

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Тихомирова

Тихомирова Виктория Евгеньевна

**Фенотипирование ангиотензин-превращающего фермента в
крови и тканях человека в норме и при патологии**

03.01.04 - БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научные руководители — *Кост Ольга Алексеевна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник*

Данилов Сергей Михайлович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты — *Мелик-Нубаров Николай Сергеевич, доктор химических наук, кафедра высокомолекулярных соединений МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник*

Мяжкова Марина Александровна, доктор биологических наук, профессор, Институт биологически активных соединений РАН, заведующая лабораторией

Кугаевская Елена Владимировна, кандидат биологических наук, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «5» июня 2018 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва ул. Ленинские горы д. 1 стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/110794807/>

Автореферат разослан «3» мая 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

Актуальность темы. Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1) – Zn^{2+} -зависимая пептидаза, включающая два каталитически активных домена (N- и С-домены) в составе одной полипептидной цепи, является одним из главных регуляторов кровяного давления и принимает участие в развитии сосудистой патологии и ремоделировании. У здорового человека АПФ в кровь поступает, главным образом, из обширной системы капилляров легких, при этом уровень АПФ в крови достаточно стабилен, но увеличивается при некоторых заболеваниях, таких как саркоидоз и болезнь Гоше.

Исследования с использованием панели из 17 моноклональных антител (мАт), распознающих различные эпитопы на поверхности АПФ, показали, что связывание мАт с АПФ является чувствительным маркером локальной конформации поверхности АПФ, изменяясь при частичной денатурации глобулы АПФ, химической модификации, связывании ингибитора и др. Использование панели мАт позволило детектировать АПФ, продуцируемый в различных клетках, включая АПФ из макрофагов и дендритных клеток, а также обнаружить конформационно измененный АПФ, поступающий из саркоидных гранул, в крови пациентов с саркоидозом и конформационно измененный АПФ в крови больных уреимией.

Поскольку очевидно, что повышенный уровень АПФ в крови при развитии болезни Гоше связан с поступлением фермента в кровь не только из легких, но и из видоизмененных макрофагов (клеток Гоше), то существует возможность определения такого фермента в крови с помощью мАт. Образец связывания панели мАт с АПФ в тканях и крови пациентов с болезнью Гоше может позволить различать АПФ, продуцируемый в норме и при патологии, что, в свою очередь, позволит получить новые сведения о механизме и развитии болезни Гоше и получить новый маркер этого заболевания.

Известно также, что при фибрилляции предсердий уровень АПФ в тканях сердца повышен в 3 раза, что может приводить к повышенному поступлению в кровь АПФ из сердца. Исследование топографии поверхности АПФ сердца с использованием панели мАт в сравнении с АПФ легких может продемонстрировать отличия этих двух ферментов, что в свою очередь покажет возможность получения мАт, специфичных именно к АПФ сердца.

Цели работы. Характеристика АПФ в крови и тканях пациентов с болезнью Гоше для выявления АПФ с измененной топографией поверхности фермента. Фенотипирование АПФ, продуцируемого в тканях сердца, для определения возможной тканеспецифичности АПФ сердца.

Научная новизна и практическая значимость. Определен уровень АПФ в различных тканях человека – сердце, легких, почках, печени, селезенке, простате, плаценте и жировой ткани – путем сравнения активности АПФ в гомогенатах этих тканей. Активность АПФ в сердце примерно в 3 раза выше, чем в плазме крови и в 10-15 раз меньше, чем в легких. Активность АПФ в селезенке в 10 раз ниже, чем в легких, но возрастает в среднем в 12 раз при болезни Гоше.

Показано, что все ткани содержат эндогенные ингибиторы АПФ, причем содержание ингибиторов варьируется в зависимости от ткани и от пациента к пациенту. В нормальной селезенке обнаружено особенно высокое содержание эндогенных ингибиторов АПФ, основная часть которых легко удаляется при фильтрации, диализе или разбавлении гомогената. Однако в здоровой селезенке обнаружен ингибитор АПФ с молекулярной массой от 10-30 кДа, который удалялся только при очистке АПФ методом аффинной хроматографии на колонке со специфичным ингибитором фермента или инкубацией гомогената селезенки с сильным ингибитором АПФ с последующей фильтрацией на 30 кДа фильтрах. У пациентов с диагнозом болезни Гоше этот эндогенный ингибитор в ткани селезенки отсутствует.

В плазме пациентов с болезнью Гоше уровень АПФ повышен в среднем в 6,5 раз по сравнению с нормой. В то же время плазма крови пациентов с болезнью Гоше содержит и больше низкомолекулярных (менее 10 кДа) эндогенных ингибиторов АПФ.

Продемонстрированы отличия топографии поверхности АПФ в составе плазмы крови пациентов с болезнью Гоше от АПФ в составе плазмы условно здоровых доноров: связывание двух мАт 3G8 и 6A12, эпитопы которых находятся на N-домене АПФ, и мАт 3F11 к С-домену АПФ значительно отличалось в норме и при патологии, что может быть связано с различиями в гликозилировании АПФ в потенциальных сайтах N-гликозилирования, находящихся внутри эпитопов связывания этих мАт Asn82 и/или Asn 25, Asn416 на N-домене, а также Asn1162 на С-домене фермента. Показаны также отличия в топографии АПФ, продуцируемого клетками Гоше в тканях селезенки, по сравнению с АПФ, продуцируемым эндотелиальными клетками здоровой селезенки: отмечена различная эффективность связывания мАт 3G8 и 5F1 к N-домену АПФ, а также 1B3, 1B8/3F10, 1E10 и 2H9 к С-домену АПФ, что может быть связано с различным гликозилированием АПФ в норме и при патологии в сайтах Asn82 и/или Asn 25, Asn117 на N-домене, а также Asn731 и Asn685 на С-домене. Сравнение профилей связывания мАт с АПФ селезенки и печени позволило сделать вывод, что избыточный уровень АПФ в крови при болезни Гоше может возникать путем поступления из макрофагов Гоше не только селезенки, но и печени. В целом, определение в крови АПФ с измененной конформацией поверхности может служить дополнительным клиническим биомаркером болезни Гоше.

Проведено сравнение характеристик АПФ из сердца и легких. Показано, что при гидролизе субстрата Hip-His-Leu оптимум pH находится при 7,5 для АПФ сердца и 7,8-7,9 для АПФ легких. Каталитическая константа гидролиза этого же субстрата под действием АПФ сердца оказалась в 2 раза ниже, чем под действием АПФ легких, в то время как для других субстратов существенных отличий не было.

Показаны отличия в связывании мАт с АПФ, продуцируемым эндотелиальными клетками (и, возможно, миофибробластами) сердца, и АПФ, продуцируемым эндотелиальными клетками легких, что может объясняться различным гликозилированием в сайтах Asn25 и Asn117 на N-домене и Asn666 и Asn731 на С-домене АПФ из разных органов.

С использованием MALDI-TOF спектрометрии показано, что в АПФ из сердца гликозилированы сайты Asn117, 480, 666 и 685, а в АПФ из легких сайты Asn117, 648, 666, 685 и, возможно, 480. Обнаружены различия в вероятных структурах гликанов в составе АПФ из сердца и легких, которые демонстрируют тканеспецифичность АПФ, продуцируемого в разных органах.

Обнаружено, что связывание специфичного ингибитора АПФ эналаприлата в активных центрах фермента вызывает небольшие изменения в связывании нескольких антител к ферменту (i2H5, 6A12, 5F1, 4E3) в случае АПФ легких, но значительные в случае АПФ сердца.

Различия в эффективности связывания мАт с АПФ из сердца и легких наблюдаются не только для очищенных АПФ, но и для гомогенатов тканей, а также АПФ, прошедших через кровотоки крысы. Эти данные показывают, что возможно получение мАт, специфично распознающих АПФ из сердца.

Кроме того, в тканях сердца обнаружено присутствие эндогенного эффектора АПФ с молекулярной массой от 3 до 100 кДа, понижающего эффективность связывания мАт 1B8 и 3F10 к С-домену фермента.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на International Conference "Science of the future" (Saint-Petersburg, 2014), American College of Cardiology 64th Annual Scientific Session (San-Diego, 2015), Conference "Biocatalysis-2015. Fundamentals and Applications" (Москва, 2015), VII Российском симпозиуме "Белки и Пептиды" (Новосибирск, 2015), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015» (Москва, 2015), V Съезде физиологов СНГ и V Съезде биохимиков России (Сочи 2016), Международной научной конференции по биоорганической химии "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" и VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Москва, 2017).

Печатные работы. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.02.08 по специальности 03.01.04 – БИОХИМИЯ, и тезисах 7 докладов всероссийских и международных научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (главы 1-3), экспериментальной части (глава 4), описывающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения (главы 5-8), выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 144 страницах, содержит 7 таблиц и 55 рисунков. Список литературы включает 220 ссылок.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Образцы плазмы крови пациентов с болезнью Гоше были предоставлены Медико-генетическим научным центром РАМН. Плазмы крови здоровых доноров и ткани различных органов были предоставлены Научным Центром Сердечно-Сосудистой Хирургии имени А.Н. Бакулева МЗ РФ и Медицинским научно-образовательным центром МГУ имени М.В. Ломоносова. Семенная жидкость предоставлена НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина РФ. Из плазмы крови условно здоровых доноров был создан стандартизированный пул плазмы крови. В работе использовали АПФ, очищенный нами из тканей легких, сердца и семенной жидкости человека, а также АПФ в составе биологических жидкостей (плазмы крови и семенной жидкости) и гомогенатов тканей человека.

1. Методология работы с АПФ в составе гомогенатов тканей и плазмы крови

В работе использован комплексный метод характеристики АПФ (фенотипирование). Для этого использовали: 1) измерение активности в образцах по скорости гидролиза 2мМ Z-Phe-His-Leu и 5мМ Hip-His-Leu; 2) соотношение скоростей гидролиза этих субстратов ZPHL/HNL под действием АПФ из исследуемых источников, позволяющее обнаружить присутствие в среде ингибиторов АПФ (Danilov *et al.*, 2008); 3) исследование локальной топографии поверхности фермента с помощью уникальной панели моноклональных антител (мАт) против АПФ, «узнающих» 17 различных эпитопов на поверхности молекулы АПФ человека (Danilov *et al.*, 2010).

Для оценки связывания мАт с АПФ был использован метод иммуносорбции, при этом за образованием комплексов мАт-АПФ следили по активности фермента, связанного с мАт, сорбированными на планшете через поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов мыши.

Предварительно были определены условия, при которых проводились все дальнейшие эксперименты, а именно: 1) подобрана концентрация детергента для экстракции АПФ из тканей; 2) показано, что гидролиз использованных субстратов в гомогенатах происходит под действием только АПФ; 3) продукт реакции His-Leu гидролизуетея сопутствующей аминопептидазой в гомогенатах тканей, активность которой полностью подавляется бестатином; 4) учтены эффекты тушения флуоресценции продукта ферментативного гидролиза белками и флуорофорами в гомогенатах тканей; 5) показано присутствие в гомогенатах тканей эндогенных ингибиторов АПФ, влияющих на определяемую активность фермента. В качестве примера приведены данные по определению активности АПФ в гомогенатах легких от 10 различных доноров. Показано, что определяемая величина активности АПФ имеет нелинейную зависимость от содержания гомогената в реакционной

среде, а приведенная активность АПФ растет с увеличением разбавления гомогената (Рис. 1) и практически достигает плато при разбавлении в 10 раз. С учетом эффекта тушения флуоресценции определяемая активность АПФ, измеренная для неразбавленного гомогената, может составлять лишь около 40% от реальной. Это свидетельствует о наличии в гомогенатах тканей эндогенных ингибиторов фермента, комплексы которых с АПФ диссоциируют при разбавлении.

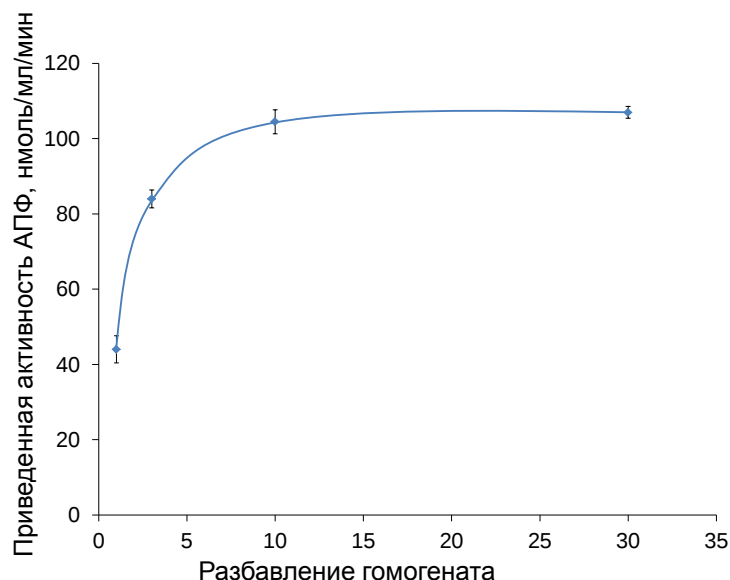


Рис.1. Эффект разбавления гомогената легких на приведенную активность АПФ. Активность АПФ определяли с использованием Z-Phe-His-Leu в качестве субстрата при различных исходных разбавлениях гомогената легких от одного донора в до 30 раз (180 раз в реакционной среде), приготовленного в соотношении 1:9 (ткань : буфер) в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,5, содержащем 0,15 М NaCl и 1мкМ ZnSO₄. Данные представлены в % от приведенной активности АПФ, полученной для исходного разбавления гомогената в 30 раз.

2. Активность АПФ в различных тканях человека

АПФ синтезируется практически во всех органах организма человека. Мы определили уровень АПФ в различных тканях человека. Представленные на рисунке 2 данные являются средними значениями для образцов тканей или плазмы от 3 – 9 пациентов. Показано, что содержание АПФ в тканях сердца в среднем в 3 раза выше, чем в плазме крови человека, и в 13 раз меньше, чем в легких человека (Рис 2 А), что коррелирует с результатами более ранних исследований (Vago *et al.*, 1992) и соотносится с данными транскрипции РНК АПФ в тканях легких и сердца (*The Human Protein Atlas*). Активность в гомогенатах селезенки была в 10 раз ниже, чем в аналогично полученных гомогенатах легких.

Кроме того, показано статистически значимое различие в активности АПФ в предсердиях и желудочках сердца, причем эта активность самая высокая в правом желудочке 90 ± 19 нмоль/мин/г и самая низкая в правом предсердии 61 ± 17 нмоль/мин/г (Z-Phe-His-Leu в качестве субстрата).

Повышенное соотношение скоростей гидролиза двух субстратов Z-Phe-His-Leu и Hip-His-Leu под действием АПФ в составе гомогенатов различных тканей (ZPHL/HNL отношение) (Рис. 2 Б, В) подтверждает, что все исследованные ткани содержат эндогенные ингибиторы

АПФ, содержание которых может варьироваться в различных тканях. Кроме того, это соотношение варьируется при переходе от пациента к пациенту. Для большинства тканей при разбавлении гомогенатов в 10 раз ZPHL/HNL соотношение снижается, приближаясь к таковому для очищенного АПФ (Рис 2 Б), равному 1 - 1,4, но для селезенки ZPHL/HNL остается крайне высоким даже при разбавлении исходных гомогенатов в 10 раз, что может отражать более высокое содержание ингибиторов в селезенке.

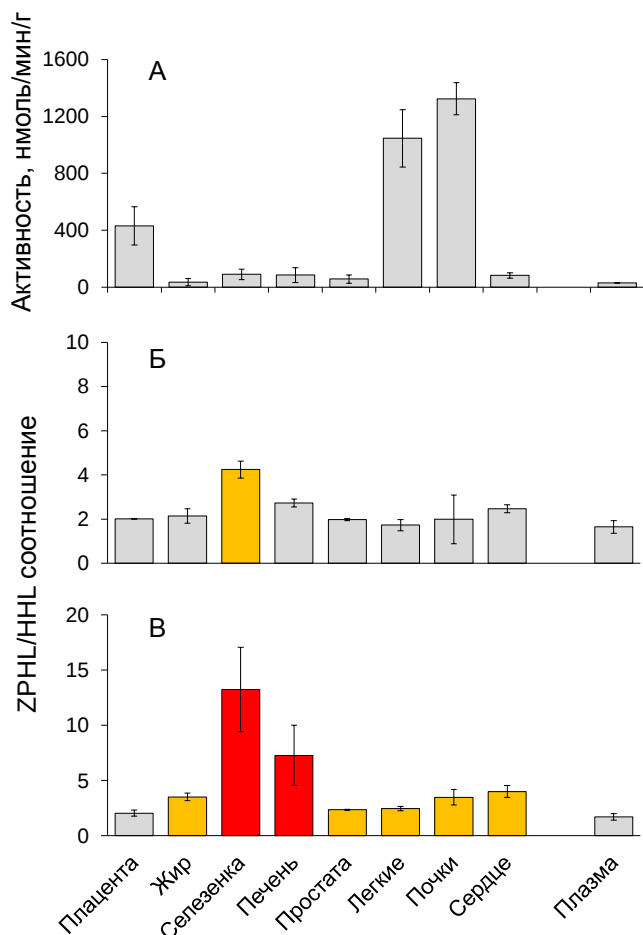


Рис. 2. Активность АПФ в гомогенатах различных тканей, определенная по скорости гидролиза субстрата Z-Phe-His-Leu, и соотношение скоростей гидролиза Z-Phe-His-Leu/Hip-His-Leu. Гомогенаты приготовлены в соотношении 1:9. А) активность АПФ в гомогенатах различных тканей, предварительно разбавленных в 10 раз, по 2 мМ Z-Phe-His-Leu, Б) соотношение скоростей гидролиза двух субстратов Z-Phe-His-Leu и Hip-His-Leu для гомогенатов различных тканей человека при предварительном разбавлении в 10 раз и В) соотношение ZPHL/HNL для неразбавленных гомогенатов, а также плазмы крови. Столбцы, выделенные красным цветом, отражают повышение значения более чем на 100%, оранжевым – более чем на 20 %.

3. Фенотипирование АПФ в плазме пациентов с болезнью Гоше

Мы сравнили активность АПФ в составе пула плазмы крови от 25 здоровых доноров и в составе образцов плазмы 19 пациентов с болезнью Гоше с использованием двух субстратов Z-Phe-His-Leu и Hip-His-Leu, а также соотношение ZPHL/HNL. Активность АПФ в плазме крови пациентов с болезнью Гоше по Z-Phe-His-Leu была в среднем в 6,5 раз выше, чем в норме (Рис. 3 А), что согласуется с предыдущими наблюдениями (Silverstein and Friedland, 1977). Активность АПФ в плазме крови двух пациентов № 4 и 7 с болезнью Гоше, перенесших ферментную заместительную терапию, понижалась в 1,8 и 3 раза через 1 год лечения.

Соотношение ZPHL/HNL было значительно ниже ($p < 0,01$) для АПФ в составе плазмы крови большинства пациентов с болезнью Гоше (Рис. 3 Б), что может указывать на наличие при заболевании избыточных количеств эндогенных ингибиторов АПФ, предпочтительнее

связывающихся с N-доменом АПФ. При разбавлении плазмы Гоше до 20 раз ZPHL/HNL соотношение немного возросло, что позволяет заключить, что пониженное соотношение ZPHL/HNL пациентов с болезнью Гоше действительно связано с высоким содержанием ингибиторов в плазме крови. Из 2 наборов плазм крови пациентов с болезнью Гоше был создан пул, в который не включили образцы 3,6 и 13.

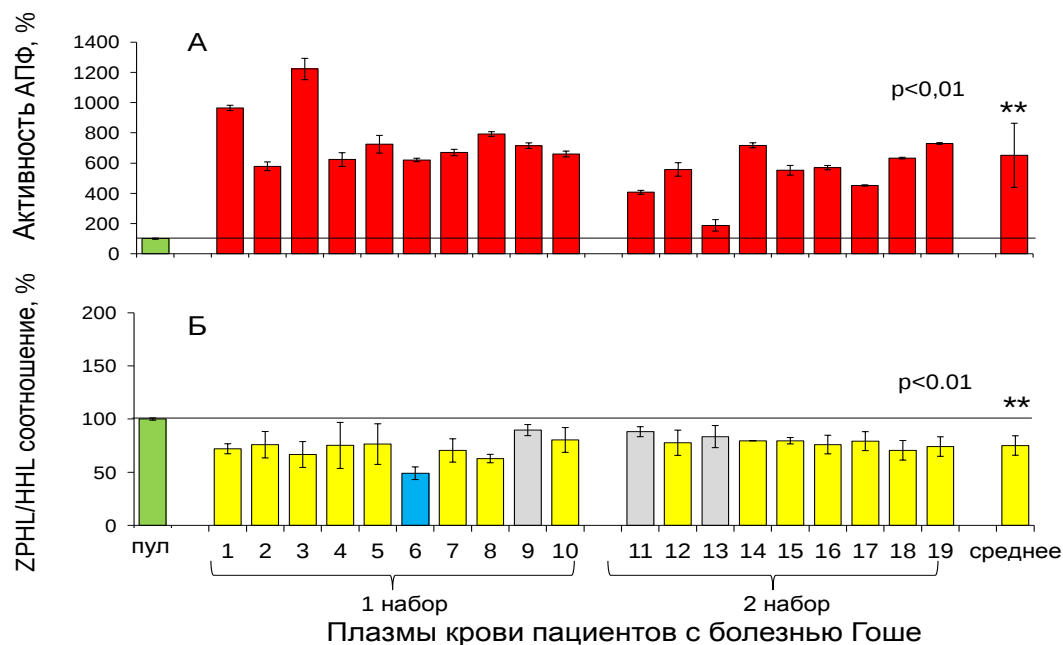


Рис. 3. Активность АПФ в плазме крови пациентов с болезнью Гоше и соотношение скоростей гидролиза Z-Phe-His-Leu/Hip-His-Leu в сравнении с данными для здоровых доноров. Активность АПФ определена с использованием 2мМ Z-Phe-His-Leu и 5мМ Hip-His-Leu в качестве субстратов в 0,1 М фосфатном буфере, pH 8,3, содержащем 0,3 М NaCl и 1мкМ ZnSO₄. А) Данные по активности АПФ выражены в процентном соотношении активности АПФ в плазме пациентов к значению для пула плазмы здоровых доноров (23,3 нмоль/мин/мл для Hip-His-Leu). Б) Соотношение скорости гидролиза двух субстратов (отношение ZPHL/HNL) в тестируемых образцах. Данные выражены в % от контрольного значения (зеленый столбец). Столбцы, выделенные красным цветом, отражают повышение более чем на 100%. Желтым выделены образцы со значением на 20% меньше, чем условно здоровый пул, синим на 50% ** p < 0,01 указывает на значимые различия активности АПФ и соотношения ZPHL/HNL при заболевании и в норме.

Диализ и фильтрация пула плазмы пациентов с болезнью Гоше с использованием мембраны как 10 кДа, так и 100 кДа приводили к увеличению активности АПФ по обоим субстратам Z-Phe-His-Leu и Hip-His-Leu на 30-40 и 55%, соответственно. После диализа и фильтрации пула плазмы здоровых доноров активность АПФ возрастала на 35% только по Z-Phe-His-Leu. При этом соотношение ZPHL/HNL практически не изменялось для АПФ плазмы больных, но возрастало для АПФ плазмы здоровых доноров. Таким образом, в крови как здоровых доноров, так и пациентов с болезнью Гоше присутствуют эндогенные ингибиторы, но их содержание и природа могут значительно различаться в норме и при патологии.

Прошедшие сквозь мембраны с размером пор 10 кДа и 100 кДа 95 % фильтраты плазмы условно здоровых доноров практически не оказывали влияния на активность АПФ, очищенного из семенной жидкости. Фильтраты 10 и 100 кДа плазмы пациентов с болезнью Гоше понижали активность очищенного АПФ на 30 %, что подтверждает более высокое содержание эндогенных ингибиторов в плазме крови пациентов с болезнью Гоше. Поскольку оказываемый 10 кДа и 100 кДа фильтратами эффект на активность очищенного АПФ был одинаковым, молекулярная масса этих ингибиторов АПФ в составе плазмы пациентов с болезнью Гоше составляет менее 10 кДа.

Чтобы охарактеризовать топографию поверхности АПФ в крови у пациентов с болезнью Гоше, мы получили профиль связывания панели из 16 мАт, направленных к различным эпитопам, расположенным на N- и С-доменах каталитически активного человеческого АПФ (Danilov *et al.*, 2010), с АПФ в составе 7 образцов плазмы крови пациентов с болезнью Гоше и 5 образцов от условно здоровых доноров (Рис. 4).

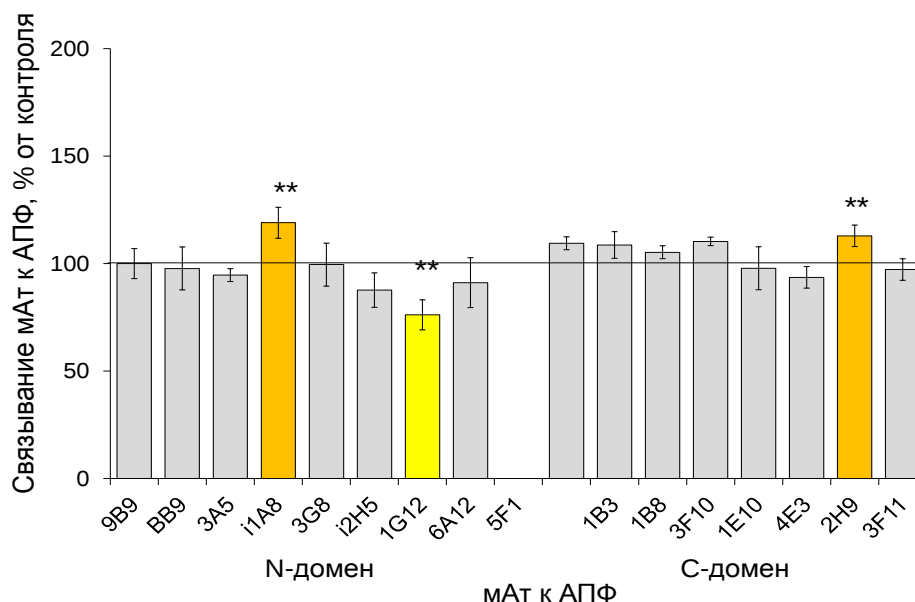


Рис. 4. Профиль связывания панели из 16 мАт с АПФ в составе плазмы крови пациентов с болезнью Гоше в сравнении с плазмой условно здоровых доноров. Плазма крови была разбавлена в 10 раз. Представленные данные представляют собой среднее значение данных, полученных для 7 образцов плазмы пациентов с болезнью Гоше и 5 образцов плазмы здоровых доноров. Оранжевым выделены соотношения, увеличенные более чем на 20%, а пониженные более чем на 20% - желтым. ** $p < 0,01$ указывает на значимость различий в связывании мАт с АПФ в нормальной плазме и при развитии болезни Гоше.

Показано, что связывание двух мАт 3G8 и 6A12, эпитопы связывания которых располагаются на N-домене АПФ (Balyasnikova *et al.*, 2007; Gordon *et al.*, 2010) и мАт 3F11, направленного к эпитопу на С-домене (Naperova *et al.*, 2008), значительно отличалось для образцов плазмы крови пациентов с болезнью Гоше (Рис. 4). Различия в связывании мАт 3G8, 6A12 и 3F11, вероятно, связаны с различиями в гликозилировании АПФ в потенциальных

сайтах N-гликозилирования Asn82 и/или Asn 25, Asn416 и Asn1162, которые располагаются в эпитопах связывания этих мАт на поверхности АПФ, которые приводят к различиям в локальной топографии этих эпитопов на поверхности АПФ в норме и при патологии, что, в свою очередь, отражается в различиях в эффективности связывания панели мАт.

Итак, показано, что активность АПФ в плазме крови пациентов с болезнью Гоше повышена в среднем в 6,5 раз по сравнению с плазмой условно здоровых доноров, при этом в плазме крови пациентов с болезнью Гоше также содержится более высокое количество эндогенных ингибиторов с молекулярной массой менее 10 кДа. Топография поверхности АПФ в плазме крови в норме и при развитии болезни Гоше существенно отличается.

4. Активность АПФ в гомогенатах селезенки

Болезнь Гоше характеризуется повышенной выработкой обогащенных липидами макрофагов Гоше во многих тканях, включая селезенку, печень, почки, легкие, мозг и костный мозг. Поэтому помимо изучения АПФ в составе плазмы крови пациентов при развитии болезни Гоше, мы определили активность АПФ и соотношение ZPHL/NHL в гомогенатах селезенки от 6 пациентов с болезнью Гоше и 5 контрольных образцах селезенки от условно здоровых доноров (Рис. 5).

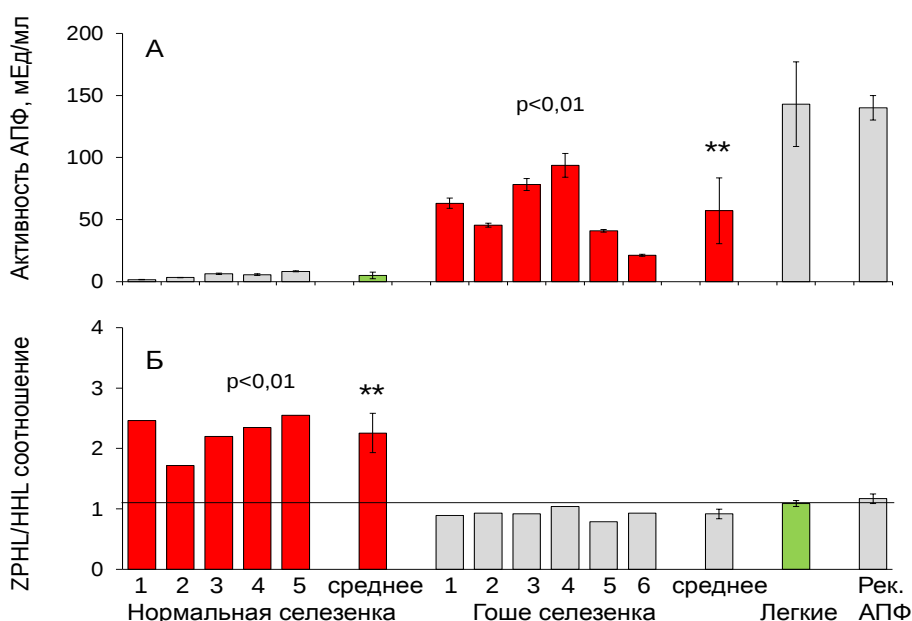


Рис. 5. Активность АПФ и соответствующие соотношения ZPHL/NHL в гомогенатах селезенки пациентов с болезнью Гоше и гомогенатах селезенки условно здоровых пациентов. Гомогенаты приготовлены 1:9 (ткань : буфер) и предварительно разбавлены для измерения активности в 10 раз. А) активность АПФ, определенная с использованием 2 мМ Z-Phe-His-Leu в 0,1 М фосфатном буфере, рН 8,3, содержащем 0,3 М NaCl и 1мкМ ZnSO₄; Б) соотношения ZPHL/NHL для АПФ в гомогенатах селезенки пациентов с болезнью Гоше и здоровых доноров в сравнении с соответствующими параметрами для среднего из 3 гомогенатов легких здоровых пациентов, а также для рекомбинантного растворимого АПФ, продуцированного CHO-клетками (Wei *et al.*, 1991). ** $p < 0,01$ указывает на значительные различия в активности АПФ при болезни Гоше и норме, а также на значительные отличия ZPHL/NHL для нормальной селезенки.

В образцах селезенки пациентов с болезнью Гоше активность АПФ была значительно увеличена в среднем в 12 раз (Рис. 5 А), что подтверждает предыдущие исследования (Silverstein and Friedland, 1977). Повышение уровня АПФ в тканях селезенки при развитии болезни Гоше выражено значительно сильнее, чем отражается в уровне АПФ в крови (Рис. 3).

Соотношение ZPHL/HNL для АПФ в составе гомогенатов селезенки пациентов с болезнью Гоше соответствовало значениям, полученным для рекомбинантного фермента и АПФ в составе гомогенатов легких условно здоровых доноров. Однако в случае нормальной селезенки соотношение ZPHL/HNL оказалось неожиданно высоким (Рис. 5 Б), что указывает на то, что здоровая селезенка продуцирует высокое количество эндогенных ингибиторов АПФ.

5. Присутствие высокоаффинного ингибитора в селезенке человека

Зависимость активности АПФ от разбавления гомогената селезенки выражена намного ярче, чем для АПФ в составе гомогената легких, что указывает на то, что селезенка содержит намного больше ингибиторов, чем ткани легких (Рис. 6). Соотношение ZPHL/HNL для АПФ в составе гомогената селезенки резко снижалось с увеличением разбавления, что указывает на легкую диссоциацию комплексов этих ингибиторов с АПФ при разбавлении. В то же время даже при высоком разбавлении соотношение ZPHL/HNL для АПФ селезенки было гораздо выше, чем для легких (Рис. 6 В).

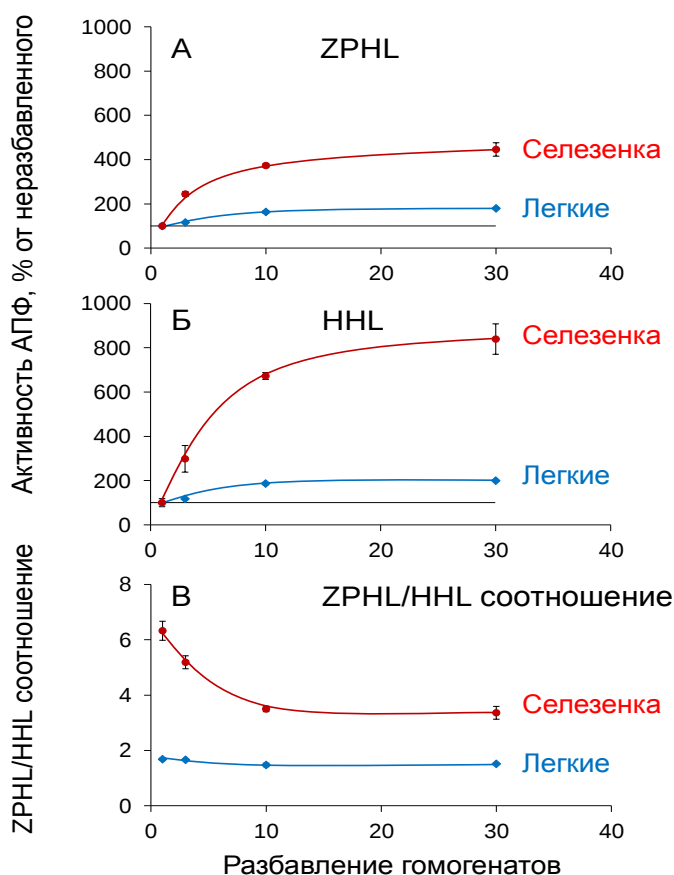


Рис. 6. Зависимость приведенной активности АПФ в гомогенатах тканей и соотношения ZPHL/HNL от разбавления. А) Активность АПФ в составе гомогенатов легких и селезенки от одного условно здорового донора при различных разбавлениях, определенная с использованием 2 mM Z-Phe-His-Leu и Б) 5 mM Hip-His-Leu в 0,1 М фосфатном буфере, pH 8,3, содержащем 0,3 М NaCl и 1мкМ ZnSO₄. Приведенная активность рассчитана в % от значений активности, полученных для неразбавленных гомогенатов; В) соотношение скоростей гидролиза двух субстратов ZPHL/HNL.

Повышенное соотношение ZPHL/HNL для АПФ в составе гомогената селезенки может быть объяснено присутствием специфичного для селезенки высокоаффинного эндогенного ингибитора.

Фильтрация гомогенатов селезенки Гоше и селезенки от здоровых доноров с использованием фильтров с размерами пор 10 кДа и 100 кДа показала, что ткани селезенки при болезни Гоше содержат больше низкоаффинных ингибиторов, чем нормальная селезенка, тогда как нормальная селезенка может содержать высокомолекулярные ингибиторы или эффекторы, отсутствующие в селезенке пациентов с болезнью Гоше.

В случае же нормальной селезенки в результате разбавления, диализа (10 кДа) и фильтрации на фильтрах с размером пор 100 кДа соотношение ZPHL/HNL оставалось повышенным (Рис.7 А), что указывает на присутствие в тканях селезенки высокоаффинного ингибитора. Однако очистка АПФ из гомогената селезенки с помощью аффинной хроматографии на колонке со специфичным ингибитором АПФ лизиноприлом привела к уменьшению отношения ZPHL/HNL, которое стало близким к значениям АПФ легких и АПФ в плазме крови (Рис. 7 А). Таким образом, мы продемонстрировали, что повышенное соотношение ZPHL/HNL не является свойством фермента селезенки, но обусловлено наличием в тканях селезенки высокоаффинного ингибитора АПФ.

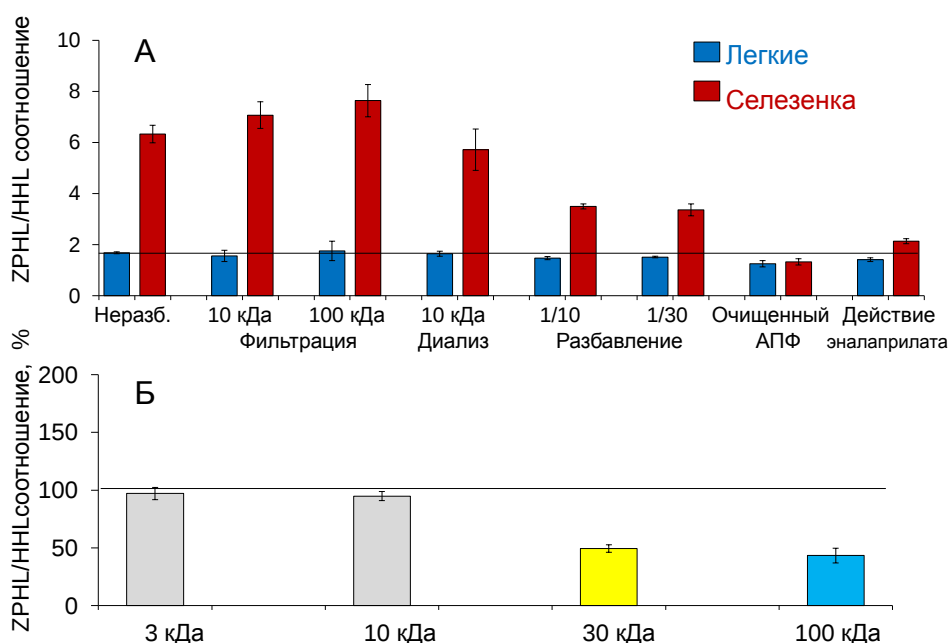


Рис. 7. Эффект различных видов очистки гомогенатов легких и селезенки на соотношение ZPHL/HNL. А) Эффект различных видов обработки гомогенатов селезенки и легких на соотношение скоростей гидролиза ZPHL/HNL; Б) Эффект фильтрации на фильтрах с различным размером пор на соотношение ZPHL/HNL АПФ в гомогенатах селезенки с предварительной инкубацией гомогенатов с 10 мкМ эналаприлатом. В качестве субстратов использовали 2 mM Z-Phe-His-Leu и 5 mM Hip-His-Leu в 0,1 M фосфатном буфере, pH 8,3, содержащем 0,3 M NaCl и 1мкМ ZnSO₄. Желтый цвет обозначает понижение активности АПФ более чем на 20 %, синий более чем на 50 %.

Высвобождение ингибитора из комплекса с АПФ за счет образования комплекса АПФ с лизиноприлом было подтверждено экспериментом, в котором гомогенат селезенки (гомогенат легких параллельно) инкубировали со специфическим ингибитором АПФ эналаприлатом, затем фильтровали на фильтрах различной пористости и, наконец, удаляли эналаприлат интенсивным диализом (Рис. 7 А, Б). Оказалось, что искомым ингибитор проходит через поры 100 и 30 кДа, что приводило к снижению соотношения ZPHL/HNL, но удерживался на фильтрах с размерами пор 10 и 3 кДа. Это позволяет утверждать, что молекулярная масса специфического ингибитора АПФ в селезенке человека находится в диапазоне от 10 до 30 кДа.

В результате проведения этого эксперимента было показано, что уменьшение соотношения ZPHL/HNL для АПФ селезенки вызвано значительным увеличением активности по Hip-His-Leu, но не Z-Phe-His-Leu. Это указывает на то, что удаляемый высокоаффинный ингибитор предпочтительно связывается на С-домене АПФ, поскольку в условиях эксперимента (рН 8,3 и 0,3 М NaCl) субстрат Hip-His-Leu быстрее расщепляется под действием С-домена, в то время как Z-Phe-His-Leu гидролизуетя обоими доменами с близкими скоростями.

Внесение фильтрата селезенки 10-30 кДа к очищенному АПФ из семенной жидкости вызывало снижение активности, однако, соотношение ZPHL/HNL увеличивалось на 37 %, но не достигало значений, полученных для неразбавленного гомогената селезенки. Возможно, предполагаемый эффектор нестабилен, после диссоциации его комплекса с АПФ, или же восприимчив к действию сопутствующих протеиназ.

Таким образом, в норме селезенка содержит высокоаффинный С-домен специфичный ингибитор АПФ с молекулярной массой от 10 до 30 кДа, отсутствующий в селезенке пациентов с болезнью Гоше. Отсутствие в селезенке этого ингибитора – новый клинический признак болезни Гоше.

6. Конформационный анализ АПФ в различных тканях при развитии болезни Гоше

С использованием панели мАт к АПФ мы продемонстрировали различия в локальной топографии поверхности АПФ в гомогенатах различных тканей в норме и при развитии болезни Гоше (Рис. 8).

Оказалось, что эффективность связывания мАт 3G8 и 5F1 к N-домену АПФ и мАт 1B3, 1B8/3F10, 1E10 и 2H9 к С-домену значительно различается для АПФ селезенки пациентов с болезнью Гоше, в которых АПФ производится в основном клетками Гоше, и АПФ контрольных образцов здоровой селезенки (Рис. 8 А), где АПФ продуцируется только эндотелиальными клетками. Такие различия в связывании панели мАт могут отражать различия в гликозилировании потенциальных сайтов N-гликозилирования на поверхности

АПФ, в частности Asn82 и/или Asn 25 в эпитопе связывания мАт 3G8 (Gordon *et al.*, 2010) и Asn117 в эпитопе для мАт 5F1 (Danilov *et al.*, 2007) на N-домене, а также Asn731 в области перекрывания эпитопов для мАт 1B8/3F10 и 1B3 и Asn685 в эпитопе для мАт 2H9 (Naperova *et al.*, 2008) на C-домене АПФ.

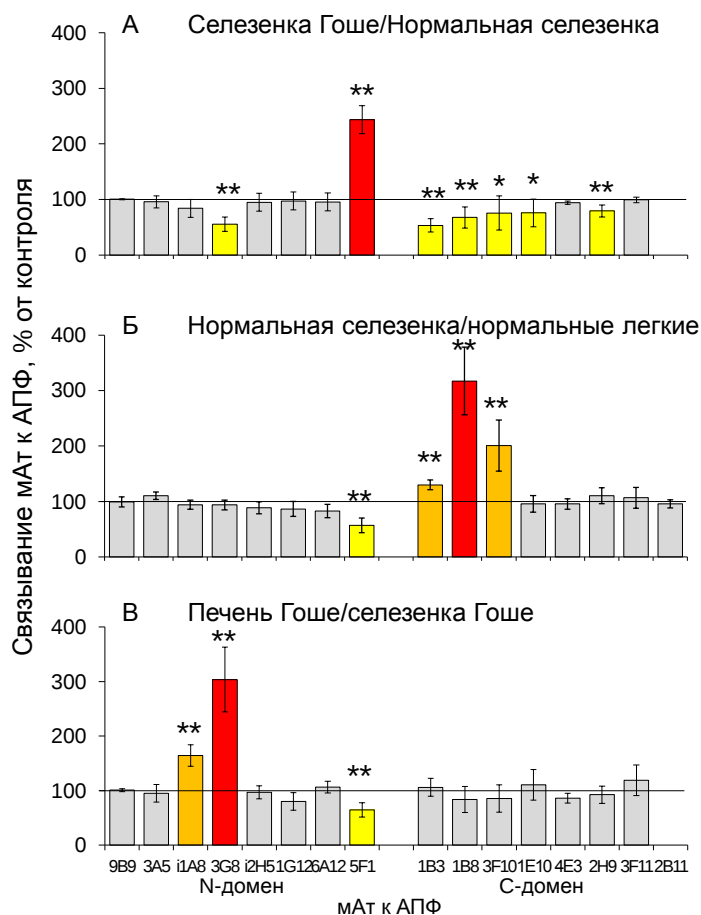


Рис. 8. Конформационные различия АПФ в составе гомогенатов селезенки, легких и печени с использованием панели 16 мАт к АПФ. Чтобы подчеркнуть различия, данные представлены в виде отношения активностей комплексов АПФ-мАт. А) Соотношение для АПФ в составе гомогената селезенки Гоше к нормальной селезенке; Б) отношение для АПФ в составе гомогената нормальной селезенки к АПФ в составе гомогената легких и В) соотношение для АПФ в составе гомогенатов печени Гоше к селезенке Гоше. Столбцы, выделенные красным цветом, отражают повышение более чем на 100%, оранжевым – более чем на 20 %. Желтый цвет – понижение значения более чем на 20 %. ** $p < 0,01$ и * $p < 0,05$ указывают на значимость различий для профиля связывания панели мАт с АПФ в различных тканях в норме и при развитии болезни Гоше.

Топография поверхности АПФ, продуцируемого эндотелиальными клетками в контрольных тканях селезенки и легкого, также различалась, что выражается в различной эффективности связывания мАт 5F1 на N-домене и мАт 1B3/1B8/3F10 на C-домене (Рис. 8 Б). Эти различия могут быть связаны с тем, что продуцируемый эндотелиальными клетками селезенки АПФ содержит большее количество сиалированных гликанов в сайтах гликозилирования Asn117 и Asn731.

Гистологически болезнь Гоше характеризуется наличием клеток Гоше не только в селезенке, но также в печени и костном мозге пациентов (Adar *et al.*, 2016), (Ivanova *et al.*, 2016). Поэтому обнаруженные нами ранее конформационные отличия АПФ в составе плазмы крови пациентов с болезнью Гоше от АПФ в плазме крови здоровых доноров (Рис. 4) могут быть связаны не только с тем, что конформационно измененный АПФ поступает из клеток Гоше селезенки, но также из клеток Гоше печени.

Связывание мАт 3G8 с АПФ печени происходит намного эффективнее, чем связывание с АПФ селезенки (Рис. 8 В). Поскольку в крови эффективность связывания этого мАт при

болезни выше, чем в норме, мы связали избыточный уровень АПФ в крови при болезни Гоше не только с ферментом, поступающим в кровь из клеток Гоше в селезенке, но также и из клеток Гоше в печени. Учитывая активность АПФ в обоих органах и их вес, можно рассчитать, что количество АПФ, доступное для шеддинга в кровообращение из клеток Гоше в печени, сравнимо с количеством фермента из клеток Гоше селезенки.

Таким образом, фенотипирование АПФ в составе плазмы и тканей селезенки у пациентов с болезнью Гоше показало, что активность и топография поверхности АПФ в плазме и селезенке при развитии этого заболевания значительно отличаются от АПФ условно здоровых доноров. Конформационно измененный АПФ в составе плазмы крови пациентов может быть использован в качестве нового биохимического маркера болезни Гоше.

Фенотипирование АПФ из тканей сердца

Поскольку содержание АПФ в сердце мало по сравнению с легкими, даже при повышении уровня АПФ в 3 раза при развитии фибрилляции предсердий, это не дает возможности детектировать в крови АПФ, поступающий именно из сердца. Поэтому перспективным представляется получение мАт, способных связывать АПФ сердца. Прежде чем приступить к этой задаче, необходимо выяснить, отличается ли, и если отличается, то как АПФ сердца от АПФ легких.

7. Кинетические характеристики АПФ из тканей сердца и легких

В первую очередь мы изучили кинетические свойства высокоочищенных препаратов АПФ из тканей сердца и легких. Зависимости ферментативной активности от рН для АПФ сердца и легких при гидролизе Z-Phe-His-Leu в присутствии 0,15 М NaCl имели одинаковый оптимум рН около 7,0. Однако оптимум рН для гидролиза Hip-His-Leu составляет 7,5 для АПФ сердца и 7,8-7,9 для АПФ легких (Рис. 9).

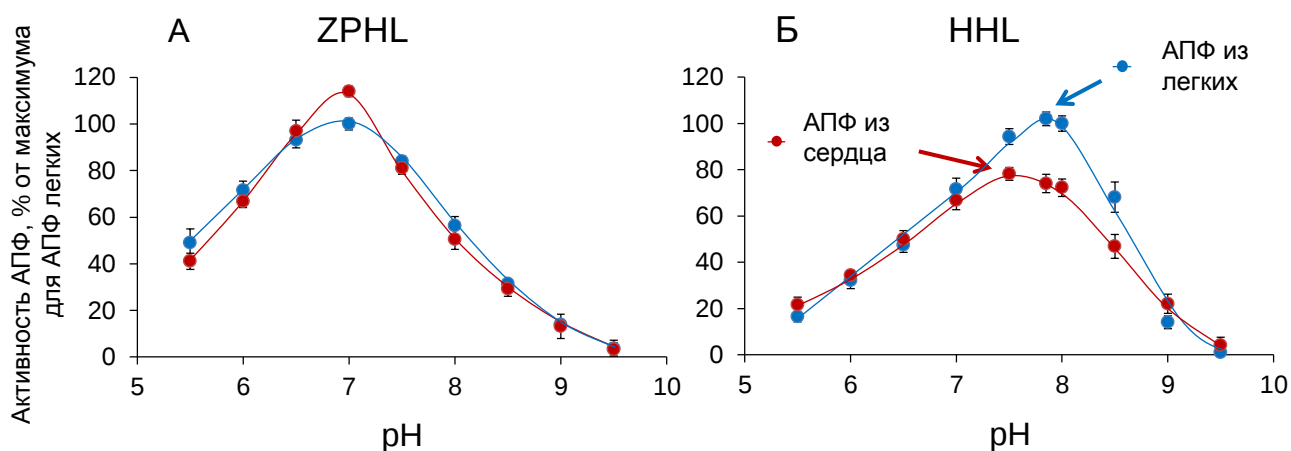


Рис. 9. Зависимость активности очищенного АПФ из тканей сердца и легких от рН. Измерение активности очищенных АПФ из легких и сердца с использованием 0,5 мМ Z-Phe-His-Leu (А) и 1,3 мМ Hip-His-Leu (Б) проводили в 25 мМ ацетатном-MES-Tris-боратном буфере, содержащем 0,15 М NaCl и 1 мкМ ZnCl₂. Каждое значение представляет собой среднее из 3 экспериментов в повторях.

Кинетические параметры $k_{\text{кат}}$ и K_M гидролиза нескольких синтетических субстратов, а также естественного субстрата АПФ ангиотензина I под действием очищенных АПФ из сердца и легких человека определяли в физиологических условиях при pH 7,5 и в присутствии 0,15 М NaCl. Рассчитанные константы представлены в таблице 1. Два субстрата Z-Phe-His-Leu и Hip-His-Leu, являются С-концевыми аналогами ангиотензина I, в то время как субстрат с Phe-Arg на С-конце можно рассматривать как С-концевой аналог другого природного субстрата АПФ, брадикинина, а также как С-концевой аналог атриопептина 2.

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза различных субстратов под действием очищенных АПФ из сердца и легких человека.

Субстрат	АПФ сердца			АПФ легких		
	$k_{\text{кат}},$ с^{-1}	$K_M, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}/K_M,$ $\text{с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$	$k_{\text{кат}},$ с^{-1}	$K_M, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}/K_M,$ $\text{с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$
Ангиотензин I	22±1	0.04±0.01	535	21±3	0.04±0.01	518
Cbz-Phe-His-Leu	131±16	0.21±0.06	625	128±22	0.20±0.04	640
Hip-His-Leu	36±1	1.18±0.50	30	63±4	1.20±0.35	52
FA-Phe-Gly-Gly	220±18	0.24±0.07	980	173±8	0.24±0.04	730
FA-Phe-Phe-Arg	47±6	0.03±0.01	1657	46±2	0.02±0.01	1943

Условия измерений: 50 мМ фосфатный буфер, pH 7,5, содержащий 150 мМ NaCl и 1 мкМ ZnCl_2 , 25° С. Ошибка измерений представлена как стандартное отклонение от среднего значения.

Значения K_M для гидролиза любого из исследованных субстратов под действием АПФ из сердца и легких оказались похожими, как и значения $k_{\text{кат}}$ для большинства субстратов. Однако для самого короткого субстрата Hip-His-Leu значение $k_{\text{кат}}$ гидролиза было в два раза ниже для АПФ из сердца по сравнению с АПФ легких (Таблица 1).

8. Различия топографии поверхности АПФ из сердца и легких

Показано, что эффективность связывания ряда мАт с АПФ из тканей сердца значительно и статистически достоверно отличается от эффективности связывания тех же мАт с АПФ из тканей легких (Рис. 10 А). Различия в эффективности связывания этих мАт мы можем, прежде всего, отнести к различиям в гликозилировании следующих потенциальных сайтов N-гликозилирования: Asn25 в области эпитопов связывания для мАт BB9, 3A5 и i1A8, Asn117 в эпитопе для мАт 5F1 на N-домене, а также Asn666 в эпитопе для мАт 4E3 и 1E10 и Asn731, который находится внутри эпитопов мАт 1B8 и 3F10 и близко к эпитопу мАт 1B3 на

С-домене АПФ. Видно, что изменения затрагивают совершенно различные участки на обоих доменах АПФ, что повышает вероятность получения тканеспецифичных мАт к АПФ.

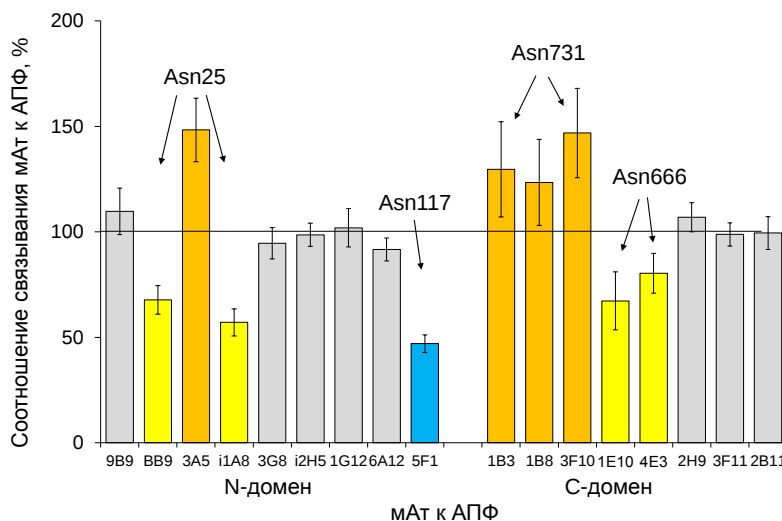


Рис. 10. Конформационные различия АПФ из сердца и легких, выявление с использованием панели из 17 мАт. Соотношение активности иммунопреципитированного очищенного АПФ из сердца к АПФ из легких, выраженное в %. Соотношения увеличенные более чем на 20% выделены оранжевым цветом, пониженные более 20% выделены желтым цветом и более чем на 50% - синим. Данные представляют собой среднее значение $\pm$ SD из 10-16 экспериментов (каждый в повторях), $p < 0,01$.

9. Анализ возможных гликановых структур на поверхности АПФ из сердца и легких

Мы продемонстрировали возможные различия в гликозилировании АПФ из сердца и легких с помощью МАЛДИ-масс-спектрометрии как вероятную молекулярную базу для наблюдаемых с помощью панели мАт различий топографии поверхности АПФ (Рис. 10). Обнаруженные с использованием программы FindPept негликозилированные фрагменты аминокислотной последовательности растворимой формы АПФ (1203 а.о.) составили 58% для фермента из сердца и 69% для фермента из легких. Гидролизат АПФ из сердца содержал негликозилированные пептиды, включающие Asn82, 131, 494 и 1196. В гидролизате АПФ из легких были найдены пептиды, содержащие потенциальные сайты гликозилирования: Asn131, 494, 666, 731 и 1196.

При соответствии определяемой массы пика одновременно негликозилированному и гликозилированному пептидам, мы относили эту массу только к негликозилированному пептиду, исключая возможность существования частично гликозилированных сайтов гликозилирования в составе АПФ. Единственным исключением стал пептид 661–677, содержащий потенциальный сайт N-гликозилирования Asn666, в гидролизате АПФ из легких, поскольку интенсивность пика масс-спектра, соответствующего этому негликозилированному пептиду, была чрезвычайно мала.

Анализ масс-спектров с использованием программы GlycoMod позволил выделить пики, соответствующие возможным гликозилированным пептидам. В результате, в молекулах АПФ из сердца гликозилированы Asn117, 480, 666, 685 (Табл. 2), в молекулах АПФ из легких гликозилированы остатки аспарагина 117, 648, 666, 685, а также, возможно, Asn480 (Табл. 3). Ранее было обнаружено, что в АПФ в составе плазмы гликозилированы остатки аспарагина Asn480, 666 и 685 (Liu *et al.*, 2005). Эти данные хорошо соотносятся с полученными нами данными для АПФ из легких (Табл. 3), которые являются основным поставщиком АПФ в кровь.

Таблица 2. Вероятные N-гликозилированные пептиды и гликановые структуры в АПФ из сердца человека.

Сайты N-гликози- лирования	Пептиды	Найденные <i>m/z</i>	Теорети- ческие <i>m/z</i>	Потенциальные структуры гликанов
Asn117	Arg108-Arg120	3349.4	3349.4	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn480	Tyr470-Lys489	4182.8	4182.8	(HexNAc) ₅ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn666	Asn661-Lys670	2921.2	2921.2	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
	Asn661-Arg676	4181.8	4182.8	(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Fuc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn685	Phe678-Lys689	4281.7	4281.7	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		3131.3	3131.3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ и/или (Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (Fuc) ₁ (NeuGc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
	Lys677-Lys689	2678.2	2678.2	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		2765.3	2765.3	(Hex) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂

К сожалению, в гидролизатах АПФ не были выявлены гликопептиды, содержащие сайт гликозилирования Asn25, входящий в состав эпитопов связывания мАт BB9, 3A5 и i1A8, для которых были продемонстрированы значительные различия в связывании с АПФ из тканей сердца и легких (Рис. 10). Однако были выявлены пептиды, содержащие потенциальный сайт гликозилирования Asn666, находящийся в области эпитопов связывания мАт, эффективность связывания которых с АПФ из сердца и легких значительно различалась (Рис. 10). Возможные различия гликозилирования сайта Asn666 в составе АПФ из сердца и легких представлены в таблицах 2 и 3 и проиллюстрированы на рисунке 11. Следует отметить, что в АПФ из сердца предполагается присутствие в сайте Asn666 гликанов комплексного типа (Табл. 2 и Рис. 11), причем одна из возможных структур гликана в АПФ сердца содержит фукозу, а другая сialiрирована, тогда как в АПФ из легких обнаружена высокоманнозная структура гликана (Hex)₄+(Man)₃(GlcNAc)₂ в составе гликопептида Ile656-Lys670 (Табл. 3, Рис. 11). Таким

образом, именно структура гликана в сайте N-гликозилирования Asn666 может определять эффективность связывания мАт 1Е10 и 4Е3, в эпитопы которых входит этот сайт (Рис. 10).

В составе гидролизата АПФ из легких, но не сердца, был обнаружен негликозилированный пептид, содержащий Asn731, находящийся в эпитопе связывания мАт 1В8 и 3F10, хотя интенсивность соответствующего пика 5579 была очень мала. Наблюдаемые различия в эффективности связывания мАт 1В8 и 3F10, в эпитоп связывания которых входит Asn731, а также мАт 1В3, эпитоп которого располагается очень близко, вероятно, обусловлены наличием или отсутствием гликана в этом сайте.

Таблица 3. Вероятные N-гликозилированные пептиды и гликановые структуры в АПФ из легких человека.

Сайты N-гликози- лирования	Пептиды	Найденные <i>m/z</i>	Теорети- ческие <i>m/z</i>	Потенциальные структуры гликанов
Asn117	Arg108-Arg120	3349.4	3349.4	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ и/или (Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (Fuc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
	Gln109-Arg120	5469,1	5469,1	(Hex) ₅ (HexNAc) ₅ (Fuc) ₁ (NeuAc) ₄ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn648	Thr630-Lys655	5885.4	5885.4	(Hex) ₅ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ и/или (Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (Fuc) ₁ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn666	Ile656-Lys670	3305.5	3305.5	(Hex) ₄ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn685	Lys677-Lys689	2765.3	2765.3	(Hex) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ и/или
	Phe678-Lys689			(Hex) ₁ (HexNAc) ₅ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
	и/или Phe678-Arg690	3490.5	3490.5	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn117 и/или	Gln109-Lys126			(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		4237,8	4237,8	
Asn685	Phe678-Arg690			(Hex) ₅ (HexNAc) ₄ (Fuc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn480 и/или	Asn480-Lys489		2468.0	(Hex) ₃ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
		2468.1		
Asn666	Asn661-Lys670		2468.1	(HexNAc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn82	Glu74-Arg89			(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ и/или (Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn117 и/или	Gln109-Arg120	4182,8	4182,8	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂ и/или (Hex) ₂ (HexNAc) ₃ (Fuc) ₂ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
Asn666	Asn661-Arg676			(Hex) ₃ (HexNAc) ₄ (Fuc) ₁ +(Man) ₃ (GlcNAc) ₂

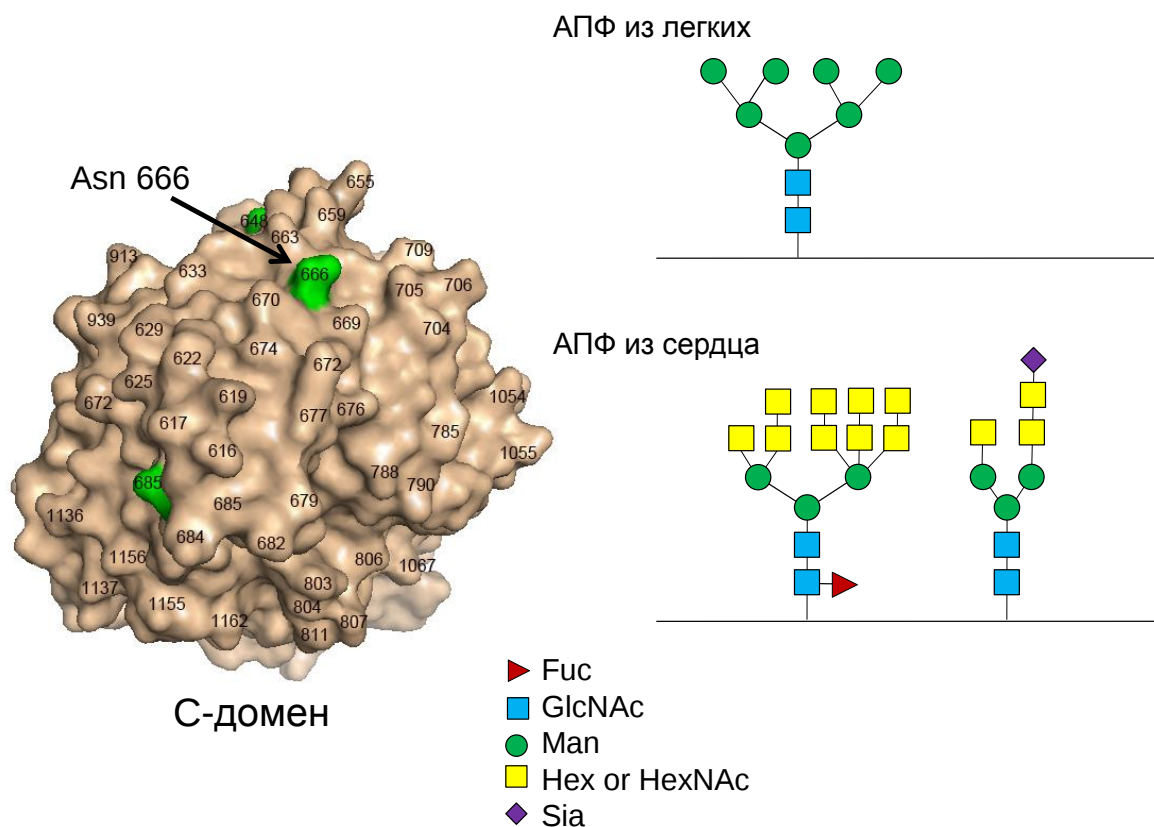


Рис. 11. Возможные структуры гликанов в потенциальном сайте N-гликозилирования Asn666 в составе АПФ человека из тканей сердца и легких. Анализ масс-спектральных данных трипсиновых гидролизатов АПФ из сердца и легких человека проведен с помощью программы GlycoMod, при этом пики с массами, соответствующими массам негликозилированных пептидов, в рассмотрение не входили.

Таким образом, полученные различия в характере гликозилирования молекул АПФ, продуцируемых в различных тканях могут определять различия в локальной топографии поверхности АПФ и могут служить молекулярной базой наблюдаемых различий в эффективности связывания моноклональных антител с ферментом и кинетических различий (Табл. 1 и Рис. 10).

Также мы показали, что наблюдаемые конформационные различия АПФ из сердца и легких (Рис. 10) сохраняются и при сравнении АПФ в составе гомогенатов соответствующих тканей, что позволило нам сделать вывод, что АПФ сердца, продуцируемый эндотелиальными клетками и, возможно, миофибробластами (Falkenhahn *et al.*, 1995) и АПФ легких, продуцируемый эндотелиальными клетками легких (Metzger *et al.*, 2011), имеют различную локальную топографию поверхности, вероятно, в силу тканевой и клеточной посттрансляционной модификации. Более того, даже после циркуляции в кровотоке крысы профили связывания панели мАт с АПФ из сердца и легких хоть и значительно изменялись, но сильно отличались друг от друга, подтверждая возможность различать АПФ, продуцируемый различными тканями в реальной крови.

Показано, что анализ топографии поверхности АПФ способен обеспечить структурную основу для получения мАт, способных отличать АПФ, продуцируемый определенным типом клеток или определенным органом, в частности, сердцем. Такие различия составляют основу для будущего анализа крови с целью обнаружения тканеспецифичного АПФ в крови для прогнозирования риска фибрилляции предсердий.

11. Эффектор АПФ в гомогенате сердца

Как было показано выше, гомогенаты тканей содержат большое количество ингибиторов и/или эффекторов АПФ (Рис. 1, 2 и 6). Процедура очистки фермента из сердца последовательно с помощью анионообменной и аффинной хроматографии значительно изменяла профиль связывания панели мАт с АПФ (Рис.12 А).

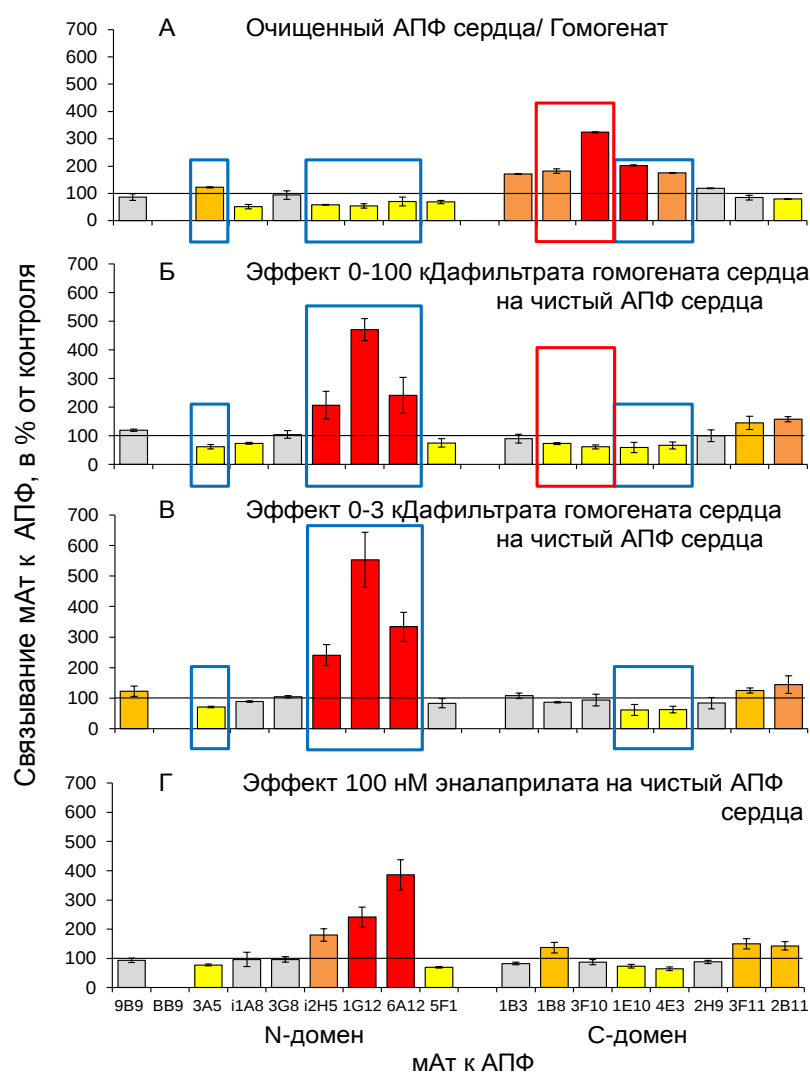


Рис. 12. Влияние компонентов гомогената сердца человека на эффективность связывания панели 16 мАт с очищенным АПФ сердца. А-эффект очистки АПФ сердца из гомогената, Б и В-влияние компонентов гомогената на очищенный фермент, Г-эффект эналаприлата.

Понижение эффективности связывания мАт 1G12, 6A12 и i2H5 с перекрывающимися эпитопами на N-домене АПФ при очистке фермента может объясняться диссоциацией комплекса АПФ с низкомолекулярными эндогенными ингибиторами. Наблюдаемое при очистке АПФ сердца резкое возрастание эффективности связывания мАт 1B8 и 3F10 с АПФ (Рис. 12 А) не наблюдалось при диализе гомогенатов в кассетах с размером пор 10 кДа. Это

позволило сделать предположение, что в гомогенатах тканей сердца содержатся также высокомолекулярные эффекторы АПФ, влияющие на связывание этих МАТ.

Анионная хроматография гомогената сердца вызывала значительное увеличение эффективности связывания МАТ 1В8 и 3F10 к С-домену АПФ, что позволило предположить, что эффектор, удаляющийся при очистке АПФ сердца, не связывается на анионообменном носителе и выходит в «проскоке». Поэтому мы исследовали влияние термоинактивированных фракций менее 3 кДа и менее 100 кДа «проскока» на эффективность связывания панели МАТ с очищенным АПФ из сердца человека (Рис. 12 Б и В).

Внесение к АПФ из сердца фильтрата, содержащего только низкомолекулярные соединения, значительно изменяло эффективность связывания МАТ к N-домену АПФ (Рис. 12 В), причем наблюдаемый эффект был схож с эффектом изменения профиля связывания панели МАТ с АПФ сердца, инкубированного со специфическим ингибитором АПФ эналаприлатом (Рис. 12 Г). Эффекты, связанные с присутствием низкомолекулярных компонентов, на рисунке 12 отмечены синими рамками. Фильтрат гомогената тканей сердца, содержащий, помимо низкомолекулярных, также высокомолекулярные компоненты, вызывал значительное понижение эффективности связывания 1В8 и 3F10 с очищенным АПФ (Рис. 12 Б), что может быть объяснено действием высокомолекулярного эффектора в составе фильтрата (обозначено на рисунке 12 красными рамками). Предполагаемая область на поверхности АПФ, экранируемая высокомолекулярным эффектором из гомогената сердца, обозначена красным эллипсом на рисунке 13.

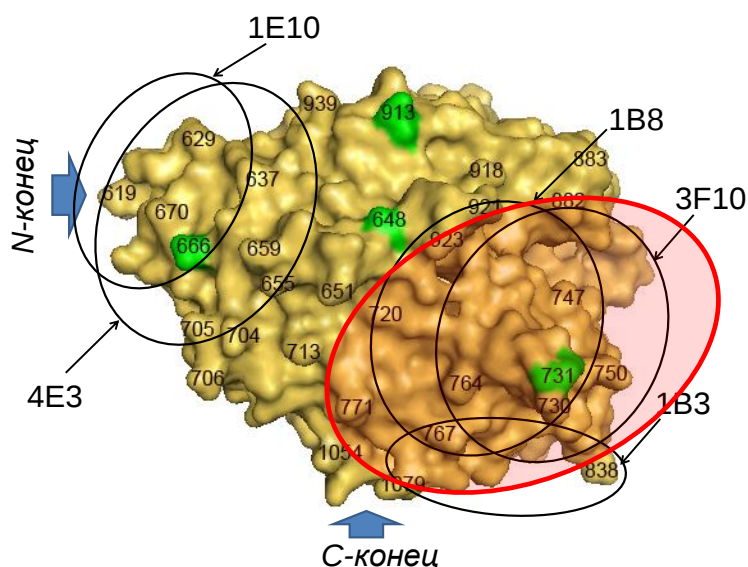


Рис. 13. Область на поверхности С-домена АПФ, где происходит связывание предполагаемого высокомолекулярного эффектора из сердца человека. Потенциальные сайты гликозилирования отмечены зеленым цветом, эпитопы связывания МАТ отмечены черными эллипсами. Предполагаемая область связывания высокомолекулярного эффектора отмечена красным эллипсом.

Таким образом, в тканях сердца человека присутствует высокомолекулярный эффектор с массой от 3 до 100 кДа, влияющий на связывание МАТ с С-доменом АПФ. Этот эффектор не является высокомолекулярным ингибитором АПФ, присутствие которого мы обнаружили в селезенке, поскольку он не подавляет активность АПФ, а ингибитор в селезенке, напротив ингибирует активность фермента, но не влияет на связывание с ним МАТ, то есть область

контакта ингибитора из селезенки с АПФ находится в области, далекой от эпитопов связывания использованных мАт. Ранее в крови человека был обнаружен высокомолекулярный эффектор, лизоцим (Danilov *et al.*, 2016), который в комплексе с низкомолекулярным билирубином связывался с АПФ, значительно изменял эффективность связывания панели мАт с АПФ и стабилизировал конформацию АПФ на поверхности клеточной мембраны. Однако влияние эффектора из тканей сердца на связывание мАт с АПФ было абсолютно отличным от совместного влияния лизоцима и билирубина. Это позволяет нам заключить, что мы обнаружили присутствие новых эффекторов в тканях селезенки и сердца человека.

ВЫВОДЫ

1. Определено содержание АПФ в различных тканях человека: уровень АПФ в тканях сердца в 13 раз, а в селезенке в 10 раз ниже, чем в легких. У пациентов с болезнью Гоше содержание АПФ в крови в среднем в 6,5 раз выше нормы, а в тканях селезенки в среднем в 12 раз выше нормы.
2. В крови пациентов с болезнью Гоше также повышено содержание эндогенных ингибиторов АПФ с массой менее 10 кДа. В тканях здоровой селезенки обнаружен высокоаффинный ингибитор АПФ с молекулярной массой от 10 до 30 кДа, который не продуцируется при болезни Гоше.
3. Эффективность связывания нескольких мАт с АПФ из плазмы крови пациентов с болезнью Гоше изменяется по сравнению с нормой: мАт 3G8 и 6A12 к N-домену и мАт 3F11 к C-домену. Эффективность связывания мАт с АПФ из селезенки Гоше (отражающая топографию поверхности АПФ) также меняется по сравнению с АПФ из нормальной селезенки, что может быть использовано в качестве нового биохимического маркера болезни Гоше.
4. Каталитическая константа гидролиза субстрата Hip-His-Leu под действием очищенного АПФ из сердца в 2 раза ниже, чем под действием АПФ из легких. Оптимум pH для этого субстрата 7,5 для АПФ из сердца и 7,8-7,9 для АПФ легких.
5. Связывание мАт с АПФ из сердца и АПФ из легких отличалось для 9 из исследованных 17 мАт, что может быть связано с отличиями в N-гликозилировании молекулы фермента: Asn25 в эпитопе мАт BV9, 3A5 и i1A8 и Asn117 в эпитопе мАт 5F1 на N-домене, а также Asn666 в эпитопе мАт 4E3 и 1E10 и Asn731 – в эпитопе мАт 1B8 и 3F10 на C-домене АПФ. В тканях сердца обнаружен эффектор с молекулярной массой от 3 кДа до 100 кДа, снижающий эффективность связывания мАт 1B8 и 3F10 на C-домене АПФ.
6. В АПФ из сердца найдены 4 сайта N-гликозилирования Asn117, 480, 666, 685. В АПФ из легких гликозилированы Asn117, 648, 666, 685, а также, возможно, Asn480. Продемонстрированы отличия в структурах гликанов в АПФ из тканей сердца и легких, то есть доказана тканевая специфичность АПФ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Danilov S.M., **Tikhomirova V.E.**, Metzger R., Naperova I.A., Bukina T.M., Goker-Alpan O., Tayebi N., Gayfullin N.M., Schwartz D.E., Samokhodskaya L.M., Kost O.A., Sidransky E. ACE phenotyping in Gaucher disease. (2018) *Molecular Genetics and Metabolism*, 123 (4), 501-510. DOI:10.1016/j.ymgme.2018.02.007
2. Кост О.А., **Тихомирова В.Е.**, Крюкова О.В., Гусаков А.В., Булаева Н.И., Евдокимов В.В., Голухова Е.З., Данилов С.М. Конформационный "портрет" ангиотензин-превращающего фермента. (2018) *Биоорганическая химия*, 44, 48-60. DOI: 10.7868/S0132342318010050
3. **Tikhomirova V.E.**, Kost O.A., Kryukova O.V., Golukhova E.Z., Bulaeva N.I., Zholbaeva A.Z., Bokeria L.A., Garcia J.G.N., Danilov S.M. ACE phenotyping in human heart. (2017) *PLoS ONE*, 12, e0181976. DOI: 10.1371/journal.pone.0181976
4. Kryukova O.V., **Tikhomirova V.E.**, Golukhova E.Z., Evdokimov V.V., Kalantarov G.F., Trakht I.N., Schwartz D.E., Dull R.O., Gusakov A.V., Uporov I.V., Kost O.A., Danilov S.M. Tissue specificity of human angiotensin I-converting enzyme. (2015) *PLoS ONE*, 10, e0143455. DOI: 10.1371/journal.pone.0143455
5. Кост О.А., Петров М.Н., Наперова И.А., **Тихомирова В.Е.**, Крюкова О.В., Гачок И.В., Булаева Н.И., Голухова Е.З., Данилов С.М. Конформационный "фингерпринтинг" ангиотензин-превращающего фермента в крови в норме и при развитии патологии. (2015) *Вестник Московского университета, Серия 2: Химия*, 56, 399-404.
6. Кост О.А., **Тихомирова В.Е.**, Крюкова О.В., Голухова Е.З., Данилов С.М., Конформационный "портрет" ангиотензин-превращающего фермента в крови в норме и при заболеваниях. (2017) *СПЕЦВЫПУСК. Международная научная конференция по биоорганической химии "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" и VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Перо Москва, ИБХ РАН*, 122.
7. **Тихомирова В.Е.**, Крюкова О.В., Жолбаева А.З., Булаева Н.И., Голухова Е.З., Данилов С.М., Кост О.А. Фенотипирование ангиотензин-превращающего фермента из сердца человека. (2016) *Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда Биохимиков России, Конференции ADFLIM, ACTA NATURAE, СПЕЦВЫПУСК*, том 2, 188
8. **Tikhomirova V.E.**, Kryukova O.V., Serov R.A., Bulaeva N.I., Bokeria L.A., Golukhova E.Z., Kost O.A., Danilov S.M. Phenotyping of angiotensin-converting enzyme in the human heart. (2015), *Materials of American College of Cardiology 64th Annual Scientific Session, San-Diego, Journal of the American College of Cardiology, Elsevier BV*, 65, № Suppl.A, A404-A404
9. **Тихомирова В.Е.**, Крюкова О.В., Булаева Н.И., Голухова Е.З., Данилов С.М., Кост О.А. Иммунологические особенности ангиотензин-превращающего фермента – база для создания потенциального маркера фибрилляции предсердий. (2015) *Материалы VII Российского симпозиума "Белки и пептиды", Новосибирск*, 359-359
10. **Тихомирова В.Е.** Перспективы использования ангиотензин-превращающего фермента как маркера фибрилляции предсердий. (2015) *Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015»*, секция 32, подсекция 11, 44
11. Kost O.A., **Tikhomirova V.E.**, Kryukova O.V., Golukhova E.Z., Serov R.A., Danilov S.M., Bulaeva N.I., Bokeria L.A. Phenotyping of heart angiotensin-converting enzyme – a base for the development of a potential marker of atrial fibrillation. (2015) *Abstracts of International Conference "Biocatalysis-2015. Fundamentals and Applications". Moscow*, 139-140.
12. Danilov S.M., **Tikhomirova V.E.**, Kryukova O.V., Serov R.A., Bulaeva N.I., Bokeria L.A., Kost O.A., Golukhova E.Z. Is ACE a new marker for atrial fibrillation? (2014) *Materials of the International Conference "Science of the future", Saint-Petersburg, электронное издание ООО "Инконсалт К" Москва* http://sf-conf.com/assets/files/theses2014/_site/reports/Sergei_M_Danilov.html