



УДК 577.152.341*51.01

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ГОМОЛОГИЧНЫХ ДОМЕНОВ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

© 2003 г. С. В. Воронов, П. В. Биневский, Н. А. Зуева, В. А. Палюлин,
И. И. Баскин, М. А. Орлова, О. А. Кост[#]

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
119992, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 20.12.2002 г. Принята к печати 22.01.2003 г.

Соматический ангиотензинпревращающий фермент (АСЕ) состоит из двух гомологичных доменов, каждый из которых содержит активный центр. Показаны различия в субстратной специфичности и в сродстве к ингибиторам активных центров, расположенных на двух доменах АСЕ быка. Продемонстрирована различная тепловая устойчивость доменов АСЕ, проанализированы причины этого различия. Предложена структурная модель доменов АСЕ, позволяющая выделить структурный поддомен, важный для стабильности белка, а также определить местоположение на молекуле фермента гидрофобного и углеводсвязывающего центров.

Ключевые слова: ангиотензинпревращающий фермент (АСЕ), вторичная структура, пространственная структура; 8-анилинонафталинсульфофоскислота (ANS), термоинактивация, инактивация.

ВВЕДЕНИЕ

Ангиотензинпревращающий фермент (АСЕ, пептидилдипептидаза А, КФ 3.4.15.1) представляет собой цинксодержащую металлопротеиназу (1277 а. о. после отщепления сигнального пептида), которая относится к классу цинкинов. Уникальной особенностью молекулы фермента, синтезируемого в соматических клетках, является наличие в ее полипептидной цепи двух высокомолекулярных доменов, каждый из которых содержит активный центр [1]. По положению в полипептидной цепи эти домены принято называть *N*- и *C*-доменами. Их гомология составляет 67–73% (в зависимости от организма), а в центральной части доменов, содержащей цинксвязывающий мотив, идентичность аминокислотных остатков достигает 89% [2]. В то же время как сами домены, так и расположенные на них активные центры неравноценны. Так, было показано [3], что *N*-домен АСЕ человека значительно сильнее гликозилирован, чем *C*-домен. Эксперименты с мутантными формами АСЕ человека показали, что рекомбинантный *N*-домен обладает более высокой стабильностью при высоких температурах, чем *C*-домен или двудоменная форма АСЕ [4]. Аналогичные данные были получены с использованием метода дифференциальной сканирующей кало-

риметрии и для АСЕ быка. Соматический фермент демонстрировал два пика теплопоглощения при 55 и 70°C, в то время как для индивидуального *N*-домена АСЕ, полученного ограниченным протеолизом исходной соматической формы, выявлялся один высокотемпературный пик [5]. Более устойчив *N*-домен также и к действию мочевины и экстремальных значений рН [6].

Пространственная структура полноразмерного АСЕ, так же как и структура его отдельных доменов, до сих пор не расшифрована, поэтому структурные предпосылки особенностей доменов АСЕ неизвестны.

Каталитические центры АСЕ гидролизуют один и тот же круг пептидных субстратов и связывают одни и те же ингибиторы. Однако эти центры различаются по скорости катализируемого ими гидролиза пептидов, эффективности связывания ингибиторов и профилю активации хлорид-анионами [2]. Ранее считалось, что каталитический гидролиз на двух центрах АСЕ происходит независимо [7], однако в настоящее время накапливаются данные [6, 8, 9], свидетельствующие о взаимодействии между активными центрами в составе фермента, что, в свою очередь, подразумевает сближенность и контакты двух доменов в пространстве.

В настоящей работе впервые представлены данные, характеризующие субстратную специфичность АСЕ быка и сродство к ингибиторам его активных центров, продемонстрирована различная стабильность двух доменов фермента,

Сокращения: АСЕ – ангиотензинпревращающий фермент; FA – *N*^α-3-(2-фурил)акрилоил; ANS – 8-анилинонафталинсульфофоскислота.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 939-54-17; эл. почта: kost@enzyme.chem.msu.ru)

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза синтетических трипептидных субстратов под действием однодоменных форм АСЕ быка*

Субстрат	<i>N</i> -Домен АСЕ		Тестикулярный АСЕ	
	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мМ
FA-Phe-Gly-Gly	279 ± 10	1.40 ± 0.02	260 ± 14	0.50 ± 0.02
Hip-His-Leu	12 ± 1	0.50 ± 0.05	12 ± 1	0.60 ± 0.03
Cbz-Phe-His-Leu	122 ± 10	0.15 ± 0.02	19 ± 2	0.13 ± 0.02
FA-Phe-Ala-Ala	35 ± 3	0.05 ± 0.02	178 ± 15	0.05 ± 0.01
FA-Phe-Ala-Lys	35 ± 3	0.14 ± 0.01	85 ± 7	0.17 ± 0.02
FA-Phe-Phe-Arg	45 ± 4	0.05 ± 0.01	76 ± 8	0.12 ± 0.02

Условия: 50 мМ Непес-буфер, pH 7.5, содержащий 150 мМ NaCl, 1 мкМ ZnCl₂, 25°C.

проанализированы ее вероятные причины и предложена структурная модель доменов АСЕ.

Для сравнения каталитических функций двух активных центров АСЕ быка мы воспользовались тем обстоятельством, что частичная денатурация соматического фермента приводила к денатурации его *C*-домена, в то время как *N*-домен сохранял каталитическую активность и мог быть получен в индивидуальном виде после проведения ограниченного протеолиза для расщепления денатурированного белка [10]. В качестве индивидуального *C*-домена был использован тестикулярный фермент, продуцируемый в семенниках быка и идентичный *C*-домену соматического АСЕ, за исключением короткой *N*-концевой последовательности, не оказывающей влияния на каталитические функции фермента [11].

Результаты по определению кинетических параметров гидролиза синтетических трипептидных субстратов под действием двух индивидуальных активных центров АСЕ быка представлены в табл. 1. Оказалось, что ряд субстратов одинаково гидролизывался на обоих активных центрах фермента быка (для сравнения, АСЕ человека в 9 раз быстрее гидролизывал субстрат Hip-His-Leu на *C*-доме [7]). Субстраты FA-Phe-Ala-Ala, FA-Phe-Ala-Lys и FA-Phe-Phe-Arg быстрее гидролизывались на *C*-доме фермента (различия в величинах каталитических констант при близких величинах констант Михаэлиса), а субстрат Cbz-Phe-His-Leu эффективнее гидролизывался на *N*-доме АСЕ (в то время как АСЕ человека гидролизывал этот субстрат практически с одинаковой скоростью на обоих центрах [12]). В целом, полученные данные согласовывались с выдвинутым ранее предположением [7, 13] о "меньшей требовательности" активного центра *C*-домена к структуре гидролизываемого субстрата.

Данные по эффективности ингибирования обратимыми конкурентными ингибиторами двух активных центров АСЕ быка представлены в табл. 2. Единственное значительное различие в величинах

констант ингибирования отмечалось для каптоприла, который, как и в случае АСЕ человека [14], эффективнее ингибирывал *N*-домен фермента.

Итак, активные центры АСЕ быка несколько различались по субстратной специфичности и сродству к ингибиторам, причем эти различия не совпадали с выявленными ранее различиями для активных центров фермента человека.

Функциональные различия доменов фермента, на которых расположены активные центры, выявляются также при сравнении их стабильности. Кинетика необратимой термоденатурации двудоменного соматического АСЕ носит ярко выраженный двухфазный характер (рис. 1а), не зависящий от концентрации белка и свидетельствующий о присутствии в системе по крайней мере двух различных по стабильности фракций. Константа скорости термоденатурации тестикулярного АСЕ совпадала с константой скорости денатурации лабильной фракции, в то время как стабильная фракция денатурировала с той же константой скорости, что и выделенный индивидуальный *N*-домен. Полученные результаты позволили проанализировать кинетику термоденатурации соматического АСЕ в широком интервале температур и определить величины энергии активации

Таблица 2. Константы ингибирования конкурентными ингибиторами реакции гидролиза Cbz-Phe-His-Leu под действием однодоменных форм АСЕ

Ингибитор	K_i , М	
	<i>N</i> -домен	Тестикулярный АСЕ
Лизиноприл	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-10}$	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-10}$
Каптоприл	$(5.0 \pm 0.2) \times 10^{-10}$	$(9.1 \pm 0.9) \times 10^{-9}$
PP-09	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-8}$	$(4.7 \pm 0.4) \times 10^{-8}$
Эналаприл-малеат	$(8.6 \pm 0.4) \times 10^{-8}$	$(2.6 \pm 0.1) \times 10^{-7}$

Условия: 50 мМ Непес-буфер, pH 7.5, содержащий 150 мМ NaCl, 1 мкМ ZnCl₂, 37°C.

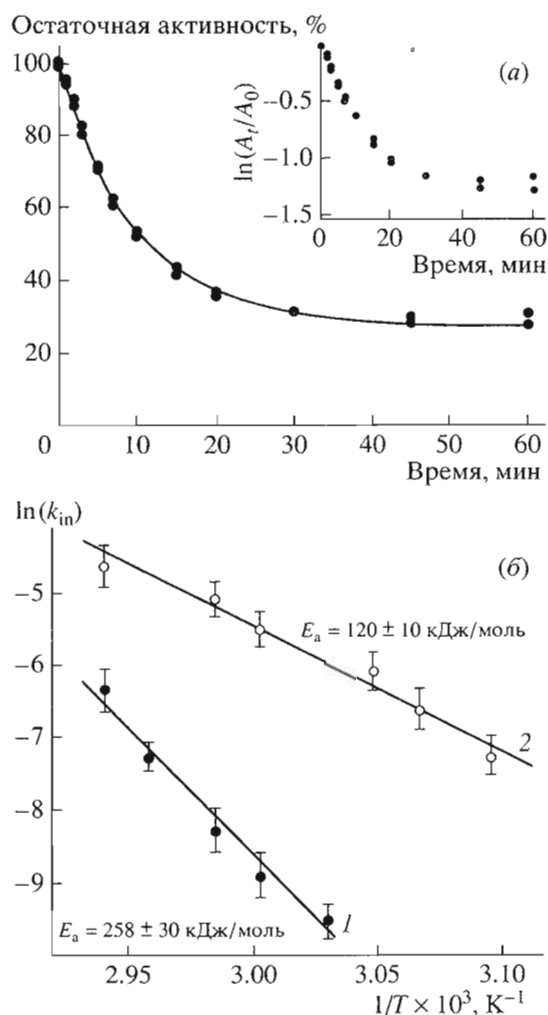


Рис. 1. Термоинактивация соматического АСЕ: а) кинетика термоинактивации АСЕ при 55°C. Вставка – те же данные в полулогарифмических координатах; б) температурная зависимость констант денатурации *N*- (1) и *C*- (2) доменов соматического АСЕ, выраженная в координатах Аррениуса. (0.025 М фосфатный – 0.025 М боратный буфер, рН 6.5, 0.15 М NaCl, 1 мкМ Zn^{2+}).

для денатурации каждого домена в составе фермента. Данные представлены в координатах Аррениуса на рис. 1б. Более чем двукратное различие в величинах E_a для двух гомологичных доменов АСЕ иллюстрировало различия в их термостабильности.

Важно, что различная термостабильность доменов позволила избирательно проводить денатурацию только одного из них (*C*-домена) с получением каталитически активного индивидуального *N*-домена (после протеолиза) или *N*-домена в составе полноразмерного фермента с денатурированным *C*-доменом, причем присутствие денатурированного *C*-домена не оказывало влияния ни на стабильность, ни на каталитические функции *N*-домена [5]. Таким образом, можно утверж-

дать, что домены в составе молекулы соматического АСЕ денатурируют независимо, что свидетельствует о независимости пространственных структур этих доменов.

Более высокая устойчивость *N*-домена АСЕ была продемонстрирована также в экспериментах по денатурации фермента под действием продуктов радиолитического распада воды, образующихся в результате γ -излучения. В отличие от теплового воздействия, которое происходит по всему объему молекулы, продукты радиолитического распада воды воздействуют прежде всего на поверхность белка [15]. Оказалось, что индивидуальный *N*-домен инактивировался под действием γ -излучения медленнее, чем соматический фермент (рис. 2), хотя его удельная площадь поверхности больше.

Известно [16], что образующиеся при радиолитическом расходе воды радикалы, в первую очередь, повреждают экспонированные в растворитель остатки ароматических аминокислот. С другой стороны, гидрофобные области на поверхности белка могут быть экранированы путем сорбции низкомолекулярных соединений. Ранее [17] мы показали, что на глобуле соматического АСЕ быка существует один гидрофобный центр, способный образовывать комплекс с молекулой гидрофобного красителя – 8-анилинонафталинсульфокислоты (ANS). Связывание ANS значительно стабилизировало соматический АСЕ к действию γ -излучения, причем максимальный эффект достигался после установления равновесия комплексообразования.

Оказалось, что индивидуальный *N*-домен незначительно стабилизировался в присутствии ANS (рис. 2), что предполагает локализацию единственного гидрофобного центра, связывающего протектор, не на *N*-, а на *C*-домене фермента. Следует подчеркнуть, что в результате комплексообразования с ANS чувствительная к действию радиолитического распада молекула соматического АСЕ приобретала гораздо большую устойчивость, чем ее изначально более стабильный *N*-домен (см. кривые 2 и 3 на рис. 2). Эти данные указывают на существование контактов между доменами фермента, которые приводят к их взаимному влиянию, в том числе и по отношению к действию радиолитического распада.

Для анализа возможных структурных различий между доменами, ответственных за различия в стабильности, мы прежде всего провели предсказание вторичной структуры доменов АСЕ быка на основании известной [18] аминокислотной последовательности фермента. По результатам предсказания, содержание в белковой молекуле АСЕ α -спиралей составляло около 45% и неупорядоченной структуры ~50%, вклад β -структур (в виде β -поворотов) незначителен и не превышал 5% (по данным спектров КД, содержание α -спиралей в АСЕ быка оценивалось в 37%, β -структура практически отсутствовала [5]).

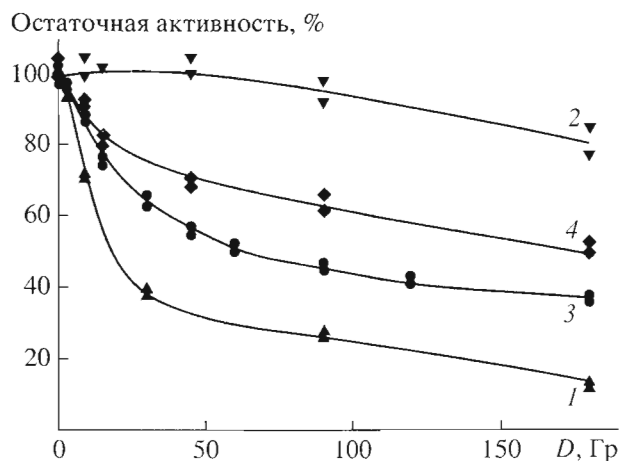


Рис. 2. Зависимость остаточной активности соматического ACE (1, 2) и *N*-концевого домена ACE (3, 4) от дозы γ -облучения в отсутствие (1, 3) и в присутствии ANS (2, 4).

(0.025 М фосфатный – 0.025 М боратный буфер, pH 6.5, 0.15 М NaCl, 1 мкМ Zn^{2+} , концентрация ACE 10 нМ, концентрация ANS 50 мМ).

Согласно полученной нами модели, вторичная структура доменов ACE в области активных центров практически одинакова, а наиболее заметные различия между доменами наблюдались в их *N*-концевых областях на относительно небольших участках, включающих фрагмент 1–105 у *N*-домена и фрагмент 604–705 у *C*-домена (рис. 3). Степень гомологии между *N*-концевыми участками *N*- и *C*-доменов наиболее низка и составляла всего 49%. На эту область в *N*-доме приходилось две аминокислотные вставки и четыре сайта потенциального гликозилирования, в то время как соответствующая область на *C*-доме содержала три сайта. Более того, по данным работы [19], полученным для ACE человека, два сайта из четырех на *N*-доме фермента несли на себе углеводные цепи, в то время как на соответствующем участке *C*-домена углеводные цепи не были найдены. Степень α -спирализации *N*-домена на рассматриваемом участке значительно выше, чем для *C*-домена (63% против 48%), что позволяло

сделать предположение о большей конформационной жесткости этого участка в *N*-доме. Кроме того, в этой области у *N*-домена наблюдалось вдвое повышенное содержание остатков пролина, что должно дополнительно увеличивать стабильность структуры этого участка.

Можно предположить, что большая жесткость и большая степень гликозилирования области 1–105 у *N*-домена и большая подвижность соответствующего участка *C*-домена обусловлены тем, что, по всей вероятности, фолдинг *C*-домена происходит в условиях, когда *N*-доме уже свернут, по крайней мере частично. Для компенсации пространственных ограничений, накладываемых наличием уже свернутого *N*-домена, от полипептидной цепи начального участка *C*-домена требуется повышенная конформационная гибкость. Экспериментально наблюдаемая нами пониженная стабильность *C*-домена вполне вероятно является следствием этой гибкости.

Для более детальной характеристики структурных различий между доменами ACE мы предприняли попытку моделирования пространственной структуры доменов. На первом этапе мы определили структурный тип белковой укладки, разрешенный для каждого из доменов ACE в соответствии с первичной структурой и предсказанной вторичной структурой. Оказалось, что как *N*-, так и *C*-доме ACE из всех известных на сегодняшний день структур белков наиболее близка только одна – структура нейролизина (35% гомологии с ACE). Нейролизин (КФ 3.4.24.16) – цинк-зависимая металлопептидаза, способная гидролизовать короткие (до 17 а. о.) пептиды, в том числе такие хорошо известные субстраты ACE, как ангиотензин и брадикинин, но при этом расщепление идет по другим, чем в случае ACE, сайтам [20]. Длина полипептидной цепи нейролизина составляет 704 а. о., что соответствовало длине одного домена ACE. По результатам расшифровки пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа, молекула нейролизина состоит преимущественно из α -спиралей (53%) и неупорядоченной структуры (41%) [21]. В ней имеется также один β -лист, в образовании кото-

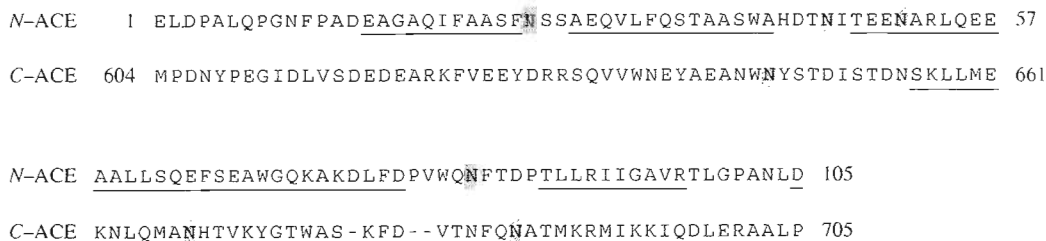


Рис. 3. Предсказанная вторичная структура доменов ACE быка в областях наибольших структурных различий между *N*- (остатки 1–105) и *C*- (остатки 604–705) доменами. Положение α -спиралей подчеркнуто. Серым фоном отмечены потенциальные сайты гликозилирования.

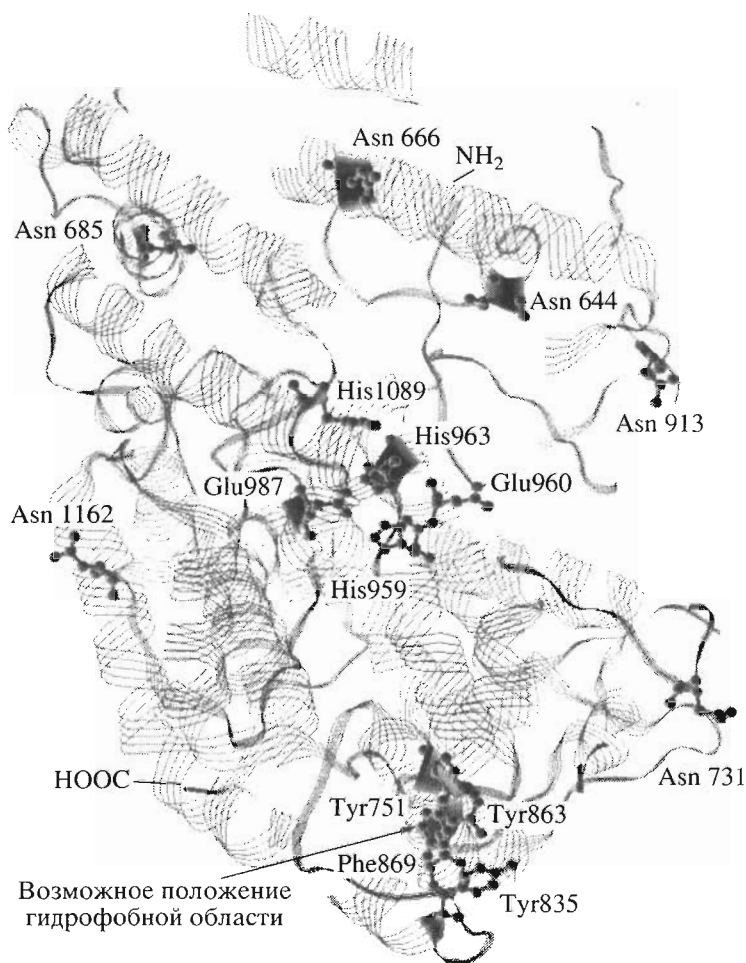


Рис. 4. Модель пространственной укладки полипептидной цепи *C*-домена АСЕ. Отмеченные аминокислотные остатки показывают положение активного центра, сайтов потенциального гликозилирования и предполагаемой гидрофобной области.

рого участвует около 6% общего числа аминокислотных остатков.

Используя в качестве матрицы мотив пространственной укладки полипептидной цепи нейрוליрина, по первичным структурам и моделям вторичной структуры *N*- и *C*-доменов АСЕ были построены модели пространственной структуры доменов, представленные на рис. 4 и 5. Модель *C*-домена АСЕ оказалась более полной, в то время как модель для *N*-домена ограничивалась только областью 1–477. Это связано с наличием в полипептидной цепи *N*-домена последовательности VVRNETH (аминокислотные остатки 477–483), критично отличающейся от последовательности LARSQDD, находящейся в соответствующей области *C*-домена (остатки 1075–1081). В результате использованный алгоритм построения модели требует недопустимых конформаций от боковых радикалов ряда аминокислотных остатков.

Рассмотрим более полную модель *C*-домена фермента подробнее. Практически все α -спирали,

находящиеся в составе одного домена АСЕ, уложены в направлении, близком к расположению щели, содержащей активный центр фермента. Цинккоординирующие остатки His959, His963, Glu987, а также остаток Glu960, участвующий в поляризации гидролизующей пептидной связи, занимают положения, при которых возможно протекание каталитической реакции. Отдаленный по последовательности более чем на 100 а. о. His1089, участие которого в стабилизации переходного состояния при катализе отличает АСЕ от остальных членов семейства цинкинов [22], в предложенной структуре оказался расположенным в общей щели с остальными аминокислотными остатками активного центра, что служит свидетельством в пользу адекватности модели. В реальной структуре белка, однако, этот остаток гистидина должен быть расположен значительно ближе к остальным остаткам активного центра. Следует отметить, что остаток His1089 оказался включенным в состав длинной неструктурированной петли (рис. 4), а

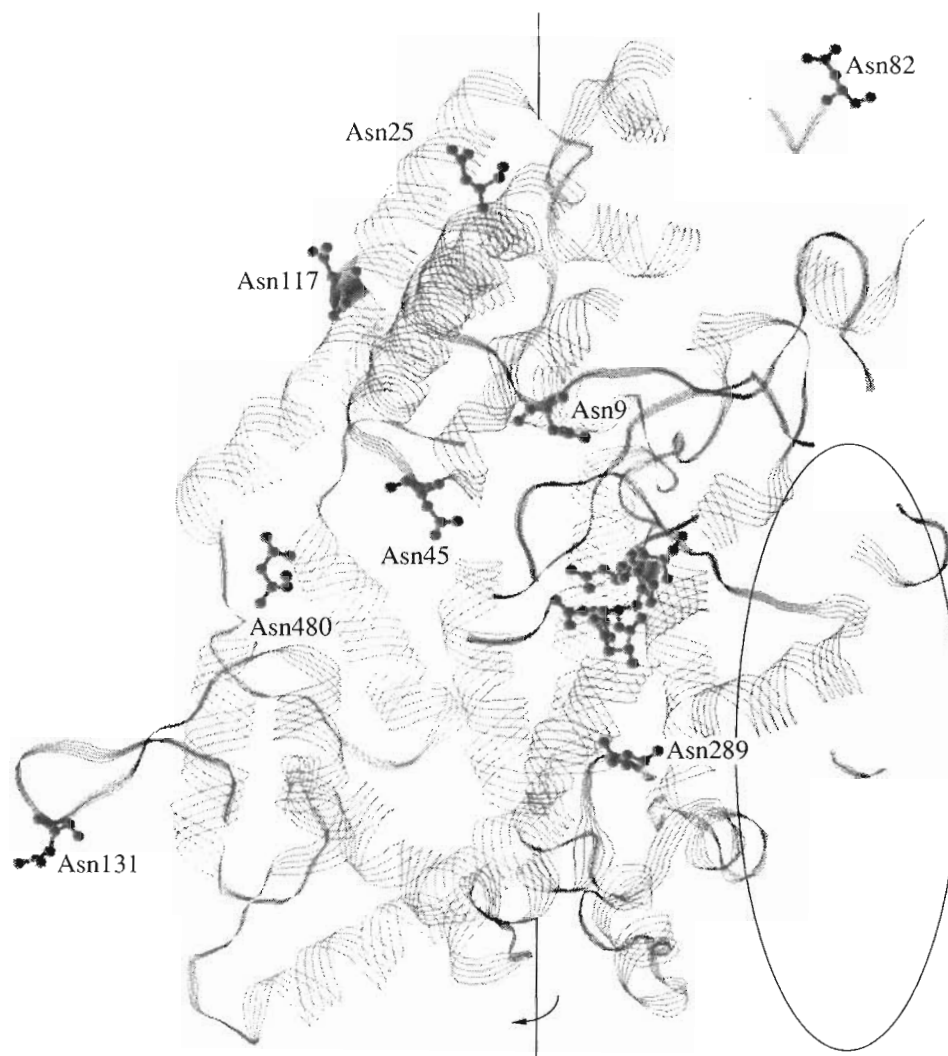


Рис. 5. Модель пространственной укладки полипептидной цепи *N*-домена АСЕ. Выделены аминокислотные остатки активного центра и потенциальные сайты гликозилирования. В обведенной кружком области мы предполагаем локализацию углеводсвязывающего центра. Данная проекция получается из представленной на рис. 4 поворотом на 90° в указанном направлении относительно указанной оси.

использованный алгоритм моделирования пространственной структуры, как и все существующие на сегодняшний день алгоритмы, не позволяет определять конформацию и положение неструктурированных петель с достаточной точностью.

Все остатки аспарагина, определенные авторами работы [19] как подверженные гликозилированию при экспрессии тестикулярного АСЕ человека в клетках яичников китайских хомячков (по нумерации, используемой в данной работе, это Asn666, Asn685, Asn731, Asn913 и Asn1162), согласно нашей модели пространственной структуры, оказались расположены близко к поверхности *C*-домена АСЕ (рис. 4), что служит дополнительным подтверждением адекватности предложенной модели.

N-Концевые области – 1–105 у *N*-домена и 604–705 у *C*-домена, – отмеченные нами выше как

наиболее вероятно ответственные за разную термическую стабильность доменов, не удалось смоделировать с высокой степенью точности (на рис. 4 и 5 это можно видеть по рыхлости структуры белка и по множественным разрывам пептидной цепи в этих областях), что указывает на низкую структурную консервативность данных областей. Результаты моделирования, однако, показывают, что рассматриваемые участки должны занимать обособленное положение в пространстве. При этом рассматриваемые области достаточно удалены от районов активных центров и образуют структурно обособленные поддомены, по-видимому, важные для общей стабильности доменов.

Подтверждение этому выводу можно найти в работе [4], авторы которой получили химерный АСЕ человека, у которого *N*-концевой участок

С-домена (601–747) был заменен соответствующим участком N-домена (остатки 1–148). Эта замена оказала влияние как на каталитические свойства, так и на стабильность мутантного фермента: он характеризовался повышенной по сравнению с С-доменом стабильностью к термоинактивации, меньшей, однако, чем стабильность рекомбинантного N-домена.

Несмотря на ограниченность предложенной модели, она позволила нам обнаружить единственный гидрофобный центр на поверхности С-домена АСЕ, который может служить центром связывания молекулы ANS и мишенью для повреждающего действия продуктов радиолиза воды. Этот гидрофобный кластер образован тремя остатками тирозина (Tyr751, Tyr835, Tyr863) и одним остатком фенилаланина, Phe869 (рис. 4). Гидрофобный центр оказался значительно удаленным от щели активного центра, что согласуется с экспериментальными данными, согласно которым связывание молекулы ANS на гидрофобном центре АСЕ не влияло на его каталитическую активность [17].

Отмеченные остатки Tyr и Phe консервативны и присутствуют также на N-доме АСЕ, где они, в принципе, тоже могут формировать гидрофобную область. По-видимому, тонкая организация этой области отличается от области на С-доме фермента, что может приводить к значительному ухудшению связывания молекулы красителя и фиксации в условиях эксперимента только одного гидрофобного центра на глобуле соматического фермента.

Необычность АСЕ заключается в том, что этот белок содержит специфичный углеводсвязывающий центр, таким образом, фермент проявляет лектиноподобные свойства [23]. Функции этого центра не связаны с прямыми каталитическими свойствами АСЕ, а заключаются, по-видимому, в структурной организации фермента в составе биологической мембраны. Анализ модели неполного N-домена фермента позволил нам очертить область вероятного расположения этого углеводсвязывающего центра на поверхности белка. Установлено [Кост О.А., Данилов С.М., неопубликованные данные], что моноклональное антитело 9В9 к N-дому АСЕ человека и его Fab-фрагменты экранируют углеводсвязывающий центр на глобуле АСЕ и подавляют димеризацию фермента, вызываемую взаимодействием углеводных цепей одной молекулы фермента с углеводсвязывающим центром другой [23]. Эпитоп, узнаваемый антителом 9В9 на поверхности соматического АСЕ человека, расположен между аминокислотными остатками Lys535 и Lys572 N-домена АСЕ [24]. Полученные данные позволили утверждать, что углеводсвязывающий центр располагается на N-доме фермента

В полученную нами модель пространственной укладки полипептидной цепи N-домена эта область не вошла. Однако по аналогии с положением гомологичной области С-домена мы предполагаем, что в пространстве этот участок будет расположен в области, которая на рис. 5 обведена кружком. Важно, что значительная часть сайтов потенциального гликозилирования расположена с той же стороны глобулы АСЕ, где, по нашим предположениям, находится углеводсвязывающий центр. Такое относительное расположение сайтов гликозилирования и углеводсвязывающего центра должно создавать стерические препятствия для углеводконтролируемого взаимодействия более двух молекул одновременно. Действительно, экспериментально было показано, что углеводами контролируется только образование димеров АСЕ, а более крупные агрегаты фермента образуются в результате взаимодействий другой природы [25].

Авторы сообщают, что в то время, когда статья уже лежала в портфеле редакции, наконец была расшифрована пространственная структура тестикулярного АСЕ человека (Ramanathan Natesh, Sylva L.U. Schwager, Edward D. Sturrock, K. Ravi Acharya // Nature. 2003. V. 421. P. 551–554). Полученная нами модель С-домена АСЕ быка удовлетворительно коррелирует с полученной структурой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы: N^α-3-(2-фурил)акрилоил-L-фенилаланилглицилглицин, N-(S-1-карбокси-3-фенилпропил)-L-лизил-L-пролин (лизиноприл), (2S)-1-(3-меркапто-2-метилпропионил)-L-пролин (каптоприл), (S)-1-[N-(1-[этоксикарбонил]-3-фенилпропил)-L-аланил]-L-пролинмалеат (эналаприлмалеат) – “Sigma”, США; гиппурил-L-гистидил-L-лейцин и гистидил-L-лейцин – “Serva”, Германия. N^α-Карбобензоксид-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин – “Bachem”, США. N^α-3-(2-Фурил)акрилоил-L-фенилаланил-L-аланил-L-аланин и N^α-3-(2-фурил)акрилоил-L-фенилаланил-L-аланил-L-лизин любезно предоставлены М.В. Овчинниковым (Кардиологический научный центр РАМН). (RS)-N^α-[1-Карбокси-2-(бензиламинокарбонил)этил]-L-аланил-L-пролин (PP-09) и N^α-3-(2-фурил)акрилоил-L-фенилаланил-L-фенилаланил-L-аргинин любезно предоставлены В.Ф. Поздневым (Институт биомедицинской химии РАМН).

Соматический и тестикулярный АСЕ выделяли методом, включающим экстракцию фермента из легких и семенников быка 50 мМ фосфатным буфером, pH 7.5, содержащим 150 мМ NaCl, 1 мкМ ZnCl₂ в присутствии 0.5% Тритона X-100 и каскадную аффинную хроматографию [26].

N-Домен ACE получали методом ограниченного протеолиза частично денатурированной соляной кислоты формы ACE [5, 6].

Все препараты были гомогенны по SDS-электрофорезу. Концентрацию активных молекул ACE определяли методом стехиометрического титрования специфическим конкурентным ингибитором лизиноприлом по подавлению ферментативного гидролиза субстрата FA-Phe-Gly-Gly как описано в [6].

Кинетику каталитического гидролиза FA-Phe-Gly-Gly, FA-Phe-Ala-Ala, FA-Phe-Ala-Lys и FA-Phe-Phe-Arg изучали спектрофотометрически на спектрофотометре Shimadzu UV-265FW (Япония) по методике [27]. Скорость каталитического гидролиза Hip-His-Leu и Cbz-Phe-His-Leu измеряли флуориметрически на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4 (Япония), определяя продукт реакции His-Leu с помощью орто-фталевого альдегида [28].

Определение констант ингибирования однодоменных форм ACE различными конкурентными ингибиторами проводили в равновесных условиях при фиксированной концентрации фермента и пяти концентрациях субстрата, лежащих в интервале $0.5-3 \times K_m$. Концентрацию фермента в реакционной смеси создавали равной величине K_i , определенной в предварительных экспериментах; концентрацию ингибитора варьировали в интервале $0.5-10 \times [E]_0$. Экспериментальные данные обрабатывали по методу Гендерсона [29].

За термоинактивацией ACE следили, измеряя остаточную активность фермента (субстрат Cbz-Phe-His-Leu) после инкубации при заданной температуре в течение различного времени [5]. Остаточную активность рассчитывали в процентах относительно активности интактного фермента.

Влияние ANS на кинетику радиационной инактивации ACE в растворе изучали, подвергая 10^{-8} М раствор фермента γ -облучению [17]. Величина поглощенной дозы определялась временем облучения (кинетический набор дозы при постоянной мощности дозы – 0.05 Гр/с). Остаточную активность препаратов измеряли по скорости каталитического гидролиза субстрата Cbz-Phe-His-Leu.

Предсказание вторичной структуры ACE быка проводили с использованием сервиса Consensus, доступного через Web-сервер Network Protein Sequence Analysis (Франция) <http://npsa-pbil.ibcp.fr/>. Предсказание велось параллельно по 8 различным алгоритмам, учитывающим гомологию с белками с расшифрованной пространственной структурой, зависимость конформации аминокислотного остатка от его ближайшего окружения и способность аминокислотного остатка к формированию водородных связей. После этого, по результатам, полученным по всем алгоритмам, производился выбор наиболее вероятной структурной конформации для каждого участка. По данным

литературы, точность такого предсказания составляет более 70% [30].

Предсказание мотива пространственной укладки пептидной цепи доменов ACE проводили по первичным последовательностям доменов ACE быка с помощью сервиса 3D-PSSM [31], доступного через Web-сервер группы структурной биоинформатики Имперского колледжа науки, технологии и медицины (Великобритания) <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/servers/3dpssm/>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично финансировалась из средств Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 00-04-482430).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Corvol P., Williams T.A., Soubrier F. // Methods Enzymol. 1995. V. 248. P. 283–305.
3. Deddish P.A., Wang J., Michel B., Morris P.W., Davidson N.O., Skidgel R.A., Erdos E.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 7807–7811.
4. Marcic B., Deddish P.A., Jackman H.L., Erdos E.G., Tan F. // Hypertension. 2000. V. 36. P. 116–121.
5. Voronov S., Zueva N., Orlov V., Arutyunyan A., Kost O. // FEBS Lett. 2002. V. 522. P. 77–82.
6. Бинеvский П.В., Никольская И.И., Позднев В.Ф., Кост О.А. // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 765–774.
7. Wei L., Alhenc-Gelas F., Corvol P., Clauser E. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 9002–9008.
8. Sturrock E.D., Danilov S.M., Riordan J.F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 236. P. 16–19.
9. Воронов С.В., Бинеvский П.В., Еремин С.А., Кост О.А. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 968–975.
10. Deddish P.A., Wang L.-X., Jackman H.L., Michel B., Wang J., Skidgel R.A., Erdos E.G. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996. V. 279. P. 1582–1589.
11. Ehlers M.R.W., Chen Y.-N.P., Riordan J.F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992. V. 183. P. 199–205.
12. Danilov S., Jaspard E., Churakova T., Towbin H., Savoie F., Wei L., Alhenc-Gelas F. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 26 806–26 814.
13. Jaspard E., Wei L., Alhenc-Gelas F. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9496–9503.
14. Wei L., Clauser E., Alhenc-Gelas F., Corvol P. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 13 398–13 405.
15. Первичные радиобиологические процессы / Ред. Н.В. Тимофеев-Ресовский. М.: Атомиздат, 1973.
16. Орлова М.А. // Успехи химии. 1993. Т. 62. С. 529–544.
17. Воронов С.В., Скиргелло О.Е., Трошина Н.Н., Орлова М.А., Кост О.А. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 663–668.
18. Shai S.Y., Fishel R.S., Martin B.M., Berk B.C., Bernstein K.B. // Circ. Res. 1992. V. 70. P. 1274–1281.

19. Yu X.C., Sturrock E.D., Wu Z., Biemann K., Ehlers M.R., Riordan J.F. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 3511–3519.
20. Vincent B., Vincent J.P., Checler F. // *Brain Res.* 1996. V. 709. P. 51–58.
21. Brown C.K., Madauss K., Lian W., Beck M.R., Tolbert W.D., Rodgers D.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 3127–3132.
22. Fernandez M., Liu X., Wouters M.A., Heyberger S., Husain A. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 4998–5004.
23. Kost O.A., Bovin N.V., Chemodanova E.E., Nasonov V.V., Orth T.A. // *J. Mol. Recognit.* 2000. V. 13. P. 360–369.
24. Balyasnikova I.V., Karran E.H., Albrecht R.F., Danilov S.M. // *Biochem. J.* 2002. V. 362. P. 585–595.
25. Гринштейн С.В., Левашов А.В., Кост О.А. // *Биохимия.* 2001. Т. 66. С. 46–54.
26. Кост О.А., Гринштейн С.В., Никольская И.И., Шевченко А.А., Бинеvский П.В. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. С. 375–383.
27. Holmquist B., Bunning P., Riordan J.F. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 95. P. 540–549.
28. Friedland J., Silverstein E. // *J. Am. Clin. Pharmacol.* 1976. V. 66. P. 416–424.
29. Henderson P.J.F. // *Biochem. J.* 1972. V. 127. P. 321–333.
30. Deleage G., Blanchet C., Geourjon C. // *Biochimie.* 1997. V. 79. P. 681–686.
31. Kelley L.A., MacCallum R.M., Sternberg M.J.E. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 299. P. 499–520.

Structural and Functional Peculiarities of Homologous Domains of Angiotensin-Converting Enzyme

S. V. Voronov, P. V. Binevski, N. A. Zueva,
V. A. Palyulin, I. I. Baskin, M. A. Orlova, and O. A. Kost[#]

[#]Fax: +7 (095) 939-5417; e-mail: kost@enzyme.chem.msu.ru

Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

Somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) consists of two homologous domains, each of them containing an active site. Differences in substrate specificities and affinity to inhibitors of the active sites of the two domains of bovine ACE are described. The ACE domains demonstrate different thermostability, and the reasons for this difference are analyzed. A structural model of the ACE domains is suggested, which allows us to reveal the structural subdomain important for the protein stability and localize the hydrophobic and the carbohydrate-binding sites. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: angiotensin-converting enzyme, secondary structure, three-dimensional structure; 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid; thermal inactivation; γ -inactivation