

УДК 577.21

NO-СИНТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ФОТОМОРФОГЕНЕЗЕ *Neurospora crassa*

© 2020 г. С. Ю. Филиппович^{1, *}, М. В. Онуфриев², Д. И. Перегуд³,
Г. П. Бачурина¹, М. С. Крицкий¹

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

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, 117485 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава
России, Москва, 119034 Россия

*e-mail: syf@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 14.01.2020 г.

После доработки 03.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Изучение превращения ³H-L-аргинина в ³H-L-цитруллин в клетках *Neurospora crassa* позволило выявить активность NO-синтазы. По чувствительности к ионам кальция, действию специфических ингибиторов фермента, вестерн-блот анализу NO-синтаза сходна с индуцибельной формой фермента млекопитающих. По данным Вестерн-блоттинга молекулярная масса фермента составляла около 130 кДа. Светозависимые изменения удельной активности NO-синтазы в фотокаротиногенезе и фотоконидиогенезе *N. crassa* не обнаружены.

Ключевые слова: NO-синтаза, конидиогенез, каротиногенез, *Neurospora crassa*

DOI: 10.31857/S0555109920040042

Оксид азота – короткоживущая молекула, обладающая высокой реакционной способностью. Функции NO разнообразны, от высокотоксичного агента до сигнальной молекулы, участвующей в регуляции разнообразных метаболических путей.

Важно, что онтогенез и биосинтетическая продуктивность мицелиальных грибов зависят от химической природы источников азота и метаболических путей их ассимиляции. В литературе представлены данные об участии оксида азота в физиологических и биохимических процессах у грибов. Целый ряд работ посвящен влиянию NO на процессы роста и дифференцировки грибов, принадлежащих к различным таксономическим группам, – *Colletotrichum coccodes* [1], *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium italicum* [2], *Botrytis cinerea* [3], *Penicillium expansum* [4], *Phycomyces blakesleeanus* [5], *Flammulina velutipes* [6], *Coniothyrium minitans* [7, 8] и *Aspergillus nidulans* [9].

Известно, что синтез NO осуществляется NO-синтазой (КФ 1.14.13.39), катализирующей превращение L-аргинина и кислорода в L-цитруллин и NO. Процесс описан для различных представителей высших и низших организмов. Наиболее хорошо изучен фермент млекопитающих, представленный 3 формами: нейрональной (nNOS), индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS), кодируемыми разными генами [10]. Он представляет

собой гомодимер, содержащий N-концевой каталитический или оксигеназный домен (NOSox), C-концевой редуктазный домен (NOSred) и регуляторный кальмодулинсвязывающий участок, соединяющий NOSox и NOSred в единый комплекс. У млекопитающих NO-синтаза регулирует кровяное давление, сокращение мышц, а также работу иммунной и нервной систем. NO-синтазы бактерий отличаются от одноименного фермента млекопитающих отсутствием редуктазного домена [11]. Единственное исключение из этого правила – NO-синтаза миксобактерии *Sorangium cellulosum*. Помимо отличия в структуре, NO-синтазы бактерий различаются и функциями – участвуют в нитровании индольного кольца триптофана и восстановлении повреждений, вызванных УФ-радиацией, в адаптации бактерий к окислительному стрессу, синтезе cGMP и устойчивости бактерий к антибиотикам. У высших растений образование NO происходит 2 путями: нитратредуктазным и L-аргинин-зависимым, причем данные о существовании второго пути являются противоречивыми [12, 13]. Вместе с тем, в 2016 г. Чанг с соавт. [14] разработали метод с применением нового флуоресцентного аналога аргинина, позволяющий напрямую идентифицировать NO-синтазу у высших растений, и успешно применили его для листьев табака. Этот метод можно сочетать с тести-

рованием ингибиторов энзима млекопитающих и иммуноцитохимическим анализом.

Пути синтеза и распада оксида азота, позволяющие поддерживать определенный баланс NO в клетках грибов, изучены мало [15]. Одним из основных препятствий является отсутствие в геноме большинства грибных организмов типичных полноценных генов, кодирующих NO-синтазы млекопитающих. Несмотря на это, активность фермента, определяемая изотопным методом, по превращению ³H- или ¹⁴C-L-аргинина в ³H- или ¹⁴C-L-цитруллин, обнаружена в таких грибах как *Neurospora crassa* [16], *F. velutipes* [6], *Saccharomyces cerevisiae* [17], *Blastocladiella emersonii* [18] и *C. minitans* [8]. Кроме того, у ряда грибов выявлены стадии развития, чувствительные к действию соединений, влияющих на активность NO-синтазы. Для зигомицета *P. blakesleeanus* это светостимулируемое образование макроспорангиофоров [5], для базидиомицета *F. velutipes* – образование плодовых тел [6], для хитридиомицета *B. emersonii* – образование зооспор [18], для митоспорового гриба *C. minitans* – пикнидий [8].

При исследовании роли оксида азота в метаболизме аскомицета *N. crassa* сложилась противоречивая ситуация. Применив донор NO, нитропруссид натрия, а также специфические ингибиторы NO-синтазы, Ниннеманн и Майер [16] предположили, что NO ингибирует у *N. crassa* светостимулируемое образование вегетативных спор, конидий. Наряду с этим, в мицелии гриба изотопным методом они обнаружили NO-синтазную активность. Вместе с тем, как и у большинства грибов, в геноме *N. crassa* не удалось найти полноценный ген NO-синтазы животного типа. Ранее был проанализирован выход нитрат- и нитрит-ионов и их внутриклеточное содержание в качестве методического подхода к исследованию метаболизма и функций NO у *N. crassa* [19, 20]. Для этого гриба детально охарактеризован ряд генов, связанных с метаболизмом азота [21]. Структурный ген *nit-6* кодирует нитритредуктазу (**НиР**). Глобальный регуляторный ген *nit-2* кодирует ядерный белок, влияющий на экспрессию более 100 генов азотного метаболизма, при его повреждении в клетках гриба полностью отсутствует активность НиР и нитратредуктазы (**НР**). Использование *nit*-мутантов позволило измерить выход ионов нитрата и нитрита из клетки, избежав их вторичной ассимиляции. Изучение *N. crassa* вызывает также особый интерес в связи со светозависимой регуляцией процессов развития и дифференцировки этого гриба [22]. Установлено, что динамика выхода нитрата в ходе фотоиндуцированного каротиногенеза [19] и фотостимулируемого конидиогенеза [20] *nit-6* мутанта *N. crassa* свидетельствует о возможном участии NO-генерирующего механизма в трансдукции фотосигнала гриба.

Цель работы – определение NO-синтазной активности в клетках дикого типа *wt-987* и мутантов *nit-2* и *nit-6 N. crassa* и ее динамики при светозависимой стимуляции каротиногенеза и конидиогенеза.

МЕТОДИКА

Штаммы *N. crassa*, среды, культивирование. Штамм дикого типа *wt 987(74-0R23-1A)* и мутанты *nit-2 (33 A)* и *nit-6 (3463 A)* аскомицета *N. crassa* были получены из Центра по хранению генетического материала грибов (Fungal Genetic Stock Center – FGSC, США). Оба мутанта дефектны по НиР, а *nit-2* штамм лишен также и НР.

Состав сред, получение инокулята и условия культивирования дикого типа и *nit*-мутантов были описаны ранее [20, 22]. Мицелий выращивали на агаризованной среде Фогеля с 2%-ной сахарозой в качестве источника углерода, но с другим источником азота [22]. В опытах по конидиогенезу вместо 25 мМ NH₄NO₃ использовали 50 мМ NH₄Cl или 50 мМ NH₄NO₃, или 50 мМ NaNO₃.

Регуляция светом каротиногенеза и конидиогенеза. Фотоиндукцию каротиногенеза и фотостимуляцию конидиогенеза проводили согласно предыдущим работам [19, 20].

Получение экстрактов мицелия. После 24 ч выращивания в темноте при 28°C мицелий собирали с поверхности целлофана при красном свете, промывали дистиллированной водой, фильтровали через 3 слоя марли, высушивали с помощью фильтровальной бумаги и растирали с жидким азотом в течение 15 мин. Экстракцию осуществляли при слабом перемешивании в течение 30 мин тремя объемами 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 8.0, содержащего 0.5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитола, 5 мкг/мл леупептина, 5 мкг/мл апротинина, 5 мкг/мл пепстатина и 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (**PMSF**). После центрифугирования при 20000 g в течение 30 мин при 4°C полученные супернатанты диализовали в течение ночи против того же буфера, содержащего в качестве ингибитора протеаз только 1 мМ PMSF. Аликвоты диализатов хранили при –70°C.

Определение активности NO-синтазы. Активность NO-синтазы оценивали по превращению ³H-L-аргинина в ³H-L-цитруллин. В серии предварительных экспериментов были определены оптимальные условия для ферментативной реакции. Реакционная смесь общим объемом 50 мкл содержала (мкМ): НАДФН – 1.0, ФАД – 5.0, ФМН – 5.0, тетрагидробиоптерин – 50, валин – 50 мМ, цитруллин – 1.0 мМ, аргинин – 10 мкМ и ³H-аргинин – 0.5 мкл (“Amersham Biosciences”, США) с активностью 1 мкюри/мл, растворенного в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.0. Ферментативную реакцию начинали добавлением 20 мкл диа-

лизата белков *N. crassa* и проводили в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл суспензии ионообменника Dowex 50 Wx8 (400 меш, Na⁺ форма; “Sigma-Aldrich”, США) в 50 мМ HEPES буфере, рН 7.5. Положительно заряженный L-аргинин связывался с колонкой Dowex, а незаряженный продукт, ³H-цитруллин, оставался в растворе. Радиоактивность полученных проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Wallac 1420 (“Perkin Elmer”, США). Для исключения неспецифического действия на ферментативную активность различных соединений, содержащихся в мицелиальном диализате, добавляли ингибитор индуцибельной NO-синтазы животных L-N⁶-(1-иминоэтил)-лизин (L-NIL). Для снижения влияния фоновой радиоактивности данные для реакционной смеси, содержащей воду, вычитали из данных для той же смеси с 0.1 мМ L-NIL вместо воды. Концентрацию белка измеряли по методу Бредфорд, используя БСА в качестве стандарта.

Удельную активность NO-синтазы выражали в пмоль цитрулина образовавшегося в мин на мг белка.

Вестерн-блоттинг. Диализаты *N. crassa* смешивали с равным объемом 125 мМ Трис-НСl буфера, рН 6.8, содержащего 4% ДДС, 10% глицерина, 0.006% бромфенолового синего, 1.8% β-меркаптоэтанола, прогревали при 100°C в течение 10 мин, пробы центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин. После измерения концентрации белка в супернатанте его равные количества фракционировали методом электрофореза в 8%-ном ПААГ с Na-ДДС при 100 В в течение 90 мин. Затем белки переносили на мембрану из поливинилиденфторида с размером пор 0.2 мкм (“Bio-Rad Laboratories”, США) при 150 мА в течение 180 мин. Предварительно окрашенные высокомолекулярные белковые стандарты (“Bio-Rad Laboratories”, США) использовали в качестве маркеров для контроля переноса белков. Блокировку сайтов неспецифического связывания 20 мМ Трис-НСl буфером, рН 7.5, содержащим 150 мМ NaCl, 0.1% Твин-20 (TBST) и 5% сухое молоко проводили в течение ночи. Затем мембраны промывали в TBST и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к мышинной нейрональной NO-синтазе (разведение 1 : 2000, “Chemicon”, США) или мышинной эндотелиальной NO-синтазе (разведение 1 : 5000, “BD Biosciences”, США) или кроличьей индуцибельной NO-синтазе (разведение 1 : 5000, “Chemicon”, США). После трехкратной промывки мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, которые визуализировали используя хемилюминесцентный субстрат SuperSignal West Pico (“Thermo Scientific Pierce”, США).

Статистический анализ. Число биологических параллелей варьировало от 3 до 15, число биохимических параллелей было не ниже 3. Результаты представлены в виде средних значений ± ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение свойств NO-синтазы *N. crassa* с индуцибельным ферментом млекопитающих. Для определения активности фермента в диализатах мицелиальных клеток гриба был оптимизирован метод измерения скорости ферментативного окисления ³H-L-аргинина, использовавшийся ранее при исследовании клеток млекопитающих. Оказалось, что фермент *N. crassa* чувствителен к специфическим ингибиторам ферментов животного происхождения. Исследование проводили на диализатах супернатантов экстрактов мицелия и для исключения неспецифического действия различных примесей, а также эндогенного L-аргинина результаты измерения NO-синтазной активности представляли в виде разности активностей в пробах, содержащих и не содержащих ингибитор фермента. Ферментативная активность *N. crassa* была на порядок более чувствительна к L-NIL, чем к метилому эфиру N-нитро-L-аргинина (NAME) (рис. 1а). Кроме того, аналогично ферменту из *P. blakesleeanus* [5], она не активировалась в присутствии ионов кальция (рис. 1б). Известно, что iNOS млекопитающих является Ca-независимой, так как она тесно связывается с кальмодулином вне зависимости от концентрации внутриклеточного кальция [23]. На основании результатов по действию специфических ингибиторов и ионов кальция на активность фермента было сделано предположение о сходстве NO-синтазы *N. crassa* с индуцибельной формой фермента животных.

Действительно, с помощью Вестерн-блоттинга (рис. 2) выявлено наличие у всех изучаемых штаммов *N. crassa* белка, с которым специфически связываются поликлональные антитела против iNOS изоформы фермента млекопитающих, но не взаимодействуют антитела против eNOS и nNOS изоформ фермента. Для прореагировавших антител иммуногеном служил C-концевой пептид, содержащий 14 аминокислот iNOS, полученный из макрофагов мыши. При сравнении с положением белковых метчиков было выявлено, что молекулярная масса обнаруженной формы фермента *N. crassa* близка к таковой для iNOS животных [24] и равна 130 кДа.

Данные о существовании различных форм NO-синтазы грибов, аналогичных формам, обнаруженным для фермента животных, немногочисленны. Канада с соавт. [25], используя моноклональные антитела против nNOS, выявили конститутивную форму NO-синтазы у дрожжей *S. cerevisiae*. В более поздней работе у этого же

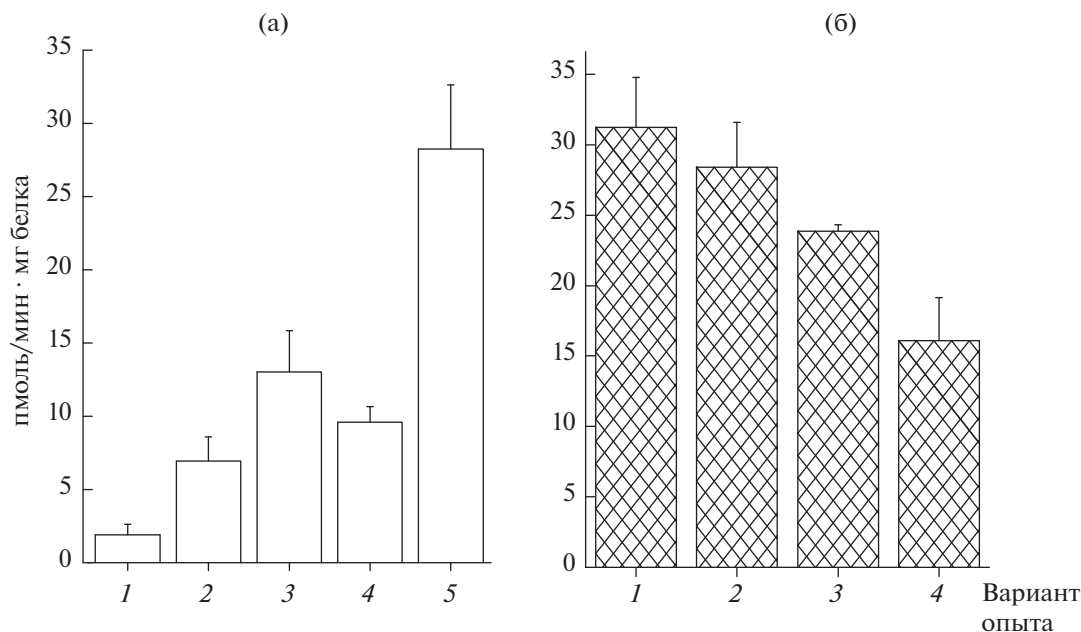


Рис. 1. Действие различных ингибиторов (а) и ионов кальция (б) на активность (пмоль цитруллина/мин · мг белка) NO синтазы *N. crassa*. а – 1 – 0.01 мМ L-NAME; 2 – 0.1 мМ L-NAME; 3 – 1 мМ L-NAME; 4 – 0.01 мМ L-NIL; 5 – 0.1 мМ L-NIL; б – 1 – 200 мМ ЭДТА; 2 – 1 мМ ЭГТА; 3 – 0.01 мМ Ca²⁺; 4 – 0.1 мМ Ca²⁺. Способ подсчета удельной активности фермента описан в тексте статьи.

микроорганизма в экспоненциальной фазе роста выявлена экспрессия эндотелиальной, нейрональной и индуцибельной изоформ фермента [26]. Показано, что индукция различных изоформ NO-синтазы у этого гриба зависит от метаболического состояния клеток и ответа на стресс.

Таким образом, на основании комплекса полученных данных о чувствительности фермента к специфическому ингибитору iNOS и ионам кальция и его взаимодействию с поликлональными антителами против iNOS можно предположить существование в поверхностном мицелии *N. crassa* формы фермента, сходной с индуцибельной изоформой млекопитающих.

NO-синтаза в фотоморфогенезе *N. crassa*. На рис. 3 представлены результаты изменения удельной активности NO-синтазы в каротиногенезе у штамма дикого типа *N. crassa* в зависимости от времени освещения. Достоверных изменений этого параметра не наблюдалось как в освещенных культурах, так и в темновых контролях. Рост гриба осуществляли на стандартной среде Фогеля, содержащей 4 мМ хлорид аммония в качестве источника азота. Необходимо отметить, что, в противоположность дикому штамму, в этих условиях культивирования *N. crassa* NO-синтазная активность в диализатах *nit*-мутантов не обнаруживалась.

С результатами опыта, представленными на рис. 3 согласовывались результаты на рис. 4, согласно которым освещение мицелия гриба в присутствии ингибитора NO-синтазной реакции L-NIL

при концентрации от 0.1 до 1.0 мМ, практически не сказывалось на фоторегуляции каротиногенеза в клетках трех штаммов *N. crassa*.

В табл. 1 приведены результаты определения удельной активности NO-синтазы в фоторегулируемом конидиогенезе *N. crassa*, осуществляемом в сухой поверхностной культуре на средах с разными источниками азота. Ранее было показано [22], что в этих условиях совместное действие света и дегидратации в большинстве вариантов азотного статуса вызывало синергическое увеличение выхода конидий, поэтому для исследования были взяты варианты (штамм + источник азота в среде), в которых наблюдался эффект фотостимуляции конидиогенеза или же он отсутствовал. Было установлено, что при культивировании на среде с 50 мМ NH₄Cl активность фермента не была обна-

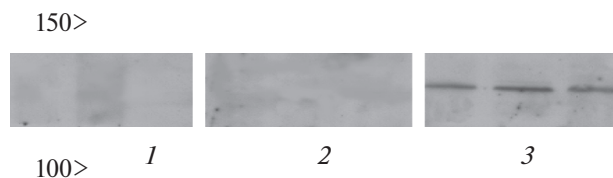


Рис. 2. Результаты Вестерн-блоттинга различных штаммов *N. crassa* с использованием антител к нейрональной (1), эндотелиальной (2) и индуцибельной (3) изоформам NO-синтазы млекопитающих; 1 – *nit-1* мутант; 2 – *nit-6* мутант и 3 – *wt-987* штамм *N. crassa*. Цифры обозначают молекулярные массы белков-метчиков (кДа).

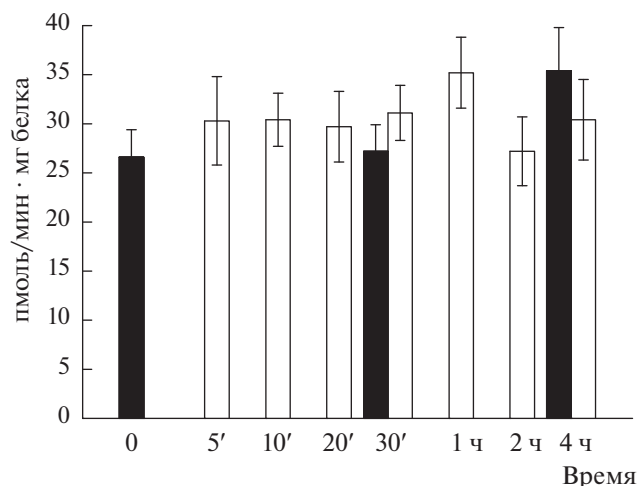


Рис. 3. Активность NO-синтазы в каротиногенезе *wt-987* штамма *N. crassa* (культивирование на среде с 4 мМ NH_4Cl в качестве источника азота). Темные столбики – темновые контроли, светлые – освещенные культуры. Способ подсчета удельной активности фермента описан в тексте статьи.

ружена как в вариантах, для которых отмечена фотостимуляция конидиогенеза, так и без нее. При выращивании дикого типа на среде с 50 мМ NaNO_3 фермент был активен, но величина удельной активности NO-синтазы оказалась одинаковой и в темновом контроле, и в мицелии, подвергнутом освещению. Сравнимая удельная активность фермента обнаружена у гриба-паразита *C. minitans* [8]. Примечательно, что она достигает максимального уровня 20 пмоль/мин · мг белка именно при конидиогенезе.

При увеличении концентрации хлорида аммония в среде культивирования дикого штамма *N. crassa* от 4 до 50 мМ активность NO-синтазы

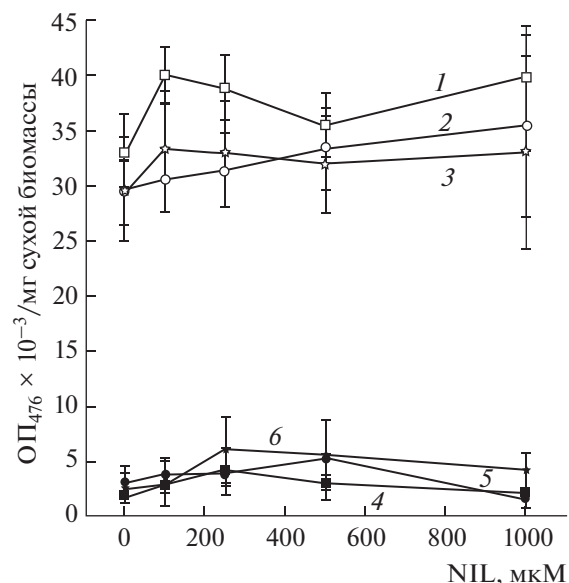


Рис. 4. Синтез каротиноидов в присутствии и отсутствии L-NIL у мутантов *nit-2* (1, 4), *nit-6* (2, 5) и штамма *wt-987* (3, 6) *N. crassa*. 1, 2, 3 – освещенный мицелий, 4, 5, 6 – темновые контроли.

исчезала. Вместе с тем активность фермента выявлялась при выращивании гриба на среде с 50 мМ NaNO_3 . Это позволило предположить наличие ингибирующего действия ионов NH_4^+ и активирующего NO_3^- на NO-синтазу *N. crassa*, подобного обнаруженному для HP [27].

Вестерн-блоттинг диализатов различных штаммов *N. crassa*, полученных для разных вариантов конидиогенеза аскомицета, с антителами к iNOS представлен на рис. 5а. Использовали разные варианты (штамм + источник азота в среде), в кото-

Таблица 1. NO-синтазная активность в конидиогенезе *N. crassa*

Источник азота в среде	Штамм	Эффект фотостимуляции конидиогенеза (дегидратированная культура)	Вариант опыта	Активность NO-синтазы, пмоль/мин · мг белка
50 мМ NH_4Cl	<i>wt-987</i>	Нет	Темновой контроль	0
			2 ч света	0
	<i>nit-2</i>	× 8.1	Темновой контроль	0
			2 ч света	0
	<i>nit-6</i>	× 12.3	Темновой контроль	0
			2 ч света	0
50 мМ NaNO_3	<i>wt-987</i>	× 8.1	Темновой контроль	28.5 ± 2.7
			2 ч света	28.0 ± 4.3

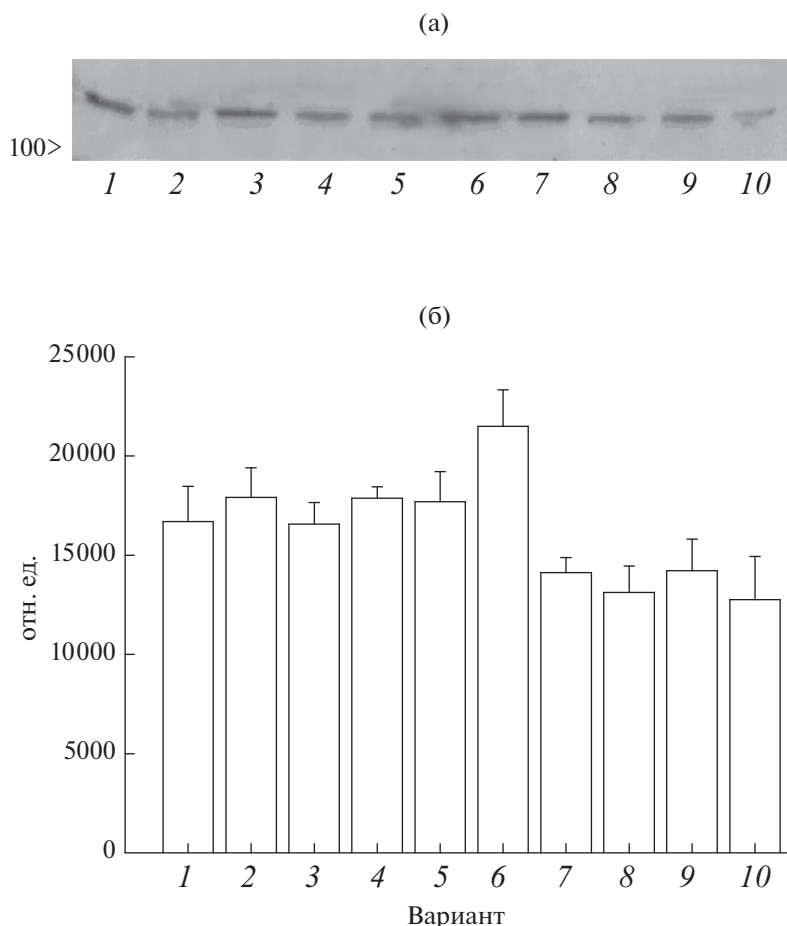


Рис. 5. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ диализатов различных штаммов *N. crassa*, полученных для разных вариантов конидиогенеза аскомицета, с поликлональными антителами к iNOS кролика (а) и денситометрия экспрессии NOS (б). а – 1, 2 – *wt-987* + 50 мМ NH₄Cl; 3, 4 – *nit-2* + 50 мМ NH₄Cl; 5, 6 – *nit-6* + 50 мМ NH₄Cl; 7, 8 – *nit-6* + 50 мМ NH₄NO₃; 9, 10 – *wt-987* + 50 мМ NaNO₃. 1, 3, 5, 7 – темновые контроли, 2, 4, 6, 8 – после 2-часовой стимуляции светом. Цифры обозначают молекулярные массы белков-метчиков(кДа).

рых эффект фотостимуляции конидиогенеза или был, или отсутствовал. Несмотря на отсутствие активности фермента в ряде случаев (табл. 1) иммунологически NO-синтаза выявлялась во всех вариантах. Средние показатели денситометрии экспрессии фермента в различных вариантах конидиогенеза из 3 Вестерн-блот опытов суммированы на диаграмме рис. 5б. Они свидетельствовали скорее о зависимости экспрессии фермента от состава среды культивирования, чем от влияния освещения мицелия в разных вариантах конидиогенеза *N. crassa*.

Изменение удельной активности NO-синтазы под действием света ранее было выявлено у зигомицета *P. blakesleanus* [5]. Предполагали, что данный фермент является частью световой сигнальной цепи, так как образование цитруллина из аргинина увеличивалось под действием света в наиболее важных фазах развития зигомицета – в логарифмической фазе роста мицелия и при созре-

вании макроспорангиофоров. Увеличение активности NO-синтазы в 72 раза перед образованием плодовых тел происходило в освещенном мицелии базидиомицета *F. velutipes* [6], однако оценить вклад действия света в этот процесс сложно, так как темновые контроли не были поставлены. Основываясь на действии донора NO и ингибиторов NO-синтазы на фотоконидиогенез *N. crassa*, Ниннеманн и Майер [16] предположили, что свет может быть отрицательным регулятором функционирования NO за счет ингибирующего действия на фермент. Однако, в настоящей работе выявить какие-либо светозависимые изменения удельной активности NO-синтазы в светорегулируемых процессах каротиногенеза и конидиогенеза *N. crassa* не удалось. Вместе с тем, учитывая данные о динамике выхода нитрита из мицелия *nit-6* и изменения внутриклеточного содержания NO₃⁻ и NO₂⁻ у разных штаммов при фотоиндукции каротиногенеза и фотоактивации конидиогенеза [19, 20], можно так-

же предположить возможность L-аргинин-независимого синтеза NO у *N. crassa*. Он может осуществляться белком (или комплексом белков), обычно выполняющим другие ферментативные функции.

У высших растений в определенных условиях продукцию оксида азота катализируют НР [28, 29]. Недавно на примере *Aspergillus* установлено, что грибы также способны синтезировать NO при помощи НР [30]. Возможность участия НР и НиР в регуляции фотоконидиогенеза *N. crassa* (wt-987 штамм на среде с вторичным азотом) рассматривалась в предыдущей работе [22], однако наличие данных ферментов не являлось необходимым элементом процесса, так как и у *nit-2*, и *nit-6* мутантов наблюдалась светозависимая стимуляция образования спор. С использованием мутантов, дефицитных по НР и НиР было показано, что эти ферменты также не участвуют в синтезе NO у *Magnaporthe oryzae*, аскомицета, вызывающего гниль риса [31]. Другими вероятными кандидатами, ответственными за образование оксида азота, могут быть ксантиноксидоредуктаза [29], р450:НАДФН-Р450 редуктаза [31] или некоторые мембраносвязанные ферменты [29, 32]. Гипотеза, предложенная для высших растений, по которой NO-синтазоподобная активность, зависящая от L-Arg, может быть результатом кооперативного действия нескольких дискретных белков, собранных в сложный комплекс, в результате чего генерируется NO [12], может быть справедлива и для грибов.

Недавно Пенгкит с соавт. [33] выявили в геноме *N. crassa* ряд генов, имеющих высокую степень гомологии с генами NO-синтазы других грибов и человека. Анализируя их свойства, авторы предположили возможность существования различных путей синтеза NO (зависимого и независимого от NO-синтазы) у *N. crassa*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J., Higgins V.J. // Fungal Genet. Biol. 2005. V. 42. № 4. P. 284–292.
2. 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.
3. Turrion-Gomez J.L., Eslava A.P., Benito E.P. // Fungal Genet. Biol. 2010. V. 47. № 5. P. 484–496.
4. Lai T., Li B., Qin G., Tian S. // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. № 1. P. 229–234.
5. Maier J., Hecker R., Rockel P., Ninnemann H. // Plant Physiol. 2001. V. 126. № 3. P. 1323–1330.
6. Song N.K., Jeong C.S., Choi I.S. // Mycologia. 2000. V. 92. № 6. P. 1027–1032.
7. Gong X., Fu Y., Jiang D., Li G., Yi X., Peng Y. // Fungal Genet. Biol. 2007. V. 44. № 12. P. 1368–1379.
8. Li B., Fu Y., Jiang D., Xie J., Cheng J., Li G. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 9. P. 2830–2836.
9. Chiuchetta S.J.R., Castro-Prado M.A.A. // Genet. Mol. Biol. 2005. V. 28. № 4. P. 798–803.
10. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. // Biochem. J. 2001. V. 357. Pt. 3. P. 593–615.
11. Филиппович С.Ю. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 10. С. 1367–1376.
12. Corpas F.G., Barroso J.B. // Nitric Oxide. 2017. V. 68. P. 5–6.
13. Santolini J., Andre F., Jeandroz S., Wendehenne D. // Nitric Oxide. 2017. V. 63. P. 30–38.
14. Chang K., Guo T., Li P., Liu Y., Xu Y., Fang Y., Qian X. // Sci. Reports. 2016. V. 6. P. 32630.
15. Cánovas D., Marcos J.F., Marcos A.T., Strauss J. // Curr. Genet. 2016. V. 62. P. 513–518.
16. Ninnemann H., Maier J. // Photochem. Photobiol. 1996. V. 64. № 2. P. 393–398.
17. Almeida B., Buttner S., Ohlmeier S., Silva A., Mesquita A., Sampaio-Marques B. et al. // J. Cell Sci. 2007. V. 120. № 18. P. 3279–3288.
18. Vieira A.L., Linares E., Augusto, O., Gomes S.L. // Fungal Genet. Biol. 2009. V. 46. № 8. P. 575–584.
19. Филиппович С.Ю., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 3. С. 331–337.
20. Филиппович С.Ю., Онуфриев М.В., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 403–409.
21. Marzluf G.A. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. № 1. P. 17–32.
22. Филиппович С.Ю., Бачурина Г.П., Шербаков Д.Л. // Прикл. биохимия и микробиол. 2015. Т. 51. № 3. С. 326–334.
23. Ruan J., Xie Q., Hutchinson N., Cho H., Wolfe G.C., Nathan C. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 37. P. 22679–22686.
24. Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 34. P. 22789–22791.
25. Kanadia R.N., Kuo W.N., McNabb M., Botchway A. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1998. V. 45. № 6. P. 1081–1087.
26. 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.
27. Bahns M., Garret R.H. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 2. P. 690–693.
28. Moreau M., Lindermayr C., Durner J., Klessig D.F. // Physiol. Plant. 2010. V. 138. № 4. P. 372–383.
29. Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. № 3. P. 160–168.
30. Marcos A.T., Ramos M.S., Marcos J.F., Carmona L., Strauss J., Canovas D. // Mol. Microbiol. 2016. V. 99. № 1. P. 15–33.
31. Samalova M., Johnson J., Illes M., Kelly S., Fricker M., Gurr S. // New Phytol. 2013. V. 197. P. 207–222.
32. Baudouin E. // Plant Biol. 2011. V. 13. № 2. P. 233–242.
33. Pengkit A., Jeon S.S., Son S.J., Shin J.H., Baik K.Y., Choi E.H., Park G. // Sci. Reports. 2016. V. 6. Article № 30037. <https://doi.org/10.1038/srep30037>

NO-Synthase Activity in Photomorphogenesis in *Neurospora crassa***S. Yu. Filippovich^{a, *}, M. V. Onufriev^b, D. I. Peregud^c, G. P. Bachurina^a, and M. S. Kritsky^a**^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*^b*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117485 Russia*^c*Serbsky Federal Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119034 Russia***e-mail: syf@inbi.ras.ru*

NO synthase activity was detected in *Neurospora crassa* cells by measuring the conversion of ³H-L-arginine to ³H-L-citrulline. Some properties of this activity (sensitivity to calcium ions, the action of specific enzyme inhibitors, Western blot analysis) were similar to those for inducible enzyme form in mammals. According to Western blotting, the molecular weight of the enzyme was about 130 kDa. No light-dependent changes in the specific activity of NO synthase were revealed in photocarotino-genesis and photoconidiogenesis of *N. crassa*.

Keywords: NO-synthase, conidiation, carotino-genesis, *Neurospora crassa*