

УДК 577.175.8

ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОД-РАСПОЗНАЮЩИХ ЦЕНТРОВ АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ БЫКА И ЧЕЛОВЕКА

Чемоданова Е.Е.¹, Орт Т.А.¹, Насонов В.В.², Бовин Н.В.², Кост О.А.^{1*}.

¹Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Москва 119899, Россия; ²Институт Биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва 117871, Россия, Fax: (7) (095) 9395417. Phone: (7) (095) 9393417. E-mail: kost@enzyme.chem.msu.ru

Показано, что ангиотензин-превращающие ферменты (АПФ) быка и человека могут существовать в системе обращенных мицелл, моделирующих мембранное окружение фермента, как в мономерной, так и димерной формах с сохранением каталитической активности. Димеризация является обратимым процессом и специфично контролируется углеводами. Изучено влияние углеводов различной структуры на образование димеров АПФ. Специфика действия углеводов на димеризацию АПФ быка и человека практически одинакова. Различия наблюдаются лишь во влиянии некоторых олигосахаридов, таких как 3'SiaLac, 6'SiaLac, Lac-ol. Показано, что асиало- и агалакто-АПФ быка и человека способны к формированию димеров в системе обращенных мицелл, в то время как асиало-агалакто-АПФ не образует димера.

Соматический ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, пептидил-дипептидгидролаза, КФ 3.4.15.1) представляет собой один из физиологически важных гликопротеинов в организме человека и животных. Одной из наиболее изученных физиологических функций АПФ является участие в регуляции кровяного давления и водно-солевого обмена [1]. Соматический АПФ N-гликозилирован; содержание углеводов (7–33%), количество сайтов гликозилирования, а также структура олигосахаридных цепей сильно зависят от источника выделения фермента [2, 3]. АПФ человека и быка имеют 17 и 16 потенциальных сайтов для N-гликозилирования, соответственно [4, 5], но количество реально гликозилированных сайтов для АПФ человека, крысы, кролика и морской свинки было оценено равным 7–8 [3]. Свои основные физиологические функции АПФ выполняет в составе биологических мембран. В этих условиях свойства фермента могут существенно отличаться от его свойств в водной гомогенной среде. Для выявления возможного влияния мембранного микроокружения на характеристики фермента используют модельные системы, такие как система обращенных мицелл АОТ–вода–октан [6]. Каталитическая активность ферментов в этой системе зависит от степени гидратации W_0 – параметра, определяющего размеры внутренней полости мицелл. Подобные зависимости обычно имеют колоколообразный вид, где оптимум активности приходится на степень гидратации, которая отвечает радиусу внутренней полости мицеллы, совпадающему с радиусом глобулы фермента [6].

Использование этой системы позволило показать, что АПФ из легких быка может функционировать в мономер-

ной и димерной формах, причем образование димера специфично контролируется углеводами [7]. Эти данные позволили предположить существование на молекуле фермента углевод-распознающего центра.

В настоящей работе оценены структурные требования углевод-распознающих центров АПФ быка и человека.

Материалы и методы

Нейраминидаза (Е.С. 3.2.1.18) из *Vibrio cholerae* и β -галактозидаза из *Aspergillus oryzae* («Serva», Германия). Фурилакритоил-L-фенилаланил-глицил-глицин (FA-Phe-Gly-Gly) («Sigma», США). Натриевая соль ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (аэрозоль ОТ, АОТ) («Fluka», Австрия). Моносахариды, метилгликозиды, лактоза, сиалиллактозы, сиалиллактозамин («Sigma», США). Олигосахаридные цепи АПФ быка, α_1 -кислого гликопротеина человека, овальбумина, фетуина, иммуноглобулина G и α -фибриногена получены гидразинолизом.

Получение АПФ. АПФ выделяли из легких быка или мембранной фракции почек человека экстракцией в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 150 мМ NaCl, 1 мкМ ZnCl₂, 0,1% Тритон X-100. Затем ферменты очищали до электрофоретической гомогенности посредством аффинной хроматографии на лизиноприл-агарозе [8]. При выделении АПФ человека боратный буфер содержал 0,1% Тритона X-100.

Получение асиало-АПФ. Десиалирование АПФ быка и человека проводили с помощью нейраминидазы (0,3 ед. на 0,05 мг АПФ) по [8].

Получение агалакто-АПФ. Дегалактозилирование нативного АПФ или асиало-АПФ осуществляли β -галактози-

*Адресат для переписки.

дазой (0,1 ед. на 0,05 мг АПФ) в 0,5 мл 0,05 М цитратно-фосфатного буфера при рН 6,0. Реакцию проводили в течение 24 ч при 37°.

Кинетические эксперименты в обращенных мицеллах тройной системы АОТ–вода–октан проводили как описано в [7].

Результаты и их обсуждение

В работе мы исследовали АПФ, выделенный из легких быка, и АПФ, выделенный из коры почек человека. Полученные препараты ферментов были электрофоретически гомогенными. Содержание активных молекул для обоих ферментов составляло 95–97%.

В водных растворах фермент обычно функционирует в виде мономера [9], но есть данные о том, что в экстрактах и концентрированных растворах [10] АПФ может агрегировать. Более того, проведение электрофореза в неденатурирующих условиях показало [3], что АПФ из нескольких источников способны димеризоваться. Ранее мы продемонстрировали способность АПФ быка формировать димер в обращенных мицеллах тройной системы АОТ–вода–октан [7]. В данной работе мы применили этот подход для фермента человека. Для обоих ферментов на зависимости каталитической активности от степени гидратации наблюдалось два оптимума при $W_0 = 27$ и 31 (рис. 1, кривая 1), указывающие на существование

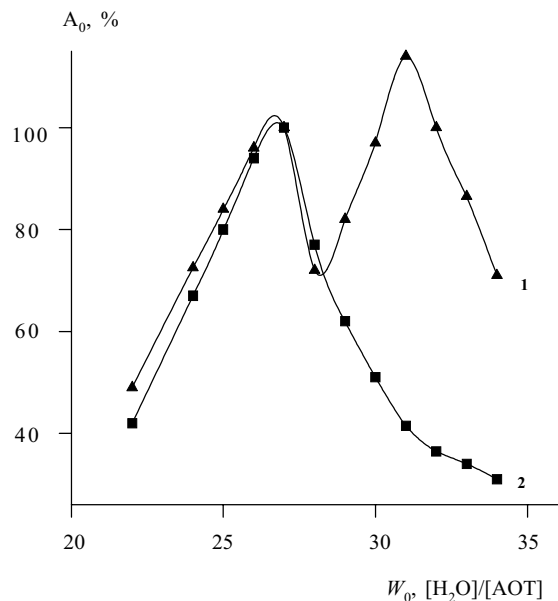


Рис. 1. Зависимость каталитической активности АПФ от степени гидратации в обращенных мицеллах тройной системы АОТ–вода–октан (активность АПФ при степени гидратации $W_0 = 27$ принята за 100%): 1 – нативный, асиало- или агалакто-АПФ быка и человека; 2 – последовательно асиалированный, агалактозилированный АПФ быка и человека (0,3 М АОТ в октане, 50 мМ Нерес-буфер с рН 7,5, содержащий 150 мМ NaCl, 1 мкМ ZnCl₂, концентрация АПФ 10⁻⁸ М, концентрация субстрата 7,5·10⁻⁵ М)

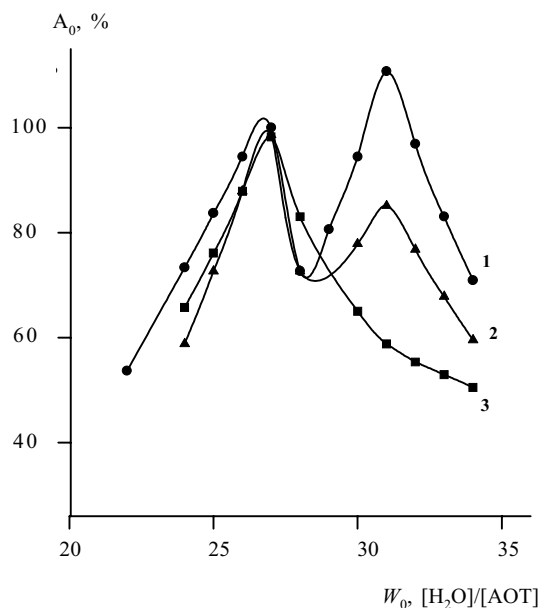


Рис. 2. Влияние на образование димера АПФ человека в системе обращенных мицелл N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac), мМ: 1 – 1; 2 – 6; 3 – 10 (0,3 М АОТ в октане, 50 мМ Нерес-буфер с рН 7,5, содержащий 150 мМ NaCl, 10 мкМ ZnCl₂, концентрация АПФ 10⁻⁸ М, концентрация субстрата 7,5·10⁻⁵ М)

Т а б л и ц а 1

Влияние углеводов на образование димера АПФ быка и человека

Углеводы	Концентрация углевода, при которой не наблюдается образование димера фермента, М	
	АПФ быка	АПФ человека
Моносахариды		
Glc, GalNAc	10 ⁻¹	10 ⁻¹
GlcNAc	10 ⁻²	10 ⁻²
Man, Neu5Acβ-OMe	10 ⁻³	10 ⁻³
Fuc	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Galβ-OMe	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
Gal	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
Galβ-OMe	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
Neu5Ac	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
Neu5Acα-OMe	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
Олигосахариды		
Lac	10 ⁻³	10 ⁻³
Lac-ol	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
6'SiaLac	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
3'SiaLac	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
3'SiaLac-ol	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
3'SiaLacNAc	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
Пул олигосахаридов*		
OS _{agp}	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
OS _{fg}	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
OS _{IgG}	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
OS _f	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
OS _{ov}	10 ⁻³	10 ⁻³

* Пул N-цепей α₁-кислого гликопротеина (OS_{agp}); асиало-биантенные цепи α-фибриногена (OS_{fg}) или иммуноглобулина G (OS_{IgG}); триантенные цепи фетуина (OS_f); высокоманнозные цепи овальбумина (OS_{ov}).

двух форм фермента. Результаты седиментационного анализа, проведенные для АПФ быка [7] показали, что при степенях гидратации ниже $W_0 \ll 30$ в системе находится мономерная форма АПФ, а при $W_0 \gg 30$ – только его димерная форма. Таким образом, первый максимум активности при $W_0 = 27$ соответствует функционированию в системе мономера, а второй максимум при $W_0 = 31$ – функционированию димера фермента. Таким образом, способность к образованию каталитически активной димерной формы является общим свойством соматических двудоменных ангиотензин-превращающих ферментов из различных источников.

Димеризацию нативного соматического АПФ можно нарушить добавлением свободных углеводов в реакционную среду. Для АПФ человека были получены данные, демонстрирующие влияние углеводов на формирование второго оптимума при $W_0 = 31$, соответствующего функционированию димера. Так, например, увеличение содержания N-ацетилнейраминной кислоты в системе приводило к постепенному уменьшению и, наконец, исчезновению второго пика активности АПФ (рис. 2), аналогично наблюдаемым ранее результатам [7] для АПФ быка. Полученные данные позволяют заключить, что образование димеров обоих ферментов осуществляется за счет одинаковых взаимодействий с участием собственных олигосахаридных цепей АПФ, т.е. взаимодействие АПФ–АПФ происходит за счет образования углеводов-белковых контактов с участием углеводов-распознающих центров этих ферментов.

Свободные углеводы, добавленные в реакционную среду, конкурируют с олигосахаридными цепями одной молекулы АПФ за центр связывания на другой. Таким образом, свободные углеводы могут быть рассмотрены как ингибиторы димеризации АПФ, а подавление димеризации АПФ углеводами разного строения, в свою очередь, может быть использовано как подход для изучения специфичности и структуры углеводов-распознающего центра на молекуле фермента.

Данные по специфике влияния углеводов на образование димеров АПФ быка и человека приведены в табл. 1. За эффективность ингибирующей способности углеводов была взята концентрация углевода, необходимая для полного подавления димеризации. Оказалось, что степень влияния углеводов сильно зависит от их структуры. Из моносахаридов наибольшей ингибиторной способностью обладают галактоза и N-ацетилнейраминная кислота, являющиеся концевыми в олигосахаридных цепях комплексного типа N-гликопротеинов. Лактоза обладает довольно слабой ингибирующей способностью по отношению к димеризации АПФ, но лактитол ингибирует димеризацию фермента гораздо более эффективно (особенно по отношению к ферменту быка). Таким образом, очевидно, остаток глюкозы в этом дисахариде нарушает связывание с углеводов-распознающим центром фермента. Еще более эффективными оказались сиалиллактозы, причем 3'-сиалил-

Таблица 2

Влияние углеводов на образование димера нативного, агалакто- и асиало-АПФ быка

Углеводы	Концентрация углевода, при которой не наблюдается образование димера фермента, М		
	Нативный АПФ	агалакто-АПФ	асиало-АПФ
Neu5Ac	10^{-5}	$6 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$
Gal	10^{-5}	$4 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$
Lac	10^{-3}	$2 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$
3'SiaLac	$8 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6}$

Таблица 3

Влияние углеводов на образование димера нативного, агалакто- и асиало- АПФ человека

Углеводы	Концентрация углевода, при которой не наблюдается образование димера фермента, М		
	Нативный АПФ, М	агалакто-АПФ, М	асиало-АПФ, М
Neu5Ac	$9 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-5}$
Gal	$8 \cdot 10^{-6}$	10^{-4}	$2 \cdot 10^{-6}$
Lac	10^{-3}	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-4}$
3'SiaLac	$9 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-5}$

лактоза более эффективно ингибировала димеризацию АПФ быка, а 6'-сиалаллактоза – димеризацию АПФ человека. Более эффективное действие олигосахаридов по сравнению с моносахаридами свидетельствует о наличии протяженных контактов при взаимодействии АПФ с углеводом. При этом первый и второй углеводные остатки в олигосахаридной цепи оказываются наиболее важными для взаимодействия с углеводов-распознающим центром АПФ. Структурные вариации в глюкозном остатке трисахаридов 3'SiaLac (3'SiaLac, 3'SiaLac-ol, 3'SiaLacNAc) не влияли на ингибирование димеризации АПФ быка, однако влияли на ингибирование АПФ человека, что может указывать на связывание третьего остатка в олигосахаридной цепи углеводов-распознающим центром АПФ человека, но не быка. С другой стороны, данные по влиянию Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNAc, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc показывают незначительное влияние третьего моносахарида на димеризацию АПФ человека ($8 \cdot 10^{-6}$ М, $9 \cdot 10^{-6}$ М и $5 \cdot 10^{-6}$ М соответственно). Наиболее сильными ингибиторами димеризации АПФ как быка, так и человека оказались олигосахаридные биантенные цепи комплексного типа, выделенные из других гликопротеинов (табл. 1).

Тот факт, что углеводов-распознающий центр эффективно связывает терминальные остатки Gal и Neu5Ac N-цепей комплексного типа и сами комплексные цепи, позволяет предположить, что критическую роль в ассоциации мономеров ферментов играют углеводные цепи АПФ

комплексного типа, а именно входящий в них терминальный дисахарид Neu5Ac α 2-3Gal β .

Незначительные отличия в специфичности углеводов-распознающих центров АПФ быка и человека указывают на то, что этот центр представляет собой консервативный участок на белковой глобуле.

Как уже было отмечено, разные по структуре моносахариды – Gal и Neu5Ac – проявляют одинаковое сродство к молекуле АПФ. Одним из объяснений этому факту могло быть существование на белке двух разных углеводов-распознающих центров с разными структурными требованиями, из которых первый специфичен к Gal, а второй – к Neu5Ac. Однако, если бы АПФ имел два центра, то димер асиало-АПФ формировался бы за счет взаимодействия концевых галактозильных остатков одной молекулы фермента и Gal-связывающего центра другой. Этот димер не был бы чувствителен к присутствию в среде Neu5Ac. Димер же агалакто-АПФ формировался бы в этом случае за счет концевых остатков N-ацетилнейраминовой кислоты одной молекулы фермента и Neu5Ac-связывающего центра другой молекулы. Димер этого фермента не был бы чувствителен к присутствию в среде Gal.

Нами были получены как десиалированный, так и дегалактозилированный АПФ быка и человека. Оказалось,

что эти ферменты, как и их нативные предшественники, функционируют в системе обращенных мицелл как в виде мономера, так и в виде димера (рис. 1, кривая 1), т.е. отщепление концевых остатков сиаловых кислот или галактозы от олигосахаридных цепей АПФ не нарушало способности фермента к образованию димера (табл. 2). Оказалось, что, действительно, для десиализованного АПФ более эффективны углеводы, содержащие галактозу, и менее эффективны углеводы, содержащие Neu5Ac, по сравнению с нативным АПФ (табл. 2). В случае дегалактозилированного АПФ более эффективны сиалированные углеводы, а углеводы, содержащие Gal, менее эффективны. В то же время полученные данные не согласуются с гипотезой о существовании двух пространственно разделенных углеводов-распознающих центров с разными требованиями к структуре углевода, но согласуются с вероятным нахождением в составе белковой глобулы АПФ одного центра, узнающего мотив Neu5Ac α 2-3Gal β . На эту возможность прямо указывают полученные нами данные с последовательно десиалированным, дегалактозилированным АПФ. Этот фермент функционирует в системе обращенных мицелл только в виде мономера (рис. 1, кривая 2), т.е. последовательность Neu5Ac α 2-3Gal критична для фермент-ферментного взаимодействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corvol P., Williams T.A., Soubrier F. // *Methods Enzymol.* 1995. **248**. P. 283.
2. Ehlers M.R.W., Chen Y.P., Riordan J.F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. **183**. P. 199.
3. Ripka J.E., Ryan J.W., Valido F.A., Chung A.Y.K., Peterson C.M., Urry R.L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. **196**. P. 503.
4. Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., Allegrini J., John H., Tregear G., Corvol P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. **85**. P. 9386.
5. Shai Sh.-Y., Fishel R.S., Martin B.M., Berk B.C., Bernstein K.E. // *Circ. Res.* 1991. **70**. P. 1274.
6. Klyachko N.L., Levashov A.V., Kabanov A.V., Khmelnsky Yu.L., Martinek K. / *Surfactant science series: Kinetics and catalysis in microheterogeneous systems.* Eds. M. Gratzel and K. Kalyanasundaram, N. Y., 1991. **38**. P. 135.
7. Kost O.A., Orth T.A., Nikolskaya I.I., Nametkin S.N., Levashov A.V. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. **44**. P. 535.
8. Orth T., Voronov S., Binevski P., Saenger W., Kost O. // *FEBS Lett.* 1998. **431**. P. 255.
9. Meng Q. Ch., King S.J., Chen Y.-F., Delucas L.J., Oparil S. // *J. Chromatogr.* 1989. **461**. P. 271.
10. Lanzillo J.J., Stevens J., Dasarathy Y., Yotsumoto H., Fanburg B.L. // *J. Biol. Chem.* 1985. **260**. P. 14938.

Поступила в редакцию 20.06.00