

# МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ N-ДОМЕНА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА С ПЕПТИДОМ АЛЬЦГЕЙМЕРА КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА

*Жаркова М.С., Веселовский А.В.*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича  
РАМН, г.Москва

*zharkmar@mail.ru*

*Недавно было показано, что N-домен ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) способен расщеплять N-домен пептида Альцгеймера (A $\beta$ ), причем основное место гидролиза отличается для человеческого и крысиного A $\beta$ . В работе построены модели комплексов N-домена АПФ человека с тетрапептидами, включающими в себя сайты расщепления A $\beta$  человека и крысы. Полученные модели комплексов позволяют объяснить различия в местах расщепления человеческого и крысиного амилоидного пептида.*

Болезнь Альцгеймера – наиболее распространенная форма первичной деменции, которой страдает около 30 млн. человек [1]. В настоящее время нет полного понимания причин заболевания. Современные методы терапии способны только смягчить симптомы, но пока не позволяют остановить или замедлить развитие этого заболевания. Основным патогенетическим признаком болезни Альцгеймера считается наличие альцгеймеровских (амилоидных, сенильных) бляшек и нейрофибриллярных клубков из гиперфосфорилированного тау-белка в тканях мозга пациентов.

Было показано, что амилоидные бляшки представляют собой отложение  $\beta$ -амилоида (A $\beta$ , пептид Альцгеймера,  $\beta$ -амилоидный пептид). В настоящее время считается, что токсичной для нервных клеток является олигомерная форма пептида [2, 3].

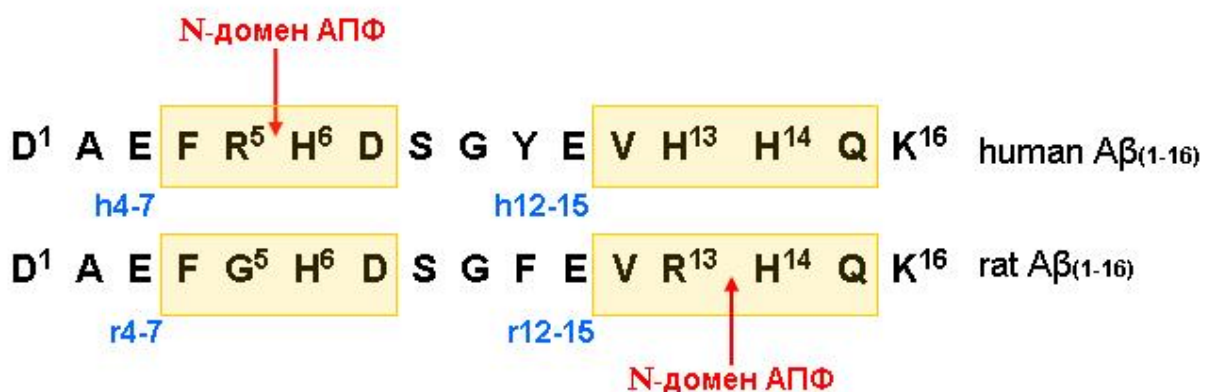
В норме секреция A $\beta$  не приводит к патологическим процессам, поскольку в здоровой ткани мозга существует баланс между продукцией пептида и его деградацией. В катаболизме A $\beta$  существенную роль играют клетки-мусорщики, а также цинковые металлопротеиназы [2, 4, 5].

Одной из таких пептидаз является ангиотензин-превращающий фермент (АПФ). АПФ (пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1) – это цинковая металлопротеиназа, состоящая из двух высокомолекулярных N- и C-доменов. АПФ является ключевым ферментом ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, поэтому его ингибиторы, тормозящие активность обоих доменов, нашли широкое применение в клинике в качестве гипотензивных средств [6]. В случае пептида Альцгеймера было показано, что N-домен АПФ может расщеплять человеческий A $\beta$  [7-10], проявляя активность дипептидазы, но в случае шестнадцатичленного домена пептида Альцгеймера основным является расщепление между пятым и шестым аминокислотными остатками, причем пептиды, образующиеся после расщепления A $\beta$  N-доменом АПФ, в культурах клеток не проявляют цитотоксичности [6]. В связи с этим было предположено, что активное применение ингибиторов АПФ как гипотензивных препаратов может спровоцировать образование сенильных бляшек в тканях мозга, что в итоге может привести к развитию деменции альцгеймеровского типа [7]. Понимание механизма взаимодействия АПФ с A $\beta$ , знание его особенностей могут способствовать в поиске новых лекарств для борьбы с болезнью Альцгеймера.

В естественных условиях крысы не страдают болезнью Альцгеймера. Недавно в Институте биомедицинской химии РАМН было показано, что N-домен АПФ расщепляет шестнадцатичленный N-домен человеческого и крысиного A $\beta$  по разным связям (статья готовится к публикации). Для человеческого A $\beta$  гидролиз проходит по единственной связи между 5 и 6 аминокислотными остатками (Arg5-His6). В то время как крысиный A $\beta$  расщепляется в основном по связи 13-14 (Arg13-His14). Поэтому в работе было проведено моделирование комплексов N-домена АПФ с человеческим и крысиным  $\beta$ -амилоидным

пептидом с целью выявить структурные особенности, определяющие такое селективное расщепление данных пептидов.

*Объекты и методы.* В работе использовали пространственную структуру N-домена АПФ человека (код pdb: 2с6п). Из-за невозможности корректного моделирования полноразмерного Аβ в активном центре фермента мы использовали четыре модельных тетрапептида, имитирующих основные места возможного гидролиза Аβ N-доменом АПФ: человеческие h4-7 (FRHD), h12-15 (VHHQ) и крысиные r4-7 (FGHD), r12-15 (VRHD) (рис. 1). Оптимизированные структуры пептидов были получены стандартными методами в программе Sybyl 8.1 фирмы Tripos [11]. Докинг пептидов проводили с помощью DOCK6.0 [12]. За место связывания тетрапептидов принималась область в активном центре на расстоянии 6 ангстрем вокруг положения ингибитора АПФ лизиноприла в известной пространственной структуре его комплекса с N-доменом АПФ (код pdb: 2с6п).



*Рис.1 Сайты расщепления шестнадцатичленного N-домена Аβ человека и крысы N-доменом АПФ. Желтым выделены модельные тетрапептиды, имитирующие основные места возможного гидролиза Аβ N-доменом АПФ.*

Докинг тетрапептидов h12-15 и r4-7 в активный центр N-домена АПФ человека не дал положительных результатов, не было найдено положений данных тетрапептидов около каталитического центра фермента, что подтверждается экспериментальными данными, согласно которым человеческий и крысиный Аβ не гидролизуются по этим связям.

Полученные комплексы h4-7 и r12-15 с N-доменом АПФ человека выявили ряд особенностей, позволяющих предположить различия во взаимодействии человеческого и крысиного Аβ с ферментом. Phe4 человеческого тетрапептида h4-7 находился в гидрофобном субсайте S2 и формировал π-катион взаимодействие с Arg500 белка (Рис. 2b). Arg5 располагался в субсайте S1 и контактировал с N-доменом АПФ в основном за счет ван-дер-ваальсовых сил (Рис. 2c). Субсайт S1' занимал His6, имидазольное кольцо которого формировало две водородные связи с Thr358 и Glu431 фермента (Рис. 2d). Asp7 располагался в субсайте S2' и мог образовывать водородную связь с Gln259 белка (Рис. 2e).

Комплекс крысиного тетрапептида r12-15 с N-доменом АПФ человека по расположению аминокислотных остатков тетрапептида в белке был похож на комплекс h4-7 с N-доменом АПФ. Val12 располагался в субсайте S2 рядом с гуанидиновой группой Arg500; Gln15 находился в субсайте S2', но в отличие от тетрапептида h4-7, не мог образовывать водородную связь с Gln259 белка; Arg13 располагался в субсайте S1 и формировал π-катион взаимодействие с Phe490. Т.е., несмотря на схожесть положения тетрапептидов h4-7 и r12-15 в активном центре N-домена АПФ человека, наблюдались

существенные различия во взаимодействии ряда боковых радикалов тетрапептидов Аβ с субсайтами фермента.

На основе полученных комплексов можно предположить, что процесс связывания β-амилоидного пептида с активным центром N-домена АПФ начинается с проникновения N-конца пептида через вход в активный центр фермента. Активный центр фермента представляет собой большую полость, разделенную на две части (по форме напоминает песочные часы), в самом узком месте которой располагается каталитический ион цинка. Для Аβ человека это приводит к тому, что в результате движения пептида в активном центре длинные аминокислотные остатки Arg5 и His6 Аβ человека оказываются первыми в области каталитического центра и выступают в роли «чеки», фиксирующей Аβ, в результате чего амилоидный пептид человека может эффективно расщепляться по связи 5-6. Далее расположенные аминокислотные остатки Аβ человека, по-видимому, не способны зафиксировать пептид в активном центре. Так, например, пептид, соответствующей области гидролиза Аβ крысы (тетрапептид h12-15) вокруг потенциальной гидролизуемой связи имеет только His14, который может образовывать прочную связь с активным центром. На это указывают данные, что нам не удалось получить комплекс этого тетрапептида с N-доменом АПФ.

Замена Arg5 на Gly5 в крысином Аβ разрушает конструкцию «чеки», пептид не может эффективно связаться в положении около связи 5-6 и «проскакивает» дальше до второй «чеки» в положении Arg13-His14, которая образовалась в результате замены в 13 положении (His у Аβ человека и Arg у крысы). Другим объяснением отсутствия расщепления связи Gly5-His6 может быть снижение величины связывания, за счет увеличения подвижности пептида, вызванные отсутствием бокового радикала у глицина. Это может сказаться как на изменении энтропийного вклада в связывание, так и на точность позиционирования других аминокислотных остатков в своих областях связывания. Но в любом случае отсутствие аргинина в положении 5 в крысином Аβ приводит к тому, что пептид «проскакивает» это положение до следующей «чеки».

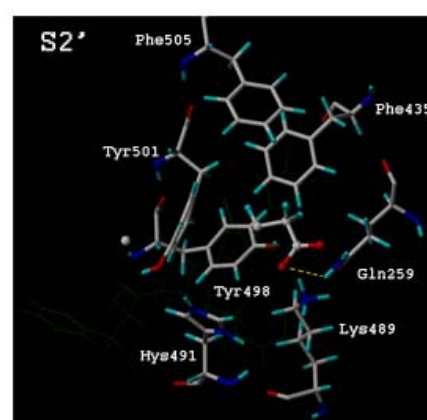
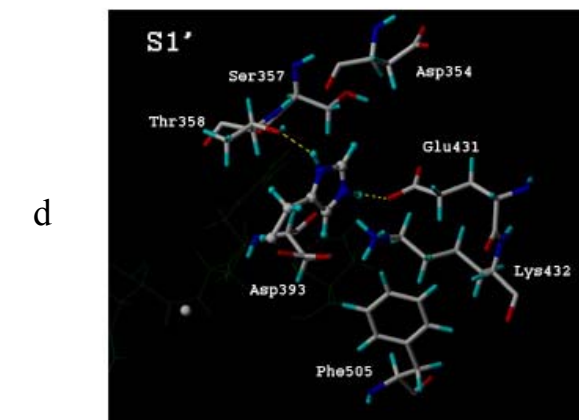
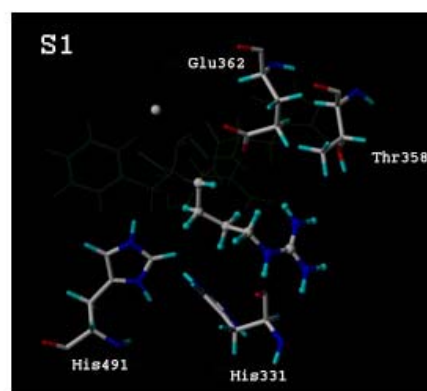
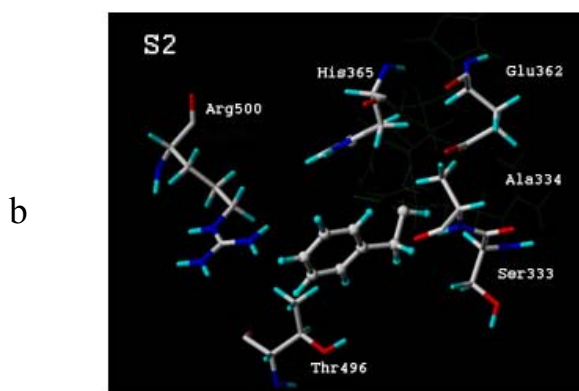
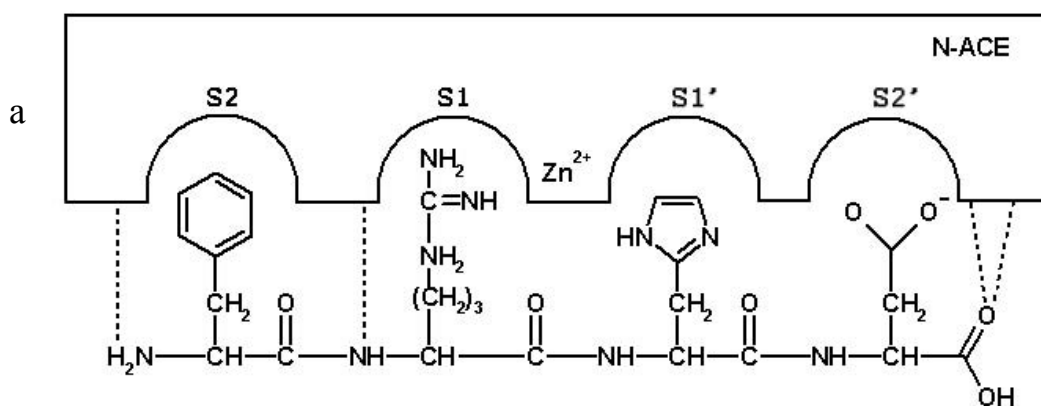


Рис2. Вверху схематическое изображение взаимодействия аминокислотных остатков тетрапептида h4-7 с субсайтами N-домена АПФ человека. Внизу молекулярно-графическая структура субсайтов, «ball and sticks» – аминокислотные остатки тетрапептида h4-7, «sticks» – аминокислотные остатки N-домена АПФ, пунктирные линии – водородные связи.

## Литература

1. *Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, MH Arrighi.* // Forecasting the global burden of Alzheimer's disease - *Alzheimer's and Dementia* 2007.3 (3). P.186–91.
2. *Selkoe D.J.* // Alzheimer Disease: Mechanistic Understanding Predicts Novel Therapies - *Annals of Internal Medicine*. 2004. 140. P.627-638.
3. *Olofsson A., Sauer-Eriksson A.E., Öhman A.* // The solvent protection of Alzheimer Amyloid- $\beta$ (1-42) fibrils as determined by solution NMR spectroscopy - *J. Biol. Chem.* 2006. 281. P.477-83.
4. *Carson J.A., Turner A.J.* //  $\beta$ -Amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases - *J. Neurochem.* 2002. 81. P.1-8.
5. *Evin G., Weidemann A.* // Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A $\beta$  amyloid peptides - *Peptides*. 2002. 23. P.1285–1297.
6. *Елусеева Ю.Е.* // Структурно-функциональные особенности ангиотензин-превращающего фермента - *Биоорганическая химия*. 1998. 24. С.262-270
7. *Hemming M. L., Selkoe D.J.* // Amyloid  $\beta$ -Protein is Degraded by Cellular Angiotensin-converting Enzyme (ACE) and Elevated by an ACE Inhibitor - *J. Biol. Chem.* 2005. 280. P.37644-37650
8. *Ghiso J., Shayo M., Calero M., Tomidokoro Y., Gandy S., Rostagno A., Frangione B.* // Systemic Catabolism of Alzheimer's A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 - *J. Biol. Chem.* 2004. 279. P.45897–45908.
9. *Oba R., Igarashi A., Kamata M., Nagata K., Takano S., Nakagawa H.* // The N-terminal active centre of human angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide - *Eur. J. Neurosci.* 2005. 21. P.733–740.
10. *Hu J., Igarashi A., Kamata M. and 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. P.47863–47868. SYBYL 8.1., Tripos Inc., 1699 South Hanley Road., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
11. *Moustakas DT, Lang PT, Pegg S, Pettersen E, Kuntz ID, Brooijmans N, Rizzo RC.* // Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5 - *J Comput Aided Mol Des.* 2006 Oct-Nov;20(10-11). P.601-19.