

Эта часть работы выложена в ознакомительных целях. Если вы хотите получить работу полностью, то приобретите ее воспользовавшись формой заказа на странице с готовой работой:

<https://studservis.ru/kursovaya-rabota/264209>

Тип работы: Курсовая работа

Предмет: Биотехнология

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ NO-СИНТАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	4
2. СТРУКТУРА NO-СИНТАЗ	7
2.1.Оксигеназный и редуктазный домены.....	7
2.2. Димеризация NOS	8
3. КАТАЛИТИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ.....	10
4. ИНГИБИТОРЫ NO-СИНТАЗ	12
5. NO-СИНТАЗЫ В УСЛОВИЯХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ НОРМЫ И ПРИ ПАТОЛОГИЯХ	14
5.1. Нейрональная NO-синтаза (nNOS)	14
5.2. Индуцибельная NO-синтаза (iNOS)	15
5.3 Эндотелиальная NO-синтаза (eNOS)	17
6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ NOS.....	21
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	24
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	26

ВВЕДЕНИЕ

NO-синтазы млекопитающих (NOS) – ферменты, которые катализируют синтез свободного радикала, монооксида азота (NO^{*}). NO^{*} участвует в регуляции сосудистого тонуса, нейротрансмиттерных систем, клеточного иммунитета, клеточного дыхания, функционального статуса тромбоцитов. Нарушения механизмов регуляции NOS лежат в основе патогенеза заболеваний печени, сердечно-сосудистой системы, ожирения, инсулиновой резистентности, рака, нейродегенеративных заболеваний. Это позволяет рассматривать NOS как терапевтическую мишень, а ингибиторы или активаторы этого фермента (в зависимости от патологического контекста) как эффективные терапевтические агенты. У млекопитающих выявлено три изоформы NOS (эндотелиальная NOS, нейрональная NOS и индуцибельная NOS), для которых показана избирательная чувствительность к различным ингибиторам в клеточных культурах и на животных моделях. Однако, в настоящее время ингибиторы NOS не получили рекомендаций для использования в терапии.

1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ NO-СИНТАЗ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В 1980 г. Furchgott и Zawadzki [1] описали релаксацию сосудов *in vitro*, которая зависела от состояния сосудистого эндотелия. Ацетилхолин вызывал релаксацию изолированных фрагментов кровеносных сосудов только в случае сохранения структурно-функциональной целостности сосудистого эндотелия. Дальнейшие исследования показали, что ацетилхолин, брадикинин, гистамин и 5-гидрокситриптамиин индуцировали освобождение химического фактора, который был нестабилен и реализовал свою активность через стимуляцию растворимой гуанилатциклазы. Гемоглобин и метиленовый синий ингибировали активность этого фактора. Этот фактор был назван: релаксирующий фактор эндотелиального происхождения (EDRF) [2].

В 1985 году группа Moncada заинтересовалась этим нестабильным фактором и предложила принципиально новый экспериментальный протокол: эндотелиальные клетки (полученные из аорты свиньи) культивировали на микробусах и проводили перфузию в модифицированной хроматографической колонке. Собранный перфузат использовали для перфузии каскада сосудистых фрагментов, из которых предварительно был удален эндотелий [3].

Комбинирование клеточной культуры с каскадом сосудистых фрагментов (системой детекции) позволило установить факт высвобождения EDRF из эндотелиальных клеток после стимуляции брадикинином. Было показано, супероксид ион (O_2^-) участвует в инактивации EDRF [4]. Некоторые из известных ингибиторов EDRF обладали окислительно-восстановительными свойствами и генерировали в среде культивирования O_2^- , который инактивировал EDRF [5]. Эти экспериментальные факты позволили предположить, что все ингибиторы EDRF, независимо от их фармакологического класса, обладают окислительно-восстановительными свойствами, которые определяют их активность в качестве ингибиторов/блокаторов EDRF. Исключением из этого списка ингибиторов был гемоглобин: он связывался с EDRF, что приводило к инактивации последнего. На основе полученных результатов было сделано предположение, что EDRF может быть свободным радикалом [5].

В 1987 году на симпозиуме, посвященном механизмам вазодилатации, Furchgott высказал предположение, что EDRF может быть оксидом азота (NO) на основании следующих экспериментальных данных:

- супероксиддисмутаза защищает EDRF от быстрой инактивации (CO_2 , катализирует реакцию $2HO_2^- \rightarrow O_2 + H_2O_2$);
- гемоглобин избирательно ингибирует EDRF;
- в растворах неорганического нитрита (NO_2^-) фрагменты аорты кролика с удаленным эндотелием способны релаксировать [6].

Palmer получил водные растворы NO^* и продемонстрировал одинаковые сосудистые эффекты EDRF и NO^* . Palmer модифицировал метод определения NO^* в пищевой и автомобильной промышленности для оценки очень низких концентраций NO^* в биологических системах. С помощью этого метода было доказано, что NO^* действительно синтезируется эндотелиальными клетками при стимуляции брадикинином [7].

На следующем этапе исследований предстояло выяснить, как синтезируется NO^* . Предполагалось, что:

- а) NO_2^- или NO_3^- могут ферментативно восстанавливаться до NO^* ;
- б) для синтеза NO^* может использоваться аммиак или аминокислота;
- в) NO^* может синтезироваться из L-аргинина.

Третий вариант рассматривался как наиболее вероятный, поскольку было известно, что активированные макрофаги генерируют NO_2^- и NO_3^- из L-аргинина [8]. Это позволило предположить, что NO^* может быть нестабильным интермедиатом в синтезе стабильных NO_2^- и NO_3^- из L-аргинина. Для проверки этой гипотезы эндотелиальные клетки в течение 24 ч культивировали на среде без L-аргинина (для создания дефицита этой аминокислоты). Последующее внесение L-аргинина в среду приводило к индукции синтеза NO^* , который регистрировался и в биологических тестах, и химическими методами. Фермент, который синтезировал NO^* из L-аргинина, был назван NO -синтазой (NOS) [9]. В 1998 году R. Furchgott, L. Ignarro и F. Murad была присуждена Нобелевская премия «За открытие роли оксида азота как сигнальной молекулы в регуляции сердечно-сосудистой системы».

2. СТРУКТУРА NO -СИНТАЗ

Три изоформы NOS человека (нейрональная, эндотелиальная, индуцибельная) кодируются тремя различными генами, каждый из которых представлен единственной копией в гаплоидном геноме. Высокая степень структурной гомологии генов изоформ NOS предполагает их происхождение от общего предкового NOS -гена [10, 11].

Все изоформы NOS являются бидоменными белками, в состав которых входят оксигеназный и редуктазный домены (рис. 1). Оксигеназный домен включает сайты связывания гема, L-аргинина, кофактора BH_4 (тетрагидриобиптерин). Оксигеназный домен через кальмодулин-узнающий сайт присоединяется к редуктазному домену. Редуктазный домен включает сайты связывания с FAD , FMN и $NADPH$ [12, 13].

Рис. 1. Димерная, каталитически активная форма NOS [14].

Мономерная форма не проявляет ферментативной активности. Мономер NOS включает два домена: оксигеназный домен (oxygenase domain, N-конец) и редуктазный домен (reductase domain, C-конец), которые разделены кальмодулин-связывающим мотивом (CaM).

1. Furchgott R.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine/ Furchgott R.F., Zawadzki J.V.// Nature.-1980.- N 288.-P.373-376.
2. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries /Furchgott R.F., Cherry P.D., Zawadzki J.V., Jothianandan

- D. J.// Cardiovasc. Pharmacol.– 1984.–N 6.–P.5336–5343.
3. Gryglewski R.J. Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells/ Gryglewski R.J., Moncada S., Palmer R.M.J.// Br. J. Pharmacol.– 1986.– N87.–P.685–694.
4. Gryglewski R.J. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor/ Gryglewski R.J., Palmer R.M.J., Moncada S.// Nature.– 1986.– N 320.–P.454–456.
5. Moncada S. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor/ Moncada S., Palmer R.M.J., Gryglewski R.J.// Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.– 1986.– N 83.–P.9164–9168.
6. Furchgott R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide/ Furchgott R.F., Vanhoutte, P.M.// Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endotheliumed.–New York: Raven Press, 1988.–P. 401–414.
7. Palmer R.M.J. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor/ Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S.// Nature.– 1987.–N 327.–P.524–526.
8. Hibbs J.B. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite/ Hibbs J.B., Jr, Taintor R.R., Vavrin Z.// Science.– 1987.–N 235.–P.473–476.
9. Moncada S. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication/ Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.// Biochem. Pharmacol.– 1989.– N 38.–P.1709–1715.
10. Tran C.T. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins/ Tran C.T., Fox M. F., Vallance P., Leiper J. M. // Genomics.– 2000.– N 68(1).–P.101–105.
11. Król M. Human nitric oxide synthase. Its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases/ Król M., Kepinska M.//Int. J. Mol. Sci.– 2020.–N 22(1).–P.56.
12. Elucidating nitric oxide synthase domain interactions by molecular dynamics/ Hollingsworth S.A., Holden J.K., Li H., Poulos T.L.//Protein Sci.– 2016.– N 25(2).–P.374–382.
13. Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases/ Campbell M.G., Smith B.C., Potter C.S. [et al.].// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2014.– N 111(35).–P. E3614–E3623.
14. Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase/ Kourosh-Arami M., Hosseini N., Mohsenzadegan M. [et al.]. //Rev. Neurosci. – 2020.– N 31(6).– P.617–636.
15. Use of computational biochemistry for elucidating molecular mechanisms of Nnitric oxide synthase/ Bignon E., Rizza S., Filomeni G., Papaleo E.// Comput. Struct. Biotechnol. J.– 2019.– N 17.–P. 415–429.
16. Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases/ Campbell M.G., Smith B.C., Potter C.S. [et al.].// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2014.– N 111(35).– P.E3614–E3623.
17. Preethi D. Molecular dynamics study of in silico mutations in the auto-inhibitory loop of human endothelial nitric oxide synthase FMN sub-domain/ Preethi D., Anishetty S., Gautam P.//J. Mol. Model.– 2021.– N27(2).–P.63.
18. Protein engineering to develop a redox insensitive endothelial nitric oxide synthase/ Rafikov R., Kumar S., Aggarwal S. [et al.].// Redox. Biol.–. 2014.– N2.–P.156–164.
19. Elucidating nitric oxide synthase domain interactions by molecular dynamics/ Hollingsworth S.A., Holden J.K, Li H., Poulos T.L.//Protein Sci.– 2016.– N25(2).–P.374–382.
20. Wheatley C. Cobalamin in inflammation III – glutathionylcobalamin and methylcobalamin/adenosylcobalamin coenzymes: the sword in the stone? How cobalamin may directly regulate the nitric oxide synthases/ Wheatley C.//J. Nutr. Environ. Med.– 2007.–N 16(3–4).–P.212–226.
21. Mechanism and regulation of ferrous heme-nitric oxide (NO) oxidation in NO synthases/ Tejero J., Hunt A.,P, Santolini J. [et al.].//J. Biol. Chem.– 2019.– N 294(19).– P.7904–7916.
22. Site and mechanism of uncoupling of nitric-oxide synthase: Uncoupling by monomerization and other misconceptions/ Gebhart V., Reiß K., Kollau A. [et al.].//Nitric Oxide.– 2019.– N 89.–P.14–21.
23. Li J. Deciphering mechanism of conformationally controlled electron transfer in nitric oxide synthases/ Li J., Zheng H., Feng C.// Front Biosci. (Landmark Ed). – 2018.– N 23(10).–P. 1803–1821.
24. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition/ Cinelli M.A., Do H.T., Miley G.P., Silverman R.B. // Med. Res. Rev. – 2020.– N 40(1). –P.158–189.
25. Alderton W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition/Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.//Biochem. J.– 2001.– N 357(Pt 3). –P.593–615.
26. Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain/ Mukherjee P., Cinelli M.A., Kang S., Silverman R.B.// Chem. Soc. Rev.– 2014.– N 43.–P.6814–6838.
27. Structural basis for isoform selective nitric oxide synthase inhibition by thiophene-2-carboximidamides/ Li H.,

- Evenson R.J., Chreifi G. [et al.]. // Biochemistry.– 2018.– N 57(44).–P.6319–6325.
28. Nitric oxide synthase into the clinic at last/ Dao V.T.V., Elbatreek M.H., Fuchß T. [et al.].//Handb. Exp. Pharmacol.– . 2021.– N 264.–P.169–204.
29. Poulos N.L. Nitric oxides and structure-based inhibitor design/ Poulos T.L., Li H//Nitric Oxide.– 2017.– N 63.–P. 68–77.
30. Balke J.E. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) splice variant function: Insights into nitric oxide signaling from skeletal muscle/Balke J.E., Zhang L., Percival J.M.// Nitric Oxide.– 2019.– N 82.–P.35–47.
31. Functional roles of neuronal nitric oxide synthase in neurodegenerative diseases and disorders/ Poon C.H., Tsui K.C., Chau S.C. [et al.].// Curr. Alzheimer Res.–2021.–N18(10).–P.831–840.
32. Insights into the C-terminal peptide binding specificity of the PDZ domain of neuronal nitric-oxide synthase: characterization of the interaction with the tight junction protein claudin-3/ Merino-Gracia J., Costas-Insua C., Canales M.Á., Rodríguez-Crespo I.//J. Biol. Chem.– 2016.– N 291(22).–P.11581–95.
33. Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase/ Kourosh-Arami M., Hosseini N., Mohsenzadegan M. [et al.].//Neurosci. – 2020.– N 31(6).–P.617–636.
34. Activity-Induced SUMOylation of Neuronal Nitric Oxide Synthase Is Associated with Plasticity of Synaptic Transmission and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling/ Du C.P., Wang M., Geng C. [et al.].//Antioxid. Redox. Signal. – 2020.– N 32(1).– P:18–34.
35. Wnt signaling through nitric oxide synthase promotes the formation of multi-innervated spines/ McLeod F., Boyle K., Marzo A. [et al.].//Front. Synaptic Neurosci.– 2020.– N 12.–P.575863.
36. Role of neuronal nitric oxide synthase on cardiovascular functions in physiological and pathophysiological states/Ally A., Powell I., Ally M.M. [et al.].// Nitric Oxide. – 2020.– N 102.–P.52–73.
37. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection/ Hurt K.J., Sezen S.F., Lagoda G.F. [et al.].// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 2012.– N 109(41).– P.16624–16629.
38. Dubey H. Alzheimer's disease: A contextual link with nitric oxide synthase/ Dubey H., Gulati K., Ray A.//Curr. Mol. Med.– 2020.– N 20(7).– P.505–515.
39. MiR-302b-5p enhances the neuroprotective effect of IGF-1 in methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease by regulating inducible nitric-oxide synthase/ Cui X., Li M., He Z. [et al.].//Cell Biochem. Funct.– 2020.– N 38(8).– P. 1025–1035.
40. The role of nitric oxide in stroke/ Chen Z.Q., Mou R.T., Feng D.X. [et al.].// Med. Gas. Res.– 2017.– N 7(3).– P.194–203.
41. Wang J. Superoxide and non-ionotropic signaling in neuronal excitotoxicity/Wang J., Swanson R.A.//Front. Neurosci.– 2020.– N 4.– P.861.
42. Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract/ Takahashi T.// J. Gastroenterol. –2003.– N 38(5).–P.421–430.
43. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?/ Lind M., Hayes A., Caprnda M. [et al.].// Biomed. Pharmacother. – 2017.– N 93.–P.370–375.
44. Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase/ Lee M., Rey K., Besler K. [et al.].// Results Probl. Cell Differ. – 2017.– N 62.–P.181–207.
45. Liao W. Prognostic value of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human cancer: A systematic review and meta-analysis/ Liao W., Ye T., Liu H.// Biomed. Res. Int. – 2019.– N 2019.– P.6304851.
46. A specific, non-immune system-related isoform of the human inducible nitric oxide synthase is expressed during differentiation of human stem cells into various cell types/ Gather F., Ihrig-Biedert I., Kohlhas P. [et al.].// Cell Commun. Signal. – 2022.– N 20(1).–P.47.
47. Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase/ Lee M., Rey K., Besler K. [et al.].//Results Probl. Cell. Differ. –2017.– N 62.– P.181–207.
48. Redox-signals and macrophage biology/Weigert A., von Knethen A., Fuhrmann D. [et al.].//Mol. Aspects Med.– 2018.– N 63.–P.70–87.
49. Nitric oxide displays a biphasic effect on calcium dynamics in microglia/Maksoud M.J.E., Tellios V., Xiang Y.Y., Lu W.Y.//Nitric Oxide.– 2021.– N 108.– P.28–39.
50. Gage M.C. Inhibitors of Src family kinases, inducible nitric oxide synthase, and NADPH oxidase as potential CNS drug targets for neurological diseases// Gage M.C., Thippeswamy T.// CNS Drugs.– 2021.–N 35(1).–P.1–20.
51. Parathath S.R. Nitric oxide synthase isoforms undertake unique roles during excitotoxicity/ Parathath S.R., Gravanis I., Tsirka S.E.//Stroke.– 2007.– N 38(6).–P.1938–1945.
52. Cauwels A.Nitric oxide in shock/Cauwels A.// Kidney Int.– 2007.– N 72(5).–P.557–565.
53. Anavi S. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions/Anavi S., Tirosh O.// Free Radic. Biol. Med.–

2020.-N 146.-P.16-35.

54. Placental endothelial nitric oxide synthase expression and role of oxidative stress in susceptibility to preeclampsia in Pakistani women /Shaheen G., Jahan S., Ain Q.U. [et al.].// Mol. Genet. Genomic. Med.- 2020.-N 8(1).-P.e1019.
55. Maron BA. Subcellular localization of oxidants and redox modulation of endothelial nitric oxide synthase/ Maron BA., Michel T.//Circ. J.- 2012.-N 76(11).-P.2497-2512.
56. Coordinated regulation of endothelial calcium signaling and shear stress-induced nitric oxide production by PKC β and PKC η / Muzorewa T.T., Buerk D.G., Jaron D., Barbee K.A.//Cell Signal. - 2021.- N 87.-P.110125.
57. Godo S. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis/ Godo S., Shimokawa H.// Free Radic. Biol. Med.- 2017.- N 109.- P.4-10.
58. Randriamboavonjy V. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there?/Randriamboavonjy V., Fleming I.// Pharmacol. Rep.- 2005.- N 57.- Suppl. 59-65.
59. Förstermann U. Roles of vascular oxidative Sstress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis/ Förstermann U., Xia N., Li H.//Cir. Res. - 2017.-N 120(4).-P.713-735.
60. Roles of eNOS in atherosclerosis treatment/Hong F.F., Liang X.Y., Liu W. [et al.].// Inflamm. Res. -2019.-N 68(6).-P:429-441.
61. Inflammatory mechanisms contributing to endothelial dysfunction/ Theofilis P., Sagris M., Oikonomou E. [et al.].// Biomedicines.- 2021.- N 9(7).-P.781.
62. Endothelial nitric oxide synthase overexpressing human early outgrowth cells inhibit coronary artery smooth muscle cell migration through paracrine functions/ Guber S., Ebrahimian T., Heidari M. [et al.].// Sc.i Rep.- 2018.- N 8(1).-P.877.
63. Cavin-2 regulates the activity and stability of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) in angiogenesis/ Boopathy G.T.K., Kulkarni M., Ho S.Y. [et al.]. //J. Biol. Chem.- 2017.- N 292(43). -P.17760-17776.
64. Generation of a nitric oxide signaling pathway in mesenchymal stem cells promotes endothelial lineage commitment/ Bandara N., Gurusinghe S., Kong A. [et al.].// J. Cell Physiol.- 2019.- N 234(11).-P.20392-20407.
65. Minicircle DNA-mediated endothelial nitric oxide synthase gene transfer enhances angiogenic responses of bone marrow-derived mesenchymal stem cells/ Bandara N., Gurusinghe S., Chen H. [et al.].// Stem Cell Res. Ther.- 2016.-N 7.-P.48.
66. Oxidative stress, GTPCH1, and endothelial nitric oxide synthase uncoupling in hypertension/ Wu Y., Ding Y., Ramprasath T., Zou M.H.//Antioxid. Redox. Signal.- 2021.- N 34(9). -P. 750-764.
67. Goshi E. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo/ Goshi E., Zhou G., He Q. //Med. Gas Res.- 2019.- N 9(4).-P.192-207.
68. Murphy M.E. Nitric oxide assay using hemoglobin method/ Murphy M.E., Noack E.// Methods Enzymol. - 1994.- N 233.-P.240-250.
69. Yao D. Determination of nitric oxide in biological samples/ Yao D., Vlessidis A.G., Evmiridis N.P.// Mikrochim Acta.- 2004.-N 147.- P.1-20.
70. Hong H. Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases/ Hong H., Sun J., Cai W.// Free Radical. Biol. Med. -2009.- N 47.-P.684-698.
71. Hetrick E.M. Analytical chemistry of nitric oxide/ Hetrick E.M., Schoenfisch M.H.// Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif).-2009.-N 2/-P. 409-433.
72. Ciszewski A. Electrochemical detection of nitric oxide using polymer modified electrodes/ Ciszewski A., Milczarek G.// Talanta.- 2003.-N 61.- P.11-26.

Эта часть работы выложена в ознакомительных целях. Если вы хотите получить работу полностью, то приобретите ее воспользовавшись формой заказа на странице с готовой работой:

<https://stuservis.ru/kurosovaya-rabota/264209>