

РОЛЬ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ ОКСИДА АЗОТА И СЕРОВОДОРОДА В РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 57.053

ОКСИД АЗОТА(II) В БИОЛОГИИ Chlorophyta

© 2023 г. Е. В. Ермилова*

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербурге, 199034 Россия

*e-mail: e.ermilova@spbu.ru

Поступила в редакцию 01.03.2023 г.

После доработки 20.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

NO представляет собой газообразную сигнальную редокс-молекулу, функционирующую в клетках эукариот. Однако некоторые аспекты синтеза, оборота и эффектов NO специфичны для растений. В отличие от высших растений роль NO у Chlorophyta изучена еще недостаточно. Тем не менее, некоторые механизмы контроля уровня этой сигнальной молекулы охарактеризованы на модельных представителях зеленых водорослей. Так, в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* синтез NO осуществляется с помощью двойной системы, включающей нитратредуктазу и NO-формирующую нитриредуктазу. Другие механизмы, с помощью которых NO образуется из нитрита, связаны с компонентами электрон-транспортной цепи митохондрий. Кроме того, образование NO у некоторых зеленых водорослей происходит по окислительному механизму, сходному с механизмом у млекопитающих. Недавнее выявление *L*-аргининзависимого синтеза NO у бесцветной водоросли *Polytomella parva* предполагает существование комплекса белков с ферментативной активностью, сходной по действию с синтазой оксида азота у животных. Это открытие прокладывает путь к дальнейшему изучению потенциальных членов семейства NO-синтаз у Chlorophyta. Неотъемлемой частью функционирования NO в клетках является не только его синтез, но и регуляторные процессы, участвующие в поддержании внутриклеточного уровня NO. Члены семейства усеченных гемоглобинов с диоксигеназной активностью могут превращать NO в нитрат, как у *C. reinhardtii*. Описано также участие NO-редуктазы в нейтрализации NO. Еще более интригующим является тот факт, что зеленые водоросли, в отличие от животных, по-видимому, не используют типичный сигнальный модуль NO-сGMP. S-нитрозированный глутатион, который считается основным резервуаром NO в клетках, передает сигналы NO белкам. S-нитрозирование белков Chlorophyta считается одним из ключевых механизмов действия редокс-молекулы. В представленной работе обсуждается современное состояние и перспективные направления исследований, связанных с биологией NO у зеленых водорослей.

Ключевые слова: Chlorophyta, NO, нитратредуктаза, NO-синтаза, S-нитрозирование

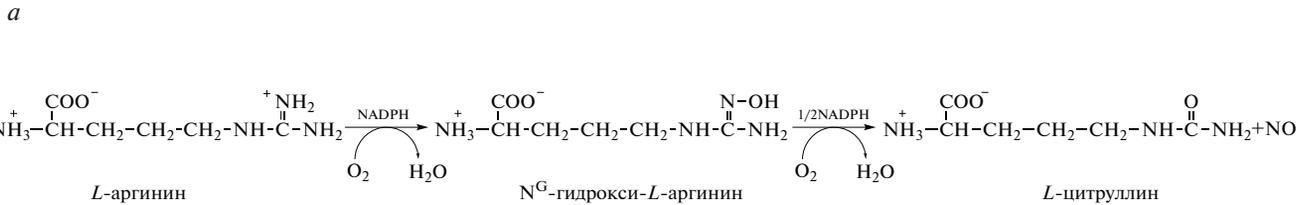
DOI: 10.31857/S002689842306006X, **EDN:** QZMDJN

ВВЕДЕНИЕ

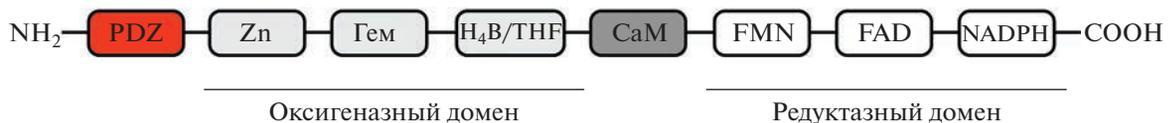
Оксид азота(II) (NO) принадлежит к категории редокс-активных молекул, которые координируют многие физиологические и биохимические процессы в организмах разного уровня организации [1–3]. С конца 1990-х годов, после выявления роли NO в воспалительных реакциях и в процессах нейротрансмиссии у млекопитающих [4–6], началось всестороннее изучение этого газообразного свободного радикала у растений [7, 8]. На примере различных представителей высших растений установлено, что NO вовлечен в регуляцию таких процессов роста и развития, как прорастание семян, цветение и созревание плодов, развитие корней, а также в адаптацию к неблагоприятным условиям окружающей среды [9–16]. Кроме того, NO играет важную роль в симбиозе бобовых растений с ризобиями, действуя как мета-

болический интермедиат в цикле фитоглобин–NO при гипоксии [17]. Анализ восстановительных и окислительных, ферментативных и неферментативных путей эндогенного синтеза NO позволил установить, что контроль с помощью этой мультифункциональной сигнальной молекулы достигается в основном за счет посттрансляционных модификаций белков (ПТМ) [8, 18–21].

Однако большинство исследований в области функций NO и механизмов контроля его внутриклеточных уровней (биологии NO) у фотосинтезирующих организмов проведено на высших растениях. По сравнению с Embryophyta функции NO у водорослей изучены недостаточно. Это создает заметный пробел в понимании механизмов образования этой сигнальной молекулы и путей ее использования у растений в целом, особенно учитывая важную роль водорослей в морских,

*b*

NOS1 млекопитающих



NOS Chlorophyta

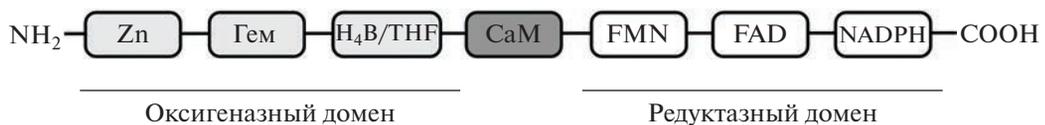


Рис. 1. Окислительный механизм формирования NO (*a*) и структура NOS у млекопитающих и зеленых водорослей (*b*).

пресноводных и наземных экосистемах. Полученные за последнее десятилетие результаты показывают, что зеленые водоросли, наряду с высшими растениями, представляют собой перспективную экспериментальную модель для изучения эволюции NO-зависимых регуляторных сетей. В предлагаемом обзоре обсуждаются последние данные о механизмах контроля внутриклеточных уровней NO, его роли и сигнальных функциях у Chlorophyta.

МЕХАНИЗМЫ СИНТЕЗА NO У CHLOROPHYTA

Механизмы, регулирующие уровни NO у фотосинтезирующих организмов, представляют одну из наиболее дискуссионных тем в биологии этой сигнальной редокс-молекулы. Зеленые водоросли способны синтезировать NO с использованием окислительного или восстановительного путей [22–26].

Окислительный путь формирования NO основан на образовании оксида азота и L-цитруллина из L-аргинина посредством двухэтапного окисления в присутствии O₂ и восстановленной формы NADPH с помощью NO-синтаз ([EC 1.14.13.39]; NOS; рис. 1*a*). Впервые такой механизм был выявлен у млекопитающих, которые используют три

изоформы NOS [27]. NOS млекопитающих — это двухдоменные белки, которые состоят из N-концевого оксигеназного домена (NOSox) и C-концевого редуктазного домена (NOSred) (рис. 1*b*). Домен NOSox связывает аргинин, протопорфирин IX (гем) и тетрагидробиоптерин (BH₄). Второй домен, NOSred, связывает NADPH, FMN и FAD [28, 29]. Оба домена соединены кальмодулинсвязывающей последовательностью (CaM). Два консервативных остатка цистеина домена NOSox в каждом мономере формируют сайт связывания цинка, который облегчает димеризацию NOS.

Первыми из NOS растений были охарактеризованы NOS зеленых одноклеточных пиководорослей, принадлежащих к классу Mamiellophyceae: *Ostreococcus tauri* (OtNOS), *O. lucimarinus* и *Bathycoccus prasinos* [22, 30, 31]. Интересно, что OtNOS обладает способностью к чрезвычайно быстрой синтезу NO, что нехарактерно для NO-синтаз животных или бактерий [32].

С использованием широкомасштабного анализа геномов и транскриптомов гомологов NOS были выявлены у некоторых водорослей [33, 34]. При этом только у 11 представителей Chlorophyta эти гомологи содержали оба домена, типичных для NOS млекопитающих, которые были соединены между собой участком, идентичным CaM-

связывающей последовательности OtNOS [33]. Следует подчеркнуть, что OtNOS сохраняет 70% активности в отсутствие CaM [22]. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что NOS Chlorophyta скорее всего не взаимодействуют с CaM. Кроме того, в отличие от NOS млекопитающих белки этого семейства у водорослей утратили консервативные аминокислотные остатки N-концевого крюка, но содержат атипичный Zn-связывающий регион [34] (рис. 1б). Еще одна отличительная особенность структурной организации NOS зеленых водорослей состоит в том, что они связывают аналог H4B, предположительно тетрагидрофолат (H4F), который, например у OtNOS, действует как донор электронов [22, 35]. Понять, являются ли эти белки истинными NOS, позволит анализ их биохимических свойств.

Примечательно, что кроме NOS “архетипического”, или “стандартного” типа, характерного для млекопитающих, обнаружены и структурно отличные от них белки [33, 36]. Поскольку в ряде случаев ингибиторный анализ выявил NOS-подобные активности у не содержащих канонических NOS представителей, предположили, что в формировании NO из аргинина могут участвовать мультимерные комплексы, состоящие из отдельных компонентов – NOSox и NOSred [21, 23].

Вместе с тем тот факт, что лишь немногие представители Chlorophyta содержат ортологи NOS, поднимает вопрос о значении этого фермента для водорослей в целом. Кроме того, у зеленых водорослей не выявлена возможность формирования NO через окислительный путь с использованием полиаминов, как у некоторых высших растений [37].

Анализ имеющихся данных указывает на то, что у большинства Chlorophyta в процессе эволюции не сохранился окислительный путь формирования NO. Вместе с тем большинство зеленых водорослей способно эффективно ассимилировать и восстанавливать нитрат, который далее восстанавливается в нитрит. Восстановительный путь формирования NO основан на его образовании из нитрита.

Восстановление нитрата в нитрит осуществляет фермент нитратредуктаза (NR). Ферменты растений локализованы в цитозоле, состоят из двух субъединиц, каждая из которых содержит три простетические группы: FAD, гем b₅₅₇ и молибденовый кофактор (МоСо), который представляет собой молибдоптеринный комплекс с молибденом [38]. Домены фермента являются окислительно-восстановительными центрами, в которых электроны от NADPH последовательно переносятся на FAD, гем и МоСо [25]. Примечательно, что фермент обладает двумя активностями: диафоразной и терминальной. В диафоразной, или дегидрогеназной активности электроны, посту-

пающие от NADPH, используются для восстановления акцепторов электронов, таких как, например, ферроцианид или цитохром c. Терминальная активность NR определяет восстановление нитрата с помощью электронов, полученных от таких доноров, как FMN, метилвиологен или бромфеноловый синий.

Экспериментальные данные, полученные на высших растениях, позволили предположить, что Мо-содержащая NR – основной фермент, ответственный за генерирование NO из нитрита у растений [8, 39, 40]. Вместе с тем, в стандартных условиях активность, обеспечивающая восстановление нитрита, составляет около 1% от общей активности NR [41]. Последнее обстоятельство предполагает минимальный вклад фермента в синтез NO. Не исключено, что другие МоСо-зависимые ферменты могут отвечать за формирование NO у растений [42].

В настоящее время нитритзависимое формирование NO экспериментально доказано только у нескольких видов зеленых водорослей [25, 43–46]. Наиболее подробно молекулярные механизмы генерирования редокс-молекулы изучены у модельной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Анализ нитритзависимого генерирования сигнальной молекулы у этой зеленой водоросли позволил пересмотреть роль NR в этом процессе. Так показано, что при образовании NO из нитрита NR взаимодействует с еще одним Мо-содержащим белком – NOFNiR (NO-формирующей нитритредуктазой) [44] (рис. 2). NOFNiR синтезирует NO независимо от Мо-центра NR, но использует электроны, поставляемые за счет диафоразной активности NR. Пока неясно, используется ли подобная двойная система NR-NOFNiR и другими зелеными водорослями, и высшими растениями.

Изучение адаптации *C. reinhardtii* к гипоксии показало, что нитритзависимое формирование NO происходит в отсутствие функциональной NR [47], а значит, осуществляется с использованием другого, независимого от NR, механизма. У высших растений компоненты электрон-транспортной цепи митохондрий (мтЭТЦ) вовлечены в синтез NO [48, 49]. Роль мтЭТЦ в формировании NO изучена у *Chlorella sorokiniana* и *C. reinhardtii* [43, 50] (рис. 2). Однако механизмы нитритзависимого синтеза NO требуют дальнейшего изучения с привлечением большего числа объектов.

МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ NO У CHLOROPHYTA

Чтобы исключить повреждающее действие NO, организмы должны контролировать его внутриклеточные уровни. Так, *C. reinhardtii* содержит усеченный гемоглобин 1 (ТНВ1), который обладает NO-диоксигеназной активностью и

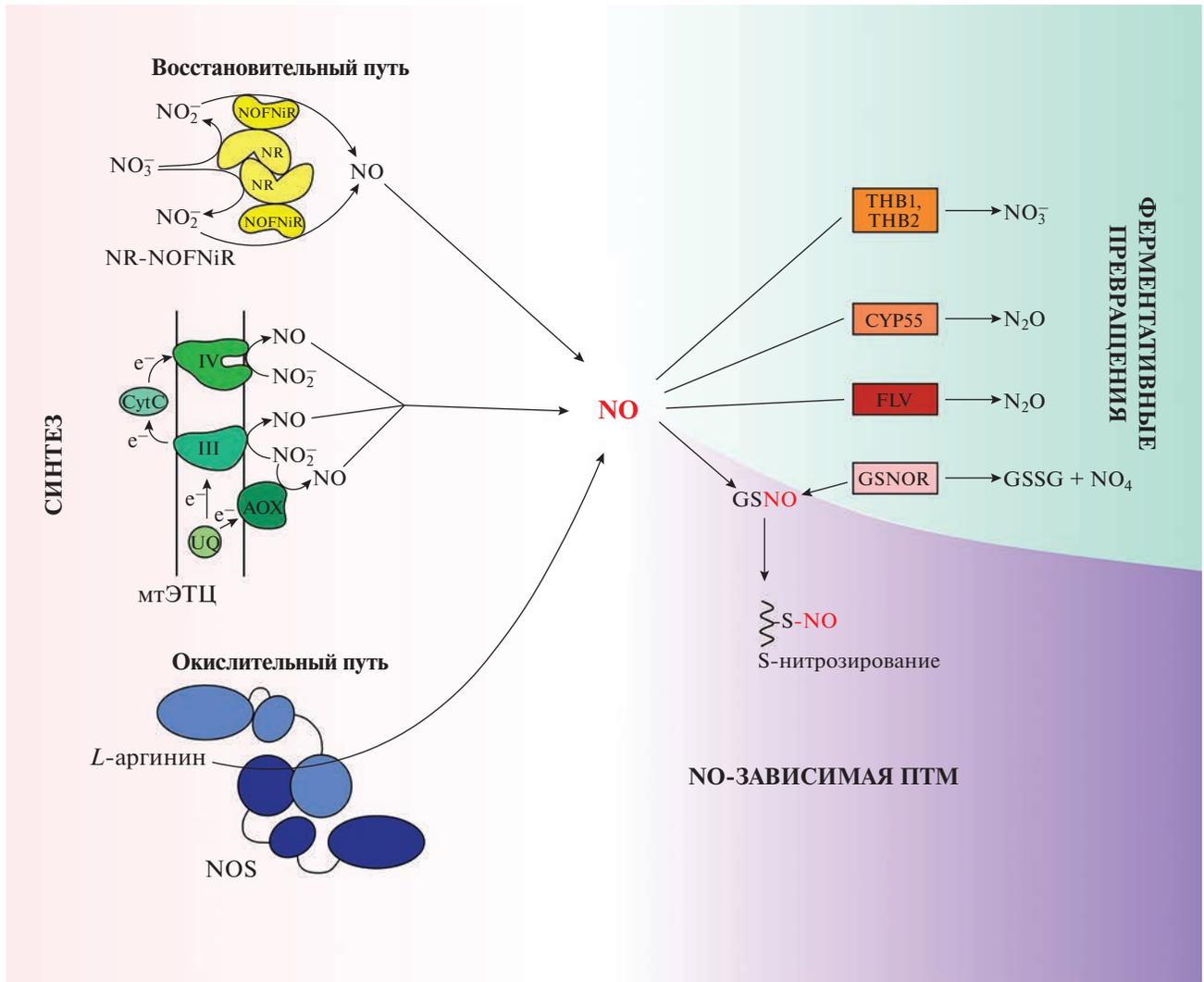


Рис. 2. Механизмы контроля внутриклеточных уровней NO у Chlorophyta.

может взаимодействовать с NR [51]. THB1 принимает электроны от NR и превращает NO в нитрат в присутствии кислорода (рис. 2), т.е. функционирует как альтернативный акцептор электронов. Интересно, что этот механизм описан у двух водорослей *Chattonella subsalsa* и *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae), у которых химерные гены кодируют как THB, так и NR [52]. Еще один усеченный гемоглобин *C. reinhardtii*, THB2, также обладающий NO-диоксигеназной активностью, необходим (дополнительно к THB1) для контроля уровней внутриклеточного NO в условиях дефицита фосфора [53, 54]. Предполагается, что усеченные гемоглобины вовлечены в модуляцию уровней NO и за счет этого могут контролировать NO-зависимые сигнальные пути [45, 51, 53, 54].

Кроме того, NO, как показано недавно, может служить субстратом для NO-редуктаз *C. reinhardtii*, которые катализируют образование оксида

азота(I) (N_2O) в митохондриях и хлоропластах [55–57]. На свету процесс формирования катализируется FLV-белками, а в темноте цитохромом P450 – CYP55 [57]. Примечательно, что CYP55 синтезируется и функционирует в основном при низком содержании кислорода в среде [58]. Поскольку различные Chlorophyta используют оба механизма синтеза N_2O [57], этот путь контроля уровней NO у зеленых водорослей может быть наиболее консервативным.

Уровни NO в клетках могут регулироваться также путем окисления производных NO (RNS) с антиоксидантом – трипептидом глутатионом (GSH, Glu-Cys-Glu), что приводит к образованию S-нитрозоглутатиона (GSNO), который рассматривается в качестве основного внутриклеточного резервуара NO [59]. Поскольку GSNO действует как своеобразный буфер NO, его уровни важны для обеспечения гомеостаза NO. В связи с

этим S-нитрозоглутатионредуктаза (GSNOR), которая катализирует необратимое превращение GSNO в окисленный глутатион, вовлечена по сути в поддержание баланса активных форм азота и, в конечном счете, в контроль редокс-состояния цитоплазмы [60]. Интересно, что в ядерном геноме *C. reinhardtii* выявлены два гена, кодирующих изоформы GSNOR. Охарактеризован фермент CrGSNOR1 и установлена его ограниченная чувствительность к редокс-зависимым посттрансляционным модификациям [61]. Предполагается, что уровни нитрозотиолов в клетках водоросли контролируются другими ферментами или регулируются в основном на уровне синтеза NO. Подобное отличие от высших растений может быть связано с разными потребностями в регуляции метаболизма NO у Chlorophyta и Streptophyta.

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ NO У CHLOROPHYTA

У млекопитающих описан NO-зависимый сигнальный путь, в котором продуцируемый синтазой NO активирует растворимые гуанилатциклазы (рГЦ), которые катализируют синтез вторичного посредника cGMP из гуанозин-5'-трифосфата. Передача сигнала осуществляется через последующее действие cGMP на белки-эффекторы [62].

У пяти видов зеленых водорослей (Chlorophyta, порядок Chlamydomonadales) выявлены 11 белков, гомологичных рГЦ [24]. Однако во всех белках зеленых водорослей отсутствовали остатки цистеина (Cys78 и Cys214), необходимые для восприятия рГЦ молекулы NO. Последнее обстоятельство указывает на то, что ни один из этих белков не может отвечать на действие NO, подобно рГЦ животных. Кроме того, проанализированные рГЦ *C. reinhardtii*, CYG12, CYG56 и CYG11, не демонстрировали зависимости от NO [63]. Более того, CYG11 охарактеризован как потенциальный СО-сенсор [64]. Имеющиеся данные позволяют сделать вывод о том, что растения не используют классический модуль NO/cGMP [65]. По-видимому, в процессе эволюции у животных и растений произошла дивергенция контролируемых NO сигнальных путей.

Считается, что у высших растений основной NO-зависимый сигнальный механизм связан с посттрансляционным S-нитрозированием белков [24]. При модификациях этого типа молекула NO реагирует с тиоловой группой цистеина в присутствии акцептора электронов и образуется ковалентная связь S-NO—S-нитрозотиол [66].

Среди зеленых водорослей S-нитрозирование анализировали главным образом у *C. reinhardtii*. У этой модельной водоросли выявлено около 500 S-нитрозированных белков, функции кото-

рых связаны с метаболическими процессами, синтезом, фолдингом и деградацией белков, репликацией, транскрипцией и другими функциями клетки [67]. Кроме того, охарактеризовано несколько белков *C. reinhardtii*, подвергающихся этой ПТМ [68, 69]. Оксид азота образуется в клетках *C. reinhardtii* при ассимиляции нитрата [70, 71], голодании по макроэлементам [45, 53, 54, 72, 73], в условиях гипоксии [47] и важен для синтеза пролина и путресцина [74], однако S-нитрозирование белков охарактеризовано только при солевом стрессе [75]. Способностью к S-нитрозированию обладает также близкородственная *C. reinhardtii* нефотосинтезирующая водоросль *P. parva* [23]. Таким образом, чтобы экспериментально подтвердить предположение о ключевой роли S-нитрозирования в действии NO на зеленые водоросли, необходим анализ этой модификации белков у других представителей Chlorophyta и в разных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Исследования последних лет привели к обнаружению синтеза NO представителями Chlorophyta. Однако несмотря на широкое использование зеленых водорослей в научных исследованиях и биотехнологии, механизмы формирования/утилизации NO и его роль в путях передачи сигналов у этих организмов пока недостаточно понятны. Одной из основных проблем в изучении роли NO была (и остается) расшифровка механизмов, которые определяют изменение его внутриклеточных уровней. Так, у высших растений ключевая роль в синтезе NO приписывается NR. У *C. reinhardtii* открыта новая система формирования редокс-молекулы, состоящая из двух ферментов: NO-формирующей нитритредуктазы и NR. Вместе с тем остается неясным, функционирует ли подобная система у других водорослей или они, подобно высшим растениям, используют NR для синтеза NO.

Открытие окислительного пути синтеза NO и характеристика NOS у некоторых Chlorophyta также не позволяют пока понять, насколько широко эта группа организмов использует аргинин в качестве субстрата для генерации NO и могут ли комплексы, состоящие из нескольких белков, функционально заменять NOS. В пользу последнего предположения свидетельствует недавнее открытие аргининзависимого синтеза NO у нефотосинтезирующей водоросли *P. parva*, утратившей NR в процессе эволюции.

Не менее интригующим остается ферментативное превращение NO. В ряде работ установлено участие в этом процессе усеченных гемоглобинов с диоксигеназной активностью. Кроме того, оказалось, что в снижении уровней NO в клетках зеленых водорослей важную роль могут играть

NO-редуктазы, катализирующие превращение NO в N₂O. В целом, для выяснения всех нерешенных вопросов необходимо исследование большего числа объектов.

Следует отдельно выделить еще одно интенсивно развивающееся направление, связанное с анализом механизмов действия этой сигнальной молекулы. Метаболизм оксида азота регулируется редокс-состоянием клеток. Совместно с другими редокс-молекулами, NO вовлечен в контроль клеточных редокс-процессов. В этой связи у Chlorophyta прежде всего необходимо детальное изучение взаимодействия NO с активными формами кислорода. Кроме того, последние данные позволяют поставить под сомнение, что Chlorophyta используют в регуляторных сетях типичный для животных модуль NO-сGMP. В отсутствие у водорослей специфических рецепторов восприятие и действие NO осуществляется, по-видимому, преимущественно через ПТМ. Для подтверждения правильности предположения о ключевой роли ПТМ по типу S-нитрозирования необходим анализ S-нитросом у различных представителей Chlorophyta в физиологических условиях, при которых в клетках генерируется редокс-молекула. По нашему мнению, дальнейший прогресс в области биологии NO у Chlorophyta позволит судить об эволюции ключевых компонентов (ферментов и регуляторных белков) биосинтеза и утилизации оксида азота, а также о тех регуляторных сетях, которые контролируются NO у растений.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 21-14-00017 для Е.Е.В.).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wendehenne D., Durner J., Klessig D.F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**(4), 449–455.
2. Wendehenne D., Pugin A., Klessig D.F., Durner J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**(4), 177–183.
3. Bredt D.S., Snyder S.H. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* **8**(1), 3–11.
4. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**(24), 9265–9269.
5. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* **327**(6122), 524–526.
6. Cox M.A., Bassi C., Saunders M.E., Nechanitzky R., Morgado-Palacin I., Zheng C., Mak T.W. (2020) Beyond neurotransmission: acetylcholine in immunity and inflammation. *J. Intern. Med.* **287**(2), 120–133.
7. Astier J., Gross I., Durner J. (2018) Nitric oxide production in plants: an update. *J. Exp. Bot.* **69**(14), 3401–3411.
8. Kolbert Z.S., Barroso J.B., Brouquisse R., Corpas F.J., Gupta K.J., Lindermayr C., Loake G.J., Palma J.M., Petřivalský M., Wendehenne D., Hancock J.T. (2019) A forty year journey: the generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide.* **93**, 53–70.
9. Yu M., Lamattina L., Spoel S.H., Loake G.J. (2014) Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol.* **202**(4), 1142–1156.
10. He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D., Cook C.W., Ahn S.M., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F., Fiorani F., Jackson R.B., Crawford N.M., Pei Z.M. (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science.* **305**(5692), 1968–1971.
11. Bethke P.C., Libourel I.G., Jones R.L. (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **57**(3), 517–526.
12. Sun C., Lu L., Liu L., Liu W., Yu Y., Liu X., Hu Y., Jin C., Lin X. (2014) Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* **201**(4), 1240–1250.
13. Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **59**(2), 165–176.
14. Qiao W., Fan L.M. (2008) Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* **50**(10), 1238–1246.
15. Fancy N.N., Bahlmann A.K., Loake G.J. (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant Cell Environ.* **40**(4), 462–472.
16. González-Gordo S., Bautista R., Claros M.G., Cañas A., Palma J.M., Corpas F.J. (2019) Nitric oxide-dependent regulation of sweet pepper fruit ripening. *J. Exp. Bot.* **70**(17), 4557–4570.
17. Berger A., Boscari A., Frendo P., Brouquisse R. (2019) Nitric oxide signaling, metabolism and toxicity in nitrogen-fixing symbiosis. *J. Exp. Bot.* **70**(17), 4505–4520.
18. Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.* **16**(3), 160–168.
19. Astier J., Lindermayr C. (2012) Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(11), 15193–15208.
20. Corpas F.J., Chaki M., Leterrier M., Barroso J.B. (2009) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signal. Behav.* **4**(10), 920–923.

21. Corpas F.J., Palma J.M., Río L.A.D., Barroso J.B. (2009) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.* **184**, 9–14.
22. Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Calo G., Salerno G., Lamattina L. (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell.* **22**(11), 3816–3830.
23. Lapina T., Statinov V., Puzanskiy R., Ermilova E. (2022) Arginine-dependent nitric oxide generation and S-nitrosation in the non-photosynthetic unicellular alga *Polytomella parva*. *Antioxidants.* **11**(5), 949.
24. Astier J., Mounier A., Santolini J., Jeandroz S., Wendehenne D. (2019) The evolution of nitric oxide signaling diverges between animal and green lineages. *J. Exp. Bot.* **70**(17), 4355–4364.
25. Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. (2017) Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends Plant Sci.* **22**(2), 163–174.
26. Mallick N., Rai L.C., Mohn F.H., Soeder C.J. (1999) Studies on nitric oxide (NO) formation by the green alga *Scenedesmus obliquus* and the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Chemosphere.* **39**(10), 1601–1610.
27. Stuehr D.J., Santolini J., Wang Z.Q., Wei C.C., Adak S. (2004) Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* **279**(35), 36167–36170.
28. Daff S. (2010) NO synthase: structures and mechanisms. *Nitric Oxide.* **23**(1), 1–11.
29. Li H., Poulos T.L. (2005) Structure–function studies on nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.* **99**(1), 293–305.
30. Di Dato V., Musacchia F., Petrosino G., Patil S., Montresor M., Sanges R., Ferrante M.I. (2015) Transcriptome sequencing of three pseudo-nitzschia species reveals comparable gene sets and the presence of nitric oxide synthase genes in diatoms. *Sci. Rep.* **5**(1), 12329.
31. Kumar A., Castellano I., Patti F.P., Palumbo A., Buia M.C. (2015) Nitric oxide in marine photosynthetic organisms. *Nitric Oxide.* **47**, 34–39.
32. Weisslocker-Schaetzl M., André F., Touazi N., Foresi N., Lembrouk M., Dorlet P., Frelet-Barrand A., Lamattina L., Santolini J. (2017) The NOS-like protein from the microalgae *Ostreococcus tauri* is a genuine and ultrafast NO-producing enzyme. *Plant Sci.* **265**, 100–111.
33. Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Wong G.K.S., Wendehenne D. (2016) Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* **9**(417), re2.
34. Santolini J., André F., Jeandroz S., Wendehenne D. (2017) Nitric oxide synthase in plants: where do we stand? *Nitric Oxide.* **63**, 30–38.
35. Foresi N., Mayta M.L., Lodeyro A.F., Scuffi D., Correa-Aragunde N., García-Mata C., Casalougué C., Carrillo N., Lamattina L. (2015) Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **82**(5), 806–821.
36. Chatelain P., Astier J., Wendehenne D., Rosnoblet C., Jeandroz S. (2021) Identification of partner proteins of the algae *Klebsormidium nitens* NO synthases: toward a better understanding of NO signaling in eukaryotic photosynthetic organisms. *Front. Plant Sci.* **12**, 3068.
37. Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I.S., Scherer G.F. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* **47**(3), 346–354.
38. Campbell M.G., Smith B.C., Potter C.S., Carragher B., Marletta M.A. (2014) Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**(35), E3614–E3623.
39. Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(25), 16314–16318.
40. Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* **4**(4), 128–129.
41. Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **53**(366), 103–110.
42. Tejada-Jimenez M., Llamas A., Galván A., Fernández E. (2019) Role of nitrate reductase in NO production in photosynthetic eukaryotes. *Plants.* **8**(3), 56.
43. Tischner R., Planchet E., Kaiser W.M. (2004) Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett.* **576**(1–2), 151–155.
44. Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Llamas Á., Ocaña-Calahorra F., Mariscal V., Carreras A., Barroso J.B., Galván A., Fernández E. (2016) A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ.* **39**(10), 2097–2107.
45. Minaeva E., Zalutskaya Z., Filina V., Ermilova E. (2017) Truncated hemoglobin 1 is a new player in *Chlamydomonas reinhardtii* acclimation to sulfur deprivation. *PLoS One.* **12**(10), e0186851.
46. Zalutskaya Z., Korkina S., Ermilova E. (2023) Second nitrate reductase of *Dunaliella salina*: functional redundancy or greatly? *Protistology.* **17**(1), 16–29.
47. Hemschemeier A., Düner M., Casero D., Merchant S.S., Winkler M., Happe T. (2013) Hypoxic survival requires a 2-on-2 hemoglobin in a process involving nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**(26), 10854–10859.
48. Gupta K.J., Igamberdiev A.U. (2011) The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion.* **11**(4), 537–543.
49. Vishwakarma A., Kumari A., Mur L.A., Gupta K.J. (2018) A discrete role for alternative oxidase under hy-

- poxia to increase nitric oxide and drive energy production. *Free Radic. Biol. Med.* **122**, 40–51.
50. Ostroukhova M., Ermilova E. (2019) New insights into NO generation and AOX1 upregulation in *Chlamydomonas*. *Protistology*. **13**(1), 19–25.
 51. Sanz-Luque E., Chamizo-Ampudia A., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. (2015) Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front. Plant Sci.* **6**, 899.
 52. Stewart J.J., Coyne K.J. (2011) Analysis of raphidophyte assimilatory nitrate reductase reveals unique domain architecture incorporating a 2/2 hemoglobin. *Plant Mol. Biol.* **77**, 565–575.
 53. Filina V., Grinko A., Ermilova E. (2019) Truncated hemoglobins 1 and 2 are implicated in the modulation of phosphorus deficiency-induced nitric oxide levels in *Chlamydomonas*. *Cells*. **8**(9), 947.
 54. Grinko A., Alqoubaili R., Lapina T., Ermilova E. (2021) Truncated hemoglobin 2 modulates phosphorus deficiency response by controlling of gene expression in nitric oxide-dependent pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. **254**, 1–15.
 55. Plouviez M., Wheeler D., Shilton A., Packer M.A., McLenachan P.A., Sanz-Luque E., Ocaña-Calahorro F., Fernández E., Guieysse B. (2017) The biosynthesis of nitrous oxide in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **91**(1), 45–56.
 56. Plouviez M., Shilton A., Packer M.A., Guieysse B. (2019) Nitrous oxide emissions from microalgae: potential pathways and significance. *J. Appl. Phycol.* **31**, 1–8.
 57. Burlacot A., Richaud P., Gosset A., Li-Beisson Y., Peltier G. (2020) Algal photosynthesis converts nitric oxide into nitrous oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**(5), 2704–2709.
 58. Zalutskaya Z., Dukhnov S., Leko N., Ermilova E. (2021) Nitric oxide levels and CYP55 expression in *Chlamydomonas reinhardtii* under normoxia and hypoxia. *Protistology*. **15**(3), 153–160.
 59. Frungillo L., Skelly M.J., Loake G.J., Spoel S.H., Salgado I. (2014) S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat. Commun.* **5**(1), 5401.
 60. Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2019) S-nitrosoglutathione reductase – the master regulator of protein S-nitrosation in plant NO signaling. *Plants*. **8**(2), 48.
 61. Tagliani A., Rossi J., Marchand C.H., De Mia M., Tedesco D., Gurrieri L., Meloni M., Falini G., Trost P., Lemaire S.D., Fermani S., Zaffagnini M. (2021) Structural and functional insights into nitrosoglutathione reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Redox Biol.* **38**, 101806.
 62. Martínez-Ruiz A., Cadenas S., Lamas S. (2011) Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* **51**(1), 17–29.
 63. de Montaigu A., Sanz-Luque E., Galvan A., Fernandez E. (2010) A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell*. **22**(5), 1532–1548.
 64. Horst B.G., Stewart E.M., Nazarian A.A., Marletta M.A. (2019) Characterization of a carbon monoxide-activated soluble guanylate cyclase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*. **58**(17), 2250–2259.
 65. Astier J., Rossi J., Chatelain P., Klinguer A., Besson-Bard A., Rosnoblet C., Jeandroz S., Nicolas-Francès V., Wendehenne D. (2021) Nitric oxide production and signalling in algae. *J. Exp. Bot.* **72**(3), 781–792.
 66. Smith B.C., Marletta M.A. (2012) Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**(5–6), 498–506.
 67. Morisse S., Zaffagnini M., Gao X.H., Lemaire S.D., Marchand C.H. (2014) Insight into protein S-nitrosylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Antioxid. Redox Signal.* **21**(9), 1271–1284.
 68. Zaffagnini M., Michelet L., Sciabolini C., di Giacinto N., Morisse S., Marchand C.H., Trost P., Fermani S., Lemaire S.D. (2014) High-resolution crystal structure and redox properties of chloroplastic triosephosphate isomerase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Plant*. **7**(1), 101–120.
 69. Berger H., De Mia M., Morisse S., Marchand C.H., Lemaire S.D., Wobbe L., Kruse O. (2016) A light switch based on protein S-nitrosylation fine-tunes photosynthetic light harvesting in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **171**(2), 821–832.
 70. Sanz-Luque E., Ocaña-Calahorro F., Llamas A., Galvan A., Fernandez E. (2013) Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Exp. Bot.* **64**(11), 3373–3383.
 71. Zalutskaya Z., Kochemasova L., Ermilova E. (2018) Dual positive and negative control of *Chlamydomonas* PII signal transduction protein expression by nitrate/nitrite and NO via the components of nitric oxide cycle. *BMC Plant Biol.* **18**, 1–10.
 72. Wei L., Derrien B., Gautier A., Houille-Vernes L., Boulouis A., Saint-Marcoux D., Malnoë A., Rappaport F., de Vitry C., Vallon O., Choquet Y., Wollman F.A. (2014) Nitric oxide-triggered remodeling of chloroplast bioenergetics and thylakoid proteins upon nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*. **26**(1), 353–372.
 73. De Mia M., Lemaire S.D., Choquet Y., Wollman F.A. (2019) Nitric oxide remodels the photosynthetic apparatus upon S-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **179**(2), 718–731.
 74. Zalutskaya Z., Derkach V., Puzanskiy R., Ermilova E. (2020) Impact of nitric oxide on proline and putrescine biosynthesis in *Chlamydomonas* via transcriptional regulation. *Biol. Plant*. **64**, 653–659.
 75. Chen X., Tian D., Kong X., Chen Q., Ef A., Hu X., Jia A. (2016) The role of nitric oxide signalling in response to salt stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. **244**, 651–669.

Nitric Oxide(II) in Biology of Chlorophyta

E. V. Ermilova*

Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: e.ermilova@spbu.ru

NO is a gaseous signaling redox-active molecule that functions in various eukaryotes. However, its synthesis, turnover, and effects in cells are specific in plants in several aspects. Compared with higher plants, the role of NO in Chlorophyta has not been investigated enough. Yet, some of the mechanisms for controlling levels of this signaling molecule have been characterized in model green algae. In *Chlamydomonas reinhardtii*, NO synthesis is carried out by a dual system comprising nitrate reductase and NO-forming nitrite reductase. Other mechanisms that might produce NO from nitrite are associated with components of mitochondrial electron-transport chain. In addition, NO formation in some green algae proceeds by oxidative mechanism similar to that in mammals. Recent discovery of *L*-arginine-dependent NO synthesis in colorless alga *Polytomella parva* suggests the existence of a protein complex with enzyme activity that are similar to animal nitric oxide synthase. This latter finding paves the way for further research into potential members of the NO synthases family in Chlorophyta. Beyond synthesis, the regulatory processes to maintain intracellular NO levels are also an integral part for its function in cells. Members of the truncated hemoglobins family with dioxygenase activity can convert NO to nitrate, as was shown for *C. reinhardtii*. In addition, the implication of NO reductases in NO scavenging has also been described. Even more intriguing, unlike in animals, the typical NO/cGMP signaling module appears not to be used by green algae. S-nitrosylated glutathione, which is considered the main reservoir for NO, provides NO signals to proteins. In Chlorophyta, protein S-nitrosation is one of the key mechanisms of action of the redox molecule. In this review, we discuss the current state-of-the-art and possible future directions related to the biology of NO in green algae.

Keywords: Chlorophyta, NO, nitrate reductase, NO-synthase, S-nitrosation