

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Петров Максим Николаевич

**Влияние экзогенных и эндогенных эффекторов
на конформацию ангиотензин-превращающего
фермента человека**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям
03.01.04 - биохимия и 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Научные руководители: к.х.н., в.н.с. Кост О.А.

д.б.н. Данилов С.М.

Москва 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1. АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ	8
1.1. Физиологическая значимость ангиотензин-превращающего фермента	8
1.2. Структура ангиотензин-превращающего фермента.....	10
1.3. Взаимное функционирование доменов в составе соматического ангиотензин-превращающего фермента.....	12
1.4. Трехмерная структура доменов ангиотензин-превращающего фермента	17
1.4.1. Структура С-домена	17
1.4.2. Структура N-домена.....	19
1.4.3. Сравнение строения активных центров N- и С-доменов ангиотензин-превращающего фермента.....	21
1.4.4. Структура двудоменного фермента.....	24
2. ИНГИБИТОРЫ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА.....	31
2.1. Ограничения современных ингибиторов АПФ	31
2.2. Домен-селективные ингибиторы АПФ	35
2.2.1. N-домен специфичные ингибиторы	35
2.2.2. С-домен специфичные ингибиторы.....	36
2.3. Двойные ингибиторы АПФ и ЭПФ	38
3. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА.....	42
3.1. Общая характеристика антител и антигенов	42
3.2. Исследование структуры и функционирования ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител к N-домену	46
3.2.1. Исследование возможной связи между димеризацией и шеддингом ангиотензин-превращающего фермента с поверхности клеточных мембран	47
3.2.2. Исследование каталитической активности N-домена ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител.....	49
3.2.3. Изучение конформационных изменений соматического ангиотензин-превращающего фермента при взаимодействии с ингибиторами.....	50
3.3. Исследование структуры и функционирования ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител к С-домену.....	51
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	56
4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
4.1. Материалы.....	56
4.2. Методы	58
4.2.1. Выделение и очистка соматического ангиотензин-превращающего фермента.....	58
4.2.2. Выделение и очистка тестикулярного ангиотензин-превращающего фермента	58
4.2.3. Получение N-домена соматического ангиотензин-превращающего фермента	59
4.2.4. Определение концентрации и чистоты выделенных препаратов фермента.....	59
4.2.5. Определение активности ангиотензин-превращающего фермента.....	59
4.2.6. Подготовка пула плазмы крови.....	61

4.2.7. Подбор оптимальных концентраций фермента и моноклональных антител для иммуносорбции	63
4.2.8. Определение констант связывания моноклональных антител с тестикулярным ангиотензин-превращающим ферментом	63
4.2.9. Изучение влияния ингибиторов АПФ на связывание моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом	65
4.2.10. Определение влияния модификаторов на связывание моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом	65
4.2.11. Моделирование разрывов дисульфидных мостиков в N-домене ангиотензин-превращающего фермента.....	66
4.2.12. Влияние гемолиза на связывание моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом крови.....	66
4.2.13. Статистическая обработка результатов.....	67
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	68
5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ ЧЕЛОВЕКА.....	68
5.1. Подбор оптимальных условий для иммуносорбции.....	68
5.2. Определение констант диссоциации комплексов моноклональных антител с тестикулярным ангиотензин-превращающим ферментом.....	70
5.3. Определение эффективности связывания панели моноклональных антител с различными формами соматического ангиотензин-превращающего фермента.....	71
6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ ЧЕЛОВЕКА	74
6.1. Выбор условий отмывки планшетов при иммуносорбции.....	74
6.2. Определение влияния эналаприлата и тепрототида на связывание панели моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом из крови.....	78
6.3. Анализ взаимного влияния доменов при связывании ингибиторов в активных центрах соматического ангиотензин-превращающего фермента	88
7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭФФЕКТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ ЧЕЛОВЕКА	93
7.1. Определение влияния S-S восстанавливающих агентов на связывание панели моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом из крови.....	93
7.2. Влияние восстановления дисульфидных связей на конформационную изменчивость ангиотензин-превращающего фермента под действием ингибиторов фермента	100
8. ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С УРЕМИЕЙ.....	106
8.1. Анализ связывания моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом в норме и при развитии уремии	106
8.2. Анализ ответа конформационно измененного ангиотензин-превращающего фермента на связывание ингибиторов АПФ при развитии уремии.....	111
8.3. Частота встречаемости конформационно измененного ангиотензин-превращающего фермента в плазме крови условно здоровых доноров	121
ВЫВОДЫ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

сАПФ – соматический ангиотензин-превращающий фермент;

тАПФ – тестикулярный ангиотензин-превращающий фермент;

мАт – моноклональные антитела;

СНО – клетки яичников китайского хомячка

Ds-Na – додецилсульфат натрия

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

Трис (Tris) – трис(гидроксиметил)аминометан

Хепес (Hepes) – N-2-гидрокси-этилпиперазин-N-этансульфоновая кислота

Ангиотензин -I – Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

FA-Phe-Gly-Gly (FPGG) – N^α-3-(2-фурил)-акрилоил-L-фенилаланил-L-глицил-L-глицин

Cbz-Phe-His-Leu (ZPHL) – карбобензоксид-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин

Hip-His-Leu (HHL) – гиппурил-L-гистидил-L-лейцин

His-Leu (HL) – L-гистидил-L-лейцин

Лизиноприл – (S)-N^α-(1-карбокси-3-фенилпропил)-L-лизил-L-пролин

Эналаприлат – (2S)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-1-карбокси-3-фенилпропил]амино]пропаноил]-пирролидин-2-карбоновая кислота

Тепротид – Glp-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro

GSH (глутатион, восстановленная форма) – (2S)-2-амино-4-[[[(1R)-1-[(карбоксиметил)карбамоил]-2-сульфанилэтил]карбамоил]бутановая кислота

GSSG – глутатион, окисленная форма

DTT (дитиотреитол) – (2S,3S)-1,4-бис(сульфанил)бутан-2,3-диол

DTNB – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота)

MG (метилглиоксаль) – 2-оксопропаналь

Gu*HCl - гуанидин хлорид

Буфер А – 50 мМ фосфатный буфер, рН 7,5, содержащий 150 мМ NaCl и 1 мкМ ZnCl₂

Буфер Б – 100 мМ фосфатный буфер, рН 8,3, содержащий 300 мМ NaCl и 1 мкМ ZnCl₂

ВВЕДЕНИЕ

Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1) – Zn^{2+} -зависимая пептидаза, состоящая из одной полипептидной цепи, которая содержит два домена (N- и С-домены), при этом каждый домен содержит каталитически активный центр [1]. При достаточно высокой (около 68%) гомологии доменов, они характеризуются разными физико-химическими свойствами (стабильностью, степенью гликозилирования и т.д.). АПФ является одним из главных регуляторов кровяного давления и содержания вазоактивных пептидов в организме [2]. Также АПФ вовлечен в метаболизм нейропептидов, иммунную и репродуктивную функции [3,4] и в развитие различных воспалительных процессов [5,6].

Диагностика патологических состояний организма на основе сравнительной характеристики отдельных молекул в норме и при развитии патологии представляет собой новый шаг в развитии инструментальных методов клинической медицины. Моноклональные антитела (мАт) зарекомендовали себя как исключительно чувствительный и точный инструмент для регистрации конформационных изменений антигенов [7]. В фундаментальных исследованиях мАт используются для идентификации и локализации белков, для дифференциации клеток различных типов, для очистки белка и для исследования экспрессии белков [8].

Ранее была получена панель из 9 мАт к N-домену и 8 мАт к С-домену АПФ и идентифицированы эпитопы связывания этих антител на поверхности фермента [9–15], что открывает путь к применению этой панели мАт для конформационного анализа АПФ. В настоящее время известно об успешном применении мАт для выявления конформационно измененного АПФ в крови при развитии болезни Гоше и саркоидоза [16]. С помощью двух мАт из этой панели показано, что АПФ претерпевает конформационные изменения при связывании коммерческих ингибиторов АПФ, применяемых при гипертонии [9].

До сих пор не известна структура полноразмерного фермента (установлены структуры только отдельных доменов АПФ [17,18]). Однако известно, что механизм гидролиза субстратов АПФ зависит от структуры гидролизуемого субстрата и предполагает некое взаимодействие доменов в составе сАПФ в процессе гидролиза [19,20]. Так, при связывании ди- и трипептидов наблюдается ярко выраженная отрицательная кооперативность между доменами АПФ (то есть значительное ухудшение эффективности связывания лиганда на одном из активных центров, если второй уже занят таким же лигандом), но при связывании нона- и декапептидов домены в составе АПФ функционируют независимо. Логично предположить, что связывание в активных центрах АПФ лигандов разной структуры может

приводить к различным изменениям конформации АПФ, которые могут являться базой наблюдаемой или не наблюдаемой отрицательной кооперативности. Исследование такого рода особенно важно в связи с тем, что ингибиторы АПФ являются первым средством при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

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 [21,22]. 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.

Целью данной работы явился конформационный анализ АПФ с применением ингибиторов разной структуры и различных модификаторов фермента, а также конформационный анализ АПФ в крови здоровых доноров и больных уремией с целью выявить АПФ, конформационно измененный вследствие развития патологии.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ

1.1. Физиологическая значимость ангиотензин-превращающего фермента

В клетках организма млекопитающих синтезируется две изоформы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ): соматическая форма фермента (сАПФ), содержащая два гомологичных домена (N- и С-домены) в составе одной полипептидной цепи [1] и более короткая тестикулярная изоформа АПФ (тАПФ), состоящая из одного домена, соответствующего С-домену соматического АПФ (за исключением уникальной N-концевой 36-аминокислотной последовательности).

АПФ функционирует в организме в основном как пептидил-дипептидаза, отщепляя С-концевой дипептид у ангиотензина I и брадикинина, являющихся компонентами ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем, соответственно. Отщепление С-концевого дипептида от вазонеактивного ангиотензина I приводит к образованию октапептида ангиотензина II, который является одним из наиболее важных эффекторов, вызывающих спазмы кровеносных сосудов и, как следствие, увеличение кровяного давления, регулирующих водно-натриевый баланс, контролирующих секрецию альдостерона, адренокортикотропного гормона, а также и других физиологически активных соединений. Катализируемое АПФ последовательное удаление двух С-концевых дипептидов приводит к деградации вазоактивного нонапептида брадикинина, который вызывает расслабление стенок кровеносных сосудов и увеличение проницаемости капилляров [23,24]. Таким образом, основная функция АПФ в организме заключается в повышении кровяного давления как общего, так и местного [25,26].

Установлено, что ангиотензин II является провоспалительным фактором: он способен увеличивать проницаемость сосудов, активировать фактор транскрипции NF- κ B, запускающий синтез провоспалительных веществ, способствовать образованию активных форм кислорода [5,27]. Таким образом, очевидно участие АПФ в развитии воспалительных процессов.

АПФ расщепляет ангиотензин 1-9 до ангиотензина 1-7, который является депрессором, вазодилататором, обладает апоптозной и антипролиферативной активностью [28].

АПФ способен расщеплять гемопозитический пептид N-Ас-SDKP-ОН (горалатид), являющийся отрицательным фактором регуляции пролиферации стволовых клеток [29] и стимулирующий ангиогенез [30], а также некоторые регуляторные пептиды, причем в

некоторых случаях АПФ способен функционировать как эндопептидаза отщепляя С-концевой трипептидамид от вещества Р [31] и С- и N- концевые трипептидамиды от люлиберина [32], лютейнизирующего и гонадотропин-высвобождающего гормонов, у которых блокированы С- и N-концы [33]. Таким образом, в организме АПФ, возможно, выполняет роль регулятора концентрации различных физиологически важных пептидов в зависимости от локализации фермента в организме.

Было показано, что уровень АПФ в крови повышен при саркоидозе [16] и в гомогенатах тканей мозга при развитии болезни Альцгеймера [34]. АПФ ответственен за расщепление β -амилоидного пептида, накапливающегося в тканях мозга, при этом образующийся пептид накапливается в меньшей степени и обладает меньшей цитотоксичностью [35].

Соматическая форма АПФ встречается практически во всех органах организма [36–41]. Особенно обогащены АПФ эндотелиальные клетки легких и эпителиальные клетки почки, где фермент локализован на внешней стороне мембраны щеточной каймы ворсинок [25], а также биологические жидкости [42,43]. Соматический АПФ найден также в щеточной кайме всасывающего эпителия тонкой кишки [37], в моноядерных клетках (моноциты, Т-лимфоциты и фибробласты) [38], в печени, сердце, надпочечниках и мозге [44].

В семенниках продуцируется тестикулярная изоформа АПФ [45], соответствующая С-домену сАПФ за исключением уникальной N-концевой 36-аминокислотной последовательности. Физиологическая роль этого фермента до конца не ясна. Тестикулярный фермент отвечает за процессинг пептидных гормонов (например, гастрин, холецистокинина), участвующих в оплодотворении [3] и в процессах сперматогенеза и овуляции [45–49], а также влияет на подвижность спермы, возможно, через инактивацию брадикинина [50]. За подвижность спермы и способность сперматозоидов связываться с яйцеклеткой ответственна не пептидил-дипептидазная активность АПФ, а другая, ранее не известная, активность фермента [51]. Новая активность АПФ заключается в способности фермента “срезать” с поверхности клетки белки, закрепленные на этой поверхности с помощью гликозилфосфатидилинозитольного якоря (GPI) [51]. Кроме того, было выявлено влияние дипептидазной активности АПФ, а не GPI-азной активности, на процесс размножения [4].

Форма АПФ, соответствующая N-домену соматического фермента [52], была обнаружена в “кишечной жидкости” больных при хирургических операциях, однако эта форма фермента, скорее всего, является результатом ограниченного протеолиза исходной соматической формы АПФ. Не исключено, что N-домен принимает участие в пищеварительных процессах [52]. Также N-домен был обнаружен в моче больных,

страдающих легкой формой гипертонии [53], что, возможно, является артефактом из-за неправильного хранения образцов мочи в сконцентрированном виде [54].

1.2. Структура ангиотензин-превращающего фермента

Полная интрон-экзоновая структура гена АПФ человека содержит 25 интронов и 26 экзонов [55]. мРНК соматической формы АПФ транскрибируется с 1 по 26 экзон, но при сплайсинге из первичной РНК происходит удаление 13 экзона. мРНК тАПФ транскрибируется с 13 по 26 экзон [55], что и объясняет наличие у тАПФ уникальной N-концевой 36-аминокислотной последовательности.

Последовательность цинк-связывающего мотива обоих доменов АПФ, подобно другим представителям класса металлопептидаз – термолизину, карбоксипептидазе А или нейтральной эндопептидазе 24.11 (неприлизин), состоит из His-Glu-X-X-His....Glu-X-X-X-Asp [56]. С использованием метода точечных мутаций были определены номера ключевых аминокислот цинк-связывающего мотива каждого домена - Glu³⁶² в N-домене и Glu⁹⁶⁰ в С-домене [57]. Более того, это позволило однозначно сказать, что оба домена в соматическом АПФ активны. По аналогии с другим представителем семейства Zn-зависимых пептидаз, термолизином, авторы [57] предположили, что оба остатка His как в С-домене, так и в N-домене являются Zn-координирующими лигандами, что полностью подтвердилось с опубликованием трёхмерных структур доменов [17,18].

Выделяют [58] два характеристических участка в последовательности ферментов этого семейства, которые содержат аминокислоты, составляющие ближайшее окружение атома цинка, т.н. Zn-связывающий мотив. При этом по положению в полипептидной цепи эти участки могут отстоять друг от друга на некотором расстоянии, которое варьируется от двух-трёх аминокислот до ста и более. Интересно отметить, что расстояние между этими участками консервативных аминокислот характеризует вторичную структуру данной области [58]. Так, расстояние в три аминокислоты наблюдается в α -спирали, а одна аминокислота – в β -листе. Кроме аминокислот в ближайшее окружение атома Zn входит необходимая для катализа молекула воды. Ион цинка поляризует или ионизирует связанную с ним молекулу воды, которая, активировавшись, нуклеофильно атакует карбонильную группу субстрата [56]. В координации иона металла участвуют четыре или пять донорных атомов, которые и составляют его тетраэдрическое или бипирамидальное окружение [56].

сАПФ человека состоит из 1306 аминокислотных остатков [1]: в процессе посттрансляционной модификации с N-конца фермента отщепляется сигнальный пептид,

состоящий из 29 аминокислот [1]; 28 С-концевых аминокислотных остатков формируют цитоплазматический домен, 22 – гидрофобный трансмембранный домен (якорь) и 1227 – два гомологичных домена (N- и С-), расположенных вне клетки (рис. 1) и отделенных друг от друга мостиковой последовательностью [59]. В С-концевой части С-домена, в непосредственной близости от клеточной мембраны, располагается так называемый примембранный участок, в котором находится пептидная связь Arg1203-Ser1204, разрывающаяся при шеддинге фермента с поверхности клетки [60].

Большей частью АПФ в организме представлен в мембранной форме, т.е. фермент закреплен на поверхности клеточной мембраны с помощью трансмембранного якоря [23,61,62]. При протеолитическом расщеплении примембранного участка АПФ соматическая и тестикулярная изоформы фермента переходят в растворимую форму, не содержащую цитоплазматический и трансмембранный домены [63]. Шеддинг происходит под действием мембраносвязанной цинк-зависимой секретазы, которая еще не идентифицирована [64,65]. Показано, что у рекомбинантного соматического АПФ человека, экспрессированного СНО-клетками, расщепление происходит по связи между остатками Arg1203 и Leu1204, что соответствует сайту расщепления в тАПФ между остатками Arg627 и Leu628 [60,66]. В то же время было показано, что АПФ из семенной жидкости на С-конце содержит остаток Ala1202 [60].

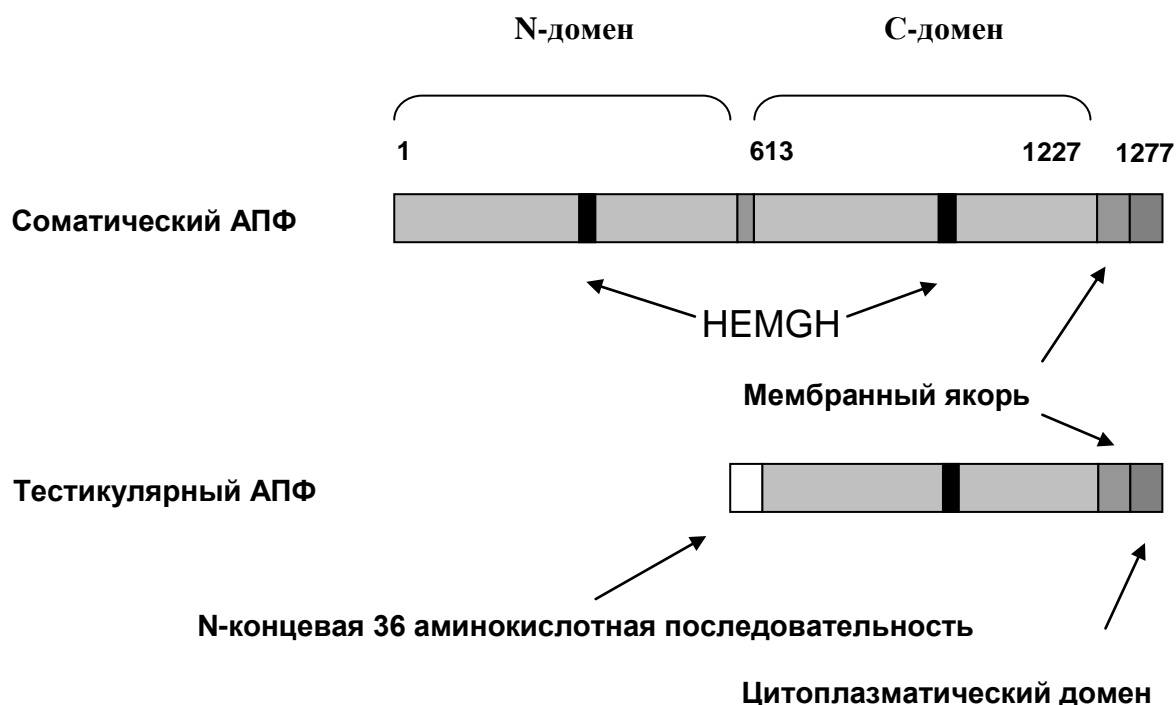


Рис. 1. Структура соматического и тестикулярного АПФ

Не исключено, что для ферментов, выделенных из различных источников, аминокислотные остатки, между которыми происходит расщепление, могут различаться. Цитоплазматический домен АПФ не является необходимым для узнавания фермента секретазой, однако этот домен вовлечен в модуляцию шеддинга [67]. Предполагают, что центр узнавания секретазы находится на С-домене [68], а N-домен прикрывает данный центр, что является причиной уменьшения скорости шеддинга соматического АПФ по сравнению с тестикулярным ферментом [69].

Следует отметить, что в сыворотке крови уровень АПФ может повышаться по сравнению с нормой, что может объясняться развитием патологий, таких как саркоидоз [21], болезнь Гоше [22] (уровень АПФ повышен в 2-7 раз) и др., или I/D-полиморфизмом – у людей, гомозиготных по D-генотипу, уровень АПФ в крови повышен на 60-66% по сравнению с людьми, гомозиготными по I-генотипу [70]. Менее выраженное, но все же значительное повышение уровня АПФ в крови наблюдалось у больных с почечной недостаточностью и уремией [71–73].

Гомология между N- и С-доменами соматического АПФ составляет около 60%, но достигает 89%, если рассматривать в каждом домене последовательность из 40 аминокислот, содержащую остатки, входящие в состав активного центра [1].

Тестикулярная форма АПФ человека состоит из 732 аминокислотных остатков. В процессе посттрансляционной модификации с N-конца фермента отщепляется сигнальный пептид из 31 аминокислоты. Цитоплазматический домен и трансмембранный участок у тестикулярного АПФ совпадают с соответствующими областями у соматической формы фермента, а внеклеточный участок тестикулярного АПФ, за исключением N-концевых 36 аминокислот, соответствует С-домену соматического АПФ (рис. 1).

1.3. Взаимное функционирование доменов в составе соматического ангиотензин-превращающего фермента

С того момента, как стало известно, что сАПФ содержит два активных центра, было много обсуждений значимости наличия двух активных центров в составе одного фермента. Эксперименты с мутантами человеческого сАПФ, в которых один из доменов был инактивирован точечной мутацией, показали, что оба активных центра в составе сАПФ функциональны [57]. Оба активных центра обладают пептидил-дипептидазной и эндопептидазной активностью [23,29,74], но проявляют разную специфичность по отношению к разным субстратам.

В литературе известны ферменты, состоящие из двух и более доменов в составе одной полипептидной цепи. Однако, в основном, известные ферменты содержат каталитически активные домены, которые гидролизуют разные субстраты. Так, например, эстераза 0.16 проявляет тиоэстеразную и карбоксиэстеразную активности [75], или протеин-дисульфид изомеразы обладает изомеразной и оксидазной активностями [76]. Часто встречаются ферменты, состоящие из нескольких доменов, только один из которых обладает каталитической активностью [77,78]. Значительно в меньшем количестве найдены физиологически значимые ферменты с доменами, проявляющими одинаковую каталитическую активность. Так, карбоксипептидаза D содержит три домена, принадлежащих одной полипептидной цепи [79]. При этом, что один домен не проявляет ферментативной активности, субстратная специфичность остальных двух существенно перекрывается. Важной особенностью последних является то, что оптимумы их активностей располагаются в разном интервале значений pH. Поэтому подобное сочетание доменов может иметь своей целью сохранение каталитически активного состояния полноразмерного фермента в различных органеллах клетки с неодинаковыми средами [79]. В случае АПФ остаются не выясненными причины содержания двух каталитически активных доменов в молекуле полноразмерного фермента. По-видимому, соматическая двудоменная форма фермента является следующей эволюционной формой фермента после однодоменных форм, т.к. в организмах пиявки *Theromyzon tessulatum* [80] и насекомых (*Drosophila melanogaster* [81], *Musca domestica* [82], *Haematobia irritans* [83], клеща *Boophilus microplus* [84], москита *Anopheles stephensi* [85]) обнаружены АПФ-подобные пептидазы с меньшей молекулярной массой (около 70-100 кДа), содержащие только один активный центр. Интересно отметить, что у мушки *Drosophila melanogaster* было обнаружено два однодоменных фермента, гомологичных АПФ человека, один из которых по свойствам напоминает N-домен (AnCE), другой C-домен (ACEr) [86].

При том, что C- и N-домены характеризуются различными физико-химическими свойствами (стабильностью, степенью гликозилирования и т.д.) [87], домены взаимодействуют с одним и тем же набором физиологических субстратов (хотя и с разной специфичностью) [74].

Можно предположить, что непосредственная близость гомологичного домена каким-то образом оказывает влияние на функционирование соседнего домена, что обеспечивает регуляцию активности полноразмерного двудоменного фермента. Однако с того момента, как были обнаружены два каталитически активных домена АПФ, долгое время постулировалось их независимое функционирование. Это мнение получило широкое

распространение благодаря ранней работе группы Пьера Корволя (Pierre Corvol, Paris, France), которая показала, что активность соматического АПФ человека при гидролизе ангиотензина I может быть представлена суммой активностей однодоменных форм фермента [57]. Аналогичный результат был получен и при гидролизе его короткого синтетического аналога Hip-His-Leu под действием рекомбинантного АПФ человека [57]. Позже независимый характер функционирования активных центров при гидролизе ангиотензина I был подтверждён в работе [88], а также продемонстрирован при гидролизе нонапептида брадикинина и гептапептида брадикинина¹⁻⁷ [74]. Исследование связывания ингибитора лизиноприла с АПФ из почек человека и легких кролика путём определения количества пролина, высвобождавшегося в ходе кислотного гидролиза несвязавшегося ингибитора, также показало, что активные центры молекулы фермента могут одновременно взаимодействовать с двумя молекулами ингибитора [89], однако авторы указывали, что для обнаружения этого эффекта концентрация ингибитора в реакционной среде должна превышать концентрацию фермента более чем в четыре раза. В этой же работе титрование активных центров АПФ лизиноприлом, где активность фермента определяли с использованием трипептидного субстрата FA-Phe-Gly-Gly, показало, что связывания одной молекулы ингибитора было достаточно для подавления активности как однодоменного тестикулярного, так и двудоменного соматического фермента [89].

Использование радиоактивно меченых ингибиторов [³H]трандолаприлата и схожего с ним по строению Ro 31-8472 продемонстрировало наличие двух центров связывания соматического АПФ с высоким сродством к ингибитору [90]. Стехиометрическое титрование АПФ из легких кролика эналаприлатом и рамиприлатом [91], а также исследование методом калориметрического титрования связывания ингибиторов лизиноприла [92] и каптоприла [93] с соматическим ферментом из легких быка также показали связывание двух молекул ингибитора с одной молекулой двудоменного АПФ. Следует отметить, что авторы [92,93] использовали очень высокие концентрации ингибитора (30-90 мкМ).

В тоже время в литературе присутствовали данные, свидетельствующие о существенном влиянии доменов друг на друга. Так, например, константа гидролиза природного субстрата N-Ac-Ser-Asp-Lys-Pro под действием двудоменного АПФ не может быть описана как сумма констант гидролиза под действием однодоменных форм АПФ (табл. 1 и 2) [29,94,95].

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза горалатида рекомбинантными формами АПФ человека [29,96].

Условия: 100 мМ Tris, рН 7,0, содержащий 50 мМ NaCl, 10 мкМ ZnSO₄, 37°.

Фермент	K_m , мкМ	$k_{кат}$, с ⁻¹
Интактный	41	12
АПФ _{К959/963}	31	16
АПФ _{К361/365}	39	0,4

Таблица 2. Кинетические параметры гидролиза Ac-Ser-Asp-Lys-Pro под действием трёх форм АПФ [95].

Условия: первый субстрат – 50 мМ Нерес, рН 7,0, содержащий 50 мМ NaCl, 10 мкМ ZnSO₄, 1мг/мл БСА, 37°.

фермент	Ac-Ser-Asp-Lys-Pro	
	K_m , мкМ	$k_{кат}$, с ⁻¹
Соматический АПФ	481±23	7,5±0,9
N-домен	347±27	7,8±1,6
C-домен	1683±543	1,8±0,4

Подобная ситуация наблюдается и в случае некоторых гептапептидов (табл. 3) [97].

Таблица 3. Кинетические параметры гидролиза субстратов с общей формулой Abz-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-X-EDDnp под действием трёх форм АПФ [97].

Условия: 100 мМ фосфатный буфер, рН 8,0, содержащий 200 мМ NaCl, 37°.

Аминокислота X	Соматический АПФ		N-домен		C-домен	
	K_m , мкМ	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_m , мкМ	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_m , мкМ	$k_{кат}$, с ⁻¹
Ser	0,7	0,9	3,0	1,3	3,0	2,4
Asn	0,9	1,8	5,0	3,8	3,3	3,3
Glu	1,6	2,2	3,0	2,7	6,0	4,2
Arg	0,9	1,0	1,4	0,9	1,4	1,4

В работе [98] при изучении субстратной специфичности C- и N-доменов АПФ человека на примере гидролиза субстратов Mca-Ala-Ser-Asp-Lys-DpaOH и Mca-Ser-Asp-Lys-DpaOH, кинетические параметры гидролиза этих субстратов авторы находили путём теоретического расчёта, исходя из экспериментально определённой скорости гидролиза субстратов под действием соматического АПФ человека. Важным моментом является то, что при расчёте авторы постулировали, что активные центры соматического АПФ функционируют независимо. Согласно представленным расчётам, первый субстрат

гидролизом с одинаковой эффективностью на обоих доменах (при $K_{mC} = K_{mN}$). Однако через четыре года те же авторы опубликовали экспериментально полученные константы гидролиза этого субстрата (Mca-Ala-Ser-Asp-Lys-DpaOH) под действием однодоменных форм АПФ человека, опровергнув свои ранние данные: оказалось, что N-домен проявляет большую специфичность при гидролизе этого субстрата, чем C-домен ($k_{кат}(N)=14\pm 0,9 \text{ с}^{-1}$, $K_m(N)=34\pm 7 \text{ мкМ}$ и $k_{кат}(C)=4,2\pm 0,5 \text{ с}^{-1}$, $K_m(C)=65\pm 12 \text{ мкМ}$) [99]. Это также свидетельствует в пользу того, что домены, возможно, оказывают влияние на функционирование друг друга.

С использованием АПФ быка было показано, что при гидролизе субстратов активные центры соматического фермента могут функционировать как два независимых фермента, или, наоборот, могут оказывать сильное негативное влияние на функционирование друг друга, что определяется длиной и структурой гидролизующего субстрата [20]. Так, при гидролизе декапептида ангиотензина I с молекулой фермента одновременно могут связываться и гидролизироваться две молекулы субстрата. В случае гидролиза трипептидных субстратов между доменами соматического АПФ быка наблюдается строгая отрицательная кооперативность, т.е. молекула соматического АПФ быка в каждый момент времени может связаться только с одной молекулой субстрата.

Кинетический анализ гидролиза двух субстратов Cbz-Phe-His-Leu и Hip-His-Leu с одинаковым продуктом His-Leu показал, что эти субстраты конкурируют за связывание в активных центрах сАПФ - то есть связывание одного из субстратов в одном активном центре делает второй недостижимым для этого же или другого субстрата [19]. Аналогичное взаимодействие доменов наблюдалось и при ингибировании активности сАПФ каптоприлом и лизиноприлом (аналоги трипептидных субстратов) - то есть одной молекулы ингибитора достаточно, чтобы подавить гидролиз трипептидных субстратов. Таким образом, два домена в составе человеческого сАПФ демонстрируют сильную отрицательную кооперативность при связывании широко распространенных ингибиторов и при гидролизе трипептидных субстратов.

Однако, в работе [100] было продемонстрировано, что при гидролизе таких субстратов АПФ как ангиотензин или брадикинин, явление отрицательной кооперативности между доменами отсутствует. По-видимому, характер взаимного влияния доменов в составе сАПФ человека зависит от структуры лиганда (ингибитора или субстрата), связанного в активном центре фермента. Логично предположить, что при подавлении активности соматического АПФ «короткими» и «длинными» ингибиторами взаимодействие активных центров также будет различно, что и было подтверждено с использованием лизиноприла, каптоприла и тепротиды [100].

Таким образом, была описана зависимость степени взаимного влияния активных центров соматического АПФ от длины лиганда (субстрата и/или ингибитора), действующая для разных представителей семейства АПФ. Отсутствие рентгеноструктурного анализа соматического АПФ или, как минимум, аналогов подобных ферментативных «систем» не позволяет с уверенностью говорить о причинах, вызывающих наблюдаемую закономерность. На данный момент можно говорить только о том, что не одинаковая «реакция» фермента на лиганды разной длины должна быть обусловлена конформационными изменениями структуры фермента в результате связывания лиганда. Нет оснований полагать, что эти изменения происходят только в структуре соматического АПФ, а более вероятно, что структурные изменения относятся прежде всего к отдельным доменам АПФ, а затем уже и к двудоменному ферменту.

1.4. Трехмерная структура доменов ангиотензин-превращающего фермента

Оба домена сильно гликозилированы (на N-домене располагается 10 потенциальных гликозилирования, на С-домене – 7), что мешало получению кристаллов белков и определению их 3D структуры [101], поэтому кристаллические структуры обоих доменов были расшифрованы и опубликованы только после того, как была уменьшена степень гликозилирования белка.

1.4.1. Структура С-домена

Впервые рентгеноструктурные данные по пространственной структуре С-домена (PDB: 1O8A) с разрешением 2Å были опубликованы в 2003г [17]. Был закристаллизован укороченный вариант С-домена – tACEΔ36NJ – остатки 40-618 тАПФ (или 616-1194) в нумерации по сАПФ) (рис. 2).

tACEΔ36NJ представляет из себя тестикулярный АПФ, у которого отсутствуют часть примембранного участка, трансмембранный и цитоплазматический домены и уникальная для этой формы фермента N-концевая область из 36 аминокислот, богатая O-гликанами. Фактически tACEΔ36NJ соответствует С-домону соматического АПФ. Кроме того, у tACEΔ36NJ в каждом сайте N-гликозилирования, вместо комплексных олигосахаридных цепей, сохраняется лишь высокоманнозный кор ($\text{Gln}_3\text{Man}_7\text{GlnNAc}_2$), что лишает данный фермент гетерогенности, препятствующей кристаллизации. Молекула С-домена АПФ имеет эллипсоидную форму с размерами 72x57x48Å. Структура С-домена АПФ содержит 27 спиралей: 20 α-спиралей и 7 3_{10} -спиралей. Лишь 4% аминокислотных остатков составляют 6 относительно коротких β-листов, два из которых находятся около активного центра.

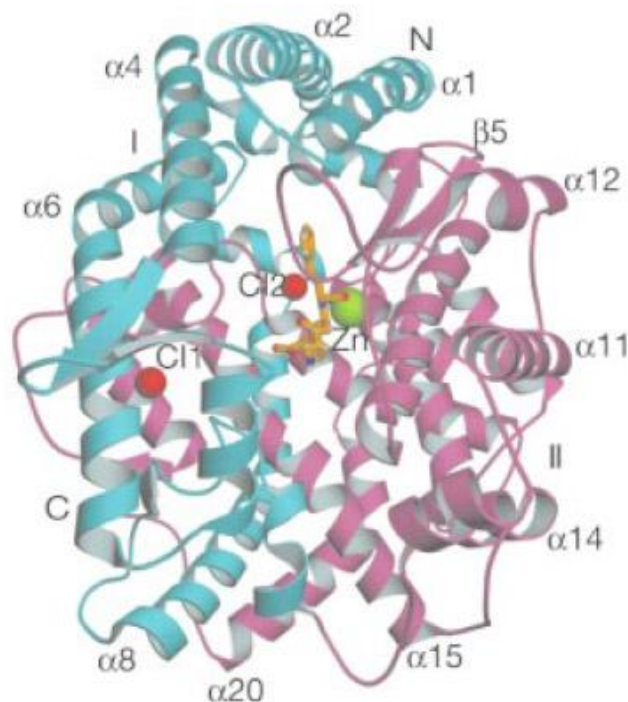


Рис. 2. Кристаллическая структура С-домена АПФ, PDB 1O86 [17].

В центральной части белка находится туннель, вытянутый приблизительно на 30\AA , который разделяет фермент на две части (на два субдомена). В этом туннеле, сформированном четырьмя α -спиралями и одним β -листом, располагается активный центр.

В молекуле фермента были идентифицированы 504 молекулы воды [17]. Несколько молекул воды располагаются в активном центре фермента. На поверхности С-домена были локализованы 6 сайтов гликозилирования. В области всех сайтов гликозилирования наблюдалась слабая электронная плотность, что позволило смоделировать связанные с Asn всех сайтов гликозилирования остатки N-ацетилглюкозаминов. 7-ой сайт гликозилирования Asn1196 не был разрешен в данной работе. Впоследствии в работе [102] была получена кристаллическая структура С-домена, содержащая остатки 40-623 (616-1199 в нумерации по сАПФ), содержащая дополнительно 5 аминокислотных остатков на С-конце С-домена.

Ион цинка является необходимым для катализа компонентом АПФ. Как и ожидалось, этот ион, имеющий тетраэдрическое окружение, был обнаружен в активном центре С-домена [17]. Цинк-связывающая последовательность His-Glu-Хаа-Хаа-His, характерная для семейства глюцинкинов, находится в 13-ой α -спирали. Остатки гистидина, находящиеся в спирали 13 являются двумя из четырех лигандами иона цинка. Третьим цинк-координирующим лигандом является остаток Glu411, принадлежащий 14-ой α -спирали. Этот

остаток расположен на расстоянии 23 аминокислот от последовательности His-Glu-Хаа-Хаа-His в 14 спирали. Четвертым лигандом иона цинка принято считать молекулу воды из растворителя, однако, в кристаллической структуре С-домена четвертым лигандом оказался ацетат-анион из кристаллизационной среды [17].

Впоследствии при работе с гликомутантами были получены еще две структуры тАПФ: PDB 2IUL, остатки 40-623 в нумерации по тАПФ или 616-1199 в нумерации по сАПФ, и PDB 2IUX, остатки 40-592 в нумерации по тАПФ или 616-1168 в нумерации по сАПФ [103]. Структуры гликомутантов практически не отличались от структуры С-домена, расшифрованного в работе [17].

Для тестикулярного фермента человека определено положение дисульфидных связей [104]. Они образованы между Cys-728 и Cys-734, Cys-928 и Cys-946, Cys-1114 и Cys-1126 (нумерация приведена по сАПФ). Седьмой остаток (Cys-1072) находится в восстановленной форме. Так как тиоловые реагенты не оказывали существенного влияния на активность АПФ, этот остаток не вовлечен в катализ [104]. Свободные остатки цистеина в N- и С-доменах, вероятнее всего, не образуют S-S связи, поскольку ограниченный протеолиз соматического фермента приводит к образованию свободных доменов АПФ [105–107].

1.4.2. Структура N-домена

Данные по пространственной структуре N-домена (PDB: 2C6N) были опубликованы в 2006г. [18] (рис. 3). Разрешение, при котором была определена структура N-домена – 3Å – оказалось хуже разрешения, при котором была получена структура С-домена, поэтому при расшифровке кристаллической структуры N- домена, помимо собственно рентгеноструктурных данных, использовали модель N-домена построенную по гомологии со структурой С-домена. Молекула N-домена состоит из 621 аминокислот. Так же как и С-домен, N-домен имеет эллипсоидную форму, посередине глобулы проходит туннель, который делит белок на два субдомена [18]. Активный центр N-домена так же, как у С-домена, находится внутри этого канала [108]. При этом ион цинка активного центра у обоих доменов расположен в наиболее узкой части канала. Данное сужение разделяет канал на две части: в меньшей части (длиной около 8Å) связывается отщепляемый С-концевой дипептид субстрата, в более длинной части (длиной около 17Å) связывается оставшаяся N-концевая часть субстрата. Возможно, именно длина канала является лимитирующим фактором при связывании и гидролизе длинных пептидов. Кроме того, расположение канонической последовательности His-Glu-Хаа-Хаа-His консервативно в обоих доменах.

N-домен АПФ состоит из 18 α -спиралей, пяти 3_{10} -спиралей, четырех спиралей

смешанного типа и шести антипараллельных β -листов. В каталитическом центре располагается атом цинка и хлорид-ион, координированный Arg500. Оказалось, что в структуре N-домена, закристаллизованного в присутствии 5 мМ лизиноприла, молекула ингибитора находилась в той же позиции и конформации, что и в молекуле С-домена АПФ (как было ранее продемонстрировано в работе [17]). Кроме того, в молекуле фермента было локализовано 25 молекул воды. В структуре N-домена, закристаллизованного в отсутствие ингибитора, в области активного центра, была обнаружена молекула ацетата, координированная Lys289 (в молекуле тАПФ в соответствующем положении находился карбоксиаланин [17]).

В молекуле N-домена, так же как и в молекуле С-домена, находятся три дисульфидных мостика, сформированный остатками Cys-128 и Cys-136, Cys-330-Cys-348, Cys-516 и Cys-528 (нумерация приведена по сАПФ). Седьмой остаток (Cys-474) находится в восстановленной форме.

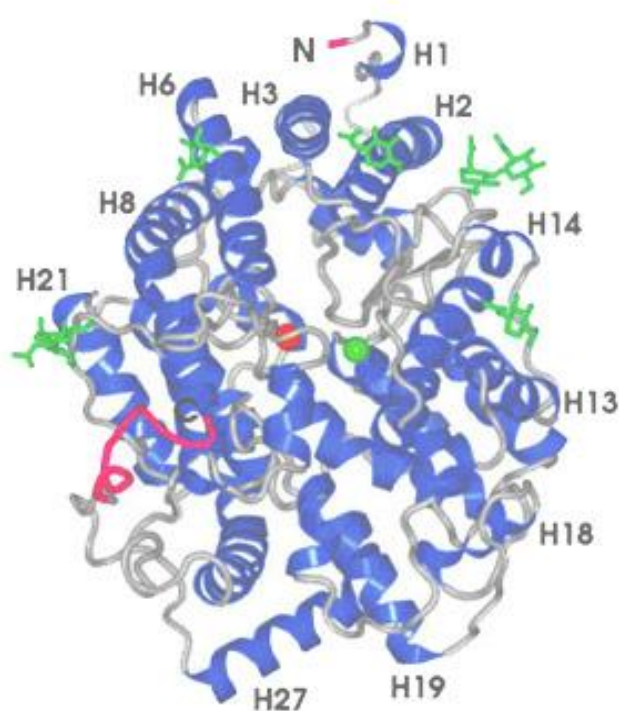


Рис. 3 Кристаллическая структура N-домена АПФ, PDB 2C6F [18].

На поверхности N-домена АПФ находятся 10 сайтов гликозилирования. Возможно, что гликановый профиль N-домена может быть ответственным за углевод-зависимую димеризацию соматической формы АПФ [109,110].

1.4.3. Сравнение строения активных центров N- и C-доменов ангиотензин-превращающего фермента

Несмотря на высокую степень гомологии между доменами, в их структуре существует ряд отличий. В работе [18] авторы выделили несовпадающие аминокислотные остатки каждого из подсайтов активных центров в С-домене и N-домене фермента (табл. 4, рис. 4). Очевидно, этими различиями объясняется разница в специфичности доменов к субстратам и ингибиторам.

Таблица 4. Отличающиеся аминокислоты подсайтов активных центров С- и N-доменов АПФ (нумерация по соматическому АПФ) [18].

S ₁	С-домен	Val ¹⁰⁹⁴	Ser ¹⁰⁹²	Glu ⁷¹⁹					
	N-домен	Thr ⁴⁹⁶	Asn ⁴⁹⁴	Ser ¹¹⁹					
S ₂	С-домен	Glu ⁹⁷⁹	Phe ⁹⁶⁷	Val ¹⁰⁹⁴					
	N-домен	Arg ³⁸¹	Tyr ³⁶⁹	Thr ⁴⁹⁶					
S' ₁	С-домен	Glu ⁷³⁸	Asn ⁸⁵³	Ser ⁸⁶⁰	Glu ⁹⁴⁸	Asn ⁹⁵⁰	Glu ⁹⁵²	Asp ⁹⁵³	Val ⁹⁵⁶
	N-домен	Asp ¹⁴⁰	Asp ²⁵⁵	Glu ²⁶²	Arg ³⁵⁰	Thr ³⁵²	Asp ³⁵⁴	Gln ³⁵⁵	Thr ³⁵⁸
S' ₂	С-домен	Thr ⁸⁵⁸	Ser ⁸⁶⁰	Glu ⁹⁵²	Val ⁹⁵⁵	Val ⁹⁵⁶	Asp ¹⁰²⁹		
	N-домен	Ser ²⁶⁰	Asp ²⁶²	Asp ³⁵⁴	Ser ³⁵⁷	Thr ³⁵⁸	Glu ⁴³¹		

С получением кристаллической структуры N- и С-доменов АПФ стал возможен новый способ разработки наиболее эффективных ингибиторов АПФ с применением докинга и компьютерного моделирования. Перспективным направлением считается разработка домен-специфичных ингибиторов, с тем чтобы избирательно регулировать активность N- и С-доменов в составе сАПФ. Наиболее наглядно структурные отличия С- и N-доменов продемонстрированы на примере их взаимодействия с фосфорсодержащими ингибиторами RXP407 [111] и RXPA380 [112,113], специфичными к N- и С-домени соответственно. При создании этих ингибиторов авторы подобрали все составляющие структуры лиганда, оптимальные для каждого участка связывания активного центра соответствующего домена. Ингибитор RXP407 разрабатывался на основе структуры субстрата – гемопэтического фактора роста стволовых клеток N-Ac-Ser-Asp-Lys-Pro, который является специфическим субстратом N-домена [94]. Наблюдаемая высокая селективность N-домена по отношению к ингибитору RXP407 (табл. 5) обусловлена разницей, прежде всего, в строении S₂ подсайтов активных центров С- и N-доменов, в которых аминокислота Phe⁹⁶⁷ С-домена заменена на

	614	624	634	644	654	664
C-ACE :	VTDEAEASKF	VEEYDRTSQV	VWNEYAEANW	NYN TNITTE	SKILLQKNMQ	IANHTLKYCT
N-ACE :	SADEAGAQLF	AQSYNSSAEQ	VLFSVAASW	AHD TNITAE	ARRQEEAALL	SQEFABAWGQ
	11	21	31	41	51	61
	674	684	691	701	711	721
C-ACE :	QARKFDVNQL	QNTT---IKR	I IKKVQDLER	AALPAQELEE	YNKIILDMET	TYSVATVCHP
N-ACE :	KAKELYEPIW	QNFTDPQLRR	IIGAVRTLGS	ANLPLAKRQQ	YNALLSNMSR	IYSTAKVCLP
	71	81	91	101	111	121
	731	739	749	759	769	779
C-ACE :	N--GSCLQLE	PDLTNVMATS	RKYEDLLWAW	EGWRDKAGRA	ILQFYPKYVE	LINQARLNG
N-ACE :	NKTATCWSLD	PDLTNILASS	RSYAMLLFAW	EGWHNAAGIP	LKPLYEDFTA	LSNEAYKQDG
	131	141	151	161	171	181
	789	799	809	819	829	839
C-ACE :	YVDAGDSWRS	MYETPSLEQD	LERLFQELQP	LYLNLHAYVR	RALHRHYGAQ	HINLEGPIPA
N-ACE :	FTDTGAYWRS	WYNSPTFEDD	LEHLYQQLEP	LYLNLHAFVR	RALHRRYGRD	YINLRGPIPA
	191	201	211	221	231	241
	849	859	869	879	889	899
C-ACE :	HLLGNMWAQT	WSNIYDLVVP	FPSAPSMDDT	EAMLKQGWTP	RRMFKAEADD	FTSGLLVPV
N-ACE :	HLLGDMWAQS	WENIYDMVVP	FDPKPNLDVT	STMLQQGWNA	THMFRVAEEF	FTSLELSMP
	251	261	271	281	291	301
	909	919	929	939	949	959
C-ACE :	PEFWNKSMLE	KPTDGREVVC	HASAWDFYNG	KDFRIKQCTT	VNLEDIVVAH	HEMGHIQYFM
N-ACE :	PEFWEGSMLE	KPADGREVVC	HASAWDFYNR	KDFRIKQCTR	V TMDQLSTVH	HEMGHIQYYL
	311	321	331	341	351	361
	969	979	989	999	1009	1019
C-ACE :	OYKDLPVLR	EGANPGFHEA	IGDVLALSVS	TPKHLHSLNL	LSSEGGSDH	DINFILKMAL
N-ACE :	OYKDLPVSLR	RGANPGFHEA	IGDVLALSVS	TPEHLHKIGL	LDRVTNDTES	DINYLLKMAL
	371	381	391	401	411	421
	1029	1039	1049	1059	1069	1079
C-ACE :	DKIAFI PFSY	LVDQWRWRVF	DGSITKENYN	QEWWSLR LKY	QGLCPPVPR	QGFDPGAKF
N-ACE :	EKIAFLPFGY	LVDQWRWGVF	SGRTPPSRYN	FDWYLR LTKY	QGLCPPVTRN	ETHFDAGAKF
	431	441	451	461	471	481
	1089	1099	1109	1119	1129	1139
C-ACE :	HIPSSVPYIR	YFVSFIIQFQ	FHEALCQAAG	HTGPLHKCDI	YQSKEAGQRL	ATAMKLCFSR
N-ACE :	HVPNVTPIYR	YFVSFVLQFQ	FHEALCKEAG	YEGPLHQCDI	YRSTKAGAKL	RKVLQACSSR
	491	501	511	521	531	541
	1149	1159	1169	1179	1189	
C-ACE :	PWPEAMQLIT	GQPNMSASAM	LSYFKPLLDW	LRTENELHGE	KLWGP	
N-ACE :	PWQEV LKDMV	GLDALDAQPL	LKYFQFVTQW	LQEQNQNGE	VLWGP	
	551	561	571	581	591	

Рис. 4. Выравнивание первичных последовательностей N-домена и С-домена АПФ человека.

Таблица 5. Константы ингибирования активности однодоменных форм АПФ фосфорсодержащими ингибиторами [111].

Условия: 50 мМ Hepes, pH 6,8, содержащий 200 мМ NaCl, 25°, субстрат – Mca-Ala-Ser-Asp-Lys-Dpa.

ингибитор	K_i , нМ	
	N-домен	C-домен
RXP407(Ac-Asp-Phe-(PO ₂ -CH ₂)-Ala-Ala-CONH ₂)	12	25000
Ac- Ala -Phe-(PO ₂ -CH ₂)-Ala-Ala-CONH ₂	15	200
Ac- Ala -Phe-(PO ₂ -CH ₂)-Ala-Ala-COOH	2	7

аминокислоту Tyr³⁶⁹ N-домена. В результате водородная связь между атомом азота аспартата (P₂) молекулы ингибитора и боковой цепью остатка Tyr³⁶⁹ в N-домене не имеет аналога в C-домене. Действительно, замена группы Asp субстрата на гидрофобный остаток Ala вызывает значительное улучшение связывания молекулы ингибитора с C-доменом (табл. 5) [111]. Кроме того, в этой же S₂ области замена Arg³⁸¹/Glu⁹⁷⁹ (N-/C-) обращает силу притяжения в N-домене на противоположную, т.е. притяжение N-концевой ацетатной группы ингибитора к Arg³⁸¹ на расстояние водородной связи меняется на отталкивание аминокислотой Glu⁴⁰³ в C-домене.

И наконец, располагающаяся в S₂' кармане аминокислота N-домена Glu⁴³¹ образует связь с C-концевой амидной группой ингибитора. В этом положении остаток Asp¹⁰²⁹ C-домена удалена от амидной группы лиганда на большее расстояние, чем остаток Glu⁴³¹ в N-домене, и связь не образуется. Замена группы NH₂ ингибитора на группу OH приводит к тому, что расстояние от этой группы до остатка Asp¹⁰²⁹ уменьшается на 0,1 Å, и в результате водородная связь образуется, что, по-видимому, является причиной 30 кратного уменьшения K_i C-домена (табл. 5). Таким образом, селективность N-домена к RXP407 основана на взаимодействии с C-концевой карбаминогруппой, боковой цепью аспартата и N-ацетатной группой ингибитора.

Различия между активными центрами, расположенными на разных доменах также наблюдаются для АПФ из других источников. Так, константы диссоциации комплексов ингибитора RXP407 с N- и C-доменами АПФ мыши и крысы отличаются примерно на два порядка [114]. В тоже время абсолютные величины констант ингибирования соматической

формы АПФ человека, мыши и крысы существенно отличаются [114], несмотря на то, что идентичность аминокислотных последовательностей этих ферментов достигает 85%, аминокислоты в районе активного центра ферментов человека и крысы совпадают на 100%, а человека и мыши отличаются одной аминокислотой 357 Ser/Ala (человек/мышь). Не совпадают и значения констант ингибирования доменов АПФ человека и доменов АПФ мыши и крысы, соответственно.

1.4.4. Структура двудоменного фермента

К настоящему времени пока не удалось получить кристаллы сАПФ, поэтому структура сАПФ не известна. Точное моделирование двудоменного АПФ невозможно, так как в кристаллической структуре С-домена три аминокислотных остатка, располагающиеся на N-конце не видны, кроме того, несколько боковых цепей в области интердоменного линкера, а также подвижная петля разупорядочены и не видны. В частности, на подвижной петле N-домена и верхней части крышки С-домена располагаются сайты N-гликозилирования, это предполагает то, что междоменные взаимодействия и движения могут включать взаимодействие с помощью углеводных цепей. Авторы работы [18] предложили две предельные модели соматического АПФ (рис. 5), при этом они соединили домены друг с другом таким образом, что молекула АПФ в одной из моделей представлена в наиболее вытянутой форме, в другой модели – в наиболее компактной. При этом область контакта между доменами в первой модели довольно мала, но, вращая С-домен вокруг точки соединения доменов, площадь области контакта можно увеличить. Тем самым авторы показали, что наличие гибкого интердоменного линкера позволяет расположить N- и С-домены в составе полноразмерного фермента различными способами, что дает отправную точку для изучения расположения доменов друг по отношению к другу в составе полноразмерного фермента.

В 2008 году была предложена модель двудоменного АПФ, базируясь на данных о топологии поверхности АПФ, полученных с помощью моноклональных антител [15] (рис.6). В работе были определены эпитопы связывания панели моноклональных антител (мАт), специфичных к С-домену АПФ, а для построения модели двудоменного фермента использовались уже известные данные о локализации эпитопов связывания ряда мАт, специфичных к N-домену АПФ [9–13,15] и мАт 1В3, специфичного к С-домену АПФ [14].

Исходя из разницы эффективности связывания мАт к С-домену АПФ с полноразмерным сАПФ и с отдельным С-доменом, авторы пришли к выводу, что эпитопы

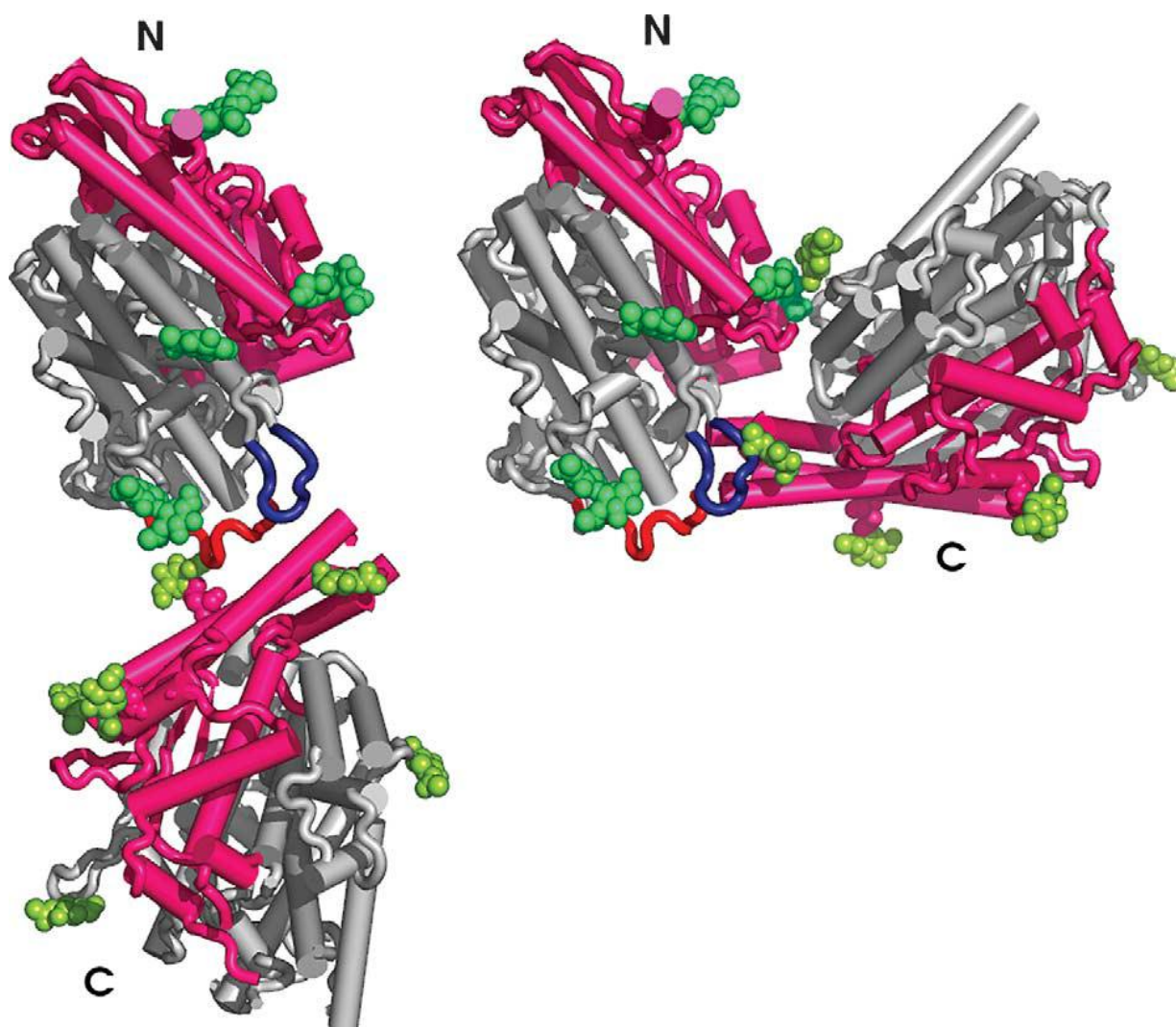


Рис. 5. Два возможных способа ориентации доменов в сАПФ [18].

мАт 1E10 и частично 4E3 в сАПФ прикрыты соседним N-доменом, что хорошо согласуется с ранними предположениями о близком расположении доменов друг относительно друга в составе сАПФ.

Аналогичным образом было показано, что эпитоп связывания мАт 1G12 (к N-домену) прикрыт соседним С-доменом в составе сАПФ. Основываясь на экспериментальных данных по конкуренции мАт, специфичных к разным доменам, за эпитопы связывания на каждом из доменов в составе сАПФ, выяснили, что мАт 9B9 (к N-домену) не конкурирует с мАт 2H9 (к С-домену), но конкурирует с мАт 3F11 (к С-домену). Полученные данные позволили предположить, что домены в составе сАПФ расположены таким образом, что мАт, специфичные к разным доменам, вынуждены конкурировать за эпитопы связывания. Предложенная модель представляет собой вытянутый эллипсоид, что соответствует ранним

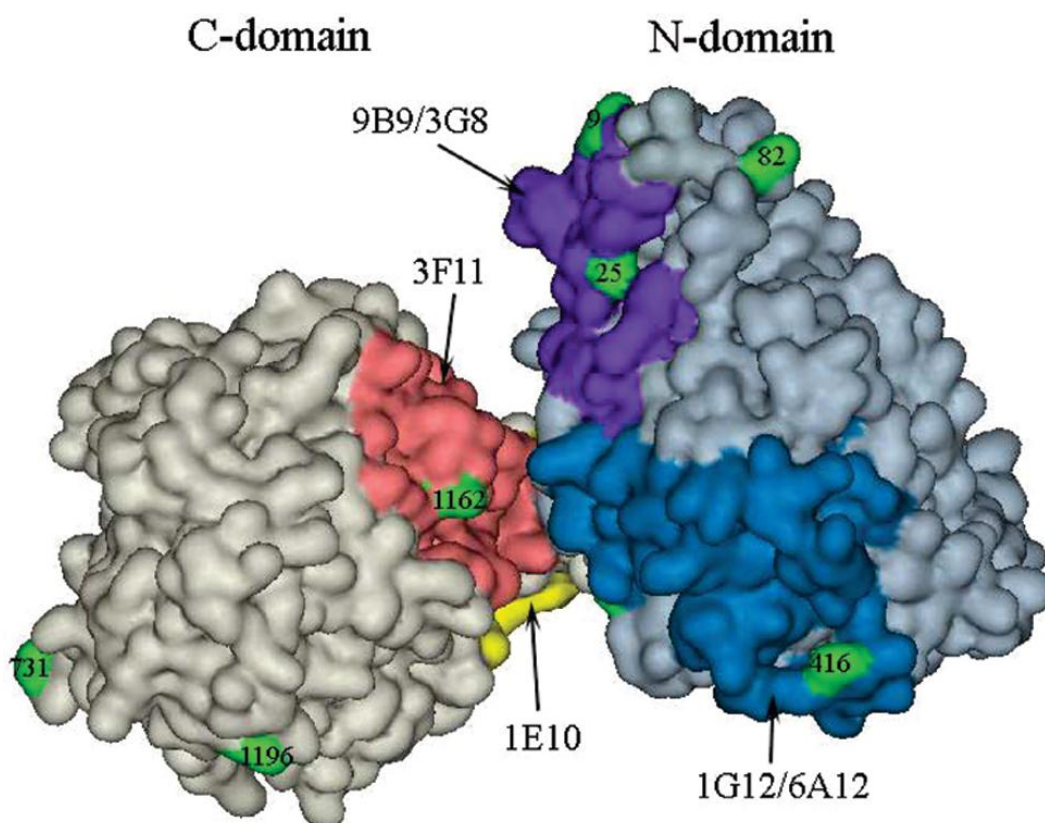


Рис. 6. Модель двудоменного АПФ [15]. Цветом отмечены эпитопы мАт, частично экранированные соседним доменом в составе сАПФ. Зеленым отмечены потенциальные сайты гликозилирования.

представлениям о форме АПФ, полученным с помощью узкого углового рассеяния нейтронов [115] и данных из обращенных мицелл [110,116]. В полученной модели длина сАПФ составила 105 Å, что удовлетворительно коррелирует с более ранними данными, согласно которым его длина составляет 90 Å. Кроме того, данная модель отражает близкое расположение доменов относительно друг друга, а также тот факт, что эпитопы мАт 1G12 и 1E10 (к N- и С-домену соответственно) частично экранированы соседним доменом в составе сАПФ. При таком взаимном расположении доменов при связывании субстрата или ингибитора переход N-домена в открытую конформацию и обратно стерически затруднен соседним С-доменом, что хорошо может объяснять отрицательную кооперативность между доменами. Более того, связывание ряда мАт (1G12, 6A12, 3G8 к N-домену и 3F11 к С-домену), находящихся близко к области контакта доменов, повышалось в присутствии лизиноприла, что авторы связывают с конформационными изменениями доменов, либо изменением взаимного положения N- и С-доменов в составе сАПФ. Полученные данные в будущем могут послужить структурным базисом для объяснения отрицательной кооперативности между доменами.

В 2010 году было получено изображение свиного легочного сАПФ с помощью трансмиссионной электронной микроскопии на углеродной подложке с применением негативного окрашивания [117]. Полученное изображение имело разрешение 2,3 нм (23 Å). Линейные размеры сАПФ составили 15,3 нм в длину и 7,4 нм в ширину, что соответствует более ранним данным [115], полученным с помощью светодинамического и нейтронного рассеяния (длина 13,5 нм, ширина 4-6 нм). Заметен мостик, соединяющий N- и С-домены. Цифровая обработка данных позволила получить более четкие изображения молекулы (рис. 7).

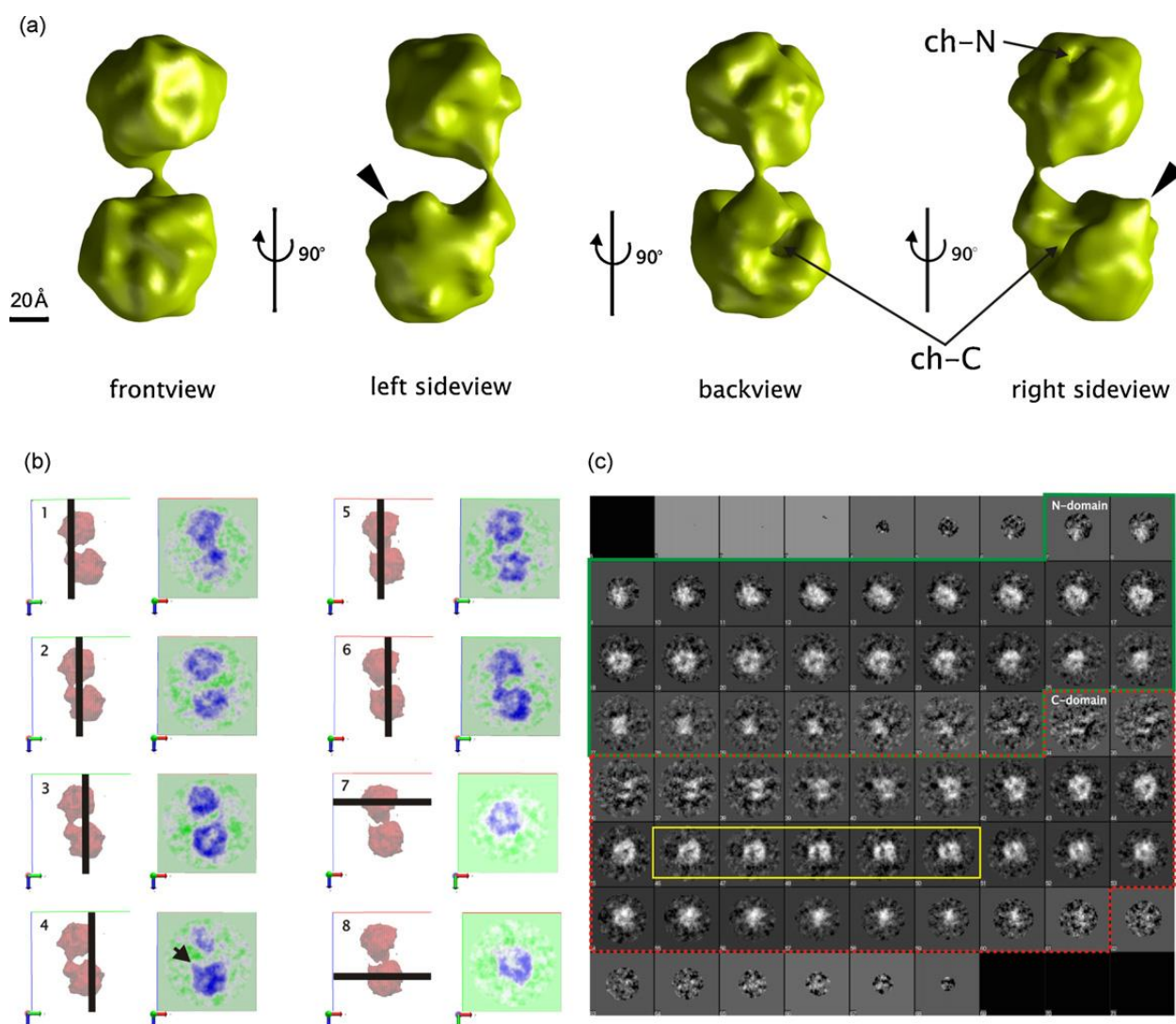


Рис. 7. Модель сАПФ [117]. А – графически обработанное представление модели сАПФ. В – срезы модели электронной плотности перпендикулярно и параллельно оси Z. С – галерея срезов вдоль оси Z.

На разрезе трехмерной реконструкции модели соматического АПФ хорошо заметно распределение массы внутри молекулы АПФ (рис. 7 b,c). В структуре как N-, так и С-домена наблюдаются щелевидные участки разного объема с дефицитом массы, указывающие на

расположение щелей активных центров. Из полученных данных можно заключить, что молекула сАПФ представляет собой два ортогонально ориентированных домена, соединенных интердоменным линкером (мостиком). Этот мостик представляет собой простой олигопептидный сегмент, благодаря которому между доменами в составе сАПФ сохраняется расстояние 2-2,5 нм. Такая форма расположения доменов находится в соответствии с ранее предложенной моделью Старрока [18] и несколько противоречит модели сАПФ, предложенной Напёровой [15], поскольку в последней предполагался более тесный контакт между доменами. Видно, что сАПФ представляет собой несимметричную молекулу.

Базируясь на полученных данных, авторы выделяют три различимые подструктуры: интердоменный линкер, цельный фрагмент треугольной формы (N-домен) и фрагмент прямоугольной формы, состоящий из двух различных долей (C-домен). Авторы объясняют такую разницу формы N- и C-доменов тем, что в условиях эксперимента первый находится в закрытой конформации, а второй – в открытой. Для того чтобы подтвердить это предположение, авторы встроили в свою модель сАПФ известные структуры N-домена (PDB: 2C6F [18]) в закрытой конформации и АПФ2 (PDB: 1R42 [118]) в открытой конформации. Полученная модель представлена на рис. 8.

Отмечается, что докинг структуры АПФ2 внутри C-домена проведен успешно, в частности, хорошо совпали расположение щели активного центра в структуре АПФ2 и выраженной выемки в модели C-домена сАПФ, а также «шишка» на поверхности C-домена (на рисунке отмечена треугольной стрелкой). Результатом такого докинга оказалось, что положение интердоменного линкера в полученной модели не соответствует положению C-концевого сегмента в структуре N-домена. Докинг структуры N-домена в модель сАПФ проводился таким образом, чтобы концы интердоменного линкера в обоих структурах были максимально сближены. Отсутствие в модели N-домена в составе сАПФ «шишки» и выраженного щелевидного центрального канала авторы считают указанием на то, что N-домен находится в закрытой конформации. Интересно отметить, что ориентация щелей активных центров N- и C-доменов несимметрична. Щель активного центра C-домена наклонена примерно на 60° относительно главной оси, а положение щели активного центра N-домена почти нормально к главной оси (пунктир на рис. 8). Таким образом, N- и C-домен в составе сАПФ перекручены таким образом, что щели их активных центров расположены примерно под углом 60° друг к другу и ориентированы в сторону растворителя, а сами домены смещены относительно друг друга примерно на 90° .

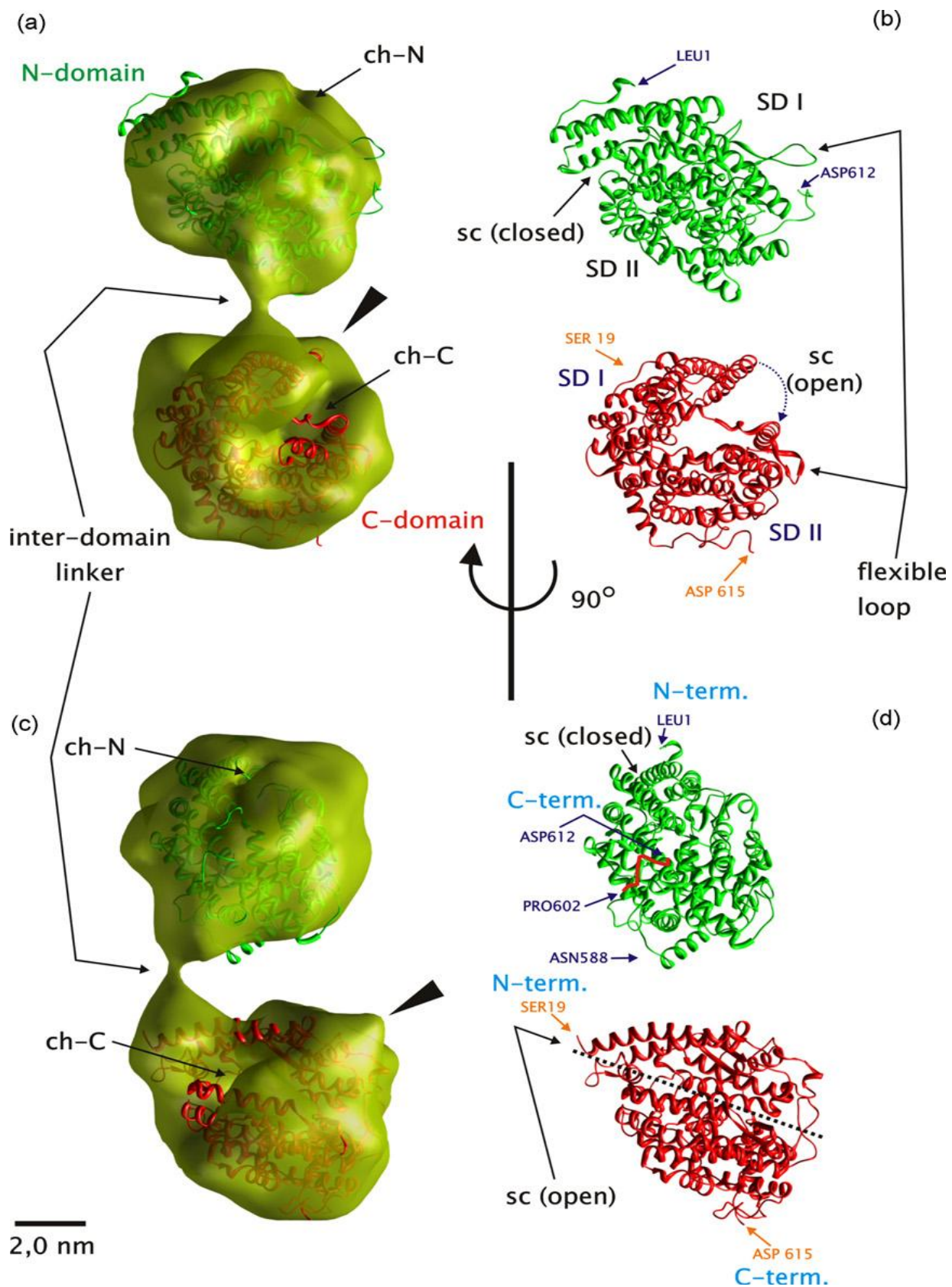


Рис. 8. Встраивание рентгеноструктурных данных отдельных N- и C-доменов в модель сАПФ [117].

Полученные данные могут быть очень полезны для определения молекулярных механизмов, объясняющих отрицательную кооперативность между доменами. Несмотря на всю значимость определения взаимного расположения доменов в составе сАПФ следует помнить, что изображение получено для фермента, сорбированного на углеродной подложке, а значит в действительности (например, в растворе или при функционировании в организме) взаимное расположение доменов может оказаться другим. Таким образом, факт существования отрицательной кооперативности двух доменов в структуре соматического фермента указывает на их тесную взаимосвязь, и выяснение молекулярных механизмов их взаимного влияния требует дальнейших исследований.

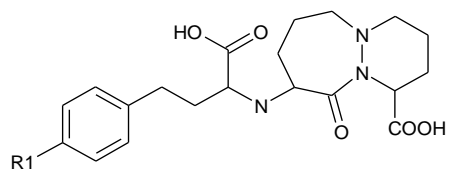
2. ИНГИБИТОРЫ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

2.1. Ограничения современных ингибиторов АПФ

В настоящий момент ингибиторы АПФ, наряду с такими известными препаратами, как диуретики, антагонисты кальция и др., являются наиболее эффективными средствами при лечении недостаточности кровообращения, остром инфаркте миокарда, больных с хроническим легочным сердцем. Уникальная ценность ингибиторов АПФ при лечении сердечно-сосудистых заболеваний обусловлена как улучшением качества жизни, так и снижением уровня смертности больных. Альтернативными путями лечения сердечно-сосудистых заболеваний является блокада рецепторов к ангиотензину II, AT₁R и AT₂R, соответствующими антагонистами. Однако интересно отметить, что две из трёх международных комиссий организаций здоровья рекомендуют применение ингибиторов АПФ, а не антагонистов ангиотензина II [58]. Несмотря на то, что группа ингибиторов АПФ представлена широким спектром препаратов, наиболее важное значение для клинической практики сохраняют каптоприл, эналаприл и лизиноприл, как наиболее изученные в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях. Поэтому поиск и исследование более совершенных природных и синтетических ингибиторов АПФ на данный момент является весьма актуальной задачей.

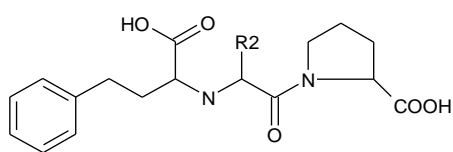
Сердечно-сосудистые заболевания, вследствие гипертензии, атеросклероза и диабета, являются главной причиной смертности в мире, насчитывая 30% случаев летальных исходов; 80% этих смертей зарегистрированы в странах с низким и средним доходом населения [119,120]. Основным источником заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний является повреждение органов, в частности сердечная недостаточность, нефропатия и ретинопатия [121]. Современные методы лечения сердечно-сосудистых заболеваний и предшествующих им условий недостаточны, и поэтому плохо контролируемые гипертензия, атеросклероз и диабет являются скорее нормой, чем исключением.

Важность АПФ и его критическая роль в ренин-ангиотензин-альдостероновой системе и регуляции сердечно-сосудистой физиологии и заболеваний давно известна. Причиной этого является то, что лекарства, блокирующие различные компоненты этой системы, эффективны при лечении гипертензии, сердечной недостаточности и предупреждении сердечно-сосудистых событий, вызванных атеросклерозом (в основном инфаркта и инсульта), а также способные замедлять болезнь почек, вызванную гипертензией и диабетом.



Цилазаприлат : R1 = H

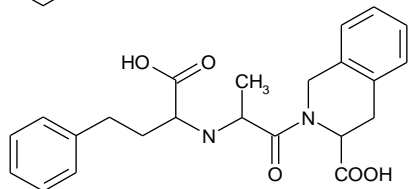
Ro 31-8472 : R1 = OH



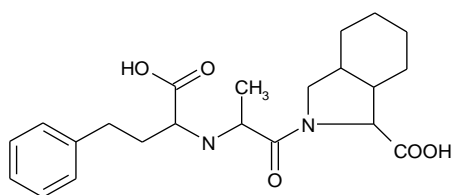
Эналаприлат: R2 = CH₃

Лизиноприл : R2 = (CH₂)₄NH₂

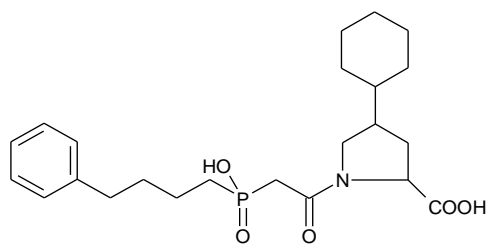
351A : R2 = (CH₂)₄NHC(NH)C₆H₄OH



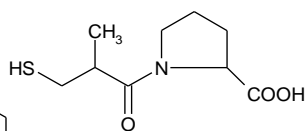
Хинаприлат



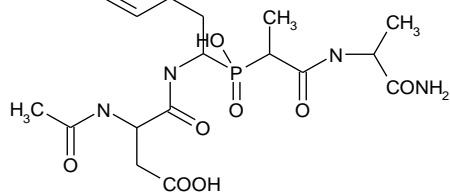
Трандолаприлат



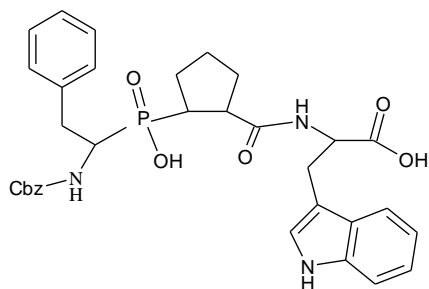
Фозиноприл



Каптоприл



RXP 407



RXPA380

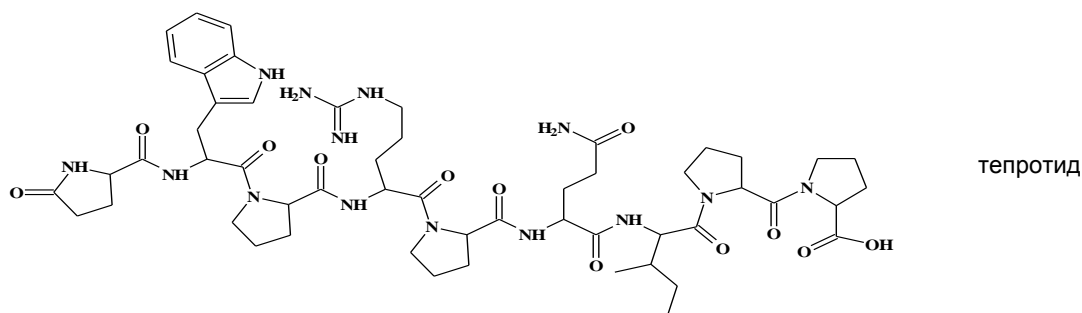


Рис. 9. Структуры ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента.

Исследования взаимодействия конкурентных ингибиторов с разными формами АПФ так же, как исследования гидролиза субстратов под действием активных центров доменов фермента, указывают на существование структурно-функциональных различий между двумя доменами. Более того, разработка новых специфичных ингибиторов в рамках создания более эффективных медицинских средств может быть основано на различном строении активных центров АПФ. На рис. 9 представлены структуры некоторых ингибиторов АПФ.

Большинство из известных на настоящий момент ингибиторов АПФ было разработано в отсутствие трёхмерной структуры доменов фермента. Начальным ориентиром для дизайна современных синтетических ингибиторов АПФ послужила структура обнаруженных в яде змеи пептидов [122]. Они привлекли внимание тем, что при внутримышечном введении в организм млекопитающего увеличивали содержание вазодилатора брадикинина в крови вследствие ингибирования АПФ. По своему действию они получили обозначение брадикинин-потенцирующие пептиды ВРР (bradykinin-potentiating peptides). Один из них нонапептид тепротид, предназначенный для внутривенного введения, применялся в клинике в течение нескольких лет. Однако вследствие серьезных недостатков тепротида, каковыми являлись токсичность, разрушение в желудочно-кишечном тракте и высокая стоимость получения, его применение в лечебной практике пришлось прекратить.

Анализ действия ингибиторов ВРР показал, что более эффективными являются молекулы, С-конец которых состоит из последовательности аминокислот Phe-Ala-Pro [123]. Дальнейшая модификация С-концевой части ингибиторов привела к созданию значительно более эффективных лигандов, широко используемых как в практических, так и в научных целях – каптоприла, лизиноприла, эналаприлата и др.

Первым эффективным синтетическим ингибитором явился каптоприл [124], клиническое применение которого началось в 1977 г. За ним появились эналаприл, лизиноприл, рамиприл и другие [125]. Ингибиторы АПФ примечательны тем, что они

уменьшают периферийное сосудистое сопротивление, не влияя на активности барорецепторов и не изменяя частоты сердечных сокращений [126], и в то же время они ингибируют тонизирующий эффект ангиотензина-II на симпатическую нервную систему [127].

АПФ гидролизует широкий спектр биологических субстратов, таких как геморегуляторный гормон AcSDKP, гонадотропин-высвобождающий гормон GnRH (также известный как LHRH - гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон), вещество P, нейротензин, динорфин и энкефалин. Поэтому ингибирование АПФ приводит к различным эффектам помимо целевого – снижения давления [128]. Так, ингибиторы АПФ усиливали эффект брадикинина в сосудах с незначительным уровнем АПФ и эффект АПФ-стойкого агониста В₂-кининового рецептора [129]. Эти данные подтверждают мнение о том, что ингибиторы АПФ селективно усиливают эффект брадикинина посредством В₂-кининового рецептора, независимо от их АПФ-ингибирующих свойств. Более того, было показано, что АПФ способен димеризоваться с В₂-кининовым рецептором, защищая высокоаффинные рецепторы, блокируя десенсбилизацию рецепторов и понижая интернализацию, тем самым усиливая действие брадикинина помимо простого предотвращения его гидролиза [130,131]. В 2005 году было показано, что ингибиторы АПФ способны индуцировать фосфорилирование Ser1270 в цитоплазматическом домене, что инициирует передачу сигнала снаружи внутрь клетки и увеличивает экспрессию циклооксигеназы-2 и АПФ [132]. Эффект ингибиторов АПФ на циклооксигеназу-2 вызван белком активатором фактора транскрипции и выражается в увеличении высвобождения простаглицлина и простаглицлина Е₂ эндотелиальными клетками [133].

Наиболее известным побочным эффектом ингибиторов АПФ является постоянный кашель, который может появляться у одного из пяти пациентов, если рассматривать определенные популяции. Другим побочным эффектом является ангионевротический аллергический отек (отек Квинке); это более редкое явление, но оно потенциально опасно для жизни. Считается, что эти эффекты вызваны повышенной концентрацией брадикинина или вещества P и стимуляцией блуждающих С-волокон [134].

Таким образом, некоторые ограничения ингибиторов АПФ, в том числе способность АПФ гидролизовать широкий спектр субстратов и способность других ферментов гидролизовать его основной физиологический субстрат ангиотензин-I, явились предпосылкой для поиска способов более тонкой настройки ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, например домен-селективных ингибиторов и двойных ингибиторов пептидаз.

2.2. Домен-селективные ингибиторы АПФ

2.2.1. N-домен специфичные ингибиторы

Известно, что ряд биологических субстратов АПФ специфичны к N-домену: ангиотензин¹⁻⁷, амилоидный бета пептид, LHRH и AcSDKP [29,135,136], хотя другие авторы показали, что гидролиз ангиотензина¹⁻⁷ не домен-специфичен [137]. Возможно, AcSDKP является наиболее важным из этих субстратов. Он впервые был определен как регуляторный пептид, вовлеченный в пролиферацию стволовых гематopoэтических клеток [138]. Кроме этого было показано, что он оказывает ряд положительных эффектов на сердечно-сосудистую систему: предупреждение и лечение фиброза и воспаления сосудов и почек [139]. AcSDKP опосредует эти эффекты, в частности, путем ингибирования дифференциации, активации и миграции макрофагов и высвобождения цитокинов. Также было показано, что AcSDKP предотвращает повреждение органов вследствие гипертонии [140]. Повышенный вследствие ингибирования АПФ уровень AcSDKP вносит вклад в положительный эффект ингибиторов посредством нового механизма, при котором AcSDKP тормозит отложение коллагена в левом желудочке сердца [141].

Эти данные подчеркивают важность разработки ингибиторов, специфичных к N-домену АПФ, которые могут быть полезны при лечении ряда таких заболеваний, как фиброз легких и почек, при которых ингибирование N-домена выгодно, в то время как C-домен останется активным для регуляции кровяного давления.

Наиболее интересным N-домен селективным ингибитором является RXP407, который демонстрирует 2000-кратную специфичность к N-домену [111]. Аминокислотные остатки Tyr369 и Arg381 в S2 кармане ответственны за N-доменную специфичность RXP407, ориентируя его в оптимальном положении (рис. 10 D)[142]. Эти данные подтверждают полученные ранее при синтезе RXP407 сведения о том, что варьирование P2-группы оказало сильное влияние на специфичность ингибитора [111]. Было установлено, что присутствие остатков Glu, Asn и Asp в P2 положении обеспечило селективность к N-домену, в то время как наличие Arg в P2'положении отменяло селективность ингибитора. Значимость S2 кармана в обеспечении селективности RXP407 была подтверждена при изучении кристаллической структуры N-домена в комплексе с этим ингибитором, где было видно, что Tyr369 и Arg381 имеют тесные контакты с P2 группой RXP407 (рис. 10 C-D)[143].

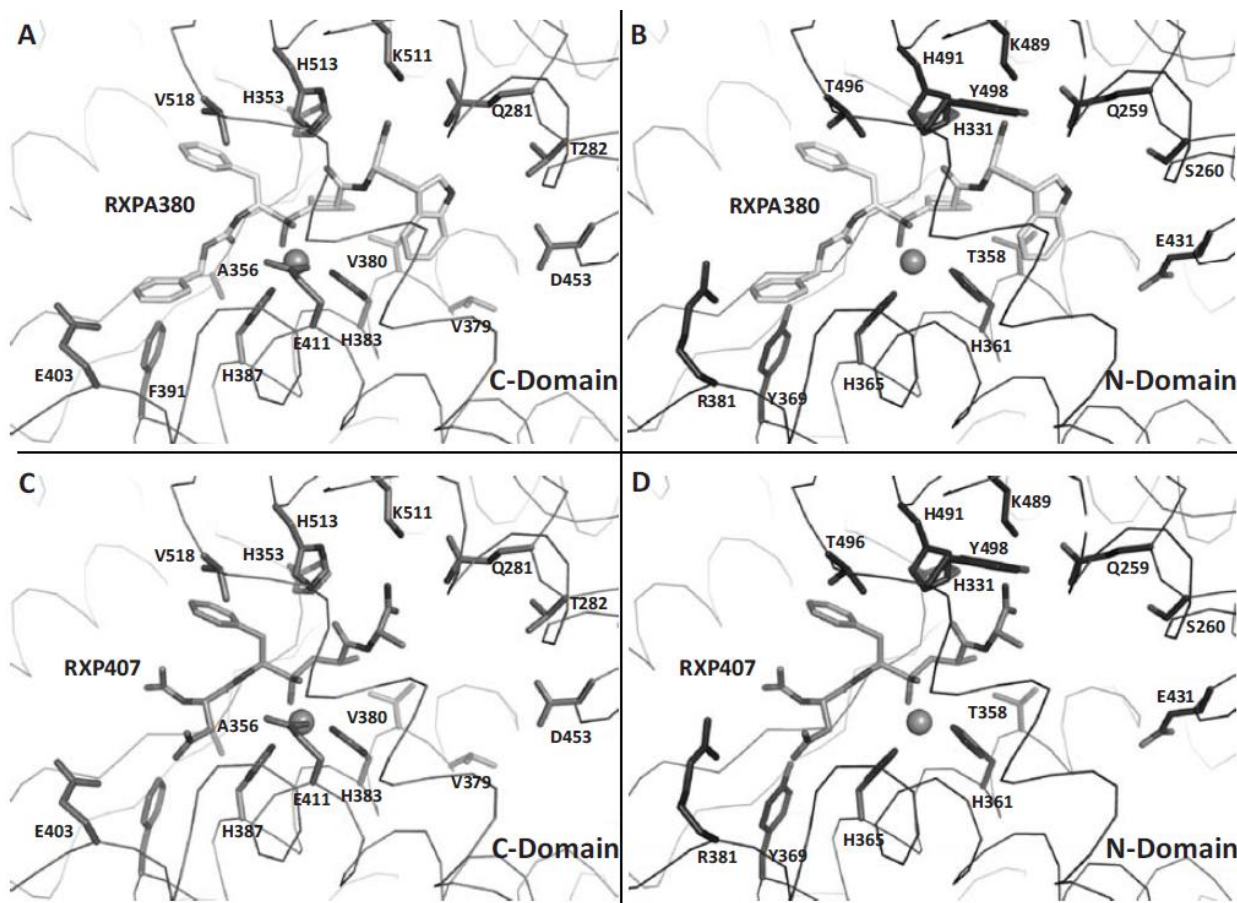


Рис. 10. Аминокислотные остатки активных центров N- и С-домена, обеспечивающие селективность ингибиторов RXP407 и RXPA380 [143].

2.2.2. С-домен специфичные ингибиторы

Недавние исследования показали, что основным сайтом расщепления ангиотензина-I является С-домен [144,145], в то время как брадикинин расщепляется обоими доменами с одинаковой эффективностью [74]. Это побудило исследователей к поиску С-домен специфичных ингибиторов, которые позволили бы контролировать кровяное давление, оставляя N-домен активным для предотвращения аккумуляции брадикинина и связанных с этим побочных эффектов [146].

Кето-АПФ (Keto-ACE) – это кетометиленовый аналог трипептида Phe-Gly-Pro, который в 50 раз более селективен к С-домену, и был первым ингибитором АПФ, проявившим заметную доменную селективность [135]. Доменная селективность этого ингибитора впоследствии была улучшена путем добавления громоздкой гидрофобной группы в P2' положение [147]. Например, замена в P2' положении Pro на Trp или Phe приводит к возрастанию селективности до 250 раз в пользу С-домена. Селективность производных кето-АПФ скорее всего обусловлена взаимодействиями между ароматическими P2' группами и

остатками Glu367 и Val380 в S2' кармане С-домена. В N-доме не таких взаимодействий нет, поскольку эти остатки там заменены на Asp354 и Thr358 соответственно. Предполагается, что гидрофобные взаимодействия производных кето-АПФ с остатками Phe391 (S2) и Val518 (P1) С-домена также вносят вклад в доменную селективность, поскольку эти остатки заменены в N-доме на более полярные аминокислоты Tyr369 и Thr496 соответственно [148].

Брадикинин потенцирующий пептид pGlu-Gly-Leu-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Ile-Pro-Pro (BPPb) проявляет 260-кратную специфичность к С-доме ну [98]. Считается, что селективность ингибиторов BPP опосредуется P2 остатками. Так, присутствие в P2 положении BPPb остатка Lys (в противовес Gln, Pro и Pro в BPPa, BPP2 и BPPc соответственно) приводит к С-доме нной специфичности этого ингибитора. Наиболее специфичным на сегодняшний день является аналог фосфинового пептида RXPA380 , который в 2000 раз более специфичен к С-доме ну, чем к N-доме ну [113]. На основании данных, полученных при изучении кристаллической структуры С-домена АПФ в комплексе с RXPA380 [102] и изучении мутантов стало известно, что специфичность этого ингибитора обусловлена в основном гидрофобными взаимодействиями между P2 группой и Phe391, который замещен на более полярный Tyr369 в N-доме не, испытывающий стерические затруднения с Phe в P2 положении при связывании RXPA380 (рис. 10 А-В) [142]. Кроме того, Glu403 в S2 кармане С-домена замещен на Arg381 в N-доме не, что также может вызывать стерические затруднения с P2 группой, внося вклад в усиление С-доме нной специфичности этого ингибитора. Интересно отметить, что Asp354 и Glu403, ответственные за доменную селективность производных кето-АПФ не оказали влияния на доменную специфичность RXPA380 [142].

Однако будущее С-доме н селективных ингибиторов оказалось под вопросом в связи с недавними исследованиями на мышах, когда было показано, что генетическая инактивация С-домена в составе сАПФ не привела к понижению кровяного давления вследствие компенсаторного механизма, включающего регуляцию ренина [145]. Повышение экспрессии ренина позволяет поддерживать кровяное давление в норме даже при неактивном С-доме не сАПФ [145,149]. Таким образом, использование С-доме н специфичных ингибиторов для лечения хронической гипертензии может оказаться не таким эффективным, как предполагалось ранее. Решением этой проблемы может стать разработка и применение двойных ингибиторов.

2.3. Двойные ингибиторы АПФ и ЭПФ

Помимо АПФ, нейтральная эндопептидаза (неприлизин, NER, EC 3.4.24.11) и эндотелин-превращающий фермент-1 (ЭПФ-1, ECE-1, EC 3.4.24.71) также проявляют вазопрессорную и вазодилаторную активность. Таким образом, оба этих фермента являются перспективными мишенями для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [150–153]. Однако важно помнить, что ингибирование АПФ вызывает рост активности химазы в сердечной внутриклеточной жидкости, что является еще одним механизмом накопления ангиотензина-II [154]. Таким образом, контроль кровяного давления остается неоптимальным у значительной части пациентов [155], обеспечивая убедительные доводы в пользу разработки новых улучшенных стратегий. Для решения этой задачи были разработаны двойные ингибиторы, способные одновременно ингибировать АПФ и неприлизин [156]. За ними были разработаны двойные ингибиторы неприлизина и ЭПФ-1, и, наконец, тройные ингибиторы, блокирующие активность АПФ, ЭПФ-1 и неприлизина одновременно [157]. Двойной ингибитор АПФ и неприлизина омапатрилат (omapatrilat) был клинически более эффективен, чем одиночный ингибитор АПФ, однако при его применении наблюдались более частые случаи возникновения ангионевротических отеков, что остановило разработку омапатрилата и подняло вопрос о соотношении риска и пользы применения таких ингибиторов в терапевтических целях [158]. Частота возникновения ангионевротических отеков при использовании тройных ингибиторов АПФ, неприлизина и ЭПФ-1 пока не установлена, однако имеется предположение, что ингибирование неприлизина (в контексте применения двойных и тройных ингибиторов) может быть ответственно за увеличение побочных эффектов [157]. Действительно, было показано, что ингибирование неприлизина приводит к увеличению уровня брадикинина и эндотелина-I, что стало толчком к разработке нового типа ингибиторов, взаимодействующих с С-доменом АПФ и ЭПФ-1 [159]. Это привело к созданию первого двойного селективного ингибитора С-домена АПФ и ЭПФ-1. Оказалось, что конфигурация остатка в P1' положении имеет ключевое значение для селективности этого ингибитора (рис. 11).

Оказалось, что вместо классической S-конформации группы в P1' положении (соединение FI на рис. 11), характерной для всех известных на данный момент ингибиторов АПФ (что соответствует L-конформации аминокислот) для нового ингибитора более эффективной оказалась R-конформация (соединение FII на рис. 11). Протяженная и громоздкая боковая цепь в P1' положении обеспечила селективность этого ингибитора к С-

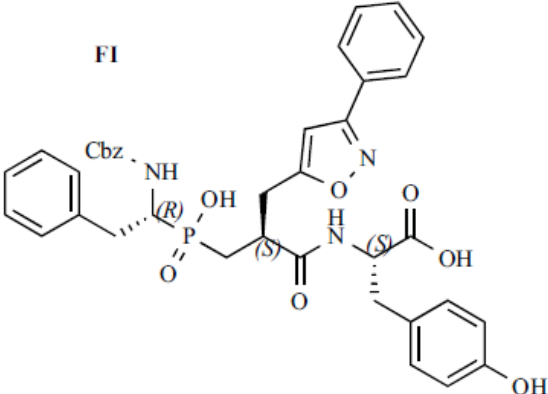
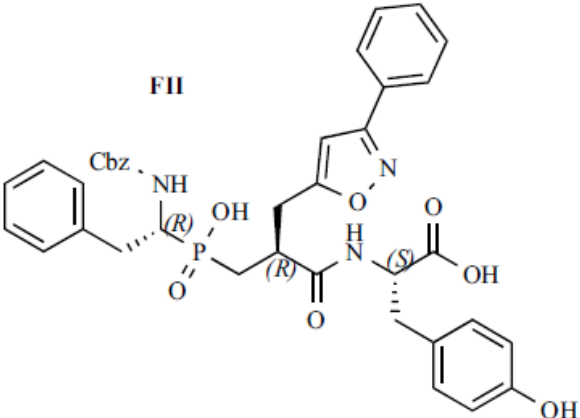
Ингибитор	Константа ингибирования, K_i (нМ)			
	N-домен АПФ	C-домен АПФ	Непри- лизин	ЭПФ-1
<p>FI</p> 	180±25	0,41±0,03	172±24	275±60
<p>FII</p> 	150±20	0,65±0,03	6700±300	14±2

Рис. 11. Структура двойных ингибиторов АПФ и ЭПФ-1 и константы ингибирования соответствующих ферментов [159].

домену АПФ и ЭПФ-1. Более того, на модели крыс со спонтанной гипертензией было показано, что внутривенное введение этого ингибитора FII дозой 10 мг/кг приводило к понижению кровяного давления на 24 ± 2 мм.рт.ст. по сравнению с контролем [159]. Таким образом, одновременное ингибирование АПФ и ЭПФ-1 понижает в плазме концентрации ангиотензина-II и эндотелина-I – самых сильных вазопрессорных пептидов, не увеличивая при этом уровень брадикинина. Структурное обоснование селективности и эффективности этого ингибитора было представлено в работе [160]. Были получены кристаллические структуры N- (2,15 Å) и C-домена (1,97 Å) АПФ в комплексе с этим ингибитором.

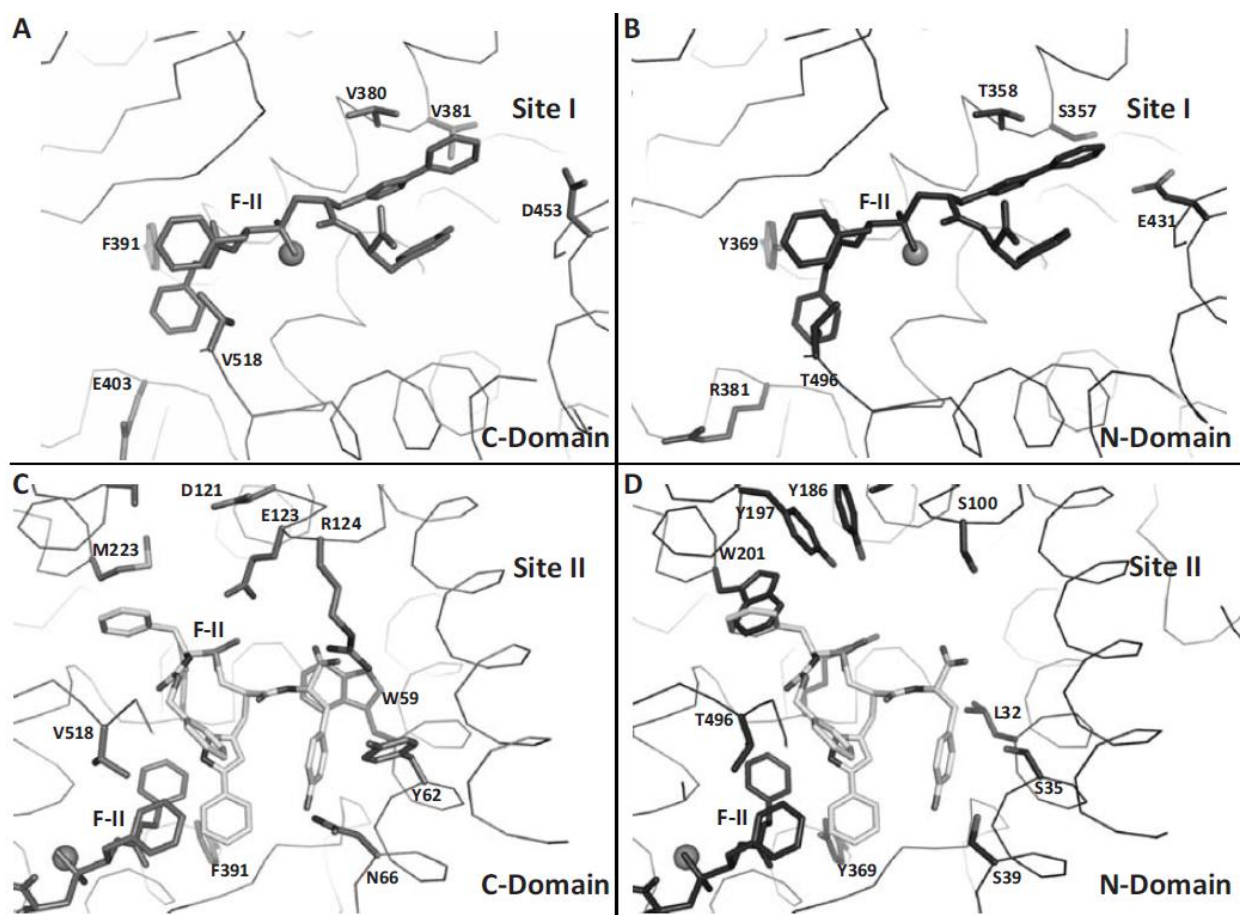


Рис. 12. Связывание ингибитора FII в активных центрах N- и C-доменов АПФ [160].

Анализ рентгеноструктурных данных выявил уникальную особенность – в С-домене связывается одновременно две молекулы этого ингибитора (рис. 12 А, С), в N-домене только одна (рис. 12 В, D). В структурах обоих доменов первая молекула ингибитора расположена в ожидаемом месте в сайте связывания, а ее громоздкая бициклическая группа в P1' положении и R-конформации разместилась, что интересно, в S2' кармане фермента. В структуре С-домена изоксазол-фенильная группа второй молекулы ингибитора образует сильное π -электронное взаимодействие с бензоильной группой первой молекулы, связывая их таким образом в “hand-shake” конформации. Эти данные впервые показали необычную архитектуру и гибкость активного центра С-домена АПФ, что может быть полезно для дальнейшей разработки ингибиторов как С-домена АПФ, так и других вазопептидаз.

Применение домен-селективных ингибиторов, а также двойных и тройных ингибиторов вазопептидаз - это большой шаг в науке и медицине, который позволит в будущем перейти к созданию более эффективных лекарственных средств. Как отмечалось выше, основным фактором, подтолкнувшим к исследованию и созданию таких ингибиторов, явилось открытие способа кристаллизации N- и С-доменов АПФ, что позволило изучать

кристаллические структуры ферментов с исследуемым ингибитором в активном центре. Это несомненное преимущество для создания и исследования новых ингибиторов, в частности, ингибиторов АПФ. Однако такой подход позволяет изучать функционирование лишь отдельных доменов АПФ, в то время как мишенью ингибиторов АПФ является именно двудоменная форма фермента. Поэтому тот факт, что до сих пор не была получена кристаллическая структура двудоменного АПФ, оставляет ряд вопросов. В частности, существуют ли какие-либо лиганд-индуцированные взаимодействия между доменами при функционировании фермента? Для того, чтобы ответить на этот вопрос, необходимо исследовать ответ сАПФ на связывание лигандов, в частности, ингибиторов АПФ. Удобным и точным инструментом для такого исследования являются МАт, специфичные к определенным эпитопам на поверхности фермента.

3. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

3.1. Общая характеристика антител и антигенов

Вещества, способные вызывать специфические иммунологические реакции в организме, в том числе биосинтез специфических антител, получили название антигенов. К антигенам относятся белки, в том числе гликопротеины, а также полисахариды, липополисахариды, нуклеиновые кислоты. На поверхности сложного антигена можно выявить функциональные группы или остатки, обуславливающие антигенную специфичность, называемые антигенными детерминантами или эпитопами [161].

Понятие антигенной детерминанты включает в себя последовательность образующих ее химических функциональных групп и их пространственное расположение. В молекулах белков антигенные детерминанты образуются совокупностью аминокислотных остатков, при этом антитела могут распознавать от 5 до 20 аминокислотных остатков. Эпитопы белков бывают двух типов – секвенциальные, т.е. представляющие из себя последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи, и конформационные, образованные аминокислотными остатками из различных частей белковой глобулы [161]. В гликопротеинах в эпитоп могут входить и олигосахаридные группировки [161], содержащие 4-6 остатков углеводов. Организм способен образовывать антитела практически к любой части молекулы антигена, но, как правило, некоторые эпитопы обладают большей антигенностью, и большинство антител образуется именно к ним. Эти эпитопы чаще всего расположены на выступающих частях молекулы антигена [162].

При контакте специфических антител с антигеном между аминокислотными остатками антиген-связывающего центра в молекуле антитела и эпитопом связывания на молекуле антигена образуются многочисленные нековалентные связи: водородные связи, электростатические, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные взаимодействия. Реакция образования комплекса антиген-антитело протекает с выделением теплоты [161], как правило, изменение энтальпии составляет -40 кДж/моль. С количественной стороны специфичность взаимодействия антитела с антигеном характеризует аффинность, или равновесная константа образования комплекса антиген-антитело K_a . Если константа равновесия процесса комплексообразования K_a около или больше 10^8 л/моль, то антитела являются высокоаффинными. Обычный диапазон изменения аффинности антител составляет 10^5 - 10^{11} л/моль, что соответствует изменению свободной энергии связывания -24 ÷ -52 кДж/моль [161].

По своим антигенным, эффекторным свойствам и структурным особенностям

иммуноглобулины подразделяются на пять основных классов: IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Общей структурной единицей всех иммуноглобулинов является комплекс из четырех полипептидных цепей – двух идентичных между собой легких цепей с молекулярной массой 25 кДа каждая и двух тяжелых с молекулярной массой 50-70 кДа (рис. 13).

Легкие цепи прочно соединены с тяжелыми посредством S-S связей. Помимо межцепочечных S-S связей в молекуле иммуноглобулина существуют внутрицепочечные S-S связи, возникающие в пределах одной и той же тяжелой или легкой цепи (обычно две в легкой и четыре в тяжелой), и S-S связи между тяжелыми цепями отдельных четырехцепочечных комплексов, обеспечивающие образование полимерных молекул IgM и IgA. Помимо S-S связей каждая из легких цепей прочно соединена с NH₂-концевыми участками тяжелых цепей с помощью гидрофобных, электростатических и других межатомных взаимодействий. Аналогичные связи существуют и между свободными участками тяжелых цепей. Антиген-связывающий участок расположен в NH₂-концевых частях тяжелых и легких цепей. Легкие цепи являются общими для всех классов иммуноглобулинов, в то время как тяжелые цепи обладают структурными, иммунологическими и химическими особенностями, характерными для каждого класса иммуноглобулинов.

При действии на молекулу IgG протеолитического фермента папаина молекула IgG распадается на три фрагмента, два из которых идентичны друг другу и сохраняют способность связывать антигены (Fab-фрагменты) и третий – Fc-фрагмент, ответственный за эффекторную функцию антител. Другой протеолитический фермент пепсин разрывает пептидную связь, расположенную ближе к COOH-концу цепи, в результате образуется Fc'-фрагмент, представляющий собой остатки тяжелых цепей, и соединенные дисульфидными связями два Fab-фрагмента – F(ab')²-фрагмент.

Принадлежность иммуноглобулинов к тому или иному классу зависит от характерных особенностей строения константной области тяжелой цепи: количества и последовательности аминокислотных остатков, молекулярной массы, количества доменов (каждый из дисульфидных мостиков образует петлю от 55 до 70 аминокислотных остатков, участки пептидных цепей вблизи петель образуют глобулы, состоящие из порядка 110 аминокислотных остатков, которые получили название домены) и межцепочечных дисульфидных мостиков, связывания олигосахаридов и др. [163]. Так, например, наибольшую молекулярную массу имеет IgM (950 кДа) по сравнению с

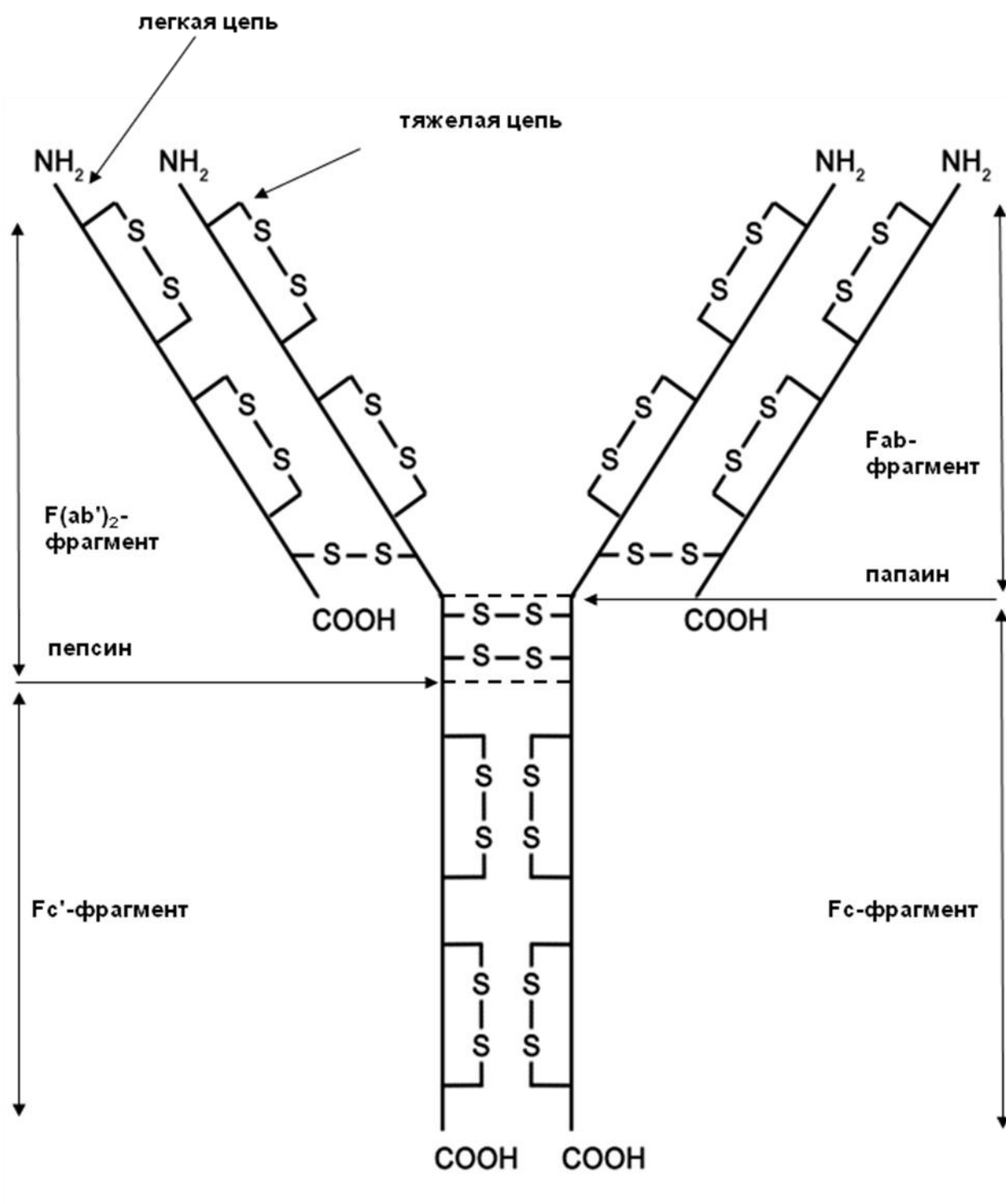


Рис. 13. Схематичное изображение строения молекул иммуноглобулинов [161].

остальными классами иммуноглобулинов (IgE – 190 кДа, IgD – 175 кДа, IgA – 160 кДа, IgG – 150 кДа), содержание углеводов по массе варьируется от 3% у IgG до 13% у IgE. Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови наибольшая у IgG и достигает 1250 мг/100 мл, в то время как концентрация IgE ничтожно мала – 0,03 мг/100 мл [161]. IgM присутствует в сыворотке в виде пентамера, IgA – в виде тетрамера или димера.

Легкие цепи иммуноглобулинов бывают двух типов и являются общими для всех пяти классов, в то время как тяжелые цепи обладают структурными, иммунологическими и химическими особенностями, характерными для каждого класса иммуноглобулинов. На основании различий в химическом строении тяжелых цепей в пределах класса выделяют подклассы иммуноглобулинов: 4 подкласса для IgG, 2 – для IgA и 2 – для IgM. В молекуле иммуноглобулина любого класса легкие цепи относятся только к одному типу.

Все легкие и тяжелые цепи имеют одну принципиальную структурную особенность: они состоят из двух частей – варибельной и константной. Варибельные части легких цепей, располагающиеся на NH₂-конце цепи, сильно отличаются друг от друга у всех исследованных иммуноглобулинов, а константные, располагающиеся в COOH-концевой части цепи, имеют близкую аминокислотную последовательность в пределах одного класса как легких, так и тяжелых цепей. Варибельная область тяжелых цепей в NH₂-концевой части несколько длиннее соответствующей области легких цепей. Варибельные части тяжелых и легких цепей содержат гиперварибельные участки, в которых частота замен отдельных аминокислотных остатков максимальна. Эти участки принимают непосредственное участие при связывании антигена и входят в состав антигенсвязывающего центра.

Существуют поликлональные и моноклональные антитела (мАт). Поликлональные антитела являются гетерогенной смесью антител, направленных к разным эпитопам связывания антигена, и различающихся как по специфичности, аффинности, так и по физико-химическим свойствам. Для получения поликлональных антител проводят иммунизацию животного антигеном, которое является донором иммунной сыворотки (антисыворотки). Так как иммунный ответ формируется в организме постепенно, приятно различать первичный ответ (после первого введения антигена) и вторичный (после повторных инъекций антигена). Первичные и вторичные антисыворотки отличаются по составу антител и их специфичности. Обычно высокоактивные антисыворотки получают после нескольких циклов иммунизации. Полученная иммунная сыворотка содержит поликлональные антитела, специфичные к исследуемому антигену.

Для получения мАт используется слияние миеломных клеток с клетками селезенки

иммунизированного животного, таким образом, гибридные клетки (гибридомы) наследуют от опухолевых клеток способность неограниченно размножаться, а от клеток селезенки – синтезировать антитела предполагаемой специфичности [164].

Для увеличения относительного количества антител, обычно проводят выделение иммуноглобулинов из антисыворотки или культуральной жидкости следующим образом: осаждение иммуноглобулинов в 30-50% растворе сульфата аммония, гель-фильтрация для получения молекул соответствующих размеров, ионообменная и аффинная хроматография. В отличие от поликлональных антител, содержащих большое разнообразие антител, отличающихся своей специфичностью, аффинностью и физико-химическими свойствами, препараты моноклональных антител содержат продукт единственного клона плазматических клеток, направленный к строго определенной антигенной детерминанте и обладающий всегда одинаковыми физико-химическими характеристиками и сродством к антигену.

3.2. Исследование структуры и функционирования ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител к N-домену

В 1987 году для исследования АПФ впервые были применены моноклональные антитела. В работе [165] мАт 9В9 (получено иммунизацией мышей ферментом из легких человека) было использовано для локализации АПФ в различных тканях человека. В результате АПФ был обнаружен на поверхности эндотелиальных клеток легких, сердца, печени, кишечника и семенников, а также в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек и в кишечнике. Интересно, что мАт 9В9 не связывалось с АПФ в эпителиальных клетках тестикулярных семенных канальцев, что позволило предположить, что эпитоп связывания этого мАт есть не у всех форм АПФ. Только в 1989 году после расшифровки аминокислотной последовательности сАПФ [166] и открытия тестикулярной изоформы фермента [46] стало понятно, что мАт 9В9 специфично связывается только с N-доменом АПФ. Было также замечено, что мАт 9В9 при введении в кровотоки мышей и обезьян аккумулировалось в легких [167]. Учитывая его высокую специфичность и нетоксичность, предлагалось использовать это мАт для визуализации гамма скинтиграфии сосудистого русла легких, выявления травм легких, а также в качестве вектора для направленного транспорта лекарств в легкие.

При попытке создать иммунологический домен-специфичный инструмент для изучения АПФ были разработаны 16 мАт к человеческому АПФ. С помощью анализа конкурентного взаимодействия антител была составлена схема, отражающая пространственные взаимоотношения между эпитопами связывания этих мАт (рис. 14). Эти антитела узнавали

по крайней мере 9 различных эпитопов в трех неперекрывающихся антигенных областях молекулы АПФ [11]. Эксперименты по связыванию мАт с денатурированным АПФ показали, что исследуемые антитела узнавали конформационные эпитопы на поверхности фермента и не связывались с денатурированным АПФ (за исключением мАт 5F1, которое связывалось как с денатурированным, так и с интактным ферментом). Анализ связывания полученной панели мАт с рекомбинантным сАПФ и несколькими мутантными формами сАПФ с одним интактным доменом показал, что эпитопы связывания всех мАт расположены на N-домене АПФ.

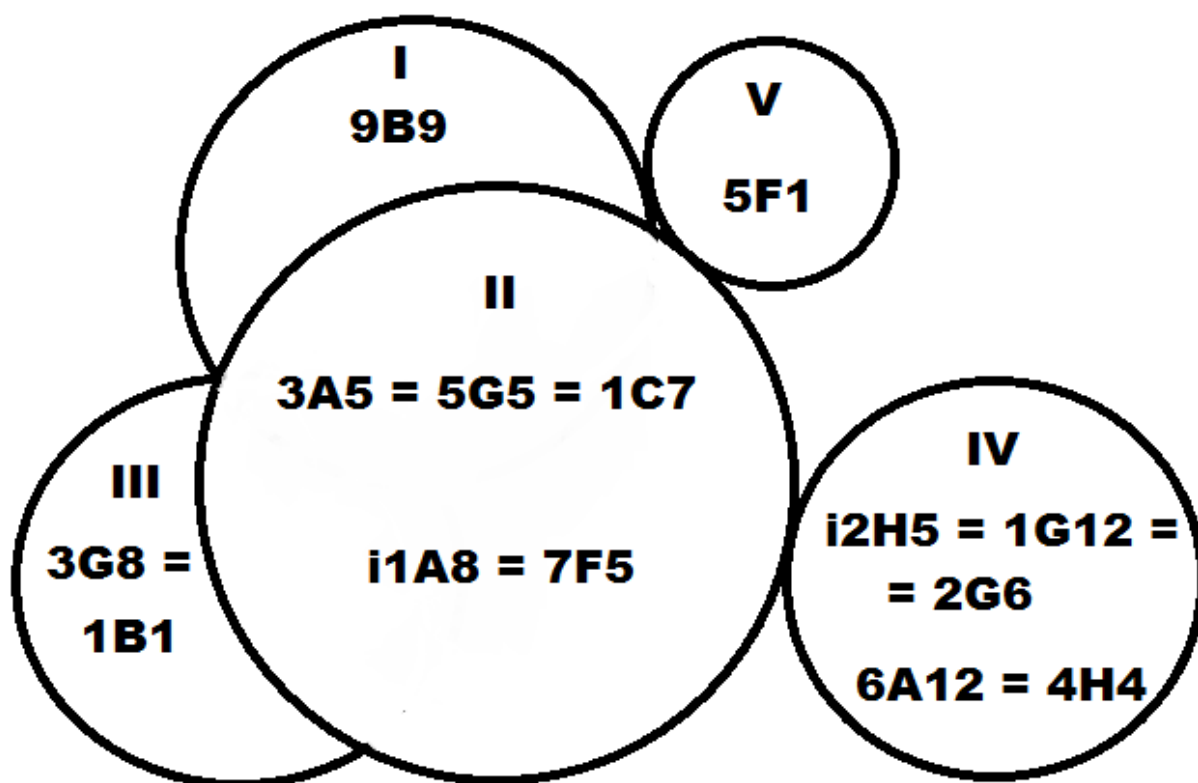


Рис. 14. Диаграмма, отражающая взаимное пространственное расположение эпитопов на поверхности N-домена АПФ [11].

3.2.1. Исследование возможной связи между димеризацией и шеддингом ангиотензин-превращающего фермента с поверхности клеточных мембран

Было показано, что АПФ может димеризоваться в обращенных мицеллах [168] и на поверхности CHO (chinese hamster ovary) клеток [110,169]. Кроме того, авторы [170] показали, что АПФ может быть представлен одновременно одномерной и димерной формами на поверхности CHO и HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) клеток. Более того, количество димеров АПФ на поверхности человеческих эндотелиальных клеток

резко возрастало в присутствии ингибитора АПФ рамиприлата [170]. В обращенных мицеллах полностью гликозилированный АПФ был способен образовывать димеры, в то время как дегликозилированный фермент терял такую способность. Углеводы также ингибировали образование димеров, что привело авторов [109,110] к мысли о существовании углевод-связывающего центра в составе N-домена АПФ, вовлеченного в процесс димеризации. Образование димеров происходит за счет взаимодействия углевод-связывающего центра N-домена одной молекулы АПФ с углеводными цепями другой молекулы фермента. Таким образом, АПФ может рассматриваться как белок с лектиноподобными свойствами. Этот центр не влияет на каталитическую активность АПФ, но может оказывать влияние на структурное состояние фермента. В клеточных мембранах углевод-связывающий центр АПФ может отвечать не только за димеризацию белка, но и за взаимодействие АПФ с другими гликопротеинами.

Авторы работы [110] локализовали углевод-связывающий центр на поверхности молекулы АПФ с помощью панели из 7 мАт к N-домену АПФ. Все антитела характеризовались высокой аффинностью по отношению к ферменту.

Точное эпитопное картирование показало, что этот углевод-связывающий центр находится в области перекрытия эпитопов связывания мАт 9В9 и 3G8 [13]. Было показано, что мАт 9В9 и 3G8 отменяют димеризацию N-домена в обращенных мицеллах [110], а связывание этих мАт на поверхности клеток СНО, продуцирующих рекомбинантный человеческий сАПФ, усиливает эффективность шеддинга АПФ (в случае мАт 9В9) [169] и, наоборот, снижает (в случае мАт 3G8) [171]. Эти результаты позволили высказать предположение о том, что два процесса – димеризация АПФ на поверхности клеточных мембран и шеддинг фермента – могут быть связаны друг с другом [13,110].

В работе [13] было проведено точное определение эпитопов связывания двух мАт 9В9 и 3G8, а также мАт i1A8, не влияющего на шеддинг и димеризацию АПФ. Анализ эпитопов связывания этих трех мАт, специфичных к N-домену АПФ, позволил определить остатки Q18, L19, Q22 и N25, расположенные в области перекрытия эпитопов связывания мАт 9В9 и 3G8, важные для связывания мАт 3G8, но не 9В9. Направленный мутагенез этих остатков привел к увеличению шеддинга мутантных форм АПФ sACEQ18H, sACEL19E и sACEQ22A, что позволило предположить, что этот участок фермента играет важную роль при шеддинге. Известно, что шеддазы взаимодействуют с участком, находящимся на отдалении от сайта шеддинга, чтобы облегчить удаление их субстратов с мембраны [172], поэтому возможно, что найденная область N-домена вовлечена в контакт между сАПФ и его шеддазой, либо этот сайт участвует в димеризации АПФ, что впоследствии влияет на шеддинг. Авторы [13]

полагают, что взаимная ориентация N- и C-доменов в составе сАПФ может иметь регуляторную роль при шеддинге. Это могло бы объяснить, почему тАПФ срезается с поверхности клеток гораздо быстрее, чем сАПФ [60,69]. Интересно отметить, что мутагенез остатков Q18, L19 и Q22 никак не повлиял на эффективность шеддинга в присутствии мАт 9В9 и 3G8, следовательно, в механизм шеддинга включено большее количество аминокислотных остатков.

3.2.2. Исследование каталитической активности N-домена ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител

Выявление моноклональных антител к различным эпитопам молекулы АПФ, которые влияют на функции фермента, а также определение эпитопов связывания этих антител дают уникальную возможность детально изучать структуру АПФ.

В работе [10] было изучено влияние мАт 3А5 и i2Н5 на каталитические свойства АПФ. Было показано, что эти мАт ингибируют и сАПФ, и N-домен. Картирование эпитопов этих мАт показало, что эпитоп мАт i2Н5 располагается в области щели активного центра N-домена, что объясняло ингибирующее действие данного мАт: предполагалось, что мАт i2Н5, связываясь с ферментом, закрывает вход в активный центр. Но эпитоп мАт 3А5 располагался в другой части на поверхности N-домена по отношению к активному центру. Связывание мАт i2Н5 и 3А5 с N-доменом в присутствии лиганда в активном центре фермента как в растворе, так и с N-доменом сорбированным на поверхности полистиролового планшета, увеличивается, в 4 и 5 раз, соответственно. Эти данные могут свидетельствовать о возможных конформационных изменениях, к которым приводит связывание молекулы лиганда в активном центре фермента, и, как следствие, антитела связываются с поверхностью белка лучше.

Для гомолога АПФ – АПФ 2, структурного гомолога нейролизина [173,174] и др. уже были расшифрованы кристаллические структуры в присутствии и в отсутствие лиганда в активном центре и было продемонстрировано, что щель активного центра может существовать в открытой в отсутствие лиганда и в закрытой конформации в присутствии лиганда в активном центре фермента, поэтому авторы предположили, что и АПФ может существовать в открытой и закрытой конформациях. По гомологии с АПФ 2 была построена открытая конформация N-домена, выявлены подвижные части молекулы фермента при движении открывания-закрывания и проанализировано расположение эпитопов связывания мАт 3А5 и i2Н5 на поверхности обеих конформаций N-домена относительно подвижных частей молекулы. Оказалось, что в эпитопы связывания мАт i2Н5 и 3А5 входят участки

молекулы, которые являются подвижными при движении открывания-закрывания щели активного центра, чем может объясняться ингибирующее действие данных мАт.

На основе полученных данных авторы сделали вывод о том [10], что N-домен, как и АПФ 2, существует в открытой конформации в отсутствие лиганда в активном центре и в закрытой в присутствии лиганда в активном центре N-домена.

В работе [12] авторы смоделировали открытую конформацию N-домена и очертили эпитоп мАт 5F1, и оказалось, что эпитоп связывания этого антитела находится в области щели активного центра, таким образом, это антитело должно обладать ингибиторными свойствами. Действительно, при больших концентрациях 5F1, это антитело слабо ингибирует активность фермента.

3.2.3. Изучение конформационных изменений соматического ангиотензин-превращающего фермента при взаимодействии с ингибиторами

Показано, что мАт 1G12 и 6A12, специфичные к N-домену АПФ, обладают небольшой ингибирующей способностью при гидролизе трипептидных субстратов N-доменом D629 [9], представляющим собой N-домен и 17 аминокислотных остатков C-домена, в то время как ингибирования гидролиза этих субстратов соматическим АПФ не наблюдалось. Сравнение связывания мАт 1G12 и 6A12 с N-доменом АПФ и двудоменным АПФ показало, что данные антитела связываются с полноразмерным ферментом гораздо хуже, чем с N-доменом. Авторы это объясняют возможным экранированием эпитопов связывания данных мАт на поверхности N-домена C-доменом в составе полноразмерного фермента. Исследование влияния ингибитора АПФ эналаприлата на связывание данных антител с N-доменом и соматическим АПФ показало, что мАт 1G12 и 6A12 в присутствии ингибитора связываются с соматическим АПФ гораздо лучше, чем в отсутствие, при этом присутствие ингибитора не влияет на связывание данных мАт с N-доменом. Это, скорее всего, объясняется некоторыми конформационными изменениями молекулы фермента при связывании ингибитора в активном центре, при этом происходит подвижка доменов друг относительно друга таким образом, что эпитопы связывания данных антител становятся более доступными [9]. Основываясь на том, что связывание мАт 1G12 и 6A12 с АПФ из крови резко возрастает, авторы предлагают использовать мАт 1G12 (или 6A12) для определения ингибиторов АПФ в крови наряду с определением активности АПФ по двум субстратам [54]. Поскольку уровень АПФ в крови пациентов может сильно варьироваться (до 5-ти кратной разницы для 95% популяции [175]), абсолютные значения сигналов, полученных при преципитации этих мАт, могут оказаться непоказательными. Напротив, использование соотношения сигналов

1G12/9B9 позволяет исключить вариабельность активности АПФ в популяции, что позволяет получить параметр, стабильный для здоровой популяции. Данный метод позволил определить эналаприлат, рамиприлат, лизиноприл и каптоприл в крови пациентов в концентрации до 0,03 нМ.

3.3. Исследование структуры и функционирования ангиотензин-превращающего фермента с помощью моноклональных антител к С-домену

Работа с мАт к С-домену АПФ началась совсем недавно. Из-за большей иммуногенности и стабильности N-домена при иммунизации животных АПФ человека вырабатывались антитела только на N-домен и антитела к С-домену получить не удавалось. В литературе мАт к С-домену АПФ впервые упоминаются в работе [14], в которой было получено мАт 1В3 к тАПФ человека и с помощью ELISA было показано, что данное мАт специфично к нативному тАПФ. Также было показано, что мАт 1В3 связываются с растворимой формой тАПФ и соматического АПФ, в то время как с мембранными формами тАПФ и сАПФ или тАПФ и сАПФ, иммобилизованными на пластике, связывание практически отсутствует. В то же время преципитация сАПФ, в котором N-домен был удален, была похожей, если не идентичной, для растворимой и мембранносвязанной форм. Это предполагает, что N-домен или высоко О-гликозилированная область (36 аминокислотных остатков) на N-конце тестикулярного АПФ препятствуют связыванию антител 1В3 с С-доменом. Известно, что, связывание антител 1В3 с С-доменом АПФ, имеющим мутацию Pro1199Leu, уменьшается в 2,5 раза [14]. Было обнаружено, что данная мутация, наблюдаемая в некоторых здоровых семьях, ведет к увеличению шеддинга АПФ с клеточных мембран, а, следовательно, и к повышенному уровню АПФ в крови [108]. Известно, что при некоторых заболеваниях в крови человека наблюдается повышенный уровень АПФ [176,177]. мАт 1В3 могут использоваться для дискриминации мутации Pro1199Leu АПФ, тем самым позволяя отрицать развитие патологий, сопровождающихся увеличенным уровнем АПФ в крови [178].

Основная работа по определению эпитопов связывания мАт к С-домену АПФ была проведена совсем недавно. В 2008 году в работе [15] были определены эпитопы связывания всех 8 мАт, специфичных к С-домену АПФ. Для того чтобы определить, сколько антигенных областей покрывают исследуемые мАт, исследовали конкурентный характер взаимодействия антител друг с другом за связывание с тАПФ. Оказалось, что на поверхности тАПФ можно выделить три непересекающиеся антигенные области, отвечающие за связывание исследуемых антител (рис. 15). Примечательно, что пары мАт 1В8 и 3F10, 1Е10 и 4Е3, 2Н9 и

3F11 распознавали сильно перекрывающиеся, но не идентичные эпитопы на поверхности тАПФ. Для определения областей локализации эпитопов некоторых мАт сравнивали эффективность связывания мАт с сАПФ крови макаки, шимпанзе и человека. Так, мАт 1В8, 3F10 и 1Е10 не связывались с АПФ из крови шимпанзе (K677 и P730 - единственные аминокислотные остатки, отличающие С-домены сАПФ человека и шимпанзе). Сравнение связывания этих мАт с АПФ из почек и легких человека позволило предположить (основываясь на разнице в связывании и, предположительно, разном гликозилировании), что эпитопы мАт 1В8 и 3F10 находятся рядом с остатком P730. Поскольку мАт 1Е10 не конкурирует за связывание с мАт 1В8 и 3F10, логично предположить, что эпитоп его связывания располагается вблизи остатка K677.

Для определения аминокислотных остатков, критичных для связывания панели мАт сравнивали связывание этих мАт с тАПФ и различными химерами и мутантными формами фермента. Например, замена D616G привела к значительному снижению связывания мАт 2Н9 и 1Е10. Анализ кристаллической структуры С-домена (PDB:1O86)[17] позволил заключить, что остатки D616 и K677 находятся недалеко друг от друга на N-конце С-домена. Таким образом установили, что мАт 1Е10 узнает N-концевой участок С-домена.

Интересно отметить, что удаление уникальной для тАПФ N-концевой 36-аминокислотной последовательности никак не сказалось на связывании всех протестированных мАт, что указывает на то, что этот участок не критичен для связывания всех мАт к С-домену. Однако удаление первых 59 аминокислот привело к тому, что все протестированные мАт перестали связываться с таким ферментом, хотя он и сохранял при этом каталитическую активность при гидролизе синтетического субстрата ZPHL. Отмена связывания всех мАт указывает на то, что конформация этого фермента изменилась критически. Анализ связывания панели мАт с соматическим и тестикулярным АПФ с трансмембранным якорем и без него показал, что связывание мАт 1В8 и 3F10 с сАПФ изменяется значительно сильнее, чем с тАПФ. Это значит, что трансмембранный якорь влияет на конформацию сАПФ, но не тАПФ.

Анализ связывания панели мАт с сАПФ из крови, легких, почек и семенной жидкости показал, что связывание всех используемых мАт различно с ферментами из разных тканей. Эти данные указывают на то, что мАт очень чувствительны к гликозилированию и сиалированию (для АПФ крови) фермента. Кроме того, анализ гликомутантов С-домена с заменой Asn на Gln, предотвращающей гликозилирование, показал, что связывание ряда мАт при этом сильно изменилось. В частности, замена Asn731Gln привела к почти полной отмене связывания мАт 1В8 и 3F10, а замена Asn666Gln привела, наоборот, к повышению

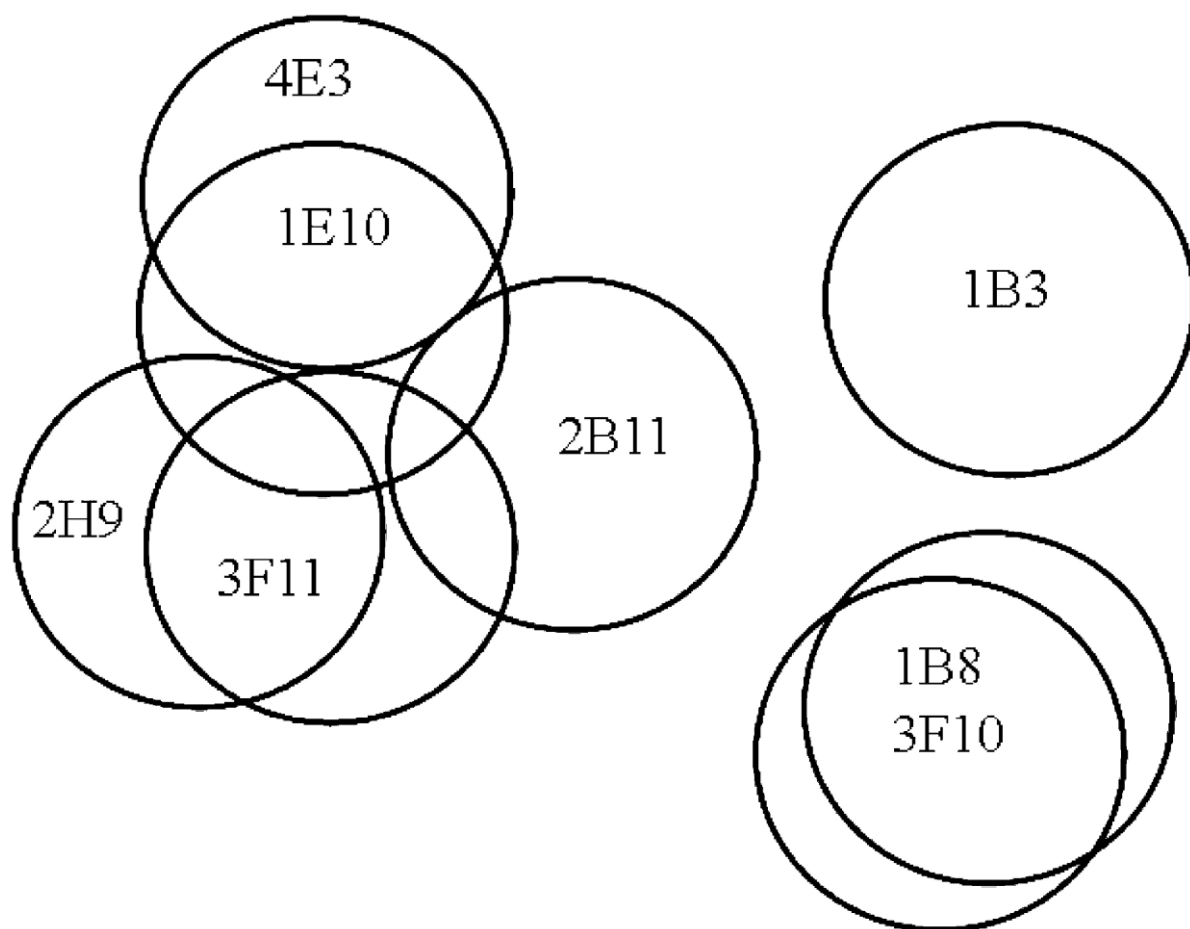


Рис. 15. Диаграмма, отражающая взаимное пространственное расположение эпитопов на поверхности С-домена АПФ[15].

связывания мАт 1E10 и 4E3 с перекрывающимися эпитопами связывания. Полученные данные еще раз подчеркивают значимость гликозилирования для связывания мАт.

Анализ эффективности связывания мАт с сАПФ, экспрессированным на поверхности СНО-клеток, показал, что мАт 1B3, 1B8, 3F10 и 1E10 не связываются с таким ферментом, что подтверждает то предположение, что эпитопы связывания этих мАт расположены с С-конца С-домена, и следовательно, экранированы поверхностью клетки. Из всех протестированных антител мАт 4E3 связывалось с сАПФ на поверхности клеток наиболее эффективно, благодаря чему является наиболее удобным кандидатом для использования в проточной цитометрии и количественном определении АПФ на поверхности клеток [179]. Это особенно важно, поскольку недавно было установлено, что АПФ не только является маркером дифференциации дендритных клеток [36], но и маркером гематopoэтических стволовых клеток в эмбриональных и взрослых гематopoэтических тканях [180].

Таким образом, были локализованы эпитопы связывания 8 мАт к С-домену АПФ (рис. 16), что в совокупности с уже известными эпитопами связывания 8 других мАт

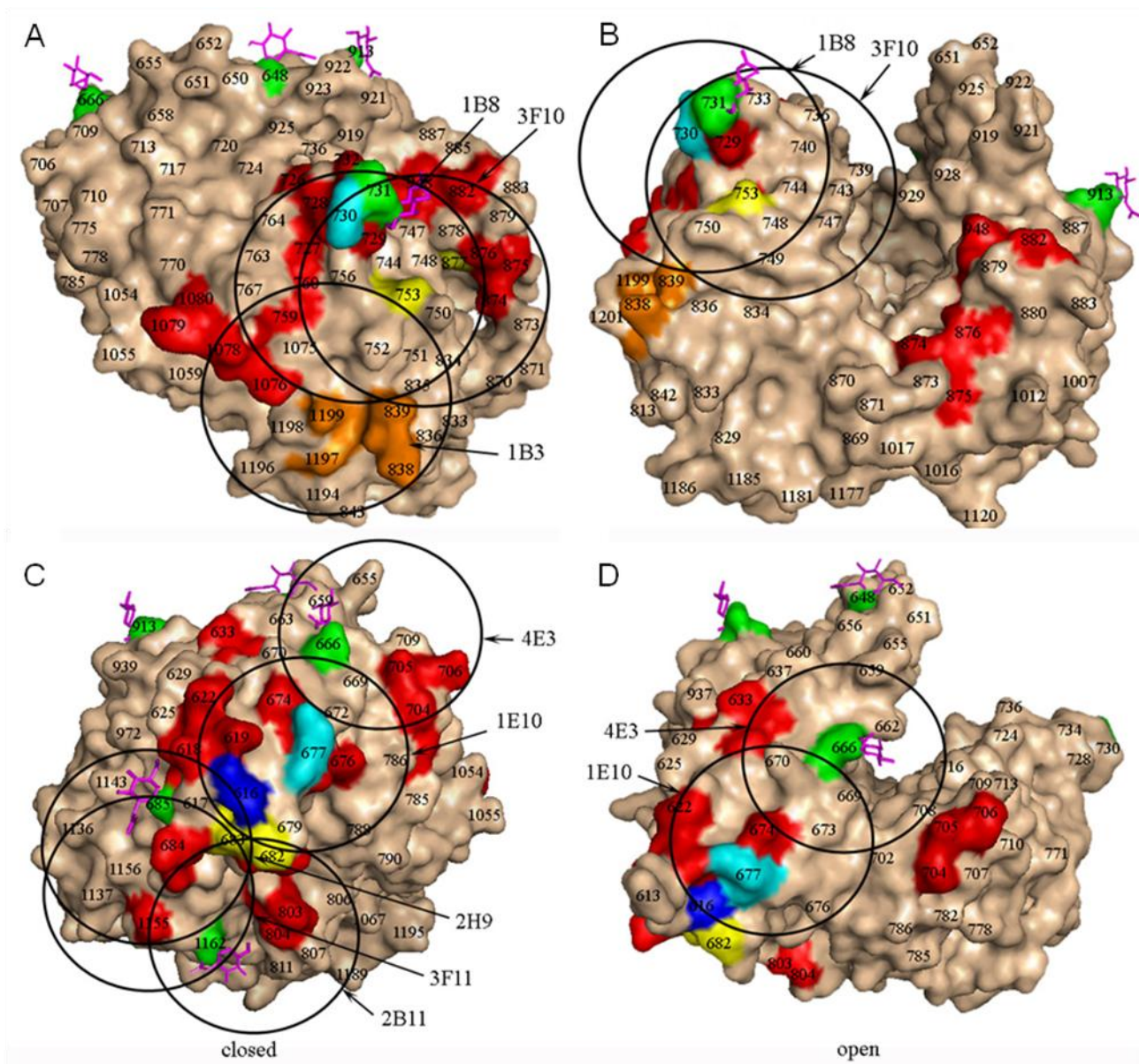


Рис. 16. Расположение эпитопов мАт на поверхности С-домена АПФ в закрытой (А, С) и открытой (В, D) конформациях [15].

к N-домену АПФ [9–13] открывает путь к использованию панели мАт для структурных исследований АПФ. В частности, как отмечалось выше, это было использовано для построения модели двудоменного АПФ [15]. В целом, мАт зарекомендовали себя как удобный и очень точный инструмент, позволяющий определять даже очень малые изменения конформации фермента. Поэтому область применения мАт простирается от фундаментальных исследований структурно-функциональных особенностей фермента (исследование шеддинга АПФ [169,171], определение мутантов [181] и ингибиторов [14] АПФ) до клинического применения, в частности, для определения ингибиторов АПФ в крови [9] и диагностики саркоидоза [16].

В настоящее время известны структуры отдельных N- и C-доменов АПФ, и поверхность этих структур в значительной степени охарактеризована расположением эпитопов связывания ряда мАт. Однако структура двудоменного фермента неизвестна, имеются лишь модели, описывающие вероятное взаимное расположение доменов в составе сАПФ. С другой стороны, известно, что механизм взаимодействия активных центров в составе АПФ 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. Логично предположить, что связывание в активном центре АПФ лигандов разной структуры может приводить к различным изменениям конформации АПФ, которые могут являться базой наблюдаемой или не наблюдаемой отрицательной кооперативности. В поддержку этого можно сказать, что недавно с помощью 2 мАт к N-домену было показано, что связывание таких коммерческих ингибиторов АПФ, как каптоприл, лизиноприл и эналаприлат (являющихся синтетическими аналогами ди- и трипептидов) изменяет участок поверхности N-домена, на котором располагаются эпитопы связывания этих мАт. Для C-домена и других участков поверхности N-домена такой информации нет.

Данная работа явилась продолжением изучения структурно-функциональных свойств фермента и посвящена определению влияния экзогенных и эндогенных эффекторов (в том числе ингибиторов различной структуры) на конформацию АПФ на обоих доменах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Материалы

В работе были использованы следующие соединения:

ферменты и белки

соматическая форма ангиотензин-превращающего фермента (сАПФ) в составе семенной жидкости, любезно предоставленной д.м.н., проф. Евдокимовым В.В. (отдел андрологии НИИ Урологии МЗ РФ) и сыворотки (либо плазмы) крови человека, в том числе плазмы крови больных уреимией, любезно предоставленных доцентом Шилов В.Ю. (кафедра нефрологии ФПДО МГМСУ им. Евдокимова);

очищенный сАПФ из семенной жидкости

тестикулярный АПФ (тАПФ) из сперматозоидов человека;

N-домен АПФ человека, полученный ограниченным протеолизом соматического АПФ.

рекомбинантный С-домен АПФ человека и рекомбинантный N-домен АПФ человека (D629, описан в [9] и представляет собой полный N-домен (остатки 1-612) и еще 17 аминокислот интердоменного линкера), продуцируемые СНО-клетками китайских хомячков, в составе культуральной жидкости любезно предоставлены д.б.н. Даниловым С.М. (University of Illinois, Chicago).

тестикулярная форма АПФ (описана как tACEΔ36NJ в [182]) содержит аминокислотные остатки 642-1203 (нумерация по соматическому АПФ) и не содержит N-концевую последовательность из 36 аминокислот, характерную только для тестикулярного АПФ;

панель из 8 моноклональных антител (мАт) мыши против С-домена соматического АПФ человека (1B3, 1B8, 3F10, 1E10, 4E3, 2H9, 3F11 и 2B11) и 9 мАт мыши против N-домена человека (9B9, BB9, 3A5, i1A8, 3G8, i2H5, 1G12, 6A12 и 5F1) - любезно предоставлены д.б.н. Даниловым С.М.;

антивидовые антитела козы, специфичные к IgG мыши –производства фирмы «Имтек» (Россия);

набор стандартных белков (миозин, β-галактозидаза, фосфорилаза *b*) для DsNa-электрофореза – производства фирмы «Sigma» (США);

трипсин – препарат фирмы «Promega» (США);

субстраты АПФ

N^α-3-(2-фурил)-акрилоил-L-фенилаланил-глицил-глицин (FA-Phe-Gly-Gly, FPGG) – производства фирмы «Sigma» (США);

N-карбобензоксид-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин (Cbz-Phe-His-Leu, ZPHL) и гиппурил-L-гистидил-L-лейцин (Hip-His-Leu, NHL) – производства фирмы «Bachem» (США);

Ангиотензин I (L-аспарагил-L-аргинил-L-валил-L-тирозил-L-изолейцил-L-гистидил-L-пролил-L-фенилаланил-L-гистидил-L-лейцин (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) – производства фирмы «American Peptide» (США);

пептиды-стандарты

L-гистидил-L-лейцин (His-Leu, HL) – производства фирмы «Sigma» (США);

ингибиторы АПФ

Лизиноприл, (S)-N^α-(1-карбоксит-3-фенилпропил)-L-лизил-L-пролин – производства фирмы «Sigma» (США);

Эналаприлат, (2S)-1-[(2S)-2-[[1(1S)-1-карбоксит-3-фенилпропил]амино]пропаноил]пирролидин-2-карбоновая кислота - в виде раствора для инъекций в концентрации 1,25 г/л – производства фирмы «KRKA» (Словения);

Тепротид, 5-оксо-L-пролил-L-триптофанил-L-пролил-L-аргинил-L-пролил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-пролил-L-пролин (pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro) – производства фирмы «American Peptide» (США);

Основы для буферов

Трис (Tris) – трис-(гидроксиметил)аминометан – производства фирмы «Sigma», США;

Хепес (Hepes) – N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N-(2-этансульфоновая кислота) – производства фирмы «Sigma», США

детергенты

Тритон X-100, октилфенилполи-(9-10)-этиленгликоль – производства фирмы «Ferak» (Германия);

додецилсульфат натрия (Ds-Na) – производства фирмы «Serva» (Германия);

Tween-20 – производства фирмы «Sigma», США.

другие реактивы

фенилметилсульфонилфторид (PMSF) – производства фирмы «Boehringer Mannheim»;

N,N'-метиленисакриламид, β-меркаптоэтанол, персульфат аммония, дитиотреитол (DTT) – производства фирмы «Reanal» (Венгрия);

N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД) – производства фирмы «Bio-Rad» (США);

глутатион восстановленный (GSH), глутатион окисленный (GSSG), DTNB (5,5'-дителио-бис(2-нитробензойная кислота)), метилглиоксаль (MG) – производства фирмы «Sigma», США;

гуанидин хлорид (Gu*HCl) – производства фирмы «Fluka» (США);

кумасси бриллиантовый синий G-250 – производства фирмы «Fluka» (США);

метанол – производства фирмы «Merck» (Германия);

орто-фталевый альдегид – производства фирмы «Koch-Light» (Великобритания);

ацетонитрил, перегнанный с P₂O₅ над K₂CO₃;

остальные реактивы и соли – отечественного производства марки ос. ч. и х. ч.

4.2. Методы

4.2.1. Выделение и очистка соматического ангиотензин-превращающего фермента

Все операции по выделению фермента проводили при 4°.

Соматический ангиотензин-превращающий фермент (сАПФ) человека из семенной жидкости очищали до гомогенного состояния аффинной хроматографией [183]. Образец спермы объемом 100 мл центрифугировали в течение 30 мин. при 2000 g на центрифуге «Beckman J-21» (США). Осадок использовали для выделения тестикулярного АПФ, а супернатант наносили на колонку (2,6 × 15 см) с аффинным сорбентом (лизиноприл-сефарозой), уравновешенным 50 мМ фосфатным буфером, pH 7,5, содержащим 150 мМ NaCl, 1 мкМ ZnCl₂ (буфер А), со скоростью 12 мл/ч/см². Промывали колонку буфером А до окончания вымывания балластных белков (150 мл), затем элюировали фермент при той же скорости элюции 80 мл 0,05 М боратного буфера, pH 9,5. В собранных фракциях по 2 мл измеряли активность АПФ по скорости гидролиза синтетических субстратов FPGG, ZPHL и NHL.

4.2.2. Выделение и очистка тестикулярного ангиотензин-превращающего фермента

Осадок (сперматозоиды) промывали 2 раза физиологическим раствором, содержащим 0,1 мМ PMSF (фенилметансульфонилфторид), предварительно растворенного в ацетоне, и центрифугировали в течение 30 мин. при 2000 g на центрифуге «Beckman J-21» (США). К осадку добавляли 50 мл буфера А, содержащего 0,5% тритона X-100 и 0,1 мМ PMSF, и оставляли перемешиваться на механической мешалке в течение ночи при +4°С. Затем смесь центрифугировали в течение 20 мин. при 30000 g, осадок отбрасывали, а супернатант

подвергали аффинной хроматографии, как описано выше.

4.2.3. Получение N-домена соматического ангиотензин-превращающего фермента

Раствор соматического фермента, очищенного ранее из почек человека, концентрировали в ячейке “Amicon” (Голландия) с мембраной YM-30 до конечной концентрации 0,25 мг/мл. Частичную денатурацию белка проводили в щелочной среде по методу [107], для этого доводили pH раствора до 11,2 с помощью 1 н. NH₄OH и инкубировали при 25° в течение 4 ч. Полученный раствор диализовали против 50 mM Tris-HCl-буфера, pH 8,0, содержащего 1 mM CaCl₂, и инкубировали с трипсином (1 мг трипсина на 1 мг АПФ) в течение 36 ч при 37°. Протеолиз АПФ под действием трипсина останавливали добавлением PMSF (10-кратный избыток в ацетоне).

4.2.4. Определение концентрации и чистоты выделенных препаратов фермента

Чистоту всех полученных препаратов АПФ контролировали по результатам Ds-Na-электрофореза. Электрофорез проводили в 7,5% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% Ds-Na и 0,1% β-меркаптоэтанола по методу Лэмли [184]. Для окрашивания белков использовали Кумасси бриллиантовый синий G-250.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по величине оптической плотности при 260 и 280 нм, при этом концентрацию белка рассчитывали по формуле (1) [185]:

$$C_{\text{белка}} \text{ (мг/мл)} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260} \quad (1)$$

При выделении АПФ фракции, содержащие активный фермент, объединяли, разливали в пластиковые пробирки, замораживали и хранили при -18° С.

4.2.5. Определение активности ангиотензин-превращающего фермента

За единицу активности (ед./л) принимали количество АПФ, гидролизующее 1 мкМ субстрата за 1 минуту в заданных условиях.

Определение активности АПФ проводили спектрофотометрически с использованием фурилакрилоил-замещенного субстрата FA-Phe-Gly-Gly по методике [186] на спектрофотометре 6405 UV (GenWay, США) с термостатируемым при 25°С кюветным отделением. В типичном эксперименте в спектрофотометрическую кювету помещали 980 мкл 0,1 mM раствора субстрата в буфере А, добавляли 20 мкл раствора фермента, перемешивали реакционную смесь и регистрировали скорость уменьшения оптической плотности при 328 нм.

Определение активности ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) при гидролизе субстратов His-Leu, Z-Phe-His-Leu и ангиотензина-I проводили по методике [187], модифицированной нами для работы на флюориметрическом ридере Tecan Infinite M-200 (Австрия). При определении активности АПФ в составе биологических жидкостей (сыворотки/плазмы крови или семенной жидкости) в пластиковые пробирки помещали по 100 мкл раствора субстрата (5 мМ His-Leu, 2 мМ Z-Phe-His-Leu или 0,35 мМ ангиотензина-I) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 8,3, содержащем 0,3 М KCl, 1 мкМ ZnCl₂ (буфер Б), добавляли по 20 мкл раствора фермента, перемешивали реакционную смесь и инкубировали при 37°C. Время реакции и концентрацию фермента предварительно подбирали таким образом, чтобы глубина гидролиза не превышала 2%. Для этого плазму крови разбавляли в 5 раз, а семенную жидкость в 2000 раз и вели реакцию 1 час при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 н. NaOH, вносили 10 мкл 0,2% орто-фталового альдегида, растворенного в метаноле, выдерживали 10 мин и добавляли 20 мкл 6 н. HCl. После добавления HCl полученную смесь центрифугировали в течение 1 мин при 10000 g для отделения белкового осадка. Супернатант переносили в ячейки 96-луночного полистирольного планшета и измеряли флюоресценцию образованного аддукта продукта ферментативной реакции His-Leu с орто-фталовым альдегидом при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны эмиссии 500 нм. Фоновую флюоресценцию измеряли так же, но фермент вносили после добавления NaOH к раствору субстрата. Стандартную флюоресценцию измеряли аналогично, для чего готовили по 120 мкл His-Leu в концентрациях 0,01, 0,03 и 0,05 мМ. Вносили 50 мкл 1 н. NaOH и 10 мкл 0,2% орто-фталового альдегида, растворенного в метаноле, выдерживали 10 мин и добавляли 20 мкл 6 н. HCl.

При определении активности АПФ в биологических жидкостях определяли также возможное тушение флюоресценции аддукта в присутствии высоких концентраций белка следующим образом: к 100 мкл 0,03 мМ стандартного раствора His-Leu в буфере Б добавляли 20 мкл биологической жидкости (разбавленной так же, как и для определения активности), 50 мкл 1 н. NaOH, затем вносили 10 мкл 0,2% орто-фталового альдегида, выдерживали 10 мин и добавляли 20 мкл 6 н. HCl. Полученный сигнал флюоресценции сравнивали с сигналом флюоресценции стандарта в отсутствие биологической жидкости (вместо нее вносили аналогичный объем буфера Б). Полученные данные учитывали при измерении флюоресценции в ходе дальнейших экспериментов.

Определение активности очищенного АПФ проводили на планшетах. Методика описана выше. При этом исходное содержание АПФ во вносимом растворе составляло 0,1 –

2 нМ (или 1 – 20 ед./л). Отдельно стоит отметить, что в данных условиях центрифугирование после добавления кислоты не нужно.

4.2.6. Подготовка пула плазмы крови

Для работы с плазмой (сывороткой) крови создавали пул из широкого набора образцов. Для того, чтобы исключить возможные случайные отклонения исследуемых параметров в пуле здоровых доноров от нормы, мы проводили скрининг всех полученных образцов сывороток крови по исследуемым параметрам – скоростям гидролиза синтетических субстратов ZPHL и HNL, а также по эффективности связывания мАт 1G12 и 9B9. Соотношение скоростей гидролиза ZPHL/HNL - это параметр, который в нормальной популяции значительно более стабилен ($100 \pm 3\%$) [54], чем активность АПФ при гидролизе любого из этих двух субстратов, которая отклоняется от среднего достаточно сильно ($100 \pm 30\%$) [175]. Так, в наборе из 48 сывороток здоровых доноров активность АПФ при гидролизе синтетического субстрата ZPHL отклонялась от среднего значения в 2,3 раза (рис. 17 А). Аналогичным образом, в 2,2 раза, изменялась эффективность связывания мАт 9B9 с АПФ из крови этих доноров (рис. 17 В). Таким образом, в крови этих доноров варьирует содержание АПФ. Высокая корреляция данных на рис. 17 А и В демонстрирует высокую точность в определении активности АПФ и при проведении иммуносорбции и подтверждает высокую вариабельность уровня АПФ в популяции [175]. В то же время, как было показано ранее в работе [54], при фиксированных условиях эксперимента (5 мМ ZPHL и 2 мМ HNL в буфере Б) соотношение скоростей гидролиза двух субстратов ZPHL и HNL под действием АПФ в составе плазмы (сыворотки) крови является очень стабильной величиной в популяции (рис. 17 С) и равно 1. Применение этого параметра позволяет с высокой точностью выявлять присутствие ингибиторов АПФ в среде, поскольку в присутствии ингибиторов параметр ZPHL/HNL возрастает [54]. Кроме того, как было установлено ранее в работе [9], в присутствии коммерческих ингибиторов (эналаприлат, каптоприл, лизиноприл) сильно возрастает связывание мАт 1G12 (к N-домену) с АПФ. Поэтому было решено использовать его наряду с ZPHL/HNL в качестве репера для отбраковывания из пула тех образцов, в которых могут присутствовать ингибиторы АПФ. При сравнении эффективности связывания любого мАт с АПФ в составе плазмы (сыворотки) крови нескольких индивидуумов важно принимать во внимание тот факт, что уровень АПФ в их крови может быть разным, а уровень сигнала при оценке эффективности связывания мАт с АПФ напрямую зависит от индивидуальной активности АПФ в крови донора. Поэтому для корректного сравнения необходимо использовать соотношение мАт/9B9 (благодаря

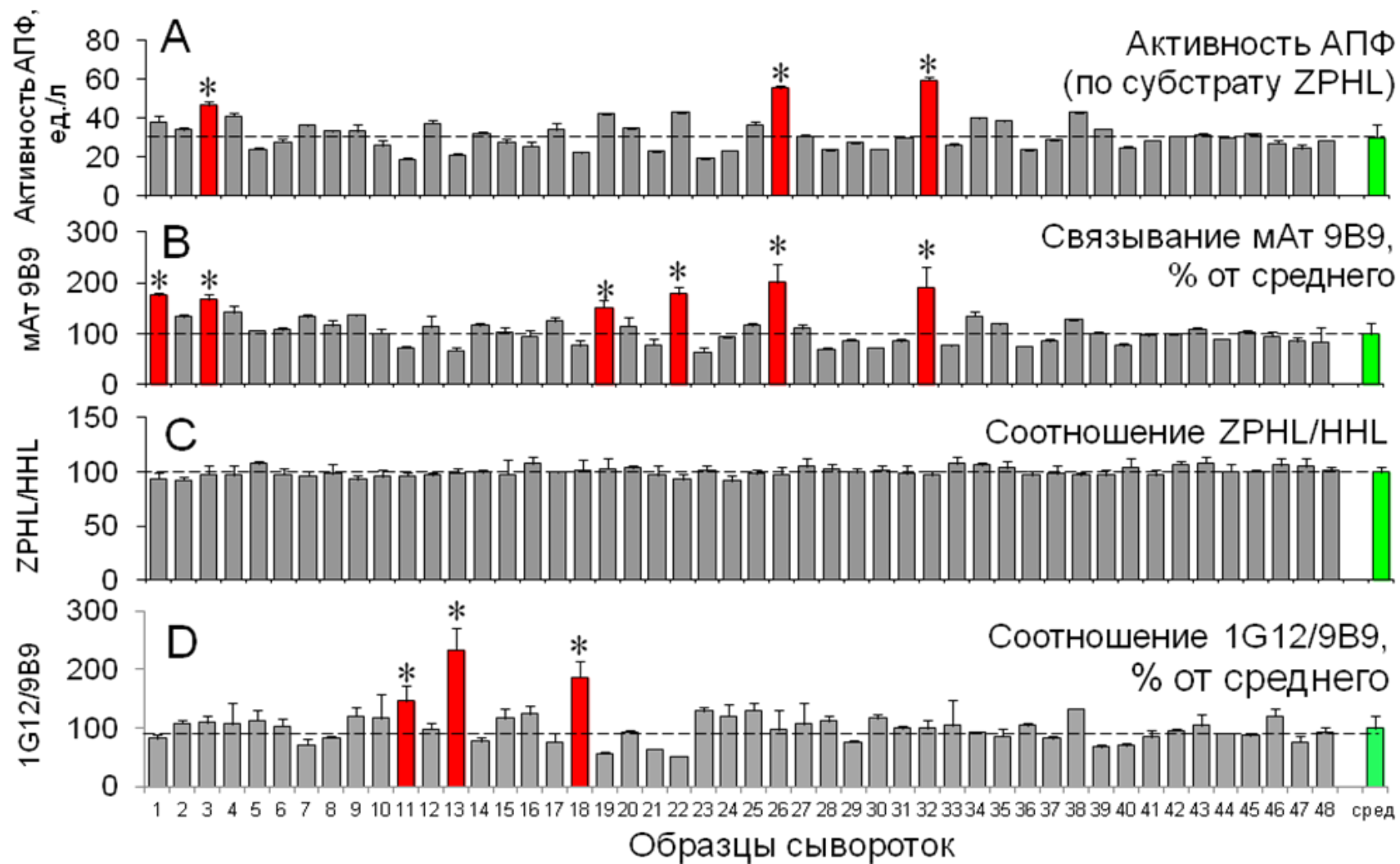


Рис.17. Формирование пула из набора сывороток крови здоровых доноров.

индифферентности мАт 9В9 к присутствию любых используемых в данной работе эффекторов) вместо прямого сравнения эффективности связывания данного конкретного мАт с АПФ в составе плазмы (сыворотки) крови разных индивидуумов (рис. 17 D).

Таким образом, два соотношения ZPHL/HNL и 1G12/9B9 были использованы для выявления и отбраковывания образцов плазмы (сыворотки) крови, содержащих ингибиторы АПФ. Отбрасывали образцы, в которых любой из параметров превышал среднее значение на величину в 2 стандартных отклонения и более. Остальные образцы объединяли в пул.

Аналогичный подход был использован при работе с плазмой крови пациентов с диагнозом уремия. Образцы плазм крови таких пациентов не объединяли в пул, а работали с каждым индивидуально.

4.2.7. Подбор оптимальных концентраций фермента и моноклональных антител для иммуносорбции

Для подбора оптимальных концентраций АПФ и мАт на поверхности лунок полистирольного планшета (Corning, США) иммобилизовали поликлональные антитела козла против иммуноглобулинов мыши в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,6, в концентрации 10 мкг/мл (50 мкл на лунку) в течение ночи при 4° С, затем раствор удаляли и промывали лунки буфером А, содержащим 0,05% tween-20. Затем в лунки добавляли по 50 мкл раствора мАт 1E10 или 2B11 в различных концентрациях (1, 3 или 10 мкг/мл) в буфере А. После инкубации в течение 1 ч. при 37°С лунки снова промывали и добавляли по 50 мкл очищенного тАПФ с активностью от 5 до 80 ед/л в том же буфере А. Инкубировали 2 ч. при 37°С, отмывали лунки, вносили по 100 мкл 5 мМ субстрата Hip-His-Leu в буфере Б и определяли активность связавшегося фермента, как описано выше. Время реакции подбирали таким образом, чтобы степень гидролиза субстрата не превышала 3%.

4.2.8. Определение констант связывания моноклональных антител с тестикулярным ангиотензин-превращающим ферментом

Константы связывания мАт 1B3, 1B8, 2H9 и 3F11 с тАПФ определяли методом иммуносорбции, описанным выше. Для этого в лунках планшета сорбировали поликлональные антитела козла против иммуноглобулинов мыши, затем мАт и, наконец, тАПФ из сперматозоидов в диапазоне концентраций 0,5-100 нМ и определяли значения флюоресценции продукта реакции при фиксированном времени гидролиза субстрата Hip-His-Leu. Расчет исходных концентраций активных молекул фермента проводили, пользуясь

уравнением Михаэлиса-Ментен и известными кинетическими параметрами гидролиза субстрата:

$$v = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0[S]_0}{[S]_0 + K_m} \quad (2)$$

Скорость ферментативной реакции в наших условиях определяется как $\Delta P/\Delta t$. Таким образом, подставляя в уравнение предварительно определенные величины кинетических параметров гидролиза субстрата, его исходную концентрацию и экспериментально определенное значение скорости реакции, рассчитывали исходные концентрации тАПФ.

Предварительно определяли кинетические параметры гидролиза субстрата Hip-His-Leu под действием тАПФ человека (с известной концентрацией активных молекул, определенной титрованием специфическим ингибитором лизиноприлом), варьируя концентрацию субстрата в реакционной среде в интервале $0,1-5K_m$ в буфере А. Полученные данные анализировали по методу Корниш-Боуден [188], для чего их представляли в координатах $[S]/v$ от $[S]$. Полученные значения кинетических параметров гидролиза субстрата Hip-His-Leu под действием тАПФ составили: $k_{\text{cat}} - 209 \pm 18 \text{ c}^{-1}$, $K_m - 0,92 \pm 0,17 \text{ mM}$.

Для расчета констант диссоциации комплексов мАт с тАПФ использовали F_i – измеряемые значения флюоресценции в ячейках микропланшета для каждой используемой концентрации тАПФ, F_f – значения флюоресценции мАт в отсутствие фермента (фоновая флюоресценция, нижнее плато полной кривой титрования) и F_b – значение флюоресценции при насыщающей концентрации фермента (верхнее плато полной кривой титрования).

Расчет концентраций комплекса тАПФ-мАт (C_b) проводили, используя значения флюоресценции для каждой экспериментальной точки с учетом эквимольного соотношения тАПФ:мАт = 1:1 в комплексе, а также исходя из допущения, что активность фермента не меняется при образовании комплексов с мАт.

Расчет общей концентрации мАт ($[mAt]_0$), связанных с поликлональными антителами козла против иммуноглобулинов мыши, проводили аналогично по значению флюоресценции F_b , исходя из того, что все мАт связаны в комплекс тАПФ-мАт при насыщающей концентрации фермента. Концентрацию свободного тАПФ, C_f , определяли по разнице общей концентрации фермента (т.е. концентрации тАПФ, вносимого в ячейку) и концентрации комплекса тАПФ-мАт (C_b).

Величины констант диссоциации комплексов тАПФ-мАт получали обработкой полученных данных в координатах Скэтчарда C_b/C_f от C_b в соответствии с уравнением:

$$\frac{C_b}{C_f} = -\frac{1}{K_{\text{дисс.}}} C_b + \frac{1}{K_{\text{дисс.}}} [\text{МАТ}]_0 \quad (3)$$

Константу диссоциации комплексов, $K_{\text{дисс.}}$, определяли как обратную величину тангенса угла наклона прямой в координатах Скэтчарда.

4.2.9. Изучение влияния ингибиторов АПФ на связывание моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом

Определение активности АПФ в присутствии ингибиторов проводили по методике, описанной выше. При этом раствор фермента предварительно инкубировали в смеси с ингибитором в течение 1 часа при 37°C.

Сравнительное определение связывания всех используемых в работе форм АПФ с моноклональными антителами (МАТ) в присутствии и в отсутствие ингибитора фермента проводили методом иммуносорбции следующим образом. В лунках планшета иммобилизовали поликлональные антитела козла против иммуноглобулинов мыши в течение 1 ч. при 37° С, промывали лунки буфером А, содержащим 0,05% tween-20, затем добавляли раствор МАТ (3 мкг/мл) в буфере А. После инкубации в течение 1 ч. при 37° С лунки снова промывали и добавляли по 50 мкл раствора АПФ (активностью от 0,1 до 2 ед/мл) в том же буфере, предварительно инкубированного с эналаприлатом (лизиноприлом) или тепротидом в течение 1 часа при 37°C. Концентрацию ингибиторов варьировали от 0 до 1 мкМ для эналаприлата (лизиноприла) и от 0 до 10 мкМ для тепротида. Планшет со смесью сорбируемого АПФ с ингибитором инкубировали в течение ночи при 4°C, и определяли активность АПФ, как описано выше, с использованием субстрата Z-Phe-His-Leu либо Hip-His-Leu, добавляя в каждую лунку по 100 мкл раствора субстрата.

4.2.10. Определение влияния модификаторов на связывание моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом

При работе со всеми эффекторами использовали пул плазмы. Для определения влияния различных эффекторов (GSH, GSSG, DTT, DTNB, MG, Cu^*HCl) на связывание МАТ с АПФ плазму крови разбавляли в 5 раз в буфере А, затем смешивали с раствором эффектора в соотношении плазма : эффектор = 9 : 1. Инкубацию с эффектором проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем проводили иммуносорбцию, как описано выше. Концентрацию каждого эффектора подбирали отдельно таким образом, чтобы в случае снижения активности АПФ получаемый сигнал флуоресценуии оставался

достоверным. Концентрация GSH, GSSG и Cu^*HCl составляла 5 мМ, DTT и DTNB – 3 мМ, MG – 1 мМ.

При определении влияния ингибиторов на модифицированный глутатионом фермент плазму крови инкубировали в присутствии глутатиона, как описано выше. Полученный таким образом модифицированный фермент в составе плазмы крови и аналогично разбавленную интактную плазму крови (образцы сравнения) инкубировали с эналаприлатом (100 нМ) или тепротидом (1 мкМ) еще 1 час при комнатной температуре. Иммуносорбцию проводили как описано выше.

4.2.11. Моделирование разрывов дисульфидных мостиков в N-домене ангиотензин-превращающего фермента

Моделирование разрыва S-S мостиков в N-домене АПФ проводили в рамках совместной работы с к.ф.н. И.В. Упоровым (Химический факультет МГУ). Для этого была использована структура открытой конформации N-домена, полученная ранее в работе [10]. Разъединение дисульфидных мостиков проводили с использованием модуля Homology программного комплекса Insight II (Accelrys Software Inc., San-Diego, USA). Для этого в каждом мостике заменяли связь Cys-Cys на связь Cys-H. После этого попеременно «замораживали» одну из половин глобулы N-домена и проводили оптимизацию геометрии другой половины молекулы в две итерации цикла по 500 шагов общей длительностью 50 пс.

Анализ аминокислот, участвующих в процессе «открывания» и «закрывания» активного центра АПФ был осуществлён с использованием программы DynDom, доступной по адресу <http://www.cmp.uea.ac.uk/dyndom/main.jsp>.

4.2.12. Влияние гемолиза на связывание моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом крови

Кровь из вены здорового индивида после отбора разделяли на две части объемом по 9 мл. Первую часть центрифугировали при 3000 об/мин (4000 g) в течение 10 минут при комнатной температуре на центрифуге Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifuge (производство США), сыворотку тут же отбирали и замораживали в аликвотах по 500 мкл. Ко второй части добавляли 50 мкл дистиллированной воды и сильно встряхивали, а затем помещали в соникатор «Elmasonic S15H» (производства фирмы «Elma», Германия) на 10 минут и оставляли на ночь при +4 °С. На следующий день кровь центрифугировали на центрифуге Eppendorf Minispin при 13000 об/мин (11000 g) в течение 5 минут при комнатной температуре. Полученный лизат отбирали и замораживали в аликвотах по 500 мкл. Далее

проводили иммуносорбцию лизата в сравнении с интактной сывороткой крови, как описано выше. Чтобы исключить возможное влияние каких-либо индивидуальных особенностей донора, эксперимент повторяли с кровью другого донора.

4.2.13. Статистическая обработка результатов

Для того, чтобы статистически подтвердить достоверность отличий анализируемых параметров (значений эффективности связывания мАт с АПФ, активности фермента и т.д.) от контроля, использовали U-критерий Манна-Уитни. Этот критерий используется для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо параметра, измеренного количественно, и позволяет выявлять различия в значении такого параметра между малыми выборками. Для статистического анализа результатов, полученных при работе с плазмой крови больных уреимией, дополнительно использовали двухвыборочный t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Критерий Стьюдента направлен на оценку различий величин средних значений двух выборок, которые распределены по нормальному закону, причем выборки могут быть не равны по величине. Последнее свойство позволило применить критерий Стьюдента для сравнения выборки пациентов, больных уреимией, с выборкой здоровых доноров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ ЧЕЛОВЕКА

В качестве С-домена АПФ использовали как природный фермент (тАПФ) из сперматозоидов (лизат), так и рекомбинантный. Возможность использования природного тАПФ определяется тем, что его уникальная N-концевая последовательность (36 аминокислот) не влияет на связывание исследуемых мАт (Данилов С.М., неопубликованные данные). Для работы был выбран метод иммуносорбции из-за его относительной простоты при проведении экспериментов. Но этот метод, однако, имеет ограничения: так как мы определяли связывание фермента с моноклональными антителами (мАт) по активности фермента, то следует учитывать, что если антитела являются ингибирующими, то результаты могут быть искажены, что необходимо учитывать при их обработке.

5.1. Подбор оптимальных условий для иммуносорбции

Подбор условий проводили с использованием тАПФ. В качестве субстрата использовали Hip-His-Leu (ННЛ), дающий при гидролизе продукт His-Leu (НЛ), накопление которого мы наблюдали флюориметрически. Сначала необходимо было определить оптимальные условия проведения реакции гидролиза субстрата. Работать необходимо в области линейного накопления продукта реакции гидролиза (начальная область кинетической кривой накопления продукта). Кроме того, необходимо убедиться в том, что отсутствует тушение флуоресценции продуктом. Для определения предельно допустимой концентрации продукта реакции гидролиза субстрата сняли градуировочную кривую зависимости сигнала флуоресценции от концентрации продукта реакции His-Leu (рис. 18). Оказалось, что при накоплении His-Leu свыше концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М (что соответствует 2% гидролиза ННЛ) наблюдается тушение флуоресценции. В дальнейшем время реакции подбирали таким образом, чтобы накопление продукта не превышало установленного порогового значения.

При проведении иммуносорбции, прежде всего, на плашке сорбировали вторичные антитела – иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши, затем мАт и тАПФ, выделенный из сперматозоидов. При этом была выбрана концентрация вторичных антител

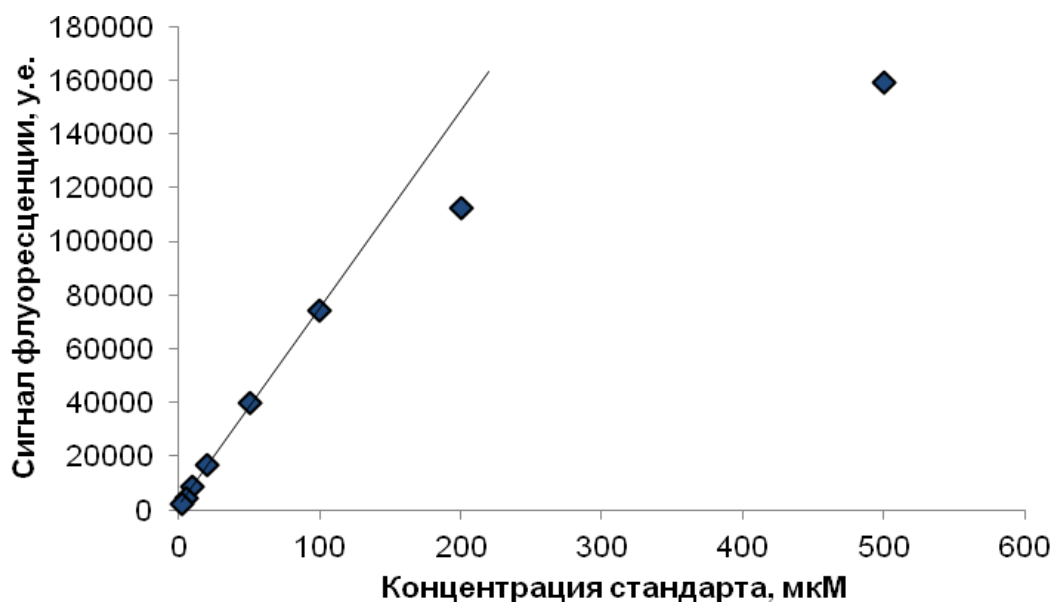


Рис. 18. Зависимость сигнала флуоресценции от концентрации His-Leu – продукта реакции гидролиза субстратов – NHL и ZPHL.

10 мкг/мл, которой, как показано ранее [11], достаточно, чтобы достичь насыщения лунок планшета, концентрации мАт и тАПФ варьировали. В первой серии экспериментов по подбору условий иммуносорбции использовали мАт 1E10.

На рис. 19 представлены кривые, показывающие зависимость величины флуоресценции от концентрации тАПФ при различных концентрациях мАт 1E10. Из полученных данных видно, что кривые, соответствующие разным концентрациям мАт, имеют квази-прямолинейный участок вплоть до 40 ед./л (6 нМ) фермента.

Из трех используемых в экспериментах по подбору условий концентраций антител для дальнейшей работы мы выбрали 3 мкг/мл, поскольку при этой концентрации мАт получаемые сигналы флуоресценции достаточно интенсивны и значительно превышают сигнал фона (в 10-80 раз), при этом можно избежать дополнительного расхода антитела (10 мкг/мл против 3 мкг/мл – практически в 3 раза).

Так как мАт 1E10 являются слабосвязывающимися [15], аналогичный эксперимент был проведен для других мАт, которые, как было показано ранее [15], являются сильносвязывающимися – мАт 2B11. Оказалось, что в случае этих мАт также на кривой зависимости активности тАПФ от концентрации фермента, вносимого в лунки планшета, наблюдается квазипрямолинейный участок вплоть до 40 ед./л (6 нМ) фермента. В дальнейших экспериментах все образцы ферментов использовали в концентрации 0,4-3 нМ (2,5-20 ед./л).

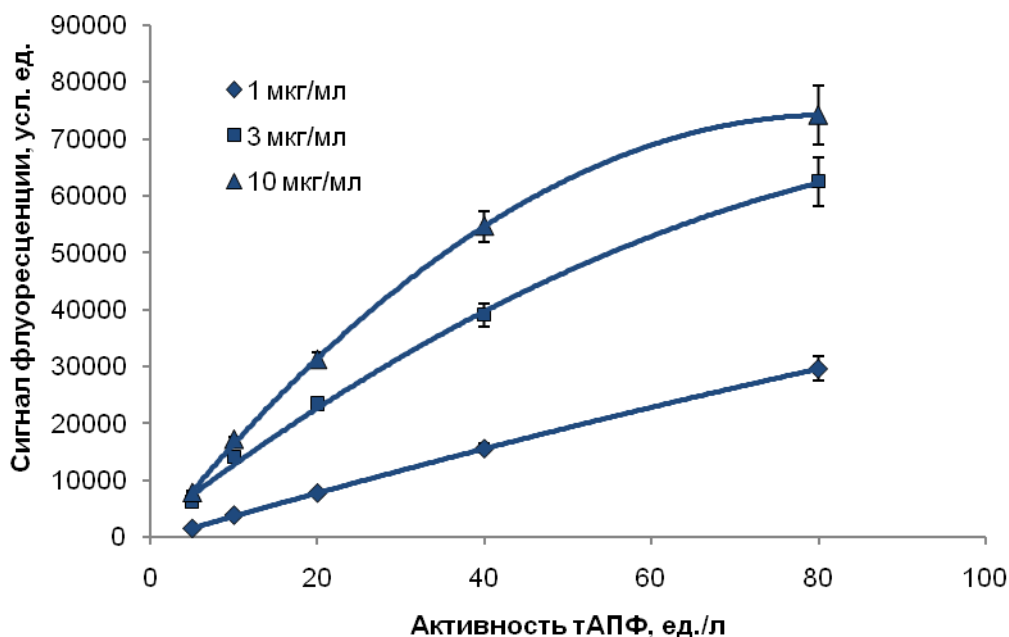


Рис.19. Зависимость комплексообразования тАПФ с иммобилизованными мАт 1Е10 от концентрации внесенного фермента при концентрациях мАт 1Е10 1, 3 и 10 мкг/мл.

5.2. Определение констант диссоциации комплексов моноклональных антител с тестикулярным ангиотензин-превращающим ферментом

Для количественной характеристики связывания мАт методом иммуносорбции были определены константы диссоциации комплексов тАПФ-мАт для некоторых мАт. На рис. 20 представлены результаты определения констант диссоциации комплексов нативный тАПФ-мАт 1В8, 2Н9, 3F11 и 1В3.

Полученные данные построены в координатах Скэтчарда, тангенс угла наклона каждой прямой соответствует обратному значению константы $K_{\text{дисс}}$, взятой с обратным знаком. Константа диссоциации комплексов нативный тАПФ-мАт для мАт 1В3 составила $1,9 \pm 0,2$ нМ, для мАт 1В8 – $4,1 \pm 0,5$ нМ, для мАт 2Н9 – $1,6 \pm 0,3$ нМ и для мАт 3F11 – $4,3 \pm 0,5$ нМ. Следует отметить, что константы диссоциации комплексов тАПФ-мАт, определенные в условиях, когда лиганд (мАт) иммобилизован на планшете, могут отличаться от констант диссоциации, определенных в растворе.

Ранее были определены константы диссоциации комплексов N-домена АПФ с мАт, специфичными к N-домену, которые составили для мАт i2Н5 $2,9 \pm 0,9$ нМ, для мАт 3А5 – $4,7 \pm 0,9$ нМ [10].

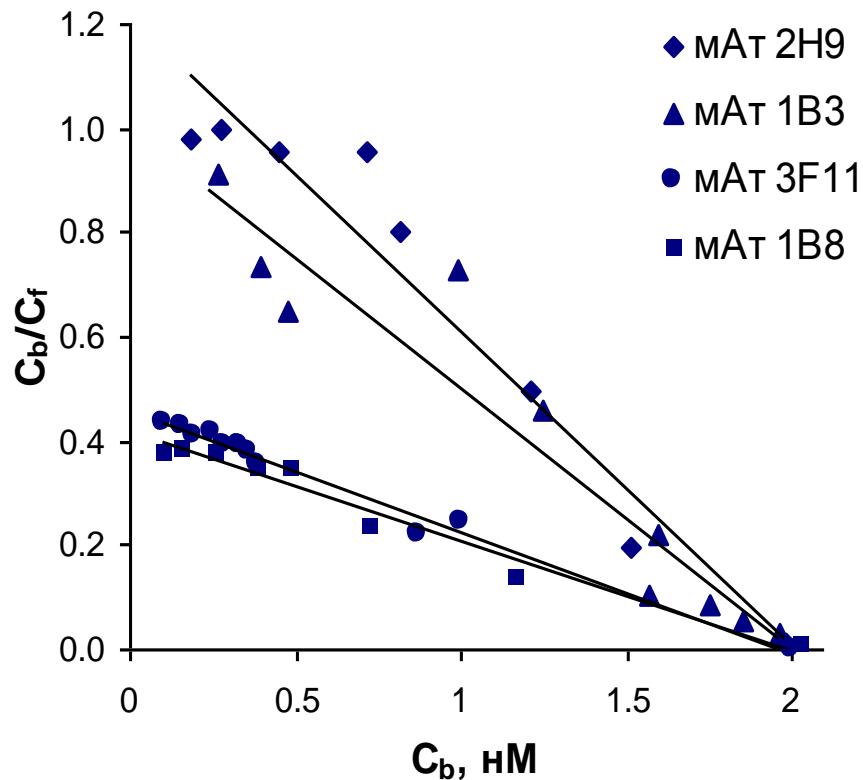


Рис. 20. Определение $K_{дисс}$ комплексов нативного тАПФ-мАт 1В3, 1В8, 2Н9 и 3F11.

5.3. Определение эффективности связывания панели моноклональных антител с различными формами соматического ангиотензин-превращающего фермента

Подобрав оптимальные условия иммуносорбции, определили сравнительное связывание мАт с сАПФ, для этого использовали фермент в составе сыворотки крови и в составе семенной жидкости. Результаты представлены на рис. 21.

Сигнал флюоресценции во всех случаях значительно превышал сигнал фона (в 3-50 раз), и значения флюоресценции были достоверны. В то же время полученные сигналы не достигали величин, при которых происходит тушение флюоресценции продуктом реакции.

Очевидно, что низкий сигнал флюоресценции свидетельствует о том, что мАт слабо связываются с АПФ, в то время как высокий сигнал флюоресценции, наоборот, свидетельствует о том, что мАт сильно связываются с АПФ. Такая картина связывания отражает разницу в константах связывания этих мАт с АПФ.

Интересно отметить, что полученные константы хорошо согласуются с данными, характеризующими эффективность связывания мАт с сАПФ в составе сыворотки крови (рис. 21 А). А именно, эффективность связывания мАт 1В8 и 3F11 одинаковая, и при этом ниже,

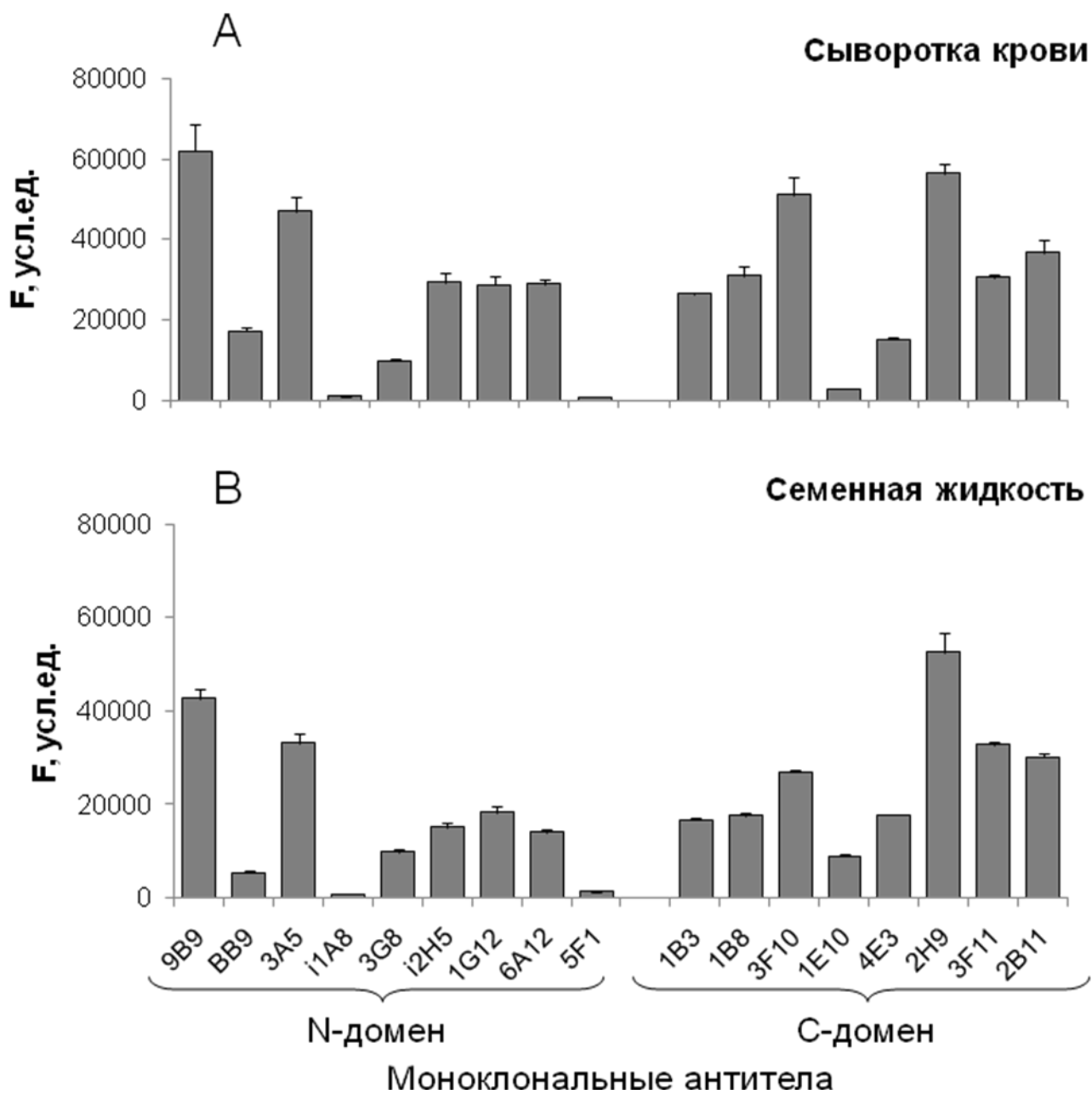


Рис. 21. Связывание панели мАт с N- и С-доменом сАПФ в составе сыворотки крови (А) и семенной жидкости (В). F – сигнал флюоресценции.

чем эффективность связывания мАт 2Н9. Эффективность связывания мАт 1В3 с сАПФ в составе сыворотки крови практически равна эффективности связывания двух других мАт с сАПФ крови - 1В8 и 3F11, что не соответствует константам, полученным для нативного тАПФ.

Из рис. 21 видно, что существуют отличия в относительном связывании мАт с АПФ из различных источников. Такая разница может быть обусловлена разницей в гликозилировании ферментов из разных источников. Однако не исключено, что эта разница может быть обусловлена также наличием в составе биологических жидкостей соединений, влияющих на связывание мАт с АПФ. Для проверки последнего предположения мы провели сравнительный анализ связывания панели мАт с очищенным сАПФ из семенной жидкости и с сАПФ в составе семенной жидкости. Результаты представлены на рис. 22.

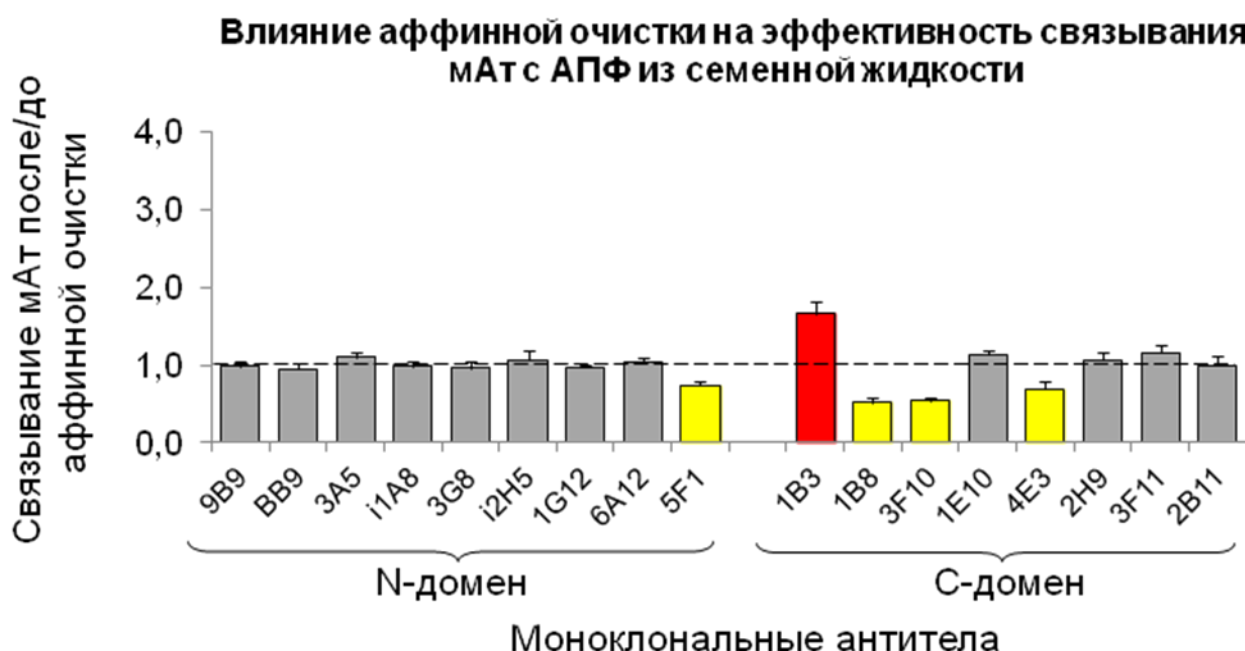


Рис. 22. Влияние аффинной очистки на связывание панели мАт с сАПФ из семенной жидкости.

Оказалось, что связывание панели мАт с сАПФ в составе биологической жидкости сильно отличается от связывания с очищенным сАПФ. А именно, понизилось связывание мАт 1В8, 3F10 и 4Е3 (к С-домену АПФ) и 5F1 (к N-домену) и повысилось связывание мАт 1В3 (к С-концевому участку С-домена АПФ) с очищенным ферментом по сравнению с сАПФ в составе биологической жидкости. Полученные данные указывают на то, что, по крайней мере в семенной жидкости человека действительно присутствуют некие соединения, влияющие на связывание мАт с АПФ.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ ЧЕЛОВЕКА

6.1. Выбор условий отмывки планшетов при иммуносорбции

Рост экспериментально наблюдаемых сигналов флюоресценции в присутствии ингибиторов может быть однозначно связан с увеличением эффективности связывания этого мАт в присутствии ингибитора. Однако если в присутствии ингибитора наблюдается понижение сигнала флюоресценции, ситуация несколько усложняется тем, что такое понижение может быть обусловлено как реальным снижением эффективности связывания конкретного мАт в присутствии ингибитора, так и банальным падением активности АПФ вследствие того, что на стадии отмывки в активных центрах АПФ мог частично задержаться ингибитор.

Для того чтобы прояснить данную ситуацию, мы воспользовались определением соотношения скоростей гидролиза субстратов ZPHL/HNL [54]. Как уже упоминалось выше (глава 4.2.6 в материалах и методах), это соотношение возрастает в присутствии ингибиторов в системе, либо в результате селективной инактивации С-домена и, соответственно, снижается при селективной инактивации N-домена. На рис. 23 А представлено соотношение скоростей гидролиза ZPHL/HNL для сАПФ в составе плазмы крови, связанного с панелью мАт на планшете в отсутствие ингибиторов АПФ. Это соотношение для большинства мАт не отличалось от значения Z/H, полученного для сАПФ в составе плазмы крови в растворе. Однако для двух мАт, 3A5 и i2H5, специфичных к N-домену АПФ и способных ингибировать активность АПФ [10,11], соотношение Z/H оказалось ниже, чем для других мАт. Это объясняется тем, что эти два мАт селективно ингибируют N-домен, вследствие чего и изменяется Z/H соотношение. Для двух других мАт, 1E10 и 4E3, специфичных к С-домену АПФ и также обладающих ингибирующей активностью [15], соотношение Z/H оказалось выше, чем для других мАт. Аналогичным образом, это объясняется смещением баланса активностей между N- и С-доменами в составе сАПФ вследствие селективного ингибирования С-домена при связывании этих мАт. Кроме упомянутых выше антикаталитических мАт, чьи эффекты на соотношение Z/H были ожидаемы, мы заметили, что данное соотношение оказалось повышенным для еще одного мАт 3F11, специфичного к С-домену АПФ, но при этом не являющегося антикаталитическим [15]. Предположительно, полученные относительно мАт 3F11 данные могут свидетельствовать о том, что это мАт

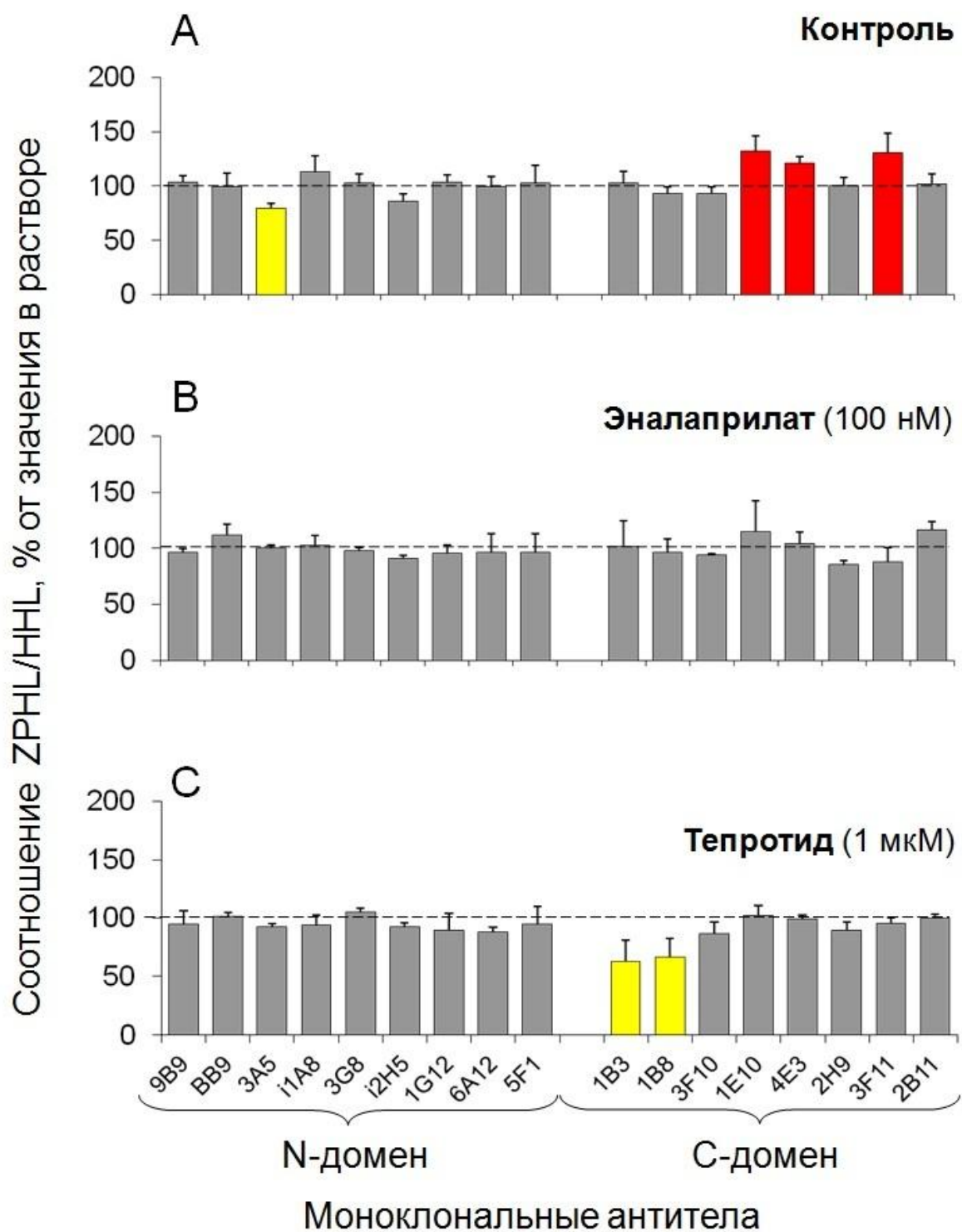


Рис. 23. Соотношение скоростей гидролиза синтетических субстратов ZPHL/HNL соматическим ангиотензин-превращающим ферментом человека, связанным с мАт, сорбированными на полистирольном планшете в присутствии ингибиторов (В, С) и без них (А).

способно индуцировать конформационные изменения белковой глобулы, сопровождаемые изменением соотношения Z/H.

На рис. 23 (B, C) представлено соотношение Z/H при связывании панели мАт с сАПФ в составе плазмы крови в присутствии высоких концентраций эналаприлата (100 нм) и тепротида (1 мкМ) после стандартной отмывки (5 раз по 200 мкл буфером А с добавлением 0,05% tween-20). Оказалось, что значение Z/H слегка увеличено на 15% для мАт 1Е10 и на 20% для мАт 2В11 (к С-домену) в случае использования эналаприлата. Такое увеличение Z/H может свидетельствовать о том, что в активных центрах АПФ осталось некоторое количество эналаприлата. Не исключено, что мАт 1Е10, являясь ингибирующим антителом, ограничивает степень подвижности С-домена сАПФ и таким образом затрудняет устранение ингибитора из активного центра АПФ при отмывке. Для того, чтобы понять структурные причины ингибирующей способности мАт, совместно с И.В. Упоровым с помощью программы Insight II (Accelrys Inc., San Diego, CA) была построена модель открытого С-домена АПФ на основе рентгено-структурных данных структурного гомолога АПФ - АПФ2 (PDB: 1R42). С помощью программы DynDom (<http://www.sys.uea.ac.uk/dyndom/>) на основе расчета движения молекулы были обнаружены подвижные аминокислотные остатки, участвующие в движении открывания-закрывания щели активного центра. Оказалось, что подвижные участки входят в состав эпитопов связывания мАт 1Е10, 4Е3 и 2В11 (рис. 24). Возможно, именно этим объясняется ингибирующая способность мАт 1Е10 и 4Е3. Поэтому, несмотря на то, что мАт 2В11 не является ингибирующим, оно, возможно, также может затруднять устранение ингибитора из активного центра АПФ при отмывке.

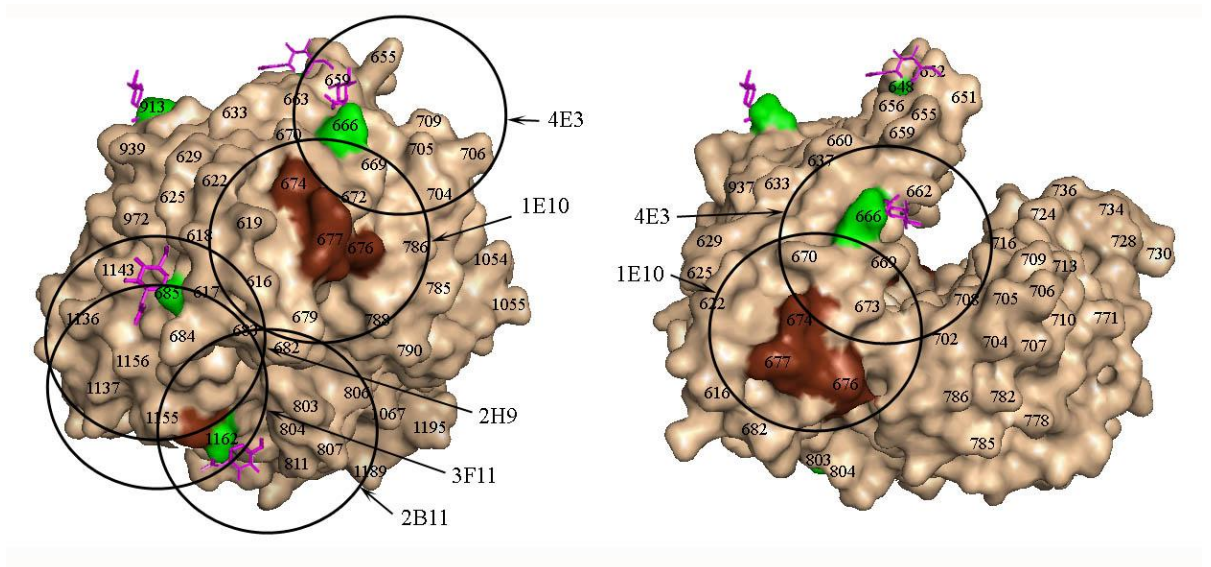


Рис. 24. Подвижные участки С-домена АПФ (покрашены коричневым) и их расположение относительно эпитопов связывания мАт.

Для того, чтобы проверить влияние качества отмывки на удерживание ингибитора в активных центрах сАПФ, связанного с мАт на планшете, мы сравнили Z/H соотношения при связывании панели мАт с сАПФ в составе плазмы крови в присутствии эналаприлата в концентрации 100 нМ и тепротида в концентрации 1 мкМ при недостаточной (рис. 25 А, С) и избыточной (рис. 30 В, D) отмывке для некоторых мАт. Из рис. 25 А видно, что значение ZPHL/ННЛ для некоторых мАт повышено, а значит, при недостаточной отмывке эналаприлат может частично задерживаться в активных центрах АПФ, даже если мАт не является ингибирующим. На рис. 25 В показано Z/H соотношение для всех используемых в работе мАт при избыточной отмывке эналаприлата. Видно, что Z/H соотношение для всей панели мАт не отклоняется от контроля, то есть эналаприлат отмывает полностью.

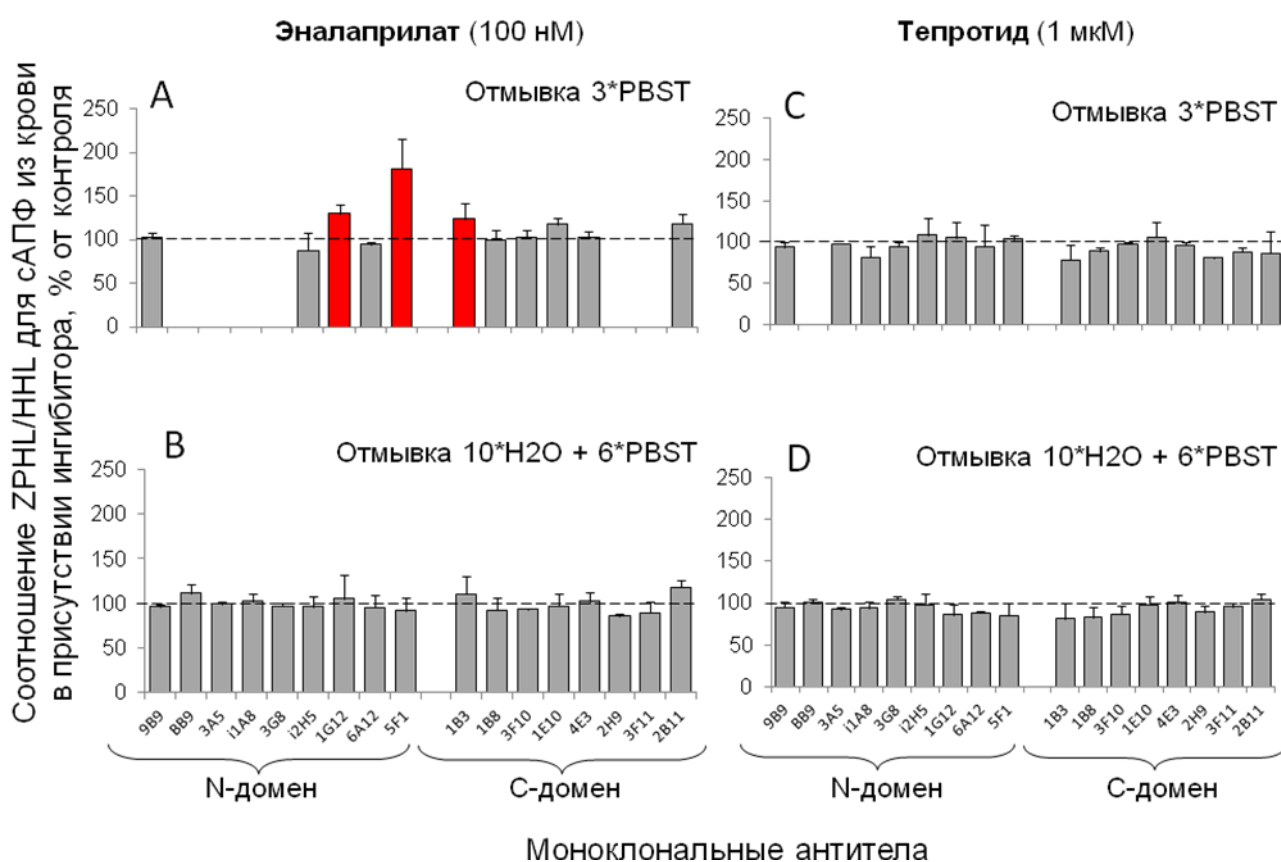


Рис. 25. Влияние качества отмывки на соотношение ZPHL/ННЛ в присутствии 100 нМ эналаприлата (А, В) и 1 мкМ тепротида (С, D)

В присутствии тепротида не отмечено повышенного соотношения Z/H при обоих вариантах отмывки (рис. 25 В, D), что означает, что тепротид легче вымывается из активных центров, чем эналаприлат в тех же условиях. Таким образом, в выбранных нами условиях наблюдаемое снижение эффективности связывания какого-либо мАт с АПФ свидетельствует

не о задержке ингибиторов в активных центрах фермента, о а конформационных изменениях АПФ, индуцированных связыванием ингибитора.

6.2. Определение влияния эналаприлата и тепротида на связывание панели моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом из крови

Как уже говорилось в обзоре литературы (глава 3.2.3), связывание мАт 1G12 и 6A12, специфичных к N-домену АПФ, с сАПФ крови резко возрастает в присутствии таких коммерчески распространенных ингибиторов АПФ, как каптоприл, лизиноприл и эналаприлат, применяемых в качестве гипотензивных средств [9]. В работах [9–15] было выполнено эпитопное картирование поверхностей N- и С-домена АПФ. Было показано, что мАт являются чувствительным маркером конформационных изменений в молекуле АПФ, и изменение связывания мАт можно соотносить с конформационными изменениями в соответствующих эпитопах на поверхности АПФ, включая конформационные изменения в структуре белка, химическую модификацию и модификацию гликанов [16]. Основываясь на результатах уже проведенных исследований, мы решили провести систематическое исследование влияния ингибиторов АПФ на связывание мАт с АПФ.

В работе [19,20] было показано, что механизм функционирования соматического фермента может меняться в зависимости от структуры гидролизуемого субстрата. При гидролизе трипептидных субстратов, например, Z-Phe-His-Leu, наблюдалась отрицательная кооперативность в функционировании доменов в двудоменном АПФ, т.е. при связывании лиганда на одном из активных центров, его связывание на втором активном центре затруднялось. При гидролизе декапептида ангиотензина-I явление отрицательной кооперативности отсутствовало, т.е. домены в сАПФ функционировали независимо друг от друга. Логично предположить, что связывание в активном центре АПФ лигандов разной структуры может приводить к различным изменениям конформации АПФ, которые могут являться базой наблюдаемой или не наблюдаемой отрицательной кооперативности. Поэтому мы решили исследовать влияние структуры лиганда (ингибитора) на конформацию АПФ.

В данной работе был проведен систематический анализ влияния эналаприлата, лизиноприла (аналоги трипептида) и нонапептида тепротида (см. рис. 9 в обзоре литературы) на связывание всей панели мАт (9 мАт к N-домену и 8 мАт к С-домену АПФ) с сАПФ и отдельными N- и С-доменами. Результаты, полученные при работе с лизиноприлом и эналаприлатом, полностью совпадали, поэтому здесь и далее представлены данные только для эналаприлата (рис. 26-30). Красным цветом отмечены мАт, связывание которых в

присутствии ингибиторов возрастало на 20% и более, желтым – мАт, связывание которых понижалось на 20% и более.

В литературе имеются сведения что связывание мАт 1G12 с отдельным рекомбинантным N-доменом (два образца длиной 629 и 737 аминокислот) выше, чем с двудоменным ферментом из легких и из крови [9]. Исходя из этого авторы [9] делают вывод, что эпитоп связывания мАт 1G12 на N-домене в составе сАПФ экранирован соседним С-доменом. Для того, чтобы подтвердить (или опровергнуть) эти данные, мы сопоставили влияние эналаприлата и тепротида на эффективность связывания мАт с соматическим АПФ и с отдельными N- и С-доменами АПФ. Результаты представлены на рис. 26. Необходимо отметить, что эффективность связывания мАт с АПФ сильно зависит от биологического источника фермента [16]. Поэтому, чтобы исключить возможное влияние природы ферментов на эффективность связывания мАт с АПФ в присутствии ингибиторов, для сравнения были использованы рекомбинантные формы соматического, тестикулярного и N-домена АПФ, экспрессированные в СНО-клетках китайских хомячков.

Оказалось, что между связыванием панели мАт с соматическим рекомбинантным АПФ и с отдельными доменами в присутствии ингибиторов существуют лишь небольшие отличия. А именно: в присутствии эналаприлата связывание мАт 9В9 с двудоменным АПФ возрастает на 50%, а с отдельным N-доменом лишь на 25%. Аналогично, в присутствии эналаприлата связывание мАт 1В3 с двудоменным АПФ возрастает на 180%, а с отдельным С-доменом на 120%; связывание мАт 3F11 с двудоменным АПФ возрастает на 85%, а с отдельным С-доменом на 140%. Аналогичная картина наблюдается и в присутствии тепротида. Связывание мАт 9В9 с двудоменным АПФ возрастает на 70%, а с отдельным N-доменом лишь на 30%. Связывание мАт 1В3 с двудоменным АПФ возрастает на 150%, а с отдельным С-доменом на 200%. Связывание мАт 1Е10 с двудоменным АПФ понижается на 50%, а с отдельным С-доменом на 40%. Важно, что под влиянием обоих ингибиторов качественно изменение эффективности связывания любого мАт с сАПФ и с отдельным доменом в присутствии ингибитора одинаковое, то есть при увеличении (либо уменьшении) связывания любого мАт с сАПФ наблюдается соответственно увеличение (либо уменьшение) связывания этого мАт с отдельным доменом.

Полученные данные не соответствуют наблюдениям, описанным в литературе [9], судя по которым связывание мАт 1G12 с отдельным рекомбинантным N-доменом выше, чем с двудоменным ферментом. Однако важно учитывать тот факт, что авторы [9] сравнивали

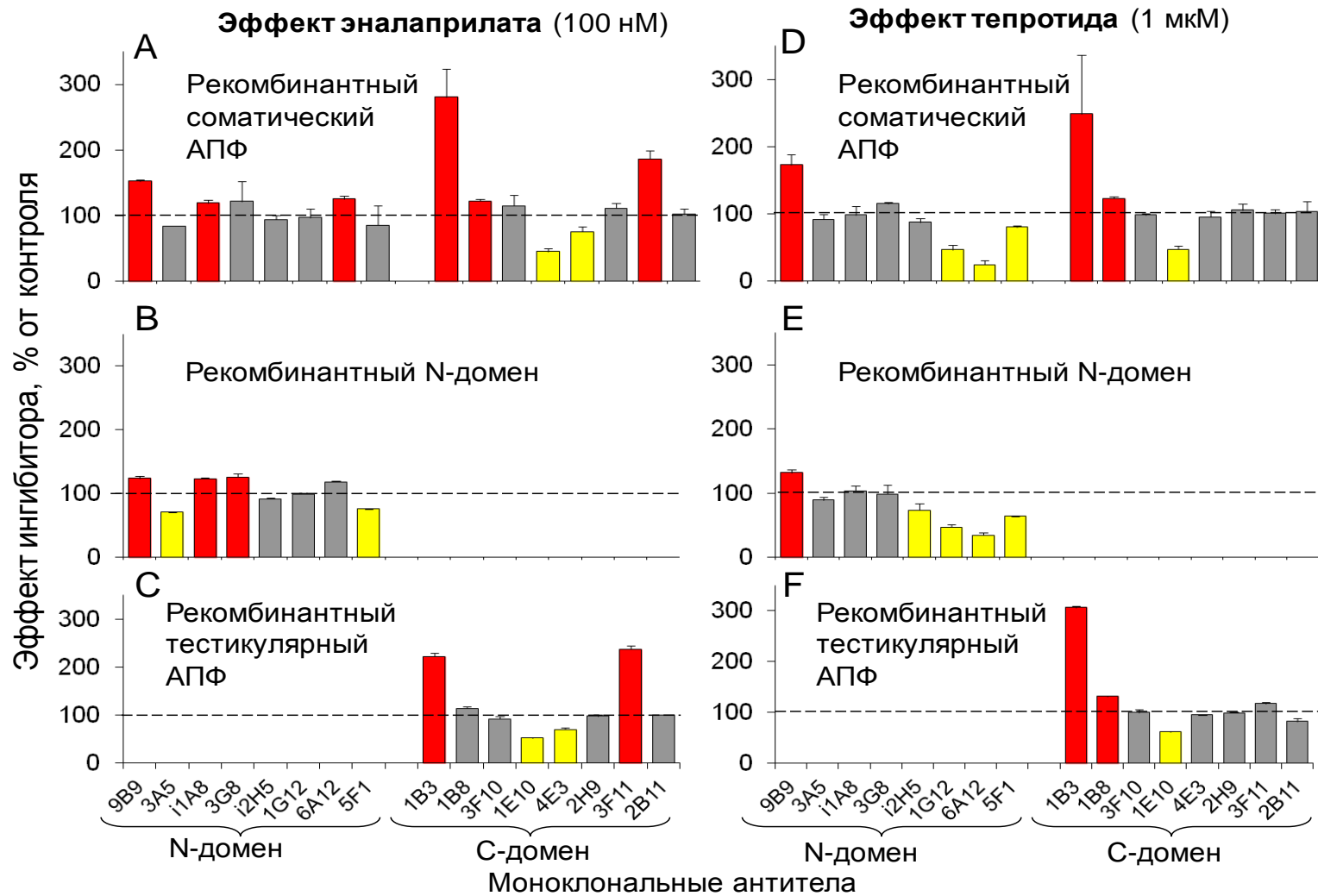


Рис. 26. Эффект эналаприлата (A, B, C) и тепротида (D, E, F) на связывание панели мАт с двудоменной и однодоменными растворимыми рекомбинантными формами АПФ.

эффективность связывания мАт 1G12 с сАПФ (из легких и из крови) и отдельным N-доменом (рекомбинантный, экспрессированный в СНО-клетках китайских хомячков), взятыми из разных биологических источников. Поэтому такая разница в связывании могла быть обусловлена разной природой исследуемых ферментов. В свою очередь, полученные нами данные для рекомбинантных форм АПФ позволяют предположить, что N- и С-домен в составе двудоменного АПФ могут создавать лишь небольшие затруднения для связывания мАт с АПФ. Однако, поскольку количественно разница между эффектами ингибиторов на соматической форме и отдельных доменах АПФ небольшая, то можно предположить, что основной вклад в изменение конформации двудоменного АПФ при связывании в активном центре ингибитора вносит изменение конформации в пределах отдельных доменов.

Отдельно стоит коснуться больших значений ошибки для данных, полученных при работе с мАт 1В3. Эта ошибка обусловлена тем, что при повторении экспериментов были получены данные, довольно сильно разнящиеся количественно, но не качественно. В свою очередь, такая разница в экспериментальных данных скорее всего объясняется тем, что эпитоп связывания мАт 1В3 располагается на С-конце С-домена АПФ – области, чрезвычайно чувствительной к протеолизу и к условиям среды [14].

Сопоставление данных по влиянию эналаприлата и тепротида на связывание панели мАт как с двудоменным АПФ, так и с отдельными N- и С-доменами АПФ (рис. 26) выявило значительные различия между эффектом эналаприлата и тепротида. Наиболее наглядно эта разница наблюдается для мАт 6А12 и 1G12 к N-домену (их эпитопы перекрываются) и мАт 3F11 к С-домену АПФ. Так, под действием эналаприлата эффективность связывания этих 3 мАт с АПФ повышается, а под действием тепротида, наоборот, понижается, что указывает на принципиально различные структурные изменения при связывании ингибиторов разной структуры.

Поскольку наибольший научный интерес представляет изучение фермента в его естественной среде, было исследовано влияние эналаприлата и тепротида на связывание всей панели мАт с сАПФ в составе плазмы крови (рис. 27). Важно подчеркнуть, что эффективность связывания мАт 9В9 с АПФ во составе плазмы крови (в отличие от рекомбинантного АПФ) не зависит от присутствия ингибиторов в системе.

В работе [9] было продемонстрировано увеличение связывания мАт 1G12 и 6А12 с сАПФ из крови и из легких в присутствии эналаприлата. Оба мАт специфичны к N-домену АПФ, причем их эпитопы связывания сильно перекрываются. Нашей задачей было выяснить с помощью набора из 17 мАт к N- и С- доменам АПФ, изменяется ли конформация фермента

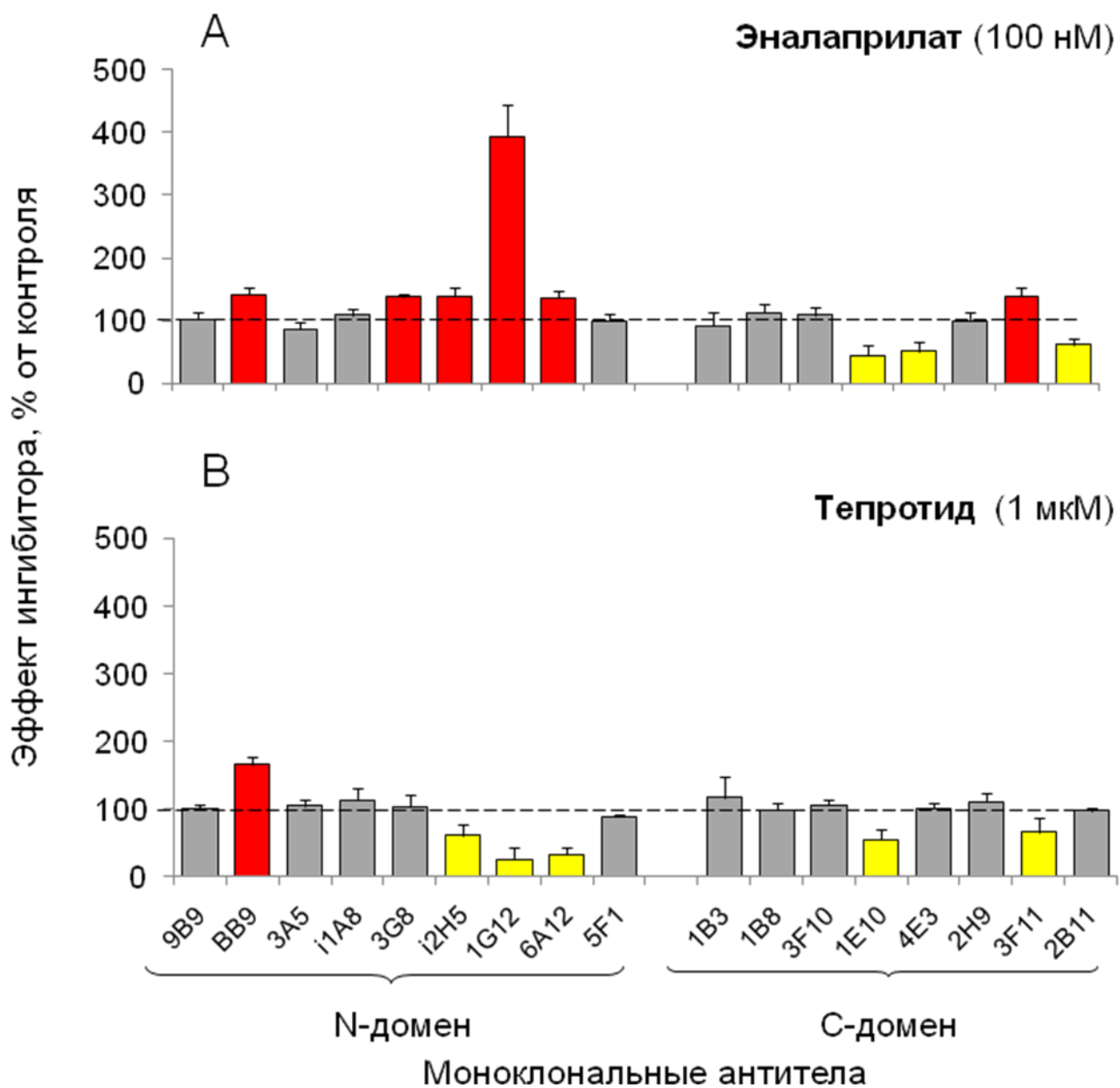


Рис. 27. Влияние эналаприлата (А) и тепротида (В) на связывание мАт с сАПФ в составе плазмы крови.

на других участках его поверхности при связывании ингибитора в активном центре. Кроме того, было решено использовать для этого ингибиторы разной структуры (эналаприлат и тепротид) с целью определить возможную разницу в изменении конформации АПФ при связывании ингибиторов разной структуры. Для этого использовали эналаприлат и тепротид в фиксированных концентрациях 10^{-7} М и 10^{-6} М соответственно. Концентрации ингибиторов выбирались таким образом, чтобы их концентрация в смеси с ферментом значительно превышала константу ингибирования. Константы ингибирования N- и C-доменов АПФ эналаприлатом составляют $2,6 \cdot 10^{-9}$ М и $0,6 \cdot 10^{-9}$ М соответственно [189], а для тепротида - $2,5 \cdot 10^{-7}$ М и $4,4 \cdot 10^{-9}$ М соответственно [100].

Прежде всего отметим, что подтвердились уже известные данные о повышении связывания мАт 1G12 и 6A12 с сАПФ из плазмы крови в присутствии эналаприлата [9]. Кроме того, в присутствии эналаприлата увеличилась эффективность связывания ряда других мАт, а именно ВВ9, i1A8, 3G8, i2H5 (к N-домену) и 3F11 (к C-домену). Понижилась эффективность связывания мАт 1E10 и 4E3 (к C-домену) (рис. 27).

В присутствии тепротида, так же, как и в присутствии эналаприлата, увеличивалось связывание мАт ВВ9 и i1A8 (к N-домену) и уменьшилось связывание мАт 1E10 (к C-домену). В эффективности связывания ряда других мАт произошли значительные изменения. А именно, в присутствии тепротида понизилось связывание мАт i2H5, 1G12 и 6A12 (к N-домену) и осталось неизменным связывание мАт 4E3 (к C-домену), в то время как в присутствии эналаприлата эффективность связывания мАт i2H5, 1G12 и 6A12 возрастала, а эффективность связывания мАт 4E3 падала. Наблюдаемая разница в эффектах ингибиторов разной структуры на эффективность связывания одних и тех же мАт свидетельствует о том, что при связывании ингибиторов разной структуры происходят разные изменения конформации белковой глобулы фермента. Поскольку известна локализация на поверхности АПФ эпитопов связывания всех используемых в работе мАт, то легко представить, какие участки поверхности фермента претерпевают конформационные изменения при связывании ингибиторов в активном центре. На рис. 28 для наглядности представлены структуры N- и C-доменов АПФ с очерченными эпитопами связывания мАт.

Для того чтобы убедиться в достоверности полученных результатов, мы исследовали влияние обоих ингибиторов на эффективность связывания панели мАт с сАПФ в составе плазмы крови в широком интервале концентраций ингибиторов. При этом концентрацию эналаприлата варьировали от 10^{-10} М до 10^{-6} М, а концентрацию тепротида от 10^{-9} М до 10^{-5} М. В целях достоверности каждую кривую снимали не менее 3 раз. На рис. 29-30 представлены данные, соответствующие средним значениям из всех проведенных экспериментов.

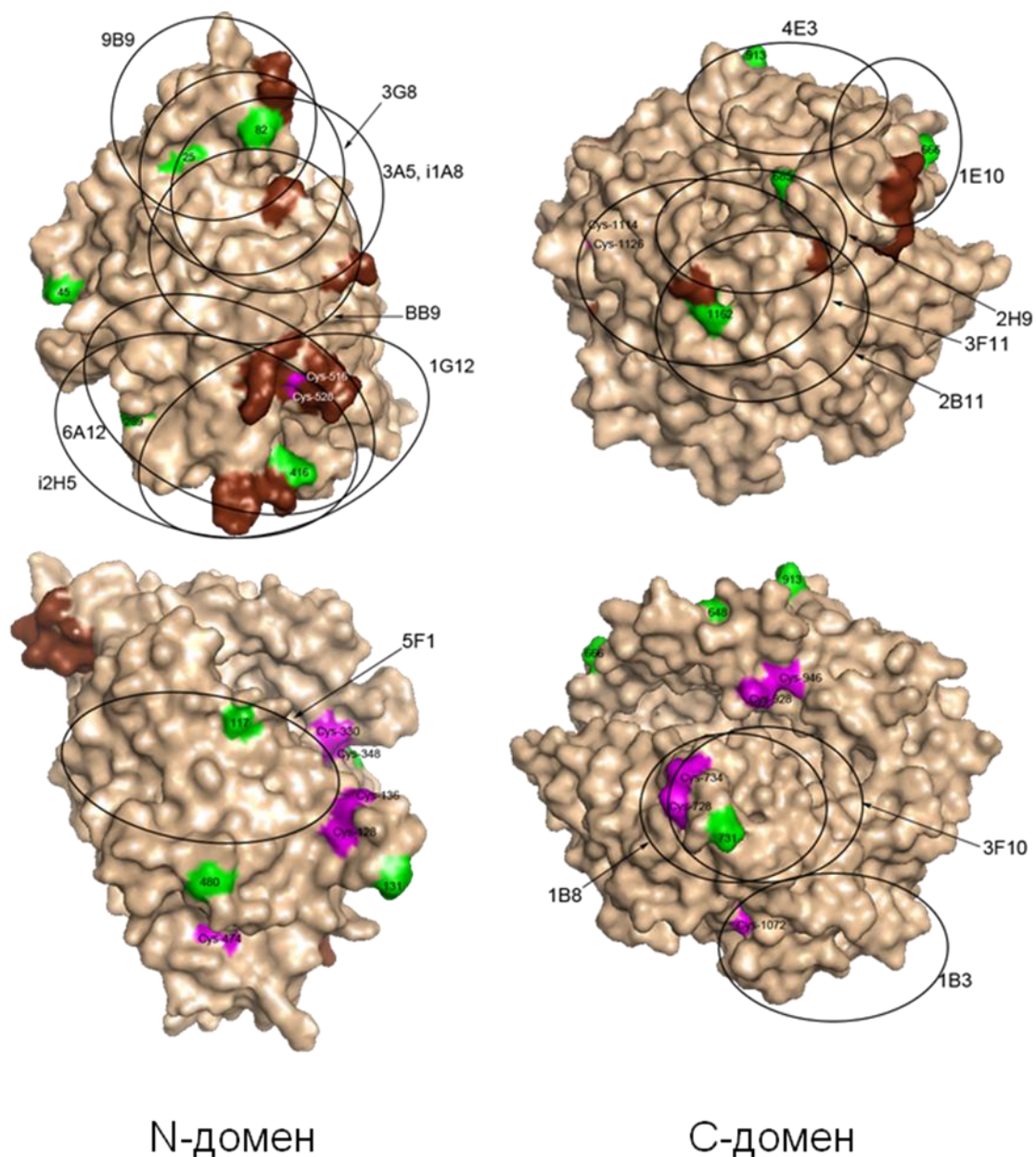


Рис. 28. Локализация эпитопов связывания МАТ на поверхности АПФ. Зеленым отмечены сайты гликозилирования, фиолетовым – дисульфидные связи и свободные цистеины, коричневым – участки молекулы фермента, участвующие в движении открывания-закрывания щели активного центра.

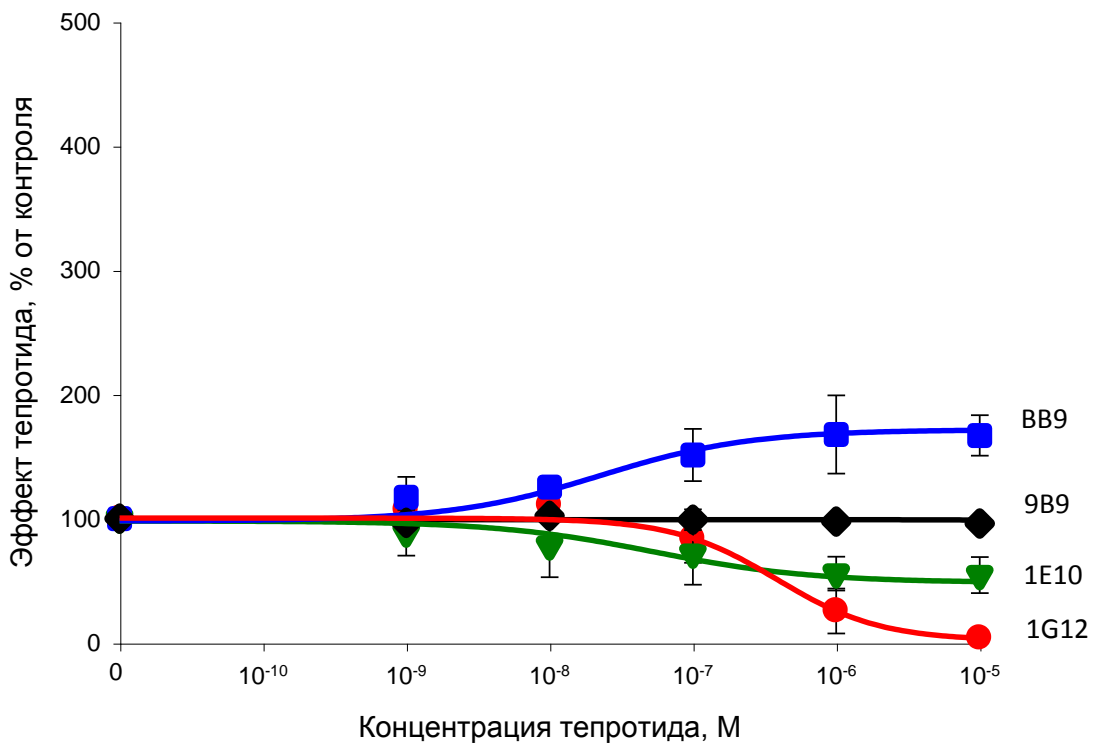
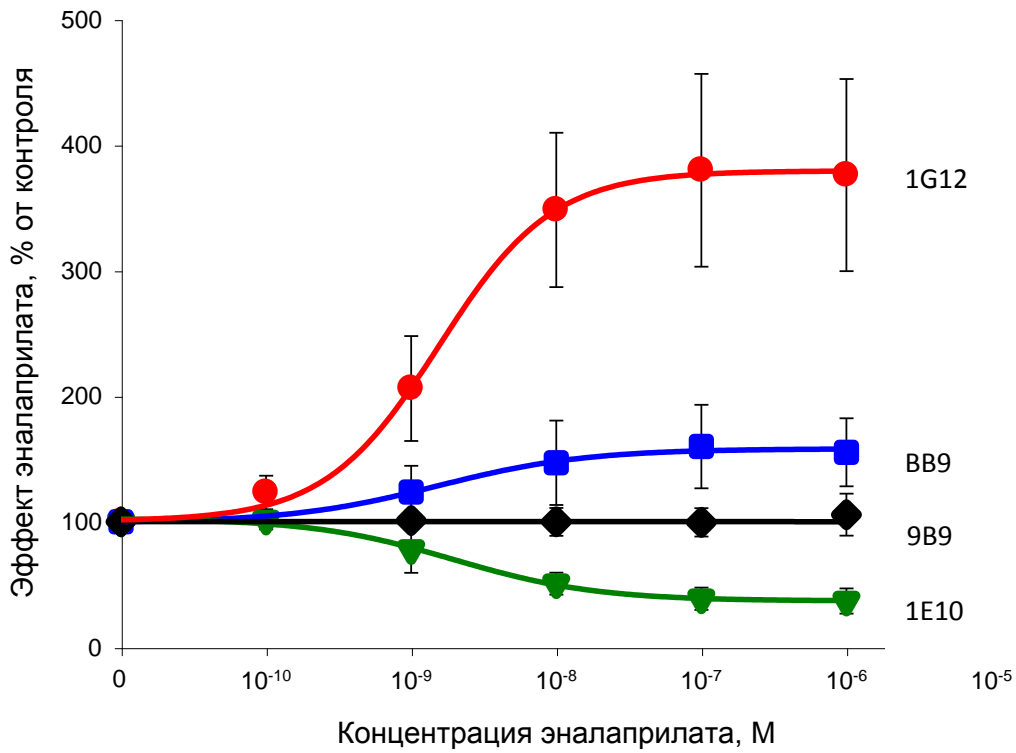


Рис. 29. Влияние связывания ингибиторов в активных центрах АПФ на эффективность связывания МАТ 9В9, ВВ9, 1G12 и 1E10 с сАПФ в составе плазмы крови.

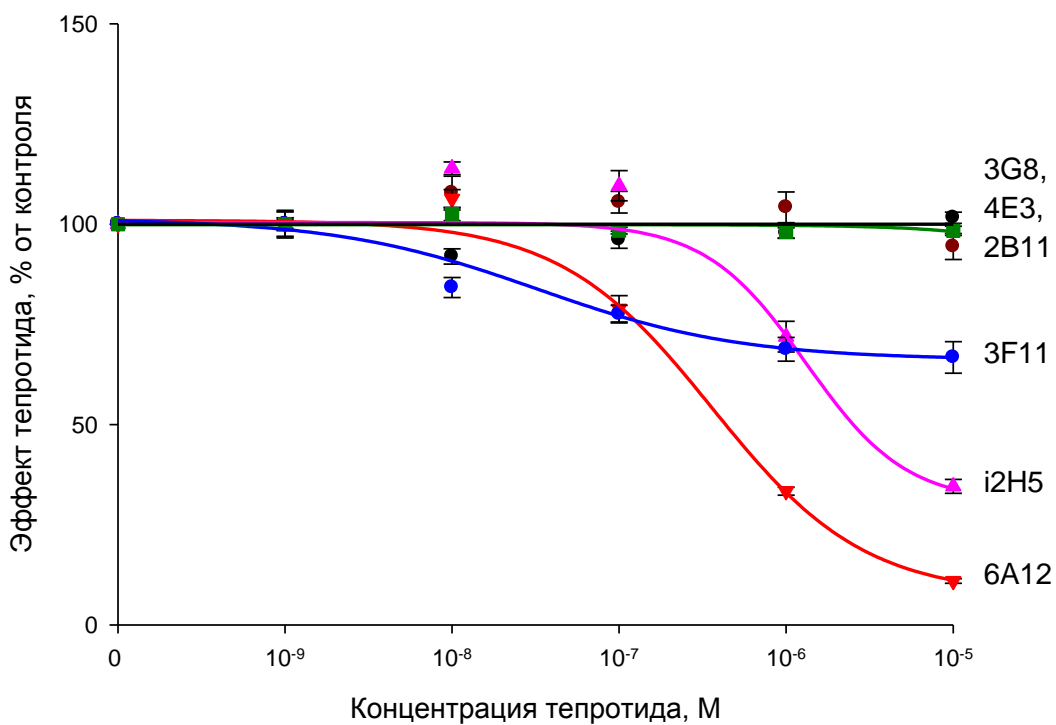
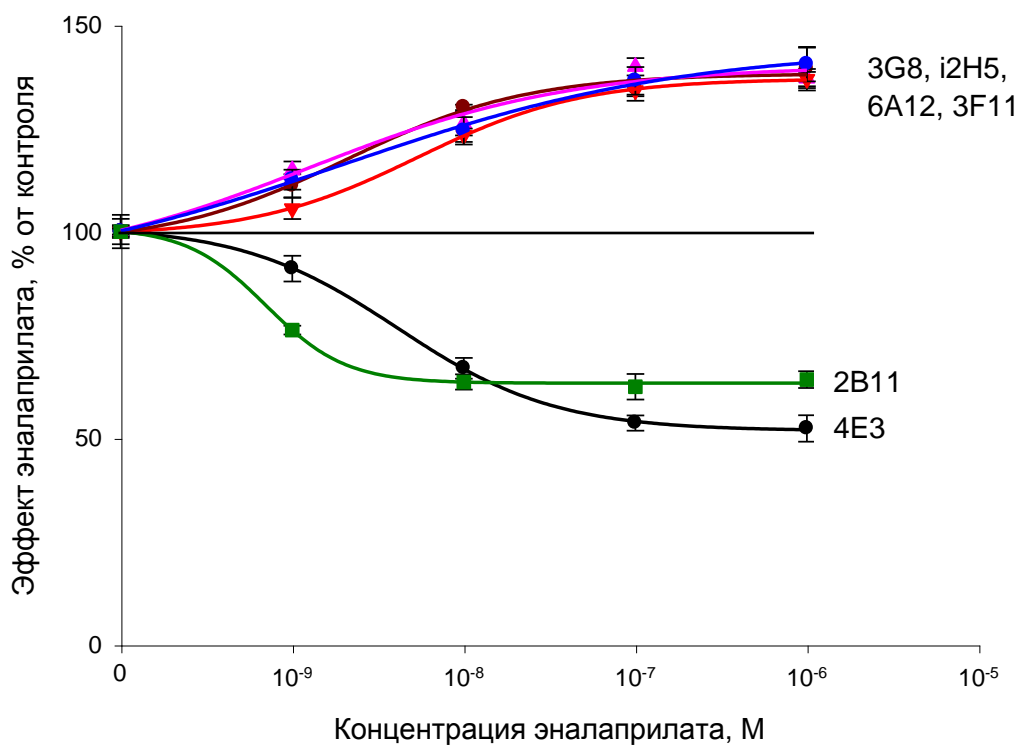


Рис. 30. Влияние связывания ингибиторов в активных центрах АПФ на эффективность связывания МАТ МАТ 3G8, i2H5, 6A12, 4E3, 3F11 и 2B11 с сАПФ в составе плазмы крови.

В первую очередь можно выделить ряд мАт, связывание которых не изменяется при связывании как эналаприлата, так и тепротида: 9В9, 3А5, i1А8, 5F1, 1В3, 1В8, 3F10, 2Н9. У ряда других мАт разница в связывании в присутствии эналаприлата и тепротида лишь количественная, но не качественная: под влиянием эналаприлата связывание мАт ВВ9 возрастает на 55 %, а под влиянием тепротида – на 65%. Связывание мАт 1Е10 под влиянием эналаприлата снижается на 65%, а под влиянием тепротида – только на 45%. Эффективность связывания ряда мАт с АПФ изменяется в присутствии одного из ингибиторов, но не изменяется в присутствии ингибитора другой структуры. Например, при добавлении эналаприлата связывание мАт 3G8 увеличивается на 40%, а связывание мАт 4Е3 и 2В11 понижается на 50% и 40% соответственно, однако под влиянием тепротида связывание этих трех мАт не изменяется (рис. 30).

Особый интерес представляют кривые изменения эффективности связывания мАт i2Н5, 6А12 и 1G12 к N-домену (их эпитопы существенно перекрываются [9]) и мАт 3F11 к С-домену АПФ, поскольку они наиболее наглядно демонстрируют различный характер конформационных изменений обоих доменов при связывании ингибиторов различной структуры – в присутствии эналаприлата связывание этих мАт существенно возрастало (в случае мАт i2Н5, 6А12 и 3F11 на 40 %, а в случае мАт 1G12 на 380%). В то же время, в присутствии тепротида связывание этих мАт существенно снижалось (i2Н5 на 65%, 6А12 на 90%, 3F11 на 30%, а связывание мАт 1G12 понижалось вплоть до полной отмены при максимальной концентрации тепротида).

Видно, что при увеличении концентрации ингибиторов, их влияние на эффективность связывания мАт с АПФ нарастает, и затем все кривые выходят на плато, что свидетельствует о том, что достигнуты максимально возможные конформационные изменения фермента.

В целом, из проведенного анализа становится ясно, что значительная часть мАт изменяет эффективность связывания с АПФ при связывании в активных центрах фермента ингибиторов АПФ, а этот факт указывает на то, что подавляющая часть поверхности АПФ претерпевает конформационные изменения при связывании ингибиторов в активных центрах фермента, расположенных глубоко внутри доменов АПФ (см. главу 1.4 в обзоре литературы, рис. 2 и 3). С другой стороны, полученные данные достоверно демонстрируют, что связывание ингибиторов разной структуры приводит к различным изменениям конформации фермента, особенно в области расположения эпитопов связывания мАт 1G12, 6А12 и i2Н5 на N-домене АПФ.

6.3. Анализ взаимного влияния доменов при связывании ингибиторов в активных центрах соматического ангиотензин-превращающего фермента

Для того чтобы попытаться выяснить, влияет ли связывание ингибитора в активном центре одного из доменов на конформацию второго домена (что может быть базой для наблюдаемой отрицательной кооперативности активных центров), мы сопоставили наблюдаемые изменения эффективности связывания МАТ с АПФ при связывании трипептидных и нонапептидного ингибиторов с насыщенностью активных центров фермента молекулами ингибитора. С помощью программы Mathematica 6 были построены теоретические кривые, характеризующие долю свободных активных центров фермента от концентрации ингибитора в активных центрах АПФ. При расчетах использовали данные, полученные для лизиноприла, так как в нашей лаборатории ранее были определены константы ингибирования N- и C-доменов АПФ человека лизиноприлом в условиях, при которых определяется эффективность связывания МАТ с АПФ [100]. Константы ингибирования N- и C-доменов АПФ лизиноприлом составляют $1,2 \cdot 10^{-9} \text{M}$ и $3,0 \cdot 10^{-10} \text{M}$ соответственно. При построении теоретической зависимости доли свободных активных центров от концентрации ингибитора учитывали ранее полученные данные о том, что связывание лизиноприла в любом из активных центров фермента ухудшает константу связывания этого ингибитора на втором активном центре в 20 раз (отрицательная кооперативность активных центров), а при связывании тепротида с АПФ отрицательная кооперативность активных центров отсутствует [100].

Поскольку константы ингибирования N- и C-доменов АПФ человека лизиноприлом различаются всего в 4 раза ($1,2 \cdot 10^{-9} \text{M}$ и $3,0 \cdot 10^{-10} \text{M}$ соответственно [100]), то очевидно, что такой ингибитор не будет проявлять доменной специфичности. Нам не удалось учесть в расчетах случайный порядок связывания лизиноприла с N- и C-доменами в составе АПФ, поэтому мы построили две теоретические кривые, представляющие собой предельные случаи связывания лизиноприла с N- и C-доменами в составе сАПФ. Таким образом считали, что в одном случае лизиноприл связывается сначала с N-доменом, а затем с худшей константой с C-доменом АПФ, а в другом – сначала с C-доменом, а затем с худшей константой с N-доменом АПФ.

Для того, чтобы сопоставить имеющиеся экспериментальные данные по эффективности связывания МАТ с АПФ с полученными теоретическими зависимостями, представили экспериментальные данные в следующем виде: за 100% (или отсутствие

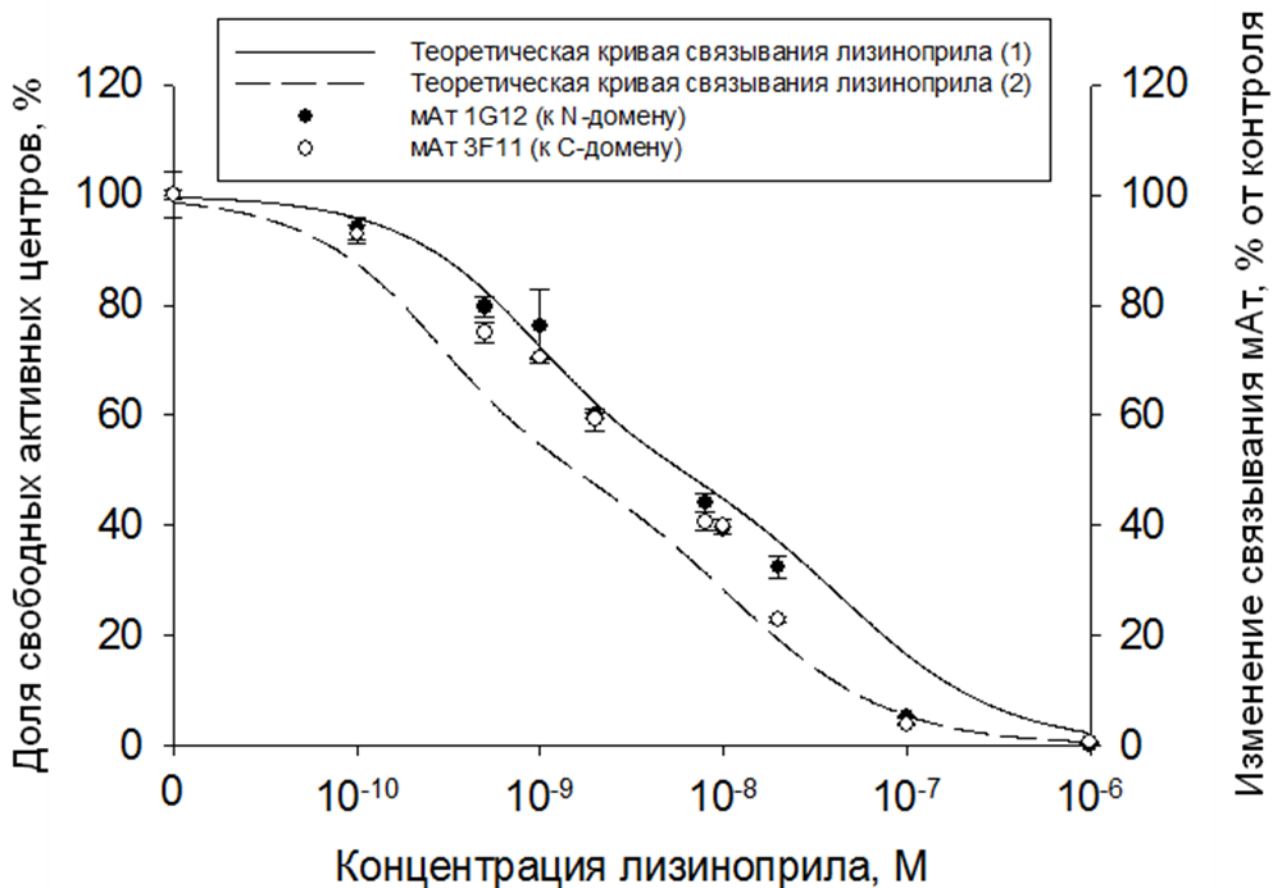


Рис. 31. Сопоставление экспериментальных данных (точки) по влиянию лизиноприла на эффективность связывания МАТ 1G12 (к N-домену) и 3F11 (к C-домену) с очищенным АПФ из семенной жидкости ($2 \cdot 10^{-10}$ М) с теоретическими зависимостями доли свободных активных центров АПФ от концентрации ингибитора в системе (кривые). Кривая 1 рассчитана исходя из предположения, что лизиноприл связывается сначала с N-доменом ($K_i = 1,2 \cdot 10^{-9}$ М), а затем с худшей в 20 раз константой с C-доменом АПФ. Кривая 2 рассчитана исходя из предположения, что лизиноприл связывается сначала с C-доменом ($K_i = 3,0 \cdot 10^{-10}$ М), а затем с худшей в 20 раз 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.

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. Для наглядности выбрали мАт 3F11 (к С-домену) и 1G12 (к N-домену), поскольку эффективность связывания именно этих мАт наиболее резко изменяется под влиянием лизиноприла. Таким образом, изменение связывания мАт 3F11 отражает изменение конформации С-домена, а изменение связывания мАт 1G12 отражает изменение конформации N-домена в составе сАПФ.

Видно, что экспериментальные точки лежат между двумя теоретическими кривыми (рис. 31), что ожидаемо, поскольку лизиноприл не проявляет доменной специфичности. Из сопоставления экспериментальных данных и теоретических зависимостей видно, что лизиноприл (ингибитор, при связывании которого с сАПФ наблюдается явление отрицательной кооперативности между доменами) равновероятно связывается с обоими доменами сАПФ, что индуцирует изменения конформации как С-, так и N-домена в составе соматического АПФ. Конформационные изменения обоих доменов продолжаются вплоть до полного насыщения всех активных центров лизиноприлом. К сожалению, поскольку величины констант ингибирования для обоих активных центров близки, полученные данные не позволяют получить достоверную информацию о возможном влиянии связывания ингибитора в активном центре одного из доменов на конформацию второго домена.

При построении теоретической кривой связывания тепротида в активных центрах соматического АПФ учитывали ранее полученные данные о том, что при связывании тепротида активные центры в составе соматического АПФ функционируют независимо друг от друга, то есть отрицательная кооперативность отсутствует. Константы ингибирования N- и С-домена АПФ человека тепротидом составляют $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ М}$ и $4,4 \cdot 10^{-9} \text{ М}$ соответственно [100]. То есть разница между этими константами составляет практически два порядка, и таким образом тепротид является С-домен специфичным ингибитором.

Сравнение экспериментальных данных по влиянию тепротида на эффективность связывания мАт 3F11 (к С-домену) и 1G12 (к N-домену) с АПФ с теоретической кривой связывания тепротида в активных центрах АПФ представлено на рис. 32. 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.

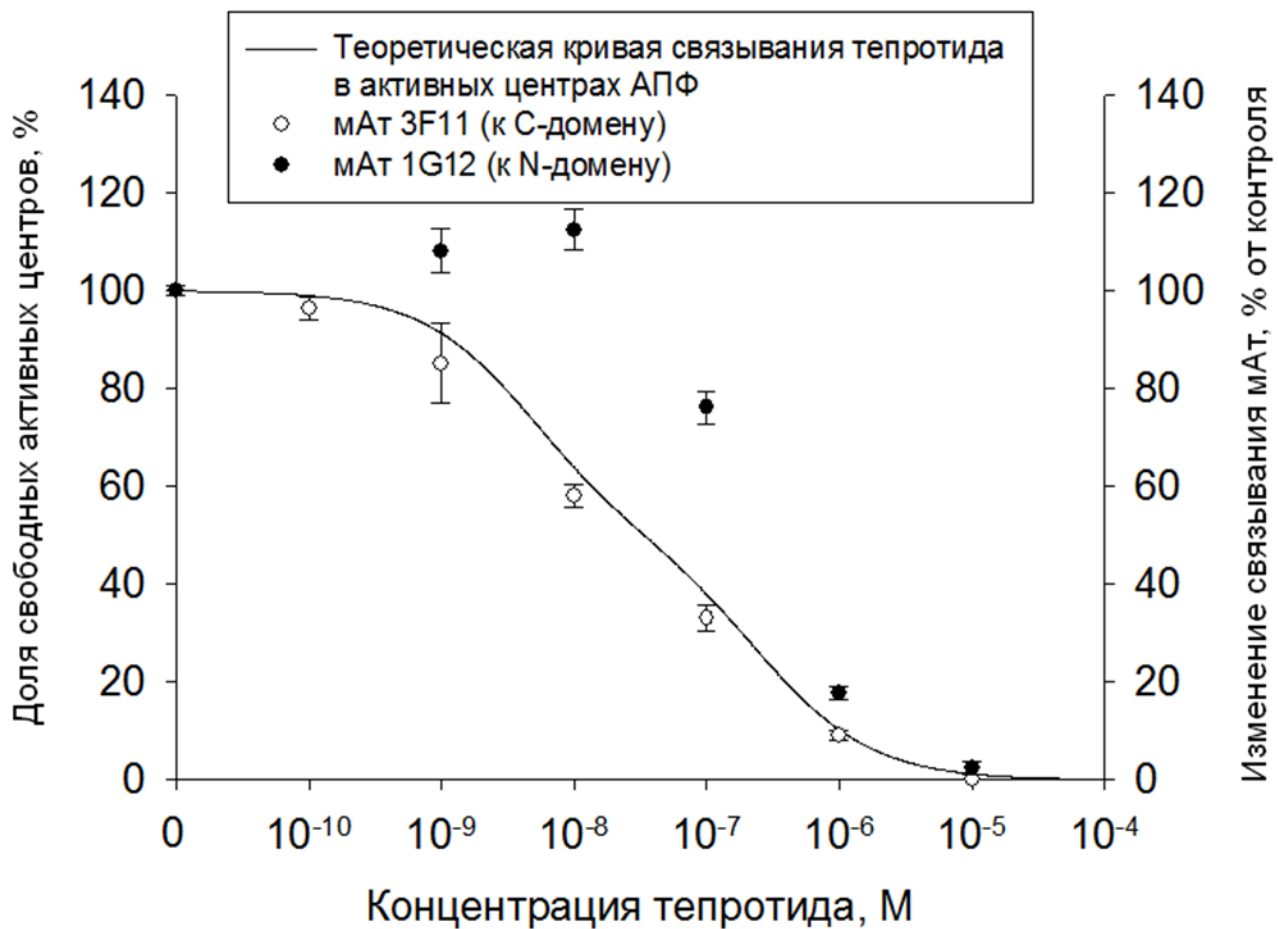


Рис. 32 Сравнение экспериментальных данных по влиянию тепротида на эффективность связывания мАт 1G12 и 3F11 с сАПФ из плазмы крови с теоретической зависимостью связывания тепротида в активных центрах сАПФ от концентрации ингибитора в системе.

При концентрациях тепротида от 10^{-9} М и выше (т.е. в тех условиях, когда тепротид связывается преимущественно с С-доменом АПФ) наблюдается небольшое повышение связывания мАт 1G12 (к N-домену) на 15%. Для того, чтобы убедиться в наличии такого эффекта, было выполнено 16 экспериментов и проведена статистическая обработка данных с применением критериев Манна-Уитни и Стьюдента. Оба примененных метода подтвердили наличие указанного эффекта. Таким образом, повышение связывания мАт 1G12 (к N-домену) при низких концентрациях тепротида, хоть и небольшое численно, является статистически достоверным. С другой стороны, аналогичный эффект наблюдался в работе [9] при исследовании влияния С-домен специфичного ингибитора RХРА380 (тетрапептид) на эффективность связывания мАт 6A12 к N-домену (эпитопы связывания мАт 1G12 и 6A12 сильно перекрываются) с АПФ в составе сыворотки крови человека. С ростом концентрации RХРА380 связывание этого мАт с АПФ сначала увеличивалось на 50%, а затем падало на 40%. Аналогично, 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. Таким образом, можно утверждать, что связывание тепротида на С-домене сАПФ может приводить к изменению конформации соседнего N-домена.

Итак, из сопоставления экспериментальных данных по влиянию тепротида на эффективность связывания мАт 1G12 и 3F11 (к N- и С-домену, соответственно) с АПФ и теоретических зависимостей, характеризующих эффективность связывания тепротида в активных центрах N- и С-доменов в составе сАПФ, можно утверждать, что связывание тепротида на любом из доменов сАПФ приводит к изменению конформации не только этого, но и соседнего домена.

Таким образом, неожиданно оказалось, что связывание в одном из активных центров АПФ тепротида (для которого отрицательная кооперативность между доменами АПФ отсутствует) тем не менее приводит к конформационным изменениям соседнего домена. В настоящее время нельзя утверждать, что связывание трипептидных ингибиторов (для которых характерна отрицательная кооперативность) не приводит к конформационным изменениям на уровне соседних доменов. Возможно, такие изменения есть, но они другие.

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭФФЕКТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИМ ФЕРМЕНТОМ ЧЕЛОВЕКА

Возможность применения мАт для регистрации конформационных изменений АПФ, индуцированных гликановой составляющей белковой глобулы [16] или связыванием ингибиторов в активном центре [9] позволила предположить, что на связывание мАт с АПФ могут оказывать влияние и другие эффекторы, помимо ингибиторов АПФ.

7.1. Определение влияния S-S восстанавливающих агентов на связывание панели моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом из крови

Молекула сАПФ 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 [190]. Кроме того, в составе каждого домена имеется неспаренный остаток цистеина: Cys474 в N-домене и Cys1072 в С-домене, которые могут участвовать в создании гомо- или гетеродимеров АПФ через образование дисульфидных мостиков [13].

Поэтому мы протестировали вещества, способные восстанавливать дисульфидные мостики – синтетический реагент дитиотреитол (DTT) и восстановленный глутатион, распространенный *in vivo* (GSH), а также DTNB – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту), способную взаимодействовать со свободным остатком цистеина. Для GSH, DTT и DTNB рабочие концентрации составили 5 мМ, 3 мМ и 3 мМ соответственно.

Восстановление S-S мостиков с помощью GSH и DTT (рис. 33 А, В) привело к похожим изменениям связывания ряда мАт, а именно: при обработке АПФ 5 мМ глутатионом связывание для мАт 1G12 и i2H5 (к N-домену) возросло на 270% и 65% соответственно, а при обработке 5 мМ DTT – на 110% и 40% соответственно. Эпитопы этих мАт имеют в своем составе дисульфидный мостик Cys516-Cys528, следовательно, можно заключить, что восстановление этого мостика приводит к наблюдаемому эффекту.

Связывание мАт 1B3 (к С-домену АПФ) возрастало на 60% в присутствии GSH и на 30% в присутствии DTT. Эпитоп для этого мАт не содержит S-S мостиков, но располагается на С-конце С-домена АПФ – области, чрезвычайно чувствительной к протеолизу и к условиям среды [14]. Кроме того, вблизи эпитопа связывания мАт 1B3 находится

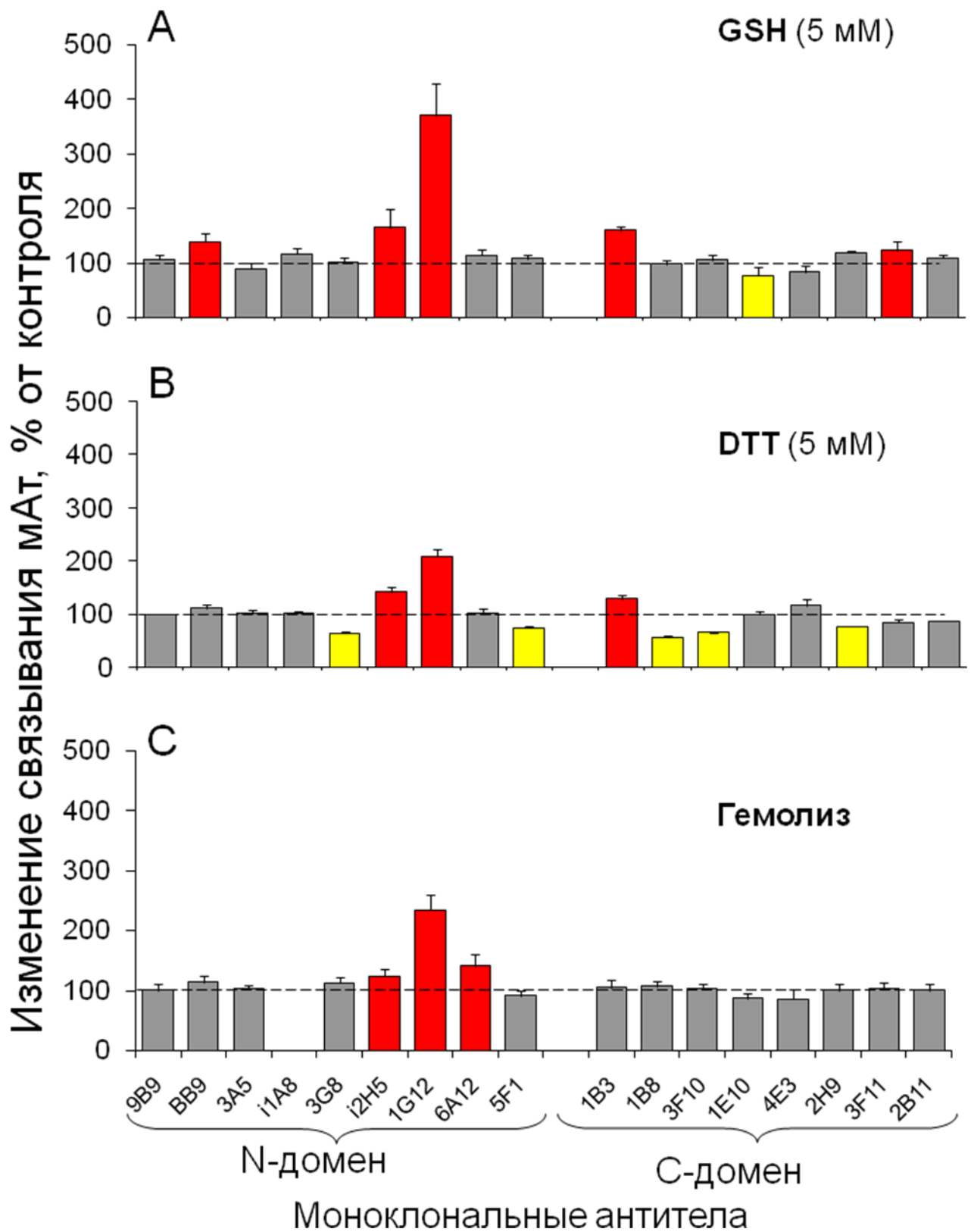


Рис. 33. Изменение связывания МАТ с сАПФ крови под влиянием глутатиона (А), дитиотреитола (В) и гемолиза (С).

дисульфидный мостик Cys728-Cys734, восстановление которого могло повлиять на связывание этого мАт. Связывание мАт 3F11 возросло на 25% после обработки плазмы GSH, но не DTT. Как известно, DTT не может восстанавливать дисульфидные связи, находящиеся глубоко в структуре белка (не находящиеся в контакте с растворителем). Возможно, что дисульфидный мостик Cys1114-Cys1126, находящийся в составе эпитопа мАт 3F11, более труднодоступен для DTT, чем другие дисульфидные мостики в молекуле АПФ. В присутствии GSH связывание мАт ВВ9 (к N-домену) повысилось на 40%, а связывание мАт 3G8 (к N-домену) понизилось на 35%. Эпитопы этих мАт перекрываются и не имеют дисульфидных мостиков. Интересно, что эпитоп связывания мАт 3G8 граничит с конформационно-чувствительной областью, включающей в себя перекрывающиеся эпитопы связывания мАт 1G12, 6A12 и i2H5 и дисульфидный мостик Cys516-Cys528. Возможно, восстановление этого дисульфидного мостика приводит к изменению конформации не только эпитопов, расположенных в непосредственной близости от него, но и более отдаленных, таких как ВВ9 и 3G8. Связывание с АПФ ряда других мАт снижается в присутствии DTT, а именно: связывание мАт 5F1 к N-домену понижается на 25% (дисульфидный мостик Cys330-Cys348 в непосредственной близости), мАт к С-домену 1В8 и 3F10 (40% и 35% соответственно, Cys728-Cys734 в эпитопах этих двух мАт) и мАт 1Е10 и 2Н9 (связывание обоих снижается на 25%, нет S-S мостиков в эпитопе). Эпитопы связывания мАт 1Е10 и 2Н9 (к С-домену) содержат в своем составе области, участвующие в движении открывания-закрывания щели активного центра, а дисульфидные мостики Cys728-Cys734 и Cys928-Cys946 располагаются на створках щели активного центра. Предположительно, восстановление этих дисульфидных мостиков может приводить к смещению створок щели активного центра, что в свою очередь может вызывать не только изменение конформации областей, участвующих в движении открывания-закрывания щели активного центра (в эпитопах связывания мАт 1Е10 и 2Н9), но и инактивацию АПФ. Взаимное расположение дисульфидных мостиков и эпитопов связывания мАт на поверхности АПФ представлено на рис. 28.

При обработке плазмы DTNB, способной взаимодействовать со свободными остатками цистеина, оказалось, что связывание мАт 1В3 (эпитоп его связывания расположен на С-конце С-домена и содержит в своем составе свободный Cys1072) понизилось на 40%. Кроме того, повысилось связывание пары других мАт к С-домену, а именно 1В8 и 3F10 на 60% и 30% соответственно, чьи эпитопы связывания перекрываются и располагаются недалеко от Cys1072.

Известно, что при гемолизе эритроцитов происходит высвобождение внутриклеточного GSH в плазму, что в значительной степени увеличивает концентрацию глутатиона в крови [191,192]. Мы смоделировали реальную ситуацию, имеющую место при гемолизе эритроцитов в крови. Для этого произвели осмотический шок эритроцитов крови и сравнили связывание панели мАт с АПФ в составе полученной и интактной сыворотки крови. Данные представлены на рис. 33 С.

Оказалось, что вследствие гемолиза значительно увеличивается эффективность связывания группы мАт 1G12, 6A12 и i2H5 к N-домену АПФ, чьи эпитопы связывания сильно перекрываются между собой и содержат в своем составе дисульфидный мостик Cys516-Cys528. Таким образом было показано, что соединения, присутствующие в крови и способные восстанавливать дисульфидные связи, могут непосредственно влиять на конформацию АПФ. С методологической точки зрения важно отметить, что для определения конформации АПФ с использованием мАт должна использоваться плазма (либо сыворотка) крови, не содержащая гемолизованных клеток крови.

Для того, чтобы определить возможные конформационные последствия разрыва дисульфидных связей, с помощью программы Insight 2 смоделировали разрыв Cys330-Cys348 и Cys516-Cys528 в составе N-домена. Для того, чтобы стабилизировать молекулу N-домена в процессе молекулярной динамики, зафиксировали положение основной полипептидной цепи (но не боковые цепи) половины белковой глобулы, содержащей мостик Cys128-Cys136. В структуре N-домена принудительно размыкали один или оба дисульфидных мостика Cys330-Cys348 и Cys516-Cys528 путем замены S-S связи на две пространственно разделенные SH-группы. Затем проводили 500 шагов молекулярной динамики длительностью по 0,1 пс. Сравнение полученных моделей с разомкнутыми и интактными S-S мостиками проводили визуально методом наложения (рис. 34). Эксперимент повторяли для закрытой (PDB: 2C6N [18]) и открытой [10,100] (построена по гомологии с АПФ2 PDB: 1R42 [118]) моделей N-домена. 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 анализе модели N-домена в открытой конформации фермента 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

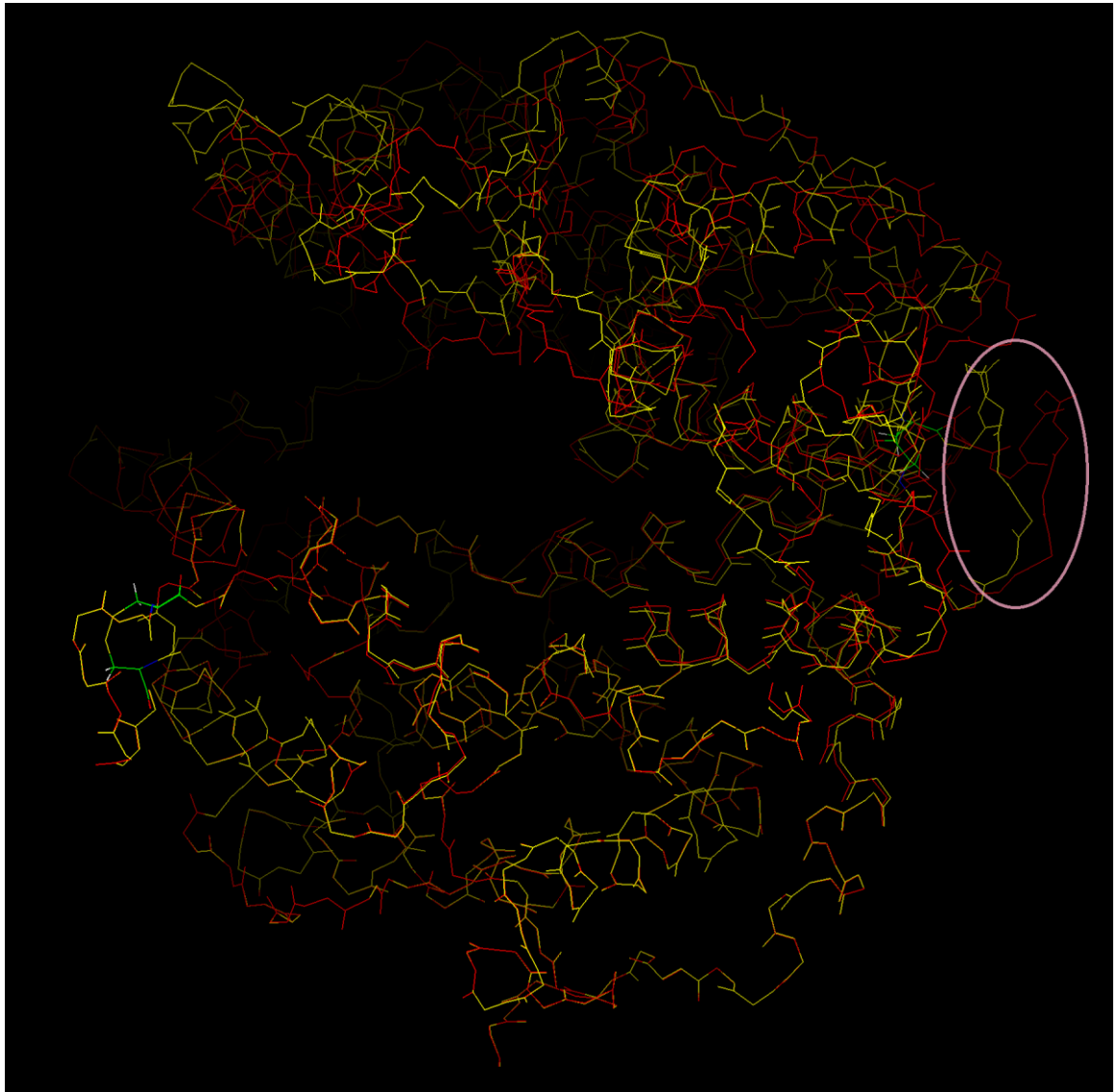


Рис. 34. Структура N-домена в открытой конформации с разомкнутым дисульфидным мостиком Cys516-Cys528 до процедуры молекулярной динамики (желтые линии) и после нее (красные линии). Молекулы цистеина, образующие мостик, покрашены зеленым. Розовым отмечено изменение положения петли, находящейся в непосредственной близости от мостика Cys516-Cys528.

полузакрытом положении после первых 200 шагов молекулярной динамики. В качестве примера на рис. 34 представлена структура N-домена с разомкнутым дисульфидным мостиком Cys516-Cys528 до процедуры молекулярной динамики (желтые линии) и после нее (красные линии). Видно, что в процессе молекулярной динамики структуры с разомкнутым дисульфидным мостиком Cys516-Cys528 происходит изменение положения петли, расположенной в непосредственной близости от этого мостика в эпитопе связывания мАт 1G12, что может объяснять изменение связывания этого мАт при восстановлении этого S-S мостика.

Для того, чтобы прояснить полученную картину, воспользовались программным комплексом DynDom, расположенным в свободном доступе в интернете по адресу <http://fizz.cmp.uea.ac.uk/dyndom/> и предназначенным для определения движущихся частей ферментов. Результаты представлены на рис. 35. В модели N-домена со всеми интактными дисульфидными мостиками (рис. 35 А, В) наблюдается явное наличие движения открывания-закрывания щели активного центра, что было продемонстрировано ранее в работе [10]. В движении открывания-закрывания щели активного центра в этом случае принимает участие большое количество аминокислот, а именно: 18 - 30, 65 - 71, 277 - 279, 283 - 286, 297 - 298, 303 - 304, 318 - 319, 333 - 334, 336 - 337, 342 - 345, 349 - 351, 366 - 367, 379 - 380, 400 - 401, 415 - 416. В случае, когда был разомкнут один или оба цистеиновых мостика, движение открывания-закрывания щели активного центра не наблюдалось. На рис. 35 (С, D) для иллюстрации показана модель N-домена с разомкнутым цистеиновым мостиком Cys516-Cys528. Интересно отметить, что несмотря на отсутствие движения как такового, имеется ряд аминокислотных остатков, изменяющих свое положение в пространстве, а именно: 29 - 30, 60 - 76, 86 - 88, 90 - 100. Исходя из полученных данных логично предположить, что восстановление одного или нескольких дисульфидных мостиков должно сказаться на активности фермента. И действительно, как указывалось выше, GSH и DTT в концентрациях 5 мМ и 3мМ соответственно подавляли активность АПФ на 35%.

На рис. 28 на N-домене в области перекрывающихся эпитопов связывания мАт 1G12, 6A12 и i2H5 хорошо заметен конформационно-подвижный участок (покрашен коричневым), принимающий участие в движении открывания-закрывания щели активного центра. Этот участок представляет собой две петли, состоящие из аминокислотных остатков 520-523 и 529-533. Этот же участок содержит дисульфидный мостик Cys516-Cys528. Наличие такого подвижного участка в эпитопе связывания мАт позволяет предположить наличие ингибирующих свойств у этих мАт. И действительно, мАт i2H5 в растворе эффективно

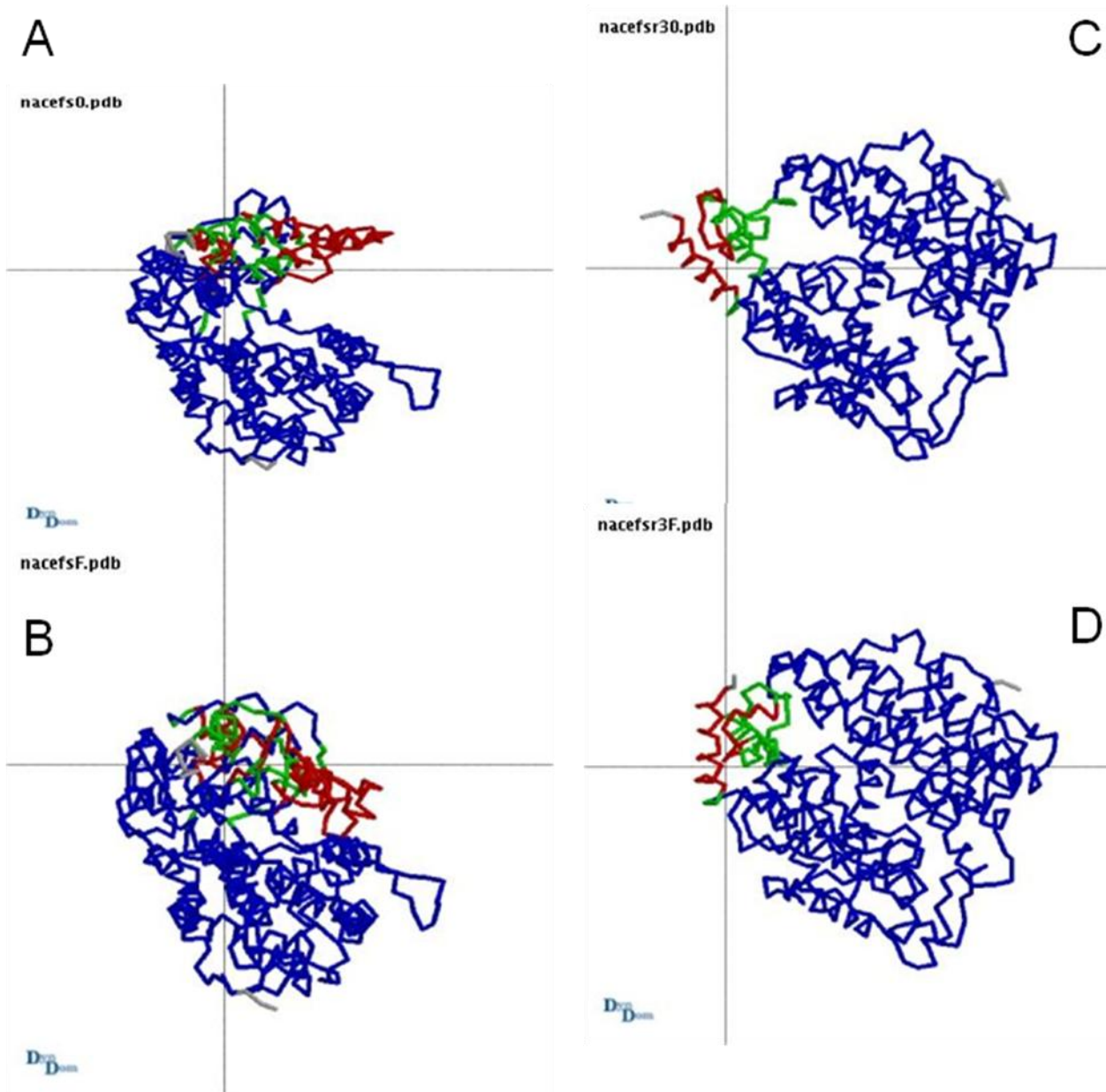


Рис. 35. Влияние размыкания дисульфидных мостиков на движение открывания-закрывания щели активного центра на примере N-домена АПФ. А, В – N-домен с интактными S-S связями; С, D – N-домен с разорванной связью Cys516-Cys528. Синим показаны не движущиеся участки фермента, красным – движущиеся, зеленым – изгибающиеся.

ингибирует скорость гидролиза субстратов ZPHL и NHL ($IC_{50} = 0.54$ мкг/мл) [10]. При этом мАт 1G12 и 6A12 проявляют лишь слабые ингибирующие свойства (IC_{50} не указано) [9].

Возможно, именно взаимосвязь конформационно-подвижного участка с дисульфидным мостиком делает эпитоп связывания мАт 1G12 таким чувствительным к изменению конформации АПФ под воздействием различных эффекторов. Таким образом, можно заключить, что состояние дисульфидных мостиков и свободных остатков цистеина существенным образом может влиять как на конформацию АПФ, так и на его функционирование.

7.2. Влияние восстановления дисульфидных связей на конформационную изменчивость ангиотензин-превращающего фермента под действием ингибиторов фермента

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. 36 представлены для сравнения эффекты глутатиона (А), эналаприлата (В) и эффект эналаприлата на АПФ, предварительно модифицированный глутатионом (С) на связывание панели мАт с сАПФ в составе плазмы крови. При сравнении рис. 36 А, В и С в первую очередь заметно, что общая картина изменения связывания всей панели мАт под влиянием глутатиона и эналаприлата практически одинаковая. А именно, в присутствии GSH, так же, как и в присутствии эналаприлата возрастает связывание мАт ВВ9, i2H5, 1G12 (к N-домену) и 3F11 (к С-домену) и понижается связывание мАт 3A5 (к N-домену) и 1E10 (к С-домену). Следует отметить, что существуют участки поверхности АПФ, конформация которых изменяется под действием эналаприлата, но не глутатиона. Такими участками являются эпитопы связывания мАт 6A12 (содержит Cys516-Cys528 в эпитопе), мАт 3F10 (содержит Cys728-Cys734 в эпитопе) и мАт 4E3. Таким образом видно, что разрыв дисульфидных мостиков влияет на связывание не всех мАт, подверженных влиянию эналаприлата, то есть существует некоторая разница в конформационном ответе белковой глобулы сАПФ на глутатион и эналаприлат.

Отметим, что эффект эналаприлата на связывание мАт выражен чуть ярче, чем эффект глутатиона. Например, связывание мАт i2H5 (содержит Cys516-Cys528 в эпитопе) в присутствии глутатиона возрастает на 90%, в присутствии эналаприлата на 150%, а при

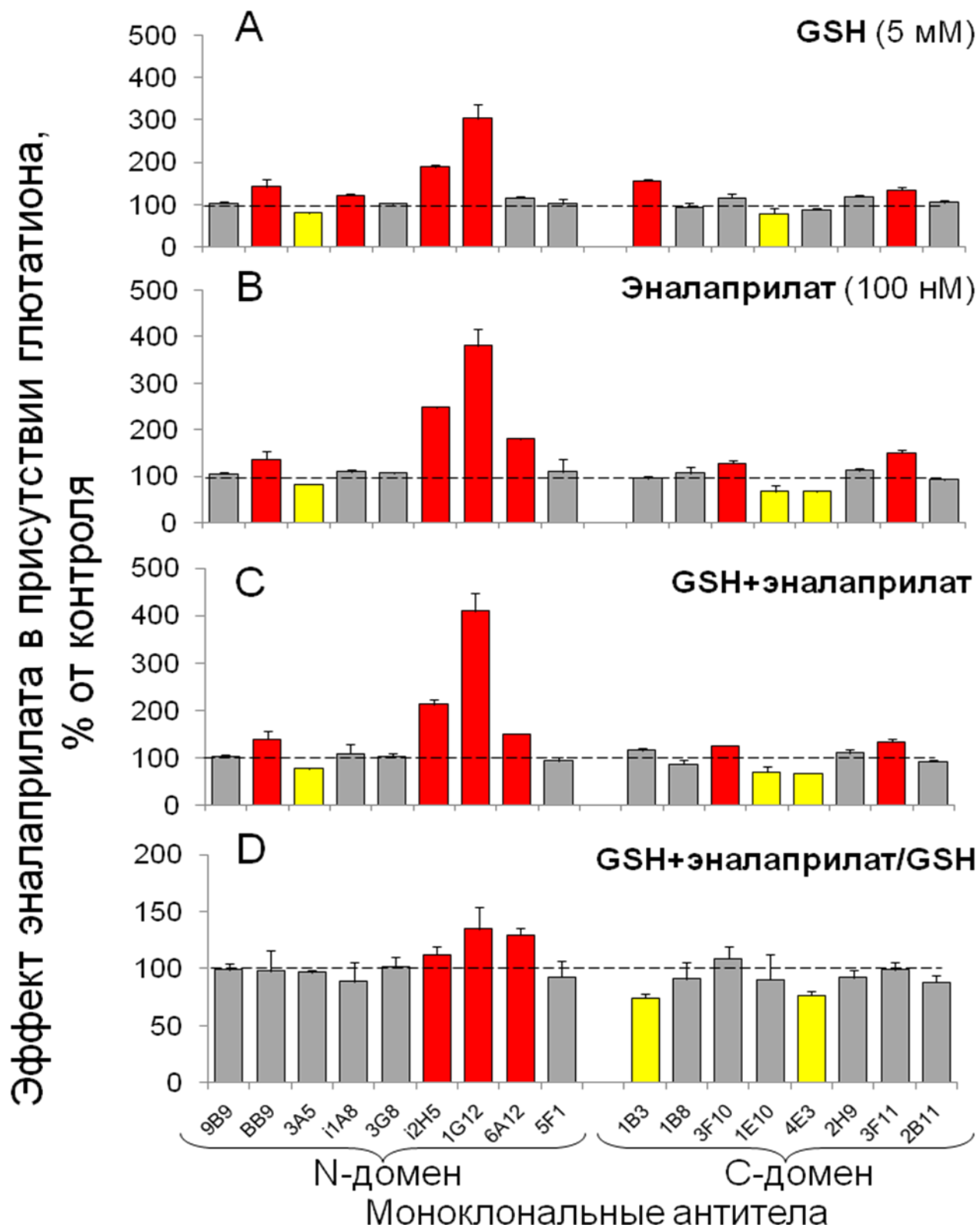


Рис. 36. Изменение связывания панели мАт с сАПФ в плазме крови под влиянием глутатиона (А), эналаприлата (В), эналаприлата после обработки АПФ глутатионом (С); D – отношение С/А.

воздействии эналаприлатом на плазму, предварительно обработанную глутатионом, связывание этого мАт возрастает на 110%. Связывание мАт 1G12 (содержит Cys516-Cys528 в эпитопе) возрастает соответственно на 200%, 280% и 310%, мАт BB9 – на 40%, 35% и 40% соответственно. Связывание мАт 3F11 (к С-домену, содержит Cys1114-Cys1126 в эпитопе) возрастает соответственно на 35%, 50% и 35%. Связывание мАт 3A5 снижается на 20%, 20% и 20%, а связывание мАт 1E10 – на 20%, 30% и 30% соответственно. Связывание мАт 9B9, 3G8, 5F1 (к N-домену) и мАт 1B8 и 2H9 (к С-домену) не изменяется во всех трех случаях. Эти данные свидетельствуют о том, что восстановление дисульфидных мостиков так изменяет конформацию АПФ, что последующее связывание эналаприлата уже не приводит к каким-либо значительным изменениям конформации фермента в этих участках.

Аналогичный анализ был проведен с тепротидом. Результаты представлены на рис. 37. При сравнении рис. 37 А и В видно, что картины связывания панели мАт с сАПФ крови под влиянием GSH и тепротидом совершенно различны. Сравним сначала влияние глутатиона и тепротидом на связывание мАт к N-домену в составе сАПФ (рис. 37 А, В). В первую очередь видна качественная разница в эффектах глутатиона и тепротидом на связывание мАт i2H5, 1G12 и 6A12 эпитопы которых перекрываются и содержат в своем составе дисульфидный мостик Cys516-Cys528. Под влиянием глутатиона связывание мАт i2H5 возрастает на 90%, 1G12 – на 200%, а связывание мАт 6A12 не изменяется. Тепротид оказывает обратный эффект на связывание этих мАт, а именно, связывание мАт i2H5 снижается на 20%, 1G12 – на 70%, 6A12 – на 70%. Можно выделить еще ряд мАт к N-домену, эффект глутатиона и тепротидом на которые различается – это мАт 3A5, связывание которого понижается на 20% под влиянием GSH и не меняется под действием тепротидом, а также мАт i1A8, связывание которого повышается на 25% под влиянием GSH и не меняется под действием тепротидом. Связывание мАт 5F1 не меняется под действием GSH, но понижается на 25% под влиянием тепротидом. мАт 9B9 и 3G8 индифферентны к наличию в системе тепротидом или глутатиона.

Из всех мАт к N-домену только для мАт BB9 наблюдается качественно одинаковый эффект – повышение связывания, а именно, под действием GSH связывание этого мАт повышается на 40%, а под действием тепротидом – на 70%. Однако, стоит отметить, что при действии тепротидом на фермент, модифицированный глутатионом, связывание этого мАт возрастает только на 40%, то есть лишь до того уровня, который достигался при действии на АПФ глутатионом. При последовательном действии сначала GSH, а затем тепротидом связывание мАт i2H5 возрастает на 115%, 1G12 – на 210%, а связывание мАт 6A12 не изменяется – абсолютно так же эти мАт отвечали на действие только GSH. Из рис. 37 D

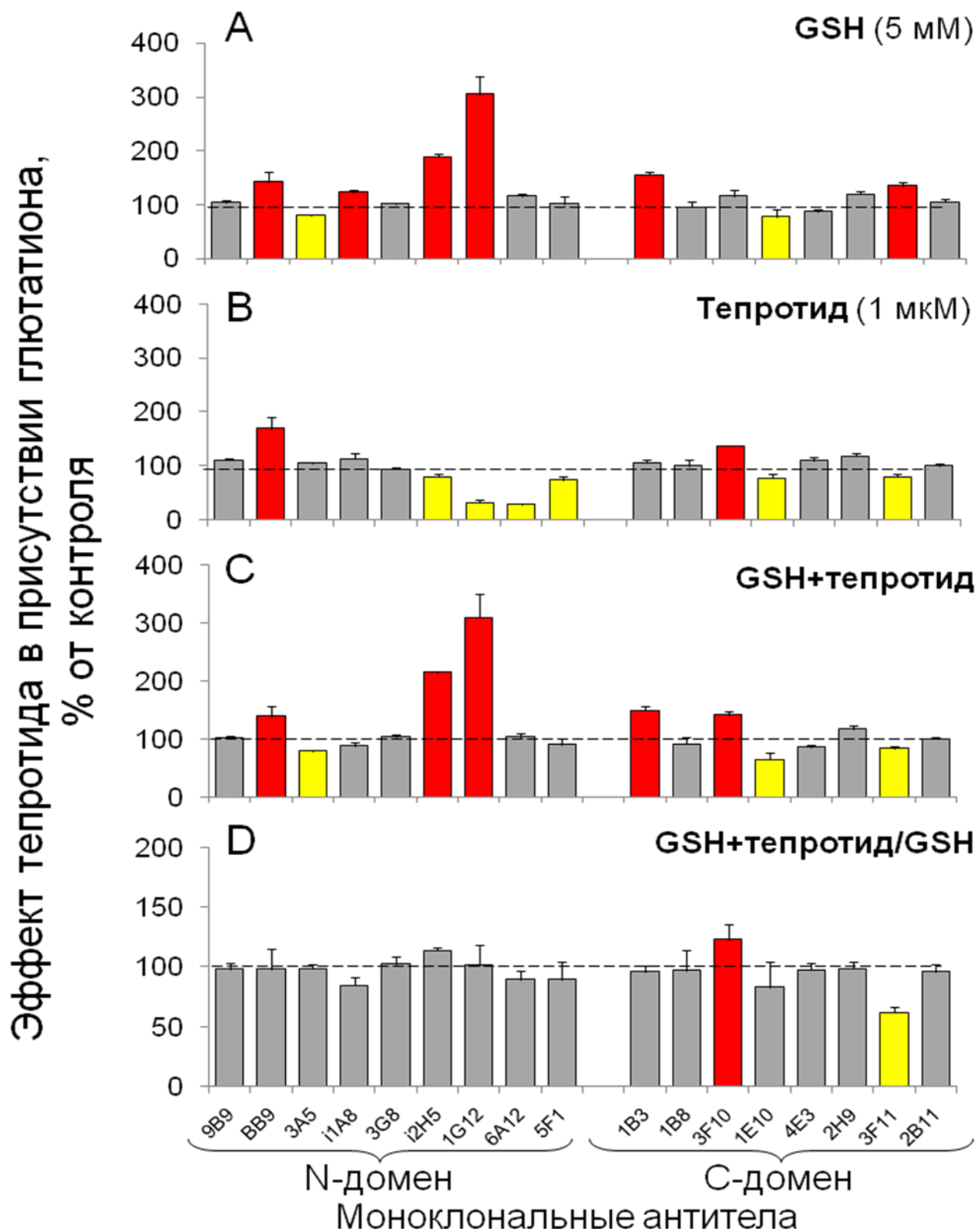


Рис. 37. Изменение связывания панели мАТ с сАПФ в плазме крови под влиянием глутатиона (А), тепротида (В), тепротида после обработки АПФ глутатионом (С); D – отношение С/А.

видно, что эффект тепротида на АПФ, модифицированный глутатионом, ничем не отличается от эффекта глутатиона на связывание МАТ к N-домену. То есть при действии тепротида на АПФ, модифицированный глутатионом, эффект тепротида не проявляется. Таким образом, показали, что разрыв дисульфидных мостиков в N-домене приводит к значительным конформационным изменениям фермента, причем последующее связывание тепротида уже не способно изменить такую конформацию N-домена.

Рассмотрим влияние глутатиона и тепротида на связывание МАТ к С-домену с сАПФ крови (рис. 37 А, В). Видно, что для ряда МАТ, так же, как и для N-домена, эффект глутатиона и тепротида на связывание МАТ к С-домену различен. В частности, связывание МАТ 1В3 под влиянием GSH возрастает на 50% ,а под влиянием тепротида не меняется. Связывание МАТ 3F10 под влиянием GSH не меняется, а под влиянием тепротида возрастает на 35%. Связывание МАТ 3F11 под влиянием GSH возрастает на 35%, а под влиянием тепротида падает на 20%. Здесь также можно выделить ряд МАТ, индифферентных к наличию в системе тепротида или глутатиона, а именно: МАТ 1В8, 4Е3, 2Н9 и 2В11 к С-домену. Так же, как и в случае с N- доменом, из всех МАТ к С-домену можно заметить одно МАТ 1Е10, для которого наблюдается качественно одинаковый эффект – понижение связывания в присутствии как глутатиона, так и тепротида на одинаковую величину 20%.

Сравним теперь полученные данные по влиянию тепротида и глутатиона на связывание с АПФ МАТ к С-домену с влиянием тепротида на связывание МАТ с АПФ, модифицированным глутатионом (рис. 37 С, D). Так, при действии тепротидом на АПФ, модифицированный глутатионом, связывание МАТ 3F10 возрастает на 40%, связывание МАТ 3F11 падает на 15% – абсолютно так же эти МАТ отвечали на действие только тепротида, но не GSH. Для МАТ 1В3 в тех же условиях воспроизводится эффект глутатиона (повышение связывания на те же 50%), но не тепротида. Относительно МАТ 1Е10 дельзя сделать никаких выводов, поскольку связывание этого МАТ во всех трех случаях изменяется одинаково – снижается на 20%.

Таким образом показали, что разрыв дисульфидных мостиков в С-домене приводит к значительным конформационным изменениям фермента; наблюдаемые изменения (за исключением МАТ 1Е10) противоположны действию тепротида на С-домене в составе сАПФ. Часть поверхности С-домена в составе сАПФ (а именно, эпитоп связывания МАТ 1В3) под действием глутатиона претерпевает такие конформационные изменения, что связывание тепротида уже не может изменить такую конформацию. Другая часть С-домена (неперекрывающиеся эпитопы связывания МАТ 3F10 и 3F11) претерпевает одинаковые изменения при действии тепротида на интактный фермент и на фермент, модифицированный

глутатионом. То есть тепротид, в отличие от эналаприлата, способен изменять конформацию С-домена АПФ, модифицированного глутатионом.

Подводя итог, можно заключить, что восстановление дисульфидных мостиков в сАПФ крови приводит к существенным конформационным изменениям белковой глобулы. При этом конформационный ответ сАПФ на связывание эналаприлата и тепротида сильно изменяется и зависит от структуры используемого ингибитора.

8. ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С УРЕМИЕЙ

8.1. Анализ связывания моноклональных антител с ангиотензин-превращающим ферментом в норме и при развитии уремии

Используемые в данной работе мАт известны своей чувствительностью к конформационным изменениям, индуцированным гликановой составляющей белковой глобулы [16] и связыванием ингибиторов в активном центре [9]. Кроме того, как показано выше, модификация АПФ глутатионом тоже приводит к изменению связывания мАт с ферментом. Мы предположили, что заболевания, характеризующиеся выбросом в кровоток токсических соединений, могут сопровождаться конформационными изменениями АПФ в крови. Известно, что при развитии уремии в крови повышается концентрация многих соединений, например, гуанидин хлорид [193,194], метилглиоксаль [195,196] и глутатион [197,198]. Поэтому такой чувствительный инструмент, как мАт, может быть полезен для определения конформации АПФ при развитии уремии. Поэтому мы исследовали способность перечисленных соединений влиять на эффективность связывания мАт с АПФ в составе плазмы крови. Для гуанидин хлорида и метилглиоксаля концентрации составили 5 мМ и 1 мМ соответственно. Оказалось, что метиоглиоксаль и гуанидин хлорид в выбранных концентрациях не повлияли на эффективность связывания мАт с сАПФ в составе плазмы крови. Данные представлены на рис. 38. Изменение эффективности связывания мАт с АПФ в составе плазмы крови под влиянием глутатиона обсуждалось ранее (глава 7.1, рис. 33)

Уремия является патологическим заболеванием, характеризующимся высоким содержанием в крови токсических соединений [199] вследствие недостаточной очистки крови в почках. Пациенты с хронической почечной недостаточностью подвержены повышенному окислительному стрессу, причиной которого являются уремические токсины с дальнейшим усугублением ситуации при гемодиализе, наличии хронического воспалительного состояния и т.д. [200–202]. В частности, из литературы известно, что уровень глутатиона в крови значительно повышен у пациентов в конечной стадии развития почечной недостаточности и у пациентов на гемодиализе [197,198]. В то же время повышение концентрации глутатиона является индикатором механизма адаптации организма при окислительном стрессе, наблюдающемся у пациентов с почечной недостаточностью. Поэтому мы исследовали как активность АПФ в крови пациентов, так и

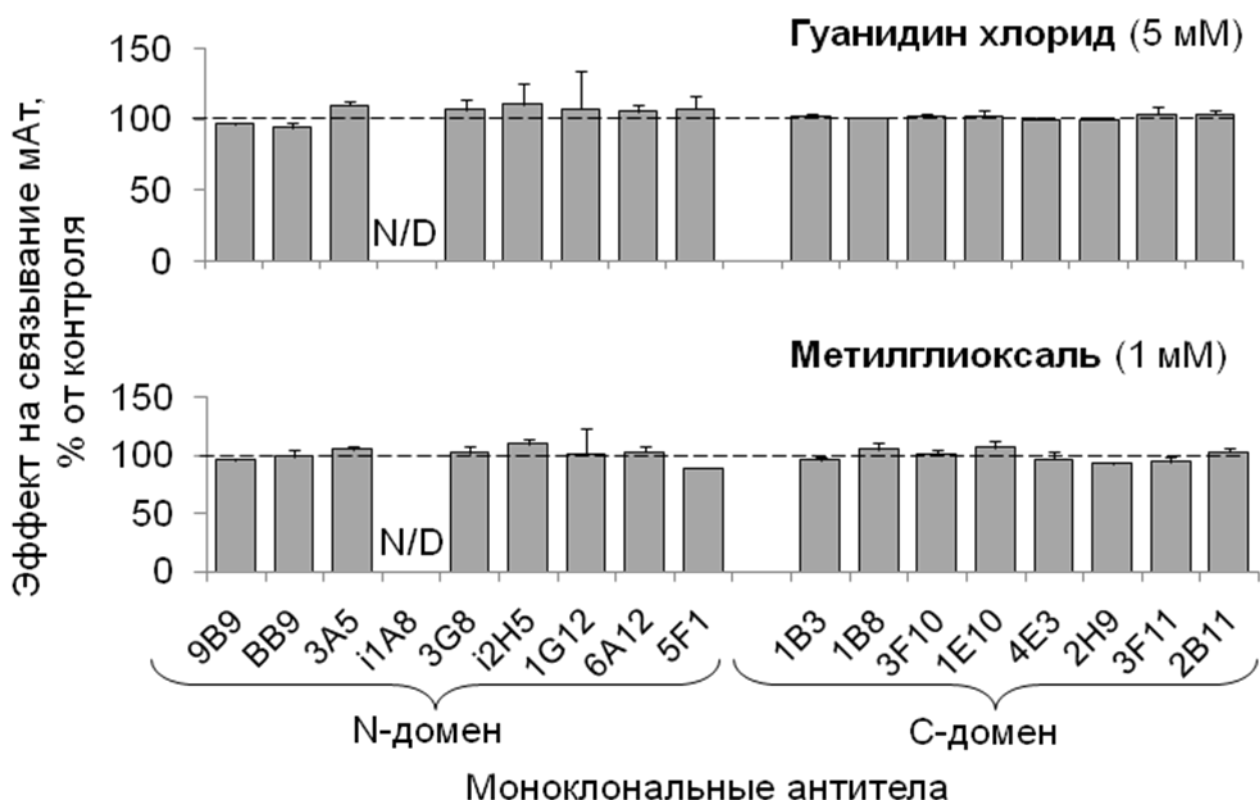


Рис. 38 Влияние гуанидин хлорида (5 мМ) и метилглиоксаля (1 мМ) на связывание мАт с сАПФ в составе плазмы крови.

связывание такого фермента с мАт для регистрации возможного изменения конформации АПФ при уремии. Для исследования были выбраны пациенты в конечной стадии почечной недостаточности с диагнозом уремия и находящиеся на регулярном гемодиализе (трижды в неделю по 4 часа). Средний возраст пациентов составил $58,3 \pm 8,5$ лет, а средняя продолжительность гемодиализа составила 151 ± 32 месяца. Отбор крови осуществляли до гемодиализа, чтобы получить образцы с максимальным содержанием токсических соединений. Из крови получали цитратную плазму, которую хранили при -18°C не дольше трех месяцев (на период проведения исследований активности и иммунохимической характеристики).

Известно, что нарушения работы сердечно-сосудистой системы являются наиболее распространенной причиной смерти взрослых пациентов с почечной недостаточностью, чья смертность составляет 20% в год [203,204]. Важно отметить, что положительный эффект ингибиторов АПФ на риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов без почечной недостаточности был многократно и однозначно продемонстрирован [205,206]. Однако большинство клинических исследований по предотвращению сердечно-сосудистых заболеваний исключали из рассмотрения пациентов с почечной недостаточностью [207,208].

Более того, при исследовании эффективности фозиноприла для лечения сердечнососудистых заболеваний у пациентов с уреимией выяснилось, что этот ингибитор оказался не достаточно эффективен по отношению к таким пациентам [208]. Таким образом, остается открытым вопрос, можно ли применить результаты исследований, устанавливающих эффективность лекарственных средств и методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, эффективность лечения ингибиторами АПФ, к пациентам с почечной недостаточностью, в крови которых есть токсические соединения.

В настоящее время предложено несколько механизмов, осложняющих терапию ингибиторами АПФ: полиморфизм гена АПФ [209], активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы [210], степень поврежденности почек, предшествующая ингибированию АПФ [211], различная степень элиминирования лекарственных препаратов из организма пациентов отвечающих и не отвечающих на терапию ингибиторами АПФ [212]. Можно предположить, что при почечной недостаточности ответ на ингибиторы АПФ может существенно искажаться в присутствии уремических токсинов. Причиной такого искажения могут являться конформационные изменения в молекуле АПФ, индуцированные токсическими соединениями в крови больных уреимией. Для того чтобы проверить эту гипотезу, был проведен более глубокий и тщательный анализ АПФ в крови каждого конкретного пациента.

При анализе образцов крови использовали уже отлаженный подход (см. главу 4.2.6 в методах), при котором плазму крови анализировали по нескольким параметрам: 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 [175]; 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 этих ингибиторов [9]; 5) определение эффективности связывания всей панели мАт с АПФ больных уреимией и здоровых доноров.

На рис. 39 А представлена активность АПФ из плазмы крови 7 здоровых добровольцев и 20 пациентов с хронической уреимией при гидролизе субстрата ZPHL. У 5 из 20 пациентов уровень активности АПФ оказался повышенным, что подтверждает найденные в литературе упоминания о встречающейся повышенной активности АПФ у больных уреимией [71–73].

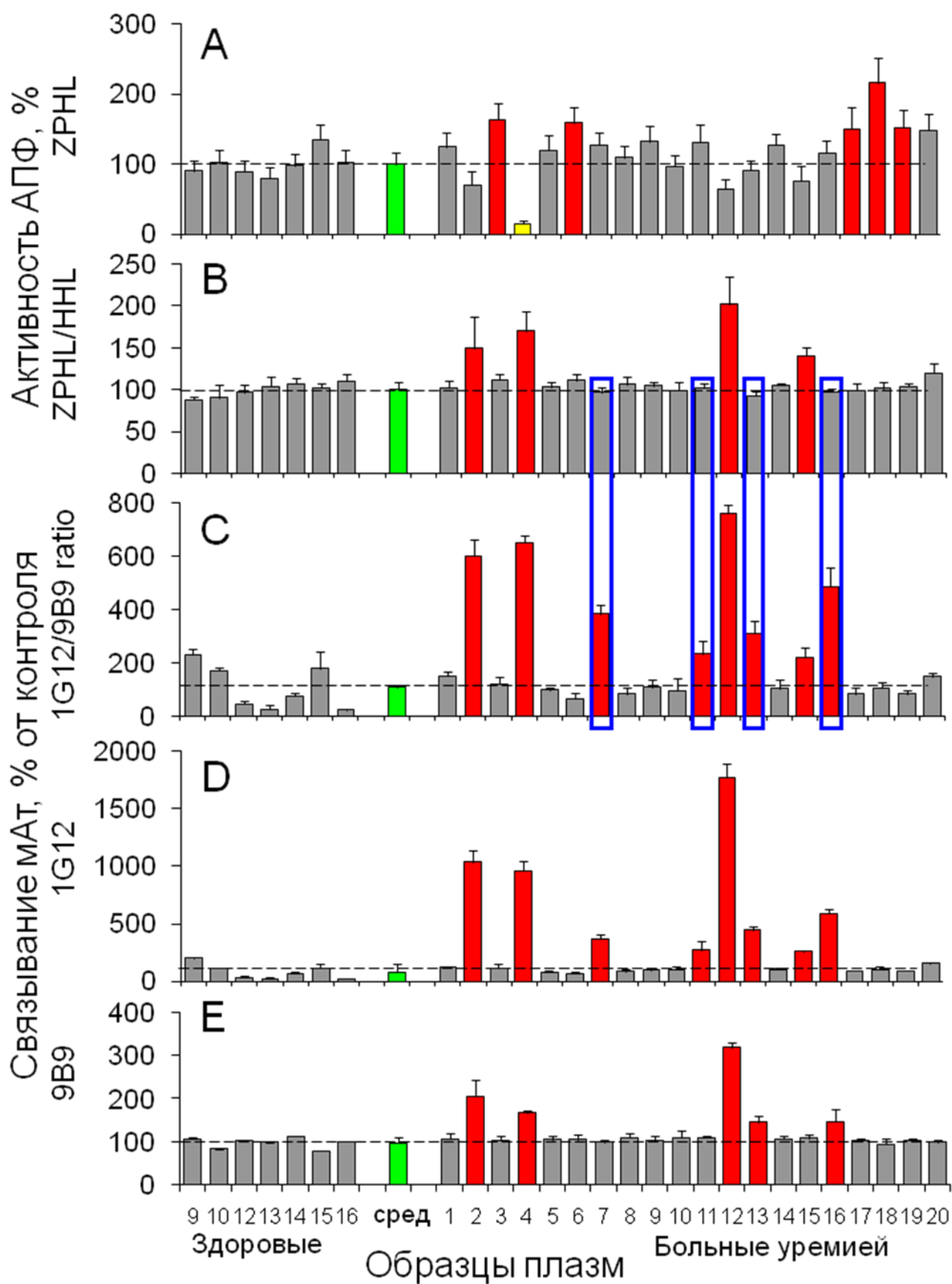


Рис. 39. Анализ плазмы крови здоровых доноров и больных уремии.

На рис. 39 В представлено соотношение скоростей гидролиза двух синтетических субстратов ZPHL/HNL. Этот параметр в нормальной популяции значительно более стабилен ($100\pm 3\%$) [54], чем скорость гидролиза любого из этих двух субстратов, которая отклоняется от среднего достаточно сильно ($100\pm 30\%$) [57,175]. Из рисунка ясно видно, что соотношение ZPHL/HNL сильно повышено у 4 из 20 пациентов (номера 2, 4, 12 и 15), что указывает на присутствие в крови этих пациентов ингибиторов АПФ (в соответствии с [54]).

Помимо определения скорости гидролиза синтетических субстратов у больных и здоровых доноров была определена эффективность связывания мАт 9В9 с АПФ крови (рис. 39 Е). Важно отметить, что эффективность связывания этого мАт с АПФ не зависит от присутствия ингибиторов АПФ и соответствует уровню АПФ в крови [175]. Параллельно определяли связывание мАт 1G12 с АПФ из плазмы крови больных и здоровых доноров (рис. 39 D). Связывание этого мАт значительно повышается (в 3-5 раз) в присутствии распространенных ингибиторов АПФ (таких как эналаприлат) [9]. При сравнении эффективности связывания любого мАт с АПФ нескольких индивидуумов важно принимать во внимание тот факт, что уровень АПФ в их крови может быть разным, поэтому для корректного сравнения необходимо использовать соотношение мАт/9В9 (благодаря индифферентности мАт 9В9 к присутствию любых используемых в данной работе эффекторов) вместо прямого сравнения эффективности связывания данного конкретного мАт с АПФ разных индивидуумов. Оказалось, что связывание мАт 1G12, и, что более важно, соотношение 1G12/9В9 (рис. 39 С) возрастало в плазме крови тех же 4 пациентов, у которых было повышено соотношение ZPHL/HNL (номера 2, 4, 12 и 15), подтверждая таким образом наличие в их крови ингибиторов АПФ.

Этот же подход позволил выявить 4 других пациента с уреимией (номера 7, 11, 13 и 16), у которых соотношение 1G12/9В9 повышено, но при этом соотношение ZPHL/HNL абсолютно нормальное (рис. 39 В и С в рамке). Это позволило заключить, что по крайней мере у этих четырех пациентов может быть изменена локальная конформация эпитопа к мАт 1G12 на N-домене фермента. Важно подчеркнуть, что причиной этих изменений не могут быть ингибиторы АПФ, т.к. соотношение ZPHL/HNL в норме, что позволяет предположить, что конформация могла быть изменена вследствие влияния токсических соединений, присутствующих в крови больных уреимией.

Для того, чтобы определить возможные конформационные изменения АПФ на других участках глобулы фермента, протестировали эффективность связывания панели мАт к N- и С-домену АПФ с АПФ в составе плазмы крови этих четырех пациентов (номера 7, 11, 13 и 16) по сравнению со связыванием этой же панели мАт с АПФ в составе плазмы крови

здоровых доноров. Оказалось, что кроме уже упомянутой повышенной эффективности связывания мАт 1G12 к N-домену АПФ, повышена на 60% эффективность связывания мАт 1B3 к C-домену АПФ (рис. 40). Одной из причин такого увеличения связывания могло 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 неспаренный Cys1072 в эпитопе мАт 1B3. Интересно отметить, что данный эффект похож на эффект DTT, GSH (рис. 34) и DTNB, однако существует некоторая разница между эффектом этих веществ и обнаруженным эффектом в крови больных уреимией. А именно, связывание мАт 6A12 и i2H5 с АПФ в составе плазмы крови больных уреимией практически не изменилось, несмотря на то, что эпитопы связывания этих мАт частично перекрываются с эпитопом мАт 1G12, и под влиянием GSH связывание мАт i2H5 значительно возрастало, а при гемолизе увеличивалось связывание всей тройки мАт - 1G12, 6A12 и i2H5.

Таким образом, выявлены четверо пациентов, в крови которых АПФ конформационно изменен вследствие действия токсических веществ, содержащихся в крови при развитии уремии.

8.2. Анализ ответа конформационно измененного ангиотензин-превращающего фермента на связывание ингибиторов АПФ при развитии уремии

Поскольку ранее нами было установлено, что восстановление дисульфидных связей изменяет не только конформацию АПФ, но и его конформационный ответ на ингибиторы АПФ, мы протестировали влияние эналаприлата и тепротида на АПФ из крови больных уреимией. Для этого сравнили влияние эналаприлата и тепротида на соотношение 1G12/9B9 в крови пациентов, больных уреимией, с нормой. В качестве контроля использовали среднее значение соотношения 1G12/9B9 для 33 здоровых доноров. Как видно из рис. 41, соотношение 1G12/9B9 в крови ряда пациентов, больных уреимией (номера 1, 3, 9, 14, 17 и 18), в присутствии эналаприлата изменяется так же, как и у здоровых доноров. А именно: в отсутствие эналаприлата соотношение 1G12/9B9 в крови пациентов такое же низкое, как в норме (рис. 41 А, серые столбики); добавление эналаприлата вызывает такой же рост связывания, как в норме (рис. 41 А и В, красные столбики).

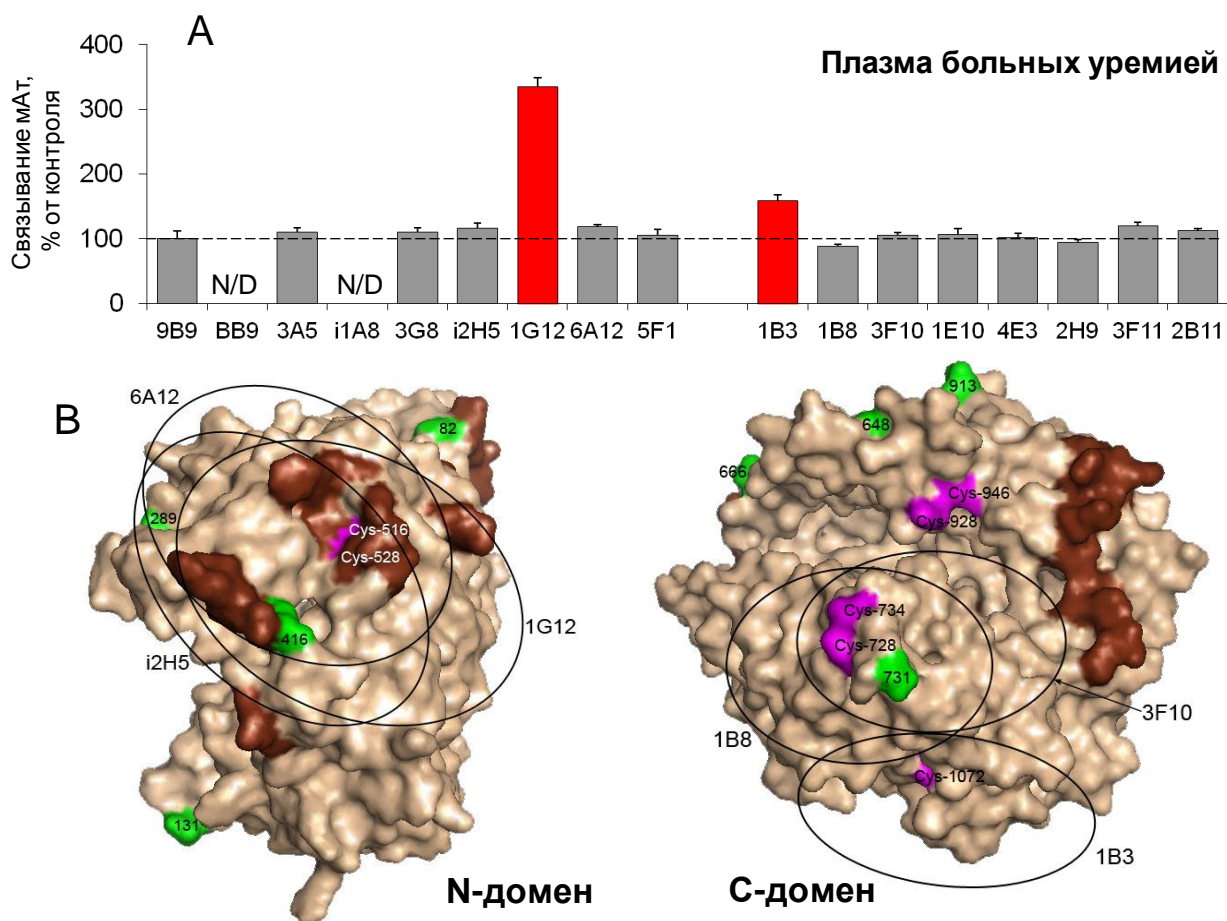


Рис. 40. А - связывание панели мАТ с сАПФ из крови больных уремией по сравнению с нормой. В - Расположение эпитопов связывания некоторых мАТ на поверхности N- и С-доменов АПФ. Зеленым отмечены сайты гликозилирования, фиолетовым – дисульфидные связи и свободные цистеины, коричневым – участки молекулы фермента, участвующие в движении открывания-закрывания щели активного центра.

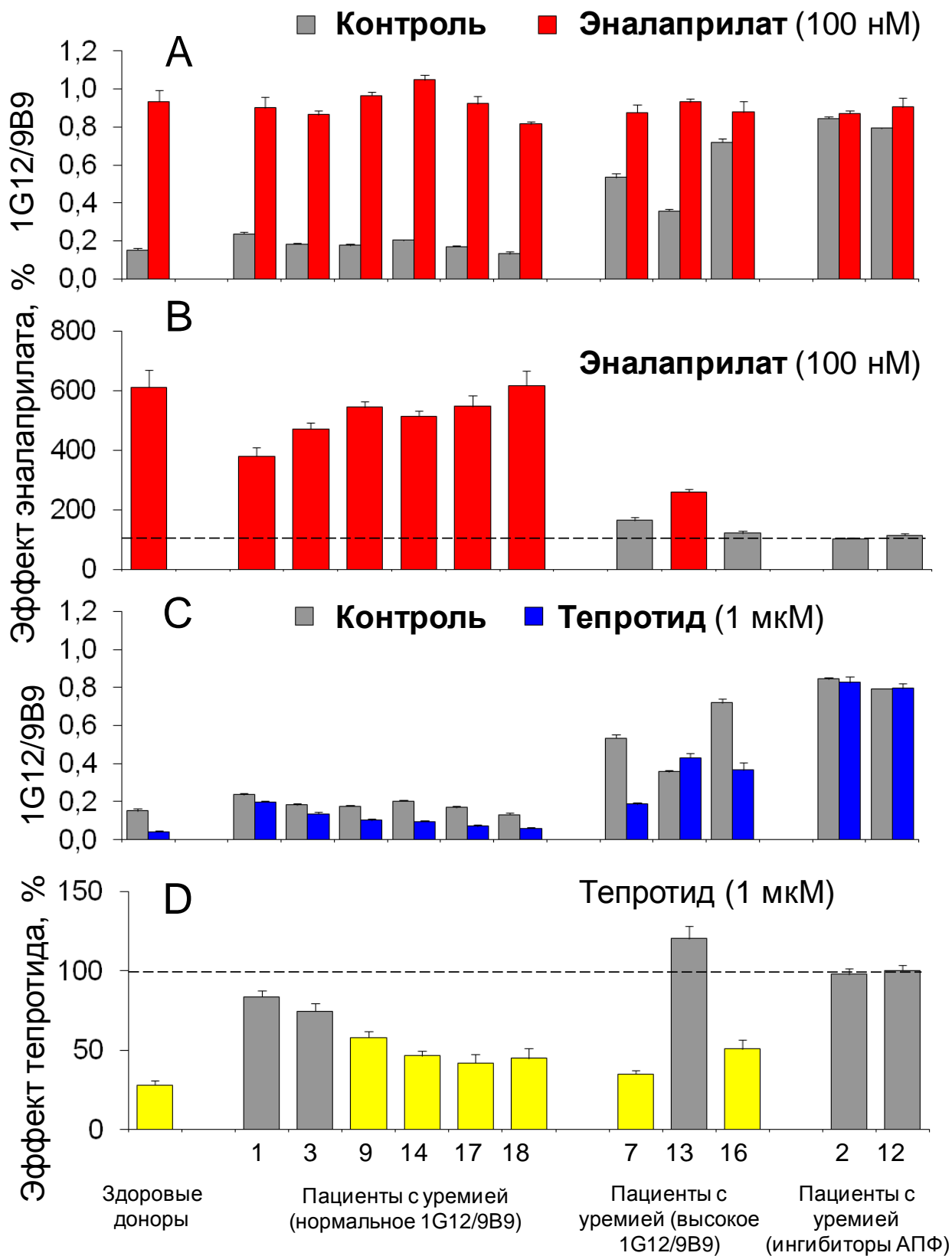


Рис. 41. Эффект эналаприлата (А, В) и тепротид (С, D) на соотношение связывания мАт 1G12/9B9 с АПФ крови в норме и при развитии уремии.

У пациентов 2 и 12 исходное соотношение 1G12/9B9 и ZPHL/HHL были повышены, что мы отнесли (см. выше) к присутствию ингибиторов АПФ в крови этих пациентов. Вполне логично, что внесение экзогенного ингибитора не привело к дальнейшим конформационным изменениям фермента в составе плазмы крови этих пациентов.

В случае ряда больных уреимией из числа выявленных четверых пациентов с повышенным соотношением 1G12/9B9 (номера 7, 13 и 16) оказалось, что увеличение экспонированности эпитопа мАт 1G12 под действием эналаприлата почти не наблюдается. Исходя из полученных данных можно предположить, что в крови по крайней мере части пациентов, больных уреимией, конформация АПФ изменена таким образом, что эпитоп связывания мАт 1G12 полностью (или почти полностью) экспонирован, и связывание ингибитора эналаприлата не способно дополнительно экспонировать этот эпитоп.

При работе с тепротидом наблюдалась другая ситуация (рис. 41 С, D). В группе пациентов с нормальным исходным соотношением 1G12/9B9 добавление тепротиды привело к снижению соотношения 1G12/9B9 только в 4 из 6 образцов (рис. 41 D, номера 9, 14, 17 и 18), причем это снижение было гораздо менее выраженным, чем в норме. Соотношение 1G12/9B9 для двух других образцов из этой группы (рис. 41 D, номера 1 и 3) почти не изменилось в присутствии тепротиды. Соотношение 1G12/9B9 в образцах 2 и 12, предположительно принимавших ингибиторы АПФ, также не изменилось, что указывает на то, что тепротид не смог отменить эффект ингибиторов, применяемых в качестве лекарственных средств, на конформацию АПФ крови.

В группе с повышенным исходным соотношением 1G12/9B9 (рис. 41 D, номера 7, 13 и 16) добавление тепротиды привело к снижению соотношения 1G12/9B9 только двух из трех образцов (номера 7 и 16), причем это снижение было гораздо менее выраженным, чем в норме. Соотношение 1G12/9B9 образца номер 13 не изменилось.

Итак, эффект тепротиды на АПФ больных уреимией оказался более индивидуальным, чем эффект эналаприлата. Важно подчеркнуть, что во всех протестированных образцах плазмы больных уреимией изменение конформации АПФ в присутствии тепротиды было менее выраженным, чем в норме, а в некоторых случаях (образцы 1, 3 и 13) конформация АПФ в присутствии тепротиды вообще почти не изменялась.

Итак, мы продемонстрировали, что в крови больных уреимией могут содержаться конформационно измененные молекулы АПФ, не способные, или гораздо менее способные

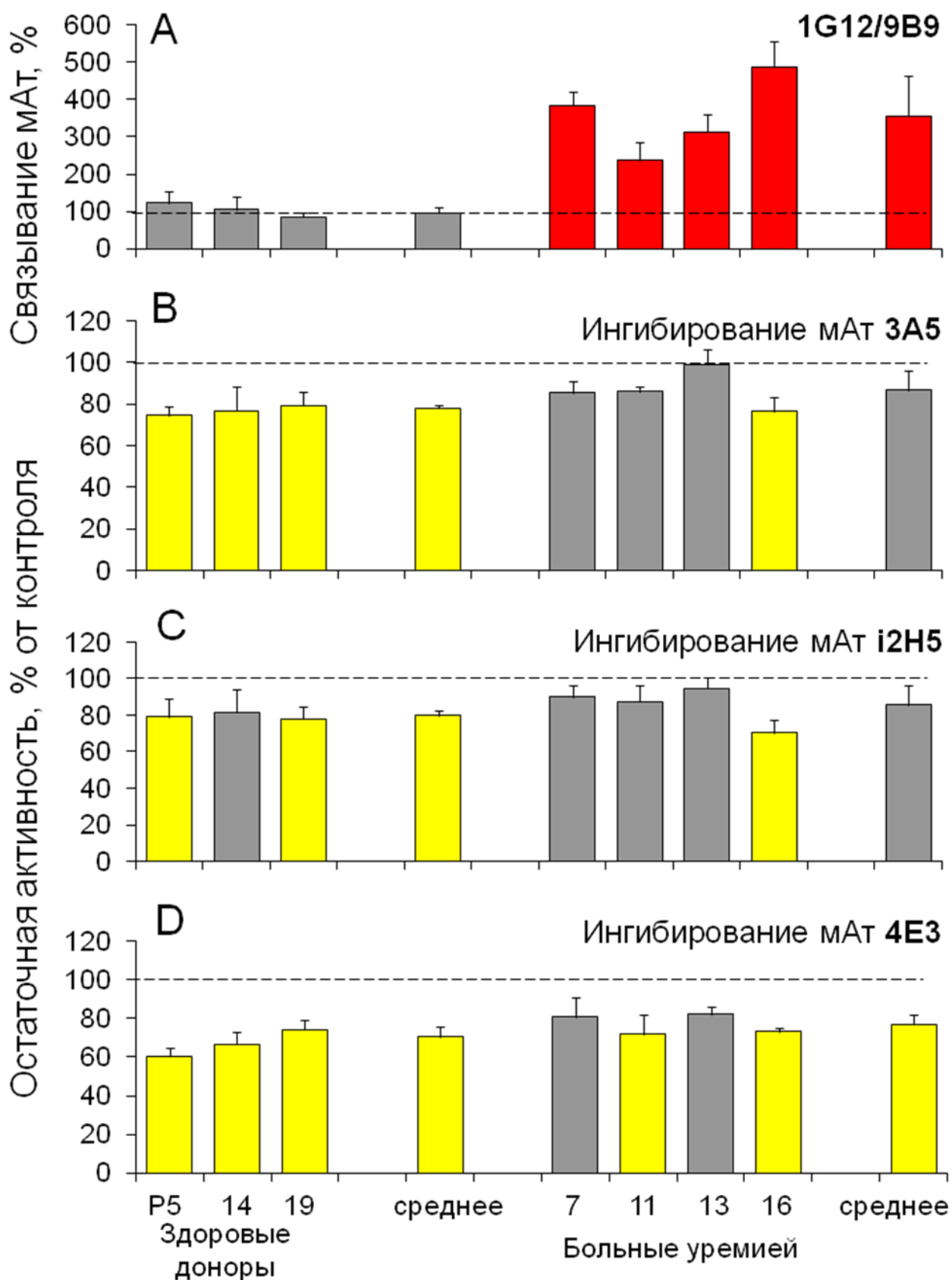


Рис. 42. Ингибирование активности сАПФ в составе плазмы крови пациентов с уремией моноклональными антителами. Условия: буфер Б (рН 8.3), 37°C, [МАТ]= $1 \cdot 10^{-7}$ М, [АПФ] $\approx 7,5 \cdot 10^{-12}$ М, [ZPHL]= $2 \cdot 10^{-3}$ М, [ННЛ]= $5 \cdot 10^{-3}$ М.

изменять конформацию поверхности при связывании ингибиторов в активных центрах АПФ. Следующим логическим шагом было исследование таких молекул с точки зрения подавления их активности.

Прежде всего, мы проверили влияние антикаталитических мАт к N- и С-домену на скорость гидролиза субстратов ZPHL (с мАт 3A5 и i2H5 к N-домену) и HHL (с мАт 4E3 к С-домену). Из рис. 42 видно, что по отношению по крайней мере к АПФ в составе плазмы крови 3 из 4 пациентов с повышенным соотношением 1G12/9B9 (номера 7, 11 и 13) антикаталитические мАт 3A5 и i2H5 продемонстрировали меньшую ингибирующую способность, чем по отношению к АПФ в составе плазмы крови здоровых доноров. В случае мАт 4E3 АПФ в составе плазмы крови 2 из 4 пациентов (номера 7 и 13) ингибировался хуже, чем в норме.

Наиболее важные результаты были получены в экспериментах с ингибированием эналаприлатом и тепротидом активности АПФ из крови больных уремией в сравнении со здоровыми донорами. В качестве субстратов использовали декапептид ангиотензин-I и синтетический субстрат ZPHL. Результаты представлены на рис. 43. Прежде всего, оказалось, что при гидролизе ангиотензина-I активность АПФ из крови некоторых больных уремией была значительно выше (до 4 раз), чем у здоровых доноров (рис. 43 E). Это относится в первую очередь к пациентам с повышенным соотношением 1G12/9B9. Этот результат не может быть объяснен более высоким уровнем АПФ в плазме крови больных уремией, поскольку у этих больных не было обнаружено увеличения связывания мАт 9B9 (рис. 39 E). Кроме того, активность АПФ из крови этих пациентов при гидролизе синтетического субстрата ZPHL была такой же, как у здоровых доноров (рис. 39 A).

Показано (рис. 43 A, B), что АПФ, характеризующийся повышенным соотношением 1G12/9B9, несколько менее восприимчив к ингибированию эналаприлатом при использовании субстрата ZPHL (номера 11 и 13) и еще менее восприимчив к ингибированию, если в качестве субстрата использовался декапептид ангиотензин-I (номера 11, 13 и 20).

При использовании в качестве ингибитора нонапептида тепротиды налицо оказалась еще более четкая дифференциация пациентов с нормальным и высоким соотношением 1G12/9B9. Интересно, что в случае АПФ с исходным высоким соотношением 1G12/9B9 эффективность ингибирования не зависела от длины субстрата (номера 11 и 13), а степень ингибирования можно считать пренебрежимо малой величиной (рис. 43 C, D).

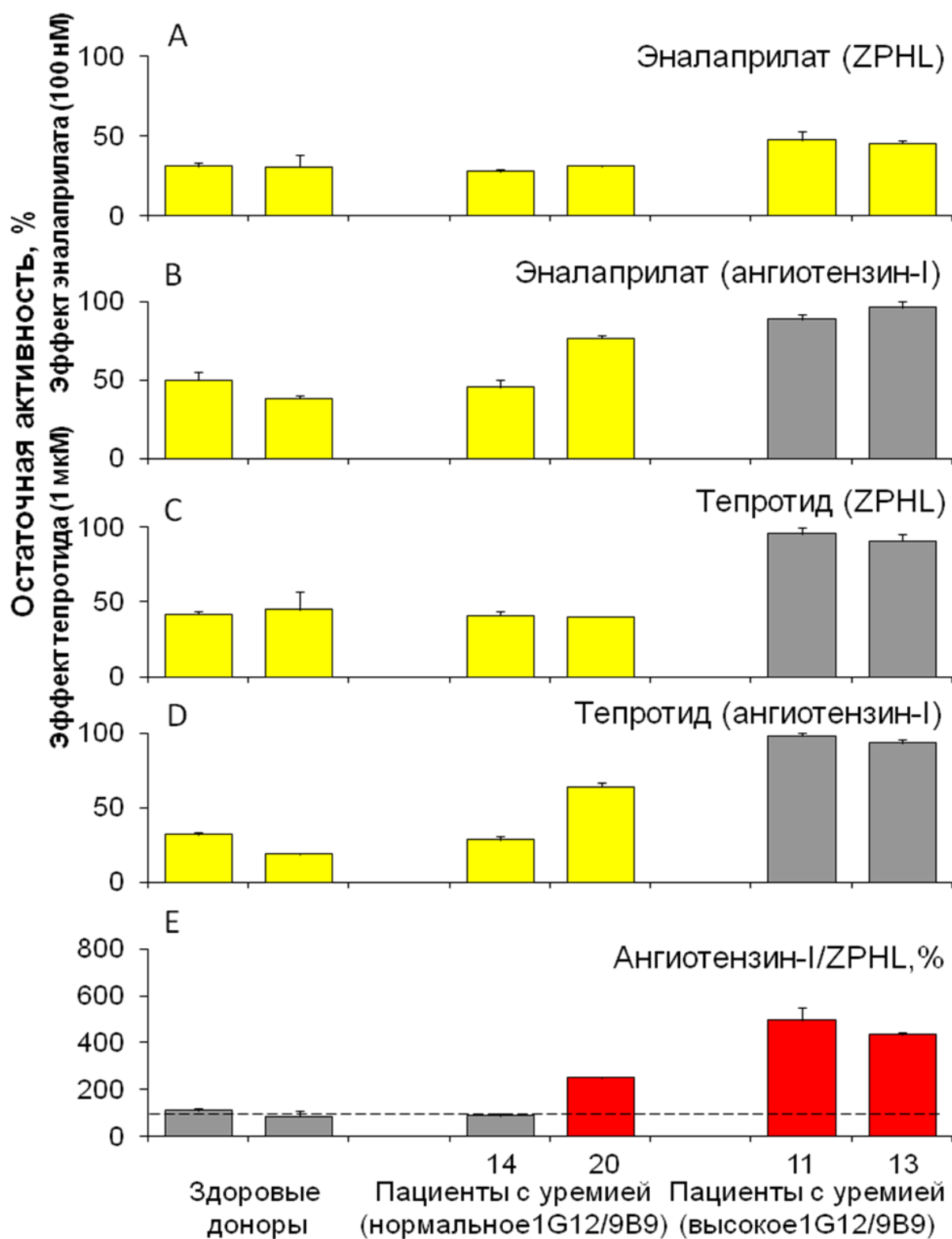


Рис. 43. Ингибирование эналаприлатом и тепротидом активности сАПФ в составе плазмы крови пациентов с уремией по двум субстратам – ZPHL и ангиотензину-I. А-D - остаточная активность, Е - соотношение активностей по двум субстратам (без ингибиторов). Условия: буфер Б (рН 8.3), 37°C, [АПФ]≈ $1,5 \cdot 10^{-11}$ М, [ZPHL]= $2 \cdot 10^{-3}$ М, [Ангиотензин-I]= $3,5 \cdot 10^{-4}$ М, [Эналаприлат]= $1 \cdot 10^{-7}$ М, [Тепротид]= $1 \cdot 10^{-6}$ М

Мы предположили, что ухудшение ингибирования образцов с повышенной активностью по ангиотензину-I может быть обусловлено большим содержанием АПФ в анализируемых образцах. Для того, чтобы проверить это, плазму крови одного из пациентов (номер 13) разбавили так, чтобы скорость гидролиза ангиотензина-I была такой же, как у здорового донора. Однако даже в этом случае активность АПФ из плазмы крови пациента с уремией по отношению к ангиотензину-I не ингибировалась эналаприлатом. Данные представлены в табл. 6.

Таблица 6. Остаточная активность (в %) сАПФ в плазме крови при ингибировании скорости гидролиза синтетического субстрата ZPHL и природного ангиотензина-I эналаприлатом.

Условия: 2 мМ ZPHL и 0,35 мМ ангиотензин-I в буфере Б (рН 8,3), 37°С.

Концентрация эналаприлата	ZPHL			Ангиотензин-I		
	Здоровый донор	Уремия	Уремия разбавл.	Здоровый донор	Уремия	Уремия разбавл.
5*10 ⁻⁸ М	45	58	59	88	102	101
1*10 ⁻⁷ М	33	53	43	88	104	102
2*10 ⁻⁷ М	24	43	41	77	103	104

Таким образом, можно заключить, что контроль конформации АПФ – определение соотношения 1G12/9B9 совместно с ZPHL/HNL может помочь выявить субпопуляцию пациентов (по крайней мере среди пациентов, больных уремией), менее восприимчивых к терапии ингибиторами АПФ. Вероятно, таким пациентам следует назначать более интенсивную терапию ингибиторами АПФ. Кроме того, сравнение скоростей гидролиза ангиотензина-I и ZPHL под действием АПФ является новым удобным способом (наряду с определением соотношений ZPHL/HNL и 1G12/9B9) для выявления субпопуляции уремических больных с конформационно измененным АПФ и менее восприимчивых к терапии ингибиторами АПФ.

Полученные данные по конформационной изменчивости АПФ в норме и при патологии мы сопоставили с таким широко распространенным клиническим параметром, как артериальное давление. Результаты представлены в табл. 7 и на рис. 44. Видна заметная и близкая к статистически достоверной ($p < 0,05$) разница в артериальном давлении у больных уремией с конформационно измененным АПФ (давление измеряли до диализа) и у прочих пациентов.

Таблица 7. Артериальное давление у пациентов с уреимией. САД – систолическое артериальное давление, ДАД - диастолическое артериальное давление. Давление измеряли до диализа и до отбора образца крови.

1-ая группа Интактный АПФ					2-ая группа Конформационно измененный АПФ					3-я группа АПФ в присутствии ингибиторов				
Пациент №	Возраст, лет	Диализ, мес	САД, мм.рт.ст.	ДАД, мм.рт.ст.	Пациент №	Возраст, лет	Диализ, мес	САД, мм.рт.ст.	ДАД, мм.рт.ст.	Пациент №	Возраст, лет	Диализ, мес	САД, мм.рт.ст.	ДАД, мм.рт.ст.
1	47	147	137	80	7	58	119	156	72	2	43	216	140	90
3	75	161	72	42	11	61	216	158	90	4	65	160	130	80
5	48	190	130	75	13	61	126	130	70	12	57	184	138	77
6	48	98	140	78	16	47	115	137	80	15	63	125	80	45
8	53	228	123	70										
9	39	137	97	56										
10	72	177	162	80										
14	62	120	129	74										
17	58	109	110	60										
18	72	141	140	66										
19	63	128	87	53										
20	73	123	160	60										
Среднее	59,2	146,6	123,9	66,2	56,8	144,0	145,3	78,0		57,0	171,3	122,0	73,0	
SD	12,2	37,1	27,8	12,1	6,7	48,2	13,9	9,1		9,9	38,4	28,3	19,5	
Значение p для сравнения с 1-ой группой					0,629	0,926	0,069	0,078		0,733	0,313	0,911	0,547	
Значение p для сравнения со 2-ой группой										0,968	0,412	0,209	0,665	

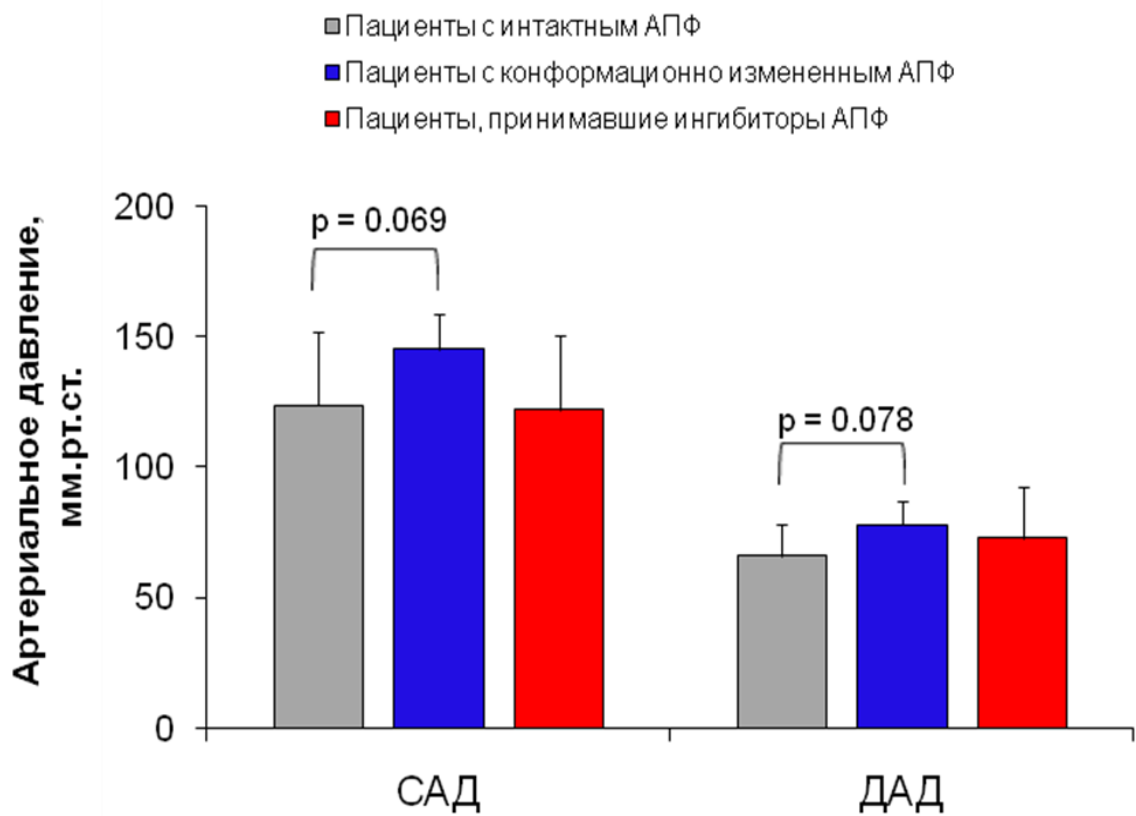


Рис. 44. Артериальное давление у пациентов с уремией. САД – систолическое артериальное давление, ДАД - диастолическое артериальное давление. Давление измеряли до диализа и до отбора образца крови.

8.3. Частота встречаемости конформационно измененного ангиотензин-превращающего фермента в плазме крови условно здоровых доноров

Для того, чтобы оценить частоту встречаемости конформационно измененного АПФ в широкой популяции, мы определили соотношение 1G12/9B9 и ZPHL/HNL у 48 здоровых доноров (рис. 45) и 63 пациентов поликлиники, не имеющих диагноза уремии. В выборке из 48 здоровых доноров было найдено 3 донора, у которых было значительно повышено соотношение 1G12/9B9 при нормальном ZPHL/HNL (номера 11, 13 и 18 на рис. 45 и 46), а в выборке из 63 пациентов поликлиники было найдено 5 таких доноров (номера 20, 21, 32, 46 и 54 на рис. 46 F). Таким образом видно, что в нормальной популяции доля индивидуумов с конформационно измененным АПФ заметно ниже, чем при уремии (табл. 8).

Таблица 8. Частота встречаемости конформационно измененного АПФ в норме и при патологии.

Здоровые доноры	Прочие заболевания	Уремия
6,3%	7,9%	20,0%
3 из 48	5 из 63	4 из 20

Интересно отметить, что у пациентов с уремией повышение соотношения 1G12/9B9 достигало 240-490% от нормы, в то время как для пациентов с прочими заболеваниями и для здоровых доноров это значение не превышало 230-240% для двоих человек и 145-185% для остальных 6 (рис. 46 F). Важно, что у тех же двоих пациентов с соотношением 1G12/9B9 на 230% выше нормы (номера 13 и 21 на рис. 46) активность АПФ по отношению к ангиотензину-I также оказалась существенно выше нормы.

Ингибирование АПФ из крови здоровых доноров и пациентов без уремии (соотношение 1G12/9B9 145-185%) не отличалось от нормы независимо от структуры используемых ингибиторов (эналаприлат и тепротид) и субстратов (ZPHL и ангиотензин-I), рис. 46 A-D. Однако для двух пациентов (13 и 21) с более высоким соотношением 1G12/9B9 наблюдалось значительное ухудшение ингибирования АПФ эналаприлатом и тепротидом при использовании ангиотензина-I в качестве субстрата (рис. 46 B, D) – аналогичная картина наблюдалась (как отмечалось выше) у пациентов с диагнозом уремии.



Рис. 45. Характеристика АПФ в составе плазмы крови здоровых доноров

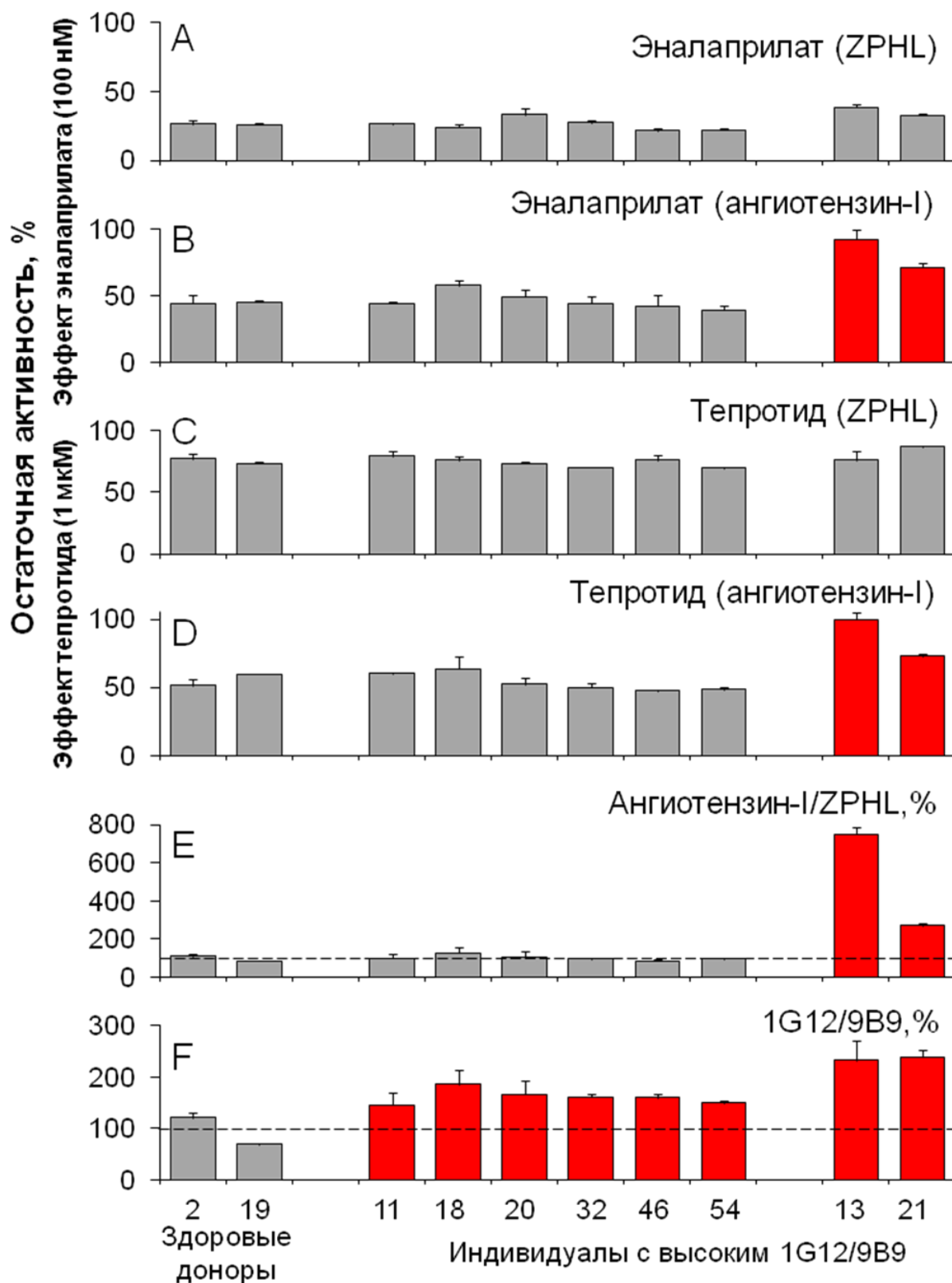


Рис. 46. Ингибирование активности сАПФ в составе плазмы крови условно здоровых доноров. А-Д - остаточная активность, Е - соотношение активностей по двум субстратам (без ингибиторов), F - соотношение 1G12/9B9 (без ингибиторов) Условия: буфер Б (рН 8.3), 37°C, [АПФ]≈1,5*10⁻¹¹М, [ZPHL]=2*10⁻³М, [Ангиотензин-I]=3,5*10⁻⁴М, [Эналаприлат]=1*10⁻⁷М, [Тепротид]=1*10⁻⁶М

Таким образом, полученные данные говорят о том, что конформационно измененный АПФ может встречаться среди здоровых доноров, что может указывать на возможно меньшую восприимчивость этих индивидуалов к терапии ингибиторами АПФ. В целом, увеличение значения соотношения 1G12/9B9 при нормальном значении соотношения ZPHL/ННL 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/ННL 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soubrier, F.; Alhenc-Gelas, F.; Hubert, C.; Allegrini, J.; John, M.; Tregear, G.; Corvol, P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 9386–90.
2. Bernstein, K. E.; Ong, F. S.; Blackwell, W. B.; Shah, K. H.; Giani, J. F.; Gonzalez-villalobos, R. A. A Modern Understanding of the Traditional and Nontraditional Biological Functions of Angiotensin-Converting Enzyme. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 1–46.
3. Isaac, R. E.; Williams, T. A.; Sajid, M.; Corvol, P.; Coates, D. Cleavage of arginyl-arginine and lysyl-arginine from the C-terminus of pro-hormone peptides by human germinal angiotensin I-converting enzyme (ACE) and the C-domain of human somatic ACE. *Biochem. J.* **1997**, *328*, 587–591.
4. Fuchs, S.; Frenzel, K.; Hubert, C.; Lyng, R.; Muller, L.; Michaud, A.; Xiao, H. D.; Adams, J. W.; Capecchi, M. R.; Corvol, P.; Shur, B. D.; Bernstein, K. E. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 1140–1142.
5. Suzuki, Y.; M., R.-O.; Lorenzo, O.; Ruperez, M.; Esteban, V.; Egidio, J. Inflammation and angiotensin II. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **2003**, *35*, 881–900.
6. Kurihara, T.; Ozawa, Y.; Ishida, S.; Okano, H.; Tsubota, K. Renin-Angiotensin system hyperactivation can induce inflammation and retinal neural dysfunction. *Int. J. Inflamm.* **2012**, *2012*, doi: 10.1155/2012/581695.
7. Marcos-Silva, L.; Narimatsu, Y.; Halim, A.; Campos, D.; Yang, Z.; Tarp, M. A.; Pereira, P. J.; Mandel, U.; Bennett, E. .; Vakhrushev, S. Y.; Levery, S. B.; David, L.; Clausen, H. Characterization of binding epitopes of CA125 monoclonal antibodies. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 3349–3359.
8. Zola, H. *Monoclonal antibodies*; Springer-Verlag: New York, 1987.
9. Balyasnikova, I. V.; Skirgello, O. E.; Binevski, P. V.; Nesterovich, A. B.; Albrecht, R. F. I.; Kost, O. A.; Danilov, S. M. Monoclonal antibodies 1G12 and 6A12 to N domain of human angiotensin-converting enzyme: fine epitope mapping and antibody-based method for relevation and quantification of ACE inhibitors in the human blood. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1580–1594.
10. Skirgello, O. E.; Balyasnikova, I. V.; Binevski, P. V.; Zhu-Li, S.; Baskin, I. I.; Palyulin, V. A.; Nesterovich, A. B.; Albrecht, R. F. I.; Kost, O. A.; Danilov, S. M. Inhibitory antibodies to human angiotensin-converting enzyme: fine epitope mapping and mechanism of action. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4831–4847.
11. Danilov, S.; Jaspard, E.; Churakova, T.; Towbin, H.; Savoie, F.; Wei, L.; Alhenc-Gelas, F. Structure-function analysis of angiotensin I-converting enzyme using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26806–26814.

12. Danilov, S. M.; Watermeyer, J. M.; Balyasnikova, I. V.; Gordon, K.; Kugaevskaya, E. V.; Eliseeva, J. E.; Albrecht, R. F. I.; Sturrock, E. D. Fine epitope mapping of monoclonal antibody 5F1 reveals anticatalytic activity toward the N domain of human angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9019–9031.
13. Gordon, K.; Balyasnikova, I. V.; Nesterovitch, A. B.; Schwartz, D. E.; Sturrock, E. D.; Danilov, S. M. Fine epitope mapping of monoclonal antibodies 9B9 and 3G8 to the N - domain of angiotensin converting enzyme (CD143) defines a region involved in regulating angiotensin-convertingenzyme dimerization and shedding. *Tissue Antigens* **2010**, *75*, 136–150.
14. Balyasnikova, I. V.; Zhu-Li, S.; Franke, F. E.; Berestetskaya, Y. V.; Chubb, A. J.; Albrecht, R. F. I.; Sturrock, E. D.; Danilov, S. M. Monoclonal antibodies 1B3 and 5C8 as probes for monitoring the integrity of the C-terminal end of soluble angiotensin-converting enzyme. *Hybridoma* **2005**, *24*, 14–26.
15. Naperova, I. A.; Balyasnikova, I. V.; Schwartz, D. E.; Watermeyer, J.; Sturrock, E. D.; Kost, O. A.; Danilov, S. M. Mapping of conformational mAb epitopes to the C domain of human angiotensin I-converting enzyme. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3396–3411.
16. Danilov, S. M.; Balyasnikova, I. V.; Danilova, A. S.; Naperova, I. A.; Arablinskaya, N. E.; Borisov, S. E.; Metzger, R.; Franke, F. E.; Schwartz, D. E.; Gachok, I. V; Trakht, I. N.; Kost, O. O. A.; Garcia, J. G. N. Conformational Fingerprinting of the Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE). 1 . Application in Sarcoidosis. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 5782–5793.
17. Natesh, R.; Schwager, S. L. U.; Sturrock, E. D.; Acharya, K. R. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* **2003**, *421*, 551–554.
18. Corradi, H. R.; Schwager, S. L. U.; Nchinda, A. T.; Sturrock, E. D.; Acharya, K. R. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 964–74.
19. Skirgello, O. E.; Binevski, P. V.; Pozdnev, V. F.; Kost, O. A. Kinetic probes for inter-domain co-operation in human somatic angiotensin-converting enzyme. *Biochem.J.* **2005**, *391 (Pt 3)*, 641–647.
20. Binevski, P. V.; Sizova, E. A.; Pozdnev, V. F.; Kost, O. A. Evidence for the negative cooperativity of the two active sites within bovine somatic angiotensin-converting enzyme. *FEBS Lett.* **2003**, *550*, 84–88.
21. Silverstein, E.; Friedland, J.; Lyons, H. A.; Gourin, A. Elevation of angiotensin-converting enzyme in granulomatous lymph nodes and serum in sarcoidosis: clinical and possible pathogenic significance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1976**, *278*, 798–513.
22. Silverstein, E.; Friedland, J. Elevated serum and spleen angiotensin converting enzyme and serum lysozyme in Gaucher's disease. *Clin. Chim. Acta* **1977**, *74*, 21–25.
23. Corvol, P.; Williams, T. A.; Soubrier, F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzym.* **1995**, *248*, 283–305.

24. Ruschitzka, F. T.; Noll, G.; Luscher, T. F. The endothelium in coronary artery disease. *Cardiology* **1997**, *88 Suppl 3*, 3–19.
25. Erdös, E. G.; Skidgel, R. A. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab. Invest* **1987**, *56*, 345–348.
26. Soffer, R. L.; El-Dorry, H. A. Angiotensin-converting enzyme: immunologic, structural, and developmental aspects. *Fed. Proc.* **1983**, *42*, 2735–2739.
27. Kranzhofer, R.; Browatzki, M.; Schmidt, J.; Kubler, W. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *257*, 826–828.
28. Ager, E. I.; Neo, J.; Christophi, C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1675–84.
29. Rousseau, A.; Michaud, A.; Chauvet, M. T.; Lenfant, M.; Corvol, P. The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3656–3661.
30. Wang, D.; Carretero, O. A.; Yang, X.; Rhaleb, N. N -acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline stimulates angiogenesis in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* **2004**, *287*, H2099–2105.
31. Skidgel, R. A.; Engelbrecht, S.; Johnson, A. R.; Erdos, E. G. Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* **1984**, *5*, 769–776.
32. Skidgel, R. A.; Erdos, E. . Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *85*, 1025–1029.
33. Papakyriakou, A.; Spyroulias, G. A.; Sturrock, E. D.; Manessi-Zoupa, E.; Cordopatis, P. Simulated interactions between angiotensin-converting enzyme and substrate gonadotropin-releasing hormone: novel insights into domain selectivity. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8753–8765.
34. Barnes, N. M.; Cheng, C. H.; Costall, B.; Naylor, R. J.; Williams, T. J.; Wischik, C. M. Angiotensin converting enzyme density is increased in temporal cortex from patients with Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* **1991**, *200*, 289–292.
35. Hu, J.; Igarashi, A.; Kamata, M.; Nakagawa, H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47863–47868.
36. Danilov, S. M.; Sadovnikova, E., Scharenborg, N., Balyasnikova, I. V.; Svinareva, D. A.; Semikina, E.L., Parovichnikova, E.N., Savchenko, V. G.; Adema, G. J. Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells. *Exp. Hematol.* **2003**, *31*, 1301–1309.

37. Bruneval, P.; Hinglais, N.; Alhenc-Gelas, F.; Tricottet, V.; Corvol, P.; Ménard, J.; Camilleri, J.-P.; Bariety, J. Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultrastructural immunohistochemical localization. *Histochemistry* **1986**, *85*, 73–80.
38. Friedland, J.; Setton, C.; Silverstein, E. Induction of angiotensin-converting enzyme in human monocytes in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *83*, 843–849.
39. Гарац, Е. В.; Никольская, И. И.; Биневский, П. В.; Позднев, В. Ф.; Кост, О. А. Характеристика ангиотензин-превращающего фермента из предсердия быка. *Биохимия* **2001**, *66*, 429–434.
40. Sakharov, I. Y.; Danilov, S. M.; Dukhanina, E. A. Affinity chromatography and some properties of the angiotensin-converting enzyme from human heart. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *923*, 143–149.
41. Чеснокова, Н. Б.; Никольская, И. И.; Мухаметова, Л. И.; Кост, О. А.; Айсина, Р. Б.; Безнос, О. В.; Столярова, Е. П.; Гулин, Д. А.; Биневский, П. В. Компоненты фибринолитической и ренин-ангиотензиновой систем в тканевых структурах и жидких средах глаза кроликов в норме и после ожога роговицы. *Российский Офтальмологический Журнал* **2008**, *1*, 46–50.
42. Yasui, T.; Alhenc-Gelas, F.; Corvol, P.; Menard, J. Angiotensin I-converting enzyme in amniotic fluid. *J. Lab. Clin. Med.* **1984**, *104*, 741–751.
43. Schweisfurth, H.; Schioberg-Schiegnitz, S. Assay and biochemical characterization of angiotensin-I-converting enzyme in cerebrospinal fluid. *Enzyme* **1984**, *32*, 12–19.
44. Wright, J. W.; Harding, J. W. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Eur. J. Physiol.* **2013**, *465*, 133–151.
45. Velletri, P. A. Testicular angiotensin I-converting enzyme (E.C. 3.4.15.1). *Life Sci.* **1985**, *36*, 1597–1608.
46. Ehlers, M. R.; Fox, E. A.; Strydom, D. J.; Riordan, J. F. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7741–7745.
47. Esther, C. R.; Howard, T. E.; Marino, E. M.; Goddard, J. M.; Capecchi, M. R.; Bernstein, K. E. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab. Invest.* **1996**, *74*, 953–965.
48. Hooper, N. M. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *Int. J. Biochem.* **1991**, *23*, 641–647.
49. Kregge, J. H.; John, S. W.; Langenbach, L. L.; Hodgins, J. B.; Hagaman, J. R.; Bachman, E. S.; Jennette, J. C.; O'Brien, D. A.; Smithies, O. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* **1995**, *375*, 146–148.
50. Reeves, P. G.; O'Dell, B. L. Zinc deficiency in rats and angiotensin-converting enzyme activity: comparative effects on lung and testis. *J. Nutr.* **1988**, *118*, 622–626.

51. Kondoh, G.; Tojo, H.; Nakatani, Y.; Komazawa, N.; Murata, C.; Yamagata, K.; Maeda, Y., Kinoshita, T., Okabe, M., Taguchi, R., Takeda, J. Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 160–166.
52. Deddish, P. A.; Wang, J.; Michel, B.; Morris, P. W.; Davidson, N. O.; Skidgel, R. A.; Erdos, E. G. Naturally occurring active N-domain of human angiotensin I-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7807–7811.
53. Casarini, D. E.; Plavinik, F. L.; Zanella, M. T.; Marson, O.; Krieger, J. E.; Hirata, I. Y.; Stella, R. C. Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 75–85.
54. Danilov, S. M.; Balyasnikova, I. V.; Albrecht, R. F. I.; Kost, O. A. Simultaneous determination of ACE activity with 2 substrates provides information on the status of somatic ACE and allows detection of inhibitors in human blood. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2008**, *52*, 90–103.
55. Hubert, C.; Houot, A. M.; Corvol, P.; Soubrier, F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15377–15383.
56. Vallee, B. L.; Auld, D. S. Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1990**, *87*, 220–224.
57. Wei, L.; Alhenc-Gelas, F.; Corvol, P.; Clauser, E. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 9002–9008.
58. Spyroulias, G. A.; Galanis, A. S.; Pairas, G.; Manessi-Zoupa, E.; Cordopatis, P. Structural features of angiotensin-I converting enzyme catalytic sites: conformational studies in solution, homology models and comparison with other zinc metallopeptidases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 403–429.
59. Riordan, J. F. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol.* **2003**, *4*:225.
60. Woodman, Z. L.; Oppong, S. Y.; Cook, S.; Hooper, N. M.; Schwager, S. L.; Brandt, W. F.; Ehlers, M. R.; Sturrock, E. D. Shedding of somatic angiotensin-converting enzyme (ACE) is inefficient compared with testis ACE despite cleavage at identical stalk sites. *Biochem. J.* **2000**, *347 Pt 3*, 711–718.
61. Елисеева, Ю. Е. Структурно-функциональные особенности ангиотензин-превращающего фермента. *Биорг. Химия* **1998**, *24*, 262–270.
62. Sturrock, E. D.; Colin, A. S.; Danilov, S. M. Peptidyl-Dipeptidase A / Angiotensin I-Converting Enzyme. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*; Barrett, A. J.; Rawlings, N. D.; Woessner, F. J., Eds.; Elsevier Academic Press: London, 2012; pp. 480–494.
63. Beldent, V.; Michaud, A.; Wei, L.; Chauvet, M. T.; Corvol, P. Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 26428–26434.

64. Ehlers, M. R.; Schwager, S. L.; Chubb, A. J.; Scholle, R. R.; Brandt, W. F.; Riordan, J. F. Proteolytic release of membrane proteins: studies on a membrane-protein-solubilizing activity in CHO cells. *Immunopharmacology* **1997**, *36*, 271–278.
65. Sadhukhan, R.; Sen, G. C.; Ramchandran R.; Sen, I. The distal ectodomain of angiotensin-converting enzyme regulates its cleavage-secretion from the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 138–143.
66. Ehlers, M. R.; Schwager, S. L.; Scholle, R. R.; Manji, G. A.; Brandt, W. F.; Riordan, J. F. Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9549–9559.
67. Chubb, A. J.; Schwager, S. L.; van der Merwe, E.; Ehlers, M. R.; Sturrock, E. D. Deletion of the cytoplasmic domain increases basal shedding of angiotensin-converting enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *314*, 971–975.
68. Pang, S.; Chubb, A. J.; Schwager, S. L.; Ehlers, M. R.; Sturrock, E. D.; Hooper, N. M. Roles of the juxtamembrane and extracellular domains of angiotensin-converting enzyme in ectodomain shedding. *Biochem. J.* **2001**, *358*, 185–192.
69. Woodman, Z. L.; Schwager, S. L.; Redelinghuys, P.; Carmona, A. K.; Ehlers, M. R.; Sturrock, E. D. The N domain of somatic angiotensin-converting enzyme negatively regulates ectodomain shedding and catalytic activity. *Biochem. J.* **2005**, *389*, 739–744.
70. Rigat, B.; Hubert, C.; Alhenc-Gelas, F.; Cambien, F.; Corvol, P.; Soubrier, F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.* **1990**, *86*, 1343–1346.
71. Patel, R.; Ansari, A. Serum angiotensin converting enzyme activity in patients with chronic renal failure on long term hemodialysis. *Clin. Chim. Acta* **1979**, *92*, 491–495.
72. Silverstein, E.; Brunswick, J.; Rao, T. K.; Friedland, J. Increased serum angiotensin-converting enzyme in chronic renal disease. *Nephron* **1984**, *37*, 206–210.
73. Dux, S.; Aron, N.; Boner, G.; Carmel, A.; Yaron, A.; Rosenfeld, J. B. Serum angiotensin converting enzyme activity in normal adults and patients with different types of hypertension. *Isr. J. Med. Sci.* **1984**, *20*, 1138–1142.
74. Jaspard, E.; Wei, L.; Alhenc-Gelas, F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9496–503.
75. Bornscheuer, U. T. Deep sea mining for unique biocatalysts. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 859–860.
76. Kulp, M. S.; Frickel, E. M.; Ellgaard, L.; Weissman, J. S. Domain architecture of protein-disulfide isomerase facilitates its dual role as an oxidase and an isomerase in Ero1p-mediated disulfide formation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 876–884.

77. Cal, S.; Quesada, V.; Llamazares, M.; Diaz-Perales, A.; Garabaya, C.; Lopez-Otin, C. Human polyserase-2, a novel enzyme with three tandem serine protease domains in a single polypeptide chain. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 1953–1961.
78. Jacobs, M.; Hayakawa, K.; Swenson, L.; Bellon, S.; Fleming, M.; Taslimi, P.; Doran, J. The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 260–268.
79. Novikova, E. G.; Eng, F. J.; Yan, L.; Qian, Y.; Fricker, L. D. Characterization of the enzymatic properties of the first and second domains of metallocarboxypeptidase D. *J. Biol. Chem.* **1999**, 28887–28892.
80. Laurent, V.; Salzet, M. Biochemical properties of the angiotensin-converting-like enzyme from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Peptides* **1996**, *17*, 737–745.
81. Cornell, M. J.; Williams, T. A.; Lamango, N. S.; Coates, D.; Corvol, P.; Soubrier, F.; Hoheisel, J.; Lehrach, H.; Isaac, R. E. Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 13613–13619.
82. Lamango, N. S.; Sajid, M.; Isaac, R. E. The endopeptidase activity and the activation by Cl⁻ of angiotensin-converting enzyme is evolutionarily conserved: purification and properties of an angiotensin-converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. *Biochem. J.* **1996**, *314* (Pt 2), 639–646.
83. Wijffels, G.; Fitzgerald, C.; Gough, J.; Riding, G.; Elvin, C.; Kemp, D.; Willadsen, P. Cloning and characterisation of angiotensin-converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system. *Eur.J.Biochem.* **1996**, *237*, 414–423.
84. Jarmey, J. M.; Riding, G. A.; Pearson, R. D.; McKenna, R. V.; Willadsen, P. Carboxydipeptidase from *Boophilus microplus*: a “concealed” antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. *Insect Biochem.* **1995**, *25*, 969–974.
85. Ekbote, U.; Coates, D.; Isaac, R. E. A mosquito (*Anopheles stephensi*) angiotensin I-converting enzyme (ACE) is induced by a blood meal and accumulates in the developing ovary. *FEBS Lett.* **1999**, *455*, 219–222.
86. Taylor, C. A.; Coates, D.; Shirras, A. D. The *Acer* gene of *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. *Gene* **1996**, *181*, 191–197.
87. Voronov, S.; Zueva, N.; Orlov, V.; Arutyunyan, A.; Kost, O. Temperature-induced selective death of the C-domain within angiotensin-converting enzyme molecule. *FEBS Lett.* **2002**, *522*, 77–82.
88. Jaspard, E.; Alhenc-Gelas, F. Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1995**, *211*, 528–534.
89. Ehlers, M. R.; Riordan, J. F. Angiotensin-converting enzyme: zinc- and inhibitor-binding stoichiometries of the somatic and testis isozymes. *Biochemistry* **1991**, *30*, 7118–7126.

90. Perich, R. B.; Jackson, B.; Rogerson, F.; Mendelsohn, F. A.; Paxton, D.; Johnston, C. I. Two binding sites on angiotensin-converting enzyme evidence from radioligand binding studies. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *42*, 286–293.
91. Skoglof, A.; Gothe, P. O.; Deinum, J. Effect of temperature and chloride on steady-state inhibition of angiotensin I-converting enzyme by enalaprilat and ramiprilat. *Biochem.J.* **1990**, *272*, 415–419.
92. Tellez-Sanz, R.; Garcia-Fuentes, L.; Baron, C. Calorimetric analysis of lisinopril binding to angiotensin I-converting enzyme. *FEBS Lett.* **1998**, *423*, 75–80.
93. Ortiz-Salmeron, E.; Baron, C.; Garcia-Fuentes, L. Enthalpy of captopril-angiotensin I-converting enzyme binding. *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 219–224.
94. Michaud, A.; Chauvet, M. T.; Corvol, P. N-domain selectivity of angiotensin I-converting enzyme as assessed by structure–function studies of its highly selective substrate, N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochem.Pharmacol.* **1999**, *57*, 611–618.
95. Azizi, M.; Massien, C.; Michaud, A.; Corvol, P. In vitro and in vivo inhibition of the 2 active sites of ACE by omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor. *Hypertension* **2000**, *35*, 1226–1231.
96. Rieger, K. J.; Saez-Servent, N.; Papet, M. P.; Wdzieczak-Bakala, J.; Morgat, J. L.; Thierry, J.; Voelter, W.; Lenfant, M. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochem. J.* **1993**, *296 (Pt 2)*, 373–378.
97. Araujo, M. C.; Melo, R. L.; Cesari, M. H.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Carmona, A. K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8519–8525.
98. Cotton, J.; Hayashi, M. A.; Cuniasse, P.; Vazeux, G.; Ianzer, D.; De Camargo, A. C.; Dive, V. Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6065–6071.
99. Jullien, N. D.; Cuniasse, P.; Georgiadis, D.; Yiotakis, A.; Dive, V. Combined use of selective inhibitors and fluorogenic substrates to study the specificity of somatic wild-type angiotensin-converting enzyme. *FEBS J.* **2006**, *273*, 1772–1781.
100. Скиргелло, О. Е. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук “Лиганд-зависимое функционирование ангиотензин-превращающего фермента быка”; Москва, 2006.
101. Sturrock, E. D.; Natesh, R.; van Rooyen, J. M.; Acharya, K. R. Structure of angiotensin I-converting enzyme. *Cell Mol Life Sci.* **2004**, *61*, 2677–2686.
102. Corradi, H. R.; Chitapi, I.; Sewell, B. T.; Georgiadis, D.; Dive, V.; Sturrock, E. D.; Acharya, K. R. The structure of testis angiotensin-converting enzyme in complex with the C domain-specific inhibitor RXPA380. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5473–5478.

103. Watermeyer, J. M.; Sewell, B. T.; Schwager, S. L.; Natesh, R.; Corradi, H. R.; Acharya, K. R.; Sturrock, E. D. Structure of testis ACE glycosylation mutants and evidence for conserved domain movement. *Biochemistry* **2006**, *45*, 12654–12663.
104. Sturrock, E. D.; Yu, X. C.; Wu, Z.; Biemann, K.; Riordan, J. F. Assignment of free and disulfide-bonded cysteine residues in testis angiotensin-converting enzyme: functional implications. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9560–9566.
105. Sturrock, E. D.; Danilov, S. M.; Riordan, J. F. Limited proteolysis of human kidney angiotensin-converting enzyme and generation of catalytically active N- and C-terminal domains. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **1997**, *236*, 16–19.
106. Deddish, P. A.; Wang, L. X.; Jackman, H. L.; Michel, B.; Wang, J.; Skidgel, R. A.; Erdos, E. G. Single-domain angiotensin I converting enzyme (kininase II): characterization and properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 1582–1589.
107. Биневский, П. В.; Никольская, И. И.; Позднев, В. Ф.; Кост, О. А. Получение и характеристика N-домена ангиотензин-превращающего фермента быка. *Биохимия* **2000**, *65*, 765–774.
108. Fernandez, J. H.; Hayashi, M. A. F.; Camargo, A. C. M.; Nashich, G. Structural basis of the lisinopril-binding specificity in N- and C-domains of human somatic ACE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *308*, 219–226.
109. Kost, O. A.; Bovin, N. V.; Chemodanova, E. E.; Nasonov, V. V.; Orth, T. A. New feature of angiotensin-converting enzyme: carbohydrate-recognizing domain. *J. Mol. Recognit.* **2000**, *13*, 360–369.
110. Kost, O. A.; Balyasnikova, I. V.; Chemodanova, E. E.; Nikolskaya, I. I.; Albrecht, R. F. 2nd; Danilov, S. M. Epitope-dependent blocking of the angiotensin-converting enzyme dimerization by monoclonal antibodies to the N-terminal domain of ACE: possible link of ACE dimerization and shedding from the cell surface. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6965–6976.
111. Dive, V.; Cotton, J.; Yiotakis, A.; Michaud, A.; Vassiliou, S.; Jiracek, J.; Vazeux, G.; Chauvet, M. T.; Cuniassse, P.; Corvol, P. RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **1999**, *96*, 4330–4335.
112. Georgiadis, D.; Beau, F.; Czarny, B.; Cotton, J.; Yiotakis, A.; Dive, V. Roles of the two active sites of somatic angiotensin-converting enzyme in the cleavage of angiotensin I and bradykinin: insights from selective inhibitors. *Circ.Res.* **2003**, *93*, 148–154.
113. Georgiadis, D.; Cuniassse, P.; Cotton, J.; Yiotakis, A.; Dive, V. Structural determinants of RXPA380, a potent and highly selective inhibitor of the angiotensin-converting enzyme C-domain. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8048–8054.
114. Vazeux, G.; Cotton, J.; Cuniassse, P.; Dive, V. Potency and selectivity of RXP407 on human, rat, and mouse angiotensin-converting enzyme. *Biochem.Pharmacol.* **2001**, *61*, 835–841.

115. Baudin, B.; Timmins, P. A.; Drouet, L.; Bauman, F. C. Molecular weight and shape of angiotensin-converting enzyme. A neutron scattering study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *154*, 1144–1150.
116. Grinshtein, S. V.; Nikolskaya, I. I.; Klyachko, N. L.; Levashov, A. V.; Kost, O. A. Structural organization of membrane and soluble forms of somatic angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry* **1999**, *64*, 571–580.
117. Chen, H. L.; Lünsdorf, H.; Hecht, H. J.; Tsai, H. Porcine pulmonary angiotensin I-converting enzyme--biochemical characterization and spatial arrangement of the N- and C-domains by three-dimensional electron microscopic reconstruction. *Micron* **2010**, *41*, 674–85.
118. Towler, P.; Staker, B.; Prasad, S. G.; Menon, S.; Tang, J.; Parsons, T.; Ryan, D.; Fisher, M.; Williams, D.; Dales, N. A.; Patane, M. A.; Pantoliano, M. W. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17996–8007.
119. Strong, K.; Mathers, C.; Leeder, S.; Beaglehole, R. Preventing chronic diseases: how many lives can we save? *Lancet* **2005**, *366*, 1578–1582.
120. Lim, S. S.; Gaziano, T. A.; Gakidou, E.; Reddy, K. S.; Farzadfar, F.; Lozano, R.; Rodgers, A. Prevention of cardiovascular disease in high-risk individuals in low-income and middle-income countries: health effects and costs. *Lancet* **2007**, *370*, 2054–2062.
121. Anthony, C. S.; Masuyer, G.; Sturrock, E. D.; Acharya, K. R. Structure based drug design of angiotensin-I converting enzyme inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 845–55.
122. Ondetti, M. A.; Williams, N. J.; Sabo, E. F.; Pluscec, J.; Weaver, E. R.; Kocy, O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry* **1971**, *10*, 4033–4039.
123. Cushman, D. W.; Ondetti, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1110–1113.
124. Rubin, B.; Antonaccio, M. J.; Horovitz, Z. P. Captopril (SQ 14,225) (D-3-mercapto-2-methylpropranoyl-L-proline): a novel orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme and antihypertensive agent. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1978**, *21*, 183–194.
125. Patchett, A. A.; Harris, E.; Tristram, E. W.; Wyvratt, M. J.; Wu, M. T.; Taub, D.; Peterson, E. R.; Ikeler, T. J.; ten Broeke, J.; Payne, L. G.; Ondeyka, D. L.; Thorsett, E. D.; Greenlee, W. J.; Lohr, N. S.; Hoffsommer, R. D.; Joshua, H.; Ruyle, W. V.; Rothrock, J. W.; Aster, S. D.; Maycock, A. L.; Robinson, F. M.; Hirschmann, R.; Sweet, C. S.; Ulm, E. H.; Gross, D. M.; Vassil, T. C.; Stone, C. A. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature* **1980**, *288*, 280–283.
126. Simon, A. C.; Levenson, J. A.; Bouthier, J.; Maarek, B.; Safar, M. E. Effects of acute and chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on large arteries in human hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1985**, *7 Suppl 1*, S45–S51.

127. Ajayi, A. A.; Campbell, B. C.; Meredith, P. A.; Kelman, A. W.; Reid, J. L. The effect of captopril on the reflex control heart rate: possible mechanisms. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1985**, *20*, 17–25.
128. Skidgel, R. A.; Defendini, R.; Erdos, E. G. Angiotensin I converting enzyme and its role in neuropeptide metabolism. In *Neuropeptides and their peptidases*; Turner, A. J., Ed.; Ellis Horwood Ltd.: Chichester, UK, 1987; pp. 165–182.
129. Hecker, M.; Blaukat, A.; Bara, A. T.; Muller-Esterl, W.; Busse, R. ACE inhibitor potentiation of bradykinin-induced vasoconstriction. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *121*, 1475–1481.
130. Minshall, R. D.; Tan, F.; Nakamura, F.; Rabito, S. F.; Becker, R. P.; Marcic, B.; Erdos, E. G. Potentiation of the actions of bradykinin by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. The role of expressed human bradykinin B2 receptors and angiotensin I-converting enzyme in CHO cells. *Circ. Res.* **1997**, *81*, 848–856.
131. Minshall, R. D.; Erdos, E. G.; Vogel, S. M. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors potentiate bradykinin's inotropic effects independently of blocking its inactivation. *Am. J. Cardiol.* **1997**, *80*, 132A–136A.
132. Kohlstedt, K.; Busse, R.; Fleming, I. Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension* **2005**, *45*, 126–132.
133. Kohlstedt, K.; Shoghi, F.; Muller-Esterl, W.; Busse, R.; Fleming, I. CK2 phosphorylates the angiotensin-converting enzyme and regulates its retention in the endothelial cell plasma membrane. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 749–756.
134. Israili, Z. H.; Hall, W. D. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann. Intern. Med.* **1992**, *117*, 234–242.
135. Deddish, P. A.; Marcic, B.; Jackman, H. L.; Wang, H. Z.; Skidgel, R. A.; Erdos, E. G. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension* **1998**, *31*, 912–917.
136. Zou, K.; Maeda, T.; Watanabe, A.; Liu, J.; Liu, S.; Oba, R.; Satoh, Y.; Komano, H.; Michikawa, M. Abeta42-to-Abeta40- and angiotensin-converting activities in different domains of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 31914–31920.
137. Rice, G. I.; Thomas, D. A.; Grant, P. J.; Turner, A. J.; Hooper, N. M. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J.* **2004**, *383* (Pt 1), 45–51.
138. Bonnet, D.; Lemoine, F. M.; Khoury, E.; Pradelles, P.; Najman, A.; Guigon, M. Reversible inhibitory effects and absence of toxicity of the tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) in human long-term bone marrow culture. *Exp. Hematol.* **1992**, *20*, 1165–1169.
139. Sharma, U.; Rhaleb, N. E.; Pokharel, S.; Harding, P.; Rasoul, S.; Peng, H.; Carretero, O. A. Novel anti-inflammatory mechanisms of N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro in hypertension-induced target organ damage. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* **2008**, *294*, H1226–H1232.

140. Liu, Y. H.; D'Ambrosio, M.; Liao, T. D.; Peng, H.; Rhaleb, N. E.; Sharma, U.; Andre, S.; Gabius, H. J.; Carretero, O. A. N-acetyl-seryl-aspartyl-lysylproline prevents cardiac remodeling and dysfunction induced by galectin-3, a mammalian adhesion/growth-regulatory lectin. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* **2009**, *296*, H404–H412.
141. Peng, H.; Carretero, O. A.; Liao, T. D.; Peterson, E. L.; Rhaleb, N. E. Role of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in the antifibrotic and antiinflammatory effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril in hypertension. *Hypertension* **2007**, *49*, 695–703.
142. Kröger, W. L.; Douglas, R. G.; O'Neill, H. G.; Dive, V.; Sturrock, E. D. Investigating the domain specificity of phosphinic inhibitors RXP380 and RXP407 in angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry* **2009**, *48*, 8405–8412.
143. Anthony, C. S.; Corradi, H. R.; Schwager, S. L.; Redelinguys, P.; Georgiadis, D.; Dive, V.; Acharya, K. R.; Sturrock, E. D. The N domain of human angiotensin-I-converting enzyme: the role of N-glycosylation and the crystal structure in complex with an N domain-specific phosphinic inhibitor, RXP407. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 35685–35693.
144. Fuchs, S.; Xiao, H. D.; Cole, J. M.; Adams, J. W.; Frenzel, K.; Michaud, A.; Zhao, H.; Keshelava, G.; Capecchi, M. R.; Corvol, P.; Bernstein, K. E. Role of the N-terminal catalytic domain of angiotensin-converting enzyme investigated by targeted inactivation in mice. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15946–15953.
145. Fuchs, S.; Xiao, H. D.; Hubert, C.; Michaud, A.; Campbell, D. J.; Adams, J. W.; Capecchi, M. R.; Corvol, P.; Bernstein, K. E. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. *Hypertension* **2008**, *51*, 267–274.
146. Ehlers, M. R. Safety issues associated with the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Expert. Opin. Drug Saf.* **2006**, *5*, 739–740.
147. Nchinda, A. T.; Chibale, K.; Redelinguys, P.; Sturrock, E. D. Synthesis and molecular modeling of a lisinopril-tryptophan analogue inhibitor of angiotensin I-converting enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4616–4619.
148. Watermeyer, J. M.; Kroger, W. L.; O'Neill, H. G.; Sewell, B. T.; Sturrock, E. D. Characterization of domain-selective inhibitor binding in angiotensin-converting enzyme using a novel derivative of lisinopril. *Biochem. J.* **2010**, *428*, 67–74.
149. Bernstein, K. E.; Shen, X. Z.; Gonzalez-Villalobos, R. A.; Billet, S.; Okwan-Duodu, D.; Ong, F. S.; Fuchs, S. Different in vivo functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 105–111.
150. Acharya, K. R.; Sturrock, E. D.; Riordan, J. F.; Ehlers, M. R. Ace revisited: a new target for structure-based drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 891–902.
151. Roques, B. P.; Noble, F.; Dauge, V.; Fournie-Zaluski, M. C.; Beaumont, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1993**, *45*, 87–146.

152. Cerdeira, A. S.; Bras-Silva, C.; Leite-Moreira, A. F. Endothelin-converting enzyme inhibitors: their application in cardiovascular diseases. *Rev. Port. Cardiol.* **2008**, *27*, 385–408.
153. Dive, V.; Chang, C. F.; Yiotakis, A.; Sturrock, E. D. Inhibition of zinc metallopeptidases in cardiovascular disease--from unity to trinity, or duality? *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 3606–3621.
154. Wei, C. C.; Hase, N.; Inoue, Y.; Bradley, E. W.; Yahiro, E.; Li, M.; Naqvi, N.; Powell, P. C.; Shi, K.; Takahashi, Y.; Saku, K.; Urata, H.; Dell'italia, L.; J.; Husain, A. Mast cell chymase limits the cardiac efficacy of Ang I converting enzyme inhibitor therapy in rodents. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 1229–1239.
155. Elijevich, F.; Laffer, C. A role for single-pill triple therapy in hypertension. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* **2009**, *3*, 231–240.
156. Worthley, M. I.; Corti, R.; Worthley, S. G. Vasopeptidase inhibitors: will they have a role in clinical practice? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2004**, *57*, 27–36.
157. Daull, P.; Jeng, A. Y.; Battistini, B. Towards triple vasopeptidase inhibitors for the treatment of cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2007**, *50*, 247–256.
158. Campbell, D. J. Vasopeptidase inhibition: a double-edged sword? *Hypertension* **2003**, *41*, 383–389.
159. Jullien, N.; Makritis, A.; Georgiadis, D.; Beau, F.; Yiotakis, A.; Dive, V. Phosphinic tripeptides as dual angiotensin-converting enzyme C-domain and endothelin-converting enzyme-1 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 208–220.
160. Akif, M.; Schwager, S. L.; Anthony, C. S.; Czarny, B.; Beau, F.; Dive, V.; Sturrock, E. D.; Acharya, K. R. Novel mechanism of inhibition of human Angiotensin-I converting enzyme (ACE) by a highly specific phosphinic tripeptide. *Biochem. J.* **2011**, *36*, 53–59.
161. Егоров, А. М.; Осипов, А. П.; Дзантиев, Б. Б.; Гаврилова, Е. М. *Теория и практика иммуноферментного анализа*; Высшая школа: Москва, 1991.
162. Ройт, А.; Бростофф, Д.; Мейл, Д. *Иммунология*; Мир: Москва, 2000.
163. Галактионов, В. Г. *Иммунология*; Академия: Москва, 2004.
164. Бутеренко, Р. Г.; Гусев, М. В.; Киркин, А. Ф. *Биотехнология. Клеточная инженерия.*; Высшая школа: Москва, 1987.
165. Danilov, S. M.; Faerman, A. I.; Printseva, O. Y.; Martynov, A. V.; Sakharov, I. Y.; Trakht, I. N. Immunohistochemical study of angiotensin-converting enzyme in human tissues using monoclonal antibodies. *Histochemistry* **1987**, *87*, 487–490.
166. Bernstein, K. E.; Martin, B. M.; Edwards, A. S.; Bernstein, E. A. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11945–11951.

167. Danilov, S.; Sakharov, I.; Martynov, A.; Faerman, A.; Muzykantov, V.; Klibanov, A.; Trakht, I. Monoclonal antibodies to angiotensin-converting enzyme: a powerful tool for lung and vessel studies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1989**, *21 Suppl 1*, 165–170.
168. Kost, O. A.; Orth, T. A.; Nikolskaya, I. I.; Nametkin, S. N.; Levashov, A. V. Carbohydrates regulate the dimerization of angiotensin-converting enzyme. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1998**, *44*, 535–542.
169. Balyasnikova, I. V.; Karran, E. H.; Albrecht, R. F. I.; Danilov, S. M. Epitope-specific antibody-induced cleavage of angiotensin-converting enzyme from the cell surface. *Biochem. J.* **2002**, *362*, 585–595.
170. Kohlstedt, K.; Gershon, C.; Friedrich, M.; Müller-Esterl, W.; Alhenc-Gelas, F.; Busse, R.; Fleming, I. Angiotensin-converting enzyme (ACE) dimerization is the initial step in the ACE inhibitor-induced ACE signaling cascade in endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 1725–1732.
171. Balyasnikova, I. V.; Woodman, Z. L.; Albrecht, R. F. I.; Natesh, R.; Acharya, K. R.; Sturrock, E. D.; Danilov, S. M. Localization of an N-domain region of angiotensin-converting enzyme involved in the regulation of ectodomain shedding using monoclonal antibodies. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 258–267.
172. Takeda, S.; Igarashi, T.; Mori, H.; Araki, S. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2388–2396.
173. Towler, P.; Staker, B.; Prasad, S. G.; Menon, S.; Tang, J.; Parsons, T.; Ryan, D.; Fisher, M.; Williams, D.; Dales, N. A.; Patane, M. A.; Pantoliano, M. W. Ace2 X-rays structure reveals a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17996–18007.
174. Brown, C. K.; Madauss, K.; Lian, W.; Beck, R. M.; Tolbert, W. D.; Rodgers, D. W. Structure of neurolysin reveals a deep channel that limits substrate access. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3127–3132.
175. Danilov, S.; Savoie, F.; Lenoir, B.; Jeunemaitre, X.; Azizi, M.; Tarnow, L.; Alhenc-Gelas, F. Development of enzyme-linked immunoassays for human angiotensin I converting enzyme suitable for large-scale studies. *J. Hypertens.* **1996**, *14*, 719–727.
176. Lieberman, J. Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am. J. Med.* **1975**, *59*, 365–372.
177. Ainslie, G. M.; Benatar, S. R. Serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis: sensitivity and specificity in diagnosis: correlations with disease activity, duration, extra-thoracic involvement, radiographic type and therapy. *Q. J. Med.* **1985**, *55*, 253–270.
178. Linnebank, M.; Kesper, K.; Jeub, M.; Urbach, U.; Wullner, U.; Klockgether, T.; Schmidt, S. Hereditary elevation of angiotensin-converting enzyme suggesting neurosarcoidosis. *Neurology* **2003**, *61*, 1819–1820.

179. Nikolaeva, M. A.; Balyasnikova, I. V.; Alexinskaya, M. A.; Metzger, R.; Franke, F. E.; Albrecht, R. F. I.; Kulakov, V. I.; Sukhikh, G. T.; Danilov, S. M. Testicular isoform of angiotensin I-converting enzyme (ACE, CD143) on the surface of human spermatozoa: revelation and quantification using monoclonal antibodies. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2006**, *55*, 54–68.
180. Jokubaitis, V. J.; Sinka, L.; Driessen, R.; Whitty, G.; Haylock, D. N.; Bertoncello, I.; Smith, I.; Péault, B.; Tavian, M.; Simmons, P. J. Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues. *Blood* **2008**, *111*, 4055–4063.
181. Metzger, R.; Bohle, R. M.; Pauls, K.; Eichner, G.; Alhenc-Gelas, F.; Danilov, S. M.; Franke, F. E. Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney Int.* **1999**, *56*, 1442–1454.
182. Beldent, V.; Michaud, A.; Bonnefoy, C.; Chauvet, M. T.; Corvol, P. Cell surface localization of proteolysis of human endothelial angiotensin I-converting enzyme. Effect of the amino-terminal domain in the solubilization process. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 28962–28969.
183. Кост, О. А.; Гринштейн, С. В.; Никольская, И. И.; Шевченко, А. А.; Биневский, П. В. Выделение солюбилизированной и мембранной формы соматического ангиотензин-превращающего фермента каскадной аффинной хроматографией. *Биохимия* **1997**, *62*, 375–383.
184. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 668–672.
185. Досон, Р.; Эллиот, Д.; Эллиот, У.; Джонс, К. *Справочник биохимика*; Мир: Москва, 1991.
186. Piquilloud, Y.; Reinharz, A.; Roth, M. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *206*, 136–142.
187. Conroy, J. M.; Hartley, J. F.; Soffer, R. L. Canine pulmonary angiotensin-converting enzyme: physicochemical, catalytic and immunological properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *524*, 403–412.
188. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of enzyme kinetics*; Portland Press Ltd.: London, 1999.
189. Wei, L.; Clauser, E.; Alhenc-Gelas, F.; Corvol, P. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13398–13405.
190. Yu, X. C.; Sturrock, E. D.; Wu, Z.; Biemann, K.; Ehlers, M. R.; Riordan, J. F. Identification of N-linked glycosylation sites in human testis angiotensin-converting enzyme and expression of an active deglycosylated form. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3511–3519.
191. Giustarini, D.; Dalle-Donne, I.; Colombo, R.; Milzani, A.; Rossi, R. Interference of plasmatic reduced glutathione and hemolysis on glutathione disulfide levels in human blood. *Free Radic. Res.* **2004**, *38*, 1101–1106.

192. Jones, D. P.; Carlson, J. L.; Samiec, P. S.; Sternberg, P. J.; Mody, V. C. J.; Reed, R. L.; Brown, L. A. Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. *Clin. Chim. Acta* **1998**, *275*, 175–184.
193. Schepers, E.; Glorieux, G.; Dou, L.; Cerini, C.; Gayraud, N.; Louvet, L.; Maugard, C.; Preus, P.; Rodriguez-Ortiz, M.; Argiles, A.; Brunet, P.; Cohen, G.; Jankowski, J.; Jankowski, V.; Massy, Z.; Rodriguez, M.; Vanholder, R. Guanidino compounds as cause of cardiovascular damage in chronic kidney disease: an in vitro evaluation. *Blood Purif.* **2010**, *30*, 277–87.
194. De Deyn, P. P.; Marescau, B.; Cuykens, J. J.; Van Gorp, L.; Lowenthal, A.; De Potter, W. P. Guanidino compounds in serum and cerebrospinal fluid of non-dialyzed patients with renal insufficiency. *Clin. Chim. Acta* **1987**, *167*, 81–88.
195. Lapolla, A.; Flamini, R.; Lupo, A.; Aricò, N. C.; Rugiu, C.; Reitano, R.; Tubaro, M.; Ragazzi, E.; Seraglia, R.; Traldi, P. Evaluation of glyoxal and methylglyoxal levels in uremic patients under peritoneal dialysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 217–224.
196. Mukhopadhyay, S.; Ghosh, A.; Kar, M. Methylglyoxal increase in uremia with special reference to snakebite-mediated acute renal failure. *Clin. Chim. Acta* **2008**, *391*, 13–17.
197. Lucchi, L.; Bergamini, S.; Iannone, A.; Perrone, S.; Stipo, L.; Olmeda, F.; Caruso, F.; Tomasi, A.; Albertazzi, A. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. *Artif. Organs* **2005**, *29*, 67–72.
198. Stepniewska, J.; Dolegowska, B.; Ciechanowski, K.; Kwiatkowska, E.; Millo, B.; Chlubek, D. Erythrocyte antioxidant defense system in patients with chronic renal failure according to the hemodialysis conditions. *Arch. Med. Res.* **2006**, *37*, 353–359.
199. Vanholder, R.; De Smet, R.; Glorieux, G.; Argilés, A.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Clark, W.; Cohen, G.; De Deyn, P. P.; Deppisch, R.; Descamps-Latscha, B.; Henle, T.; Jörres, A.; Lemke, H. D.; Massy, Z. A.; Passlick-Deetjen, J.; Rodriguez, M.; Stegmayr, B.; Stenvinkel, P.; Tetta, C.; Wanner, C.; Zidek, W.; (EUTox), E. U. T. W. G. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 1934–1943.
200. Himmelfarb, J.; Stenvinkel, P.; Ikizler, T. A.; Hakim, R. M. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* **2002**, *62*, 1524–1538.
201. Ward, R. A.; McLeish, K. R. Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? *Artif. Organs* **2003**, *27*, 230–236.
202. Morena, M.; Delbosc, S.; Dupuy, A. M.; Canaud, B.; Cristol, J. P. Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial. Int.* **2005**, *9*, 37–46.
203. Herzog, C. E.; Ma, J. Z.; Collins, A. J. Long-term survival of dialysis patients in the United States with prosthetic heart valves: should ACC/AHA practice guidelines on valve selection be modified? *Circulation* **2002**, *105*, 1336–1341.

204. Gendlin, G. E.; Shilo, V. Y.; Tomilina, N. A.; Storogakov, G. I.; Borisovskaya, S. V. Left ventricular myocardial hypertrophy and its prognostic role at chronic kidney disease. *Clin. Nephrol.* **2009**, *1*, 22–28.
205. Menard, J.; Patchett, A. A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Adv. Protein Chem.* **2001**, *56*, 13–75.
206. Tokmakova, M. P.; Skali, H.; Kenchaiah, S.; Braunwald, E.; Rouleau, J. L.; Packer, M.; Chertow, G. M.; Moyé, L. A.; Pfeffer, M. A.; Solomon, S. D. Chronic kidney disease, cardiovascular risk, and response to angiotensin-converting enzyme inhibition after myocardial infarction: the Survival And Ventricular Enlargement (SAVE) study. *Circulation* **2004**, *110*, 3667–3673.
207. Chang, T. I.; Shilane, D.; Brunelli, S. M.; Cheung, A. K.; Chertow, G. M.; Winkelmayer, W. C. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cardiovascular outcomes in patients on maintenance hemodialysis. *Am. Hear. J.* **2011**, *162*, 324–330.
208. Zannad, F.; Kessler, M.; Leheret, P.; Grünfeld, J. P.; Thuilliez, C.; Leizorovicz, A.; Lechat, P. Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney Int.* **2006**, *70*, 1318–1324.
209. Scharplatz, M.; Puhan, M. A.; Steurer, J.; Perna, A.; Bachmann, L. M. Does the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism modify the response to ACE inhibitor therapy? – a systematic review. *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* **2005**, *6*, 16.
210. Silva, A. C. S.; Diniz, J. S. S.; Pereira, R. M.; Pinheiro, S. V. B.; Santos, R. A. S. Circulating renin angiotensin system in childhood chronic renal failure: marked increase of angiotensin-(1–7) in end-stage renal disease. *Ped. Res.* **2006**, *60*, 734–739.
211. Kramer, A. B.; Laverman, G. D.; van Goor, H.; Navis, G. Inter-individual differences in anti-proteinuric response to ACEi in established adriamycin nephritic rats are predicted by pretreatment renal damage. *J. Pathol.* **2003**, *201*, 160–167.
212. Windt, W. A.; van Dokkum, R. P.; Kluppel, C. A.; Jeronimus-Stratingh, C. M.; Hut, F.; de Zeeuw, D.; Henning, R. H. Therapeutic resistance to angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition is related to phar-macodynamic and kinetic factors in 5/6 nephrectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *580*, 231–240.