

АУТОРЕГУЛЯЦИЯ И АУТОИНГИБИРОВАНИЕ ОСНОВНЫХ ИЗОФОРМ NO-СИНТАЗ (КРАТКИЙ ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2023.15.3.06

УДК 612:661.982

Поступила 18.02.2023 г.



Н.А. Попова, научный сотрудник лаборатории клинической и экспериментальной биофизики¹;
научный сотрудник лаборатории химического и биотехнологического синтеза²;

С.К. Соодаева, д.м.н., зав. лабораторией клинической и экспериментальной биофизики¹;
ведущий научный сотрудник лаборатории химического и биотехнологического синтеза²;

И.А. Климанов, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической
и экспериментальной биофизики¹;

В.М. Мишарин, к.м.н., ВРИО директора института¹;

А.А. Темнов, д.м.н., зав. лабораторией химического и биотехнологического синтеза²

¹Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Ореховый бульвар, 28,
Москва, 115682;

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Институтский переулок, 9, Долгопрудный, Московская область, 141701

Оксид азота (II) NO является важнейшим медиатором широкого спектра физиологических и патофизиологических процессов. Он синтезируется NO-синтазами (NOS), у которых выделяются три основные изоформы, отличающиеся друг от друга особенностями активации и ингибирования, уровнями продукции NO, субклеточной локализацией и т.д. При этом структурно все изоформы очень схожи, а указанные различия определяются ауторегуляторными элементами NOS.

Представлен анализ ауторегуляторных и аутоингибиторных механизмов редуктазного домена NOS, определяющих различия в продуктивности изоформ, а также их зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} . К основным регуляторным элементам в NOS, модулирующим перенос электронов от флавина к гему, относят кальмодулин (CaM), аутоингибиторную вставку (AI) и C-концевой хвост (C-tail). Предполагается, что гидрофобные взаимодействия CaM с поверхностью оксидазного домена NOS способствуют переносу электрона от флавиномононуклеотида (FMN). Связывание CaM вызывает изменение междоменных расстояний, сдвиг AI, C-tail и, как следствие, уменьшение их ингибирующего влияния. Также CaM сдвигает конформационное равновесие редуктазного домена в сторону более открытых конформаций, уменьшает время жизни конформаций, их стереометрическое распределение и ускоряет поток электронов через редуктазный домен. AI, по всей видимости, индуцирует конформационное изменение, которое препятствует переносу электронов внутри редуктазного домена по аналогии с шарнирным доменом в цитохроме P450. C-tail совместно с CaM регулируют поток электронов между флавинами, расстояние и относительную ориентацию изоаллоксановых колец, а также модулируют поток электронов от FMN к терминальному акцептору. Также AI совместно с C-tail предопределяют зависимость нейрональной и эндотелиальной форм NOS от концентрации ионов Ca^{2+} , а длина C-tail влияет на различия в продуктивности синтеза NO. Ингибирующее влияние C-tail, по всей вероятности, снижается при связывании CaM из-за сдвига C-tail за счет сил электростатического отталкивания отрицательно заряженных остатков фосфата и аспартата. Ауторегуляторные элементы NOS требуют дальнейшего изучения, поскольку механизмы их взаимодействия имеют сложный и разнонаправленный характер, благодаря которому обеспечивается широкий диапазон характеристик наблюдаемых изоформ.

Ключевые слова: оксид азота; NO-синтаза; моделирование NOS; ауторегуляция NOS; аутоингибиторная вставка; кальмодулин; C-концевой хвост; перенос электронов в NOS.

Как цитировать: Popova N.A., Soodaeva S.K., Klimanov I.A., Misharin V.M., Temnov A.A. Autoregulation and autoinhibition of the main NO synthase isoforms (brief review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(3): 53, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.3.06>

Для контактов: Попова Наталья Алексеевна, e-mail: npopova523@mail.ru

Autoregulation and Autoinhibition of the Main NO Synthase Isoforms (Brief Review)

N.A. Popova, Researcher, Laboratory of Clinical and Experimental Biophysics¹; Researcher, Laboratory of Chemical and Biotechnological Synthesis²;

S.K. Soodaeva, MD, DSc, Head of Laboratory of Clinical and Experimental Biophysics¹; Leading Researcher, Laboratory of Chemical and Biotechnological Synthesis²;

I.A. Klimanov, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Clinical and Experimental Biophysics¹;

V.M. Misharin, MD, PhD, Acting Director of the Institute¹;

A.A. Temnov, MD, DSc, Head of Laboratory of Chemical and Biotechnological Synthesis²

¹Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia, 28 Orekhovy Boulevard, Moscow, 115682, Russia;

²Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 9 Institutskiy Per., Dolgoprudny, Moscow Region, 141701, Russia

Nitric oxide (II) (NO) is the most important mediator of a wide range of physiological and pathophysiological processes. It is synthesized by NO synthases (NOSs), which have three main isoforms differing from each other in terms of activation and inhibition features, levels of NO production, subcellular localization, etc. At the same time, all isoforms are structurally very similar, and these differences are determined by NOS autoregulatory elements.

The article presents an analysis of the autoregulatory and autoinhibitory mechanisms of the NOS reductase domain that determine differences in the productivity of isoforms, as well as their dependence on the concentration of Ca²⁺ ions. The main regulatory elements in NOS that modulate the electron transfer from flavin to heme include calmodulin (CaM), an autoinhibitory insert (AI), and the C-terminal tail (C-tail). Hydrophobic interactions of CaM with the surface of the NOS oxidase domain are assumed to facilitate electron transfer from flavin mononucleotide (FMN). CaM binding causes a change in the inter-domain distances, a shift of AI and the C-tail, and, as a result, a decrease in their inhibitory effect. CaM also shifts the conformational equilibrium of the reductase domain towards more open conformations, reduces the lifetime of conformations, their stereometric distribution, and accelerates the flow of electrons through the reductase domain. The AI element, apparently, induces a conformational change that hinders electron transfer within the reductase domain, similar to the hinge domain in cytochrome P450. Together with CaM, the C-tail regulates the electron flow between flavins, the distance and relative orientation of isoalloxane rings, and also modulates the electron flow from FMN to the terminal acceptor. Together with the C-tail, AI also predetermines the dependence of neuronal and endothelial forms of NOS on the concentration of Ca²⁺ ions, and the C-tail length affects differences in the productivity of NO synthesis. The inhibitory effect of the C-tail is likely to be reduced by CaM binding due to the C-tail shift due to the electrostatic repulsive forces of the negatively charged phosphate and aspartate residues. The autoregulatory elements of NOS require further study, since the mechanisms of their interaction are complex and multidirectional, and hence provide a wide range of characteristics of the observed isoforms.

Key words: nitric oxide; NO synthase; NOS modeling; NOS autoregulation; autoinhibitory insert; calmodulin; C-tail; electron transfer to NOS.

Введение

Оксид азота (II) NO является важнейшим межклеточным медиатором широкого спектра физиологических и патофизиологических процессов. Так, он регулирует тонус, проницаемость и структуру сосудов, тонус гладких мышц внутренних органов, процессы воспаления и иммунного ответа, свободнорадикальные процессы, вовлечен в патогенез большинства воспалительных заболеваний, может служить биологическим маркером воспаления и пр. [1–3].

NO-синтазы (NOS), образующие NO и представляющие собой ферментативную часть более общего цикла NO, являются цитохром-P450-подобными гемопroteинами. Они окисляют L-аргинин (Arg) в двухстадийном процессе, включающем в качестве промежуточного продукта L-гидроксиаргинин (NOHA).

В цикле катализа участвуют ряд кофакторов: никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH), флавинадениндинуклеотид (FAD), флавиномононуклеотид (FMN), тетрагидроптерин, кальмодулин (CaM) и т.д. [4–6].

Три основные изоформы NOS (nNOS, eNOS, iNOS) имеют ряд существенных различий: кодируются разными генами, отличаются субклеточной локализацией, продуцируемыми концентрациями NO, степенью зависимости от концентрации Ca²⁺. Несмотря на это, основные структурные элементы NOSs идентичны для всех изоформ [7–9] (рис. 1).

Как видно из рис. 1, димер оксигеназного домена в центре NOS содержит связывающие центры для тетрагидробиоптерина (BH₄), гема и L-аргинина. К оксигеназному домену присоединен редуктазный, состоящий из NADPH, FAD и FMN. CaM при его связывании

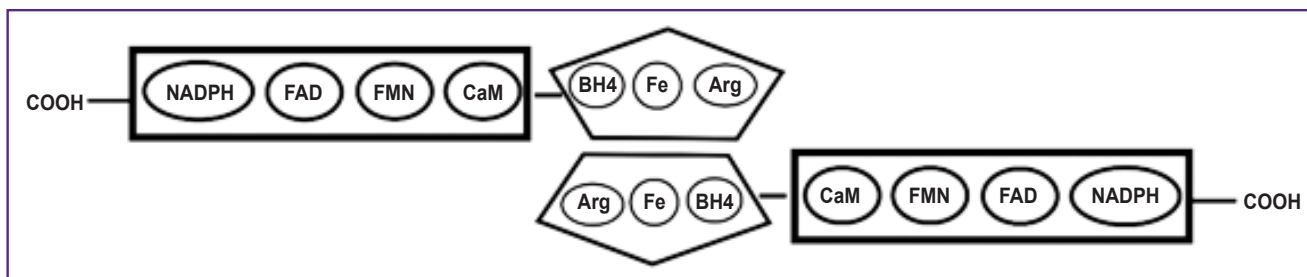


Рис. 1. Структурная модель NOS [5, 7]

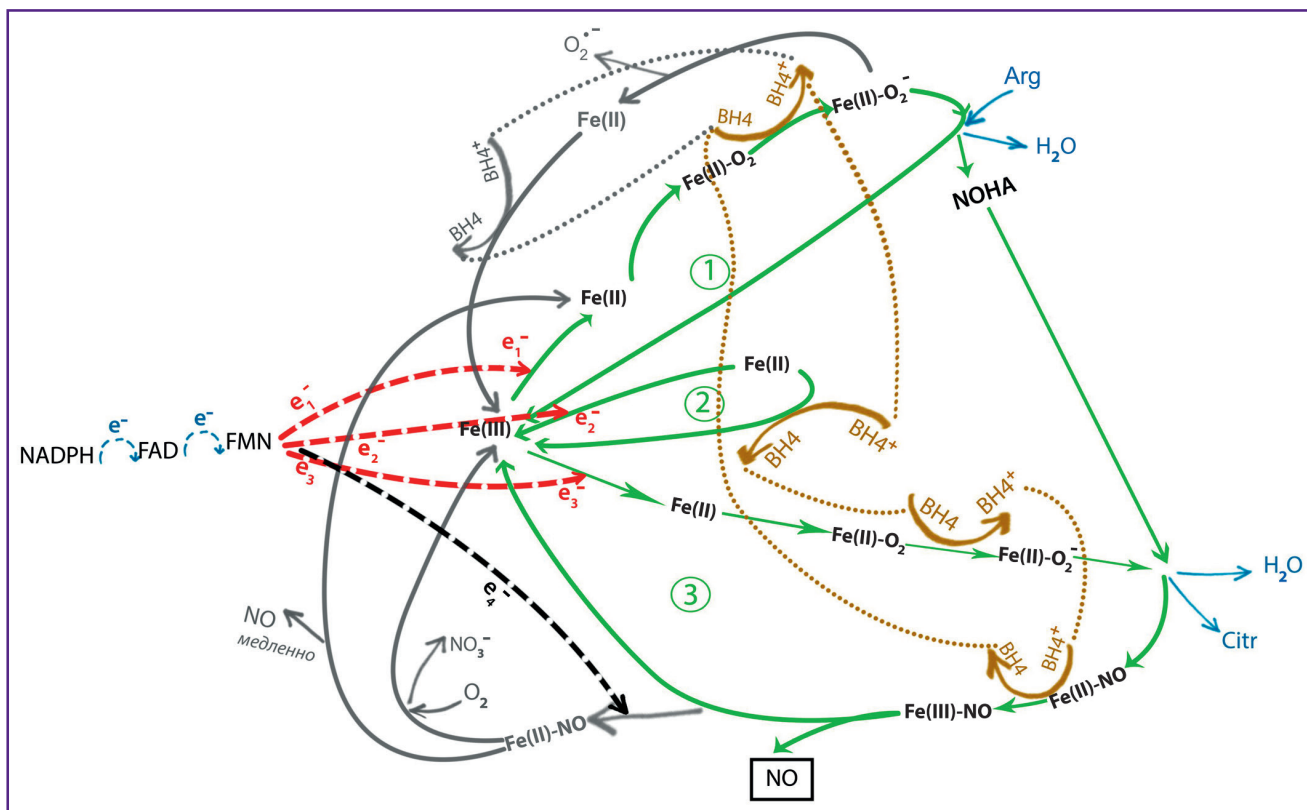


Рис. 2. Трехтактный цикл катализа NOS [10]

ферментом находится между FMN и оксигеназным доменом [5, 7, 9].

В предложенной нами ранее [10] структурной схеме трехтактной модели катализа NOS учитывается значительная разница в скорости восстановления комплекса гем-Fe(II)-O₂ электроном из редуктазного домена и коферментом BH₄. Кинетическая предпочтительность второго пути позволила сделать предположение о работе BH₄ по бинарной логике: восстановление комплекса гем-Fe(II)-O₂, окисление комплексов гем-Fe(II) и гем-Fe(II)-NO. Получаемый в таком случае замкнутый цикл последовательного окисления и восстановления BH₄ дает непротиворечивую картину его роли в катализе.

На рис. 2 представлен алгоритм трехтактного каталитического цикла NOS при физиологических

условиях, разработанный с целью последующего имитационного моделирования. Зеленым цветом выделена нормальная последовательность этапов катализа, в результате которой фермент синтезирует NO, серым цветом показаны патологические цепочки. Коричневым цветом выделена замкнутая цепь последовательных окислений и восстановлений кофермента BH₄.

Каталитический цикл начинается с переноса первого электрона по электрон-транспортной цепи редуктазного домена, затем — на гем трехвалентного железа (гем-Fe(III)). Согласно современным представлениям [4, 5], NADPH связывает молекулу, содержащую флавины FAD и FMN, восстанавливает FAD, затем электроны диспропорционируют между FAD и FMN. CaM связывает два иона Ca²⁺, после чего становится

способным присоединиться к соответствующему связывающему центру NOS, но этого недостаточно для инициации конформационных изменений фермента, позволяющих передать электрон от FMN на оксигензый домен к гему трехвалентного железа (гем-Fe(III)). Для указанной передачи необходимо, чтобы два оставшихся центра связывания CaM также заполнились ионами Ca²⁺.

Каждый такт трехтактного цикла катализа NOS запускается описанным процессом переноса электрона по электрон-транспортной цепи редуктазного домена и восстановлением гем-Fe(III) до гем-Fe(II). Такты нормального продуктивного цикла NOS указаны на рис. 2 зеленым цветом и соответствующими цифрами.

В первом такте гем-Fe(III) восстанавливается первым электроном до гем-Fe(II), который при достаточности кислорода окисляется до комплекса гем-Fe(II)-O₂. Для того чтобы этот комплекс был способен прореагировать с субстратом, он активируется восстановленным после предыдущего каталитического цикла коферментом BH₄ до гем-Fe(II)-O₂⁻. BH₄ превращается при этом в радикал BH₄[•], а комплекс гем-Fe(II)-O₂⁻ уже способен прореагировать с аргинином, превращая его в NOHA с выделением одной молекулы H₂O и окислением гема до его первоначального состояния (гем-Fe(III)). На этом первый такт цикла заканчивается.

Второй такт является промежуточным и служит для восстановления кофермента BH₄, окисленного в предыдущем такте. При этом второй электрон от редуктазного домена сначала восстанавливает гем-Fe(III) до гем-Fe(II) по аналогии с первым тактом, а затем радикал BH₄[•] окисляет гем-Fe(II) до гем-Fe(III), таким образом восстанавливаясь для третьего такта цикла катализа.

В третьем такте по аналогии с первым тактом гем-Fe(III) восстанавливается до гем-Fe(II) третьим электроном от редуктазного домена, затем окисляется до комплекса гем-Fe(II)-O₂, активируется тетрагидробиоптеринном, восстановленным во втором такте, до гем-Fe(II)-O₂⁻ и реагирует с NOHA, образуя цитруллин, молекулу H₂O и комплекс гем-Fe(II)-NO, высвобождение NO из которого происходит крайне медленно. Радикал BH₄[•], образовавшийся после восстановления гем-Fe(II)-O₂, немедленно окисляет гем-Fe(II)-NO до гем-Fe(III)-NO, который способен высвобождать NO значительно быстрее своей восстановленной формы. При этом восстановленный BH₄ становится готовым для следующего цикла катализа.

Если оксид азота, высвободившийся из комплекса гем-Fe(III)-NO, успевает выйти из кармана фермента до момента прихода нового электрона, то каталитический цикл завершается продуктивно и фермент становится готовым к новому циклу. В противном случае новый электрон восстанавливает гем-Fe(III)-NO до гем-Fe(II)-NO, который при достаточности кислорода реагирует с ним, образуя NO₃⁻, а при недостаточности

кислорода фактически блокирует фермент из-за медленного высвобождения NO.

Необходимо отметить, что катализ NO лимитируется наиболее медленной стадией, а именно переносом электрона внутри редуктазного домена, а также с FMN на гем. Этот перенос необходим для восстановления гем-Fe(III) в начале каждого такта цикла. Соответственно регуляция скорости этого переноса отвечает за «производительность» NOS в нормальном каталитическом цикле, а регуляторные механизмы являются исключительно важными для понимания функционирования фермента. Мало того, в случае NOS именно ауторегуляторные механизмы переноса электрона в редуктажном домене определяют и объясняют разницу различных изоформ по продуктивности синтеза NO и по зависимости от концентрации ионов Ca²⁺.

Целью настоящего обзора является анализ результатов исследований основных ауторегуляторных механизмов редуктазного домена NOS, к которым относят кальмодулин (CaM), аутоингибиторную вставку (AI) и C-концевой хвост (C-tail). На сегодняшний день механизмы их функционирования недостаточно изучены, но имеющиеся данные позволяют сделать вывод о сложном, разнонаправленном алгоритме взаимодействия, который обеспечивает широкий диапазон характеристик наблюдаемых изоформ.

Материалы и методы

В качестве основного источника научных данных были выбраны поисковики <https://scholar.google.ru/> и база PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Глубина поиска составила 33 года (с 1990 по 2023 г.), метод анализа данных — голографический. В качестве ключевых использовались следующие слова: “NOS”, “NO synthase”, “nitric-oxide synthase”, “electron flow”, “electron transfer”, “regulation”, “autoinhibition”, “modulation by”, “conformational control”, “conformational dynamics”, “C-tail”, “C-terminus”, “cytochrome C-reduction”, “ferricyanide reduction”, “autoinhibitory insert”. Общее количество источников при сочетании ключевых слов [(“NOS” OR “NO synthase” OR “nitric-oxide synthase”) AND (“electron flow” OR “electron transfer”) AND (“regulation” OR “autoinhibition” OR “conformational control” OR “modulation by” OR “conformational dynamics”) AND (“C-tail” OR “C-terminus”)] составило 3100 в <https://scholar.google.ru/> при очень низкой релевантности (только 6 работ затрагивают исследуемую проблематику) и всего 11 в PubMed, из которых только 4 работы достаточно релевантны. При сочетании [(“NOS” OR “NO synthase” OR “nitric-oxide synthase”) AND (“regulation” OR “autoinhibition” OR “modulation by”) AND (“C-tail” OR “C-terminus”) AND (“cytochrome C-reduction” OR “ferricyanide reduction”)] найдено 247 источников в <https://scholar.google.ru/> с низкой релевантностью, а работ в базе PubMed не обнаружено. При этом в большинстве работ анализируется регуляторная роль

кальмодулина, тогда как другие ауторегуляторные элементы только упоминаются. Так, выявлено 3 работы, где количественно оценивалась регуляторная роль аутоингибиторной вставки и C-tail с использованием мутантных форм ферментов. Следует отметить, что это работы 1999–2001 гг., и они по ряду данных недостаточно согласуются друг с другом, а их дизайн в большей степени соответствует пилотным исследованиям.

Крайне малое количество высокорелевантных работ по указанной тематике свидетельствует о том, что механизмы ауторегуляции NO-синтаз на сегодняшний день являются малоизученной областью, объем существующих экспериментальных количественных оценок недостаточен для адекватного понимания работы аутоингибирующих и регуляторных элементов, а также для их моделирования.

Регуляторные функции кальмодулина и Ca^{2+}

Ключевую роль в регуляции трансфера электронов в NOS играет белок кальмодулин. Когда два из четырех центров связывания CaM, обладающих более высокой аффинностью, заполняются Ca^{2+} , CaM связывается с NOS, располагаясь, как принято считать, между FMN и гемом. Это инициирует конформационные изменения, ускоряющие электронный трансфер внутри редуктазного домена: от NADPH в FAD, от FAD в FMN. После заполнения Ca^{2+} двух оставшихся свободных центров связывания CaM становится способным ускорять перенос электрона от FMN к гему [4].

Согласно имеющимся данным [4], механизмы снятия репрессии на ключевых этапах переноса электрона не связаны с изменением термодинамики реакций. Поскольку редуктазный домен может существовать в любых состояниях — от одно- до четырехэлектронного восстановленного, как динамическая система открытых и закрытых конформаций, — основными механизмами регулирующего влияния CaM предполагаются следующие:

сдвиг конформационного равновесия в сторону более открытых конформаций;

сокращение времен жизни конформаций и ускорение переходов между ними;

сужение стереометрических распределений конформаций;

ограничение степеней свободы внутри фермента, что направляет перемещения домена FMN в пространстве.

Вышеописанные механизмы, по всей вероятности, обусловлены способностью CaM формировать ионные связи и гидрофобные взаимодействия с оксидазным доменом NOS, что помогает направлять стыковку домена FMN и формирует оптимальную «электронную тропу». CaM, предположительно, также устраняет ингибирующее влияние AI на участок стыковки FMN с гемом [4, 11, 12].

В отсутствие CaM nNOS практически не синтезирует NO (концентрации не определяются), а eNOS продуцирует NO на уровне 2,5% от уровня синтеза в присутствии CaM. Заполнение ионами Ca^{2+} центров связывания CaM является фактически триггером переноса электронов на гем, по всей вероятности, за счет смещения ингибирующих регуляторных элементов: AI и C-tail. При этом iNOS в отличие от двух других изоформ не имеет AI и сразу экспрессируется с CaM, что делает ее практически независимой от концентрации ионов Ca^{2+} [11].

Регуляторные функции аутоингибиторной вставки

Основное отличие в строении трех главных изоформ NOS млекопитающих — наличие последовательности из 52–55 аминокислот в редуктазном домене nNOS и eNOS. Ключевые функции этой вставки, определенные с помощью химер NOS, полученных ее удалением, позволяют утверждать, что это аутоингибиторный элемент. Кроме того, именно AI во многом определяет зависимость активности NOS от концентрации Ca^{2+} . Например, химерам eNOS с удаленной AI требуется в 7 раз меньшая концентрация Ca^{2+} для активации (20 вместо 150 нМ) [13].

Ингибирующее влияние AI носит довольно сложный характер, который иллюстрируется несколькими параметрами [12, 13]:

1) общей восстановительной активностью редуктазного домена NOS, которую можно оценить по интенсивности восстановления цитохрома C (как искусственного акцептора электронов), присоединенного к FMN;

2) эффективностью переноса электрона от NADPH на FAD, оцениваемой по восстановлению феррицианида, присоединенного к FAD;

3) продуктивностью синтеза NO.

Для eNOS и nNOS связывание CaM ускоряет восстановление цитохрома C (общую восстановительную активность редуктазного домена) примерно в 10 раз. Изначально такую же активность (и она сравнима с цитохромом P450) имеет iNOS, так как экспрессируется с уже связанным CaM. В случае мутантных nNOS, eNOS (с удаленной AI) редуктазная активность без CaM усиливается радикально, в 10–30 раз. В присутствии CaM и при физиологических концентрациях солей калия, натрия и кальция редуктазная активность мутантных форм выше, чем у исходных, всего в 3 раза [13].

На восстановлении феррицианида, т.е. на переносе электронов с NADPH на FAD, влияние AI сказывается значительно слабее: в присутствии CaM и при физиологических концентрациях солей эффективность мутантных форм всего в 2 раза превышает эффективность нормальных, а в отсутствие CaM удаление AI дает рост эффективности в 3–6 раз. Удаление AI приводит также к заметному увеличению

максимального синтеза NO, особенно при физиологических концентрациях солей калия и натрия. Исходя из результатов экспериментов с мутантными формами конститутивных NOS с удаленной AI можно сделать ряд предварительных выводов о принципах ее функционирования [13]:

1. AI примерно в 7 раз повышает уровень Ca²⁺, необходимый для связывания CaM конститутивными NOS, что является одной из причин их значительно большей зависимости от Ca²⁺.

2. AI также увеличивает зависимость конститутивных NOS от Ca²⁺ за счет того, что радикально (в 10–30 раз) снижает редуктазную активность NOS без связанного CaM. В случае связанного CaM AI снижает эту активность значительно слабее (в 3 раза).

3. Кроме AI, по всей вероятности, существуют другие факторы, определяющие зависимость конститутивных NOS от Ca²⁺, поскольку, несмотря на повышенную редуктазную активность ферментов без AI, для синтеза NO им все равно требуется связывание CaM. Кроме того, мутантные формы iNOS с добавленной AI синтезируют NO даже при концентрациях Ca²⁺ значительно ниже пороговых.

4. Разные изоформы NOS при удалении AI начинают показывать схожую редуктазную активность, причем у связанных с CaM мутантных форм эта активность выше, чем у связанных с CaM исходных форм.

5. Суммарное аутоингибирование NOS ослабляется при связывании CaM и для мутантных форм с удаленной AI, и для нормальных исходных ферментов, причем связывание CaM в большей степени усиливает редуктазную активность мутантных NOS с удаленной AI, чем исходных.

6. Предположительно самая низкая продуктивность eNOS по сравнению с другими изоформами объясняется ее наиболее эффективной AI, которая продолжает частично ингибировать активность фермента даже при связанном CaM и достаточности Ca²⁺. В случае nNOS ингибирующий эффект AI на редуктазную активность полностью компенсируется связыванием CaM и достаточностью Ca²⁺. Это подтверждается

тем, что при удалении AI редуктазная активность мутантной eNOS сравнивается с таковой для мутантной nNOS.

Имеющиеся данные пока не позволяют делать выводы о механизмах влияния AI на редуктазную активность NOS. AI может стереометрически мешать цитохрому С и феррицианиду контактировать с редуктазным доменом, а также может индуцировать конформационное изменение, которое препятствует переносу электронов внутри редуктазного домена по аналогии с шарнирным доменом в цитохроме P450, который улучшает перенос электронов между флавинами [12, 14].

Регуляторные функции С-концевого хвоста

В отличие от цитохром-P450-редуктазы все изоформы NOS на С-конце имеют удлинение из 20–40 аминокислот, причем базовая последовательность из восьми аминокислот С-конца (основание хвоста) оказалась абсолютно идентичной для мышинной iNOS, крысиной nNOS, коровьей eNOS, а также NOS фруктовой мушки и бабочки бражника, а удлинения (непосредственно хвост — C-tail) имеют разную длину и последовательность аминокислот [15] (рис. 3).

Эксперименты с мутантными формами NOS (с удаленным в разной степени C-tail) показали, что C-tail оказывает ингибирующее влияние. В противоположность этому основание хвоста служит для эффективного синтеза NO. При удалении в iNOS одновременно удлинения (C-tail) и базовой последовательности синтез NO падает на 70%. При удалении только удлинения синтез NO растет на 15%, а редуктазная активность увеличивается в 10 раз. Эти данные получены в присутствии CaM, так как iNOS не удавалось экспрессировать без него [12, 15].

Поскольку nNOS и eNOS легко экспрессировать как со связанным CaM, так и без него (меняя уровень концентрации Ca²⁺), то можно зафиксировать влияние C-tail в обоих случаях. Для исходных нормальных ферментов связывание CaM усиливает редуктазную активность в 10 раз для nNOS и в 3 раза для eNOS.

Для мутантных форм (с удаленным C-tail) связывание CaM, наоборот, замедляет редуктазную активность примерно на 36% для nNOS и на 46% — для eNOS. При этом в отсутствии CaM редуктазная активность мутантных eNOS примерно в 7 раз, а nNOS — в 21 раз больше, чем редуктазная активность исходных нормальных конститутивных NOS, т.е. CaM работает как частичный неконкурентный ингибитор редуктазной активности мутантных форм. В то же время для нормальных конститутивных форм NOS с со-

Rat	CPR	RYSLDVWS
Mouse	iNOS	RYHEDIFGAVFSYGAKKGSALEEPkatRL ⁽²¹⁾
Rat	nNOS	RYHEDIFGVTLRTYEVTNRLRSESI AFIEESKkDADEVFSS ⁽³³⁾
Bovine	eNOS	RYHEDIFGLTLRTQEVTSRI RTQSFSLQERHLRGAVPWAFDPPGPDPGP ⁽⁴²⁾
Fruit Fly	NOS	RYHEDIFGITLRTAEIHTKSRATARIRMASQP ⁽²⁴⁾
Hawkmoth	NOS	RYHEDIFGITLRTAEVHSASREFAKRTRQESLQSQAI ⁽²⁸⁾

Рис. 3. Базовая аминокислотная последовательность (основание хвоста, выделено прямоугольником) и С-концевые аминокислотные последовательности (отсутствуют в цитохром-P450-редуктазе) для мышинной iNOS, крысиной nNOS, коровьей eNOS, а также NOS фруктовой мушки и бабочки бражника [15]

храненными C-tail CaM выступает как катализатор редуцтазной активности [15, 16].

Как и в случае AI, регуляторное влияние C-tail на эффективность разных этапов синтеза NO конститутивными формами NOS имеет сложный характер [15, 16]:

в присутствии CaM редуцтазная активность (именно восстановление цитохрома C, соединенного с FMN, а не перенос электрона на гем) для мутантных и нормальных форм nNOS и eNOS примерно одинакова, удаление хвоста не имеет радикального влияния;

в отсутствие CaM редуцтазная активность обеих изоформ при удалении C-tail возрастает в 7–21 раз, но при этом скорость синтеза NO для мутантной nNOS оказывается самой низкой (возможно, из-за образования супероксида путем диссоциации комплекса гем–Fe(II)–O₂ в оксидазном домене);

C-tail вносит вклад в зависимость конститутивных форм NOS от Ca²⁺, так как при наличии C-tail связывание CaM увеличивает редуцтазную активность, а при его отсутствии, наоборот, уменьшает.

Предполагается [15], что C-tail не взаимодействует непосредственно с гемовым доменом, AI и CaM, так как эти домены находятся далеко от него. Наиболее вероятным считается, что CaM находится на одной стороне флавиновой стенки, а C-tail покрывает другую ее сторону. При этом CaM и C-tail модулируют поток электронов между флавинами, координируя расстояние и относительную ориентацию изоаллоксановых колец, а также регулируют поток электронов от FMN к терминальному акцептору (цитохрому C, феррицианиду или гемовому домену). Эксперименты с заменой серина на аспарат в C-tail показали, что связывание CaM вызывает перемещение C-tail для меньшего ингибирования потока электронов, вероятнее всего, за счет сил электростатического отталкивания отрицательно заряженных остатков фосфата или аспартата.

Заключение

CaM, AI и C-tail являются основными элементами ауторегуляции NOS, модулирующими перенос электронов от флавина к гему. Связывание CaM вызывает изменение междоменных расстояний, сдвиг и, как следствие, уменьшение ингибирующего влияния AI и C-tail [12, 15, 16]. Эффекты CaM, по всей видимости, реализуются через формирование временных ионных и гидрофобных взаимодействий с поверхностью оксидазного домена NOS, помогающих его взаимодействию с FMN. Также CaM сдвигает конформационное равновесие редуцтазного домена в сторону более открытых конформаций, сокращает время жизни и стереометрическое распределение конформаций, ускоряя переходы между ними и поток электронов через редуцтазный домен. AI, вероятно, индуцирует конформационное изменение, которое препятствует переносу электронов внутри редуцтазного домена по аналогии с шарнирным доменом в цитохроме P450 [12, 14].

C-tail совместно с CaM модулируют поток электронов между флавинами, изменяя расстояние и относительную ориентацию изоаллоксановых колец, а также регулируют поток электронов от FMN к терминальному акцептору. Предполагаемый механизм — сдвиг C-tail и, как следствие, снижение его ингибирующего влияния на перенос электронов при связывании CaM за счет сил электростатического отталкивания отрицательно заряженных остатков фосфата и аспартата.

Функционирование регуляторных элементов NOS требует дальнейшего изучения, которое позволит детализировать их сложный, разнонаправленный алгоритм взаимодействия. Более полное понимание механизмов ауторегуляции NO-синтаз в норме, а также при патологических состояниях необходимо для современных технологий моделирования NOS, что будет способствовать выявлению особенностей патогенеза различных социально-значимых заболеваний, повышению эффективности их диагностики и таргетной терапии.

Вклад авторов: Н.А. Попова — концепция статьи; Н.А. Попова, С.К. Соодаева, И.А. Климанов — подготовка первоначального варианта текста; В.М. Мишарин, А.А. Темнов — обзор и редактирование статьи.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование не финансировалось какими-либо источниками, и конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Carlström M. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. *Nat Rev Nephrol* 2021; 17(9): 575–590, <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00429-z>.
2. Lij P.M., Puzi N.N.A., Jose S., Vidyadaran S. Nitric oxide modulation in neuroinflammation and the role of mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2021; 246(22): 2399–2406, <https://doi.org/10.1177/1535370221997052>.
3. Iwakiri Y., Kim M.Y. Nitric oxide in liver diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36(8): 524–536, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.05.001>.
4. Stuehr D.J., Haque M.M. Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *Br J Pharmacol* 2019; 176(2): 177–188, <https://doi.org/10.1111/bph.14533>.
5. Campbell M.G., Smith B.C., Potter C.S., Carragher B., Marletta M.A. Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(35): E3614–E3623, <https://doi.org/10.1073/pnas.1413763111>.
6. Cinelli M.A., Do H.T., Miley G.P., Silverman R.B. Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 2020; 40(1): 158–189, <https://doi.org/10.1002/med.21599>.
7. Król M., Kepinska M. Human nitric oxide synthase — its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci* 2020; 22(1): 56, <https://doi.org/10.3390/ijms22010056>.
8. Tsutsui M., Tanimoto A., Tamura M., Mukae H., Yanagihara N., Shimokawa H., Otsuji Y. Significance of nitric

oxide synthases: lessons from triple nitric oxide synthases null mice. *J Pharmacol Sci* 2015; 127(1): 42–52, <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.10.002>.

9. Li H., Jamal J., Plaza C., Pineda S.H., Chreifi G., Jing Q., Cinelli M.A., Silverman R.B., Poulos T.L. Structures of human constitutive nitric oxide synthases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014; 70(Pt 10): 2667–2674, <https://doi.org/10.1107/s1399004714017064>.

10. Попова Н.А., Климанов И.А., Соодаева С.К., Темнов А.А. Формирование структурной схемы универсальной модели каталитического цикла NO-синтаз. *Современные проблемы науки и образования* 2022; 4: 130, <https://doi.org/10.17513/spno.31989>.

Popova N.A., Klimanov I.A., Soodaeva S.K., Temnov A.A. Formation of the structural scheme for universal NO-synthase catalytic cycle model. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* 2022; 4, <https://doi.org/10.17513/spno.31989>.

11. Kobayashi K., Tagawa S., Daff S., Sagami I., Shimizu T. Rapid calmodulin-dependent interdomain electron transfer in neuronal nitric-oxide synthase measured by pulse radiolysis. *J Biol Chem* 2001; 276(43): 39864–39871, <https://doi.org/10.1074/jbc.m102537200>.

12. Hanson Q.M., Carley J.R., Gilbreath T.J., Smith B.C.,

Underbakke E.S. Calmodulin-induced conformational control and allostery underlying neuronal nitric oxide synthase activation. *J Mol Biol* 2018; 430(7): 935–947, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.02.003>.

13. Nishida C.R., Ortiz de Montellano P.R. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem* 1999; 274(21): 14692–14698, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.14692>.

14. Li J., Zheng H., Feng C. Deciphering mechanism of conformationally controlled electron transfer in nitric oxide synthases. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2018; 23(10): 1803–1821, <https://doi.org/10.2741/4674>.

15. Roman L.J., Martásek P., Miller R.T., Harris D.E., de la Garza M.A., Shea T.M., Kim J.J.P., Masters B.S.S. The C termini of constitutive nitric-oxide synthases control electron flow through the flavin and heme domains and affect modulation by calmodulin. *J Biol Chem* 2000; 275(38): 29225–29232, <https://doi.org/10.1074/jbc.m004766200>.

16. Panda S.P., Li W., Venkatakrishnan P., Chen L., Astashkin A.V., Masters B.S., Feng C., Roman L.J. Differential calmodulin-modulatory and electron transfer properties of neuronal nitric oxide synthase mu compared to the alpha variant. *FEBS Lett* 2013; 587(24): 3973–3978, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.032>.