

УДК 579.017.7: 577.151.3

Б.М. Галкін, В.О. Іваниця, М.Б. Галкін

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: bgalkin@ukr.net

## БАКТЕРІАЛЬНІ СИНТЕТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ

У статті представлено огляд сучасних наукових публікацій про молекулярну структуру, механізми синтезу, молекулярну біологію, генетику і біологічні функції бактеріальних синтетаз оксиду азоту.

Ключові слова: бактеріальні синтетази оксиду азоту, гени NO-синтез, регуляторна та сигнальна функції.

У ссавців оксид азоту (NO) бере участь у багатьох біологічних процесах. Він регулює кров'яний тиск і здійснює захист від патогенних мікроорганізмів, виконує сигнальну функцію та ін. [3]. Синтетази оксиду азоту ссавців (mNOSs) є строго регульованими комплексами ферментів, які каталізують окиснення L-аргініну до цитруліну і NO (рис. 1).

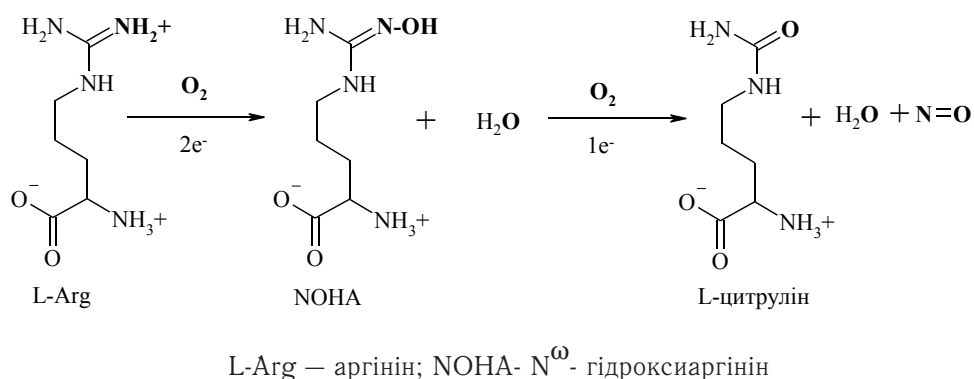


Рис. 1. Окиснення L-аргініну до цитруліну і оксиду азоту за допомогою синтетази оксиду азоту [48]

Fig. 1. Oxidation of L-arginine to citrulline and nitric oxide by nitric oxide synthase

У бактеріальних геномах були знайдені гени, що кодують гомологи синтетази оксиду азоту [50], вивчена ферментна активність у лізатах різних бактеріальних клітин, виділені окремі ферменти, які відповідають за синтез оксиду азоту та вивчена їх молекулярна структура [14]. Виявилось, що бактеріальні NO-синтетази (bNOS) виконують у прокариотів різноманітні функції, які відрізняються від функцій цих ферментів у багатоклітинних організмів. Проведення рентгеноструктурного аналізу деяких бактеріальних ферментів синтезу оксиду азоту дозволило визначити їх схожість та відмінності від синтетаз оксиду азоту багатоклітинних організмів. Бактеріальні NOS відрізняються від mNOSs коротшою доменною структурою. Крім того, ця ферментна система бактерій є розчинною, тому її легко виділити та очистити. У деяких прокариотів bNOS є термостабільною.

### Біохімія і геноміка бактеріальних синтетаз оксиду азоту

Дослідження з пошуку синтетаз оксиду азоту у бактерій почалися більше десяти років тому. На початку у деяких бактерій, таких як *Nocardia species* та *Lactobacillus fermentum*, було показано, що у них утворюється нітрит при додаванні у живильне середовище L-аргініну, а також при дії інгібіторів синтетаз оксиду азоту відбувається зниження рівня оксиду азоту [13,35]. Проте, багато бактерій здатні синтезувати оксид азоту не тільки за допомоги NOS. Наприклад, фермент нітратредуктаза може перетворити нітриту у NO при низькій концентрації нітратів [57]. Крім того, в циклі сечовини при деімінізації аргініну також може утворюватися цитрулін [55], або за допомоги аргінази, або орнітинкарбамоїлтрансферази [23, 52].

Тим не менше, у даний час немає сумнівів, що бактерії і археї містять NOS-подібні білки [40]. Було показано, що нуклеотидна послідовність у гені, що кодує bNOS, подібна з такою ж ділянкою гена, який кодує mNOSs. Білки мають схожість у N-кінцевій амінокислотній послідовності оксигеназного домену (NOSox) [29, 56]. NOS-подібні білки в основному знайдені у грампозитивних бактерій, хоча вони також були виявлені й у грамнегативних бактерій і архей. У всіх прокариотних NOS схожі амінокислотні послідовності, в геновому і активному сайтах. Для вивчення еволюції цих білків був проведений філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей синтетаз оксиду азоту з різних організмів. Філогенетичне древо припускає можливість горизонтального переносу генів NOS. На підставі отриманих результатів філогенетичного аналізу можна простежити еволюцію цих ферментних систем.

У прокариотів простіша будова синтетази оксиду азоту, а саме відсутній редуказний домен, за винятком архей, у яких є редуказний домен, але він розташовується в N-кінцевій частині ферментної системи [18]. У бактерій положення гена в хромосомі може часто дати уявлення про функції цього білка. Гени NOS розташовуються в таких ділянках



хромосоми, що функція сусідніх генів невідома, хоча є і виключення. Наприклад, у деяких штамів *Streptomyces* ген, який кодує NO-синтетазу, розташовується в так званому, «острівці патогенності» і бере участь у біосинтезі такстомінів. Ці фітотоксини викликають паршу картоплі.

### Структура і каталітичні властивості бактеріальних синтетаз оксиду азоту

Спектральні властивості, структура та каталітичні профілі bNOS більшою мірою схожі з mNOS [1, 2, 14]. NO-синтетаза ссавців є гомодимером, який містить N-кінцевий фрагмент NOS<sub>ox</sub> і C-кінцевий фрагмент, що виконує редуктазну функцію за допомоги флавопротеїдів (NOSred). NOS<sub>ox</sub> зв'язує L-аргінін, гем і відновний редокс-активний кофактор 6R-тетрагідроптерин (H<sub>4</sub>B) і в цій ділянці знаходиться каталітичний центр ферменту. NOSred має сайти зв'язування для ФАД, ФМН, НАДФН і діє як джерело відновлювальних еквівалентів для зв'язування кисню і його активації. Білок кальмодулін сполучає оксигеназну і редуктазну області NOS. Він так само регулює перехід окисненої форми ферменту у відновлену за допомогою кальцій-залежних механізмів [3]. З участю mNOS з L-аргініну утворюється стійкий проміжний продукт N<sup>ω</sup>-гідрокси-L-аргінін (NOHA). Надалі він перетворюється на NO і L-цитрулін (рис. 1) [48]. При цьому активація кисню вимагає відновного кофактору H<sub>4</sub>B [48]. Бактеріальні NOS<sub>ox</sub> області NO-синтетази схожі з такими областями в mNOS, але у bNOS відсутній NOSred (відновний фрагмент), а в N-кінцевій області відсутній фрагмент, який за допомогою водневих зв'язків координує цинк. Незважаючи на це NO-синтетази системи у бактерій, все ж схожі з mNOS<sub>ox</sub>. По-перше, у димерів гема нормальні спектральні властивості, по-друге, геми зв'язують L-аргінін і з нього утворюється оксид азоту, по-третє, використовуються біоптерини (естер Hb) або тетрагідрофолат (ТГФ). Тим не менше, існують невеликі відмінності в спектральних властивостях гемових центрів. Зокрема, у *Bacillus subtilis* NOS (bsNOS) і у *Bacillus anthracis* NOS (baNOS) дещо відмінна структура гемової кишені. Ці відмінності призводять до змін активності ферменту та його функцій [25]. За винятком деяких відсутніх фрагментів в N-термінальній області bNOS, все ж вони є структурними аналогами mNOS (рис. 2). Це було підтверджено при з'ясуванні структури комплексу bsNOS з L-аргініном та ТГФ [36]. NOS *Staphylococcus aureus* (saNOS) пов'язані з НАД і S-етил-ізотіосечовиною (аналог L-аргініну) [5] і NOS *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS) в комплексі з L-аргініном [49].

Цікаво, що у NOS *Streptomyces* може міститися N-термінальний сайт цинку, але в цьому фрагменті один з двох Cys, які присутні в mNOS замінюються на амінокислотний залишок His [26]. Таким чином, збереження всіх основних каталітичних центрів серед бактеріальних і тваринних NOS дає можливість зробити припущення, що оксид азоту утворюється з аргініну через N<sup>ω</sup>-гідрокси-L-аргінін (NOHA) [36]. Синтез NO за допомоги



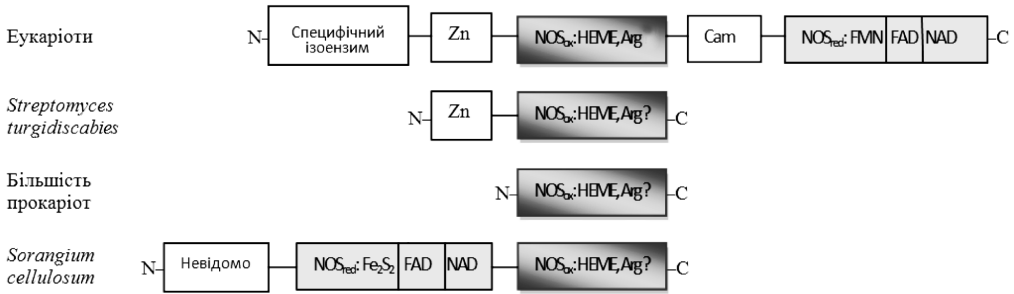


Рис 2. Будова синтетаз оксиду азоту у різних організмів [50]

Fig 2. Structure of nitric oxide synthase in various organisms [50]

конститутивної форми NO-синтетази був продемонстрований у *Bacillus subtilis* (bsNOS) [1], у *Deinococcus radiodurans* (drNOS) [2] і у *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS) [49]. У всіх трьох випадках, утворення оксиду азоту відбувається тільки за присутності або естеру  $H_4B$ , або ТГФ, хоча у bsNOS і drNOS вища спорідненість до  $H_4B$  [1,2,49]. Схоже, що відсутність N-термінальної цинк-зв'язуючої ділянки дозволяє бактеріальним NOS зв'язувати більші кількості птеринових кофакторів або ТГФ, ніж mNOSs [2,36]. Однак, не ясно, чи можуть бактерії, які виробляють ТГФ, синтезувати  $H_4B$ . Більшість прокаріотів, у яких присутня NOS, містять деякі з генів біосинтезу  $H_4B$ , але тільки бактерії роду *Bacillus* мають гомолог ферменту сепіаптеринредуктази — кінцевого ферменту у біосинтезі  $H_4B$ . Бактеріальні NOS служать хорошим інструментом для досліджень механізмів каталізу даної групи ферментів. Для цього як модель гем-кисневих комплексів використовують гем-нітрозилні комплекси bsNOS, які здатні окиснювати L-аргінін [37]. Ці структури дають можливість дослідити утворення субстрат-відновлений гем-кисневий комплекс, простежити хід реакції та встановити продукти каталізу. Використання спектроскопії комбінаційного розсіювання (рамановської спектроскопії), яка дозволяє отримати інформацію щодо зіткнення фотонів з молекулами або іонами, в ході яких вони обмінюються енергією. За зміною енергії фотона можна судити про зміну енергії молекули, тобто про перехід її на новий енергетичний рівень. Цей метод доволі часто використовується для вивчення механізмів каталізу оксидоредуктазних ферментів, у яких в активному центрі знаходяться метали зі змінною валентністю. Він дозволив вивчити стійкі гем-кисневі комплекси з L-аргініном і N-гідрокси-L-аргініном та з'ясувати частку проміжних форм кисню в saNOS каталізі [12]. Встановлено, що звільнення оксиду азоту з гемового активного центру є значно нижчим при каталізі bNOS, ніж при каталізі mNOS [1]. Ці каталітичні відмінності можна пояснити тим, що в активному центрі ферменту mNOS розташовується амінокислотний залишок валіну, а у bNOS в цьому місці розташований ізолейцин [36]. Дійсно, заміна цих

амінокислотних залишків у бактеріальних і тваринних NOS змінює ступінь дисоціації гем-лігандного комплексу [53]. Бактеріальні NOS можуть бути використані для характеристики структурних елементів, які є однаковими для бактеріальних і тваринних NO-синтеаз. Ці елементи беруть участь в утворенні та регулюванні ферментів NOS. За відсутності НВ і субстрату відмічено часткове розкриття оксигеназного домену mNOSox [30]. Такі структурні стани активного центру ферменту сприйнятливіші до протеолізу. При цьому гем має нижчий окисно-відновний потенціал, ніж фермент, зв'язаний з НВ і субстратом [30]. Ці структурні зміни поширюються не тільки на інші області ферменту, але і на його активний центр, що впливає на його здатність зв'язуватися з субстратом. Таким чином, механізми каталізу синтетази оксиду азоту є такими (рис. 3).

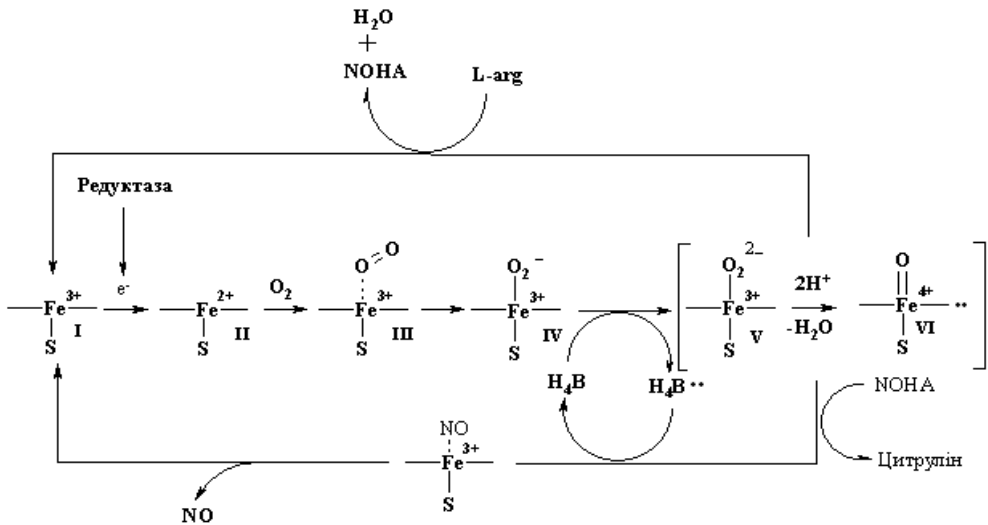


Рис. 3. Механізм каталітичного циклу синтетази оксиду азоту [14]

Fig. 3. The mechanism of the catalytic cycle of nitric oxide synthase [14]

Синтез оксиду азоту NO-синтетазами грамположитивних і грамнегативних бактерій аналогічний синтезу NO ферментом mNOS, за винятком того, що у них відсутня редуктазна область. Ефективним донором електронів для bsNOS *B. subtilis* може виступати флаводоксин (YkuN) [54]. Однак, при видаленні гену *yku* N-синтез оксиду азоту у *B. subtilis* не припиняється. Бактеріальна NOS *E. coli* в природних умовах використовує свої редуктази [18]. Таким чином, на відміну від ферментної системи ссавців, які містять спеціальний редуктазний модуль, бактеріальна ферментна система, скоріше за все, може приймати електрони від декількох різних редуктаз [18]. Розшифровка геному представника архей *Sorangium (Polyangium) cellulosum* [43] показала, що їх NOS система



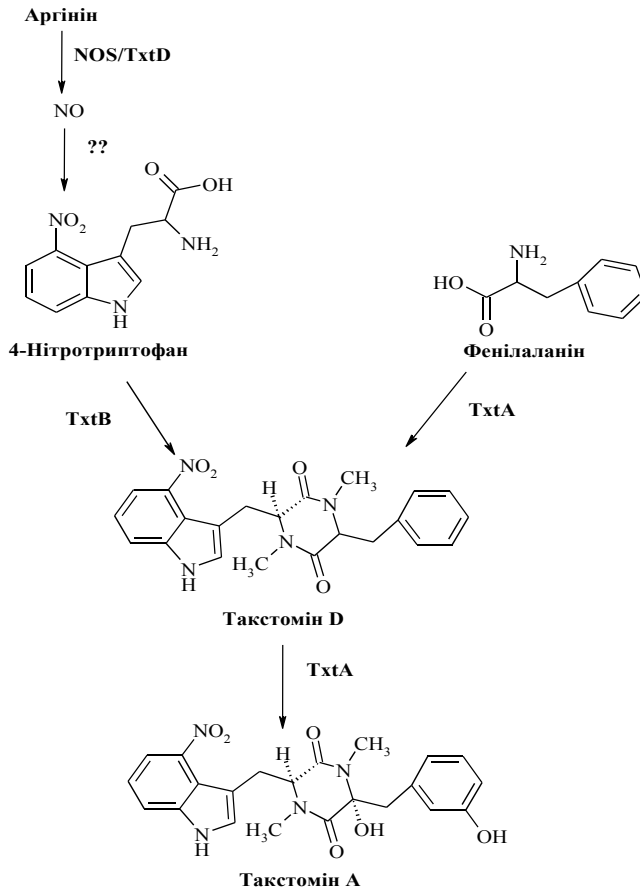
має ковалентно приєднаний редуказний модуль. Але на відміну від mNOS він розташований в N-кінцевій області (рис. 2). Синтетаза оксиду азоту *Sorangium cellulosum* (scNOS) містить в N-кінцевій області ділянку з невідомою функцією, а потім Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> кластер, ФАД- і НАД-зв'язуючі домени і, нарешті, в С-кінцевій ділянці розташовується NOS<sub>ox</sub>. Крім того, флаводоксинава ділянка в mNOS замінюється в scNOS кластером Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, який здатний переносити один електрон. Значний інтерес викликає те, що у mNOS є ділянка в області ФМН, яка зв'язана з відновленням NOS<sub>ox</sub> і регулюється Ca<sup>2+</sup>-кальмодуліном [16,41]. Подальше вивчення scNOS ферментної системи може пролити світло на механізми взаємодії між двома ділянками (NOS<sub>ox</sub> і NOS<sub>red</sub>) синтетази оксиду азоту.

### Функції бактеріальних синтетаз оксиду азоту

Оксид азоту може виступати важливою сигнальною молекулою у бактерій в незалежності від джерела походження [10, 46]. Поки ще не у всіх прокариотів знайдено синтетазу оксиду азоту, але у бактерій, у яких вона є, ця ферментна система здатна виконувати дуже важливі регуляторні функції.

Однією з основних функцій NOS *Streptomyces turgidiscabies* це синтез такстомінів — фітотоксинів, що викликають захворювання парші картоплі. Ген цього ферменту був знайдений у *Streptomyces turgidiscabies* в так званому «острівці патогенності» [26]. Механізм патогенності такстомінів насамперед пов'язаний з порушенням синтезу клітинної стінки у картоплі. Так, стомін — це незвичайний дипептид (похідне цикло-[L-триптофану-L-фенілаланіну]), який утворюється без участі рибосом [20]. Він представляє собою триптофеніловий фрагмент, нітрований по четвертому положенню дипептиду [20]. Розташування гену NOS на «острівці патогенності», який є відповідальним за біосинтез такстоміну і його перебування в безпосередній близькості від генів, що кодують нерибосомні пептидсинтетази (*txtA* і *txtB*) переконливо показують, що відповідний фермент (stNOS) може бути залучений до нітрування такстомінів (рис. 4).

Порушення гену *nos* значно зменшувало виробництво такстоміну. Після додавання NOS синтез фітотоксинів був частково відновлений [26]. Однак, не нітровані такстоміни не були виявлені у живильному середовищі у нокаутних по гену *nos* штамів *Streptomyces turgidiscabies*. Інгібітори mNOSs, які були додані у живильне середовище для росту *Streptomyces turgidiscabies* штаму дикого типу призвели до зменшення синтезу такстоміну без будь-якого ефекту на ріст цих бактерій [26]. Це пояснюється зменшенням синтезу токсину, так як інгібітори знижують активність NOS. Крім того, експресія гену stNOS, введеного у *E. coli*, показала, що нітрит утворюється з NOHA і він є кінцевим продуктом реакції NO з киснем. Було показано, що при використанні <sup>15</sup>N-L-аргініну, нітрування такстоміну відбувається завдяки гуанідиновому радикалу L-аргініну. NOS є єдино відомим ферментом, який окиснює азот гуа-

Рис. 4. Синтез такстоміну А у *Streptomyces turgidiscabies* [24]Fig. 4. Synthesis of thaxtomine A in *Streptomyces turgidiscabies* [24]

нідину L-аргініну з утворенням NO. Таким чином, зроблено висновок, що NOS є одним з ключових ферментів, який бере участь у нітруванні триптофанового (Trp) фрагменту [26]. Біосинтетичні реакції нітрування в основному протікають при окисненні амінів [11]. Хімічні механізми NOS-залежного нітрування, ймовірно, дуже складні і можуть включати в себе й інші реакції, оскільки дуже складно собі уявити, що індольний замісник триптофану може безпосередньо взаємодіяти з оксидом азоту, хоча вільнорадикальні форми оксиду азоту, такі, як нітрозіум ( $\text{NO}^+$ ), пероксинітрил ( $\text{ONOO}^-$ ), нітроніум ( $\text{NO}^{+2}$ ), або діоксид азоту ( $\text{NO}_2$ ), як відомо, здатні нітрувати ароматичні радикали [27]. Цікаво, що штами *Streptomyces* починають нітрувати токсин у місці інфікування, коли відбувається розвиток коренів [24]. У рослинах NO, як відомо, виступає як сигнальна молекула, яка активує численні процеси: тропізми, цвітіння, утворення ксилеми, ріст коренів, адаптацію і стрес-відповідь, тощо [51].

Цікаво відзначити, що патогенна продукція NO також сприяє зростанню тканин і їх колонізації.

Після доказу причетності stNOS до біосинтетичних реакцій нітрування було проведено дослідження пошуку подібних біосинтетичних реакцій NOS у інших бактерій. Подібну властивість виявила тільки синтетаза оксиду азоту *Deinococcus radiodurans* (drNOS). Вона здатна каталізувати синтез невеликих кількостей 4-нітро-L-триптофану *in vitro*, у разі використання чужої NOSred як відновника [6]. До того ж, drNOS спільно виділялася та очищалася з незвичайною триптофан-транспортною РНК синтетазою, тим самим забезпечуючи зв'язок з метаболізмом триптофану [6, 7]. Наявність такого незвичайного центру зв'язування триптофану у TrpRS II означає, що аналоги триптофану з замісниками в індольному кільці можуть розпізнаватися і з'єднуються з tРНК за допомогою цього ферменту [8].

Дійсно, TrpRS II приєднує до триптофан-специфічної tРНК триптофан, 4-нітро-триптофан або 5-гідрокси-триптофан з майже однаковою специфічністю *in vitro*, тоді як TrpRS I приєднує тільки триптофан [9]. Тому, комплекс drNOS-TrpRS II може синтезувати 4-нітро-триптофан-tРНК. Призначення цього незвичайного продукту незрозуміло і на даний час немає доказів того, що 4-нітро-триптофан може входити до складу білків. Можливо 4-нітро-триптофан-tРНК використовується *D. radiodurans* для продукції ще не відкритих вторинних метаболітів.

При делеції гена NOS ( $\Delta nos$ ) у штаму *Deinococcus radiodurans* різко знижена здатність до відновлення після УФ-випромінювання [38]. *D. radiodurans* може виживати в досить жорстких умовах, таких як висушування, окиснювальне пошкодження і радіаційні впливи у порівнянні з іншими організмами [4]. При делеції  $\Delta nos$  відбувається незначне уповільнення росту у рідкій культурі за відсутності стресу у порівнянні з диким типом, але при дії УФ-випромінювання відмінності між штамами великі. Швидше за все роль оксиду азоту при УФ-випромінюванні не в захисті, а в сигналі, який відновлює проліферацію клітин. Проведення експериментів зі специфічними мРНК показало, що деякі гени диференційно регулюються геном *nos* після опромінення. Зокрема, активується ген *obg*, що кодує малі ГТФ-зв'язувальні білки, які беруть участь у відновленні клітин після УФ-опромінення у штаму дикого типу, на відміну від штаму, у якого вилучено ген  $\Delta nos$  [38]. Отримані дані дозволяють припустити важливу регуляторну роль оксиду азоту.

На відміну від функцій stNOS та drNOS синтетаза оксиду азоту різних видів *Bacillus* (bsNOS і baNOS) використовується для захисту бактерій від оксидантного стресу [17, 44]. Вплив на клітини мілімолярних концентрацій  $H_2O_2$  призводить до утворення гідроксильних радикалів, які з'являються завдяки реакції Фентона (рис. 5), при цьому відбувається пошкодження ДНК і загибель клітин.



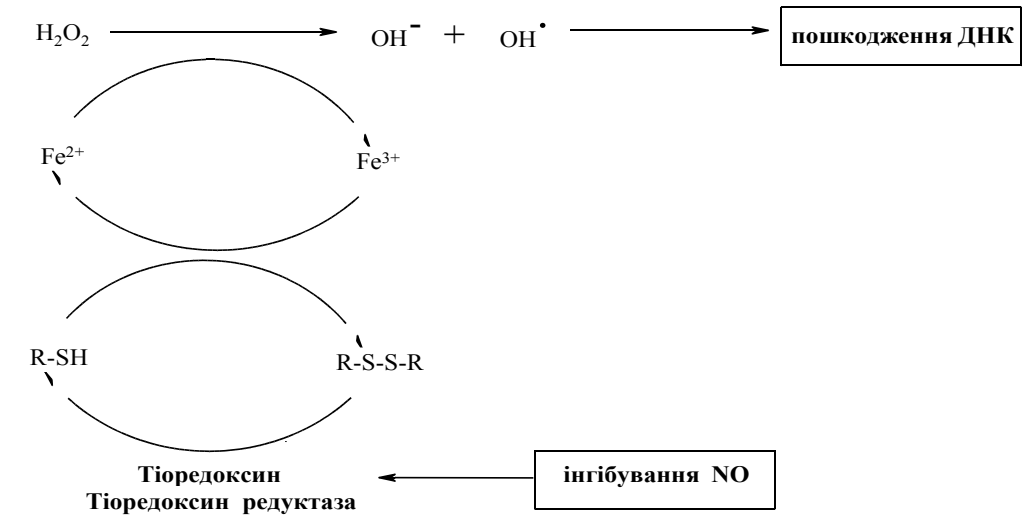


Рис. 5. Інгібування оксидом азоту ферменту тіоредоксин редуктази у *B. subtilis* та *B. anthracis* [17]

Fig. 5. Inhibition of thioredoxin reductase enzyme in *B. subtilis*, *B. anthracis* by nitric oxide [17]

Проте, коли до *B. subtilis* попередньо, за 5 секунд до впливу  $H_2O_2$ , додавали оксид азоту, виживання клітин збільшувалося в 10 разів [17]. Додавання NO або одночасно з  $H_2O_2$ , або після  $H_2O_2$  не викликає подібного ефекту [17]. Крім того, оксид азоту може активувати певні гени у *B. subtilis* і *E. coli* для захисту від оксидантного і нітрозативного стресів [17]. Цей ефект не пов'язаний з експресією захисних генів, так як захист клітин стався відразу після додавання в середовище оксиду азоту. Штам *B. subtilis* з дефектним геном *nos* став чутливішим до окиснювального пошкодження насамперед через збільшення рівня відновлених тіолів [17]. Тому і виникла гіпотеза, що оксид азоту, який утворюється в NO-синтезних реакціях, зменшує окисні пошкодження шляхом інгібування ферменту тіоредоксин редуктази. Цей ензим відновлює тіоредоксин. Тіоредоксин необхідний для відновлення заліза, а завдяки йому і утворюються  $OH^\cdot$  радикали, що ушкоджують ДНК (рис. 5). Крім того, оксид азоту активує каталазу *B. subtilis*. Аналогічні функції були знайдені у baNOS [44]. Значну роль у процесах виживання *B. anthracis* відіграє її NO-синтезаза. Відомо, що фагоцити утворюють великі кількості оксиду азоту, а також вільнорадикальні форми кисню та азоту у відповідь на дію патогенів. На моделі системної інфекції показано, що спори мутантного NOS-штаму *B. anthracis* втрачають вірулентність [44]. NOS-залежний захист *B. anthracis* від вільних радикалів макрофагів такий самий як у *B. subtilis*. За допомогою NO активується бактеріальна каталаза і блокується реакція Фентона. Крім того, відмічено індукцію синтезу NO у

патогенних штамів у відповідь на «дихальний вибух» фагоцитів, який є захисним механізмом хазяїна. Таким чином, NO захищає бактерію на ранніх стадіях інфекції. У *S. aureus* також є подібна захисна система, яка залежить від синтезу оксиду азоту NO синтетазою [17].

**Участь синтетази оксиду азоту в захисті бактерій від антибіотиків**

Антибіотики, такі як похідні лактамів, аміноглікозидів, хінолонів та фенозинів частково проявляють свою токсичність за рахунок генерації активних форм кисню. Оксид азоту захищає грампозитивні бактерії від оксидантного стресу [17]. Тому було зроблено припущення, що оксид азоту може брати участь у формуванні бактеріями резистентності до антибіотиків [19]. Для перевірки цієї гіпотези були вибрані різні антимикробні препарати, такі як, акрифлавін, піоціанін і цефуроксим, які були додані до  $\Delta nos$  мутантів бактерій.

Акрифлавін виявився найбільш сильним інгібітором росту  $\Delta nos$  мутантів серед антибіотиків, що інтеркалюють у ДНК. Акрифлавін містить дві ароматичні аміногрупи, які необхідні для прояву токсичності. Крім того, було показано, що акрифлавін здатний генерувати активні радикали, які пошкоджують ДНК бактерій [19]. При хімічній взаємодії акрифлавіну та оксиду азоту було встановлено, що продукти окиснення NO призводять до нітрування ариламинових груп.

В результаті цього катіони арилдіазонію швидко гідролізуються з вивільненням молекулярного азоту і формуванням менш токсичних похідних дигідроксиарцидину (рис. 6). При попередньому змішуванні акрифлавіну і NO у поживному середовищі до інокуляції бактерій було відмічено зниження інгібування росту *Bacillus subtilis* і *Staphylococcus aureus* акрифлавіном.

Сам NO у використаній концентрації не пригнічував ріст бактерій. Таким чином, NO, синтезований за участю синтетази оксиду азоту, модифікує акрифлавін і це призводить до зниження його активності *in vivo* (рис. 6) [19]. Акридиновий помаранчевий, який також є похідним феназину, виявляє нижчу анти-

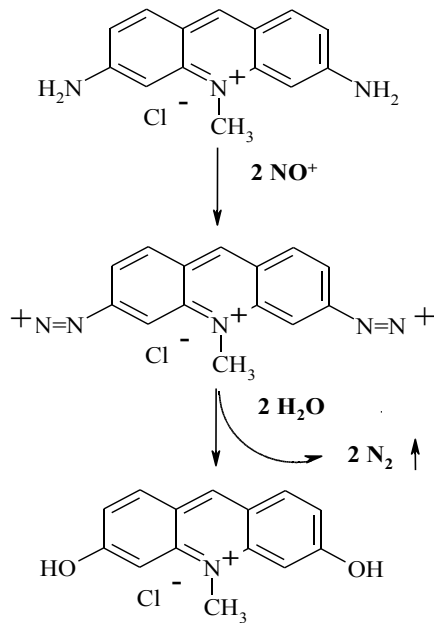


Рис. 6. Механізм перетворення акрифлавіну за допомогою бактеріальної синтетази оксиду азоту [19]

Fig. 6. Mechanism of acriflavine conversion by bacterial nitric oxide synthase

мікробну дію, оскільки містить метильовані  $\text{NH}_2$ -групи, які не здатні взаємодіяти з  $\text{NO}^+$ .

Природний токсин піоціанін (1-гідрокси-5-метил-феназин), який синтезується *Pseudomonas aeruginosa* є структурним аналогом акрифлавіну і він використовується для конкуренції з іншими прокаріотами за екологічну нішу. Тому штами *Bacillus subtilis*, у яких є делеція в гені *nos* чутливіші до дії піоціаніну ніж штами дикого типу. Додавання оксиду азоту до штамів *Bacillus subtilis*  $\Delta nos$  відновлює ріст цих бактерій у присутності піоціаніну. Піоціанін відрізняється за своєю структурою від акрифлавіну відсутністю ариламінових груп, і тому він не реагує з  $\text{NO}^+$ . Встановлено, що при дії піоціаніну у стаціонарній фазі росту бактерії  $\Delta nos$  у клітинах накопичується у великій кількості супероксиданіон, а штами *Bacillus subtilis* з делецією в гені  $\Delta sod$  ще чутливіші до піоціаніну. Крім того, активація синтезу оксиду азоту підсилює експресію гену *sodA*. Таким чином, оксид азоту підвищує концентрацію супероксиддисмутази у *Bacillus subtilis*, яка захищає бактерію від дії піоціаніну [19].

Оксид азоту ефективно запобігає також токсичній дії лактамних антибіотиків на *Bacillus subtilis*. Основною мішенню лактамних антибіотиків є процес біосинтезу компонентів клітинної стінки, хоча є і інші механізми дії. Наприклад, ампіцилін пригнічує ріст *E. coli* шляхом індукції оксидативного стресу. На користь цього свідчить зниження бактерицидного ефекту лактамів за присутності хелатора заліза біпіридилу або гасника реактивних форм кисню тіосечовини. Так як  $\text{NO}/\text{NO}^+$  захищають бацили від оксидативного стресу і не реагують з лактамами безпосередньо, автори зробили припущення, що активність в NOS забезпечує захист бактерій від лактамів шляхом супресії оксидативного стресу [19].

### Регуляторні функції оксиду азоту у бактерій

У прокаріотів оксид азоту також бере участь у регуляторних процесах. Ця функція реалізується через пряму взаємодію з металокофакторами, або шляхом S-нітрозування залишків цистеїну. У ссавців  $\text{NO}$ , як відомо, регулює активність фосфатаз, кіназ і транскрипційних факторів, таких як  $\text{NIF-1}$ ,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , і  $\text{RHP-Keap1}$  за допомоги S-нітрозилування [32, 33]. У бактерій також були знайдені деякі  $\text{NO}$ -залежні транскрипційні фактори:  $\text{NogR}$ , який активує три різних фермента, що беруть участь у метаболізмі  $\text{NO}$  ( $\text{NO}$  редуктаза, флаворубредоксин, флавогемоглобін);  $\text{NsrR}$  — сенсор  $\text{NO}$  і/або нітритів, який активує залежні від  $\text{NO}$  захисні механізми клітини;  $\text{NngR}$ , що активує транскрипцію генів денітрифікації у присутності  $\text{NO}$  [47]. Крім того, були знайдені ще кілька інших транскрипційних регуляторів. Це  $\text{SoxR}$ ,  $\text{OxyR}$ ,  $\text{FNR}$ ,  $\text{MetR}$ , і  $\text{Fur}$ , хоча основна функція кожного з них полягає у реагуванні на інші сигнали (супероксид, перекис водню, кисень, гомоцистеїн і залізо, відповідно) [47]. Деякі бактеріальні сенсорні кінази характерні тільки для *Mycobacterium tuberculosis*, наприклад,  $\text{DosS}/\text{DosT}$ , які є редокс та гіпоксичними сен-



сорами [28] і Н-NOX-гістидинкіназа, яка є датчиком зв'язування NO [39]. У бактерій багато різних систем, чутливих до оксиду азоту, тому і відповідь регуляторних систем на цей агент може бути різноманітною. Продукція NO синтетазою оксиду азоту у *Bacillus subtilis* активує ген *bmp*, який кодує флавогемоглобін. Він бере участь у детоксикації оксиду азоту. Цей ген також регулює транскрипційні фактори, що містять Fe<sup>2+</sup>, та  $\sigma^B$  – основний стрес-регулятор бактеріальних клітин [34, 42]. В свою чергу оксид азоту регулює білки, які контролюються Fur, PerR, OhrR, Spx, та  $\sigma^B$  регулонами [22]. Транскрипційний фактор PerR контролює систему антиоксидантного захисту у *B. subtilis*, у тому числі ген каталази *katA* [21]. Вірогідно, що NO-залежна індукція PerR пов'язана із захистним ефектом синтетази оксиду азоту у *Bacillus* від окиснювального стресу. У *D. radiodurans* оксид азоту, який утворюється за допомоги синтетази оксиду азоту, є сигнальною молекулою, яка регулює гени, що відповідають за відновлення та проліферацію клітин після радіаційного пошкодження. За це відповідають деякі транскрипційні фактори, такі як *obg* [38]. Подібні аналоги існують і у ссавців. УФ-опромінення індукуює специфічну синтетазу азоту, що приводить до S-нітрозилування і активації транскрипційного фактору HIF-1 $\alpha$  [31].

Таким чином, бактеріальні синтетази оксиду азоту є аналогами цих ферментів у ссавців, хоча існують деякі відмінності у будові цього ензиму. У прокаріотів синтетаза оксиду азоту виконує захисну та регуляторні функції.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Adak S., Aulak K.S., Stuehr D.J. Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis* // J. Biol. Chem. — 2002. — V. 227, № 18. — P. 16167–16171.
2. Adak S, Bilwes A.M., Panda K. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2002. — V. 99, № 1. — P. 107–112.
3. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. // Biochem. J. — 2001. — V. 357, № 3. — P. 593–615.
4. Battista J.R. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans* // Annu. Rev. Microbiol. — 1997. — V. 51, № 2. — P. 203–224.
5. Bird L.E., Ren J., Zhang J., Foxwell N., Hawkins A.R., Charles I.G., Stammers D.K. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*. // Structure. — 2002. — V. 10, № 12. — P. 1687–1696.
6. Buddha M.R., Tao-Tao, Parry R.J., Crane B.R. Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase

and tryptophanyl-tRNA synthetase. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, № 48. — P. 49567–49570.

7. *Buddha M.R., Keery K.M., Crane B.R.* An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2004. — V. 101, № 45. — P. 15881–15886.

8. *Buddha M.R., Crane B.R.* Structures of tryptophanyl-tRNA synthetase II from *Deinococcus radiodurans* bound to ATP and tryptophan: Insight into subunit cooperativity and domain motions linked to catalysis. // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280, № 36. — P. 31965–31973.

9. *Buddha M.R., Crane B.R.* Structure and activity of an aminoacyl-tRNA synthetase that charges tRNA with nitro-tryptophan. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2005. — V. 12, № 3. — P. 274–275.

10. *Cabello P., Roldan M.D., Moreno-Vivian C.* Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. // *Microbiol.* — 2004. — V. 150, № 11. — P. 3527–3546.

11. *Carter G.T.* Direct biochemical nitration in the biosynthesis of dioxapyrrolomycin — a unique mechanism for the introduction of nitro-groups in microbial products. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* — 1989. — V. 404, № 11. — P. 1271–1273.

12. *Chartier F.J.M., Couture M.* Resonance Raman spectra of the nitric oxide complexes of the nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus* reveal pterin-induced structural modifications of the heme. // *Biophys. J.* — 2005. — v. 88, № 1. — P. 390A–400A.

13. *Chen Y.J., Rosazza J.P.N.* A bacterial, nitric oxide synthase from a *Nocardia* species. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1994. — V. 203, № 2. — P. 1251–1258.

14. *Crane B.R., Sudhamsu J., Patel B.A.* Bacterial nitric oxide synthases. // *Annu. Rev. Biochem.* — 2010. — V. 79, № 4. — P. 445–470.

15. *Fawcett P., Paddon C.* The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. // *J. Bacteriol.* — 2003. — V. 185, № 1. — P. 243–253.

16. *Feng Ch., Roman L.G., Hazzard J.T., Ghosh D.K., Tollin G., Masters B.S.S.* Deletion of the autoregulatory insert modulates intraprotein electron transfer in rat neuronal nitric oxide synthase. // *FEBS Lett.* — 2008. — V. 582, № 18. — P. 2768–2772.

17. *Gusarov I., Nudler E.* NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* — 2005. — V. 102, № 39. — P. 13855–13860.

18. *Gusarov I., Starodubtseva M., Wang Z.Q., McQuade L., Lippard S.J., Stuehr D.J., Nudler E.* Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283, № 19. — P. 13140–13147.

19. *Gusarov I., Shatalin K., Starodubtseva M., Nudler E.* Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. // *Science.* — 2009. — V. 325, № 5946. — P. 1380–1384.



20. Healy F.G., Wach M., Krasnoff S.B., Gibson D.M., Loria R. The *txtA,B* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. // *Mol. Microbiol.* — 2000. — V. 38, № 4. — P. 794–804.

21. Helmann J.D., Wu M.F.W., Gaballa A., Kobel P.A., Morshedi M.M., Fawcett P., Paddon C. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors // *J. Bacteriol.* — 2003. — V. 185, № 1. — P. 243–253.

22. Hochgröf F., Wolf C., Fuchs S., Liebeke M., Lalk M., Engelmann S., Hecker M. Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. // *J. Bacteriol.* — 2008. — V. 190, № 14. — P. 4997–5008.

23. Jansson E., Lindblad P. Cloning and molecular characterization of a presumptive *argF*, a structural gene encoding ornithine carbamoyl transferase (OCT), in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. // *Physiol. Plant.* — 1998. — V. 103, № 3. — P. 347–353.

24. Johnson E.G., Krasnoff S.B., Bignell D.R.D., Chung W.-C., Tao T., Parry R.J. 4-Nitrotryptophan is a substrate for the non-ribosomal peptide synthetase *TxtB* in the thaxtomin. A biosynthetic pathway *mmi 6780*. // *Mol. Microbiol.* — 2009. — V. 73, № 3. — P. 409–418.

25. Jung Ch., Stuehr D.J., Ghosh D.K. FT-infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch mode of iNOS oxygenase domain: Effect of arginine and tetrahydrobiopterin. // *Biochem.* — 2006. — V. 45, № 5. — P. 1480–1489.

26. Kers J.A., Wach M.J., Krasnoff S.B., Widom J., Cameron K.D., Bukhalid R.A., Gibson D.M., Crane B.R., Loria R. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. // *Nature.* — 2004. — V. 429, № 6987. — P. 79–82.

27. Koppenol W.H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. // *Free Radic. Biol. Med.* — 1998. — V. 25, № 4–5. — P. 385–391.

28. Kumar A., Toledo J.C., Patel R.P., Lancaster J.R.Jr., Steyn A.J.C. *Mycobacterium tuberculosis* *DosS* is a redox sensor and *DosT* is a hypoxia sensor. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104, № 28. — P. 11568–11573.

29. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., et. al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. // *Nature.* — 1997. — V. 390, № 6657. — P. 249–256.

30. Li D., Hayden E.J., Panda K., Stuehr D.J., Deng H., Rousseau L., Yeh S.N. Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide. // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, № 12. — P. 8197–8204.



31. Li F., Sonveaux P., Rabbani Z.N., Liu S., Huang Q., Li C-Yu. Regulation of HIF-1 $\alpha$  stability through S-nitrosylation // *Mol. Cell.* — 2007. — V. 26, № 1. — P. 63–74.
32. Lia C-Q, Kima M.Y Godoya L.C., Thiantanawata A., Trudela L.J., Wogan G.N. Nitric oxide activation of Keap1/Nrf2 signaling in human colon carcinoma cells. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2009. — V. 106, № 34. — P. 14547–14551.
33. Marshall H.E., Merchant K, Stamler J.S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. // *FASEB J.* — 2000. — V. 14, № 13. — P. 1889–1900.
34. Moore C.M., Nakano M.M., Wang T., Ye R.W., Helmann J.D. Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. // *J. Bacteriol.* — 2004. — V. 186, № 14. — P. 4655–4664.
35. Morita H., Yoshikawa H., Sakata R., Nagata Y., Tanaka H. Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. // *J. Bacteriol.* — 1997. — V. 179, № 24. — P. 7812–7815.
36. Pant K., Bilwes A.L., Adak S., Stuehr D.J., Crane B.R. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. // *Biochem.* — 2002. — V. 41, № 37. — P. 11071–11079.
37. Pant K., Crane B.R. Nitrosyl—heme structures of *Bacillus subtilis* nitric oxide synthase have implications for understanding substrate oxidation. // *Biochem.* — 2006. — V. 45, № 8. — P. 2537–2544.
38. Patel B.A., Moreau M., Widom J., Chen H., Yin L., Hua Y., Crane B.R. Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — V. 106, № 43. — P. 18183–18188.
39. Price M.S., Chao L.Y., Marletta M.A. *Shewanella oneidensis* MR-1 H-NOX regulation of a histidine kinase by nitric oxide. // *Biochem.* — 2007. — V. 46, № 48. — P. 13677–13683.
40. Raman C.S., Martasek P., Masters B.S.S. Structural themes determining function in nitric oxide synthases. // In: *The Porphyrin Handbook*. Eds. Kadish K. M., Smith K. M., Guillard R. N.Y.: 2000. — Acad. Press. — P. 293–339.
41. Roman L.J., Masters B.S.S. Electron transfer by neuronal nitric-oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, № 32. — P. 23111–23118.
42. Rogstam A., Larsson J.T., Kjelgaard P., von Wachenfeldt C. Mechanisms of adaptation to nitrosative stress in *Bacillus subtilis*. // *J. Bacteriol.* — 2007. — V. 189, № 8. — P. 3063–3071.
43. Schneiker S., Perlova O., Kaizer O., Gerth K. et al. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. // *Nat. Biotech.* — 2007. — V. 25, № 11. — P. 1281–1289.



44. *Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., Shatalina Y., McQuade L.E., Lippard S.J., Nudler E.* *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* — 2008. — V. 105, № 3. — P. 1009–1013.

45. *Sparks J.P., Dzikovski B., Crane B.R., Gibson D.M., Loria R.* Plant-pathogenic *Streptomyces* species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals. // *Chem. Biol.* — 2008. — V. 15, № 1. — P. 43–50.

46. *Spiro S.* The nitric oxide response of *Escherichia coli*. // *Nitric Oxide.* — 2006. — V. 14, № 2. — P. A20–A12.

47. *Spiro S.* Regulators of bacterial responses to nitric oxide. // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2007. — V. 31, № 2. — P. 193–211.

48. *Stuehr D.J., Santolini J., Adak S.* Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, № 35. — P. 3616–3617.

49. *Sudhamsu J., Crane B.R.* Structure and reactivity of a thermostable prokaryotic nitric-oxide synthase that forms a long-lived oxy-heme complex. // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, № 14. — P. 9623–9632.

50. *Sudhamsu J., Crane B.R.* Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? // *Trends Microbiol.* — 2009. — V. 17, № 5. — P. 212–218.

51. *Tewari R.K., Hahn E.J., Paek K.Y.* Uction of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng*. // *Plant Cell. Rep.* — 2008. — V. 27, № 3. — P. 563–573.

52. *Viator R.J., Rest R.F., Hildebrandt E., McGee D.J.* Characterization of *Bacillus anthracis* arginase: effects of pH, temperature, and cell viability on metal preference. // *BMC Biochem.* — 2008. — V. 9, № 1. — P. 1–15.

53. *Wang Z-Q., Wei Ch., Sharma T., Pant K., Crane B.R., Stuehr D.J.* A conserved val to ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, № 18. — P. 19018–19025.

54. *Wang Z-Q., Lawson R.J., Buddha M.R., Crane B.R.* Bacterial *flavodoxins* support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282, № 4. — P. 2196–2202.

55. *Wei Y., Zhou H., Sun Y., He Y., Luo Y.* Insight into the catalytic mechanism of arginine deiminase: Functional studies on the crucial sites. // *Proteins.* — 2007. — V. 66, № 3. — P. 740–750.

56. *White O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., et. al.* Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. // *Science.* — 1999. — V. 286, № 5444. — P. 1571–1577.

57. *Yamasaki H., Sakihama Y.* Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. // *FEBS Lett.* — 2000. — V. 486, № 1. — P. 89–92.





**Б.Н. Галкин, В.А. Иваница, Н.Б. Галкин**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СИНТЕТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА**

### **Реферат**

В статье представлен обзор современных научных публикаций о молекулярной структуре, механизмах синтеза NO, молекулярной биологии, генетики и биологических функциях бактериальных синтетаз оксида азота.

Ключевые слова: бактериальные синтетазы оксида азота, гены NO-синтетаз, регуляторная и сигнальная функция.

**B.M. Galkin, V.O. Ivanytsia, M.B. Galkin**

Odesa Mechnykov National University,  
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **BACTERIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE**

### **Summary**

The article provides the overview of modern scientific publications on the molecular structure, the mechanisms of synthesis of NO, molecular biology, genetics and biological function of bacterial nitric oxide synthase.

Key words: bacterial nitric oxide synthase, NO-synthase genes, regulation and signaling function.

