

*На правах рукописи*



ПЕТРОВ МАКСИМ НИКОЛАЕВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ЭФФЕКТОРОВ  
НА КОНФОРМАЦИЮ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО  
ФЕРМЕНТА ЧЕЛОВЕКА**

03.01.04 – биохимия  
03.01.06 – биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии Химического факультета  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научные руководители:**

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник  
**Кост Ольга Алексеевна**

доктор биологических наук  
**Данилов Сергей Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Ротанова Татьяна Васильевна**

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник  
лаборатории химии протеолитических ферментов Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Института  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова РАН

**Мягкова Марина Александровна**

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией  
иммунохимии Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института физиологически активных веществ РАН

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение Научно-исследовательский институт  
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

Защита диссертации состоится **« 27 » октября 2015 года в 15 часов** на заседании  
Совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по  
химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.  
Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ,  
Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского  
государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического  
факультета МГУ ([www.chem.msu.ru](http://www.chem.msu.ru)).

Автореферат разослан        сентября 2015 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 501.001.59,  
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

**Актуальность темы.** Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, КФ 3.4.15.1)

- Zn-зависимая пептидилдипептидаза, является одним из главных регуляторов кровяного давления, влияет на метаболизм нейропептидов, передачу сигнала внутрь клетки, иммунную и репродуктивную функции.

Ингибиторы АПФ являются первым средством при терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы. Недавно с помощью моноклональных антител (мАт) было показано, что связывание таких коммерческих ингибиторов АПФ, как каптоприл, лизиноприл и эналаприлат (синтетические аналоги ди- и трипептидов) изменяет участок поверхности фермента, на котором располагаются эпитопы связывания двух мАт. Не исключено, что изменения конформации затрагивают и другие участки поверхности фермента. В настоящее время определены эпитопы связывания 9 мАт к N-домену и 8 мАт к С-домену на разных участках поверхности АПФ, что открывает новые возможности для исследования изменений конформации АПФ под влиянием различных лигандов, в том числе ингибиторов.

Следует отметить, что АПФ - это молекула сложной структуры, состоящая из двух доменов в составе одной полипептидной цепи, каждый из которых несет в своем составе активный центр. При этом механизм взаимодействия активных центров зависит от структуры лиганда и предполагает некое взаимодействие доменов в составе АПФ. Так, при связывании ди- и трипептидов наблюдается ярко выраженная отрицательная кооперативность между доменами АПФ, но при связывании нона- и декапептидов домены в составе АПФ функционируют независимо. Это, в свою очередь, позволяет предположить, что связывание ингибиторов различной структуры может приводить к различным конформационным изменениям молекулы фермента, что, возможно, является базой наблюдаемых отличий в механизме функционирования активных центров АПФ.

С помощью мАт возможно контролировать изменение конформации фермента не только при связывании ингибиторов АПФ, но и при продуцировании фермента различными тканями, а также при химической модификации молекулы АПФ. В частности, с помощью мАт было показано, что при развитии болезни Гоше и саркоидоза в крови больных присутствует АПФ, продуцируемый из видоизмененных макрофагов (клеток Гоше) и саркоидных гранулам и имеющий топологию поверхности, отличную от нормы. Не исключено, что при развитии других патологий на конформацию АПФ могут оказывать влияние также эндогенные соединения,

присутствующие в крови. Среди заболеваний, характеризующихся содержанием в крови массы различных токсических соединений, следует выделить уремию. При развитии уремии в крови, в частности, повышается концентрация глутатиона, восстанавливающего дисульфидные связи. Исследование АПФ в составе крови этих больных и возможное выявление конформационно измененного АПФ позволит надеяться получить информацию о характеристиках АПФ при развитии уремии и получить фундаментальные данные, которые могут послужить основой для развития молекулярной медицины в будущем.

**Цели работы.** Выявление изменений связывания мАт к различным эпитопам на поверхности АПФ, которые характеризуют изменения конформации фермента на определенных участках поверхности белковой глобулы под действием ингибиторов АПФ; выявление различий в конформационных изменениях белка при связывании ингибиторов различной структуры; определение влияния восстановления дисульфидных связей на конформацию фермента; анализ образцов плазмы больных уремией для выявления конформационно измененного АПФ в крови этих больных и его характеристика по активности и эффективности ингибирования.

**Научная новизна и практическая значимость.** Впервые определено влияние коммерческих ингибиторов АПФ лизиноприла и эналаприлата (аналоги трипептидов) на конформацию АПФ. С помощью панели из 17 мАт показано, что в присутствии этих ингибиторов изменяется связывание 5 мАт, специфичных к двум неперекрывающимся областям на поверхности N-домена и 4 мАт, специфичных к двум неперекрывающимся областям на поверхности С-домена АПФ.

Впервые показано, что связывание нонапептида тепротида приводит к изменению связывания тех же 4 мАт, специфичных к двум неперекрывающимся областям на поверхности N-домена и тех же 2 мАт, специфичных к двум неперекрывающимся областям на поверхности С-домена АПФ, связывание которых менялось под влиянием лизиноприла и эналаприлата. При этом влияние тепротида на конформацию АПФ принципиально отличается от влияния эналаприлата и лизиноприла. Наиболее ярким отличием является то, что связывание трех мАт (1G12, 6A12 и i2H5) к сильно перекрывающимся эпитопам связывания на N-домене АПФ значительно увеличивается под действием эналаприлата и лизиноприла, в то время как под действием тепротида связывание этих трех мАт, наоборот, резко падает. Полученные данные свидетельствуют, что связывание в активных центрах АПФ

ингибиторов различной структуры приводит к различным изменениям конформации АПФ, что может служить основой наблюдаемых различий функционирования активных центров фермента при связывании лигандов различной структуры.

Сравнение экспериментальных данных по зависимости эффективности связывания мАт 1G12 (к N-домену) и 3F11 (к C-домену) с АПФ от концентрации ингибитора с соответствующими теоретическими кривыми связывания ингибиторов в активных центрах АПФ показывает, что связывание тепротиды на N-домене АПФ влечет за собой изменение конформации не только этого, но и соседнего C-домена.

С помощью мАт показано, что разрыв дисульфидных мостиков в глобуле АПФ посредством восстанавливающих агентов глутатиона (GSH) и дитиотреитола (DTT) приводит к существенному изменению конформации АПФ. При этом модифицированный таким образом АПФ почти не претерпевает дальнейших изменений конформации под действием эналаприлата, а под действием тепротиды изменяется конформация только C-домена в составе двухдоменного АПФ. Показано, что при гемолизе эритроцитов происходят изменения конформации фермента, схожие с изменениями конформации, вызванными действием глутатиона и дитиотреитола.

Выявлены 4 из 20 пациентов (20%), больных уреимией, в крови которых выявлен конформационно измененный АПФ. Эти изменения конформации затрагивают области связывания мАт 1B3 (на C-домене) и мАт 1G12 (на N-домене). Этот конформационно измененный АПФ характеризуется повышенной активностью по отношению к природному субстрату ангиотензину-I и пониженной чувствительностью к ингибирующему действию специфических ингибиторов – эналаприлата и тепротиды. Показано, что в крови этих пациентов изменение конформации поверхности АПФ под действием ингибиторов (как эналаприлата, так и тепротиды) менее выражено по сравнению с нормой. Таким пациентам может быть рекомендовано переходить на другой класс антигипертензивных средств.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены на VI симпозиуме по химии протеолитических ферментов (Москва, 2007); международной конференции "Biocatalysis-2009: Fundamentals & Applications" (Архангельск, 2009); XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2010» (Москва, 2010); XVII Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2010); XVIII Российском национальном конгрессе

"Человек и лекарство" (Москва, 2011); международной конференции "Biocatalysis-2013: fundamentals and applications" (Москва, 2013).

**Печатные работы.** По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ.

**Структура.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (главы 1-3), экспериментальной части (глава 4), описывающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения (главы 5-7), выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 142 страницах, содержит 8 таблиц и 46 рисунков. Список литературы включает 212 ссылок.

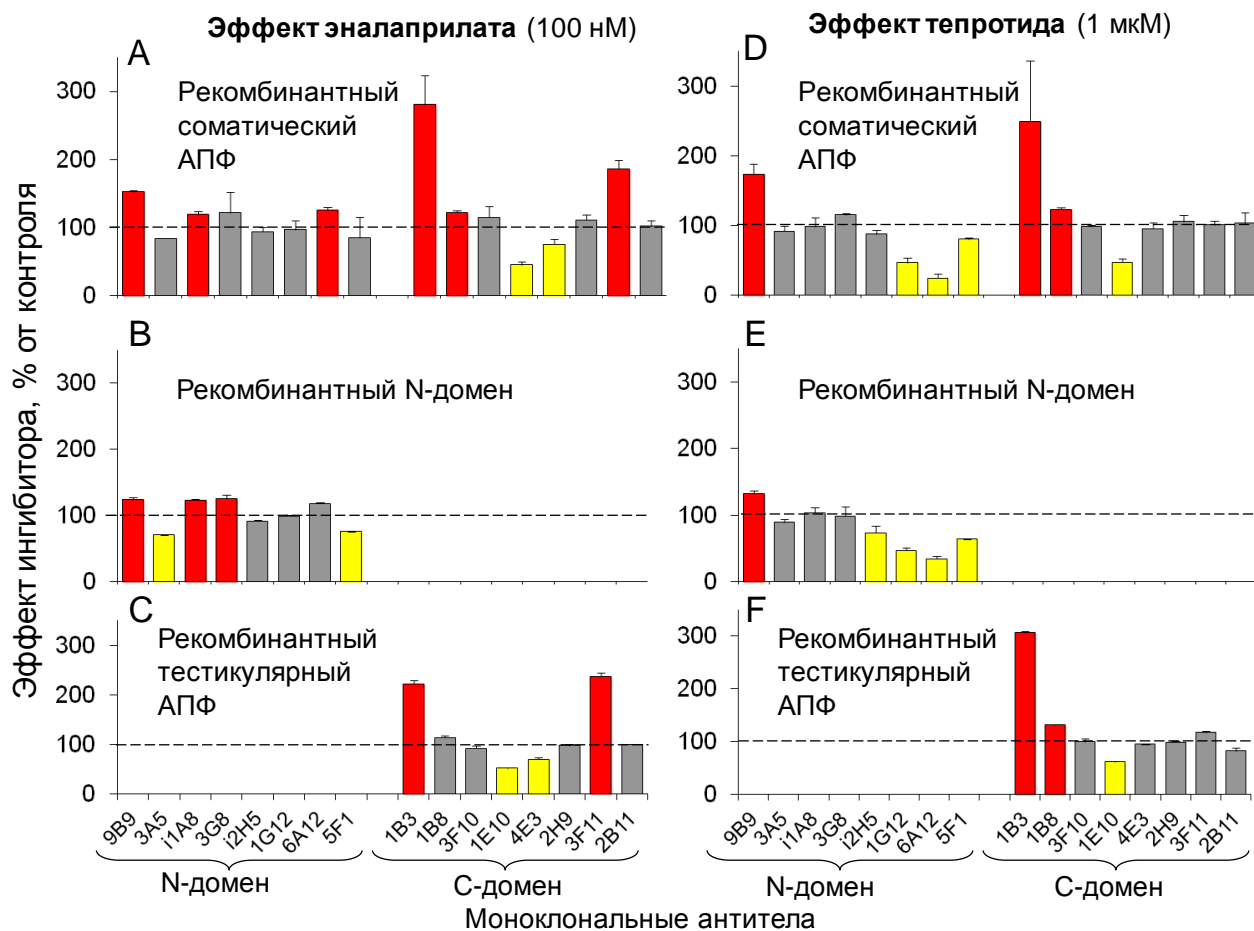
## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Предварительно были определены условия, при которых проводились все дальнейшие эксперименты. Для оценки связывания мАт с АПФ был выбран метод иммуносорбции, за образованием комплексов мАт-АПФ следили по активности фермента, связанного с мАт, сорбированными на планшете через поликлональные антитела козла против иммуноглобулинов мыши. В работе использовали АПФ, выделенный и очищенный из семенной жидкости человека, и АПФ в составе биологических жидкостей (плазмы крови и семенной жидкости) человека. Также использовали рекомбинантные формы соматического, тестикулярного (С-домен) и N-домена АПФ человека, экспрессированные в СНО-клетках китайских хомячков. Моноклональные антитела и рекомбинантные формы АПФ были любезно предоставлены д.б.н. Даниловым С.М. из университета Иллинойса, Чикаго. Образцы плазмы крови пациентов с уреимией, а также донорскую плазму любезно предоставил к.м.н. Шилов В.Ю. из Московского Государственного Медико-стоматологического университета. Семенную жидкость любезно предоставил проф. Евдокимов В.В. из НИИ Урологии, Москва.

### **1. Определение влияния связывания ингибиторов различной структуры на эффективность связывания моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом**

В данной работе был выполнен систематический анализ влияния эналаприлата, лизиноприла (аналоги трипептидов) и тепротида (нонапептид) на связывание панели мАт (9 мАт к N-домену и 8 мАт к С-домену АПФ) с АПФ.

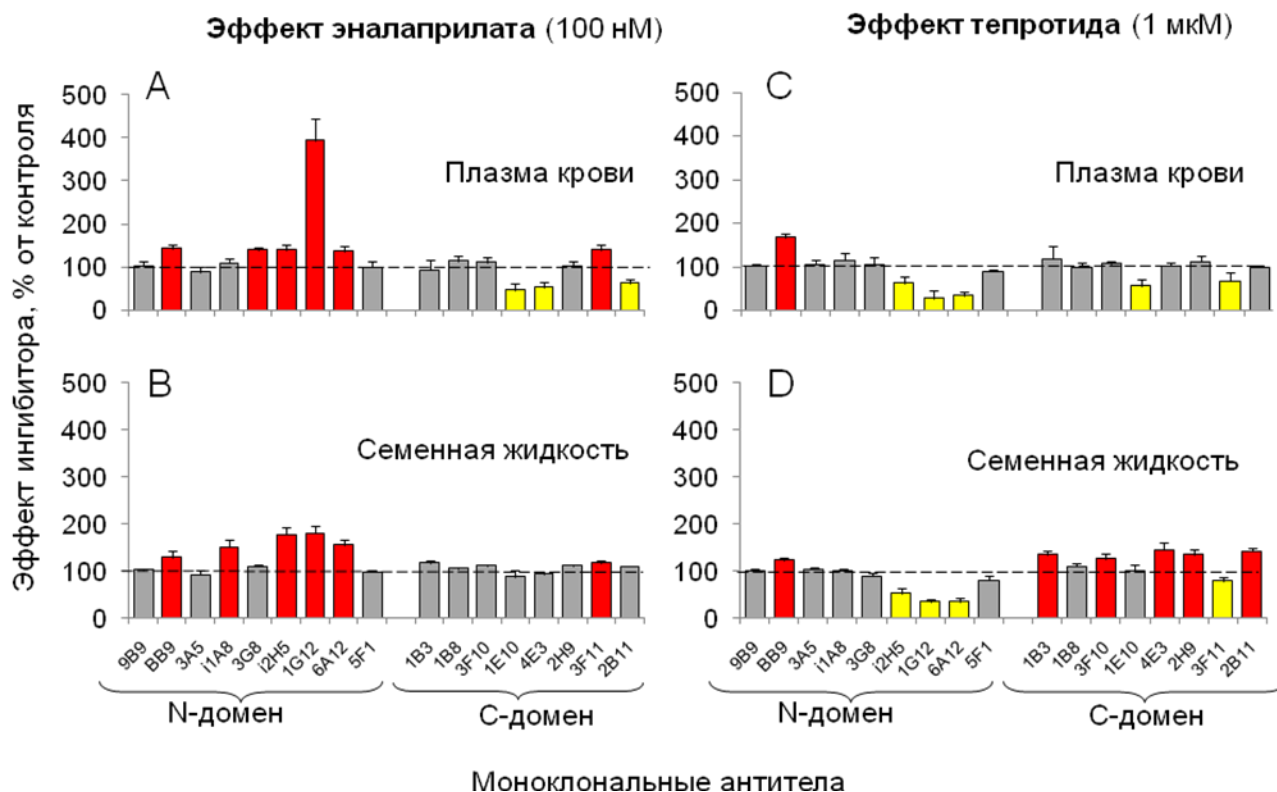
Определено влияние указанных ингибиторов на эффективность связывания панели мАТ как с двудоменной рекомбинантной АПФ, так и с рекомбинантными однодоменными формами фермента. Показано, что связывание этих ингибиторов в активных центрах АПФ вызывает изменения конформации как двудоменной, так и однодоменных форм фермента (рис. 1).



**Рис. 1.** Эффект эналаприлата (А, В, С) и тепротида (D, Е, F) на связывание панели мАТ с двудоменной и однодоменными растворимыми рекомбинантными формами АПФ человека. Ингибиторы использовали в концентрации, превышающей константу ингибирования АПФ на два порядка. Красным цветом отмечены мАТ, связывание которых в присутствии ингибиторов возрастало на 20% и более, желтым – мАТ, связывание которых понижалось на 20% и более.

Из рис. 1 А-С видно, что под действием эналаприлата связывание мАТ изменяется качественно одинаково как с соматическим АПФ, так и с отдельными доменами. Эффект лизиноприла на связывание мАТ с АПФ полностью совпадал с эффектом эналаприлата. Аналогично, под действием тепротида связывание мАТ как с соматическим АПФ, так и с отдельными доменами изменяется одинаково (рис. 1 D-F). Наблюдаемые эффекты ингибиторов (как аналогов трипептидов, так и нонапептида тепротида) сохраняются при переходе и на другие источники ферментов.

Количественно цифры могут варьироваться, но качественно эффект тот же. Так, эффект эналаприлата различается для рекомбинантного АПФ (рис. 1 А) и для АПФ в составе плазмы крови (рис. 2 А) и семенной жидкости (рис. 2 В). Эффект тепрототида на связывание мАт с АПФ также зависит от источника фермента (рис. 1 D, рис. 2 С, D).



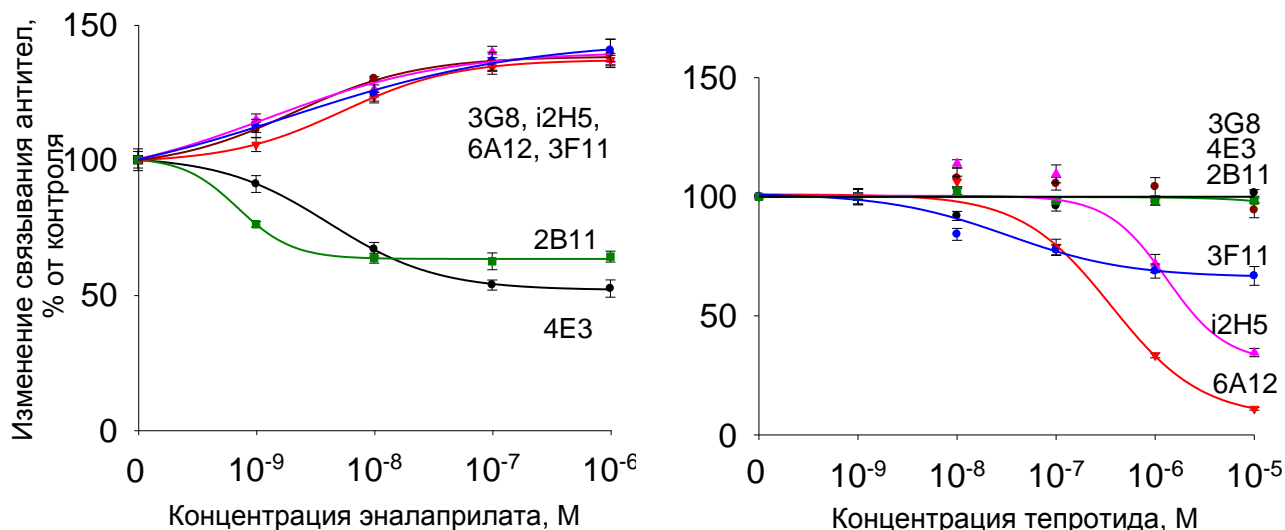
**Рис. 2.** Эффект эналаприлата (А, В) и тепрототида (С, D) на связывание панели мАт с АПФ в составе плазмы крови и семенной жидкости. Красным цветом отмечены мАт, связывание которых в присутствии ингибиторов возросло на 20% и более, желтым – мАт, связывание которых понижалось на 20% и более.

Такая разница может объясняться, например, разным гликозилированием ферментов из разных источников, а также вероятным влиянием различных компонентов в составе биологических жидкостей.

Сопоставление данных по влиянию эналаприлата и тепрототида на связывание панели мАт как с двудоменным АПФ, так и с отдельными N- и C-доменами АПФ (рис. 1, 2) выявило значительные различия между эффектом эналаприлата и тепрототида. Наиболее наглядно эта разница наблюдается для мАт i2H5, 6A12 и 1G12 к N-домену (их эпитопы перекрываются) и мАт 3F11 к C-домену АПФ. Так, под действием эналаприлата эффективность связывания этих 4 мАт с АПФ повышается, а под действием тепрототида, наоборот, понижается, что указывает на принципиально различные структурные изменения при связывании ингибиторов разной структуры.



Исследование влияния эналаприлата и тепротида на связывание панели мАт с АПФ в составе плазмы крови в широком интервале концентраций ингибиторов показало, что при высоких концентрациях ингибиторов практически все кривые выходят на плато, что свидетельствует о том, что в этих условиях достигнуты максимально возможные конформационные изменения фермента. На рис. 3 в качестве примера представлены данные для некоторых мАт.



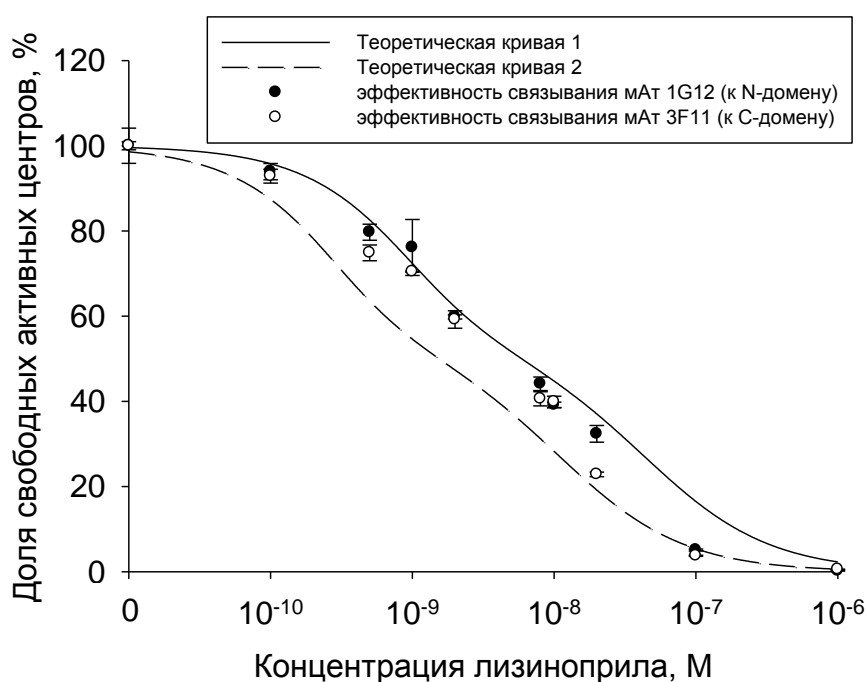
**Рис. 3.** Зависимость эффективности связывания мАт с АПФ в составе плазмы крови от концентрации ингибитора.

Таким образом, при связывании в активных центрах АПФ ингибиторов разной структуры значительная часть мАт изменяет эффективность связывания с ферментом. При этом наблюдаемые изменения конформации поверхности АПФ зависят от структуры используемого ингибитора.

### 1.1. Сопоставление конформационных изменений ангиотензин-превращающего фермента со степенью заполнения его активных центров ингибитором

Для того, чтобы сопоставить наблюдаемые изменения эффективности связывания мАт с АПФ при связывании эналаприлата и тепротида с насыщенностью активных центров фермента молекулами ингибитора, с помощью программы Mathematica 6 были построены теоретические кривые, характеризующие степень заполнения активных центров АПФ ингибиторами (лизиноприлом и тепротидом) в зависимости от концентрации ингибитора в системе. Фактически рассчитывали теоретические зависимости доли свободных активных центров фермента от концентрации ингибитора в активных центрах АПФ. При этом учитывали ранее

обнаруженный факт, что при связывании лизиноприла на любом из доменов константа связывания его на втором домене ухудшается в 20 раз (так называемое явление отрицательной кооперативности), а при связывании тепротида с АПФ явление отрицательной кооперативности отсутствует. Поскольку константы ингибирования N- и С-доменов АПФ лизиноприлом достаточно близки ( $1,2 \cdot 10^{-9} \text{ М}$  и  $3,0 \cdot 10^{-10} \text{ М}$  соответственно), то очевидно, что такой ингибитор не будет проявлять доменной специфичности. Кривые, представленные на рис. 4 и 5, отражают рассчитанную зависимость количества оставшихся свободных активных центров АПФ от количества

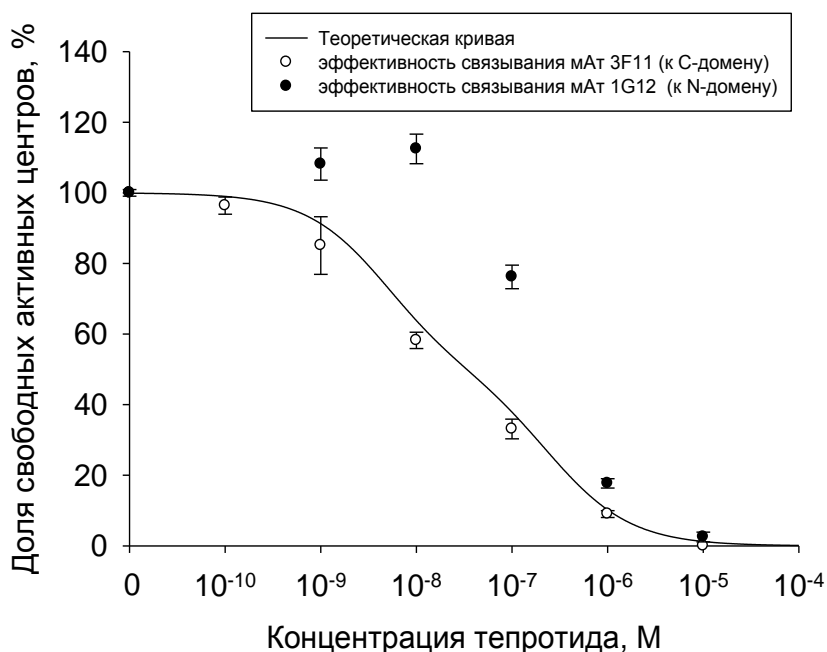


**Рис. 4.** Сопоставление экспериментальных данных (точки) по влиянию лизиноприла на эффективность связывания МАТ 1G12 (к N-домену) и 3F11 (к С-домену) с очищенным АПФ из семенной жидкости с теоретическими зависимостями, описывающими связывание лизиноприла в активных центрах АПФ от концентрации ингибитора в системе (кривые). Кривая 1 рассчитана исходя из предположения, что лизиноприл связывается сначала с N-доменом, а затем с худшей константой с С-доменом АПФ. Кривая 2 рассчитана исходя из предположения, что лизиноприл связывается сначала с С-доменом, а затем с худшей константой с N-доменом АПФ. Для того, чтобы сопоставить имеющиеся экспериментальные данные по связыванию МАТ с АПФ с полученными теоретическими зависимостями, представили экспериментальные данные в следующем виде: за 100% (или отсутствие конформационных изменений) приняли значение эффективности связывания МАТ в отсутствие ингибиторов, за 0% (максимум конформационных изменений) приняли значение эффективности связывания МАТ в присутствии максимальной концентрации ингибиторов, используемой в эксперименте.

ингибитора в системе. Нам не удалось учесть в расчетах случайный порядок связывания лизиноприла с N- и С-доменами в составе АПФ, поэтому мы построили две теоретические кривые, представляющие собой предельные случаи связывания лизиноприла с N- и С-доменами в составе АПФ (рис. 4). При этом считали, что в одном случае лизиноприл связывается сначала с N-доменом, а затем с худшей константой с С-доменом АПФ, а в другом – сначала с С-доменом, а затем с худшей константой с N-доменом АПФ.

Видно, что экспериментальные точки, характеризующие изменение связывания МАТ 1G12 и 3F11 с АПФ в зависимости от концентрации лизиноприла, лежат между предельными теоретическими кривыми, описывающими связывание лизиноприла в активных центрах АПФ с учетом ранее продемонстрированной отрицательной кооперативности между доменами фермента (рис. 4). Такое расположение экспериментальных точек ожидаемо, поскольку лизиноприл не проявляет доменной специфичности. Из полученной информации, однако, нельзя сделать вывод о том, влияют ли друг на друга домены в составе АПФ при связывании ингибитора.

На рис. 5 представлено сравнение экспериментальных данных по зависимости эффективности связывания МАТ 1G12 и 3F11 с АПФ в зависимости от концентрации тепротида с теоретической кривой связывания тепротида в активных центрах АПФ.



**Рис. 5.** Сравнение экспериментальных данных по влиянию тепротида на эффективность связывания МАТ 1G12 и 3F11 с АПФ в составе плазмы крови с теоретической зависимостью связывания тепротида в активных центрах АПФ от концентрации ингибитора в системе.

Поскольку для тепротида константы ингибирования N- и С-доменов АПФ человека значительно отличаются ( $2,5 \cdot 10^{-7}$  М и  $4,4 \cdot 10^{-9}$  М, соответственно), можно утверждать, что этот ингибитор обладает специфичностью к С-домену. Изменение

эффективности связывания мАт 3F11 к С-домену начинается уже при низких концентрациях тепротида, что соответствует преимущественному связыванию тепротида на С-домене АПФ, и продолжается вплоть до полного насыщения обоих активных центров тепротидом. То есть связывание тепротида на N-домене приводит к изменению эффективности связывания мАт 3F11 к С-домену, и, соответственно, к изменению конформации С-домена. При низких концентрациях тепротида (т.е. в тех условиях, когда тепротид связывается преимущественно с С-доменом АПФ) наблюдается небольшое, но статистически достоверное повышение связывания мАт 1G12 (к N-домену) на 15%. При увеличении концентрации тепротида и, соответственно, связывании тепротида на N-домене наблюдается резкое снижение связывания мАт 1G12 вплоть до полной отмены при максимальной концентрации ингибитора. То есть связывание тепротида на С-домене АПФ приводит к изменению конформации соседнего N-домена. Таким образом, связывание тепротида на любом из доменов АПФ приводит к изменению конформации не только этого, но и соседнего домена.

## **1.2. Определение влияния S-S восстанавливающих агентов на связывание панели моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом в составе плазмы крови**

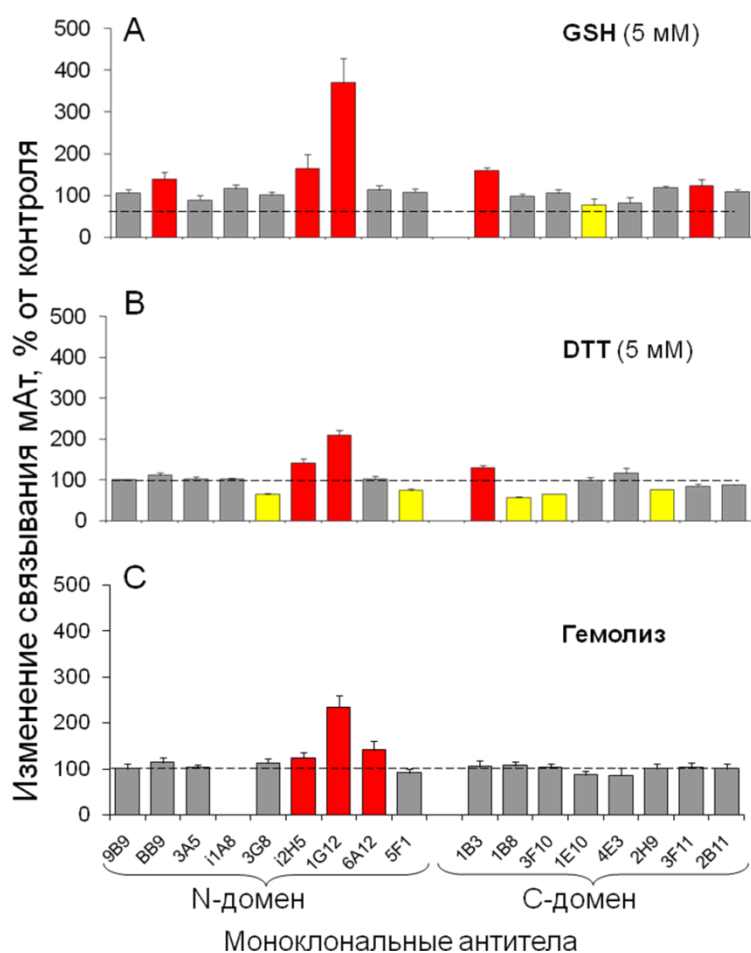
Поскольку применение мАт позволило выявить изменения конформации АПФ при связывании ингибиторов в активных центрах фермента, мы предположили, что мАт могут быть полезны при определении возможных конформационных изменений АПФ в крови при патологиях, сопровождающихся накоплением различных токсических соединений. Известно, в частности, что при развитии уремии в крови повышается концентрация многих токсических соединений, в том числе глутатиона (GSH), который способен восстанавливать дисульфидные связи в молекуле белка.

Молекула АПФ содержит 6 парных цистеиновых остатков, образующих цистеиновые мостики: Cys128-Cys136, Cys330-Cys348 и Cys516-Cys528 в составе N-домена, а также Cys728-Cys734, Cys928-Cys946 и Cys1114-Cys1126 в составе С-домена. Кроме того, в составе каждого домена имеется неспаренный остаток цистеина: Cys474 в N-домене и Cys1072 в С-домене.

Для того, чтобы проверить, каким образом влияют восстанавливающие агенты на эффективность связывания мАт с АПФ, мы провели ряд экспериментов,

включающих в себя восстановление дисульфидных связей как глутатионом, так и дитиотреитолом (DTT).

Восстановление S-S мостиков с помощью как GSH, так и DTT (рис. 6 А, В) в выбранных условиях привело к качественно одинаковым изменениям связывания ряда мАт с АПФ в составе плазмы крови и к снижению активности фермента на 40%. Наиболее выраженное изменение эффективности связывания наблюдалось для мАт 1G12 и i2H5 к N-домену АПФ (их связывание под влиянием GSH и DTT возрастало на 50-300%). Эпитопы связывания этих мАт имеют в своем составе дисульфидный мостик Cys516-Cys528, следовательно, можно заключить, что восстановление именно этого мостика приводит к наблюдаемому эффекту.



**Рис. 6.** Изменение связывания мАт с АПФ крови под влиянием глутатиона (А), дитиотреитола (В) и вследствие гемолиза (С).

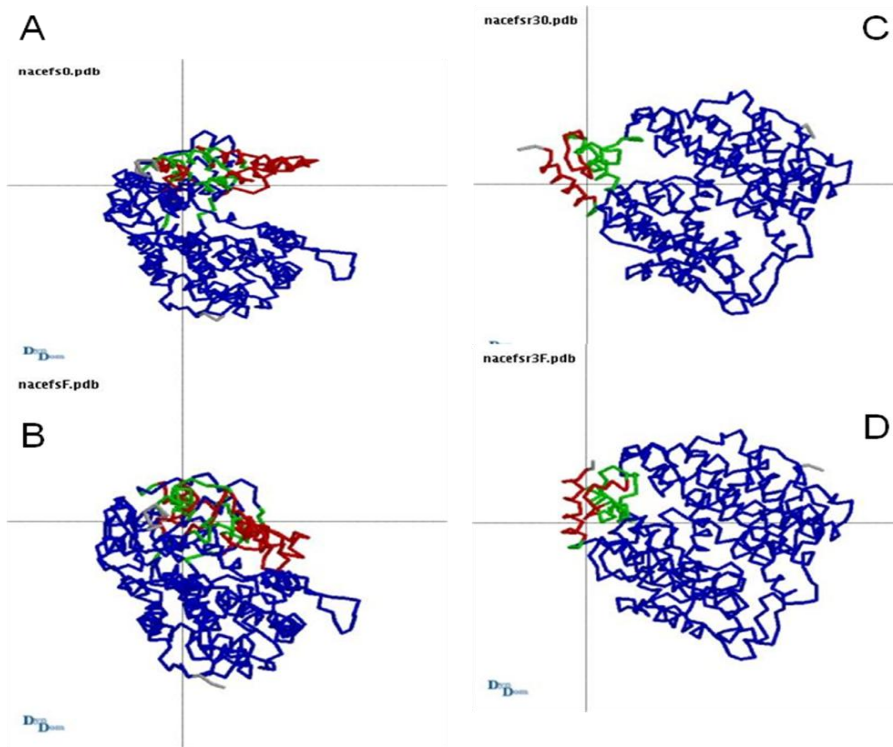
Для того чтобы попытаться определить возможные конформационные последствия разрыва дисульфидных связей в молекуле АПФ, с помощью программы Insight II (Accelrys Inc., San Diego, CA) мы заменили S-S мостики в составе N-домена на пространственно разделенные S-H группы. АПФ в закрытой конформации представлен в базе данных белков (PDB: P2C6). Модель АПФ в открытой конформации построена по гомологии с АПФ2 (PDB: 1R42). Моделирование разрыва

дисульфидных мостиков проводили в рамках совместной работы с к.ф.-м.н., с.н.с. Упоровым И.В. В структуре N-домена путем замены S-S связи на две пространственно разделенные SH-группы принудительно размыкали дисульфидный мостик Cys516-Cys528, расположенный в перекрывающихся эпитопах связывания мАт 1G12, 6A12 и i2H5, а также дисульфидный мостик Cys330-Cys348.

Молекулярная динамика структуры N-домена АПФ в закрытой конформации как с интактными, так и с модифицированными дисульфидными связями не привела к видимым изменениям конформации фермента. При работе со структурой N-домена АПФ в открытой конформации оказалось, что если все дисульфидные мостики замкнуты, то в процессе молекулярной динамики происходит «схлопывание» структуры, т.е. ее переход из открытой конформации в закрытую. Если в структуре разомкнут цистеиновый мостик Cys330-Cys348 или Cys516-Cys528, либо оба одновременно, то структура не переходит в закрытую конформацию, а застывает в полужакрытом положении после первых 200 из 500 выполненных шагов молекулярной динамики. Кроме того, в процессе молекулярной динамики структуры с разомкнутым дисульфидным мостиком Cys516-Cys528 заметно изменение положения петли, расположенной рядом с этим мостиком в эпитопе связывания мАт 1G12, что может объяснять изменение связывания этого мАт при восстановлении этого S-S мостика.

Для того, чтобы уточнить полученную картину, воспользовались программным комплексом DynDom (<http://fizz.cmp.uea.ac.uk/dyndom/>), который показывает максимально возможную пространственную разницу между движущимися частями фермента при переходе из закрытой конформации в открытую. В модели N-домена со всеми интактными дисульфидными мостиками (рис. 7 А, В) наблюдается явное наличие движения открывания-закрывания щели активного центра. В случае, когда был разомкнут один или оба цистеиновых мостика, движение открывания-закрывания щели активного центра ограничено. На рис. 7 (С, D) показана модель N-домена с разомкнутым мостиком Cys516-Cys528.

Таким образом, разрыв одного или нескольких дисульфидных мостиков в составе однодоменного фермента приводит к нарушению движения открывания-закрывания щели активного центра АПФ, что может объяснять некоторое падение (~40%) активности фермента под влиянием S-S восстанавливающих агентов.



**Рис. 7.** Влияние восстановления дисульфидных мостиков на движение открывания-закрывания щели активного центра на примере N-домена АПФ с интактными S-S связями (А, В) и с разорванной связью Cys516-Cys528 (С, D). А, С - модели фермента в открытой конформации; В, D - модели фермента в закрытой конформации.

Известно, что при гемолизе эритроцитов происходит высвобождение внутриклеточного GSH в плазму, что в значительной степени увеличивает концентрацию глутатиона в крови. Мы смоделировали реальную ситуацию, имеющую место при гемолизе эритроцитов в крови. Для этого с помощью резкого встряхивания в присутствии воды произвели осмотический шок эритроцитов в составе крови. Клетки крови отделили центрифугированием и сравнили связывание панели мАт с полученной плазмой и с нормальной плазмой крови. Данные представлены на рис. 6 С. Оказалось, что вследствие гемолиза значительно увеличивается связывание мАт 1G12 и i2H5 к N-домену АПФ (аналогично эффекту GSH и DTT). Кроме того, увеличилась эффективность связывания мАт 6A12, эпитоп связывания которого сильно перекрывается с эпитопами связывания мАт 1G12 и i2H5 и также содержит в своем составе дисульфидный мостик Cys516-Cys528.

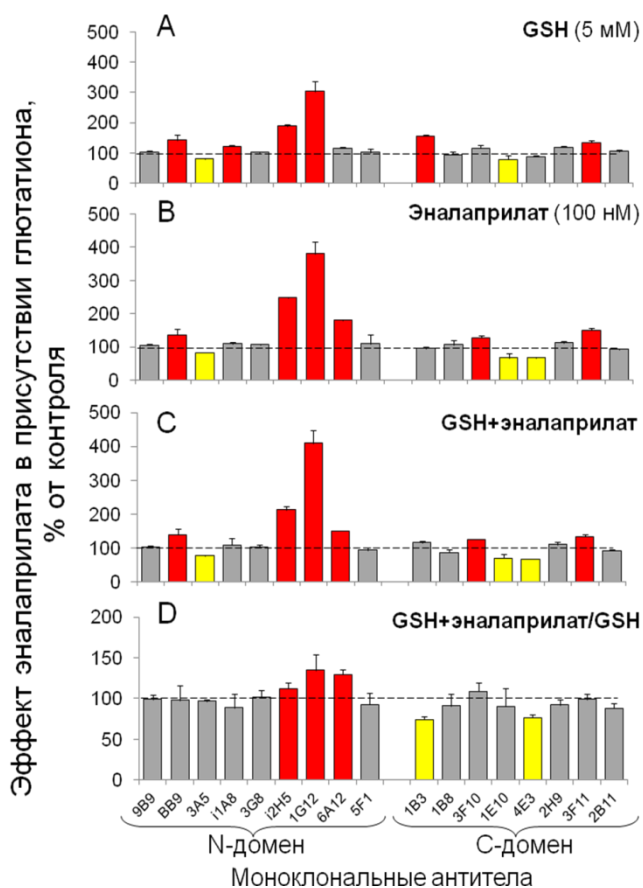
Таким образом, мы подтвердили, что соединения, присутствующие в крови (по крайней мере, глутатион), могут непосредственно влиять на конформацию АПФ в составе плазмы крови.

### **1.3. Определение влияния ингибиторов на изменение конформации ангиотензин-превращающего фермента с восстановленными дисульфидными связями**

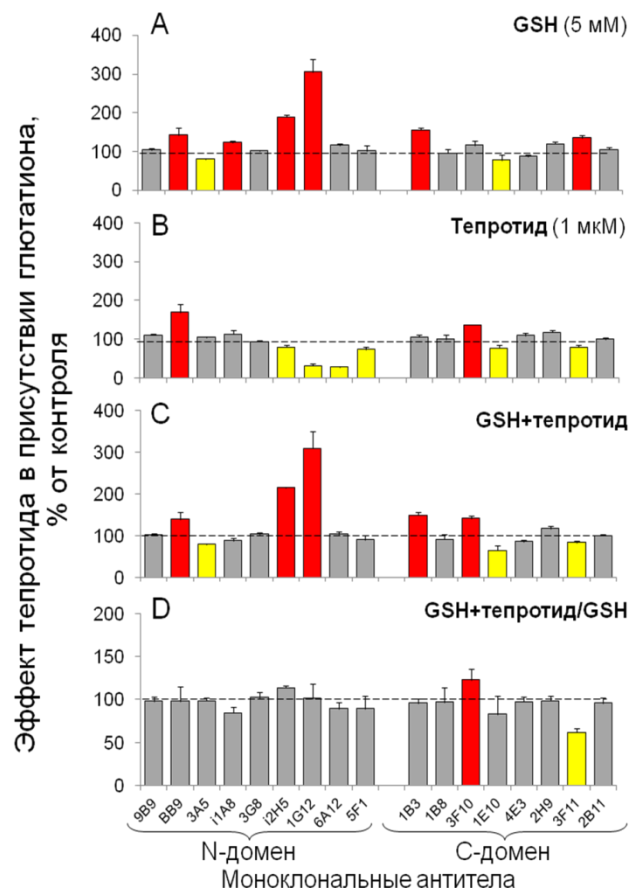
Поскольку мы показали, что конформация АПФ в крови может быть изменена вследствие восстановления дисульфидных связей, то представляло интерес

проанализировать, каким образом у такого фермента будет меняться топография поверхности при связывании ингибиторов (эналаприлата и тепротида).

На рис. 8 представлены для сравнения эффекты глутатиона на интактный фермент (А), эналаприлата на интактный фермент (В) и эналаприлата на фермент с восстановленными дисульфидными связями (С) в составе плазмы крови, а также разница эффектов С-А (рис. 8 D). Видно, что такие совершенно разные эффекторы, как ингибитор, связывающийся в активном центре АПФ, и глутатион, восстанавливающий дисульфидные связи в белковой глобуле фермента, приводят к одинаковым изменениям связывания практически одних и тех же мАт. То есть при действии на АПФ как эналаприлата, так и глутатиона изменяется топография тех же участков поверхности фермента. При последовательном действии глутатиона и затем эналаприлата эффект последнего на связывание панели мАт с АПФ уже незначителен.



**Рис. 8.** Изменение связывания панели мАт под отдельным и последовательным влиянием глутатиона (5 мМ) и эналаприлата (100 нМ).



**Рис. 9.** Изменение связывания панели мАт под отдельным и последовательным влиянием глутатиона (5 мМ) и тепротид (1 мкМ).



Эти данные свидетельствуют о том, что разрыв дисульфидных связей ведет к существенным конформационным изменениям фермента, при этом конформация АПФ меняется таким образом, что дальнейшее изменение конформации под влиянием эналаприлата становится невозможным.

Аналогичные эксперименты были проведены с тепротидом (рис. 9). Видно, что при действии тепротидом на фермент с восстановленными дисульфидными связями не происходит изменения связывания мАт к N-домену АПФ. Однако изменяется связывание мАт к C-домену фермента с восстановленными дисульфидными связями (рис. 9 В, D). То есть тепротид, в отличие от эналаприлата, способен изменять конформацию C-домена (но не N-домена) АПФ, модифицированного глутатионом.

## **2. Иммунохимическая характеристика ангиотензин-превращающего фермента в норме и при развитии уремии**

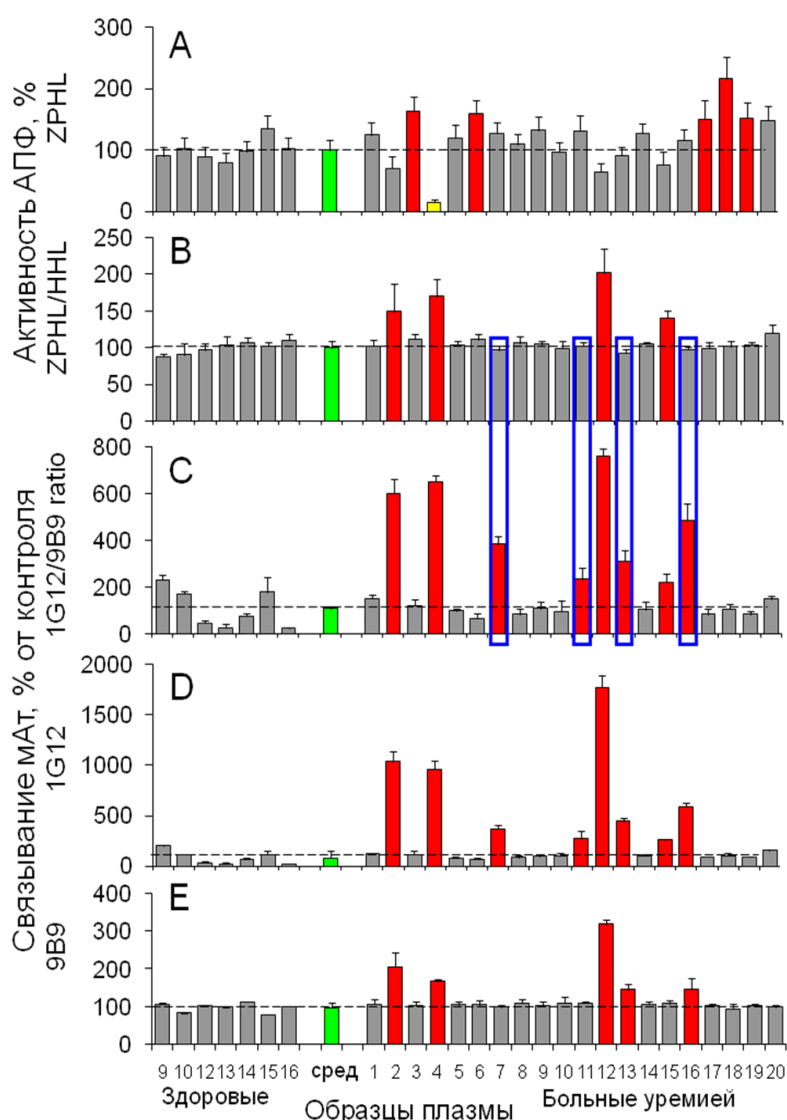
### **2.1. Поиск конформационно измененного ангиотензин-превращающего фермента в крови больных уремией**

Уремия является патологическим заболеванием, характеризующимся высоким содержанием в крови токсических соединений вследствие недостаточной очистки крови в почках. Из литературы известно, что уровень глутатиона в крови значительно повышен у пациентов в конечной стадии развития почечной недостаточности и у пациентов на гемодиализе. Для выявления вероятного присутствия в крови конформационно измененного АПФ была отобрана кровь пациентов в конечной стадии почечной недостаточности с диагнозом уремия до процедуры диализа. Выполнен анализ АПФ в крови каждого из 20 пациентов с диагнозом уремии и, для сравнения, ряда здоровых доноров.

Сравнивали образцы плазмы больных уремией и здоровых доноров по следующим показателям: 1) активность; 2) содержание АПФ в крови, определяемое по уровню связывания мАт 9В9, эффективность связывания которого с АПФ не зависит от присутствия всех используемых в работе эффекторов; 3) показатель ZPHL/HNL (соотношение скоростей гидролиза двух синтетических субстратов Cbz-Phe-His-Leu и Hip-His-Leu, соответственно), повышение которого свидетельствует о присутствии в крови экзогенных ингибиторов, применяемых в качестве лекарственных средств при гипертонии; 4) показатель 1G12/9B9 (соотношение эффективностей связывания двух

мАт), который, как ранее было показано, повышается в присутствии экзогенных ингибиторов; 5) определение эффективности связывания всей панели мАт с АПФ больных уреимией и здоровых доноров.

Проверка активности выявила у 5 из 20 пациентов повышенный уровень активности АПФ (рис. 10 А), что согласуется с литературными данными. На рис. 10 В представлено соотношение скоростей гидролиза двух синтетических субстратов ZPHL/ННЛ под действием АПФ в составе плазмы крови здоровых доноров и больных уреимией. Видно, что соотношение ZPHL/ННЛ сильно повышено у 4 из 20 пациентов (номера 2, 4, 12 и 15), что может указывать на присутствие в крови этих пациентов экзогенных ингибиторов АПФ.



**Рис. 10.** Анализ плазмы крови здоровых доноров и больных уреимией.

Соотношение 1G12/9B9 (рис. 10 С) повышено в плазме крови тех же 4 пациентов, у которых было повышено соотношение ZPHL/ННЛ (номера 2, 4, 12 и 15), что подтверждает наличие в их крови экзогенных ингибиторов АПФ. Этот же анализ позволил выявить 4 других пациента с уреимией (номера 7, 11, 13 и 16), у которых соотношение 1G12/9B9 повышено, но при этом соотношение ZPHL/ННЛ абсолютно нормальное (рис. 10 В и С в рамке). Это позволило заключить, что, по крайней мере, у этих четырех пациентов может быть изменена локальная конформация эпитопа связывания мАт 1G12 вследствие влияния токсических соединений, присутствующих в крови больных уреимией.

Для того, чтобы определить, какие еще эпитопы связывания мАт на поверхности АПФ, помимо эпитопа мАт 1G12, могут быть изменены в крови этих четырех пациентов (номера 7, 11, 13 и 16), мы протестировали эффективность связывания всей панели мАт с АПФ в составе плазмы крови этих четырех пациентов по сравнению со связыванием этой же панели мАт с АПФ в составе плазмы крови здоровых доноров. Оказалось, что, кроме уже упомянутого повышенного связывания мАт 1G12 к N-домену, в крови тестируемых пациентов повышено также связывание мАт 1B3 к C-домену АПФ. Одной из причин такого увеличения связывания мАт может быть влияние токсических соединений, находящихся в крови больных уреимией, на дисульфидный мостик Cys516-Cys528 в эпитопе связывания мАт 1G12 в N-домене АПФ и на дисульфидный мостик Cys728-Cys734, расположенный вблизи эпитопа связывания мАт 1B3 в C-домене АПФ, а также на свободный Cys1072 в эпитопе мАт 1B3.

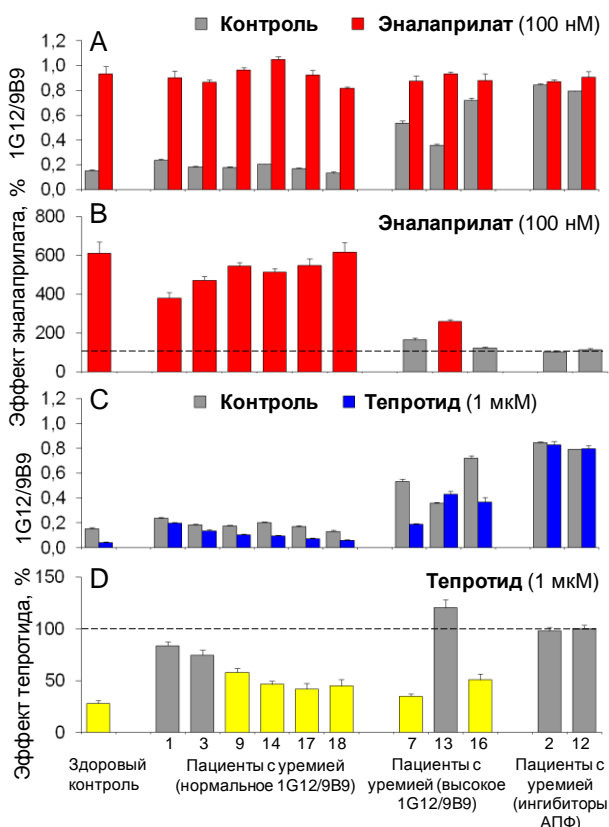
Таким образом, показано, что, действительно, в крови больных уреимией может присутствовать конформационно измененный АПФ.

## **2.2. Характеристика конформационно измененного ангиотензин-превращающего фермента в крови больных уреимией**

Как было показано выше, модифицированный глутатионом АПФ практически лишается способности изменять поверхностную структуру N-домена при связывании как эналаприлата, так и тепротида (рис. 8 и 9). Поэтому мы проверили, каким образом связывание ингибиторов с конформационно измененным АПФ в составе крови больных уреимией может влиять на конформацию его поверхности.

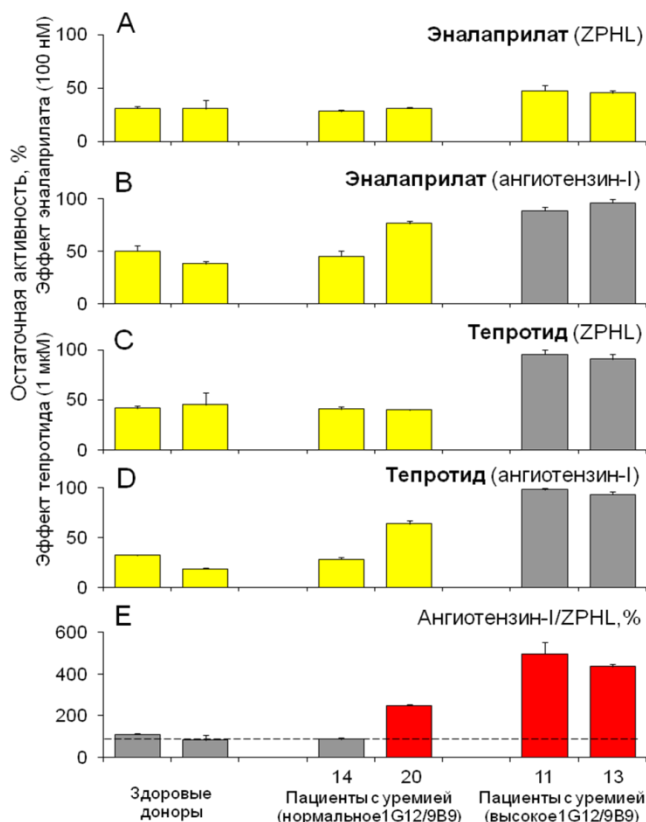
Поскольку очевидно, что некоторые пациенты принимали ингибиторы АПФ в качестве лекарственных средств, добавление ингибиторов, естественно, не приводило к дальнейшим конформационным изменениям фермента в плазме крови таких пациентов (рис. 11, номера 2 и 12). Вместе с тем, у выявленных пациентов (рис. 11, номера 7, 13 и 16) с конформационно измененным АПФ в крови, не принимавших ингибиторы АПФ, изменение связывания мАт 1G12 с АПФ под действием ингибиторов тоже практически отсутствовало (как и у АПФ с восстановленными дисульфидными связями). Изменение связывания мАт 1G12 с АПФ в крови остальных пациентов, больных уреимией (номера 1, 3, 9, 14, 17 и 18) не отличалось от нормы (красные столбики).

Эффект тепротида на эффективность связывания мАт с АПФ больных уреимией (рис. 11 С, D) оказался более индивидуальным, чем эффект эналаприлата, поскольку в группах уремических больных с нормальным (номера 1, 3, 9, 14, 17 и 18) и повышенным (номера 7, 13 и 16) исходным соотношением 1G12/9B9 оказались как пациенты, связывание мАт с АПФ которых под действием тепротида изменялось слабо, так и те, изменение связывания мАт с АПФ которых было таким же, как в норме.



**Рис. 11.** Эффект эналаприлата и тепротида на связывание мАт 1G12 с АПФ в составе крови больных уреимией. А, С - соотношение 1G12/9B9 в присутствии и в отсутствие ингибиторов; В, D - эффект ингибиторов на соотношение 1G12/9B9.

Важные результаты были получены в результате экспериментов по ингибированию эналаприлатом и тепротидом активности АПФ в составе плазмы крови больных уреимией в сравнении со здоровыми донорами. В качестве субстратов использовали природный субстрат декапептид ангиотензин-І и синтетический субстрат ZPHL. Результаты представлены на рис. 12. Оказалось, что по сравнению с нормой конформационно измененный АПФ в составе крови больных уреимией хуже



**Рис. 12.** Ингибирование активности АПФ из крови пациентов с уреимией по двум субстратам – ZPHL и ангиотензину-І. А-D - остаточная активность; E - отношение активностей по двум субстратам.

поддавался ингибированию эналаприлатом в реакции гидролиза ZPHL (рис. 12 А) и практически не ингибировался тепротидом в этой же реакции (рис. 12 С).

При замене синтетического субстрата ZPHL на природный ангиотензин-I выяснилось, что и эналаприлат, и тепротид оказались не способны ингибировать реакцию гидролиза ангиотензина-I конформационно измененным АПФ в составе крови больных уреимией (рис. 12 В, D). Кроме того, АПФ в составе крови одного из двух протестированных больных уреимией с нормальным соотношением 1G12/9B9 также оказался менее чувствителен к ингибированию гидролиза ангиотензина-I как эналаприлатом, так и тепротидом. Важно, что активность АПФ из крови этих пациентов по ангиотензину-I была в несколько раз выше нормы (до 4 раз), в то время как их активность по ZPHL была такой же, как у здоровых доноров (рис. 12 E). Это относится в первую очередь к пациентам с конформационно измененным АПФ.

Мы также провели анализ широкой выборки здоровых доноров и больных без диагноза уреимии по ряду параметров: активность АПФ, соотношение ZPHL/ННЛ и 1G12/9B9. Оказалось, что в обеих выборках были найдены пациенты с конформационно измененным АПФ, но среди здоровых доноров было найдено 3 из 48 (т.е. ~6%) таких пациентов, а среди прочих пациентов (без диагноза уреимии) - 5 из 63 (т.е. ~8%) сравнению с 4 из 20 (т.е. 20%) среди пациентов с диагнозом уреимия, у которых изменена конформация эпитопа связывания мАт 1G12. Таким образом, при уреимии встречаемость пациентов с конформационно измененным АПФ в крови существенно выше, чем у здоровых доноров и людей с другими заболеваниями.

Важно отметить, что существует заметная и близкая к статистически достоверной ( $p < 0,05$ ) разница в артериальном давлении у больных уреимией с конформационно измененным АПФ (давление измеряли до диализа) и у прочих пациентов. Систолическое артериальное давление у больных уреимией с конформационно измененным АПФ составило в среднем  $145,3 \pm 13,9$  мм.рт.ст. против  $123,9 \pm 27,8$  мм.рт.ст. у прочих пациентов ( $p = 0,069$ ), в то время как диастолическое артериальное давление составило в среднем  $78,0 \pm 9,1$  мм.рт.ст. против  $66,2 \pm 12,1$  мм.рт.ст. соответственно ( $p = 0,078$ ).

\*\*\*

Таким образом, можно заключить, что увеличение значения соотношения 1G12/9B9 при нормальном значении соотношения ZPHL/HNL свидетельствует о наличии в крови пациента конформационно измененного АПФ. В процессе выполнения данной работы сформирован научный подход, заключающийся в одновременном контроле соотношений 1G12/9B9 и ZPHL/HNL в плазме (сыворотке) крови пациента. Этот подход может служить базой для разработки стандартной методики, направленной на выявление пациентов, которые могут быть менее восприимчивы к терапии ингибиторами АПФ. Таким пациентам, вероятно, следует назначать более интенсивную терапию ингибиторами АПФ, либо заменять ингибиторы АПФ на другой класс антигипертензивных препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. Связывание ингибиторов в активных центрах АПФ изменяет эффективность связывания ряда мАт к N- и С-доменам фермента, то есть индуцирует конформационные изменения поверхности белковой глобулы. Ингибиторы разной структуры (аналоги трипептидов и нонапептид) могут вызывать разные конформационные изменения АПФ.
2. Сравнение экспериментальных данных по связыванию мАт с АПФ в присутствии ингибиторов с теоретическим моделированием степени связывания ингибиторов в активных центрах фермента позволило установить, что связывание нонапептида тепротида в активном центре, расположенном в любом из доменов АПФ, влияет на конформацию определенного участка поверхности не только на этом же, но и на соседнем домене фермента.
3. Восстановление дисульфидных связей в молекуле АПФ приводит к изменению конформации фермента: такой фермент практически не способен к дальнейшему изменению конформации как N-, так и С-домена под действием коммерческого ингибитора АПФ эналаприлата, но изменяет конформацию С-домена под действием нонапептида тепротида. Компьютерное моделирование с использованием программных комплексов Insight II и DynDom показало, что разрыв одного или нескольких дисульфидных мостиков в составе однодоменного фермента приводит к нарушению движения открывания-закрывания щели активного центра АПФ, что объясняет некоторое падение активности фермента под влиянием S-S восстанавливающих агентов.
4. При развитии уремии в крови присутствует конформационно измененный АПФ (связывание мАт 1G12 к N-домену и 1B3 к С-домену достоверно повышено в 2-4 раза и 1,5 раза соответственно). Определена частота встречаемости таких случаев в крови больных уремией (20%), прочих пациентов (~8%) и здоровых доноров (~6%).
5. Конформационно измененный АПФ в крови больных уремией значительно менее восприимчив к действию ингибиторов (с точки зрения изменения конформации и ингибирования активности АПФ). Показано, что активность АПФ в крови таких больных по отношению к ангиотензину-I повышена по сравнению с нормой.
6. Разработан метод фенотипирования АПФ индивидуальных пациентов, заключающийся в одновременном контроле соотношений 1G12/9B9 и ZPHL/HNL в плазме (сыворотке) крови. Этот подход позволяет выявлять пациентов, которые могут быть менее восприимчивы к терапии ингибиторами АПФ.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Наперова И.А., Балясникова И.В., Петров М.Н., Вахитова А.В., Евдокимов В.В., Данилов С.М., Кост О.А. Характеристика связывания моноклональных антител с С-доменом ангиотензинпревращающего фермента человека. *Биоорганическая химия*, 2008, 34, 3, 358-364.
2. Petrov M.N., Shilo V.Y., Tarasov A.V., Schwartz D.E., Garcia J.G.N., Kost O.A., Danilov S.M. Conformational changes of blood ACE in chronic uremia. *PLoS ONE*, 2012, 7(11), e49290.
3. Petrov M.N., Naperova I.A., Uporov I.V., Danilov S.M., Kost O.A. Putative conformational changes in angiotensin-converting enzyme (ACE) induced by ACE inhibitors and revealed by monoclonal antibodies. *International conference Biocatalysis-2009: fundamentals and applications, Arkhangelsk*, 2009, p. 81-82.
4. Наперова И.А., Петров М.Н., Вахитова А.В., Кост О.А., Данилов С.М. Структурный анализ С-домена ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител. *Материалы VI Симпозиума по химии протеолитических ферментов, Москва*, 2007, с.94.
5. Петров М.Н., Наперова И.А., Кост О.А., Данилов С.М. Изменение связывания моноклональных антител как свидетельство конформационных изменений ангиотензин-превращающего фермента человека при связывании ингибиторов. *Материалы XVII Российского национального конгресса "Человек и лекарство" Москва*, 2010, с. 698.
6. Петров М.Н., Наперова И.А., Кост О.А., Данилов С.М. Применение моноклональных антител для определения конформационных изменений ангиотензин-превращающего фермента человека при развитии патологии и при связывании ингибиторов. *XVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва*, 2010, с. 31.
7. Петров М.Н., Данилов С.М., Кост О.А. Восстановление S-S связи в эпитопе mAb 1G12 на АПФ как фактор, определяющий ответ фермента на связывание ингибитора. *Материалы XVIII Российского национального конгресса "Человек и лекарство" Москва*, 2011, с. 625.
8. Karlov D.S., Vinevski P.V., Petrov M.N., Tikhomirova V.E., Kost O.A. Conformational changes in ACE domains upon binding the ligands of different structure. *Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2013: fundamentals and applications"*, 2013, P. 102-103.