошенко О.С., Кугаевская Е.В., Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э. (2014) Биоорганическая химия, **40**, 743-751.

Поступила: 15. 04. 2015.

ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME: THE ANTIGENIC PROPERTIES OF THE DOMAIN, ROLE IN ALZHEIMER'S DISEASE AND TUMOR PROGRESSION

E.V. Kugaevskaya, O.S. Timoshenko, N.I. Solovyeva

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119992 Russia; tel.: (499)2465072; e-mail: Elena.Kugaevskaya@ibmc.msk.ru

Angiotensin converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) was discovered and characterized in the Laboratory of biochemistry and chemical pathology of proteins under the direction of academician V.N. Orekhovich, where its physiological function, associated with a key role in the regulation of the renin-angiotensin (RAS) and the kallikrein-kinin systems that control blood flow in the body and homeostasis was first deciphered. We carried out a search for structural differences between the two highly homologous domains (N- and C-domains) of somatic ACE (sACE); it was based on a comparative analysis of antigenic determinants (or B-epitopes) of both domains. The revealed epitopes were classified with variable and conserved regions and functionally important sites of the molecule ACE. Essential difference was demonstrated between locations of the epitopes in the N- and C-domains. These data indicate the existence of structural differences between the domains of sACE.

We studied the role of the domains of ACE in the metabolism of human amyloid beta peptide (A β) – the main component of senile plaques, found in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD). Our results demonstrated that only N-domain ACE cleaved the A β between residues R5–H6, while, the C-domain of ACE failed to hydrolyze this region. In addition, the effect of post-translational modifications of A β on its hydrolysis by the ACE was investigated. We show that isomerization of residue D7, a common non-enzymatic age-related modification found in AD-associated species, does not reduce the affinity of the peptide to the N-domain of ACE, and conversely, it increases. According to our data, the role of ACE in the metabolism of A β becomes more significant in the development of AD.

RAS is involved in malignant transformation and tumor progression. RAS components, including ACE and angiotensin II receptors type 1 (AT1R) are expressed in various human tumors. We found a significant increase in the level of ACE activity in the tumor tissue of squamous cell carcinoma of the cervix. In our viewpoint, the increase in ACE activity may be a marker of poor clinical prognosis.

Key words: angiotensin converting enzyme, antigenic determinants, Alzheimer's disease, amyloid beta peptide, tumor progression, squamous cervical carcinoma.