МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСА N-ДОМЕНА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА С ПЕПТИДОМ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Жаркова М.С., Веселовский А.В.

ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, г.Москва

Недавно было показано, что ангиотензин-превращающий фермент (АПФ) способен расщеплять пептид Альцгеймера в нескольких положениях, причем основную роль принадлежит N-домену этого фермента. В работе построена модель N-домена АПФ по гомологии с его С-доменом. Формирование структуры активного центра фермента близкого к кристаллической структуре этого домена происходило только в результате длительной молекулярной динамики при повышенной температуре. Была построена модель комплекса N-домена АПФ с шестнадцатичленным доменом пептида Альцгеймера. Полученная модель комплекса позволяет объяснить различия в местах расщепления полноразмерного и шестнадцатичленного амилоидного пептида.

Болезнь Альцгеймера представляет собой несколько генетически гетерогенных форм первичных нейродегенеративных деменций [1]. На данный момент в мире болезнью Альцгеймера страдает по разным источникам около 20 млн. человек.

Основным патогенетическим признаком болезни Альцгеймера считается наличие экстрацеллюлярных альцгеймеровских (амилоидных, сенильных) бляшек в мозгу пациентов (рис. 1). Было показано, что амилоидные бляшки представляют собой отложение β-амилоида (Aβ, пептид Альцгеймера, β-амилоидный пептид), пептида длиной 37-43 аминокислотных остатка.

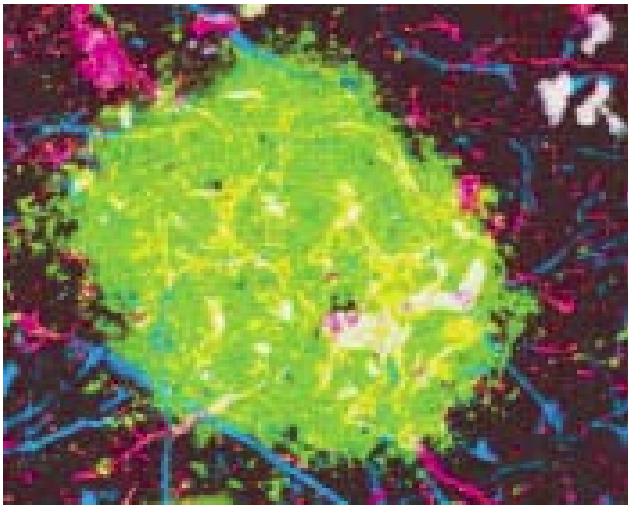

Рис.1. Флуоресцентная микроскопия препарата мозга при болезни Альцгеймера. Зеленый - β-амилоидный пептид [www.users.drew.edu].

Переход Aβ из растворимой в агрегированную форму считается обязательным условием проявления им нейродегенеративных свойств. Предполагается, что в основе процесса фибриллизации Aβ лежит его способность образовывать β-складчатые олигомерные структуры [2, 3].

В норме секреция Aβ не приводит к каким бы то ни было патологическим процессам, поскольку в здоровой ткани мозга существует баланс между продукцией пептида и его деградацией клетками-мусорщиками [2]. Показано, что помимо клеток-мусорщиков в катаболизме Aβ существенную роль играют цинковые металлопротеиназы: ангиотензин-превращающий фермент; неприлизин (нейтральная эндопептидаза); инсулизин (инсулин-деградирующий фермент); эндотелин-превращающий фермент; матриксная металлопротеиназа [4, 5]. Показано, что N-домен АПФ может расщеплять Aβ между пятым и шестым [6] или между седьмым и восьмым аминокислотными остатками [7, 8], причем для шестнадцатичленного домена пептида Альцгеймера расщепление между пятым и шестым

аминокислотными остатками является основным [С.А. Козин и др, статья готовится к печати].

АПФ (пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1) – это цинковая металлопротеиназа, состоящая из двух высокогомологичных N- и С-доменов. АПФ является ключевым ферментом ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, поэтому ингибиторы АПФ, тормозящие активность обоих доменов, нашли широкое применение в клинике в качестве гипотензивных средств [9]. Однако недавно было предположено, что их применение может спровоцировать образование сенильных бляшек в мозгу, что в итоге может привести к развитию деменции альцгеймеровского типа [10].

Поэтому для предсказания особенностей взаимодействия N-домена АПФ человека с Aβ было проведено компьютерное моделирование пространственной структуры комплекса N-домена с шестнадцатичленным доменом пептида Альцгеймера Aβ(1-16)

Вычисления проводили на графической рабочей станции Silicon Graphics Origin350 (8xR16000-700) с использованием средств молекулярно-графического пакета Sybyl 6.9.1 фирмы Tripos [11].

К началу исследования была известна пространственная структура только С-домена АПФ (код PDB 1O86). Поскольку идентичность между доменами составляет 60 % (рис. 2), С-домен был использован для моделирования структуры N-домена по методу гомологии с использованием программы Composer, входящей в пакет Sybyl. Оптимизация модели методами минимизации энергии и моделирования молекулярной динамики при температуре 300 К, в течение 200 пс не привела к значительным изменениям в ее структуре. Как и в С-домене, в построенной модели активный центр представлял собой полость.

Однако в таком активном центре могут отщепляться только С-концевые дипептиды, что согласуется со специфичностью С-домена, но не может объяснить способность N-домена расщеплять относительно длинные пептиды с их N-конца, в частности и пептид Альцгеймера. Поэтому было предположено, что построенная модель не полностью отражает особенность структуры активного центра N-домена АПФ. Одним из возможных объяснений этого может быть наличие второго входа в активный центр фермента, в результате чего активный центр будет представлять собой канал, проходящий через всю белковую глобулу.

Для проверки данного предположения было проведено моделирование более длительной молекулярной динамики при повышенной температуре. Моделирование молекулярной динамики было проведено в водном окружении в периодических граничных условиях, при постоянном давлении (1 атм), постоянной температуре 1000 К, в течение 200 пс. В этих условиях структура белка осталась стабильной.

```
sACE  N-domain  1     ........LD  PGLQPGNFSA  DEAGAQLFAQ  SYNSSAEQVL  FQSVAASWAH
sACE  C-domain  602          PLPD  NYPEGIDLVT  DEAEASKFVE  EYDRTSQVVW  NEYAEANWNY
tACE            20    TTTHQATAHQ  TSAQSPNLVT  DEAEASKFVE  EYDRTSQVVW  NEYAEANWNY

sACE  N-domain  43    DTNITAENAR  RQEEAALLSQ  EFAEAWGQKA  KELYEPIWQN  FTDPQLRRII
sACE  C-domain  646   NTNITTETSK  ILLQKNMQIA  NHTLKYGTQA  RKFDVNQLQN  TT...IKRII
tACE            70    NTNITTETSK  ILLQKNMQIA  NHTLKYGTQA  RKFDVNQLQN  TT...IKRII

sACE  N-domain  93    GAVRTLGSAN  LPLAKRQQYN  ALLSNMSRIY  STAKVCLPNK  TATCWSLDPD
sACE  C-domain  693   KKVQDLERAA  LPAQELEEYN  KILLDMETTY  SVATVCHPNG  ..SCLQLEPD
tACE            117   KKVQDLERAA  LPAQELEEYN  KILLDMETTY  SVATVCHPNG  ..SCLQLEPD

sACE  N-domain  143   LTNILASSRS  YAMLLFAWEG  WHNAAGIPLK  PLYEDFTALS  NEAYKQDGFT
sACE  C-domain  741   LTNVMATSRK  YEDLLWAWEG  WRDKAGRAIL  QFYPKYVELI  NQAARLNGYV
tACE            165   LTNVMATSRK  YEDLLWAWEG  WRDKAGRAIL  QFYPKYVELI  NQAARLNGYV

sACE  N-domain  193   DTGAYWRSWY  NSPTFEDDLE  HLYQQLEPLY  LNLHAFVRRA  LHRRYGDRYI
sACE  C-domain  791   DAGDSWRSMY  ETPSLEQDLE  RLFQELQPLY  LNLHAYVRRA  LHRHYGAQHI
tACE            215   DAGDSWRSMY  ETPSLEQDLE  RLFQELQPLY  LNLHAYVRRA  LHRHYGAQHI

sACE  N-domain  243   NLRGPIPAHL  LGDMWAQSWE  NIYDMVVPFP  DKPNLDVTST  MLQQGWNATH
sACE  C-domain  841   NLEGPIPAHL  LGNMWAQTWS  NIYDLVVPFP  SAPSMDTTEA  MLKQGWTPRR
tACE            265   NLEGPIPAHL  LGNMWAQTWS  NIYDLVVPFP  SAPSMDTTEA  MLKQGWTPRR

sACE  N-domain  293   MFRVAEEFFT  SLELSPMPPE  FWEGSMLEKP  ADGREVVCHA  SAWDFYNRKD
sACE  C-domain  891   MFKEADDFFT  SLGLLPVPPE  FWNKSMLEKP  TDGREVVCHA  SAWDFYNGKD
tACE            315   MFKEADDFFT  SLGLLPVPPE  FWNKSMLEKP  TDGREVVCHA  SAWDFYNGKD

sACE  N-domain  343   FRIKQCTRVT  MDQLSTVHHE  MGHIQYYLQY  KDLPVSLRRG  ANPGFHEAIG
sACE  C-domain  941   FRIKQCTTVN  LEDLVVAHHE  MGHIQYFMQY  KDLPVALREG  ANPGFHEAIG
tACE            365   FRIKQCTTVN  LEDLVVAHHE  MGHIQYFMQY  KDLPVALREG  ANPGFHEAIG

sACE  N-domain  393   DVLALSVSTP  EHLHKIGLLD  RVTNDTESDI  NYLLKMALEK  IAFLPFGYLV
sACE  C-domain  991   DVLALSVSTP  KHLHSLNLLS  SEGGSDEHDI  NFLMKMALDK  IAFIPFSYLV
tACE            415   DVLALSVSTP  KHLHSLNLLS  SEGGSDEHDI  NFLMKMALDK  IAFIPFSYLV

sACE  N-domain  443   DQWRWGVFSG  RTPPSRYNFD  WWYLRTKYQG  ICPPVTRNET  HFDAGAKFHV
sACE  C-domain  1041  DQWRWRVFDG  SITKENYNQE  WWSLRLKYQG  LCPPVPRTQG  DFDPGAKFHI
tACE            465   DQWRWRVFDG  SITKENYNQE  WWSLRLKYQG  LCPPVPRTQG  DFDPGAKFHI

sACE  N-domain  493   PNVTPYIRYF  VSFVLQFQFH  EALCKEAGYE  GPLHQCDIYR  STKAGAKLRK
sACE  C-domain  1091  PSSVPYIRYF  VSFIIQFQFH  EALCQAAGHT  GPLHKCDIYQ  SKEAGQRLAT
tACE            515   PSSVPYIRYF  VSFIIQFQFH  EALCQAAGHT  GPLHKCDIYQ  SKEAGQRLAT

sACE  N-domain  543   VLQAGSSRPW  QEVLKDMVGL  DALDAQPLLK  YFQPVTQWLQ  EQNQQNGEVL
sACE  C-domain  1141  AMKLGFSRPW  PEAMQLITGQ  PNMSASAMLS  YFKPLLDWLR  TENELHGEKL
tACE            565   AMKLGFSRPW  PEAMQLITGQ  PNMSASAMLS  YFKPLLDWLR  TENELHGEKL

sACE  N-domain  593   GWPEYQWHP.  ..........  ..........  ..........  ..........
sACE  C-domain  1191  GWPQYNWTPN  SARSEGPLPD  SGRVSFLGLD  LDAQQARVGQ  WLLLFLGIAL
tACE            615   GWPQYNWTPN  SARSEGPLPD  SGRVSFLGLD  LDAQQARVGQ  WLLLFLGIAL

sACE  N-domain        ..........  ..........  ..........  .......
sACE  C-domain  1241  LVATLGLSQR  LFSIRHRSLH  RHSHGPQFGS  EVELRHS
tACE            665   LVATLGLSQR  LFSIRHRSLH  RHSHGPQFGS  EVELRHS
```

Рис.2. Выравнивание аминокислотных последовательностей N-домена АПФ, С-домена АПФ и тестикулярного АПФ человека. Фиолетовый цвет - аминокислотные остатки, образующие координационные связи с атомом цинка. Желтый цвет – сайты гликозилирования, оранжевый цвет – аминокислоты, взаимодействующие с ионом хлора.

Анализ поведения модели в процессе такой динамики показал, что в структуре N-домена действительно формируется второй вход в активный центр фермента, который в результате представляет собой канал. На рисунке 3 представлена динамика формирования второго

входа в активный центр фермента. Для наглядности в активный центр помещен ингибитор АПФ лизиноприл, выделенный красным цветом.

В то же время при моделировании молекулярной динамики С-домена при тех же условиях формирования второго входа в активный центр не происходило (рис. 4). Это указывает на то, что формирование второго входа в активный центр N-домена является его структурной особенностью.

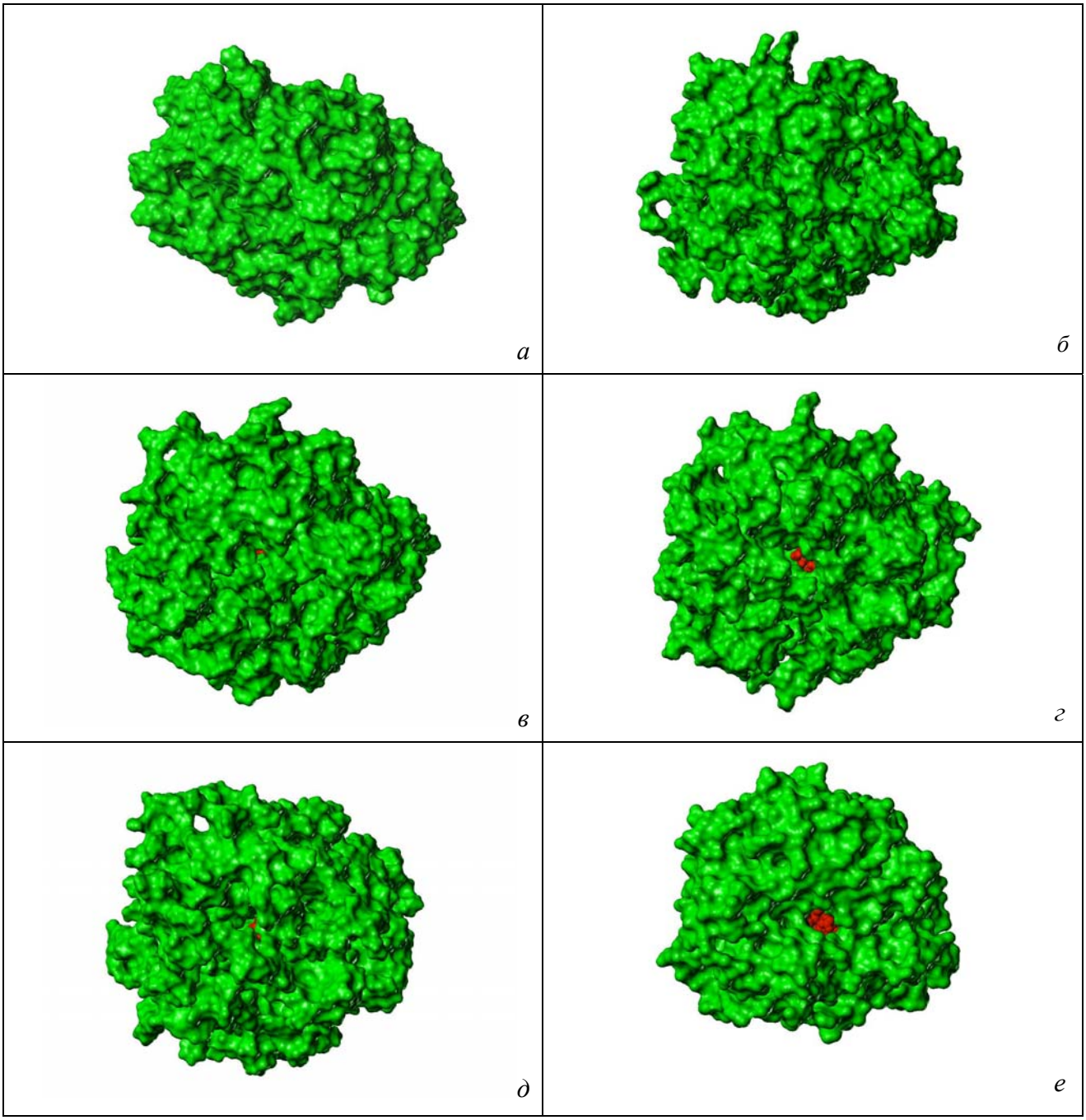

Рис.3. Динамика формирования канала активного центра в модели N-домена АПФ человека. Красным цветом показано расположение ингибитора лизиноприла в активном центре фермента. а – 0 пс, б – 100 пс, в – 154 пс, г – 170 пс, д – 200 пс, е – кристаллическая структура N-домена АПФ.

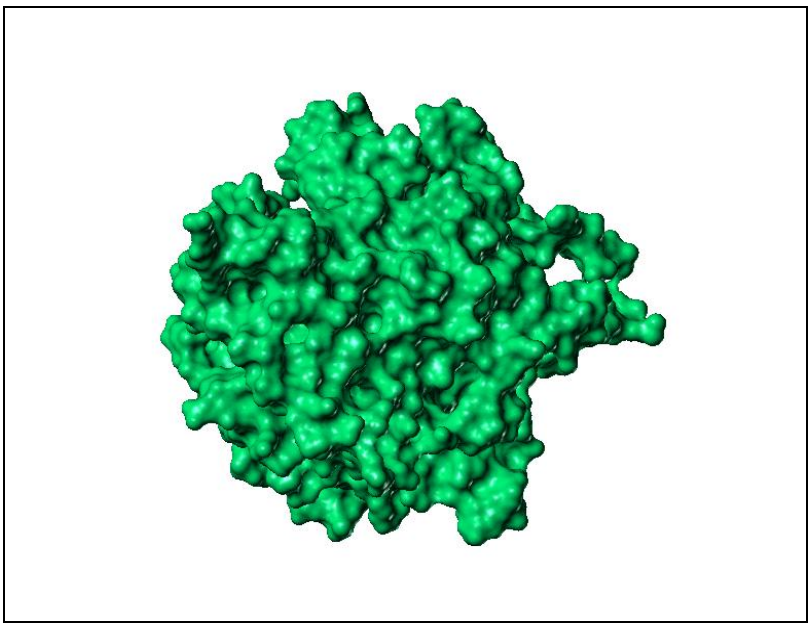

Рис.4. Молекулярная поверхность С-домена АПФ человека после молекулярной динамики.

Когда данная часть работы была уже завершена, в банке трехмерных структур PDB появилась структура N-домена АПФ человека, определенная методом РСА [12]. Ее анализ показал, что активный центр представляет собой канал (рис. 5). Сопоставление пространственной структуры кристаллического N-домена и построенной нами модели представлены на рисунке 6. RMSD по Cα-атомам построенной модели и кристаллической структуры N-домена АПФ составило 5,3 Å.

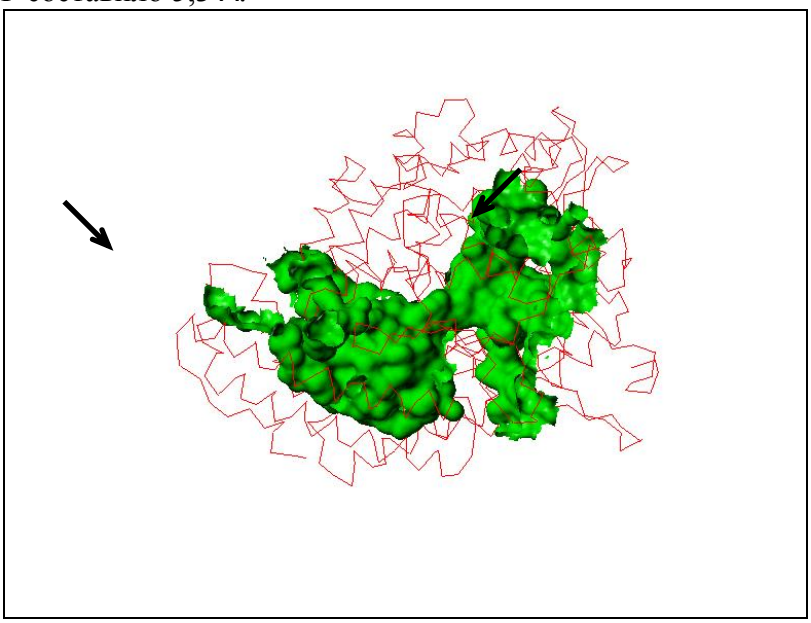

Рис.5. Молекулярная поверхность канала активного центра кристаллической структуры N-домена АПФ человека. Стрелками показаны входы в активный центр фермента.

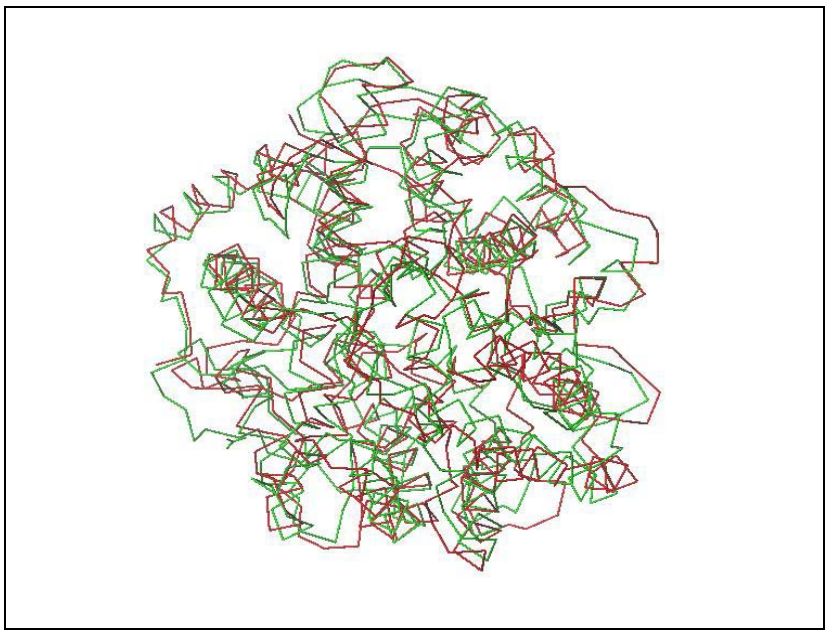

Рис.6. Пространственное совмещение модели N-домена (красный) и кристаллической структуры N-домена АПФ человека (зеленый).

Таким образом, наша модель, полученная после длительной динамики, лучше отражает структурные особенности N-домена АПФ, чем модель, полученная нами после стандартной процедуры оптимизации.

По-видимому, в ряде случаев для оптимизации модели, даже построенной на основании структуры с высокой гомологией, и для предсказания особенностей структуры активного центра ферментов, необходимо проведение длительной молекулярной динамики объекта при повышенной температуре. Это позволяет выявлять «скрытые» особенности моделируемого белка и получать более реалистичную модель его структуры.

Поскольку в процессе работы появилась пространственная структура N-домена, то моделирование его комплекса с Aβ(1-16) проводили с кристаллической структурой. Из экспериментальных данных известно, что основное место расщепления шестнадцатичленного амилоидного пептида N-доменом АПФ является связь между пятым и шестым аминокислотными остатками [С.А. Козин и др, статья готовится к печати].

Первичную укладку пептида в активном центре при построении модели комплекса проводили вручную так, чтобы положение пептида в районе каталитического центра совпадало с известным положением ингибитора АПФ лизиноприла. Для остальной цепи Aβ(1-16) была выбрана конформация β-тяжа. Построенная первичная модель комплекса N-домена АПФ человека с Aβ(1-16) была оптимизирована стандартными методами при температуре 300 К в течение 50 пс. Полученная модель представлена на рисунке 7.

В построенной модели комплекса из шестнадцати аминокислотных остатков амилоидного пептида Альцгеймера вне фермента находятся только три. Однако для полноразмерного амилоидного пептида известно, что основным местом расщепления является связь между седьмым и восьмым аминокислотными остатками [7, 8]. В этом случае вне фермента будет находиться только один аминокислотный остаток шестнадцатичленного домена амилоидного пептида. Что предполагает возможность образования белок-белкового комплекса между N-доменом АПФ и участком (17-40/43) Aβ. Тогда различия по сайтам расщепления, наблюдаемые для шестнадцатичленного и полноразмерного амилоидного пептида, можно объяснить следующим образом. Наиболее предпочтительным местом расщепления является связь между пятым и шестым аминокислотными остатками, что и реализуется при использовании в качестве субстрата шестнадцатичленного пептида. Однако, если в качестве субстрата выступает полноразмерный пептид, то N-конец Aβ способен более глубоко проникнуть в белковую глобулу фермента. В результате для такого амилоидного

пептида наблюдается преимущественное расщепление между седьмым и восьмым аминокислотными остатками (рис. 8).

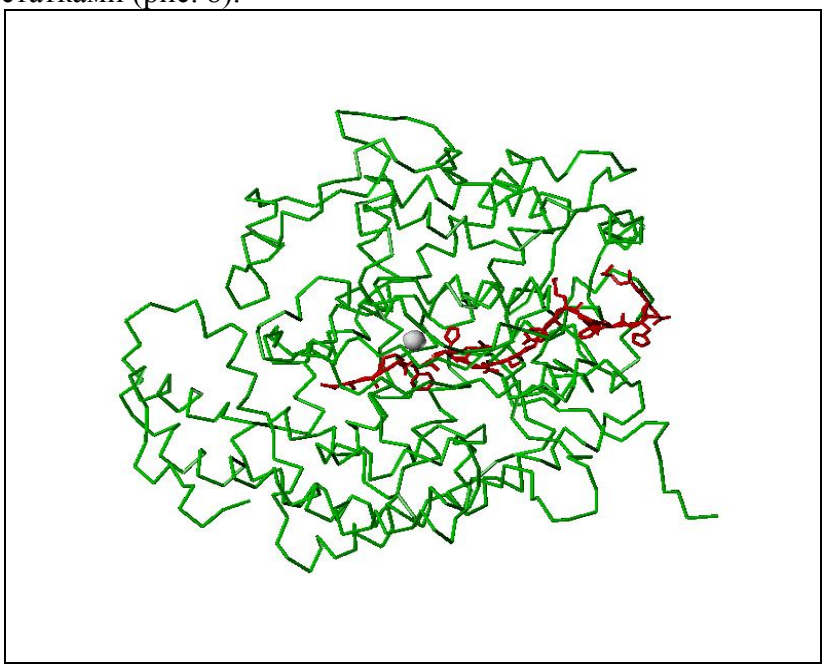

Рис.7. Модель комплекса N-домена АПФ человека (зеленый) с Aβ(1-16) (красный).

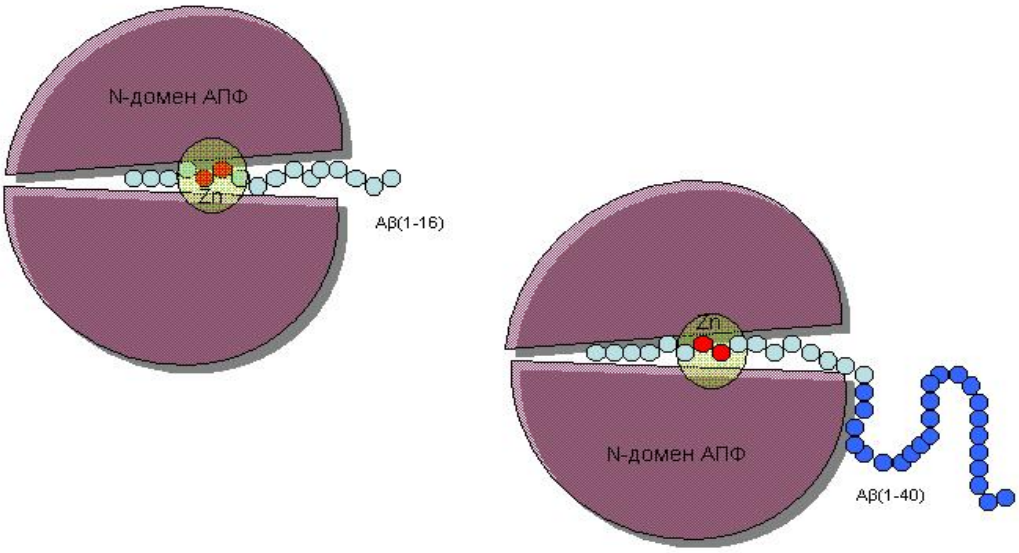

Рис.8. Схема взаимодействия N-домена АПФ с шестнадцатичленным и полноразмерным пептидом Альцгеймера.

Таким образом, построена модель комплекса N-домена АПФ человека с Aβ(1-16) позволяет объяснить различия в местах расщепления N-доменом АПФ полноразмерного амилоидного пептида и его шестнадцатичленного домена.

Литература

1. *Гаврилова С.И.* Современные представления о болезни Альцгеймера // Психиатрия и психофармокотерапия. 2001. 3. №2.
2. *Selkoe D.J.* Alzheimer Disease: Mechanistic Understanding Predicts Novel Therapies // Annals of Internal Medicine. 2004. 140. 627-638.
3. *Olofsson A., Sauer-Eriksson A.E., Öhman A.* The solvent protection of Alzheimer Amyloid-β(1-42) fibrils as determined by solution NMR spectroscopy // J. Biol. Chem. 2006. 281. 477-83.
4. *Carson J.A., Turner A.J.* β-Amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases // J. Neurochem. 2002. 81. 1-8.
5. *Evin G., Weidemann A.* Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Aβ amyloid peptides // Peptides. 2002. 23. 1285–1297.
6. *Ghiso J., Shayo M., Calero M., Tomidokoro Y., Gandy S., Rostagno A., Frangione B.* Systemic Catabolism of Alzheimer's Aβ40 and Aβ42 // J. Biol. Chem. 2004. 279. 45897–45908.
7. *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 β-peptide // Eur. J. Neurosci. 2005. 21. 733–740.
8. *Hu J., Igarashi A., Kamata M. and Nakagawa H.* Angiotensin-converting Enzyme Degrades Alzheimer Amyloid β-Peptide (Aβ); Retards Aβ Aggregation, Deposition, Fibril Formation; and Inhibits Cytotoxicity // J. Biol. Chem. 2001. 276. 47863–47868.
9. *Елисеева Ю.Е.* Структурно-функциональные особенности ангиотензин-превращающего фермента // Биоорганическая химия. 1998. 24. 262-270.
10. *Hemming M. L., Selkoe D.J.* Amyloid β-Protein is Degraded by Cellular Angiotensin-converting Enzyme (ACE) and Elevated by an ACE Inhibitor // J. Biol. Chem. 2005. 280. 37644-37650.
11. SYBYL 6.9.1., Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
12. *Corradi H.R., Schwager S.L., 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.