

УДК 612.1.577.617.96

© Коллектив авторов

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ КАЛЬМОДУЛИНОМ АКТИВНОСТИ СИНТАЗЫ ОКИСИ АЗОТА*

Ю.В. ГЕРВАЗИЕВ, Н.Н. СОКОЛОВ

Институт биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул., д.10; факс
(095) 245-08-57

Система Ca^{2+} -кальмодулин регулирует активность нейрональной и эндотелиальной изоформ синтазы окиси азота (NOS), в то время как активность индуцибельной изоформы не зависит от Ca^{2+} , поскольку кальмодулин (CaM)* прочно связан с субъединицей iNOS. Канонический CaM-связывающий сайт расположен между редуктазным и оксигеназным доменами NOS. Кальмодулин регулирует димеризацию eNOS, но не iNOS. Некоторые белки-мишени, обладающие так называемым "IQ" мотивом, связываются с CaM независимо от ионов Ca^{2+} , однако iNOS не относится к этой группе, поскольку обладает каноническим CaM-связывающим мотивом. Исследования с помощью синтетических пептидов показали, что взаимодействие CaM и CaM-связывающего домена NOS не зависит от ионов Ca^{2+} . Однако, как было установлено в опытах на химерных, мутантных и усеченных формах NOS, этого свойства явно недостаточно для Ca^{2+} -независимого связывания CaM; дополнительные сайты связывания CaM содержатся как в оксигеназном, так и в редуктазном домене iNOS. В экспериментах с использованием мутантных форм CaM уточнен механизм регуляции переноса электронов в молекуле NOS. Обсуждается гипотеза аутоингибирующей последовательности в FMN-связывающем домене конститутивных изоформ NOS.

Ключевые слова: синтаза окиси азота, изоформы синтазы окиси азота, кальмодулин, доменное строение синтазы окиси азота, регуляция активности синтазы окиси азота.

ВВЕДЕНИЕ. С начала 70-х годов основным объектом изучения молекул - передатчиков межклеточных сигналов являлись амины - норадреналин, гистамин, ацетилхолин. Открытие простагландинов обозначило новое направление исследований - липидные медиаторы. Однако с конца 80-х годов лидирующее положение занял совершенно новый класс соединений - низкомолекулярные биологические передатчики сигналов.

Окись азота является первым эндогенно синтезируемым растворенным газом, для которого была доказана физиологическая роль. Опубликовано многочисленное количество работ, касающихся молекулярно-биологических, биохимических,

* Список сокращений: NOS - синтаза окиси азота; nNOS - нейрональная изоформа; eNOS - эндотелиальная изоформа; iNOS - индуцибельная (макрофагальная) изоформа; CaM - кальмодулин; PPIX - протопорфирин IX; BH₄ - тетрагидробиоптерин; TnC - тропонин C.

физиологических и фармакологических аспектов функционирования этого медиатора. Показано, что окись азота синтезируется семейством из трех изоформ фермента синтазы окиси азота (Nitric Oxide Synthase - NOS; КФ 1.14.13.39.) [1]:

1. nNOS (также называемый тип 1), первоначально обнаруженный в нейрональных клетках центральной и периферической нервной системы;
2. iNOS (также известный как тип 2 или macNOS), который, в отличие от nNOS и eNOS, не экспрессируется постоянно (конститутивно); синтез этого фермента может быть индуцирован в клетках различных типов.
3. eNOS (также известный как тип 3), впервые идентифицированный в клетках эндотелия кровеносных сосудов.

NOS катализирует синтез NO из L-аргинина и молекулярного кислорода при участии NADPH, другим продуктом реакции является L-цитруллин (рис.1). Фермент представляет собой гомодимер, каждая из субъединиц которого состоит из

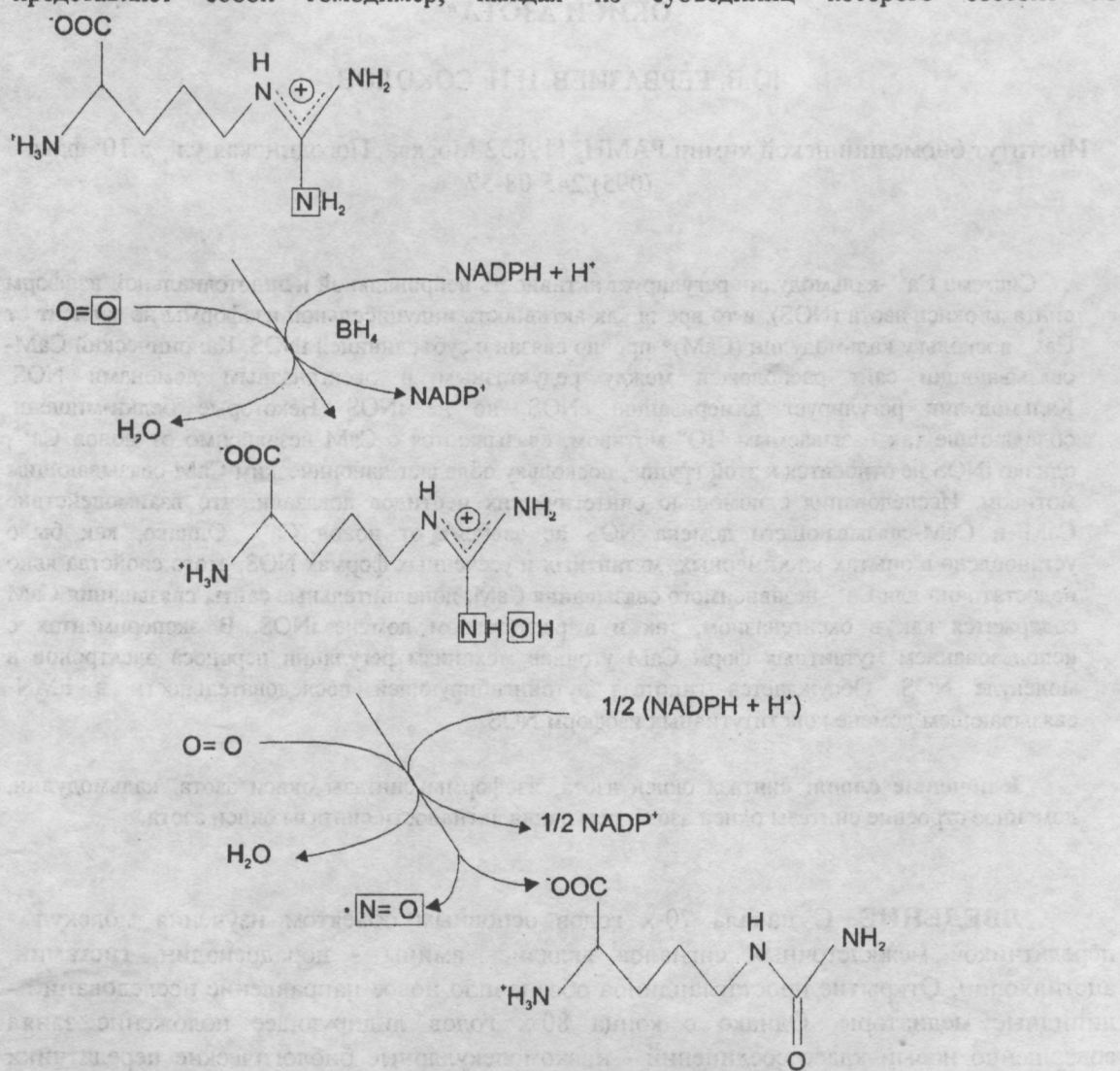


Рисунок 1.

Механизм NO-синтазной реакции (по Knowles и Moncada [33]) с изменениями). Окись азота образуется из L-аргинина и молекулярного кислорода при участии NADPH через промежуточную стадию N^ω-гидрокси-L-аргинина; другим продуктом реакции является L-цитруллин.

редуктазного домена, окисляющего NADPH, и оксигеназного домена, содержащего гем. Между ними различают еще короткий CaM-связывающий участок [2]. Особый интерес к

механизмам регуляции каждой из изоформ фермента обусловлен тем, что NO вызывает плейотропные физиологические эффекты. Повышенное образование NO связано с процессом разрушения нервных клеток, приводящим к болезни Альцгеймера [3], отторжению трансплантатов, артритам, септическому шоку и многим другим патологическим процессам [1]. Накопление избыточных количеств NO связано, как правило, с iNOS. Поэтому особенно актуальной является проблема селективного ингибирования каждой из изоформ фермента, и, в первую очередь, индуцибельной. В связи с этим значительные усилия исследователей и направлены на изучение механизмов регуляции активности изоформ NOS.

Настоящий обзор посвящен одному из интереснейших аспектов энзимологии синтазы окиси азота, касающегося активации этого фермента с помощью системы Ca^{2+} -CaM. Последний ответственен за перенос электронов между редуктазным и оксигеназным доменами NOS, что имеет принципиальное значение для регуляции активности изоформ eNOS и pNOS. К настоящему времени накоплен достаточно большой фактический материал, который необходимо осмыслить и обобщить. Особое внимание в данном обзоре будет уделено CaM-связывающему сайту iNOS, поскольку пока нет полной ясности о причине весьма необычного взаимодействия с CaM этой изоформы фермента.

1. Энзимология NOS. В организме NO опосредует большое количество функций в качестве межклеточного медиатора (например, активируя гуанилатциклазный цикл), а также индуктора образования цитотоксических частиц (например, пероксинитрита). Окисление аргинина под действием NOS происходит путем двух последовательных монооксигеназных реакций. Промежуточным продуктом является N-гидрокси-L-аргинин. На образование 1 моля NO расходуется 2 моля O_2 и 1,5 моля NADPH [4]. Таким образом, фермент должен дважды связать и активировать O_2 , используя электроны от NADPH. В этом процессе принимают участие пять кофакторов: FAD, FMN, протопорфирин IX (PPIX), тетрагидробиоптерин (BH_4) и CaM [2]. Несмотря на их широкое распространение в природе, NOS является, пожалуй, единственным ферментом, который одновременно использует все пять кофакторов [5].

В направлении от C- к N- концу молекулы NOS различают редуктазный домен, обладающий высокой гомологией с P450-редуктазой, и оксигеназный, во многом сходный с цитохромами семейства P450, но не имеющий структурной гомологии с последними. В пределах редуктазного домена имеется небольшой CaM-связывающий участок. Мы будем рассматривать его как самостоятельный домен. N-концевая последовательность фермента является специфичной для каждой изоформы. Основные каталитические различия изоформ NOS заключаются в том, что присутствие ионов Ca^{2+} необходимо для проявления активности eNOS и pNOS, в то время как CaM связан с iNOS настолько прочно, что добавление Ca^{2+} не является обязательным [6,7,8].

На рис. 2 представлена общая модель строения димерной молекулы NOS на примере ее индуцибельной изоформы. В двух субъединицах NOS взаимодействуют оксигеназные домены, формируя димер, редуктазные же домены не взаимодействуют друг с другом. Этим индуцибельная изоформа отличается от конститутивных, для которых показано взаимодействие редуктазных доменов. Такая модель строения фермента была подтверждена многочисленными исследованиями с помощью методов ограниченного протеолиза [8,9], экспрессии отдельных доменов фермента в клетках [10,11,12], исследованием взаимодействия кофакторов с синтетическими пептидами [6,13,14,15] и изучением свойств ферментов с точечными и делеционными мутациями [16].

Активация многих ферментов зависит или от их олигомеризации, или от связывания аллостерических эффекторных молекул типа CaM. Связывание Ca^{2+} синтазой окиси азота, киназой легкой цепи миозина а также эритроцитарной Ca^{2+} -АТФазой [6,14] сопровождается олигомеризацией. Помимо CaM на димеризацию NOS влияют и другие субстраты и кофакторы. Так, Ghost и Stuehr [8] показали, что в iNOS в формировании димера участвует N-концевой оксигеназный домен; образование димера зависит от BH_4

но не от CaM. Димеризация nNOS также происходит при участии оксигеназного домена, нуждается в наличии гема и стабилизируется BH_4 и аргинином [17]. Необходимость в CaM для димеризации nNOS пока не установлена. Что же касается eNOS, то для образования димера требуется CaM. Другие кофакторы не влияют на димеризацию, при этом необходимо участие лишь оксигеназного домена [18,19].

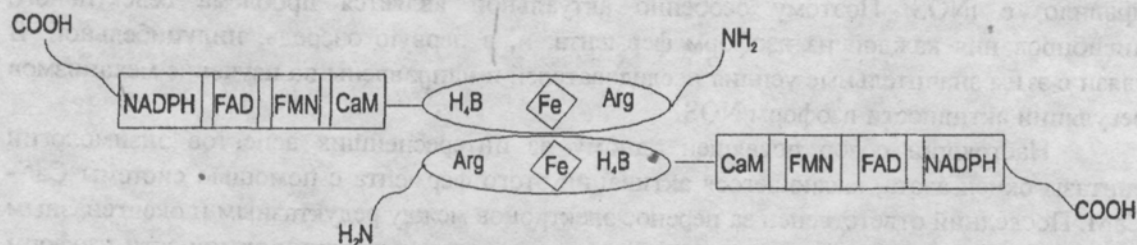


Рисунок 2

Модель доменной организации и четвертичной структуры iNOS (по Stuehr [5] с изменениями).

Каждую субъединицу димерной структуры молекулы фермента можно условно разделить на функционально независимые редуктазный домен (74 кДа) и оксигеназный домен (56 кДа). Редуктазный домен содержит сайты связывания NADPH, FAD, FMN и CaM (в данном обзоре CaM связывающий сайт рассматривается как самостоятельный домен). Оксигеназный домен содержит сайты связывания L-аргинина (ARG) и гема протопорфирина IX (Fe). Cys-194 является носителем проксимального тиолат лиганда для связывания гема.

Сравнение аминокислотных последовательностей показало, что холоферменты человека и быка eNOS идентичны на 95%, а холоферменты iNOS крысы и мыши имеют 96% гомологии. Между iNOS человека и мыши различия более значительны - гомология составляет лишь 81%. Предполагаемые CaM-связывающие домены iNOS человека и мыши имеют только 70% гомологии. Более того, было показано, что активность iNOS человека ингибируется на 30% в присутствии EGTA и EDTA. Последние не влияют на активность iNOS мыши [20]. Таким образом, можно утверждать, что изоформы NOS имеют много общих черт, но, тем не менее, они выполняют различные физиологические задачи, и, скорее всего, регулируются посредством различных механизмов.

2. Кальмодулин как активатор белков. Кальмодулин активирует более сорока различных белков, в том числе протеинкиназы, протеинфосфатазу B, NOS, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, белки ионных каналов и многие другие [21-23]. Молекула CaM, как в отсутствие, так и в присутствии четырех ионов Ca^{2+} , обладает гантелеобразной структурой с двумя долями, связанными центральным линкером из 26-ти аминокислотных остатков [24,26]. Каждая доля содержит два Ca^{2+} -связывающих участка типа "спираль-виток-спираль", соединенных короткой β -складкой. В отношении структуры центрального линкера имеются противоречивые сведения: рентгеноструктурный анализ показал, что линкер обладает α -спиральной структурой [24], в то время как данные ЯМР свидетельствуют о том, что центральный линкер в растворе вообще не имеет вторичной структуры [25,27]. Большинство гидрофобных остатков в апо-CaM спрятаны внутри белковой глобулы [25,26]. Связывание четырех ионов Ca^{2+} вызывает смещения α -спиралей в каждой доле, при этом угол между ними значительно изменяется. В результате, на поверхности молекулы CaM выступают два гидрофобных участка, богатых метионином, по одному на каждой доле. Эти районы и являются ответственными за связывание белка-мишени [24]. CaM-связывающие домены белков-мишеней обычно состоят из 20 аминокислотных остатков, которые имеют тенденцию образовывать основные амфипатические α -спирали [23,28]. Исследования комплексов Ca^{2+} -CaM-целевой белок с помощью методов высокого разрешения показали, что пептиды связываются с Ca^{2+} -CaM в α -спиральной конформации и взаимодействия между гидрофобными боковыми цепями пептида и Ca^{2+} -CaM играют главную роль в

связывании [29,30,31]. Предполагается, что гибкий центральный линкер и два гидрофобных участка, богатых остатками метионина обуславливают многообразие белков, с которыми может связываться CaM. Линкер может растягиваться, приспособливаясь к многообразным целевым белкам, при этом остатки метионина обеспечивают регулируемую гидрофобную поверхность для связывания различных белков, благодаря значительной гибкости остатков метионина и высокой поляризационной способности атомов серы [32].

Ионы Ca^{2+} обычно необходимы для связывания CaM с субстратом, но некоторые белки могут взаимодействовать с CaM и в отсутствии Ca^{2+} . Так, например, в случае γ -субъединицы киназы фосфоридазы CaM связывается с двумя неконтактирующими районами, охватывающими 70 аминокислотных остатков, при этом один образует α -спираль с канонической CaM-связывающей последовательностью, а другой формирует структуру β -шпильки. Они расположены на С-конце γ -субъединицы, приводя к тесной ассоциации CaM в качестве интегральной δ -субъединицы [33,34]. Анализ предполагаемой вторичной структуры CaM-связывающих районов iNOS и nNOS (остатки 475-575 и 696-796 соответственно) говорит о сходстве этих участков с подобной структурой в γ -субъединице киназы фосфоридазы для iNOS, но не для nNOS.

3. Регуляция CaM активности конститутивных изоформ NOS. Предполагаемые CaM-связывающие домены в молекуле NOS были определены благодаря каноническому содержанию в них основных и липофильных аминокислот. Они охватывают 20-25 аминокислотных остатков и происходят из двух экзонов в каждом из генов NOS млекопитающих. При этом в CaM связывающем домене eNOS есть делеция длиной в четыре аминокислотных остатка с N-конца, которая возможно, и объясняет более низкую аффинность этого фермента к CaM.

Предполагаемая модель регуляции CaM переноса электронов в молекуле NOS на примере ее индуцибельной изоформы представлена на рис.3. Регуляция кальмодулином eNOS имеет свои отличительные особенности.

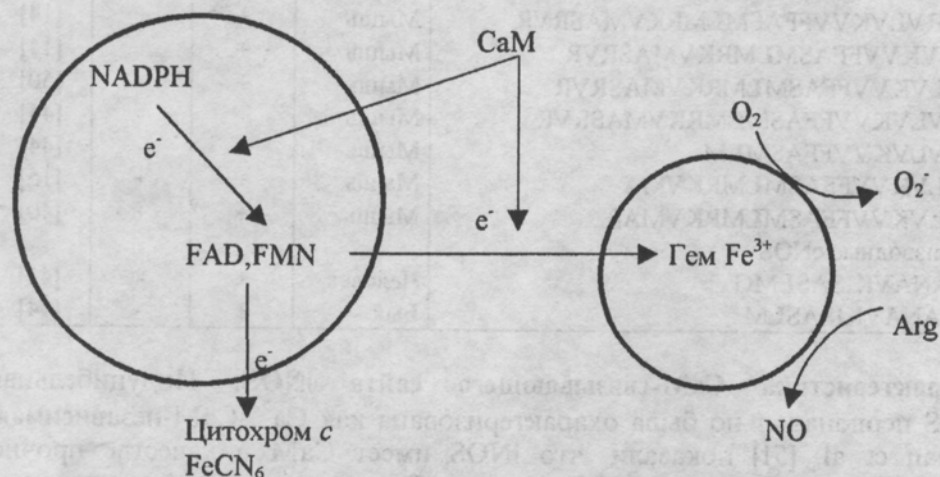


Рисунок 3.

Регуляция кальмодулином потока электронов в nNOS (по Abu-Soud et.al [7] с изменениями). Редуктазный и оксигеназный домены изображены в виде двух окружностей. Связывание CaM активирует перенос электронов в двух точках: оно увеличивает скорость переноса электронов от NADPH к флавионам (1) и дает возможность переноса электронов от флавионов на оксигеназный домен NOS (2). Активация в первой точке увеличивает специфические каталитические активности редуктазного домена, такие как перенос электронов на цитохром с или феррицианид. Активирование во второй точке восстанавливает гемовое железо NOS, инициируя синтез NO из L-аргинина или образование супероксида в отсутствии субстрата [7]. Более поздние исследования Н. Marletta et al. [39] показали, что связывание CaM оказывает влияние также и на оксигеназный домен.

1.	KRRW	KKNF	IAV	SAANRF	KKISSSGAL
2.	RRKW	QKTG	HAV	RAIGRL	SSS
3.	QILW	FRGL	NRI	QTQIRV	VNAFRSS
4.	ARKEV	IRNK	IRAI	GKMARV	SFVL
5.	NRVPIGF	YQKV	VWKV	LQKCHGL	
6.	KRRAIGF	KKLA	EAV	KFSAKL	MGQAMAKRVK
7.	RREIRF	RVLV	KVV	FFASML	MRKVMASRVR

Рисунок 4.

Выравнивание последовательностей CaM-связывающих сайтов некоторых белков. Выделены высококонсервативные гидрофобные остатки, которые играют важную роль во взаимодействии с кальмодулином (по Anagli et al. [14] с изменениями). 1. Киназа легкой цепи миозина скелетных мышц; 2. Киназа легкой цепи миозина гладких мышц; 3. Ca²⁺-АТФаза плазматической мембраны; 4. Кальцийнейрин; 5. α -субъединица киназы фосфорилазы; 6. nNOS; 7. iNOS.

В эндотелиальных клетках, а также в вентрикулярных миоцитах активность этой изоформы NOS ингибируется кавеололином, связанным с кавеолами клеточной поверхности. При этом CaM является антагонистом кавеолина [35,36]. Повышение концентрации Ca²⁺ вызывает связывание CaM с eNOS и диссоциацию кавеолина.

Таблица 1. Сравнение аминокислотных последовательностей синтетических пептидов, производных iNOS и eNOS (по Matsubara et al. [41] с изменениями).

Аминокислотные последовательности	Вид	Связывание с CaM		Ссылка
		+ Ca ²⁺	- Ca ²⁺	
А. Пептиды-производные iNOS				
KRREIPLKVLVKAVLFACMLMRK	Человек	+	-	[41]
KLRPRRREIRFRVLVKVVFFASMLMRKVMASRVR	Мышь	+	+	[14]
RREIRFRVLVKVVFFASMLMRKVMASRVR	Мышь	+	+	[14]
RRREIRFRVLVKVVFFASMLMRKVMASRVR	Мышь	+	-	[50]
RPRRREIRFRVLVKVVFFASMLMRKVMASRVR	Мышь	+	-	[44]
RPRRREIRFRVLVKVVFFASMLM	Мышь	+	-	[44]
RRREIRFRVLVKVVFFASMLMRKVMA	Мышь	+	+	[15]
RRREIRFRVLVKVVFFASMLMRKVMAS	Мышь	+	+	[40]
Б. Пептиды-производные eNOS				
RKKTFKVANAVKISASLMG	Человек	+	-	[41]
TRKKTFKVANAVKISASLM	Бык	+	-	[44]

4. Характеристика CaM-связывающего сайта iNOS. Индуцибельная изоформа NOS первоначально была охарактеризована как Ca²⁺-CaM-независимая. Позднее Nathan et al. [51] показали, что iNOS имеет CaM в качестве прочно связанной субъединицы, причем, iNOS крысы обладает чрезвычайно высоким сродством к CaM даже в присутствии хелаторов Ca²⁺. Несмотря на то, что человеческая iNOS имеет несколько более выраженную Ca²⁺-зависимость [37], в общем смысле она может условно считаться Ca²⁺-независимой.

CaM способен связывать белки двумя способами: посредством так называемого "IQ" мотива (IQXXRGXXR) он взаимодействует Ca²⁺-независимым образом; связывание же с помощью канонического CaM-связывающего района зависит от ионов Ca²⁺. Однако, молекула iNOS не имеет типичного IQ мотива. Более того, все предполагаемые CaM-связывающие участки изоформ eNOS, nNOS и iNOS попадают под определение канонического CaM-связывающего района, основной

амфипатической α -спиральной последовательности, содержащей 20 основных и гидрофобных аминокислотных остатков [38].

Для изучения общего механизма действия системы Ca^{2+} -CaM был проведен целый ряд исследований.

Исследования с помощью синтетических пептидов

Marletta и Stevens-Truss [39] синтезировали 30-членный пептид, соответствующий остаткам 503-532 молекулы iNOS. Было обнаружено, что он образует с CaM не только комплекс 1:1, но и комплексы более высоких молекулярных весов. В 12-кратном избытке этот пептид ингибировал на 90% ферментативную активность iNOS. При добавлении экзогенного CaM функция фермента восстанавливалась. С другой стороны, добавление EDTA вызывало 30%-ное ингибирование активности фермента, которая нормализовалась при добавлении ионов Ca^{2+} . Эти результаты показывают, что взаимодействие iNOS-CaM в некоторой степени является обратимым и зависит от Ca^{2+} .

Yuan et al. [40] с использованием КД-спектроскопии обнаружили, что свободный пептид, соответствующий CaM-связывающему домену мышинной iNOS, в водном растворе имеет β -складчатую конформацию. Взаимодействие с апо-CaM в отсутствие Ca^{2+} приводило к тому, что пептид приобретал структуру β -поворота типа II. В присутствии же ионов Ca^{2+} при взаимодействии с CaM пептид обладал α -спиральной конформацией, аналогичной той, что имеют соответствующие участки белков, регулируемых Ca^{2+} -CaM. Исследуемый синтетический пептид был способен ингибировать взаимодействие с CaM одного из таких белков - киназы легкой цепи миозина гладких мышц.

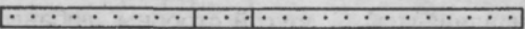
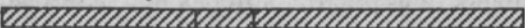

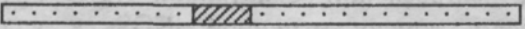
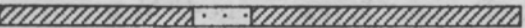
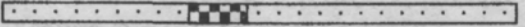
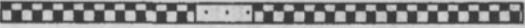
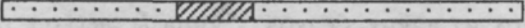

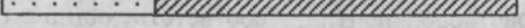
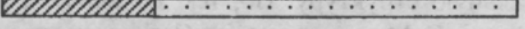
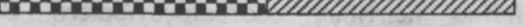
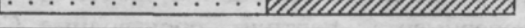
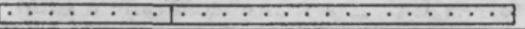

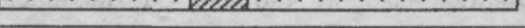
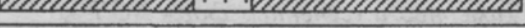
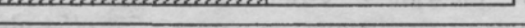
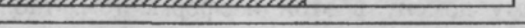
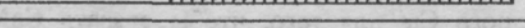
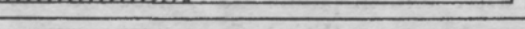
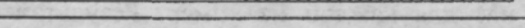
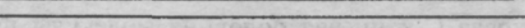
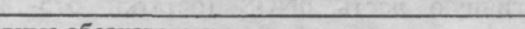
Приведенные выше результаты не совпадают с данными группы Matsubara et al. [41], установившими, что в водном растворе пептид, соответствующий CaM-связывающему участку iNOS, имеет α -спиральную структуру. Но, тем не менее, в этой работе было показано, что пептид связывается с CaM в отсутствие Ca^{2+} , в отличие от пептида, производного pNOS. Это свойство пептида, соответствующего CaM-связывающему участку iNOS, нашло подтверждение и в более ранних работах [14,42]. Как видно из таблицы 1, в некоторых экспериментах пептиды, производные CaM-связывающего домена iNOS, требуют присутствия Ca^{2+} для взаимодействия с CaM. Но, поскольку существуют пептиды, связывающиеся с CaM -независимым от Ca^{2+} образом, можно утверждать, что взаимодействие связывающего домена iNOS и CaM не зависит от присутствия ионов Ca^{2+} . Однако, этого свойства недостаточно для Ca^{2+} -независимой активации фермента, о чем свидетельствуют рассматриваемые ниже эксперименты.

Исследования взаимодействия с CaM химерных и усеченных форм NOS

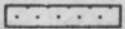
Ruan et al. [43] сконструировали химерные белки, в которых 503-532 аминокислотные остатки iNOS мыши реципрокно заменялись на остатки 725-754 pNOS, крысы, соответствующие CaM-связывающему домену в этой изоформе (см. табл. 2, строки 4-5). В отличие от исходных форм, для активности обоих химерных белков требовалось усредненное количество свободного Ca^{2+} для того, чтобы связать CaM и инициировать синтез NO. В клеточных лизатах концентрация Ca^{2+} , необходимая для достижения 50% от максимальной активности фермента (EC_{50}), была бесконечно мала для iNOS, 200-300 нМ для pNOS и 7-10 нМ для каждой из химер. Результат был аналогичным, когда участок замены увеличивался на 7-8 остатков в направлении от N-конца (см. табл. 2, строки 8-9). Напротив, когда С-концевая половина молекулы iNOS (остатки 454-1144) заменялась на аналогичную часть pNOS (остатки 675-1429), получившийся в результате химерный белок напоминал pNOS (EC_{50} свободного Ca^{2+} составляла 200-300 нМ) (см. табл. 2, строка 10). Эта же группа исследователей изучала взаимодействие с CaM "усеченных" форм iNOS. Белки, deletированные с С-конца, образовывали димеры, устойчивые к воздействию додецилсульфата натрия, что подтверждает предположение о том, что С-концевая половина молекулы iNOS не

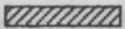
является необходимой для димеризации. В экспериментах по связыванию этих "усеченных" белков с CaM удаление С-концевых остатков, вплоть до 726-ого, также как и N-концевых до 483-его, не влияло на эффективность связывания.

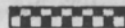
Таблица 2. Сравнение свойств нативных, химерных и мутантных белков - производных от nNOS крысы, eNOS быка и iNOS мыши. Длина аминокислотных последовательностей варьирует.

№	Конструкции химерных белков	Точки замен	Зависимость от Ca ²⁺	Зависимость от свобод- ного CaM	Ссыл- ки
1			-	-	[1,2]
2			+	+	[1,2]
3			+	+	[1,2]
4		и 503-532 ↕ и 725-754	+/-	Н	[43]
5			+/-	Н	[43]
6		и 503-532 ↕ и 493-512	+	+	[44]
7			+	-	[44]
8		и 496-532 ↕ и 717-754	+/-	Н	[43]
9			+/-	Н	[43]
10		и 454 ↕ и 675	+/-	Н	[43]
11			не функциональна		[43]
12		и 527↔и760	+	+	[46]
13		и 538↔и760	-	-	[46]
14		L 475 → V	-	Н	[45]
15		L 696 → V	+	Н	[45]
16		и 725 - 755 ↕ и 503 - 533	+	Н	[45]
17			+	Н	[45]
18		n798→i576	+	Н	[45]
19		n→ i749	+	Н	[45]
20		n696→i475	+	Н	[45]
21		n726→i504	-	Н	[45]
22		n755→i533	-	Н	[45]
23		n797→i575	-	Н	[45]
24		n725→i503	-	Н	[45]

Условные обозначения:

 Индуцибельная NOS

 Нейрональная NOS

 Эндотелиальная NOS

↕ реципрокные замены

☆ точечные мутации

Н - эксперименты не проводились

Из этих экспериментов следует, что в Ca^{2+} -независимом связывании CaM принимает участие не только канонический CaM-связывающий сайт, но и дополнительный участок в области 484-626 остатков. Сходные результаты были получены и Venema et al. [44], которые исследовали химерные белки, реципрочно заменяя CaM-связывающие домены iNOS и eNOS. Белок, полученный путем замены аминокислотных остатков в положении 501-532 в молекуле iNOS остатками 493-512 из молекулы eNOS оказался Ca^{2+} - и CaM-зависимым. Подобная же замена в молекуле eNOS приводила к получению функционального белка, который был независим от CaM, но сохранял зависимость от Ca^{2+} (см. табл. 2, строки 7-8).

Аналогичные данные были получены и в последней работе. Newton et al. [20], которые изучали свойства усеченных NOS, состоящих из редуктазных и CaM-связывающих доменов. Конструкции, производные от iNOS человека (остатки 480-1153) и мыши (остатки 474-1144) обладали Ca^{2+} -связывающими свойствами, аналогичными таковым у холофермента. Для редуктазных же доменов pNOS крысы было характерно Ca^{2+} -зависимое связывание CaM и активация. Эта работа доказывает, что связывание CaM не регулирует поток электронов внутри редуктазного домена iNOS, как это было показано для нейрональной изоформы фермента.

Lee и Stull [45] исследовали взаимодействие с CaM химерных белков, производных от нейрональной и индуцибельной изоформ NOS (см. табл. 2, строки 14-24). Гибридные конструкции, содержащие только оксигеназный домен, CaM-связывающий район или редуктазный домен iNOS (остальное от pNOS), не обладали выраженной Ca^{2+} -независимой активностью. Каждая гибридная конструкция была более чувствительна к Ca^{2+} , чем нейрональная изоформа. Если же в химерном белке присутствовал редуктазный или оксигеназный домен iNOS в совокупности со своим CaM-связывающим районом, то он обладал существенной, но не абсолютной Ca^{2+} -независимой активностью. Авторы делают вывод, что независимое от Ca^{2+} связывание обусловлено взаимодействием CaM как с оксигеназным, так и с редуктажным доменом iNOS. Такие выводы подтверждаются и экспериментами по ко-иммунопреципитации химерных белков с CaM и ингибированием их активности трифторпиразином в отсутствие Ca^{2+} .

Те же самые выводы следуют и из работы Nishida и Ortiz de Montellano [46], сконструировавших химерные белки, в которых редуктазные домены eNOS и iNOS были заменены на редуктазный домен pNOS (см. табл. 2, строки 12-13). Показано, что для Ca^{2+} -независимой активности iNOS требуется взаимодействие CaM как с CaM-связывающим сайтом, так и с флавопротеиновым доменом.

На основании результатов экспериментов с химерными и усеченными белками можно утверждать, что CaM связывается не только с каноническим, но и с другими сайтами в молекуле iNOS, расположенными как в оксигеназном, так и в редуктажном домене фермента, причем это связывание необходимо для его активации NOS.

Исследования взаимодействия с NOS химерных кальмодулинов

Perchenini et al. [47] проводили исследования взаимодействия pNOS крысы с рекомбинантными молекулами CaM, полученными путем взаимной замены четырех Ca^{2+} -связывающих участков (EF hands). Было установлено, что степень связывания pNOS с C-концевой долей CaM в несколько тысяч раз выше, чем с N-концевой, однако для активации фермента необходимо связывание обеих долей CaM.

В работе Stuehr et al. [48] исследовалось взаимодействие pNOS крысы и гибридов CaM с тропонином C - сигнальным белком сердечно-сосудистой системы. CaM и TnC были на 50% идентичны по первичной структуре, оба содержали по четыре Ca^{2+} -связывающих домена (EF hands), попарно расположенных на глобулярных долях, разделенных длинным центральным районом. В отличие от CaM, тропонин C не связывает и не активирует pNOS, вследствие чего химерные белки CaM-TnC являются весьма информативными зондами для исследования взаимодействий NOS-CaM. В этой

работе изучалась способность химерных белков активировать функции nNOS по синтезу NO, окислению NADPH и восстановлению цитохрома c. Все семь изученных химерных белков в разной степени индуцировали восстановление цитохрома c как нативным ферментом, так и редуктазным доменом NOS, но не все активировали синтез NO. Степень активации синтеза NO каждой гибридной конструкцией примерно соответствовала степени восстановления гемового железа, которая изменялась от 0 до 80% по сравнению с нативным CaM. Восстановление же цитохрома c не всегда сопровождалось восстановлением гемового железа и флавинов. На этом основании авторы делают следующие выводы:

- влияние CaM в двух точках на транспорт электронов в молекуле nNOS может быть функционально разделено;

- CaM управляет синтезом NO путем регуляции восстановления гемового железа, а редуктазная активность повышается в результате функционирования двух механизмов, только один из которых связан с восстановлением флавинов.

5. Гипотеза аутоингибирующего домена в составе конститутивных NOS

Salerno et al. [49] высказали предположение о механизме регуляции CaM активности конститутивных NOS. С помощью компьютерных методов было предсказано, что в FMN-связывающем районе этих ферментов существует полипептидная вставка, которая уникальна для конститутивных NOS и пространственно расположена рядом с CaM-связывающим доменом. С помощью синтетических пептидов, соответствующих этой вставке, было установлено, что она препятствует связыванию CaM, и, следовательно, активации конститутивных NOS. Авторы предполагают, что ингибирование осуществляется путем связывания этой вставки с какими-то ключевыми элементами молекулы NOS. Связывание CaM смещает вставку, активируя таким образом фермент с помощью "дезингибирования". Такой механизм регуляции предполагает замещение вставки CaM в процессе его связывания с конститутивными NOS, аффинность к CaM при этом будет более низкой. И наоборот, отсутствие этой вставки в молекуле iNOS обеспечивает беспрепятственное связывание CaM с синтазой, и, следовательно, гораздо более тесное их взаимодействие, что и наблюдается в эксперименте. Такая концепция противоречит гипотезе дополнительных сайтов связывания в молекуле iNOS.

Интересно отметить, что во вставке nNOS отсутствует мотив RRKRK, который необходим для аутоингибирования eNOS. Хотя авторы и не отмечают это в выводах, по результатам экспериментальных данных очевидно, что пептиды, соответствующие аутоингибиторному району nNOS, подавляют реакцию гораздо слабее, чем соответствующие пептиды eNOS. Возможно предположить, что механизм регуляции CaM этих изоформ значительно отличается. Из приведенных результатов следуют очевидные вопросы: где на поверхности молекулы расположены сайты взаимодействия с ингибиторным пептидом и каким образом этот пептид тормозит перенос электронов? К сожалению, исследования в этом направлении не получили пока дальнейшего развития.

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день имеется следующая информация относительно вопроса регуляции синтазы окиси азота системой Ca^{2+} -CaM:

1. CaM регулирует активность нейрональной и эндотелиальной форм NOS; в индуцибельной NOS он присутствует в качестве тесно связанной субъединицы. Активность iNOS не зависит от концентрации ионов Ca^{2+} .

2. CaM регулирует перенос электронов в NOS в двух точках: на флавины и далее к гемовой части фермента, причем это влияние может быть функционально разделено.

3. В регуляции эндотелиальной изоформы фермента участвует белок кавеолин, который является антагонистом CaM.

4. Все предполагаемые CaM-связывающие участки eNOS, nNOS и iNOS попадают под определение канонического CaM-связывающего района. Регуляция белков, имеющих в своем составе эти районы, зависит от концентрации ионов Ca^{2+} .

5. Пептиды, соответствующие CaM-связывающему участку iNOS, взаимодействуют с CaM независимо от концентрации Ca^{2+} или присутствия хелаторов (EDTA или EGTA), приобретая при этом α -спиральную конформацию.

6. Эксперименты с химерными и усеченными белками показывают, что одного канонического CaM-связывающего района недостаточно для Ca^{2+} -независимой активности фермента. Доказано существование дополнительных CaM-связывающих сайтов как в оксигеназном, так и в редуктазном домене iNOS¹.

7. Степень связывания pNOS с C-концевой долей CaM в несколько тысяч раз выше, чем с N-концевой, однако для активации фермента необходимо связывание обеих долей CaM.

8. Предполагается существование аутоингибирующей последовательности в FMN-связывающем домене конститутивных NOS, при этом связывание CaM приводит к снятию ингибирования фермента.

Наибольший интерес вызывают следующие вопросы:

1. В каких районах находятся дополнительные сайты связывания CaM в iNOS и каким образом они способствуют переносу электронов?

2. Какие участки молекулы CaM задействованы во взаимодействии с каноническим, а какие с неканоническими CaM-связывающими сайтами iNOS? Как это коррелирует с конститутивными изоформами NOS и с другими ферментами, регулируемые CaM?

3. Верна ли гипотеза аутоингибирующей последовательности в конститутивных NOS, и если да, то каким образом происходит процесс аутоингибирования?

Таким образом, большинство из имеющихся на сегодняшний день неясных вопросов связано с поиском локальных участков внутри- и межмолекулярных взаимодействий. Возможно, сейчас имеет смысл привлечь к их решению комбинаторные методы исследования - фазовый дисплей или двухгибридную систему дрожжей. Вопрос регуляции активности iNOS системой Ca^{2+} -CaM представляет собой очень интересную задачу, как в общетеоретическом, так и в практическом плане (поиск селективных ингибиторов индуцибельной изоформы). В ближайшие несколько лет должны решиться многие из поставленных вопросов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Knowles R.G. (1996). *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 875-878.
2. Горпен А.С., Майер Б. (1998). *Биохимия*, **63**, 734-743.
3. Башкатова В.Г., Раевский К.С. (1998). *Биохимия*, **63**, 866-873.
4. Stuehr D.J., Griffiths O.W. (1992). *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, **65**, 287-346.
5. Stuehr D.J. (1997). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **37**, 339-359.
6. Persechini A., White H.D., Gansz K.J. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 62-67.
7. Abu-Soud H.M., Yoho L.L., Stuehr D.J. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 32047-32050.
8. Ghosh D.K., Stuehr D.J. (1995). *Biochemistry*, **34**, 801-807.
9. Sheta E.A., McMillan K., Masters B.S. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 15147-15153.
10. McMillan K., Masters B.S. (1995). *Biochemistry*, **34**, 3686-3693.
11. Chen P.F., Tsai A.L., Berka V., Wu K.K. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 14631-14635.

12. Gachhui R., Presta A., Bentley D.F., Abu-Soud H.M., McArthur R., Brudvig G., Ghosh D.K., Stuehr D.J. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 20594-20602.
13. Vorherr T., Knopfel L., Hofmann F., Mollner S., Pfeuffer T., Carafoli E. (1993). *Biochemistry*, **32**, 6081-6088.
14. Anagli J., Hofmann F., Quadroni M., Vorherr T., Carafoli E. (1995). *Eur. J. Biochem.*, **233**, 701-708.
15. Zoche M., Bienert M., Beyermann M., Koch K.W. (1996). *Biochemistry*, **35**, 8742-8747.
16. Xie Q.W., Cho H., Kashiwabara Y., Baum M., Weidner J.R., Elliston K., Mumford R., Nathan C. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 28500-28505.
17. Klatt P., Schmidt K., Lehner D., Glatter O., Bachinger H.P., Mayer B. (1995). *EMBO J.*, **14**, 3687-3695.
18. Lee C.M., Robinson L.J., Michel T. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 27403-27406.
19. Rodriguez-Crespo I., Gerber N.C., Ortiz de Montellano P.R. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 11462-11467.
20. Newton D.C., Montgomery H.J., Guy Guillemette J. (1998). *Arch. Biochem. Biophys.*, **359**, 249-257.
21. Vogel H.J. (1994). *Biochem. Cell. Biol.*, **72**, 357-376.
22. Vogel H.J. Zhang M. (1995). *Mol. Cell. Biochem.*, **149-150**, 3-15.
23. Crivici A., Ikura M. (1995). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 85-116.
24. Babu Y.S., Bugg C.E., Cook W.J. (1988). *J. Mol. Biol.*, **204**, 191-204.
25. Kuboniwa H., Tjandra N., Grzesiek S., Ren H., Klee C.B., Bax A. (1995). *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 768-776.
26. Zhang M., Tanaka T., Ikura M. (1995). *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 758-767.
27. Barbato G., Ikura M., Kay L.E., Pastor R.W., Bax A. (1992). *Biochemistry*, **31**, 5269-5278.
28. O'Neil K.T., DeGrado W.F. (1990). *Trends. Biochem. Sci.*, **15**, 59-64.
29. Ikura M., Clore G.M., Gronenborn A.M., Zhu G., Klee C.B., Bax A. (1992). *Science.*, **256**, 632-638.
30. Meador W.E., Means A.R., Quijcho F.A. (1993). *Science.*, **262**, 1718-1721.
31. Meador W.E., Means A.R., Quijcho F.A. (1992). *Science.*, **257**, 1251-1255.
32. Gellman S.H. (1991). *Biochemistry*, **30**, 6633-6636.
33. Dasgupta M., Honeycutt T., Blumenthal D.K. (1989). *J. Biol. Chem.*, **264**, 17156-17163.
34. Juminaga D., Albaugh S.A., Steiner R.F. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 1660-1667.
35. Michel J.B., Feron O., Sase K., Prabhakar P., Michel T. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 25907-25912.
36. Michel J.B., Feron O., Sacks D., Michel T. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 15583-15586.
37. Geller D.A., Lowenstein C.J., Shapiro R.A., Nussler A.K., Di Silvio M., Wang S.C., Nakayama D.K., Simmons R.L., Snyder S.H., Billiar T.R. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3491-3495.
38. Vorherr T., James P., Krebs J., Enyedi A., McCormick D.J., Penniston J.T., Carafoli E. (1990). *Biochemistry*, **29**, 355-365.
39. Stevens-Truss R., Beckingham K., Marletta M.A. (1997). *Biochemistry*, **36**, 12337-12345.
40. Yuan T., Vogel H.J., Sutherland C., Walsh M.P. (1998). *FEBS. Lett.*, **431**, 210-214.
41. Matsubara M., Hayashi N., Titani K., Taniguchi H. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 23050-23056.
42. Zhang M., Yuan T., Aramini J.M., Vogel H.J. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 20901-20907.
43. Ruan J., Xie Qw, Hutchinson N., Cho H., Wolfe G.C., Nathan C. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 22679-22686.

44. Venema R.C., Sayegh H.S., Kent J.D., Harrison D.G. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 6435-6440.
45. Lee S.J., Stull J.T. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 27430-27437.
46. Nishida C.R., Ortiz de Montellano P.R. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 5566-5571.
47. Persechini A., Stemmer P.M., Ohashi I. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**, 32217-32225.
48. Gachhui R., Abu-Soud H.M., Ghosha D.K., Presta A., Blazing M.A., Mayer B., George S.E., Stuehr D.J. (1998). *J. Biol. Chem.*, **273**, 5451-5454.
49. Salerno J.C., Harris D.E., Irizarry K., Patel B., Morales A.J., Smith S.M., Martasek P., Roman L.J., Masters B.S., Jones C.L., Weissman B.A., Lane P., Liu Q., Gross S.S. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 29769-29777.
50. Steven-Truss R., Marletta M.A. (1995) *Biochemistry*, **34**, 15638-15645.
51. Cho H.J., Xie Q.W., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Nathan C. (1992). *J. Exp. Med.*, **176**, 599-604.

Поступила 30.03.99

MECHANISMS REGULATION ACTIVITY OF NITRIC OXIDE SYNTHASE BY CALMODULIN: A REVIEW

Yu.V.GERVAZIEV, N.N.SOKOLOV

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya str. 10, 119832 Moscow,
fax: (095) 245-0857

The Ca^{2+} -calmodulin system controls the neuronal and endothelial isoforms of NOS, whereas the inducible isoform is calcium independent apparently because CaM is a tightly bound subunit of iNOS. The canonical CaM-binding site is located between the oxygenase and reductase NOS domains. CaM controls eNOS dimerization rather than iNOS one. The proteins with the so-called "IQ" motif bind calmodulin in a Ca^{2+} -independent manner. This group of proteins does not include iNOS, which has the canonical CaM-binding motif. In the experiments with synthetic peptides was demonstrated that the interaction between the calmodulin and CaM-binding site of iNOS does not depend on the Ca^{2+} concentration. On the other hand, in the experiments with fusion, mutant and truncated NOSs was shown that these features of CaM-binding region of iNOS is not enough for the enzyme to bind calmodulin Ca^{2+} -independently; this interaction requires the additional binding sites both in reductase and oxygenase domains of iNOS. In the experiments with fusion calmodulins the mechanism of calmodulin regulation of electron transfer in NOS was elaborated. The concept of autoinhibitory control element in the FMN-binding site of constitutive NOS is discussed.

Key words: nitric oxide synthase, isoforms of nitric oxide synthase, calmodulin, domain structure of nitric oxide synthase, regulation activity of nitric oxide synthase.