

Rozprawa doktorska

Wpływ karbamylacji na aktywność enzymatyczną i biologiczne funkcje konwertazy angiotensyny I (ACE1)

Marta Kamińska

Streszczenie

Przewlekła choroba nerek dotyka blisko 850 milionów ludzi na całym świecie, a przeżycie ok. 10 milionów z nich jest możliwe tylko dzięki dializie. Pomimo ciągłych usprawnień, dializa jest w stanie zastąpić jedynie 10% funkcji nerek, przez co przewlekłe chorzy pacjenci borykają się z ciągłym, zwiększonym stężeniem toksycznych metabolitów we krwi. Zakumulowane toksyny mogą mieć szkodliwy wpływ na wszystkie układy organizmu. Najobficiej występującym we krwi toksycznym metabolitem jest mocznik, którego produktem rozkładu są wysoce reaktywne jony cyjanianu. Cyjaniany mogą reagować z grupami aminowymi występującymi w łańcuchach bocznych reszt lizyny oraz N-końców białek i peptydów, przyczyniając się do powstania produktu, karbamil-aminokwasu. Ten rodzaj nieodwracalnej modyfikacji zmienia całkowity ładunek cząsteczki białka, i może wpływać na jego strukturę i funkcję. Karbamylacja przyczynia się do zaostrzenia choroby nerek, a także rozwoju zagrażających życiu komplikacji, takich jak choroby układu sercowo-naczyniowego. Najbardziej narażone na modyfikację w ten sposób są białka surowicy, bezpośrednio wystawione na interakcje ze szkodliwymi metabolitami – a wśród nich konwertaza angiotensyny I (ACE1). ACE1 jest kluczową proteazą układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA), kontrolującego homeostazę ciśnienia krwi za pośrednictwem wazoaktywnych hormonów peptydowych. Dwudomenowa struktura tego białka umożliwia (i) inaktywację peptydów rozszerzających naczynia krwionośne takie jak Ac-SDKP czy angiotensyna 1-7 dzięki aktywności domeny N-terminalnej oraz (ii) generację angiotensyny II dzięki aktywności domeny C-terminalnej. Zaburzenia w enzymatycznej aktywności tego białka, wynikające z modyfikacji potranslacyjnych, mogą rozregulować układ RAA i mieć szkodliwy wpływ na cały organizm. Dlatego też celem niniejszej rozprawy była ocena wpływu karbamylacji na aktywność enzymatyczną ACE1 i tym samym na biologiczną funkcjonalność układu RAA.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, iż w obecności jonów cyjanianu, ACE1 był wydajnie karbamylowany *in vitro*. Analiza z użyciem spektrometrii mas pokazała, że karbamylacji z największą wydajnością ulegały reszty lizyny wyeksponowane na powierzchni białka. Jednakże, nie-powierzchniowe reszty takie jak K155, K402 (N-domena) i K948 (C-

domena), obecne na zewnętrznych krawędziach bruzdy prowadzącej do miejsca aktywnego, oraz lizyny obecne w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca aktywnego, jak K461/K1059 (N/C-domena), czy K518/K1116, uczestniczące w wiązaniu powszechnie stosowanego klinicznie inhibitora ACE1 – lizynoprylu – również ulegały wydajnej modyfikacji. Używając substratów syntetycznych potwierdzono, iż karbamyłacja ACE1 znacząco wpływała na aktywność enzymatyczną białka, w zależności od czasu i użytego stężenia jonów cyjanianu. Pomimo stosunkowo wysokiej homologii obu domen aktywnych, aktywność C-domeny była mniej wrażliwa na inaktywację w wyniku karbamyłacji niż aktywność N-domeny. Co ciekawe na wydajność modyfikacji wpływała naturalnie występująca glikozylacja ACE1, która chroniła enzym przed utratą aktywności.

Oceniono także aktywność modyfikowanego ACE1 wobec naturalnych substratów - hormonów peptydowych układu RAA. Karbamyłowany enzym trawił wszystkie (izoforma jądrowa) lub prawie wszystkie (izoforma somatyczna) natywne peptydy wolniej niż natywny enzym. Ponadto, karbamyłowana angiotensyna I oraz karbamyłowana bradykinina były trawione znacznie efektywniej niż natywne peptydy.

Karbamyłacja ACE1 mogłaby potencjalnie wpływać na skuteczność klinicznie stosowanych inhibitorów kompetycyjnych (enalaprylat, lizynopryl, zofenopryl). Porównano więc zdolność tych inhibitorów do hamowania aktywności natywnego i modyfikowanego enzymu. Pomimo tego, że karbamyłacja nie wpłynęła na IC_{50} żadnego z ocenianych inhibitorów, ich powinowactwo do enzymu uległo zmianie. Enalaprylat i lizynopryl wiązały się do miejsca aktywnego karbamyłowanego enzymu słabiej, podczas gdy dla zofenoprylu zaobserwowano zwiększenie powinowactwa inhibitora do modyfikowanego enzymu.

W ramach badań przeprowadzono także wstępną ocenę aktywności enzymatycznej ACE1 w próbkach surowicy pacjentów cierpiących na przewlekłą chorobę nerek. Wykazano nieznaczny wzrost aktywności N-domeny ACE1 w próbkach pacjentów w porównaniu do próbek od zdrowych dawców. Natomiast aktywność C-domeny ACE1 czy aktywność enzymatyczna względem substratu fluorogennego trawionego przez obie domeny były na porównywalnym poziomie.

Badania przeprowadzone z użyciem linii komórek śródbłonna HUVEC w warunkach karbamyłujących pokazały, możliwość modyfikacji ACE1 w bardziej złożonym układzie. Ponadto, długotrwała hodowla komórek w warunkach imitujących przewlekłą chorobę nerek wpływała również na zmianę ekspresji wybranych genów (m.in. *ENPP1* czy *SELE*).

Dokonano wstępnej oceny biologicznej aktywności trzech hormonów peptydowych układu RAA (angiotensyna II, angiotensyna 1-7, bradykinina) po ich karbamyłacji. Zmodyfikowane peptydy charakteryzowały się znacznie mniejszym potencjałem indukowania napływu wewnątrzkomórkowego wapnia w porównaniu do ich natywnych odpowiedników. Karbamyłana angiotensyna II utraciła zdolność do stymulacji produkcji aktywnego ACE przez śródbłonek naczyniowy, podczas angiotensyna 1-7 zyskiwała taką aktywność w wyniku karbamyłacji. Z wyjątkiem bradykininy, wszystkie badane karbamyłowane peptydy (w tym desArg⁹-bradykinina) stymulowały adhezję monocytów do śródbłonka naczyniowego w mniejszym stopniu niż ich natywne odpowiedniki.

Zebrane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki wyraźnie wskazują, że funkcjonalność układu RAA będzie znacząco zachwiana w warunkach sprzyjających karbamyłacji. Zmieniona aktywność enzymatyczna karbamyłowanego ACE1 (jak i zmiany w powinowactwie do klinicznie stosowanych inhibitorów) rozreguluje mechanizmy warunkujące metabolizm peptydów efektorowych układu RAA, z kolei karbamyłacja hormonów peptydowych może wpłynąć na utratę ich pozytywnych biologicznych funkcji, czy wręcz zyskanie nowych, potencjalnie szkodliwych aktywności. Ostatecznie zmiany w funkcjonowaniu układu RAA mogą wpływać na zwiększenie uszkodzenia nerek, zaostrzając przewlekłą chorobę nerek i przyczyniać się do rozwoju chorób towarzyszących (jak nadciśnienia czy chorób układu naczyniowo-sercowego).


Marta Kamińska


Piotr Mydel
advisor

PhD thesis entitled:

The effect of carbamylation on the enzymatic activity and biological function of angiotensin I converting enzyme (ACE1)

Marta Kamińska

Abstract

An estimated 850 million people worldwide are affected by the chronic kidney disease (CKD) and survival of around 10 million depends on dialysis due to kidney failure. Despite continuous improvement, dialysis can only replace circa 10% of physiological kidney function, leaving patients with a chronic overload of toxic metabolites. Accumulated, these compounds exert various devastating effects on almost all systems of the body. Urea is quantitatively the most abundant retained solute in the body, where it is in equilibrium with its reactive decomposition product cyanate that can react with the amino groups of lysine residues and N-termini of proteins and peptides, resulting in the formation of carbamyl-amino acids. This irreversible post-translational modification can occur at multiple sites within a single protein, altering protein charge, structure, and function. Carbamylation can contribute to the progression of CKD and the development of life-threatening complications, such as cardiovascular events. The prime candidates for this post-translational modification are the proteins directly exposed to the toxic metabolites accumulated in the blood and among them – angiotensin I converting enzyme (ACE1). ACE1 is the pivotal protease of the renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system that is maintaining the blood pressure homeostasis through the vasoactive peptide hormones. ACE1's double-domain structure facilitates (i) the N-domain-dependent inactivation of vasodilating peptides such as Ac-SDKP or angiotensin 1-7 and (ii) the C-domain dependent generation of the vasopressive angiotensin II. PTM-driven ACE1 activity changes could dysregulate the RAA system and have detrimental consequences for the whole organism. The purpose of this study was the evaluation of the effects of carbamylation on the enzymatic activity of ACE1 and the biological functionality of the RAA system.

ACE1 was confirmed to be efficiently carbamylated *in vitro* in the presence of cyanate ions. The modified amino acids, identified *via* MS/MS, are predominantly located on the surface of the protein. A few other residues, facilitating the functionality of this enzyme, such as: K155, K402 (N-domain) and K948 (C-domain) present on the edges of the groove leading to the active site, K461/K1059 (N/C-domain) deep inside the active site pocket of the enzyme, and K518/K1116 – the lysine residue binding one of the most clinically popular ACE1 inhibitor,

lisinopril, were also efficiently modified. Carbamylation of ACE1 significantly affected its enzymatic activity in a time- and cyanate concentration-dependent manner. Despite relatively high homology of its active domains, the C-domain's activity is preserved better than the activity of the N-domain. Moreover, sufficient glycosylation of the enzyme enabled it to retain its enzymatic activity to some degree.

The ACE1-specific cleavage of peptide hormones of RAA system was also investigated. The carbamylated enzyme cleaved all (testicular isoform) or almost all (somatic isoform) at a slower rate than its native counterpart. ACE1 cleaved carbamylated angiotensin I and bradykinin more efficiently than the native peptides.

The efficacy of ACE1's competitive inhibitors (enalaprilat, lisinopril and zofenopril) was also evaluated. While carbamylation does not affect the IC_{50} of the clinically used ACE1 inhibitors investigated in this study, it does affect their binding to the active site of the enzyme: enalaprilat's and lisinopril's affinity (K_i) is weaker, while zofenopril binds to the carbamylated enzyme more strongly.

A preliminary study of the circulating ACE1 activity in the serum of healthy volunteers and chronic kidney disease patients was also performed. The N-domain ACE1 activity in the CKD patients' serum was observed to be slightly elevated, unlike the C-domain specific activity or the ACE1 activity against the fluorogenic substrate for both active domains.

The endothelial ACE1 was susceptible to carbamylation-driven activity in the HUVEC cell culture in carbamylating conditions. The expression of several genes (*ENPP1*, *SELE*, etc) was significantly affected after prolonged culture with cyanate ions.

The biological activity of three peptide hormones of RAA system (angiotensin II, angiotensin 1-7, bradykinin) post-carbamylation was assessed. The modified peptides displayed a lower intracellular calcium influx-inducing potential. Carbamylated angiotensin II lost its ability to cause an increase in endothelial ACE1 activity, while angiotensin 1-7 gained such ability post-carbamylation. All carbamylated peptides (including desArg⁹-bradykinin) had lower pro-monocyte adhesion activities except for the full-length bradykinin.

The results presented in this thesis clearly indicate that the functionality of the whole renin-angiotensin-aldosterone system will be significantly affected in uremic conditions. Aberrant carbamylated ACE1 activity (as well as lower affinity to clinical inhibitors) will distort the metabolism of RAA effectors (peptide hormones), whereas carbamylated RAA effectors might lose beneficial biological activities and gain deleterious ones. The combined result of such

dysregulation might aggravate the kidney damage, cause severe complications in CKD, as well as contribute to the development of comorbidities (hypertension, CVD).



Marta Kamińska



Piotr Mydel

advisor