

АКТИВАЦИЯ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ СОЕДИНЕНИЯМИ, ПРОДУЦИРУЮЩИМИ ОКСИД АЗОТА*

Аннотация: На основе обзора результатов теоретических исследований рассматриваются проблемы, связанные с активацией гуанилатциклазы нитро- и нитрозосодержащими соединениями, продуцирующими оксид азота (NO). Показано, что к числу факторов, играющих ключевую роль в активации гуанилатциклазы, относятся: 1) структура соединений, продуцирующих NO; 2) электронное и пространственное строение комплексов гем-NO; 3) конформационная подвижность боковых цепей аминокислотных остатков, образующих лиганд-связывающий участок внеклеточного домена гуанилатциклазы.

Ключевые слова: оксид азота; гуанилатциклаза; электронная и пространственная структура; 2.03 комплексы.

Нитро- и нитрозосодержащие соединения с ярко выраженными мутагенными и канцерогенными свойствами являются объектами многочисленных экспериментальных и теоретических исследований благодаря их способности продуцировать в биологических системах оксид азота. Оксид азота (NO)-уникальное соединение, которое вырабатывается различными типами клеток организма и контролирует разнообразные метаболические реакции, обеспечивающие жизнеспособность и функциональную активность клеток и всего организма в целом [1-3]. NO обладает свободнорадикальными свойствами и благодаря малым размерам и отсутствию заряда легко преодолевает клеточные мембраны органов и тканей организма. В условиях организма NO может связываться в относительно стабильные соединения и депонироваться в клетках или транспортироваться на расстояния, во много раз превышающие размеры клетки. Однако при определенных условиях, в зависимости от концентрации, времени воздействия и условий обмена в различных типах клеток, оксид азота способствует возникновению ряда серьезных заболеваний. Накопление NO в организме приводит к развитию многочисленных патологий, таких, как нарушение тонуса и повреждение сосудов, диабет, воспалительные заболевания и др. Для снижения содержания NO в организме используются препараты, ингибирующие индукцию и активность NO-синтазы, а также эндогенные «ловушки» NO. Но эти препараты зачастую токсичны, вызывают побочные эффекты или не приводят к ожидаемым результатам. NO обратимо связывается с гемовым железом гуанилатциклазы, циклооксигеназы, каталазы, липоксигеназы, NO-синтазы, цитохрома P-450 и пероксидазы, цитохромов электрон-транспортной цепи митохондрий, а также с гемовым железом оксигемоглобина. В этом ряду ферментов исключительно важная роль принадлежит гуанилатциклазе. Гуанилатциклаза (ГЦ, КФ 4.6.1.2) принадлежит семейству ферментов, катализирующих превращение гуанизинтрифосфата (ГТФ) в циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) [4,5]. Стимуляция гуанилатциклазы и аккумуляция цГМФ регулирует целый комплекс сигнальных превращений с участием промежуточных сопутствующих эффекторов—цГМФ-зависимой протеинкиназы, цГМФ-регулирующих фосфодиэстераз и ионных каналов. Гуанилатциклазы играют ключевую роль в регуляции разнообразных патофизиологических процессов; они участвуют в синтезе цГМФ в ответ на различные сигналы, такие, как оксид азота, пептидные гормоны, бактериальные токсины, свободные радикалы и потоки внутриклеточных ионов кальция. Согласно современным представ-

* © Курбанов И.С.

лениям, активация гуанилатциклазы оксидом азота обусловлена взаимодействием NO с железом гема, входящего в молекулу фермента [6,7]. Поэтому проблемы, связанные с переносом оксида азота и активацией ГЦ нитро- и нитрозосодержащими соединениями, относятся к наиболее актуальным в молекулярной биологии, биофизике и медицине. К числу соединений-источников NO в биосистемах относятся и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ, общая формула $(RS^-)_2Fe^{2+}(NO^+)_2$) [15-19], лекарственные препараты, такие, как нитропруссид, нитроглицерин и др. Впервые ДНКЖ были обнаружены методом ЭПР в тканях животных, а впоследствии – в различных клеточных культурах, продуцирующих количество NO под действием бактериальных липополисахаридов и γ -интерферона. ДНКЖ является парамагнитным и в замороженном состоянии на спектре ЭПР дает сигнал с характерной триплетной структурой ($g_{cp}=2,03$), величина которого прямо зависит от уровня NO в тканях. В связи со средним значением g-фактора сигнала ЭПР, которым характеризуются ДНКЖ, они получили название комплексов 2,03 [8,9]. Комплексы 2,03 обнаружены также и в высших растениях – табаке, листьях чайной розы, бобах, плодах унаби и маслин. По современным представлениям, эти комплексы, в состав которых входят два нитрозильных лиганда, рассматриваются в качестве соединений, способных эффективно аккумулировать оксид азота и доводить его до мишени действия, в качестве которой может выступать и ГЦ. Несмотря на большое количество экспериментальных исследований, механизм активации ГЦ NO-содержащими соединениями в настоящее время неизвестен. Не установлена поэтому и причинная связь между структурой таких соединений и их способностью влиять на увеличение количества тканевого цГМФ. В настоящем исследовании предпринята попытка изучения взаимосвязи между структурой и функциональными особенностями комплексов 2,03, связанными с активацией ГЦ на основе обзора теоретических исследований. В основе таких исследований лежит гипотеза о том, что оксид азота активирует гемопротейны путем образования нитрозильных комплексов с гемовым компонентом белков. Однако известно также, что гемопротейны сами не проникают через клеточные мембраны, а распадаются на ее наружной поверхности на гем и лишь после этого гем захватывается эпителиальной клеткой. Таким образом, рассматриваемая проблема, решение которой необходимо для установления взаимосвязи между структурой NO-содержащих соединений и активацией гуанилатциклазы, разбивается на решение следующих взаимосвязанных задач:

1. установление электронной и пространственной структуры комплексов 2,03 как источников оксида азота в биологических системах;
2. изучение электронных и конформационных аспектов образования комплексов гем-NO;
3. изучение конформационной подвижности боковых цепей аминокислотных остатков, входящих в активный центр ГЦ и участвующих в координации комплексов гем-NO.

Остановимся подробно на результатах проведенных исследований. Изучение структуры комплексов 2,03 методами молекулярной механики и полуэмпирическими методами квантовой химии показало, что пространственное строение комплексов характеризуется искаженной октаэдрической структурой, в которой могут присутствовать и две молекулы воды, не обнаруженные методом ЭПР. Другой ключевой результат этих исследований заключается в неэквивалентном распределении электронной плотности на NO-группах комплекса, обусловленном искажением их октаэдрической структуры. На одной из групп NO локализован суммарный отрицательный заряд, позволяющий NO- участвовать во взаимодействии с гемом.

Изучение электронного и пространственного строения комплексов 2,03 и железопорфиринового комплекса, моделирующего гем, выявило характерные структурные особенности таких комплексов гем-NO. К ним относятся – нелинейность валентной связи

Fe-N-O, образующей угол 167° , и свобода вращения проксимального метилимидазольного лиганда в пятом координационном положении гема, не влияющего на энергетические и геометрические параметры связывания оксида азота гемом. Главный результат указанных исследований – наибольшее сродство гема к свободному иону NO. Это позволило высказать предположение, что образование комплекса гем-NO происходит лишь после распада комплексов 2,03, образующих группы $\text{Fe}(\text{NO})_2$ на наружной поверхности мембраны. Одна из этих групп, включающая анион NO, оказывается более доступной воздействию различных внутриклеточных реагентов, в первую очередь, активных форм кислорода, а другая может участвовать в образовании высокомолекулярных комплексов 2,03. Этот вывод подтверждают ЭПР-исследования, регистрирующие понижение симметрии комплексов 2,03, локализованных во внутриклеточной среде печени [10]. Этот факт, в первую очередь, может быть обусловлен изменением суммарного заряда на одном из оксидов азота.

Заключительным этапом теоретических исследований явилось моделирование процесса взаимодействия комплексов гем-NO с активным центром внеклеточного домена ГЦ, приводящего к лиганд-индуцированным перестройкам в структуре всего белка. На основании изучения конформационной подвижности боковых цепей аминокислотных остатков, образующих лиганд-связывающий участок белка, показано, что основной вклад в координацию комплекса гем-NO вносят остатки Tyr129, His133 и Asp22 каталитического домена ГЦ. Участвуя в специфических невалентных взаимодействиях с гемовым лигандом, они могут быть причиной конформационных перестроек всего белка и перехода его в активное состояние [11-14]. Таким образом активация ГЦ различными нитро- и нитрозосодержащими соединениями, продуцирующими при своем распаде оксид азота, зависит от конформационных перестроек боковых цепей аминокислотных остатков Tyr129, His133 и Asp22, участвующих в координации гемового лиганда. Проведенные исследования позволяют вплотную подойти к пониманию роли оксида азота в регуляции биологических функций организма путем стимуляции активности ГЦ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Bryan N.S., Bian K., Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development // *Front Biosci.*, 2009, v.14, p.1-18.
2. Calabrese V., Mancuso C., Calvani M. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity // *Nature Rev.Neurosci.*, 2007, v.8, iss.10, p.766-775.
3. Cary S.P., Winger J.A., Derbyshire E.R., Marletta M.A. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off // *Trends in Biochem. Sci.*, 2006, v. 31, iss. 4, p. 231-239.
4. Derbyshire E.R., Marletta M.A. Biochemistry of soluble guanylate cyclase (review) // *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, v.191, p.17-31.
5. Poulos T.L. Soluble guanylate cyclase // *Curr.Opin.Struc.Biol.*, 2006, v.16, iss.6, p. 736-743.
6. Russwurm M., Koesling D. NO activation of guanylyl cyclase // *The EMBO Journal*, 2004, v.23, p.4443–4450.
7. Megson I.L., Miller M.R. NO and sGC-stimulating NO donors (review) // *Handb.Exp. Pharmacol.*, 2009, v.191, p.247-276.
8. Ванин А.Ф. «Нитрозильные комплексы негемового железа в тканях животных и микроорганизмах». Дисс. д-ра биол. наук, М., ИХФ АН СССР, 1980.
9. Ванин А.Ф., Киладзе С.В., Кубрина Л.Н. О включении негемового железа в динитрозильные комплексы в печени мышей *in vivo* // *Биофизика*, 1978, т. 23, с. 474-478.
10. Бурбаев Д.Ш. «Исследование методом ЭПР соединений, моделирующих комплексы негемового железа биологических объектов». Дис. канд. физ-мат. наук, М., 1971, с. 180.
11. Kristianto J., Muchunku M., Gerber N. Soluble guanylate cyclase conformational regulation // *Biophys. Journ.*, 2009, v. 96 (3), suppl. 1, p. 401a.
12. Royand B., Garthwaite J. Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, v.103(32), p.12185-12190.
13. Karow D.S., Pan D., Davis J.H., Behrends S., Mathies R.A., Marletta M.A. Characterization of functional

heme domains from soluble guanylate cyclase // *Biochemistry*, 2005, v.44(49), p.16266-16274.

14. Martin E., Berka V., Bogatenkova E., Murad F., Tsai A.L. Ligand selectivity of soluble guanylyl cyclase: effect of the hydrogen-bonding tyrosine in the distal heme pocket on binding of oxygen, nitric oxide, and carbon monoxide // *J.Biol. Chem.*, 2006, v.281(38), p.27836-27845.

I. Gurbanov

ACTIVATION OF GUANYLATE CYCLASE BY NITROGEN OXIDE PRODUCING COMPOUNDS

Abstract: The problems connected to the guanylate cyclase activation by the nitro- and nitrozoconsisting compounds capable to produce nitrogen oxide were considered on the base of the theoretical investigations. It was shown that the factors playing a key role at the guanylate cyclase activation are the following: 1) structure of the compounds producing NO; 2) electronic and spatial structure of the heme-NO complexes; 3) conformational flexibility of the amino acids side chains formed ligand-binding part of the guanylate cyclase extracellular domain.

Key words: nitrogen oxide; guanylate cyclase; electronic and spatial structure; complexes 2.03.