

УДК 577.21

ОКСИД АЗОТА В МЕТАБОЛИЗМЕ ГРИБОВ (ОБЗОР)

© 2021 г. С. Ю. Филиппович¹ *, Г. П. Бачурина¹

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: syf55@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.06.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

В обзоре суммированы последние данные об идентификации и синтезе оксида азота у грибов, а также механизмах действия NO у этих организмов, которые включают S-нитрозилирование и нитрование остатков аминокислот, инициирование разрывов ДНК, транскрипционную активацию генов и цГМФ-зависимый сигнальный путь. Особое внимание уделено NO-зависимой регуляции таких процессов как апоптоз и различные стрессовые ответы, прорастание спор, рост мицелия и дифференцировка грибов.

Ключевые слова: оксид азота, метаболизм грибов, дифференцировка, стресс, NO-синтаза, нитратредуктаза

DOI: 10.31857/S0555109921060039

Оксид азота — соединение, которое легко диффундирует через клеточные мембраны и обладает высокой реакционной способностью. Время полужизни молекулы внутри клеток составляет от 3 до 30 с в зависимости от начальной концентрации, а затем в присутствии воды и кислорода она превращается в нитрат и нитрит. Регулирующий эффект NO реализуется, прежде всего, в непосредственной близости от места его происхождения. Действие NO может изменяться в зависимости от концентрации — при низких концентрациях (несколько микромолей/кг ткани) соединение функционирует как сигнальная молекула, в более высоких концентрациях действует как защитный агент или токсический продукт окислительного метаболизма.

NO является медиатором, регулирующим целый ряд физиологических процессов у организмов, принадлежащих к разным таксономическим группам. У человека и животных NO участвует в функционировании и образовании кровеносных сосудов, гормональной регуляции, работе иммунной системы и нейротрансмиссии [1, 2]. У высших растений NO влияет на прорастание семян, созревание плодов, работу устьиц, развитие корневой системы, цветение, защиту от патогенов и апоптоз [3]. У бактерий NO участвует в регуляции денитрификации, вирулентности, подвижности, а также в образовании биопленок, восстановлении повреждений, вызванных УФ-радиацией, поглощении железа и адаптации к окислительному стрессу [4, 5]. Гораздо меньше изучена роль NO в

метаболизме грибов, но в последнее время число публикаций, посвященных этой теме, возросло [6–8].

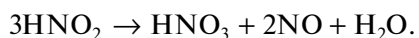
ИДЕНТИФИКАЦИЯ NO У ГРИБОВ

Образование NO в митохондриях [9] или клетках [10] дрожжей можно исследовать методами амперометрии, с использованием NO-чувствительного электрода Кларка, однако этот метод не получил широкого распространения для других грибов.

Для идентификации и функциональной оценки эндогенного оксида азота в клетках грибов применяют методы с использованием различных флуоресцентных индикаторов — 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуоресцеин диацетата (DAF-FM DA) [11–16] и диаминородамина (DAR-4M) [17]. Флуоресцентный краситель DAF-FM очень чувствителен к NO (предел обнаружения — 3 нМ), а DAF-FM DA способен пассивно диффундировать через клеточные мембраны и, проникнув в клетку, превращается эстеразами в DAF-FM [18].

Эффект, наблюдаемый после добавления доноров оксида азота, а также ингибиторов NO-синтазы млекопитающих и скавенджеров NO, является показателем синтеза оксида азота в клетках грибов [11–13, 19–22]. В качестве соединений, генерирующих оксид азота в растворах (доноров NO), используют молсидомин [23], нитропруссид натрия (SNP) [12, 20, 21, 24–26], S-нитрозо-N-ацетилпенициламин (SNAP) [25], S-нитрозоцистеин

(SNC) [27], S-нитрозо-N-ацетилцистеин (SNAC) [27], S-нитрозоглутатион (GSNO) [27–29], диэтилентриамин (DETA) [30], 2,2-(гидроксиинитрозогидразино)-бисэтанамин [31] и диэтилентриамин-NO-ат [32]. При низких значениях pH донором NO может служить нитрит натрия, при этом нитрозирующим агентом является протонированная азотистая кислота (pK_a 3.4) [27]:



NO доноры – гетерогенная группа молекул, способная выделять NO или его производные, такие как нитроксильный анион или катион нитрозония. Учитывая тот факт, что многие NO доноры в определенных концентрациях нетоксичны для клеток млекопитающих, в последнее время для борьбы с микотоксинами и токсигенными грибами внимание исследователей привлекли наноматериалы, выделяющие это соединение [33]. Применение оксида азота в комбинации с наночастицами повышает стабильность, улучшает адресную доставку и контролируемое и долгосрочное высвобождение NO [34].

Для ингибирования NO-синтазной активности, ответственной за реакцию взаимодействия кислорода и L-аргинина с образованием оксида азота и L-цитруллина, у грибов применяют нитро-L-аргинин [11, 21, 29], метил-L-аргинин ацетат (L-NMMA) [11], аминоксидин [20, 36], метиловый эфир N-нитро-L-аргинина (L-NAME) [10, 12, 20, 35], L-N6-(1-иминоэтил)-лизин (L-NIL) [35], 1-[2-(трифтор-метил)фенил]имидазол (TRIM) [13]. Сквавенджерами NO могут служить оксигемоглобин Fe(II) [27] и 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид (сРТИО) [16, 36, 37].

УЧАСТИЕ NO В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ У ГРИБОВ

Апоптоз и стресс. Избыточное количество оксида азота может привести к повреждению клеток и вызвать апоптоз. Получены свидетельства об участии NO в апоптозе, индуцированном пероксидом водорода, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [10, 38]. Для этого же гриба показано, что NO в низких концентрациях оказывает цитопротекторный эффект при стрессе, вызванном повышением температуры или гидростатического давления [39]. В условиях гипоксии митохондрии *S. cerevisiae* способны к NO₂-зависимому синтезу NO при участии флавогемоглобина YHb и цитохром-с-оксидазы [9], причем изоформы последнего фермента по-разному влияют на продукцию NO в зависимости от концентрации кислорода [40]. Получены также данные, свидетельствующие о синтезе NO из Arg в клетках этих дрожжей в ответ на тепловой стресс [41].

NO способен защитить клетки шампиньона двуспорового *Agaricus bisporus* от окислительного стресса [31]. Обработка донором NO, 2,2-(гидроксиинитрозогидразино)-бисэтанамин, уменьшила окислительное повреждение в собранных плодовых телах. При этом NO снижает содержание супероксид-радикала и H₂O₂, ингибирует полифенолоксидазу и активирует такие антиоксидательные ферменты как каталаза, супероксиддисмутаза и аскорбатпероксидаза.

При тепловом стрессе оксид азота эффективно уменьшает окислительное повреждение в мицелии вешенки степной *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* [14] и *Trichoderma harzianum* LTR-2 [37]. Обнаружено также при данном виде стресса увеличение экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока, у *Ganoderma oregonense* [42].

NO может служить регулятором метаболизма металлов у грибов, причем его действие зависит от концентрации соединения. NO в низких концентрациях защищает клетки *S. cerevisiae* от токсичности ионов Cu²⁺, однако при обработке высокими концентрациями NO наблюдали противоположный эффект [43]. При этом происходило изменение активности Cu-зависимого фактора транскрипции Ace1, что может свидетельствовать об участии оксида азота в метаболизме Cu у этого гриба. При добавлении NO к мицелию *P. eryngii*, обработанному высокими концентрациями Cd²⁺, отмечено увеличение биомассы [44]. На основании анализа секвенирования РНК установлено, что увеличение толерантности к кадмию обусловлено активацией ряда оксидоредуктаз, дегидрогеназ, трансфераз и транскрипционных факторов в присутствии экзогенного NO. Защитный эффект оксида азота от токсичного Cd²⁺ выявлен также у трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* [45]. В мицелии этого гриба под действием кадмия образуются H₂O₂ и O₂⁻, а также запускается перекисное окисление липидов. Однако обработка 100 мМ SNP (донор NO) предотвращает эти процессы и активирует пероксидазу и каталазу.

Показано, что в условиях нитрозативного стресса, вызванного присутствием NO, выделяющегося при обработке клеток DETA паразита-некротрофа *Botrytis cinerea*, основной системой детоксикации NO служит флавогемоглобин BCFHG1 [30]. Флавогемоглобины являются NO-оксидоредуктазами, известными также как NO-диоксигеназы (КФ 1.14.12.17). Эти ферменты катализируют превращение NO в NO₃⁻ в присутствии НАДФН, ФАД и O₂.

Взаимодействие грибов. Оксид азота может быть вовлечен в механизм взаимодействия различных видов грибов. Показано, что в ответ на обработку элиситором, выделенного из аскомицета *Alternaria alternata*, в клетках базидиомицета

Таблица 1. Участие оксида азота в физиологических процессах у грибов

Гриб	Процесс, чувствительный к NO	Ссылка
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	H ₂ O ₂ -индуцированный апоптоз, гипоксия в митохондриях, стресс	[10], [9], [40], [39], [28]
<i>Agaricus bisporus</i> <i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>tuoliensis</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Trichoderma harzianum</i> LTR-2 <i>Ganoderma oregonense</i>	Окислительный, тепловой, нитрозативный стресс	[31] [14] [30] [37] [42]
<i>Pleurotus eryngii</i> <i>Ganoderma lucidum</i> <i>S. cerevisiae</i>	Толерантность к кадмию Толерантность к меди	[44] [45] [43]
<i>Candida tropicalis</i>	Образование псевдомицелия	[23]
Взаимодействие между различными видами грибов	Генерация NO клетками базидиомицета в ответ на обработку элиситором из аскомицета NO-индукция биосинтеза стирилпирона	[36] [81]
<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Colletotrichum coccoides</i> <i>Aspergillus niger</i> , <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Penicillium italicum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Magnaporthe oryzae</i> <i>Puccinia striiformis</i> <i>Westend f. sp. tritici</i>	Выживание и прорастание спор, рост мицелия	[22] [25] [27] [11] [46] [26], [74] [17] [47]
<i>Phycomyces blakesleanus</i> <i>Flammulina velutipes</i> <i>Coniothyrium minitans</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Blastocladiella emersonii</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Дифференцировка	[19] [20] [12], [21] [30] [22], [32], [51], [53] [13] [24], [52], [29], [35], [16] [75]

Inonotus obliquus происходит генерация NO [36]. Очевидно, оксид азота является медиатором элиситора, приводящего к активации фенилаланин-аммиак-лиазы и увеличению биосинтеза антиоксидантных полифенолов у чаги скошенной *I. obliquus*. Авторы предположили, что при взаимодействии этих грибов NO участвует в сигнальном пути, независимом от действия оксипинов.

Прорастание спор и рост мицелия. NO подавляет образование псевдомицелия у дрожжей *Candida tropicalis* [23].

В диплоидных клетках аспергилла гнездового *Aspergillus nidulans* NO, образованный донором SNP, способен ингибировать рост мицелия при концентрациях SNP от 40 до 320 мкМ. Процесс сопровождался индукцией митотического кроссинговера [22].

При pH 4.5 обработка 2 мМ нитритом в течение 24 ч уменьшает прорастание спор патогенного гриба *Aspergillus fumigatus* на 23%, а при увеличении концентрации до 5 мМ через 16 ч наблюдается гибель 100% спор [27]. Нитрозо-производные глутатиона, SNC, SNAP и SNAC также губительны для

этих спор, но в меньшей степени. В противоположность этому GSNO не обладал фунгицидным действием, а наоборот, стимулировал прорастание спор.

Фунгицидную активность газообразного NO сравнили в опытах *in vitro* с патогенными грибами, развивающимися на растениях после сбора урожая. Обработке подвергали такие грибы как *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* (возбудитель бурой гнили косточковых плодов) и *Penicillium italicum* (поражает плоды цитрусовых) [46]. Кратковременная обработка оксидом азота (50–500 мкл/л) ингибировала прорастание спор и рост мицелия, что позволило предложить NO в качестве природного фунгицида при хранении фруктов и овощей. Сходные результаты получены для *Penicillium expansum*, другого патогенного гриба, также поражающего фруктовые плоды [26]. Оксид азота, выделяющийся при действии 6 мМ SNP, ингибировал рост мицелия. Авторы обнаружили, что экзогенный NO в высоких концентрациях индуцирует образование активных форм кислорода (АФК), которые способны вызвать окислительное повреждение белков, необходимых для прорастания спор этих грибов. Вместе с тем, при индукции внутриклеточного синтеза NO у *S. cerevisiae*, вызванного добавлением синтетического фунгицидного гесапептида PAF26, аккумуляции АФК не наблюдалось [15]. В присутствии ингибитора NO-синтазы, L-NAME, происходило частичное восстановление роста дрожжей, обработанных PAF26.

В опытах *in vitro* NO, образованный донорами SNP и SNAP, активировал прорастание, но уменьшал жизнеспособность бластоконидий у *Candida albicans* [25], причем действие NO на споры было более заметным при кислых, чем при щелочных pH. Примечательно, что бластоконидии оказались более чувствительными к действию NO, чем гифы мицелия.

АФК и NO координированно регулируют прорастание спор и последующий рост зародышевых трубок ржавчинного гриба, *Puccinia striiformis Westend f. sp. tritici* [47]. По-видимому, в контроле прорастания трубок NO действует только совместно с АФК, так как повышение или снижение уровня одного из компонентов оказывает негативное влияние на процесс, тогда как накопление высокого уровня и NO, и АФК обеспечивало нормальный рост гриба. Очевидно, что для регулирования прорастания необходим определенный баланс NO и АФК. При достижении этого баланса как NO, так и АФК предпочтительно локализируются в порах и апексе растущих зародышевых трубок и влияют на их полярный рост.

Обработка аскомицета *Trichophyton rubrum* интенсивным импульсным светом с длиной волны 420 нм приводила к увеличению уровня NO в

клетках и ингибированию их роста по сравнению с контролем *in vitro* [48].

Аккумуляция NO выявлена на всех стадиях прорастания конидий *Colletotrichum coccoides*, вызывающего антракноз у томатов [11]. Вместе с тем, добавление экзогенного NO ингибировало прорастание спор этого гриба, а обработка ингибиторами нитро-L-аргинином и L-NMMA в разной степени ускоряла процесс, указывая на регуляторную роль NO в прорастании спор.

Применение флуоресцентного красителя DAR-4M и NO-скавенджеров позволило выявить синтез NO при прорастании и на ранних стадиях развития *Magnaporthe oryzae*, аскомицета, вызывающего гниль риса [17]. Вместе с тем, делеция ряда генов, кодирующих ферменты, потенциально ответственные за синтез этого соединения, не сказывается на генерации NO. Флуоресцентные сигналы, обнаруженные после действия DAF-FM DA, также свидетельствовали о возможности вовлечения NO в процесс прорастания спор и созревания аппрессориев у этого гриба [49].

Обработка *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* донором NO SNP приводила к дозо-зависимому уменьшению прорастания конидий и увеличению скорости роста мицелия [50]. Регуляция роста мицелия оксидом азота сопровождалась изменением образования супероксид аниона.

Дифференцировка грибов. В литературе приводятся данные о действии NO как сигнальной молекулы, контролирующей дифференцировку грибов, принадлежащих к различным таксономическим группам.

NO при участии L-Arg и cGMP влияет на конидиогенез митоспорового гриба *Coniothyrium minitans* [12, 21], паразитирующего на склероциях грибов – нитроаргинин ингибирует образование пикнидий, а добавление SNP приводит к образованию спор у дефицитного по конидиогенезу мутанта. Наибольшая концентрация NO выявлена в мицелии на стадии инициации пикнидий (72 ч постинкуляции).

Майер с соавт. [19] изучили действие SNP – донора NO, и L-NAME – ингибитора NO-синтазной активности, на образование спорангиофоров у зигомицета *Phycomyces blakesleeanus*. Указанные соединения действовали противоположным образом на формирование микро- и макроспорангиофоров: под действием SNP отмечено увеличение числа макроструктур и уменьшение числа микроструктур, а в присутствии L-NAME выявлена обратная зависимость, причем процесс был гораздо сильнее выражен при макроспорангиогенезе.

Корейские исследователи обнаружили стимуляцию образования плодовых тел в присутствии SNP у базидиомицета *Flammulina velutipes* и подавление процесса при добавлении L-NAME и аминоксидина [20].

Виера с соавт. [13], используя флуоресцентный индикатор DAF-FM DA, выявили образование *NO при споруляции водного хитридиомицета *Blastocladiella emersonii*. Если обработку клеток флуоресцентным детектором проводили в присутствии NO-синтазного ингибитора L-NAME, то интенсивность зеленого флуоресцентного сигнала резко снижалась. Применение количественного хемилюминесцентного анализа подтвердило, что при индукции образования подвижных зооспор происходило увеличение внутриклеточных продуктов, являющихся производными NO, почти в 3 раза.

В работе Пенгкита с соавт. [16] для идентификации и функциональной оценки эндогенного NO у аскомицета *Neurospora crassa* также был использован метод с этим же флуоресцентным индикатором. Степень флуоресценции, показывающая уровень внутриклеточного содержания оксида азота, сильно возрастала в гифах мицелия при росте в погруженной культуре, а также в конидиофорах при конидиогенезе в поверхностной культуре. Авторы также показали, что обработка мицелия NO-скавенджером, сРТЮ, приводила к резкому уменьшению уровня транскрипции генов *con-10* и *con-13*, экспрессия которых возрастает при конидиогенезе. Авторы предположили, что оксид азота образуется внутри молодых растущих гиф и участвует в формировании конидий.

Под действием NO, генерированного донором SNP, происходило уменьшение образования конидий у аскомицета *A. nidulans* [22]. Позднее было показано, что у этого гриба синтез эндогенного NO возрастал на ранних стадиях дифференцировки, при переходе от вегетативного роста к конидиогенезу и добавление экзогенного NO служило индуктором этого перехода [51]. Уровень NO определял баланс между бесполом и половым циклами *A. nidulans* — искусственное повышение концентрации NO приводило к уменьшению конидиогенеза и индукции образования плодовых тел, клейстотециев, содержащих аскоспоры [32, 51].

Грибы могут обладать разной чувствительностью к NO в зависимости от стадии дифференцировки. Так, обработка клеток *Bacillus cinerea* [30] экзогенным NO, образованным донором DETA, приводит к изменению экспрессии гена, ответственного за синтез флавогемоглобина в мицелии и спорах. Установлено, что данный белок участвует в детоксикации NO, превращая активный NO радикал в нитрат. При обработке NO максимальная экспрессия гена, кодирующего этот белок, отмечена в прорастающих конидиях *B. cinerea*, но отсутствовала в растущем и активно ветвящемся мицелии.

В связи с тем, что свет является важным регуляторным фактором целого ряда жизненных циклов грибов, особый интерес представляет изуче-

ние роли оксида азота в трансдукции фотосигнала у *P. blakesleeanus* [19], *F. velutipes* [20], *N. crassa* [16, 24, 52] и *A. nidulans* [53].

Синий свет ингибирует образование микроспорангиофоров, но стимулирует формирование макроспорангиофоров у *P. blakesleeanus* [19]. Донор NO SNP способен замещать эффект активирующего действия света при макроспорангиогенезе, а ингибиторы NO-синтазной реакции подавлять его. Вместе с тем, свет индуцирует образование цитруллина из аргинина в наиболее важных для развития фазах роста — логарифмической фазе роста мицелия и при созревании макроспорангиофоров. Ингибирование биосинтеза тетрагидробиоптерина BH_4 , кофактора NO-синтазы (NOS), приводило к ингибированию фотоморфогенеза. При дифференцировке поверхностной культуры *P. blakesleeanus* значения удельной активности фермента в экстрактах мицелия и скорость образования NO в клетках гриба, измеренная хемилюминесцентной детекторной системой, были сходны и составляли от 1 до 10 $\text{пмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$. Характерно, что образование цитруллина и эмиссия NO стимулировались светом и ингибировались при росте гриба на среде с 2,4-диамино-6-гидросипиримидином, ингибитором биосинтеза BH_4 . Авторы предположили, что NOS участвует в передаче светового сигнала при формировании спорангиев.

Перед образованием плодовых тел в освещенном мицелии опенка зимнего *F. velutipes* NO-синтазная активность возрастала в 72 раза [20], тем не менее оценить вклад действия света в этот процесс сложно, так как авторы не исследовали темновые контроли и, кроме того, одновременно с освещением культур изменили температурный режим с 18 до 10°C.

Результаты, полученные при действии SNP, экзогенного донора NO и специфических ингибиторов NOS, позволили предположить, что NO ингибирует светостимулируемое образование конидий у аскомицета *N. crassa* [24]. Наряду с этим, авторы, измерив превращение $^3\text{H-L}$ -аргинина в $^3\text{H-L}$ -цитруллин, выявили наличие NO-синтазной активности в клетках гриба. Следует отметить, что роль оксида азота в фотопроцессах *N. crassa* можно оценить по присутствию конечных продуктов распада NO, нитрата и нитрита, в мицелии и среде культивирования, используя определенные мутанты гриба [29, 52]. Клетки дикого типа *N. crassa* и других высших грибов обладают высокой активностью нитратредуктаз (НР) и нитритредуктаз (НнР), что позволяет им утилизировать нитрат и нитрит. В связи с этим измерение выхода этих ионов из клеток дикого типа невозможно, однако трудности можно избежать, используя мутанты, лишённые данных ферментов. Так, при использовании *nit-6* штамма *N. crassa*, в котором отсут-

ствует NiP, но осуществляется каталитическое превращение нитрата в нитрит, выход NO_2^- можно рассматривать как показатель суммарного содержания NO_3^- и NO_2^- вне клетки. Анализ динамики выхода ионов нитрита из мицелия в ходе фотоиндуцированного каротиногенеза [52] и фотостимулируемого конидиогенеза [29] *nit-6* штамма *N. crassa* свидетельствовал о возможном участии NO-генерирующего механизма в трансдукции фотосигнала гриба. Введение в среду культивируемого донора оксида азота, GSNO, ингибировало, а ингибитора NOS, нитро-L-аргинина, стимулировало фотоконидиогенез *N. crassa*, что указывает на участие NO в данном процессе. Вместе с тем, отсутствие выхода NO_2^- из мицелия этого же штамма в ходе светозависимого развития протоперитециев, предшественников женских половых структур, свидетельствует о малой вероятности вовлечения NO в половой процесс гриба. Таким образом, в зависимости от природы трех светорегулируемых процессов (индукция каротиногенеза, стимуляция бесполого или полового циклов) роль NO-генерирующего механизма в трансдукции фотосигнала *N. crassa* может отличаться. Вместе с тем, светозависимые изменения удельной активности NOS, определенные измерением превращения ^3H -L-аргинина в ^3H -L-цитруллин, в фотокаротиногенезе и фотоконидиогенезе *N. crassa* выявлены не были [35].

Действие света на *A. nidulans* в присутствии кислорода инициирует образование бесполого спор, а темновые условия и гипоксия приводят к образованию половых структур. Недавно у данного гриба выявлена светорегулируемая индукция образования NO [53]. Уровень NO возрастал при освещении мицелия, культивируемого на нитрате или Arg, и уменьшался в темноте. Свет активирует 2 гена, связанных с регуляцией уровня NO, — *fhhB*, кодирующий флавогемоглобин, и *agaA*, кодирующий аргиназу, контролирующую уровень внутриклеточного аргинина. Флавогемоглобин превращает NO в безопасный нитрат, а Arg может служить субстратом для NOS. Для светозависимой индукции указанных генов необходимо функционирование гена фитохрома *fphA*, а ген *lreA* действует как репрессор в присутствии Arg в среде. При дифференцировке гриба концентрация внутриклеточного Arg возрастает, причем более заметно при индукции полового развития, чем бесполого. Аргининовый метаболизм и свет контролируют уровень конидиогенеза. Делеция *fhhB* приводит к частичной потере световой регуляции конидиогенеза на среде с Arg или нитратом, в то время как делеция *fhhA* влияет на световую регуляцию только на среде с нитратом. Авторы предположили, что нитрат-регулируемый *fhhA* и свето-регулируемый *fhhB* необходимы для корректной световой регуляции конидиогенеза *A. nidulans*.

СИНТЕЗ NO В КЛЕТКАХ ГРИБОВ

Вопрос о природе генерации NO у грибов в значительной степени остается открытым. Синтез NO может осуществляться неэнзиматически и энзиматически. Неэнзиматически образование NO происходит из NO_2^- при низких значениях pH.

Известно, что у млекопитающих основным ферментом синтеза NO является NO-синтаза (КФ 1.14.13.396), представленная 3 формами, нейрональной (nNOS), индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS), кодируемыми разными генами [54]. Естественно, что по аналогии с млекопитающими наиболее вероятным претендентом на роль фермента, ответственного за синтез оксида азота у грибов, считался именно этот фермент. Однако вопрос о существовании NO-синтазной активности в клетках грибов до сих пор является дискуссионным. Оказалось, что типичные полноценные гены, кодирующие NOS млекопитающих, в геноме большинства грибов, как и у высших растений, отсутствуют. В связи с этим для обозначения энзима, осуществляющего функции NOS у этих организмов, иногда даже используется термин NO-синтазоподобная (NOS-like) активность. Вместе с тем, у некоторых из них активность фермента определяется изотопным методом, по превращению ^3H - или ^{14}C -L-аргинина в ^3H - или ^{14}C -L-цитруллин. Среди таких грибов — *N. crassa* [24, 35], *F. velutipes* [20], *P. blakesleeanus* [19], *S. cerevisiae* [10, 39], *B. emersonii* [13] и *C. mini-tans* [21].

Показано, что подобно ферменту млекопитающих, NOS *F. velutipes* использует в качестве кофакторов НАДФН, ФАД, ФМН и BH_4 , но в отличие от него, не нуждается в ионах Ca^{2+} и кальмодулине [20]. K_M и V_{\max} для данного фермента составляют 3.3×10^{-5} М и 2.4×10^{-4} $\mu\text{моль/мин/мг}$ белка соответственно, энзим ингибируется нитро-L-аргинином и аминогуанидином с величинами K_i 2.9×10^{-4} и 3.3×10^{-4} М соответственно. Авторы предполагают, что при действии этих ингибиторов, благодаря их низкому сродству к ферменту, происходит лишь задержка образования плодовых тел, но не полное ингибирование процесса. NOS *F. velutipes* представлена димером с молекулярной массой 100 кДа и имеет активность >500 $\mu\text{моль/мин/мг}$ белка (плодовые тела).

Активность NOS возрастает после обработки клеток дрожжей *S. cerevisiae* пероксидом водорода [10]. Кроме того, при этом наблюдается 2-кратное увеличение внутриклеточной концентрации L-Arg, что может быть определяющим фактором для синтеза NO при H_2O_2 -индуцированном апоптозе.

NO-синтазная активность выявляется в ходе споруляции хитридиомицета *B. emersonii* [13], достигая максимума через 150 мин после начала

процесса и снижаясь при добавлении ингибиторов фермента, L-NAME и TRIM. Фермент является Ca^{2+} -зависимым, обнаруживая в этом сходство с nNOS формой фермента млекопитающих.

Активность NOS гриба-паразита *C. minitans* достигала максимального уровня 20 пмоль/мин/мг белка на ранней стадии формирования пикнидий (72 ч постинкуляции) [21]. Это время совпадало с максимумом образования NO в клетках.

Данные о существовании различных форм NOS грибов, аналогичных формам, обнаруженным для фермента животных, немногочисленны. NO-синтазная активность аскомицета *N. crassa* по ряду свойств (чувствительность к ионам кальция, действие специфических ингибиторов фермента, Вестерн-блот анализ) сходна с iNOS формой фермента млекопитающих [35]. В работе использовали поликлональные антитела против iNOS изоформы фермента млекопитающих, иммуногеном для которых был C-концевой пептид, содержащий 14 аминокислот iNOS, полученный из макрофагов мыши. Молекулярная масса фермента составляет около 130 кДа, что близко к таковой для iNOS животных [55]. Использование моноклональных антител против nNOS позволило обнаружить конститутивную форму фермента с молекулярной массой 60 кДа у дрожжей *S. cerevisiae* [56, 57]. Домитрович с соавт. [39] выявили в экспоненциальной фазе роста этого же организма экспрессию nNOS, iNOS, и eNOS с молекулярными массами 160, 130 и 132 кДа, соответственно. Индуцированная NOS у этого гриба обладает изоформной специфичностью и зависит от метаболического состояния клеток и ответа на стресс. Молекулярная масса NOS *I. obliquus*, определенная изоферментным методом, составила 85 кДа для конститутивной и 110 кДа для индуцибельной форм фермента [58]. Совместное культивирование базидиомицета *I. obliquus* и трутового гриба *Phellinus morii* приводило к 5-кратному увеличению активности iNOS у первого гриба с последующим резким возрастанием образования NO [58]. По мнению авторов эта форма фермента может действовать как важный регулятор, влияющий на продукцию метаболитов фенилпропаноидов во время межвидовых взаимодействий между грибами.

Как указано выше, у грибов не удалось найти полноценный ген NOS животного типа. Вместе с тем, в грибных геномах *P. blakesleeanus* и *Magnaporthe grisea* обнаружен по крайней мере один фрагмент последовательности ДНК, сходный с таковым для NOS млекопитающих [13]. Сходные участки аминокислотных NO-синтазо-подобных последовательностей обнаружены в ходе анализа *in silico* у грибов *Aspergillus oryzae*, *Glomerella graminicola* и *Colletotricum gloeosporioides* [59]. Используя этот же метод, авторы выявили консерватив-

ные аминокислотные NO-синтазо-подобные последовательности у *Macrophomina phaseolina*. При помощи биоинформационного анализа в геноме базидиомицета *I. obliquus* были выявлены гены, имеющие определенное сходство с аналогичными генами, кодирующими конститутивную и индуцибельную формы NOS млекопитающих [58]. Недавно [16] в геноме *N. crassa* обнаружен ряд генов, имеющих высокую степень гомологии с генами NOS у других грибов и человека. Основываясь на их свойствах, авторы предположили возможность наличия различных путей синтеза NO (зависимого и независимого от NOS) у данного гриба.

У *M. oryzae* делеции ряда генов биосинтеза Arg, субстрата для NOS [49], а также генов NO-синтазо-подобной активности [17] не влияли на синтез NO, что также подтвердило возможность генерации NO у грибов независимым от NOS способом.

У дрожжей *S. cerevisiae* Arg-зависимое образование NO опосредовано флавопротеином Tah18 [41]. При этом в ответ на действие таких стрессоров как высокая температура, высушивание и замораживание/оттаивание происходит активация генов N-ацетилтрансферазы *MPR1* и пролиноксидазы *PUT1*, что ведет к значительному увеличению содержания Arg, являющегося субстратом NOS [41, 60]. Предполагают, что Tah18 белок гомологичен редуктазному домену NOS [61]. Установлено, что Tah18 переносит электроны от НАДФН на Fe-S кластеры Dre2 белка через ФАД и ФМН [62]. В условиях окислительного стресса Tah18-Dre2-комплекс распадается, что приводит к функциональному изменению Tah18 и электроны от НАДФН используются для синтеза NO. По-видимому, в условиях окислительного стресса Tah18-Dre2-комплекс может использоваться в качестве молекулярного переключателя для контроля синтеза NO, индуцируя апоптоз или защищая клетку дрожжей [61].

Корпас и Баррозо [63] в 2017 г. предложили для высших растений гипотезу, согласно которой L-Arg-зависимая NO-синтазо-подобная активность может быть результатом кооперативного действия нескольких различных ферментов, собранных в сложный комплекс. Предложенный механизм синтеза NO может существовать и у грибов.

Синтез NO может осуществляться не только NOS. Маркос с соавт. [51] обнаружили, что при дифференцировке *A. nidulans* синтез NO регулируется НР, причем ген *niaD*, кодирующий НР, активируется при индукции конидиогенеза даже в условиях репрессии азотом в присутствии аммония. Вместе с тем это не универсальный механизм, так как с использованием мутантов, дефицитных по НР и НиР, показано, что эти ферменты не участвуют в синтезе NO у аскомицета *M. oryzae* [17].

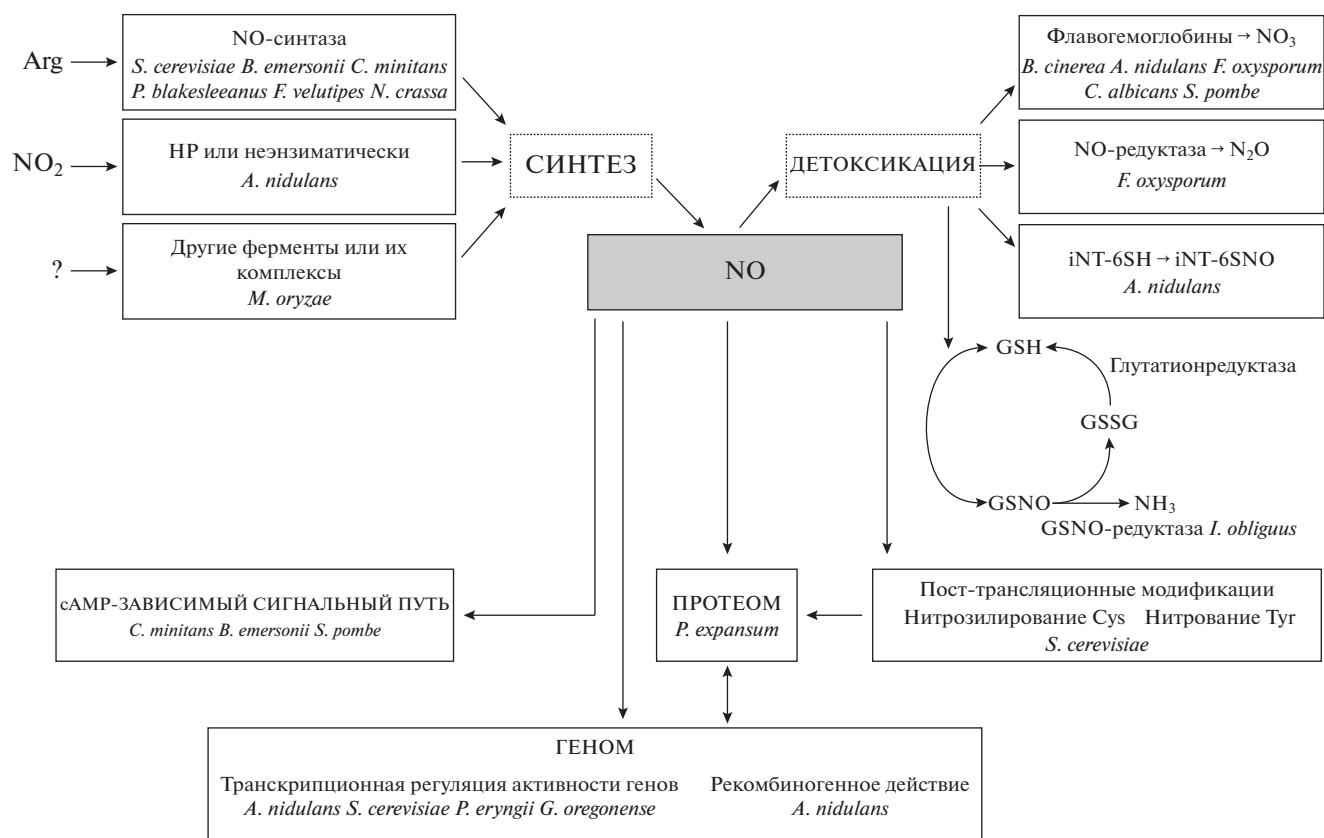


Рис. 1. Основные пути синтеза, действия и детоксикации оксида азота у грибов.

Установлено также, что НиР внутренней мембраны митохондрий грибов при участии НАДН способна восстанавливать NO^{2-} в NO [31]. Предполагают, что митохондриальные цитохром-с-оксидаза и НиР обеспечивают образование NO в условиях гипоксии или аноксии [9, 40].

Другими возможными кандидатами, ответственными за образование оксида азота у грибов, могут быть также ксантиноксидоредуктаза [64], p450:НАДФН-P450-редуктаза [17], некоторые мембраносвязанные ферменты [64, 65] или это может быть неэнзиматический синтез [66].

ПУТИ ДЕЙСТВИЯ NO У ГРИБОВ

Мишени для действия NO в клетках грибов разнообразны (рис. 1).

Геном. Образующийся из оксида азота в клетке пероксинитрит представляет собой сильный окислитель, который способен повреждать ДНК. Рекомбиногенный потенциал NO на клетки *A. nidulans* оценивали по действию SNP, экзогенного донора NO [22]. Это соединение стимулировало возникновение разрывов ДНК в G2 периоде деления. Авторы предполагают, что изменения интенсивности конидиогенеза *A. nidulans*, вызванные SNP, могут быть связаны с нарушением оксидом

азота транскрипционной активации структурных, специфичных для споруляции генов.

У дрожжей *Kluyveromyces lactis* после действия газообразного NO наблюдалось ингибирование ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора LAC9, содержащего “цинковый палец” [67]. Поскольку NO способен вызывать S-нитрозилирование тиолов цинк-серных кластеров, что приводит к обратимому разрушению структур “цинковых пальцев”, это обеспечивает молекулярный механизм для регулирования транскрипции генов.

Обработка дрожжей *S. cerevisiae* GSNO, донором NO, вызывала мягкий окислительный стресс и увеличение активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы [28]. Предполагают, что в транскрипционной активации синтеза этих ферментов участвует Yap1p, ключевой регулятор ответа дрожжей на окислительный стресс.

Для выявления механизма действия NO, связанного с повышением толерантности *P. eryngii* к тяжелым металлам, Ли с соавт. [21] использовали транскрипционный анализ. Авторы обнаружили значительное увеличение экспрессии 45 генов, кодирующих оксидоредуктазы, дегидрогеназы, редуктазы, трансферазы и факторы транскрипции, в образцах, обработанных экзогенным NO, что спо-

собствовало повышению устойчивости гриба к чрезвычайно высокому уровню кадмия. Наиболее многочисленными оказались гены, кодирующие ферменты, участвующие в окислительно-восстановительных процессах, включая предположительно пиридиннуклеотид-дисульфид-оксидоредуктазы, ацил-КоА-редуктазы, альдегиддегидрогеназу, сульфитредуктазу, оксалацетатдекарбоксилазу и формиатдегидрогеназу.

Насуно с соавт. [68] наблюдали у дрожжей *S. cerevisiae* под действием экзогенного NO индукцию экспрессии Cu-регулируемых генов, находящихся под контролем транскрипционного фактора Mac1, включая ген *CTR1*, кодирующий высокоаффинный транспортер меди. Оказалось, что NO усиливает связывание Mac1 с промоторами генов-мишеней. Обработка оксидом азота в условиях высокотемпературного стресса приводила к возрастанию ряда параметров – транскрипции гена *CTR1*, внутриклеточной концентрации меди, активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы и жизнеспособности клеток. Наряду с этим, NO не влиял на экспрессию гена *MAC1*, что, по мнению авторов, свидетельствует об активации Mac1 за счет NO-зависимой посттрансляционной модификации путем S-нитрозилирования и/или фосфорилирования. Вместе с тем у этих же дрожжей NO ингибировал активность Cu-регулируемого транскрипционного фактора Ace1, что приводило к ингибированию Cu-зависимой индукции гена *CUP1* [69]. Предполагают, что под действием оксида азота происходит модификация связывающих металлы тиолов Ace1, уменьшающая способность фактора связывать медь.

Чен с соавт. [42] сравнили транскриптом мицелия *Ganoderma oregonense*, подвергнутого тепловому стрессу (32°C) и воздействию экзогенного NO, с таковым, полученным в условиях регуляции NO при нормальной температуре культивирования. В дополнение к усилению регуляции генов, кодирующих белки теплового шока (HSP), в условиях теплового стресса по сравнению с контролем, после обработки NO был выявлен ряд новых HSP – HSP 78, HSP 70, HSP 104, HSP 30 и HSP C4. Предполагают, что NO активирует HSP для защиты *G. oregonense* от абиотического стресса. Кроме того, тепловой стресс приводит к увеличению экспрессии генов, регулирующих активность оксидазы D-аминокислот и оксидоредуктазы.

S-Нитрозилирование и нитрование остатков аминокислот. NO-зависимые пост-трансляционные модификации могут изменять функциональную активность белков, участвующих в сигнальной трансдукции при разных физиологических и стрессовых условиях. Взаимодействие NO с белками способно приводить к S-нитрозилированию Cys остатков или нитрованию остатков Tug.

Выше уже упоминалось о том, что NO может быть использован в ответах клеток грибов на разные типы стресса. Так, на основании активации синтеза NO и S-нитрозилирования глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, а также корреляции между уровнем внутриклеточной концентрации супероксидных анионов и образованием NO, Альмейда с соавт. [10] предположили участие NO в передаче сигнала при H₂O₂-индуцированном апоптозе *S. cerevisiae*. Ингибирование синтеза NO при помощи L-NAME привело к уменьшению S-нитрозилирования фермента, увеличению уровня АФК и выживаемости клеток. Оксид азота, синтезированный в митохондриях этих дрожжей, участвует в передаче сигнала в других стрессовых условиях – при гипоксии, вызывая увеличение уровня экспрессии гена гипоксии *CYC7*, которое сопровождается возрастанием нитрования Tug в белке [9]. Авторы обнаружили, что митохондрии дрожжей продуцируют NO при концентрации растворенного кислорода ниже 20 μM. Процесс катализируется цитохром-с-оксидазой и является pH-зависимым. Предполагают существование механизма положительной обратной связи, при котором NO, образованный в митохондриях, индуцирует экспрессию гена *COX5b*, кодирующего 5b-субъединицу цитохром-с-оксидазы, увеличивающую продукцию оксида азота в условиях гипоксии [40].

Известно, что в противоположность S-нитрозилированию нитрование Tug осуществляется не оксидом азота, а продуктом его взаимодействия с супероксидом ($O_2^{\bullet-}$) – пероксинитритом (ONOO⁻) [70]. Предполагают, что нитрование Tug изменяет такие свойства аминокислоты как редокс-потенциал, объем, гидрофобность и pK(a) фенольной группы, что в свою очередь, может привести к глубоким изменениям структурных и функциональных свойств белка [71], определяя участие NO в широком спектре сигнальных и регуляторных процессов.

Использование двумерного гель-электрофореза с последующим Вестерн-блот-анализом позволило выявить нитрование цитозольных и митохондриальных белков *S. cerevisiae* [72]. Среди 8 белков митохондрий, подвергшихся нитрованию, 2 были идентифицированы как аконитаза и изоцитратдегидрогеназа. Позднее Канг с соавт. [73] изучили нитропротеомный профиль у этих же дрожжей и нашли изменения в состояниях нитрования 14 белков, участвующих в передаче сигнала спаривания – α-фактора. Показано, что вокруг нитрованных остатков Tug группировались остатки таких аминокислот как Asp, Glu и His. Предполагают, что остатки Tug нитруются легче, когда остатки кислых аминокислот находятся в непосредственной близости, а также что конформационные изменения при нитровании при-

Таблица 2. NOS грибов, выявленная изотопным методом

Гриб	Факторы, влияющие на активность NO синтазы	Стадии развития, чувствительные к соединениям, влияющим на NO-синтазу	Ссылка
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (аскомицет)	Концентрация H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ -индуцированный апоптоз	[10]
<i>Blastocladiella emersonii</i> (хитридиомицет)	Концентрация кальция	Образование зооспор	[13]
<i>Coniothurium minitans</i> (митоспоровый гриб)	Время роста	Развитие пикнидий	[21]
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> (зигомицет)	Синий свет (стимуляция NO синтазной активности <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>)	Светостимулируемое образование макроспорангиофоров (SNP заменяет свет; L-NAME ингибирует)	[19]
<i>Flammulina velutipes</i> (базидиомицет)	Свет, понижение температуры	Формирование плодовых тел (SNP стимулирует; L-NAME и аминокислоты ингибируют)	[20]
<i>Neurospora crassa</i> (аскомицет)	Синий свет	Бесполое развитие – светостимулируемое образование конидий (SNP ингибирует; L-NAME и нитроаргинин стимулируют)	[24], [35]

водят к тому, что остатки нитротирозина оказываются спрятанными внутри молекулы белка.

Протеом. Лай с соавт. [74] использовали протеомный подход для оценки механизма действия экзогенного NO при прорастании спор *P. expansum*. Методами двумерного электрофореза и масс-спектрометрии было показано, что после обработки спор NO происходило увеличение активности глутаминсинтетазы, амидогидролазы, нитрилаз, диоксигеназы оксида азота и HSP 70, а также уменьшение активности тетраэрикопептидного структурного повтора, УДФ-N-ацетилглюкозамин пирофосфорилазы, энолазы, HSP 60 и K-гомологичного РНК-связывающего домена.

cGMP-зависимый сигнальный путь. NO способен изменять физиологический ответ клеток через cGMP-зависимый сигнальный путь за счет активации растворимой гуанилатциклазы [75]. Реализация данного пути обнаружена при конидиогенезе *C. minitans* [21] и биогенезе зооспор в водной культуре *B. emersonii* [13]. При дифференцировке *C. minitans* динамика изменения активности NOS была сходна с таковой для уровня cGMP, причем самая высокая активация наблюдалась на стадии пикнидиальной инициации [21].

При споруляции *B. emersonii* наряду с возрастанием уровня NO наблюдается стимуляция образования cGMP. При этом происходит активация транскрипционного профиля генов, кодирующих гуанилатциклазу и cGMP-фосфодиэстеразу [13]. У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* эффект действия потенциальных ингибиторов гуанилат-

циклазы и NOS свидетельствует о NO-регулируемом спорообразовании через cGMP-зависимый путь [76]. Очевидно, что cGMP действует в качестве важного внутриклеточного вторичного мессенджера в NO-опосредованном процессе образования спор у столь разных по таксономической принадлежности грибов.

Флавогемоглобины, нитрозотионеин (iNT), S-нитрозоглутатионредуктаза (GSNO-редуктаза) и NO-редуктаза. При индукции конидиогенеза у *A. nidulans* NO-метаболизирующие флавогемоглобины FhbA и FhbB участвуют в координированной регуляции переключения от вегетативного роста к размножению [51]. Экспрессия цитоплазматического *fhbA* гена и гена HP *niaD* возрастала в течение первых часов конидиогенеза (до 10 ч) и затем снижалась, а увеличение экспрессии *fhbB* гена митохондрий наблюдалась в более поздний период развития (в интервале от 24 до 120 ч). Важно, что регуляция экспрессии первых 2 генов определяется глобальным регулятором азотного метаболизма AgeA и специфичным регулятором нитратного пути NirA. Считают, что у данного гриба гомеостаз NO достигается за счет баланса его синтеза, осуществляемого HP, и распада в результате действия флавогемоглобинов. Установлено также, что индуцибельный FhbA защищает HP и НиР от повреждения высокими концентрациями NO [77].

Флавогемоглобины различных видов дрожжей: *S. cerevisiae* (ScYhb1), *C. albicans* (CaYhb1) и *S. pombe* (SPAC869.02c), содержат 3 консервативных фрагмента – N-концевой гемовой,

ФАД-связывающий и С-концевой НАД(Ф)-связывающий домены [78]. У *S. cerevisiae* и *S. pombe* флавогемоглобины кодируются одним геном — *ScYHB1* и *SPAC869.02c* соответственно, а у *S. albicans* — тремя (*CaYHB1*, *CaYHB4* и *CaYHB5*), причем сходство последовательностей для первого и трех последних составляет от 31 до 25%. Предполагают, что флавогемоглобины способны защитить дрожжевые клетки как от внешних, так и внутренних источников NO и активных форм азота (АФА). Очевидно, что обнаруженные различия в составе и функционировании соединений могут быть обусловлены адаптацией к разным нишам обитания указанных видов дрожжей.

Баланс синтеза и распада NO важен для регуляции физиологических функций, так как избыток NO может вызвать нитрозативный стресс благодаря высокой реактивности NO и АФА. У *A. nidulans* в условиях нитрозативного стресса NO-индуцируемый 23-аминокислотный пептид нитрозотионеин (iNT) способен обезвреживать NO посредством S-нитрозилирования Cys остатков [79]. Тиоредоксин и его редуктаза денитрозировали S-нитрозилированный пептид, снижали клеточный S-нитрозотиол и обеспечивали толерантность гриба к NO, что указывает на опосредованное пептидами каталитическое удаление NO.

GSNO рассматривают как одну из физиологических форм хранения и транспорта оксида азота в высших растениях [80]. Очевидно, такой способ депонирования и детоксикации NO существует и в грибах. При совместном культивировании *I. obliquus* и *P. morii* наблюдается аккумуляция оксида азота, который используется для обратимого S-нитрозилирования фенилаланин-аммиак-лиазы, 4-кумарат-КоА-лигазы и стирилпирон-синтазы, ферментов, участвующих в биосинтезе стирилпирона [81]. При этом в регуляции как специфичности, так и обратимости S-нитрозилирования белка у *I. obliquus* принимает участие GSNO-редуктаза и тиоредоксин-подобные белки.

Удаление избыточно-токсичного NO из клеток грибов также может осуществлять NO-редуктаза — фермент, катализирующий образование N₂O из оксида азота [82]. Известно, что у грибов для этого используется цитохром P-450nor, который передает электроны от НАДН без участия электрон-транспортной цепи. При нитратной диссимилиации у мутанта *F. oxysporum*, неспособного синтезировать NO-редуктазу и флавогемоглобин, отмечено нарушение работы дыхательной системы и ингибирование роста [83].

* * *

Основной метод, применяемый для идентификации и действия эндогенного оксида азота в клетках грибов — использование флуоресцентных

индикаторов. В последнее время для оценки участия NO в различных физиологических процессах этих организмов получило широкое применение доноры и скавенджеры NO, а также ингибиторы NO-синтазы млекопитающих. Достигнуты значительные успехи в исследовании роли оксида азота в регуляции у грибов апоптоза, различных видов стресса, метаболизма металлов, мицелиального роста, прорастания спор и дифференцировки. Уровень NO способен определять баланс между бесполом и половым циклами этих организмов, причем в регуляции жизненных циклов особое значение может приобретать участие оксида азота в трансдукции фотосигнала. Это может быть важно при разработке подходов к управлению жизненными циклами промышленно-значимых грибов. Разнообразие NO-зависимых сигнальных путей, задействованных в различных биологических процессах грибов, свидетельствует о сложности механизмов, регулируемых NO. Это расширяет наши знания о проблеме регуляции оксида азота у эукариот. Среди них — участие оксида азота в S-нитрозилировании и нитровании остатков аминокислот, инициировании разрывов ДНК, транскрипционной активации определенных генов и синтезе cGMP. Несмотря на отсутствие в геноме типичных полноценных генов, кодирующих NOS млекопитающих, у ряда грибов методом, основанным на превращении ³H- или ¹⁴C-L-аргинина в ³H- или ¹⁴C-L-цитруллин, выявлен данный фермент. Представляется важным дальнейшее подробное изучение ферментов, определяющих синтез NO, у этих организмов, а также NO-метаболизирующих флавогемоглобинов и NO-редуктазы.

Работа выполнена в рамках госзадания 0104-2019-0024 для ФИЦ биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 24. P. 9265–9269.
2. Tsoukias M. // Microcirculation. 2008. V. 15. № 8. P. 813–834.
3. Verma N., Tiwari S., Singh V.P., Prasad S.M. // Plant Growth Regul. 2020. V. 90. № 1. P. 1–13.
4. Филиппович С.Ю. // Биохимия. 2010. V. 75. № 10. P. 1367–1376.
5. Williams D.E., Boon E.M. // J. Innate Immun. 2019. V. 11. № 3. P. 205–215.
6. Cánovas D., Marcos J.F., Ana T., Marcos A.T., Strauss J. // Curr. Genet. 2016. V. 62. № 3. P. 513–518.
7. Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J. // Front. Plant Sci. 2016. V. 4. P. 252.
8. Zhao Y., Lim J., Xu J., Yu J.-H., Zheng W. // Mol. Microbiol. 2020. V. 113. № 5. P. 872–882.
9. Castello P.R., David P.S., McClure T., Crook Z., Poyton R.O. // Cell Metab. 2006. V. 87. № 4. P. 277–287.

10. Almeida B., Buttner S., Ohlmeier S., Silva A., Mesquita A., Sampaio-Marque, B. et al. // *J. Cell Sci.* 2007. V. 120. № 18. P. 3279–3288.
11. Wang J., Higgins V.J. // *Fungal Genet. Biol.* 2005. V. 42. № 4. P. 284–292.
12. Gong X., Fu Y., Jiang D., Li G., Yi X., Peng Y. // *Fungal Genet. Biol.* 2007. V. 44. № 12. P. 1368–1379.
13. Vieira A.L., Linares E., Augusto, O., Gomes S.L. // *Fungal Genet. Biol.* 2009. V. 46. № 8. P. 575–584.
14. Kong W.W., Huang C.Y., Chen Q., Zou Y.J., Zhang J.X. // *Fungal Genet. Biol.* 2012. V. 49. № 1. P. 15–20.
15. Carmona L., Gandía M., López-García B., Marcos J.F. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2012. V. 417. № 1. P. 56–61.
16. Pengkit A., Jeon S.S., Son S.J., Shin J.H., Baik K.Y., Choi E.H., Park G. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. article №30037. <https://doi.org/10.1038/srep30037>
17. Samalova M., Johnson J., Illes M., Kelly S., Fricker M., Gurr S. // *New Phytol.* 2013. V. 197. P. 207–222.
18. Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999. V. 38. № 21. P. 3209–3212.
19. Maier J., Hecker R., Rockel P., Ninnemann H. // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. № 3. P. 1323–1330.
20. Song N.K., Jeong C.S., Choi I.S. // *Mycologia.* 2000. V. 92. № 6. P. 1027–1032.
21. Li B., Fu Y., Jiang D., Xie J., Cheng J., Li G. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 9. P. 2830–2836.
22. Chiuchetta S.J.R., Castro-Prado M.A.A. // *Genet. Mol. Biol.* 2005. V. 28. № 4. P. 798–803.
23. Wilken M., Huchzermeyer B. // *Eur. J. Cell Biol.* 1999. V. 78. № 3. P. 209–213.
24. Ninnemann H., Maier J. // *Photochem. Photobiol.* 1996. V. 64. № 2. P. 393–398.
25. Abaitua F., Rementeria A., Millan R.S., Eguzkiza A., Rodriguez J.A., Ponton J., Sevilla M.S. // *Microbiology.* 1999. V. 145. № 7. P. 1641–1647.
26. Lai T., Li B., Qin G., Tian S. // *Curr. Microbiol.* 2011. V. 62. № 1. P. 229–234.
27. Kunert J. // *Folia Microbiol.* 1995. V. 40. № 3. P. 238–244.
28. Lushchak O.V., Lushchak V.I. // *Redox Rep.* 2008. V. 13. № 6. P. 283–291.
29. Филиппович С.Ю., Онуфриев М.В., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 4. С. 403–409.
30. Turrion-Gomez J.L., Eslava A.P., Benito E.P. // *Fungal Genet. Biol.* 2010. V. 47. № 5. P. 484–496.
31. Röszer T. // *The Biology of Subcellular Nitric Oxide.* New York, N.Y.: Springer & Business Media, 2012. 200 p.
32. Baidya S., Cary J.W., Grayburn W.S., Calvo A.M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. № 15. P. 5524–5528.
33. *Nanomycotoxicology. Treating Mycotoxins in the Nano Way.* / Eds. M. Rai and K.A. Abd-El Salam. N.Y.: Acad. Press, 2020. P. 481–501.
34. Hetrick E.M., Shin J.H., Paul H.S., Schoenfisch M.H. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 14. P. 2782–2789.
35. Филиппович С.Ю., Онуфриев М.В., Перегуд Д.И., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2020. Т. 56. № 4. С. 358–365.
36. Zheng W., Miao K., Zhang Y., Pan S., Zhang M., Jiang H. // *Microbiology.* 2009. V. 155. № 10. P. 3440–3448.
37. Yu Y., Yang Z., Guo K., Li Z., Zhou H., Wei Y. et al. // *Curr. Microbiol.* 2015. V. 70. № 4. P. 618–622.
38. Liu W.C., Yuan H.M., Li Y.H., Lu Y.T. // *FEMS Yeast Res.* 2015. V. 15. fov051. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov051>
39. Domitrovic T., Palhano F.L., Barja-Fidalgo C., DeFreitas M., Orlando M.T., Fernandes P.M. // *FEMS Yeast Res.*, 2003. V. 3. № 4. P. 341–346.
40. Castello P.R., Woo D.K., Ball K., Wojcik J., Liu L., Poynton R.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 24. P. 8203–8208.
41. Nishimura A., Kawahara N., Takagi H. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2013. V. 430. № 1. P. 137–143.
42. Chen C., Li Q., Wang Q., Lu D., Zhang H., Wang J., Fu R. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. article 15694. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15340-6>
43. Chiang K.T., Shinyashiki M., Switzer C.H., Valentine J.S., Gralla E.B., Thiele D.J., Fukuto J.M. // *Archiv. Biochem. Biophys.* 2000. V. 377. № 2. P. 296–303.
44. Li Q., Huang W., Xiong C., Zhao J. // *Chemosphere.* 2018. V. 201. № 6. P. 294–302.
45. Guo S., Yao Y., Zuo L., Shi W., Gao N., Xu H. // *J. Basic Microbiol.* 2016. V. 56. № 1. P. 36–43.
46. Lazar E.E., Wills R.B., Ho B.T., Harris A.M., Spohr L.J. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2008. V. 46. № 6. P. 688–692.
47. Yin S., Gao Z., Wang C., Huang L., Kang Z., Zhang H. // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 178.
48. Huang H., Huang M., Lv W., Hu Y., Wang R., Zheng X. et al. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 1143.
49. Zhang Y., Shi H., Liang S., Ning G., Xu N., Lu J. et al. // *Microbial Res.* 2015. V. 180. P. 11–22.
50. Do Y.J., Kim D.H., Jo M.S., Kang D.G., Lee S.W., Kim J.-W., Hong J.K. // *Korean J. Mycol.* 2019. V. 47. № 3. P. 219–232.
51. Marcos A.T., Ramos M.S., Marcos J.F., Carmona L., Strauss J., Canovas D. // *Mol. Microbiol.* 2016. V. 99. № 1. P. 15–33.
52. Филиппович С.Ю., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2007. Т. 43. № 3. С. 331–337.
53. Marcos A.T., Ramos M.S., Schinko T., Strauss J., Canovas D. // *Fungal Genet. Biol.* 2020. V. 137. Article 10337. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103337>
54. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. // *Biochem. J.* 2001. V. 357. № 3. P. 593–615.
55. Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 34. P. 22789–22791.
56. Kuo W.N., Jn-Baptiste J.B., Kanadia R.N., McNabb L.D., Zhai L., Weeks K. et al. // *Cytobios.* 1996. V. 87. P. 251–263.
57. Kanadia R.N., Kuo W.N., McNabb M., Botchway A. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998. V. 45. № 6. P. 1081–1087.

58. Zhao Y., Xi Q., Xu Q., He M., Ding J., Dai Y. et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. № 10. P. 4361–4372.
59. Sarkar T.S., Biswas P., Ghosh S.K., Ghosh S. // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. e107348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107348>
60. Sasano Y., Haitani Y., Hashida K., Ohtsu I., Shima J., Takagi H. // *Microb. Cell Fact.* 2012. V. 11. P. 11–40.
61. Astuti R.I., Nasuno R., Takagi H. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. № 22. P. 9483–9497.
62. Netz D.J., Stümpfig M., Doré C., Mühlenhoff U., Pierik A.J., Lill R. // *Nat. Chem. Biol.* 2010. V. 6. № 10. P. 758–765.
63. Corpas F.G., Barroso J.B. // *Nitric Oxide.* 2017. V. 68. P. 5–6.
64. Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. // *Trends Plant Sci.* 2011. V. 16. № 3. P. 160–168.
65. Baudouin E. // *Plant Biol.* 2011. V. 13. № 2. P. 233–242.
66. Zweier J.L., Samouilov A., Kuppusamy P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1411. № 2–3. P. 250–262.
67. Kröncke K.D., Fehsel K., Schmidt T., Zenke F.T., Dasting I., Wesener J.R. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1994. V. 200. P. 1105–1110.
68. Nasuno R., Aitoku M., Manago Y., Nishimura A., Sasano Y., Takagi H. // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. e113788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113788>
69. Shinyashiki M., Chiang K., Switzer C., Gralla E., Valentine J., Thiele D.J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 6. P. 2491–2496.
70. Gunaydin H., Houk K.N. // *Chem. Res. Toxicol.* 2009. V. 22. P. 894–898.
71. Radi R. // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. № 2. P. 550–559.
72. Bhattacharjee A., Majumdar U., Maity D., Sarkar T.S., Goswami A.M., Sahoo R., Ghosh S. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2009. V. 388. № 3. P. 612–617.
73. Kang J.W., Lee N.Y., Cho K.C., Lee M.Y., Choi D.Y., Park S.H., Kim K.P. // *Proteomics.* 2015. V. 15. № 2–3. P. 580–590.
74. Lai T., Chen Y., Li B., Qin G., Tian S. // *J. Proteom.* 2014. V. 103. P. 47–56.
75. Friebe A., Koesling D. // *Circ. Res.* 2003. V. 93. № 2. P. 96–105.
76. Kig C., Temizkan G. // *Protoplasma.* 2009. V. 238. № 1–4. P. 59–66.
77. Schinko T., Berger H., Lee W., Gallmetzer A., Pirker K., Pachlinger R. et al. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 78. № 3. P. 720–738.
78. Tillmann A., Gow N.A.R., Brown A.J.P. // *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. P. 219–223.
79. Zhou S., Narukami T., Masuo S., Shimizu M., Fujita T., Doi Y. et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9. № 1. P. 657–663.
80. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Chumikina L.V., Topunov A.F. // *Nat. Prod. Commun.* 2016. V. 11. P. 1189–1192.
81. Zhao Y., He M., Ding J., Xi Q., Loake G.J., Zheng W. // *Sci. Rep.* V. 6. Article 37601. <https://doi.org/10.1038/srep37601>
82. Морозкина Е.В., Кураков А.В. Прикл. биохим. и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 607–613.
83. Takaya N. // *J. Biosci. Bioeng.* 2002. V. 94. № 6. P. 506–510.

Nitric Oxide in Fungal Metabolism

S. Yu. Filippovich^{a,*} and G. P. Bachurina^a

^a *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center Fundamentals of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: syf55@yandex.ru

The review summarizes the latest data on the identification and synthesis of nitric oxide in fungi, as well as the mechanisms of NO action in these organisms, including S-nitrosylation and nitration of amino acid residues, initiation of DNA breaks, transcriptional gene activation, and the cGMP-dependent signaling pathway. Particular attention is paid to the NO-dependent regulation of such processes as apoptosis and various stress responses, spore germination, mycelium growth, and fungal differentiation.

Keywords: nitric oxide, fungal metabolism, differentiation, stress, NO synthase, nitrate reductase