



УДК 577.152.341\*51

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

© 1998 г. Ю. Е. Елисева<sup>#</sup>

НИИ биомедицинской химии РАМН, 119832, Москва, Погодинская ул., 10

Поступила в редакцию 20.11.97 г. Принята к печати 29.12.97 г.

В обзоре представлены данные о структуре и функциональной роли в различных тканях организма ангиотензинпревращающего фермента (АПФ, пептидил-дипептидаза А), ключевого фермента регуляции кровяного давления. Обсуждаются сходство и различия высокомолекулярных каталитически активных N- и C-доменов полипептидной цепи АПФ. Предполагается, что домены могут иметь разные функции в организме. Охарактеризованы природные активные формы АПФ, состоящие из одного N- или C-домена.

*Ключевые слова:* ангиотензинпревращающий фермент, гомологичные домены, гидролиз, регуляторные пептиды, ингибиторы.

Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ, пептидил-дипептидаза А, КФ 3. 4. 15. 1), ключевой фермент ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем [1–3], играет существенную роль в регуляции артериального давления (АД). Эта роль подтверждается данными многочисленных экспериментальных исследований, а также успешным применением ингибиторов АПФ в клиниках всего мира при лечении ряда сердечно-сосудистых заболеваний [4–6]. Ингибиторы АПФ квалифицируются как лекарство номер один для лечения различных форм гипертонии и сердечно-сосудистой недостаточности и оказались эффективными средствами в терапии инфаркта миокарда [7]. Ингибиторы АПФ оказывают также и антиатерогенное действие, приводят к регрессии атеросклеротического процесса [8, 9].

Регуляция АД – это основная, но не единственная функция АПФ. Он участвует в целом ряде процессов, протекающих в организме, вовлечен в реализацию таких функций, как обмен нейропептидов, репродуктивные процессы, а также защитные и иммунные реакции организма [10–13]. Недавно было обнаружено, что АПФ является физиологическим регулятором концентрации в плазме пептида N-AcSer-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), влияющего на пролиферацию гематопозитических (и других типов) клеток [14, 15].

Участие фермента в том или ином процессе определяется как его локализацией, так и особен-

ностью действия на регуляторные пептиды. АПФ широко распространен в организме [2, 3, 11, 16, 17]. Он относится к гликопротеидам, в основном существует в виде мембраносвязанной формы и является интегральным белком плазматической мембраны I типа. Почти вся молекула АПФ, представляющая собой одну полипептидную цепь, локализована экстрацеллюлярно, гидрофобный трансмембранный участок (17 а.о.) находится в положении 1230–1247, внутриклеточный гидрофильный C-конец состоит всего из 30 остатков [18]. Имеется и растворимая форма АПФ [2, 3, 11, 16, 19], отличающаяся от мембраносвязанной отсутствием трансмембранного и внутриклеточного участков [17, 20].

Мембраносвязанная форма АПФ располагается на поверхности клеток (табл. 1) [2, 3, 10, 11, 16, 19]. Высокое содержание фермента показано в эндотелиальных клетках, где он участвует в регуляции АД, в эпителиальных клетках, имеющих ворсинчатую структуру и располагающихся в местах, где происходит интенсивное всасывание или выделение жидкости и солей, а также в репродуктивных органах. Участие АПФ в репродуктивных процессах не вызывает сомнения, хотя его конкретная роль пока еще неясна. Распределение АПФ по структурам мозга очень неравномерно. Наиболее высокое содержание его отмечается в ядрах мозга, контролирующих АД и водно-солевой обмен, и в ряде структур, где он, по-видимому, участвует в метаболизме нейропептидов [10, 16, 19, 21]. На моноцитах [12, 22] и лимфоцитах [23], циркулирующих в крови, а также на макрофагах [12, 24] и фибробластах [13] содержание АПФ невелико, но резко увеличивается в культу-

Сокращения: АПФ – ангиотензинпревращающий фермент, АД – артериальное давление, fM – формилметионин, Glp, < E – широглутаминовая кислота, Hip – Vz-глицин.

<sup>#</sup> Тел.: (095) 246-86-88, факс: (095) 245-08-57.

Таблица 1. Локализация и функции АПФ в организме млекопитающих [2, 3, 16, 19]

| Локализация   | Функция   |
|---|---|
| <b>Мембраносвязанная форма</b>  |   |
| <i>Эндотелиальные клетки сосудов</i><br>Артерии, вены, капилляры  | Сокращение сосудов, стимуляция синтеза гормонов, регуляция АД         |
| <i>Эпителиальные клетки ворсинок</i><br>Канальцы почек, слизистая кишечника, сосудистые сплетения мозга, цилиарное тело глаза, плацента | Всасывание ионов и воды, транспорт ионов                              |
| <i>Эпителиальные клетки</i><br>Репродуктивные органы  | Сперматогенез, овуляция   |
| <i>Нервные клетки, ЦНС</i><br>Дендриты, аксоны, нервные окончания   | Центральная регуляция АД, обмен нейрорепептидов, водно-солевой баланс |
| <i>Мононуклеарные клетки</i><br>Моноциты, макрофаги, фибробласты, лимфоциты   | Воспаление, регенерация, иммунные реакции                             |
| <b>Растворимая форма</b>  |   |
| <i>Биологические жидкости</i><br>Плазма, лимфа, слезы, спинномозговая, внутриглазная, амниотическая и другие жидкости                   | ?   |

ре клеток или при активации клеток [12, 24]. Недавно было обнаружено, что АПФ является также компонентом тканей, богатых фибриллярным коллагеном (матрикс сердечных клапанов, рубцы, образующиеся в результате инфаркта миокарда, и др.), и что его содержание повышается с усилением фиброза [25]. Предполагается, что он может оказывать влияние на состав экстраклеточного матрикса, в частности на синтез коллагена [26]. Обнаруженное недавно скопление АПФ в атеросклеротических бляшках в стенках сосудов [24] указывает на участие фермента в патофизиологии атеросклероза.

Растворимая форма АПФ присутствует в плазме и практически во всех биологических жидкостях [2, 16, 19]. Наиболее хорошо изучен АПФ плазмы [1–3]. В пользу его физиологической значимости свидетельствует более высокое (в 3 раза) по сравнению с мембранным ферментом содержание в нем сиаловой кислоты [2], которая, как известно, защищает гликопротеины от удаления их из циркулирующей крови. Освобождение растворимой формы фермента из мембраносвязанной происходит в результате отщепления С-концевого якорного фрагмента [20, 27, 28]. Эта реакция ограниченного протеолиза осуществляется охарактеризованной недавно мембраносвязанной специфичной металлопротеиназой (секретазой) [27], близкой по свойствам к другим секретазам, составляющим группу родственных ферментов. Они находятся на поверхности плазматической мембраны клеток и освобождают с поверхности

клетки физиологически активные белки, включая ферменты и некоторые рецепторы [28].

АПФ, как и другие мембраносвязанные ориентированные экстраклеточно пептидазы [29], является регулятором пептид-медирированной активности. Причем в процессах, не связанных с регуляцией АД, в частности в обмене регуляторных пептидов, АПФ, как правило, участвует совместно с рядом протеолитических ферментов, также находящихся на поверхности плазматической мембраны [30, 31]. При действии на физиологические субстраты АПФ может вызывать либо превращение неактивной формы в активную (например, ангиотензин I в ангиотензин II), либо их инактивацию (брадикинин, энкефалины, нейро-тензин, вещество P, люлиберин, AcSDKP), либо трансформацию активности пептида – например, превращение гептапептида Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe в [Met<sup>5</sup>]энкефалин (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) приводит к снижению анальгетической активности, а превращение атриопептина II в атриопептин I ведет к потере пептидом спазмолитического действия при сохранении натрийуретического [3].

АПФ отщепляет в основном С-концевые дипептиды от олигопептидов различного строения, имеющих свободную карбоксильную группу [1–3]. Классические природные субстраты АПФ – ангиотензин I и брадикинин – пептиды, участвующие в регуляции АД. Участвуя в метаболизме ряда биологически активных пептидов (табл. 2), АПФ в некоторых случаях может гидролизовать и пептиды с заблокированным С-концом (хотя и существ-

Таблица 2. Регуляторные пептиды – субстраты АПФ [3]

| Пептиды                          | Структура и место гидролиза              |
|----------------------------------|--|
| Ангиотензин I                    | DRVYIHPF-HL<br>↓                         |
| Брадикинин                       | RPPGF-SP-FR<br>↓ ↓                       |
| des-Arg <sup>9</sup> -брадикинин | RPPGF-SPF<br>↓                           |
| Хемотактический пептид           | fM-LF<br>↓                               |
| Гемопоэтический пептид           | AcSD-KP<br>↓                             |
| Энкефалин:                       |  |
| пентапептид                      | YGG-FL<br>↓                              |
|                                  | YGG-FM<br>↓ ↓                            |
| гептапептид                      | YGG-FM-RF<br>↓                           |
| октапептид                       | YGGFMR-GL<br>↓ ↓ ↓ ↓                     |
| Вещество P                       | RP-KP-QQ-FF-GLM-NH <sub>2</sub><br>↑ ↑ ↑ |
| Аналог вещества P                | RPKPQ-QF-FG-LM<br>↓                      |
| Нейротензин                      | <ELYENKPRRPY-IL<br>↓ ↓                   |
| Люлиберин                        | <ENW-SYGL-RPG-NH <sub>2</sub><br>↓       |
| Атриопептин II                   | RSSCFGGRIDRIGAGSGLGCNS-FR<br>↓           |

венно медленнее, чем их аналоги со свободной концевой карбоксильной группой) и отщеплять не только дипептиды, но и трипептиды, причем подобное действие фермента строго ограничено особенностями структуры пептидного субстрата. Так, от вещества P фермент отщепляет как амид дипептида, так и амид трипептида, после чего в обоих случаях освобождает только дипептиды. От аналога же вещества P, имеющего свободную карбоксильную группу, он отщепляет только дипептиды. В то же время АПФ не расщепляет нейрокинины А и В, имеющие такую же последовательность трех С-концевых остатков (-Gly<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Met<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>), как и у вещества P, но отличающиеся предыдущим остатком (Val<sup>7</sup> вместо Phe<sup>7</sup> у вещества P). АПФ также может отщеплять концевой трипептид (Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>) от des-Arg<sup>9</sup>-брадикинина, образующегося в организме после удаления С-концевого остатка Arg<sup>9</sup> карбоксипептидазой N. Однако аналоги des-Arg<sup>9</sup>-брадикинина, полученные при замещении Ser<sup>6</sup> на His, Phe или Gly, не гидролизуются АПФ, как и ангиотензин II, имеющий близкую по строению С-концевую последовательность -His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>. От декапептида люлиберина, у которого оба конца заблокированы, АПФ отщепляет не только С-концевой (Arg<sup>8</sup>-Pro<sup>9</sup>-Gly<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>), но и N-концевой (Glp<sup>1</sup>-His<sup>2</sup>-Trp<sup>3</sup>) трипептиды, что оказалось полной неожиданностью. Видимо, такое необычное действие АПФ на люлиберин можно объяснить, по крайней мере частично, отсутствием зарядов на обоих концах его молекулы [3, 17, 19].

К характерным свойствам АПФ, отличающим его от многих других протеиназ, относится активация ионами хлора, которые являются аллостерическим активатором фермента [1–3, 17]. Связывание ионов хлора вызывает конформационные изменения в молекуле фермента, что приводит к повышению его сродства к целому ряду субстратов, которые в отсутствие ионов хлора практически не взаимодействуют с АПФ, как, например, ангиотензин I (в то же время брадикинин

хорошо гидролизуются и в отсутствие ионов хлора), а также к стабилизации фермент-субстратного комплекса. Оптимальная концентрация ионов хлора варьирует от 0 до 300–500 мМ главным образом в зависимости от структуры двух С-концевых остатков субстрата.

АПФ, металлопротеиназа, содержащая в активном центре атом цинка, относится к классу цинкинов, как и термоллизин (КФ 3.4.24.27), нейтральная эндопептидаза (КФ 3.4.24.11) и коллагеназы [32]. Молекула АПФ эндотелиальных клеток человека (1277 а.о. после отщепления сигнального пептида) содержит 14 цистеиновых остатков и 17 предполагаемых углеводсвязывающих участков [33]. Эта форма АПФ, по-видимому, синтезируется во всех соматических клетках, за исключением семенников [16, 34]. Она характеризуется высокой степенью внутренней гомологии, содержит два больших высокогомологичных домена (N- и С-домены) (рис. 1), которые имеют 67.7% идентичных остатков, причем в центральной части доменов идентичность составляет 89% [16, 33]. Подтверждение тому, что такая особенность структуры АПФ является результатом дубликации гена, кодировавшего однодоменный фермент, было получено при определении структуры гена [35]. Оба домена каталитически активны, но не равноценны. Они различаются скоростью катализируемого ими гидролиза пептидов, степенью торможения специфичными ингибиторами, профилем активации ионами хлора [11, 17, 36–38] и специфичностью к антигенам [39]. Предполагается, что эти различия имеют существенное физиологическое значение.

Активные центры доменов функционируют независимо, активность нативного фермента представляет собой сумму активностей доменов [36, 37]. Каждый из доменов содержит атом цинка; в полипептидной цепи доменов АПФ имеются участки, сходные с цинксвязывающими мотивами активных центров ряда хорошо изученных цинк-металлопротеиназ, таких, как термоллизин и нейтральная эндопептидаза 24.11 [32, 33] (рис. 2). Аналогичные по строению участки недавно были обнаружены и в эндотелинпревращающем ферменте, который катализует последний этап в биосинтезе сильного прессорного пептида эндотелина [40]. В АПФ роль иона цинка в катализе, по всей вероятности, аналогична его роли в активном центре этих протеиназ. Мутантные формы АПФ, полученные в результате точечной замены аминокислотных остатков в предполагаемых активных центрах обоих доменов, были полностью неактивны [36], что подтвердило участие этих остатков в формировании активного центра АПФ.

Активные изоформы АПФ, включающие только один из доменов и содержащие по одному активному центру (рис. 1), обнаружены в организ-

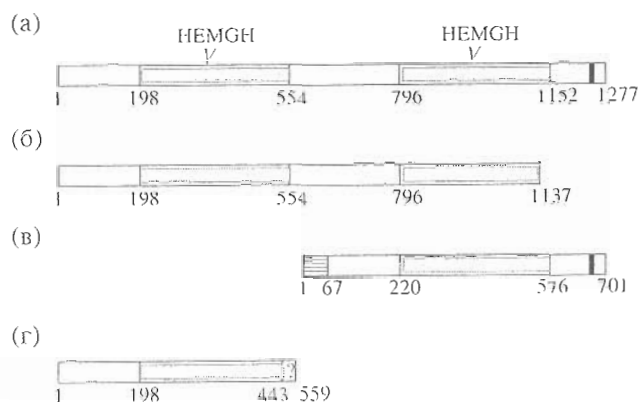


Рис. 1. Схема строения АПФ из ряда тканей человека: (а) – клеток эндотелия [33], (б) – плазмы [20], (в) – семенников [16, 34], (г) – «кишечной жидкости» (С-концевой остаток пока не определен, но установлено, что он находится между 443-м и 559-м а.о.) [41]; цифры соответствуют положению аминокислотных остатков в полипептидной цепи фермента. Гомологичные N- и С-домены заштрихованы; трансмембранный участок – черный прямоугольник; уникальный участок тестикулярного АПФ (1–67 а.о.) заштрихован горизонтально. НЕМGH – участок, содержащий остаток гистидина, связывающийся с цинком.

|             |      |       |       |        |
|-------------|------|-------|-------|--------|
| Термоллизин | 142  | 146   | 166   |        |
|             | VVAH | ELTH  | ----- | EAISD  |
| НЭП 24.11   | 583  | 587   |       | 646    |
|             | VIGH | ELTH  | ----- | EIA D  |
| ЭПФ         | 591  | 595   |       | 651    |
|             | HE   | XXH   | ----- | E      |
| N-Домен АПФ | 361  | 365   |       | 389    |
|             | TVNH | HEMGH | ----- | EALIGD |
| С-Домен АПФ | 959  | 963   |       | 987    |
|             | VAH  | HEMGH | ----- | EALIGD |

Рис. 2. Цинксвязывающие мотивы в термоллизине, нейтральной эндопептидазе 24.11 (НЭП 24.11), эндотелинпревращающем ферменте (ЭПФ) и N- и С-доменах АПФ. Остатки аминокислот, участвующие в связывании цинка, выделены жирным курсивом; остатки, участвующие в катализе, – жирным прямым шрифтом. Цифры над остатками указывают их положение в полипептидной цепи соответствующего фермента.

ме. Так, в семенниках человека и молокапитающих синтезируется АПФ (тестикулярный) [16, 17, 34], полипептидная цепь которого (701–705 а.о.) идентична, за исключением первых 67 а.о., С-концевой части молекулы АПФ из других органов. Обе изоформы кодируются одним геном, но различаются местом начала транскрипции [35]. В «кишечной жидкости», полученной из кишечника больших при хирургической операции [41], и в моче человека [42] обнаружена растворимая форма АПФ, соответствующая N-домену. Происхождение ее пока неясно. Предполагается, что в молекуле АПФ между N- и С-доменами имеется участок, доступный для ферментативного рас-

Таблица 3. Гидролиз субстратов доменами АПФ

| Субстрат                | Структура и место гидролиза       | Относительная скорость гидролиза* |         | Ссылка |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------|--------|
|                         |                                   | N-домен                           | C-домен |        |
| Гемопозитический пептид | AcSD-KP<br>↓                      | 50                                | i       | [49]   |
| Люлиберин               | <EHW-SYGLRPG-NH <sub>2</sub><br>↓ | 30                                | 1       | [38]   |
|                         | <EHWSYGL-RPG-NH <sub>2</sub><br>↓ |                                   |         |        |
| Энкефалин-гептапептид   | YGGFM-RF<br>↓                     | 5                                 | 1       | [48]   |
|                         | RPKPQQFF-GLM-NH <sub>2</sub><br>↓ |                                   |         |        |
| Вещество P              | RPKPQQFF-GLM-NH <sub>2</sub><br>↓ | 1                                 | 4       | [38]   |
|                         | RPKPQQFFG-LM-NH <sub>2</sub><br>↓ | 1                                 | 2       |        |
| Аналог вещества P       | RPKPQQFFG-LM<br>↓                 | 4                                 | 1       | [38]   |
| Ангиотензин I           | DRVYIHPF-HL<br>↓                  | 1                                 | 3       | [36]   |
|                         | BzG-HL<br>↓                       | 1                                 | 10      | [36]   |
| Брадикинин              | ZF-HL<br>↓                        |                                   | ≡       | [36]   |
|                         | RPPGFSP-FR<br>↓                   |                                   | ≡       | [38]   |
|                         | RPPGF-SP<br>↓                     |                                   | ≡       |        |

\* В каждом случае меньшая из сопоставляемых скоростей гидролиза принята за 1 единицу.

щепления. Таким образом, N-домен может освобождаться или из находящегося в растворе полноразмерного фермента, или из мембраносвязанной формы, оставляя C-домен на мембране [41]. В принципе такой процесс может происходить где угодно в организме. В подтверждение этого предположения из очищенного АПФ почек человека в результате реакций ограниченного протеолиза были получены активные N- и C-домены. Эндопроотеиназа Asp-N расщепляла связи между N- и C-доменами (Thr<sup>615</sup>-Asp<sup>616</sup>) и в примембранной области (Leu<sup>1219</sup>-Asp<sup>1220</sup>), освобождая оба домена [43]. Кроме того, в культуре эпителиальных клеток бронхов обнаружены изоформы АПФ неизвестной структуры с молекулярной массой 52 и 47 кДа [44]. Нельзя исключить, что эти изоформы представляют собой C-домены, оставшиеся после удаления N-домена.

Каталитические свойства доменов АПФ человека изучали, либо сравнивая свойства соматического и тестикулярного (включающего только один C-домен) ферментов [45, 46], либо используя мутантные формы фермента, состоящие из одного N- или C-домена, и полноразмерные, имеющие точечные мутации в области предполагаемого

активного центра одного из доменов (замена остатков Glu362 или Glu960 на Asp; или остатков His361 и His365 в N-доме или His959 и His963 в C-доме на Lys) [36]. По исследованным энзиматическим свойствам мутанты, представляющие собой один из доменов, соответствовали полноразмерным мутантам с интактным аналогичным доменом и инактивированным вторым доменом. Природная изоформа АПФ из "кишечной жидкости" человека [41, 47] по профилю активации ионами хлора и по отношению к субстратам соответствовала мутантному N-доме. Полученные из АПФ почек человека фрагменты, соответствующие N- и C-доменам [43], по кинетическим характеристикам также были близки мутантным доменам. Исследования, проведенные на полученных мутантных ферментах (шесть различных мутантов, каждый из которых имел только один интактный домен), позволили выявить различия доменов [36–38]. Так, ионы хлора в существенно большей степени влияли на активность C-домена, чем N-домена. В отсутствие ионов хлора все мутанты, содержащие интактный C-домен, были практически неактивны; максимальная активность наблюдалась при довольно высокой кон-

центрации ионов хлора (до 800 мМ в зависимости от субстрата). В то же время N-домен сохранял активность в отсутствие ионов хлора и максимально активировался при весьма низкой их концентрации (10–15 мМ). Можно предполагать, что ионы хлора являются фактором, определяющим вклад каждого домена в общую активность фермента. При нормальных физиологических условиях в крови (концентрация ионов хлора около 100 мМ) С-домен, вероятно, ответствен за большую часть превращения ангиотензина I.

Каждый из доменов гидролизовал одинаковые пептидные связи во всех исследованных пептидах, но с разной скоростью. Так, от ангиотензина I и трипептида Hip-His-Leu С-концевые дипептиды отщеплялись С-доменом с большей скоростью, чем N-доменом (табл. 3), хотя значения  $K_m$  для обоих доменов были практически одинаковы [36]. Кинетические же константы отщепления от брадикинина последовательно дипептидов Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> и Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup> были близки для обоих доменов [38]. При сравнительном исследовании расщепления обоими доменами и полноразмерным АПФ различных энкефалинов [48] было обнаружено, что пятичленные [Leu<sup>5</sup>]- и [Met<sup>5</sup>]энкефалины расщеплялись быстрее С-доменом, но в гептапептиде Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe связь Met<sup>5</sup>-Arg<sup>6</sup> гидролизывалась быстрее N-доменом, причем число оборотов фермента в отношении этого субстрата (7600 мин<sup>-1</sup>) было самым высоким по сравнению со всеми известными природными субстратами АПФ. Весьма вероятно, что *in vivo* в превращении гептапептида в [Met<sup>5</sup>]энкефалин N-домен АПФ играет преимущественную роль.

Специфичным для N-домена природным субстратом оказался пептид N-AcSer-Asp-Lys-Pro, тормозящий гемопоэз [49]; С-доменом этот пептид гидролизывался в 50 раз медленнее. Это обусловлено различием величин  $k_{cat}$ , так как значения  $K_m$  для гидролиза этого пептида нативным ферментом и полноразмерными мутантами, содержащими активный N- или С-домен, были близки. Поскольку нативный АПФ и мутант с активным только N-доменом гидролизывали AcSer-Asp-Lys-Pro почти с одинаковой скоростью, а торможение АПФ *in vivo* приводило к резкому увеличению концентрации пептида в плазме [15], можно предполагать, что и в организме расщепление пептида происходит главным образом N-доменом. Люлиберин гидролизывается обоими доменами, но отщепление N-концевого трипептида N-доменом происходит с существенно большей скоростью (в 30 раз), чем С-доменом [38]. Моноклональные антитела, ингибирующие активность N-домена, тормозили гидролиз люлиберина нативным полноразмерным ферментом более чем на 90% [39], что подтверждает преимущественное расщепление люлиберина N-доменом и в нативном ферменте. С результатами, полученными на мутант-

**Таблица 4.** Торможение активности доменов АПФ (субстрат Hip-His-Leu) [37]

| Ингибитор      | [Cl <sup>-</sup> ], мМ | K <sub>i</sub> , нМ |         |         |
|----------------|------------------------|---------------------|---------|---------|
|                |                        | Нативный АПФ        | N-Домен | С-Домен |
| Каптоприл      | 300                    | 13                  | 8.9     | 14      |
|                | 20                     | —                   | 9.1     | 111     |
| Эналаприлат    | 300                    | 6.5                 | 26      | 6.3     |
|                | 20                     | —                   | 31      | 78      |
| Лизиноприл     | 300                    | 3.9                 | 44      | 2.4     |
|                | 20                     | —                   | 42      | 27      |
| Трандолаприлат | 300                    | 0.45                | 3.1     | 0.29    |
|                | 20                     | —                   | 3.3     | 2.2     |

ных ферментах, согласуются ранее имевшиеся данные о существенно большей скорости отщепления N-концевого трипептида люлиберина соматическим АПФ по сравнению с тестикулярным ферментом (87% гидролиза происходило за счет N-домена соматического АПФ) [45, 46]. Тестикулярный же фермент отщеплял преимущественно С-концевой трипептид [46].

Специфичные ингибиторы АПФ в разной степени тормозят активность N- и С-доменов [11, 17, 37, 47], что обусловлено в основном различием в скорости диссоциации фермент-ингибиторных комплексов (скорости ассоциации ингибитора с ферментом для обоих доменов очень близки) [37]. Влияние ионов хлора, которые стабилизируют фермент-ингибиторный комплекс каждого из доменов, замедляя процесс диссоциации, более выражено для С-домена по сравнению с N-доменом (при концентрации 300 мМ NaCl скорость диссоциации комплекса с трандолаприлатом уменьшалась в 1100 и 30 раз соответственно).

Исследование взаимодействия <sup>125</sup>I-меченых ингибиторов Ro31-8472 (производное цилазаприлата) и 351А (аналог лизиноприла), различавшихся длиной боковой цепи, с N- и С-доменами разных изоформ АПФ подтвердило предположение [37, 39] о существовании структурных различий между активными центрами доменов. Было обнаружено, что с С-доменом связывались оба ингибитора, а с N-доменом связывался только один из них (Ro31-8472), имеющий меньшие размеры [50]. Используемые в клинике ингибиторы эффективно тормозят активность обоих доменов ( $K_i$  порядка 10<sup>-9</sup> М) (табл. 4). Однако если при взаимодействии с N-доменом они по эффективности образуют ряд каптоприл > эналаприлат > лизиноприл (что также отражает зависимость эффективности взаимодействия от длины боковой цепи), то для С-домена порядок был обратный [37]. В зависимости от преимущественного взаимодей-

ствия ингибиторов АПФ с одним из двух активных центров может варьировать их биологический эффект при применении их как лекарств. Так, предполагается, что более высокая эффективность применения периндоприла по сравнению с эналаприлом при диабетической экспериментальной нефропатии крыс обусловлена преимущественным торможением им С-домена [51]. Различающаяся же специфичность ингибиторов (каптоприл, эналаприлат, делаприлат) по отношению к АПФ из разных тканей, по всей вероятности, обусловлена разной степенью гликозилирования АПФ разных органов [52].

Для понимания каталитических механизмов АПФ на молекулярном уровне большое значение имеет идентификация участков доменов, ответственных за их различие. На основании мутантных N- и С-доменов были получены две химеры [53]. Химера 1 представляла собой N-домен, в который вместо остатков 331–391 был встроены 60-членный пептид, соответствующий остаткам 929–989 из С-домена: НАСАWDFYNGKDFRIKQCTI-VNLEDLVVANHEM~~GH~~IY~~F~~EMQYKDL~~PV~~ALR~~E~~GANPGFHEAI. Химера 2 – это С-домен, содержащий вместо остатков 929–989 остатки 331–391: НАСАWDFYNRKDFRIKQCTRV~~TMDQLSTVHN~~EM~~GH~~IY~~Y~~LQYKDL~~PV~~SLRRGANPGFHEAI из N-домена. Каждая из химерных молекул отличалась от соответствующего мутантного домена 13 а.о. (подчеркнуты). Поскольку антитела к N-домену связывались с химерой 1 очень слабо (3–4% по сравнению со связыванием с N-доменом) и не связывались вовсе с химерой 2 (как и с С-доменом), можно предполагать, что конформация химеры 1 отличается от конформации N-домена. Полученные химеры, однако, по соотношению  $k_{\text{кат}}$  гидролиза субстратов Z-Phe-His-Leu (гидролизуются обоими доменами примерно с одинаковой скоростью) и Hip-His-Leu (гидролизуются преимущественно С-доменом) (табл. 3) не отличались от соответствующего домена. По-видимому, остатки аминокислот, отличающие химеру от соответствующего домена, не ответственны за различие в гидролизе исследованных субстратов доменами.

В настоящее время пространственная структура АПФ неизвестна, но на основании косвенных данных можно предполагать в ней тесный контакт между доменами. В частности, N-домен тормозит переход мембранного фермента в растворимую форму [20, 54]. В нормальных условиях секретазой за 1 ч освобождается менее 2% от имеющегося на мембране фермента, т.е. существенно большая часть АПФ остается на клетке. Мутантный фермент, не содержащий N-домена, освобождался в 10 раз быстрее, чем полноразмерный фермент, и при этом гидролизовалась пептидная связь (Arg<sup>1227</sup>-Val<sup>1228</sup>), находящаяся ближе к трансмембранному участку, чем в полноразмерном ферменте (Arg<sup>1137</sup>-Leu<sup>1138</sup>). На основании

полученных данных предполагается, что N-домен расположен вблизи стебелькового участка (область между концом глобулярной части С-домена и гидрофобным трансмембранным участком) молекулы. Взаимодействуя со стебельковой зоной АПФ и/или самой секретазой, он может быть “конформационным ингибитором” реакции ограниченного протеолиза при освобождении мембраносвязанного АПФ. Кроме того, возможно, что активные центры обоих доменов находятся на близком расстоянии, так как моноклональные антитела к N-домену, тормозившие активность мутантного N-домена, но не взаимодействовавшие с С-доменом [39, 45], тормозили активность обоих доменов нативного полноразмерного фермента и активность С-домена в мутантном полноразмерном АПФ с неактивным N-доменом. Хотя при этом нельзя исключить возможность изменения конформации молекулы в результате взаимодействия с антителом, что может мешать последующему связыванию субстрата с обоими активными центрами или затруднять или предотвращать доступ субстрата к ним.

Молекулы АПФ млекопитающих (быка [55], мыши [56], крысы [57], кролика [58]) по первичной структуре близки между собой и с АПФ человека [33] (идентичность составляет 80–90%) и содержат высокоомологичные домены. Однако до сих пор исследовали каталитические свойства доменов только АПФ человека.

АПФ-подобные протеиназы, похожие по свойствам на АПФ млекопитающих, были недавно обнаружены у насекомых (*Drosophila melanogaster* [59], *Haematobia irritans* (Buffalo fly) [60], *Musca domestica* [61]). Эти протеиназы активны по отношению к ионам хлора и гидролизуют в субстратах АПФ те же пептидные связи, что и АПФ млекопитающих. Они превращают ангиотензин I в ангиотензин II, разрушают брадикинин и гидролизуют другие физиологические субстраты АПФ [59–61], хотя и менее эффективно [59, 61]. Специфические ингибиторы АПФ млекопитающих (каптоприл и трандолаприлат) тормозят активность ферментов насекомых ( $IC_{50}$   $1.1 \times 10^{-9}$  и  $1.6 \times 10^{-8}$  М соответственно, что сравнимо с эффективностью торможения ими АПФ человека). В отличие от АПФ млекопитающих ферменты насекомых являются в основном секретуруемыми ферментами, состоят из одного домена (594–598 а.о.), в котором отсутствует гидрофобный трансмембранный участок. По первичной структуре они очень близки между собой. Гены АПФ-подобных ферментов насекомых существенно меньшего размера, чем ген АПФ млекопитающих. Предполагается, что дивергенция генов произошла около 450 млн. лет назад, до дупликации (около 270 млн. лет назад) [59].

АПФ-подобные ферменты насекомых представляют особый интерес, поскольку большая часть их полипептидной цепи, за исключением концевых участков, в высокой степени гомологична как N-, так и C-домену АПФ человека (особенно в области участков активного центра), и по своим каталитическим свойствам они одновременно близки и к N-, и к C-домену этого фермента. Так, АПФ домашней мушки гидролизует пептиды и в отсутствие ионов хлора, и при высокой (300–500 мМ) их концентрации, причем в отсутствие ионов хлора специфичность фермента ближе к специфичности N-домена, а при высокой их концентрации ближе к специфичности C-домена. Например, отщепление N-концевого трипептида от люлиберина этим ферментом гораздо слабее зависит от концентрации ионов хлора, чем отщепление C-концевого трипептида.

В последние годы отмечается существенный прогресс в изучении АПФ. Выявлены особенности АПФ, позволяющие расширить представления о его роли в организме и участии в ряде патологических процессов. Обнаружение высокой степени внутренней гомологии в молекуле АПФ привело к выявлению двух каталитически активных доменов. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о существовании структурно-функциональных различий между активными центрами обоих доменов АПФ. Вопрос о биологической роли каждого из доменов и механизмах регуляции активности АПФ в организме до сих пор остается неясным. В пользу физиологической значимости доменов свидетельствует присутствие в организме изоформ АПФ, состоящих из одного N- или C-домена, а также природных субстратов N-домена. Это позволяет предполагать возможность существования для каждого из доменов специфичных эндогенных субстратов. Разное взаимодействие ингибиторов АПФ с N- и C-доменами позволяет рассматривать возможность получения ингибиторов АПФ, специфичных для каждого из активных центров. Такие ингибиторы нужны как для выяснения структурных основ, обуславливающих различие доменов, так и для использования их в клинике, поскольку преимущественное торможение ингибитором одного из двух активных центров АПФ может отражаться на его эффекте при лечении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erdős E.G. // Handbook of Experimental Pharmacology. 1979. V. 25. Suppl. 5. P. 438–487.
2. Soffer R.L. // Biochemical Regulation of Blood Pressure / Ed. R.L. Soffer. N.Y.: Wiley, 1981. P. 123–164.
3. Елисеева Ю.Е. // Успехи биол. химии. 1993. Т. 33. С. 106–129.
4. Todd P.A., Heel R.C. // Drugs. 1986. V. 31. P. 198–248.
5. Mapeev B.Yu. // Кардиология (Kardiologia). 1994. Т. 34. С. 4–11.
6. Brunel P., Agabitirosi E. // Clin. Drug Invest. 1996. V. 12. P. 226–243.
7. Torppedersen C., Kober L., Carlsen J. // Am. Heart J. 1996. V. 132. Suppl. 1. Pt. 2. P. 235–243.
8. Kowala M.C., Recce R., Beyer S., Aberg G. // J. Cardiovascular Pharmacol. 1995. V. 25. P. 179–186.
9. Fennessy P.A., Campbell J.H., Mendelsohn F.A.O., Campbell G.R. // Clin. Exper. Pharmacol. Physiol. 1996. V. 23. P. S30–S32.
10. Ehlers M.R.W., Riordan J.F. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 5311–5318.
11. Johnston C.I. // J. Hypertension. 1992. V. 10. Suppl. 7. P. S13–S26.
12. Costerousse O., Jaspard E., Alhenc-Gelas F. // Adv. Neuroimmunol. 1993. V. 3. P. 217–226.
13. Sun Y., Weber K.T. // J. Mol. Cell. Cardiol. 1996. V. 28. P. 851–858.
14. Rieger K.J., Saezservent N., Papet M.P., Wdzieczakbakala J., Morgat J.L., Thierry J., Voelter W., Lenfant M. // Biochem. J. 1993. V. 296. P. 373–378.
15. Azizi M., Rousseau A., Ezan E., Guyene T.T., Michellet S., Grognet J.M., Lenfant M., Corvol P., Menard J. // J. Clin. Invest. 1996. V. 97. P. 839–844.
16. Hooper N.M. // Int. J. Biochem. 1991. V. 23. P. 641–647.
17. Williams T.A., Soubrier F., Corvol P. // Zinc Metalloproteases in Health and Disease / Ed. N.M. Hooper. L.: Taylor & Francis, 1996. P. 83–104.
18. Wei L., Alhenc-Gelas F., Soubrier F., Michaud A., Corvol P., Clauser E. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 5540–5546.
19. Skidgel R.A., Erdős E.G. // Clin. Exp. Hypert. A. 1987. V. 9. P. 243–259.
20. Beldent V., Michaud A., Wei L., Chauvet M.-T., Corvol P. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 26428–26434.
21. Chai S.Y., Mendelsohn F.A.O., Paxinos G. // Neuroscience. 1987. V. 20. P. 615–627.
22. Aschoff J.M., Lazarus D., Fanburg B.L., Lanzillo J.J. // Anal. Biochem. 1994. V. 219. P. 218–223.
23. Costerousse O., Allegrini J., Lopez M., Alhenc-Gelas F. // Biochem. J. 1993. V. 290. P. 33–40.
24. Diet F., Pratt R.E., Berry G.J., Momose N., Gibbons G.H., Dzau V.J. // Circulation. 1996. V. 94. P. 2756–2767.
25. Sun Y., Ratajska A., Zhou G.P., Weber K.T. // J. Lab. Clin. Med. 1993. V. 122. P. 395–403.
26. Wilke A., Funck R., Rupp H., Brilla C.G. // Basic Res. Cardiol. 1996. V. 91. Suppl. 2. P. 79–84.
27. Ramchandran R., Kasturi S., Douglas J.G., Sen I. // Am. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology. 1996. V. 40. P. H744–H751.
28. Hooper N.M., Karran E.H., Turner A.J. // Biochem. J. 1997. V. 321. P. 265–279.
29. Konkoy C.S., Davis T.P. // Trends Pharmacol. Sci. 1996. V. 17. P. 288–294.
30. Stephenson S.L., Kenny A.J. // Biochem. J. 1987. V. 241. P. 237–247.
31. Turner A.J. // Adv. Neuroimmunol. 1993. V. 3. P. 163–170.



32. Hooper N.M. // Zinc Metalloproteases in Health and Disease / Ed. N.M. Hooper. L.: Taylor & Francis, 1996. P. 1–21.
33. Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., Allegrini J., John M., Tregear G., Corvol P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 9386–9390.
34. Ehlers M.R.W., Fox E.A., Strydom D.J., Riordan J.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 7741–7745.
35. Hubert C., Houot A.-M., Corvol P., Soubrier F. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 15377–15383.
36. Wei L., Alhenc-Gelas F., Corvol P., Clauser E. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 9002–9008.
37. Wei L., Clauser E., Alhenc-Gelas F., Corvol P. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 13398–13405.
38. Jaspard E., Wei L., Alhenc-Gelas F. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9496–9503.
39. Danilov S., Jaspard E., Churakova T., Towbin H., Savoitte F., Wei L., Alhenc-Gelas F. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 26806–26814.
40. Turner A.J., Tanzawa K. // Zinc Metalloproteases in Health and Disease / Ed. N.M. Hooper. L.: Taylor & Francis, 1996. P. 311–331.
41. Deddish P.A., Wang J., Michel B., Morris P.W., Davidson N.O., Skidgel R.A., Erdös E.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 7807–7811.
42. Casarini D.E., Danilov S., Alves K.B., Stella R.C.R., Gauthier F., Alhenc-Gelas F. // 14-th International Symposium on Kinins, Denver Colorado 10–15 September 1995. Program and Abstracts. P. A-49.
43. Sturrock E.D., Danilov S.M., Riordan J.F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 236. P. 16–19.
44. Muns G., Vishwanatha J.K., Rubinstein I. // J. Cell. Biochem. 1993. V. 53. P. 352–359.
45. Williams T.A., Barnes K., Kenny A.J., Turner A.J., Hooper N.M. // Biochem. J. 1992. V. 288. P. 875–881.
46. Ehlers M.R.W., Riordan J.F. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 7118–7126.
47. Deddish P.A., Wang L.X., Jackman H.L., Michel B., Wang J., Skidgel R.A., Erdös E.G. // J. Pharmacol. Exper. Therap. 1996. V. 279. P. 1582–1589.
48. Deddish P.A., Jackman H.L., Skidgel R.A., Erdös E.G. // Biochem. Pharmacol. 1997. V. 53. P. 1459–1463.
49. Rousseau A., Michaud A., Chauvet M.-T., Lenfant M., Corvol P. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 3656–3661.
50. Perich R.B., Jackson B., Rogerson F., Mendelsohn F.A.O., Paxton D., Johnston C.I. // Mol. Pharmacol. 1992. V. 42. P. 286–293.
51. Duggan K.A., Hodge G., Makarious M.M., Charlesworth J.A. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1996. V. 23. P. 608–610.
52. Bevilacqua M., Vago T., Rogolino A., Conci F., Santoli E., Norbiato G. // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1996. V. 28. P. 494–499.
53. Williams T.A., Danilov S., Alhenc-Gelas F., Soubrier F. // Biochem. Pharmacol. 1996. V. 51. P. 11–14.
54. Beldent V., Michaud A., Bonnefoy C., Chauvet M.-T., Corvol P. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 28962–28969.
55. Shai S.Y., Fishel R.S., Martin B.M., Berk B.C., Bernstein K.E. // Circ. Res. 1992. V. 70. P. 1274–1281.
56. Bernstein K.E., Martin B.M., Edwards A.S., Bernstein E.A. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 11945–11951.
57. Koike G., Krieger J.E., Jacob H.J., Mucoyama M., Pratt R.E., Dzau V.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. V. 198. P. 380–386.
58. Thekkumkara T.J., Livingston W., Kumar R.S., Sen G.C. // Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. P. 683–687.
59. Cornell M.J., Williams T.A., Lamango N.S., Coates D., Corvol P., Soubrier F., Hoheisel J., Lehrach H., Isaac R.E. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 13613–13619.
60. Wijffels G., Fitzgerald C., Gough J., Riding G., Elvin C., Kemp D., Willadsen P. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 237. P. 414–423.
61. Lamango N.S., Sajid M., Isaac R.E. // Biochem. J. 1996. V. 314. P. 639–646.

## Structure–Function Relationship of Angiotensin Converting Enzyme

Yu. E. Eliseeva

*Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119832 Russia*

The structure and functions in various tissues of angiotensin converting enzyme (ACE, peptidyl dipeptidase A), a key enzyme in blood pressure regulation, are reviewed. The similarity and differences of two homologous catalytically active N- and C-domains of the ACE molecule are discussed, and different biological functions of these domains are suggested. Natural active single-domain forms of ACE are characterized.

*Key words: angiotensin converting enzyme, homologous domains, hydrolysis, regulatory peptides, inhibitors*