

УДК 577.29, 632.4.01/.08

Изучение структуры компонентов системы поли(ADP-рибозил)ирования у грибов рода *Fusarium* и оценка динамики экспрессии ее ключевых генов

А. А. Стахеев*, Р. Р. Кутуков, М. Э. Тальянский, С. К. Завриев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: stakheev.aa@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2024

Принята к печати 18.07.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27450

РЕФЕРАТ Одним из основных типов посттрансляционных модификаций является полиADP-рибозилирование, ключевую роль в котором играет поли(ADP-рибоза)полимераза (PARP). Этот фермент широко представлен у эукариотических организмов, однако сведения как о структуре, так и о функциональном значении PARP у представителей царства Грибы (Fungi) на сегодняшний день крайне ограничены. В настоящей работе проведен биоинформатический поиск гомологов PARP и его антагониста – PARG – у четырех штаммов фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, структуры полных геномов которых аннотированы и депонированы в базах данных. Показано, что штаммы *F. graminearum* PH-1, *F. proliferatum* ET-1 и *F. oxysporum* Fo47 содержат по одному гомологу PARP и PARG. В то же время штамм *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 содержит четыре дополнительных белка, имеющих в своем составе каталитические домены PARP, отличающиеся по своей структуре от остальных найденных гомологов. Проведено секвенирование частичных последовательностей нуклеотидов, кодирующих каталитический домен гомолога PARP и PARG, у 11 штаммов 9 видов *Fusarium*, представленных во всероссийских коллекциях, оценены филогенетические характеристики исследуемых генов. В опытах с токсигенным штаммом *F. graminearum* показано усиление экспрессии гена, кодирующего гомолог PARP, при росте культуры в условиях, стимулирующих продукцию микотоксина ДОН, а также активизацию экспрессии PARG на более поздних стадиях роста, что косвенно свидетельствует об участии системы поли(ADP-рибозил)ирования в регуляции экспрессии генов, ответственных за биосинтез ДОН.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Fusarium*, парилирование, PARP, PARG, регуляция транскрипции, микотоксин, экспрессия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PARP – поли(ADP-рибоза)полимераза; PARG – поли(ADP-рибоза)гликогидролаза; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ДОН – дезоксиниваленол.

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания растений, вызываемые фитопатогенными грибами, представляют существенную проблему для сельского хозяйства и экономики во всех регионах мира [1, 2]. Представители некоторых таксономических групп царства Грибы (Fungi), в том числе рода *Fusarium*, не только способны заражать сельскохозяйственные культуры, но также являются продуцентами токсических вторичных метаболитов – микотоксинов [3], ингибирующих синтез белка, индуцирующих апоптотические процессы, а также оказывающих гепатотоксическое и имму-

носупрессивное действие на млекопитающих [4–7]. Способность к синтезу трихотеценовых микотоксинов является фактором агрессивности гриба по отношению к растению-хозяину: мутантные штаммы *F. graminearum*, не продуцирующие дезоксиниваленол (ДОН), могли заражать растение, однако распространения инфекции в другие его части не происходило [8].

Биосинтез основных групп микотоксинов организован сходным образом: ключевые гены, ответственные за различные его этапы, сгруппированы в кластеры, находящиеся под контролем

одного или нескольких регуляторных факторов [9, 10]. В свою очередь, «глобальные» факторы транскрипции являются медиаторами, регулирующими экспрессию специфических генов в зависимости от различных факторов внешней среды, таких, как температура, влажность, pH, доступность питательных веществ [11, 12]. В число ключевых регуляторных процессов входят модификации гистоновых белков, в том числе поли(ADP-рибозил)ирование, или парилирование.

Процесс парилирования представляет собой перенос нескольких остатков ADP-рибозы от молекулы кофактора NAD⁺ на целевую аминокислоту либо нуклеиновую кислоту, приводящий к изменению структуры, функций и стабильности молекулы-мишени [13, 14]. Ключевым ферментом, ответственным за осуществление реакции парилирования, является поли(ADP-рибоза)полимераза (PARP), относящаяся к семейству поли(ADP-рибозил)трансфераз [15]. По существующим на сегодняшний день представлениям, ферменты этого семейства обладают структурным и функциональным сходством с экзотоксинами патогенных бактерий, такими, как дифтерийный и холерный токсины [16, 17]. PARP является достаточно консервативным ферментом, он обнаружен у всех эукариот, кроме дрожжей. Наиболее хорошо охарактеризован на сегодняшний день PARP1 человека, представляющий собой белок массой 116 кДа, состоящий из трех основных доменов: N-концевого ДНК-связывающего домена, содержащего структуры типа «цинковые пальцы», центрального регуляторного (BRCT) домена, а также C-концевого каталитического домена – наиболее консервативного, обязательного для белков семейства поли(ADP-рибозил)трансфераз [18, 19]. Кроме того, в структуре гомологов PARP1 могут встречаться домен WGR (Trp-Gly-Arg), трансмембранные структуры, а также различные регуляторные последовательности [20]. Спектр процессов, в регуляции которых принимает участие PARP, достаточно широк: репарация ДНК, апоптоз, регуляция клеточного цикла, контроль транскрипции генов и др. [21–24]. На сегодняшний день известно, что некоторые эукариоты содержат несколько копий PARP: например, в клетках человека, помимо PARP1, найдены также белки-гомологи PARP2 и PARP3, по функциональной роли схожие с PARP1. В целом же геном человека содержит 17 генов, кодирующих белки PARP-семейства [15, 25]. Также необходимо отметить, что парилирование – это обратимая модификация: антагонистом PARP является поли(ADP-рибоза)гликогидролаза (PARG), ответственная за гидролиз связей рибоза–рибоза и расщепление полимерных цепей [26, 27]. В каноническом варианте (человек) PARG со-

стоит из C-концевого каталитического макродомена и N-концевой регуляторной части, хотя у других организмов структура может отличаться [28].

Необходимо отметить, что, несмотря на универсальность и высокую консервативность, сведения о функциях ферментов системы парилирования у представителей Грибы (Fungi), в том числе аскомицетов (*Ascomycota*), достаточно ограничены. Опубликован ряд работ, свидетельствующих об участии PARP в процессах апоптоза [29, 30], репликативного старения [31], а также формирования структур бесполого размножения [32]. При этом практически ничего не известно о возможной роли PARP в патогенезе и биосинтезе микотоксинов.

Цель настоящего исследования – выявление возможных гомологов PARP и PARG у представителей рода *Fusarium* путем биоинформатического поиска в общедоступных базах данных и секвенирование фрагментов генов *PARP* и *PARG* у штаммов 9 видов *Fusarium*, распространенных на территории России и сопредельных государств. Кроме того, проведено сравнение профилей экспрессии гомологов PARP и PARG у штамма *F. graminearum*, обладающего способностью к биосинтезу микотоксинов, при росте на различных средах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатический анализ

Для поиска гомологов PARP и PARG выбраны четыре штамма грибов рода *Fusarium*, структуры полных геномов которых аннотированы и депонированы в онлайн-базах данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и *Fusarium oxysporum* pangenome database (<http://www.fopgdb.site/>): *F. graminearum* PH-1, *F. proliferatum* ET-1, *F. oxysporum* Fo47 и *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287. В качестве референсных использовали аминокислотные последовательности белков PARP1 и PARG человека, гомолога PARP гриба *Aspergillus nidulans* (PrpA), а также нуклеотидные последовательности соответствующих генов. Поиск гомологов проводили с использованием алгоритма BLAST [33]. Функциональные домены в составе выявленных последовательностей белков моделировали с использованием онлайн-сервиса InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Штаммы грибов

В работе использовали 11 штаммов 9 видов рода *Fusarium* из коллекций «ФИЦ питания и биотехнологии» (ФИЦПБ), Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ВНИИЗР), Пущинского научного центра биологических ис-

следований (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ВКМ). Перечень штаммов с указанием их географического происхождения, видов растений-хозяев, годами сбора и принадлежности к той или иной коллекции приведен в *табл. 1*. Рост культур происходил в течение 7 суток при 25°C на картофельно-сахарозном агаре.

Выделение нуклеиновых кислот

ДНК выделяли по описанной ранее методике [34]. РНК выделяли из жидких культур гриба *F. graminearum* MFG 58918 с использованием набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. Концентрацию и качество нуклеиновых кислот оценивали с помощью спектрофотометра NanoVue (GE HealthCare, США), флуориметра Qubit (Thermo Scientific, США), а также электрофореза в 1% агарозном геле.

Дизайн праймеров, проведение ПЦР, секвенирование продуктов амплификации

Подбор праймеров для ПЦР и секвенирования проводили с использованием алгоритма ClustalW [35]. Физико-химические свойства праймеров оценивали с помощью программы Oligo 6.71.

Структуры праймеров и зондов, использованных для оценки относительной экспрессии референсного гена *TEF1α* и гена триходиенсинтазы *TRI5*, опубликованы ранее [36].

ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия) с использованием следующих программ амплификации:

Программа 1 (праймеры PARPF-R): 93°C, 90 с (1 цикл); 93°C, 1 с; 55°C, 5 с; 72°C, 5 с (40 циклов).

Программа 2 (праймеры PARGF-R): 93°C, 90 с (1 цикл); 93°C, 10 с; 60°C, 15 с; 72°C, 10 с (40 циклов).

Количественную ПЦР для оценки относительного уровня представленности транскриптов проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология») с использованием Программы 2. Накопление транскриптов оценивали с помощью программного обеспечения QGene [37].

Продукты ПЦР клонировали с использованием набора реагентов Quick-TA kit («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Фрагменты ДНК секвенировали в ЗАО «Евроген» по методу Сэнгера с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1. с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Полученные последовательности нуклеотидов депонированы в базу данных GenBank NCBI (номера PQ040409-PQ040429).

Филогенетический анализ

Множественное выравнивание и филогенетический анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, а также оценку их филогенетических свойств проводили с использованием пакета программ MEGA7 [38]. Построение филогенетических деревьев проводили с использованием метода максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и моделей Джоунса–Тейлора–Торнтон (для аминокислот, [39]) и GTR+G (для нуклеотидов, [40]). Достоверность топологий построенных деревьев подтверждали бутстрепным анализом (1000 повторений).

Таблица 1. Штаммы грибов, использованные в ходе исследования

Штамм	Вид	Коллекция	Источник выделения	Географическое происхождение	Год
MFG 58918	<i>F. graminearum</i>	ВНИИЗР	Зерно пшеницы	Краснодарский край	2016
ION-17-9/8	<i>F. graminearum</i>	ФИЦПБ	Зерно пшеницы	Московская область	2017
MFG 96801	<i>F. oxysporum</i>	ВНИИЗР	Зерно пшеницы	Северная Осетия	2007
F-840	<i>F. oxysporum</i>	ВКМ	Неизвестно	Германия	Неизвестно
MFG 58242	<i>F. venenatum</i>	ВНИИЗР	Неизвестно	Германия	2008
ION-3/4	<i>F. coffeatum</i>	ФИЦПБ	Зерно пшеницы	Тульская область	2014
F-3495	<i>F. redolens</i>	ВКМ	Зерно ячменя	Московская область	Неизвестно
F-206	<i>F. verticillioides</i>	ВКМ	Растение табака	Краснодарский край	Неизвестно
F-446	<i>F. fujikuroi</i>	ВКМ	Зерно риса	Япония	Неизвестно
MFG 61701	<i>F. poae</i>	ВНИИЗР	Зерно пшеницы	Саратовская область	2010
F-3951	<i>F. solani</i>	ВКМ	Почва	Московская область	Неизвестно

Оценка накопления микотоксина ДОН, продуцируемого *F. graminearum* в жидкой культуре

Для оценки накопления микотоксина дезоксиниваленола (ДОН) штамм *F. graminearum* MFG 58918 культивировали в двух средах различного состава: картофельно-сахарозном бульоне и среде MYRO [41]. Для этого жидкие среды (10 мл) инокулировали 100 мкл суспензий конидий *F. graminearum* MFG 58918 и инкубировали в течение 7 суток при 25°C. Материал для анализа относительной экспрессии целевых генов отбирали каждые 24 ч со 2-х по 7-е сутки. Пробы для анализа уровня микотоксинов отбирали на 4-е и 6-е сутки культивирования.

Содержание микотоксина в средах анализировали иммунохимическим экспресс-методом с использованием тест-наборов DONSENSOR производства компании Unisensor (Бельгия) по протоколу производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск гомологов PARP и PARG

Поиск, выполненный с использованием алгоритма BLASTp, показал, что геномы штаммов *F. graminearum* PH-1, *F. proliferatum* ET-1, *F. oxysporum* Fo47 и 4287 содержат по одной открытой рамке

считывания, продукты трансляции которых предположительно являются гомологами PARP1 человека и PrpA *A. nidulans*. Выявленные белки состоят из 747–752 аминокислотных остатков и содержат в своем составе четыре предсказанных домена: BRCT, WGR, регуляторный и каталитический. В отличие от PARP1 человека, у них отсутствует N-концевой домен, содержащий структурные мотивы типа «цинковые пальцы», а также субдомен pADR (рис. 1). В целом, структура выявленных гомологов соответствовала структуре охарактеризованного ранее PrpA *A. nidulans* [32]. Анализ сходства аминокислотных последовательностей показал, что наиболее консервативной частью всех проанализированных белков является каталитический домен: так, идентичность последовательностей каталитического домена PARP1 человека и его гомолога у *F. graminearum* PH-1 составила 43.9%, а идентичность последовательностей четырех проанализированных штаммов *Fusarium* – 85.1%. При этом, сравнение полных последовательностей PARP показало идентичность 24.5% у человека и *F. graminearum*, 76.6% между штаммами *Fusarium*. Также в структурах гомологов выявлен аминокислотный мотив гистидин-тирозин-глутаминовая кислота (H-Y-E, рис. 2), ключевой, согласно существующим представлениям, для осуществления каталитической функции PARP.

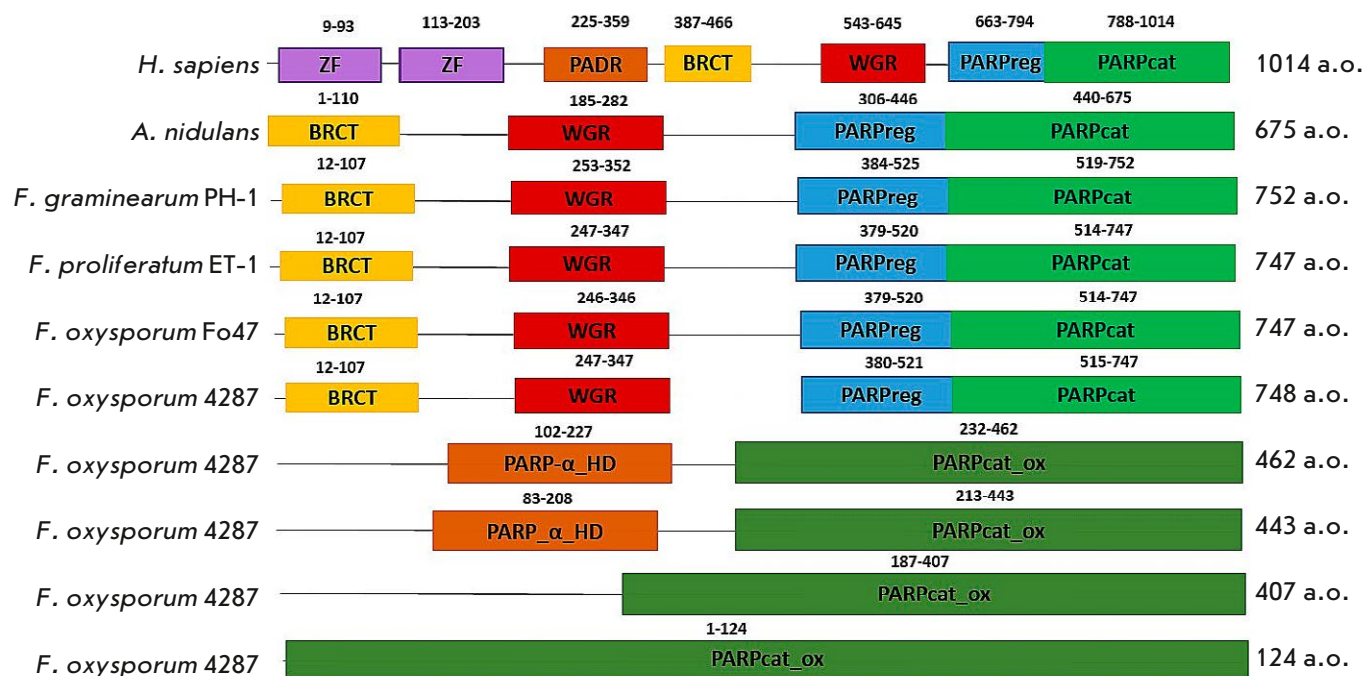


Рис. 1. Схематическое расположение основных функциональных доменов в PARP1 человека, PrpA *A. nidulans*, а также гомологов PARP четырех штаммов рода *Fusarium*. Над каждым из доменов указаны номера аминокислотных остатков в последовательности белка. ZF – структуры типа «цинковые пальцы»

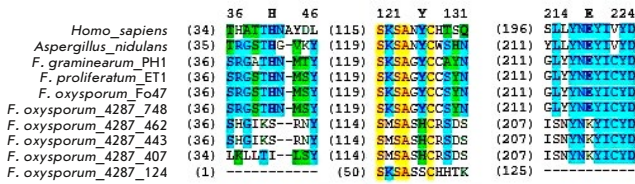
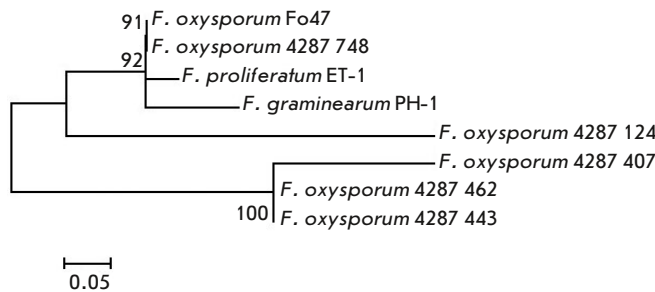


Рис. 2. Фрагменты выравнивания аминокислотных последовательностей PARP1 человека, PrpA *A. nidulans*, а также белков-гомологов PARP четырех штаммов *Fusarium*, содержащие аминокислотные остатки, составляющие мотив Н-У-Е. Ключевые аминокислоты выделены жирным шрифтом

менов которых содержатся альфа-спиральные (PARP αHD) субдомены. Еще один предсказанный гомолог длиной 407 а.о. (FoxPARP407, XP_018251711) содержал только каталитический домен без αHD-субдомена. Четвертый гомолог представлял собой короткий белок длиной 124 а.о. (FoxPARP124, XP_018251751), вся структура которого охарактеризована как каталитический домен. Интересно отметить, что гены, кодирующие четыре «дополнительных» PARP, расположены на разных хромосомах (FoxPARP462, FoxPARP407 и FoxPARP124 на хромосоме 3, FoxPARP443 – на хромосоме 6; при этом ген, кодирующий «основной» PARP, расположен на хромосоме 4). Структуры этих гомологов существенно отличались как друг от друга, так и от «основных» гомологов PARP *F. oxysporum* и других видов. Идентичность структур каталитических доменов FoxPARP443 и FoxPARP407 составила 67%, FoxPARP443 и FoxPARP124 – 52,8%, FoxPARP443 и «основного» PARP *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* – 57,2%, FoxPARP443 и PARP1 человека – 31,2%. Эти результаты подтверждаются данными филогенетического анализа аминокислотных последовательностей каталитических доменов (рис. 3). На дендрограмме видны два кластера, поддержанные значениями бутстрепа 92 и 100%: в первый входят «основные» домены четырех анализируемых штаммов, во второй – каталитические домены белков FoxPARP462, FoxPARP443 и FoxPARP407. Домен белка FoxPARP124 формировал отдельную ветвь, занимающую промежуточное положение между двумя кластерами. Также в структуре каталитических доменов «дополнительных» PARP не выявлено ни каталитического мотива Н-У-Е, ни другого распространенного в семействе поли(ADP-рибозил)-трансфераз мотива аргинин-серин-глутаминовая кислота (R-S-E).

Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей каталитических доменов белков-гомологов PARP, выявленных в геномах четырех штаммов *Fusarium* с помощью метода максимального правдоподобия. Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей



Поиск гомологов PARG проводили с использованием PARG человека в качестве референса. В каждом из исследованных геномов выявлено по одной открытой рамке считывания. Транслируемые белки состояли из 443–476 а.о. и обладали общей структурой, включающей N-концевой α-спиральный и C-концевой каталитический домены. Во всех структурах выявленных гомологов идентифицирован мотив глутамин-глутаминовая кислота-глутаминовая кислота-изолейцин (Q-E-E-I), считающийся необходимым для функциональной активности фермента (рис. 4). При этом анализ сходства аминокислотных последовательностей показал, что PARG является менее консервативным белком, чем PARP: идентичность PARG четырех анализируемых *Fusarium* составила 60,5%, а между гомологами PARG *Fusarium* и человека – лишь 17,6%.

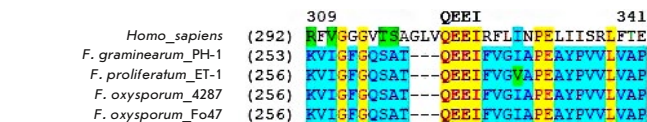


Рис. 4. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей PARG человека и белков-гомологов PARG четырех штаммов *Fusarium*, содержащий аминокислотные остатки, составляющие мотив Q-E-E-I (выделен жирным шрифтом)

Кроме того, поиск гомологов PARP при использовании в качестве запроса исключительно последовательностей аминокислот каталитических доменов PARP1 и PrpA позволил обнаружить в геноме штамма *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 еще четыре открытых рамки считывания, продукты трансляции которых содержат каталитические домены PARP (рис. 1). Два из них представляют собой белки длиной 443 (FoxPARP443, номер депонирования GenBank XP_018253699) и 462 а.о. (FoxPARP462, XP_018251710), на N-конце каталитических до-

Дизайн праймеров, секвенирование и филогенетический анализ фрагментов генов, кодирующих гомологи PARP и PARG

На основании выравнивания последовательностей нуклеотидов генов, кодирующих гомологи PARP и PARG, обнаруженные по результатам биоинформатического анализа, сконструированы универсальные праймеры для секвенирования их фрагментов. В качестве мишеней выбрали последовательность, кодирующую каталитический домен PARP и фрагмент гена PARG, кодирующий С-конец α-спирального и N-конец каталитического доменов, а также соединяющий их участок. Структуры разработанных праймеров были следующими: PARP – прямой праймер PARPF 5'-ATCCTCTYGATCGHCARTT-3', обратный праймер PARPR 5'-GHAGSAGRTAVCGBAGCTTG-3'; PARG – прямой праймер PARGF 5'-GGYAAAATHCCATTYTGGCC-3', обратный праймер PARGR 5'-AGACVACGACDGCNCCTCCTT-3'. Показано, что пара праймеров PARPF-R амплифицировала фрагменты ДНК всех 11 штаммов, выбранных для исследования (табл. 1), а пара праймеров PARGF-R – все, за исключением ДНК штамма *F. solani* F-3951. Размеры амплифицированных фрагментов составили 611 п.н. для PARP и 596–611 п.н. для PARG. Исследование филогенетических характеристик секвенированных фрагментов подтвердило тезис о том, что PARG менее консервативен, чем PARP: фрагмент гена, кодирующего гомолог PARP, содержал 58.7% консервативных, 41.3% переменных и 25.8% филогенетически информативных позиций, в то время как фрагмент гена, кодирующего гомолог PARG – 42.8% консервативных, 57.1% переменных и 42.4% филогенетически информативных позиций. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа фрагментов гена, кодирующего гомолог PARP (рис. 5А), содержало два основных кластера, в один из которых вошли виды, обладающие способностью к синтезу трихотеценовых токсинов (*F. graminearum*, *F. poae*, *F. venenatum*, *F. coffeatum*; бутстреп-поддержка 69%), а в другой – виды, продуцирующие другие группы токсинов (*F. fujikuroi*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, бутстреп-поддержка 96%). Штамм *F. solani* F-3951 образовывал отдельную ветвь; при этом необходимо отметить, что вся группа штаммов *Fusarium* формировала единый большой кластер с бутстреп-поддержкой 100%. Схожая картина наблюдалась и при анализе филогенетического дерева, построенного на основе сравнения фрагментов гена, кодирующего гомолог PARG (рис. 5Б), с той разницей, что бутстреп-поддержка для кластеров, содержащих трихотеценпродуцирующие и непродуцирующие виды была выше (94 и 99% соответствен-

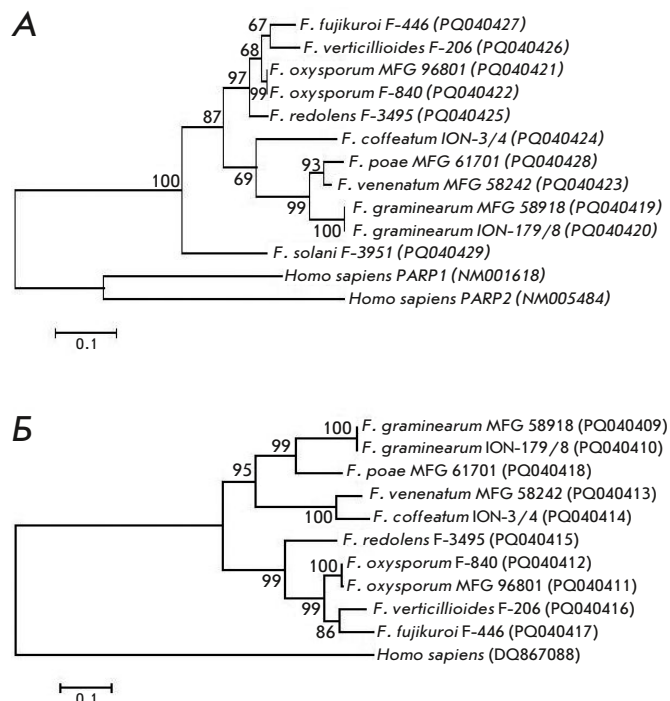


Рис. 5. Филогенетические деревья, построенные на основе сравнительного анализа последовательностей нуклеотидов PARP (А) и PARG (Б) 11 штаммов *Fusarium* из всероссийских коллекций с помощью метода максимального правдоподобия. Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей. В скобках приведен номер депонирования каждого исследованного штамма в базе данных GenBank

но). Кроме того, наблюдались отличия в топологии, выражающиеся в том, что *F. venenatum* вместе с *F. coffeatum* формировали отдельный подкластер с бутстреп-поддержкой 100%.

Анализ накопления микотоксина ДОН и динамики экспрессии генов, кодирующих гомологи PARP и PARG, при росте гриба на различных средах

Для сравнения уровней токсинообразования штамм *F. graminearum* MFG 58918 культивировали на картофельно-сахарозном бульоне (КСБ), считающемся благоприятным для роста биомассы гриба, и среде MYRO, стимулирующей биосинтез микотоксинов (в данном случае ДОН). Анализ накопления ДОН показал, что на 4 сутки в среде MYRO его концентрация составляла 30.6 мг/л среды, а на 6 сутки – 39.9 мг/л среды. При этом в культурах, выращиваемых на КСБ, ДОН не был детектирован ни в одной из временных точек. Помимо генов, кодирующих гомологи PARP (*FgPARP*) и PARG

(*FgPARG*), в исследование динамики относительной экспрессии также был включен ген *TRI5*, кодирующий триходииенсинтазу – ключевой фермент биосинтеза токсинов трихотеценовой группы. В результате показали, что при росте на среде MYRO относительная экспрессия как *TRI5*, так и *FgPARP* превышала контроль (КСБ) в каждой временной точке. Относительная экспрессия гена *FgPARG* была максимальной на 3 сутки роста (в 5.4 раза выше, чем в контроле, *рис. 6A*), а гена *TRI5* – на 4 сутки (в 8.6 раза выше, чем в контроле, *рис. 6B*). В то же время на 6–7 сутки уровни относительной экспрессии обоих генов снижались. Относительная экспрессия гена *FgPARG* на 2–5 сутки роста на среде MYRO практически не отличалась от показателей контрольной культуры, однако усиливалась на 6–7 сутки (в 2.3 и 3.2 раза соответственно выше, чем в контроле, *рис. 6B*).

ОБСУЖДЕНИЕ

PARP – фермент, принимающий участие во многих важных клеточных процессах и обнаруженный у организмов, относящихся к разным таксономическим группам. Важность изучения PARP и системы парилирования в целом определяется возможным практическим значением, в том числе использованием этого фермента в качестве мишени для лекарственных средств и препаратов для борьбы с патогенами, в том числе возбудителями болезней растений [42–46]. Однако информация о структуре и функциях компонентов системы парилирования у грибов на сегодняшний день крайне ограничена. Опубликованы данные о том, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* гомологи PARP отсутствуют [47]. С другой стороны, токсигенный гриб *A. nidulans* содержит гомолог PARP1 человека (PrpA), принимающий участие в процессах репарации ДНК и бесполого развития [32]. Показано, что гомолог PARP *F. pseudograminearum* является одним из участников процесса апоптоза [30], а обработка *F. oxysporum* ингибитором биосинтеза NAD⁺, основного субстрата PARP, снижает рост и патогенность гриба [48]. При этом одним из наиболее интересных вопросов является возможное участие PARP и его гомологов в регуляции биосинтеза микотоксинов, в том числе фузариотоксинов. На сегодняшний день модификации гистонов и изменение структуры хроматина рассматривают как одни из основных факторов, влияющих на активность генов и биосинтетических кластеров в целом [49, 50], однако роль парилирования в этих процессах у грибов не установлена.

В настоящей работе проведен поиск гомологов PARP и ее антагониста PARG с использованием баз

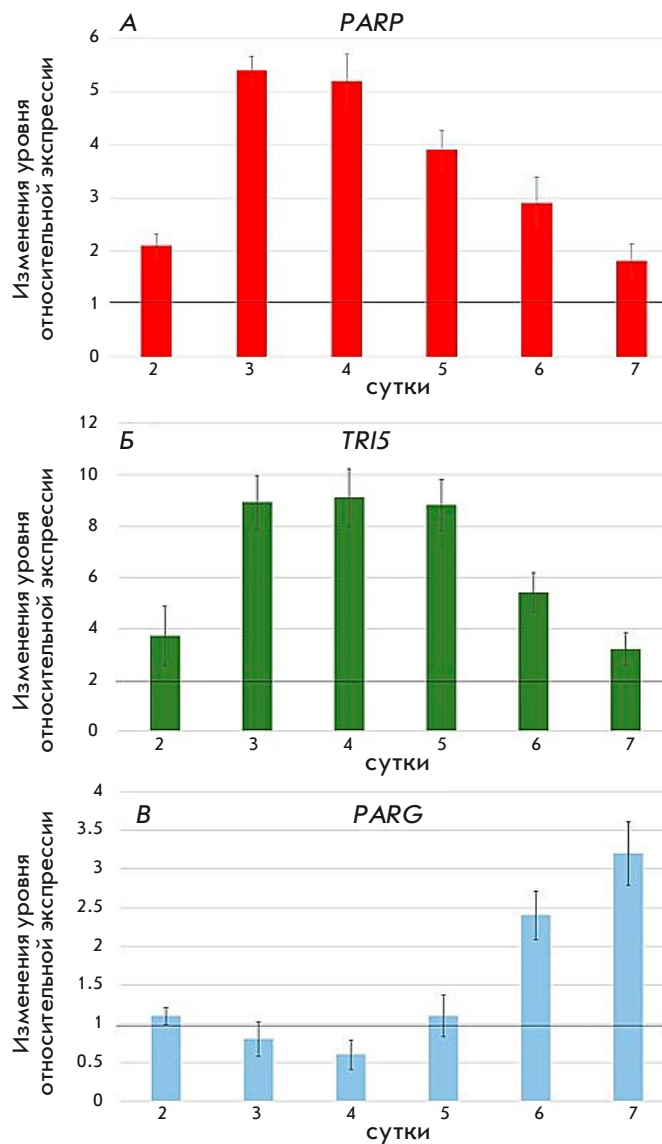


Рис. 6. Оценка уровней относительной экспрессии генов *FgPARP* (A), *TRI5* (Б) и *FgPARG* (B) с 2 по 7 сутки культивирования на среде MYRO в сравнении с контролем (КСБ, принят за 1)

данных, содержащих структуры полных геномов грибов рода *Fusarium* с предсказанными продуктами трансляции. В каждом из четырех исследованных геномов обнаружены гомологи PARP1 и PrpA длиной порядка 750 а.о., обладающие универсальной структурой: домены BRCT и WGR на N-конце, регуляторный и каталитический домены на C-конце. В отличие от PARP1 человека, у ферментов грибов отсутствовал N-концевой регуляторный домен, содержащий мотивы типа «цинковые пальцы», отвечающие за поиск и узнавание поврежденных ДНК и связывание с ними PARP, что может свидетель-

ствовать об их большем родстве с PARP2 человека, у которого также отсутствуют эти структуры [15], чем с PARP1. В связи с этим открытым остается вопрос, каким образом PARP грибов связываются с ДНК и осуществляют репарацию. Возможными вариантами, альтернативными «цинковым пальцам», могут быть участие в процессе связывания домена WGR [20] либо использование белка-посредника. Одним из наиболее интересных результатов проведенного исследования стало выявление у штамма *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287, помимо «основного» гомолога PARP, также четырех белков, содержащих каталитический домен, однако не имеющих доменов WGR и BRCT. Дополнительный поиск в базе данных с использованием алгоритма BLASTp показал, что белки, содержащие каталитический домен и по структуре похожие на «дополнительные» PARP, обнаруженные у штамма 4287, представлены и у других штаммов *Fusarium*, прежде всего у *F. oxysporum*. Этот вид крайне пластичен, в его геноме помимо основных (коровых) хромосом могут присутствовать также дополнительные хромосомы, часто несущие в своем составе гены, связанные с патогенностью и специфичностью по отношению к конкретным растениям-хозяевам [51, 52]. Вероятно, грибы приобрели «дополнительные» белки, содержащие каталитические домены PARP, независимо от «основных» посредством горизонтального переноса генов, о чем может косвенно свидетельствовать наличие похожих белков у некоторых растений, таких, как люцерна или пшеница. Однако «дополнительные» PARP не могут полностью дублировать функции «основных», что обуславливается отсутствием некоторых функционально значимых доменов в их структуре. Это, впрочем, не говорит о функциональной неполноценности этих белков, поскольку эффект, приводящий к изменению структуры хроматина и перестройкам нуклеосом, может быть не связан с ферментативной активностью PARP [53].

Функциональная активность выявленных гомологов PARP1 косвенно подтверждена с помощью поиска аминокислотных мотивов, считающихся ключевыми с точки зрения каталитического действия ферментов. Этот результат важен с эволюционной точки зрения: по имеющимся на сегодняшний день представлениям, предшественниками ферментов системы парилирования у эукариот являются бактериальные экзотоксины, такие, как дифтерийный и холерный токсины. Они обладают способностью присоединять остатки моноADP-рибозы (моно(ADP-рибозил)ирование, или марилирование) к белкам организма-хозяина, тем самым оказывая негативное воздействие на физиологические и биохимические процессы [17, 42]. Ключевым каталитическим

мотивом дифтерийного токсина является H-Y-E, холерного – R-S-E. Соответственно, семейства эукариотических поли(ADP-рибозил)трансфераз, произошедших от этих двух токсинов, отличаются по наличию одного из этих мотивов [54]. В настоящей работе показано, что каталитические центры гомологов PARP грибов рода *Fusarium* содержат каталитический мотив H-Y-E и, таким образом, могут быть отнесены к семейству ферментов, произошедших от дифтерийного токсина. При этом, «дополнительные» PARP штамма 4287 не содержали ни одного из этих каталитических мотивов, что также свидетельствует о независимом характере их происхождения. Также у исследованных штаммов *Fusarium* нами выявлено по одному гомологу PARG классической структуры, содержащему ключевой каталитический мотив Q-E-E-I.

Другой задачей исследования было расширение информации о структуре и полиморфизме генов, кодирующих гомологи PARP и PARG, у грибов рода *Fusarium*. На сегодняшний день в базах данных содержатся лишь единичные записи нуклеотидных последовательностей, охарактеризованных как гены, кодирующие компоненты системы парилирования. Разработаны универсальные праймеры, проведено секвенирование и филогенетический анализ фрагментов соответствующих генов в штаммах девяти видов рода *Fusarium*, содержащихся во всероссийских коллекциях. Показано, что фрагмент, кодирующий каталитический домен гомолога PARP, более консервативен, чем фрагмент гена, кодирующий гомолог PARG. Интересно, что топология филогенетических деревьев, построенных на основе сравнения структур этих двух генов, также несколько отличалась. По результатам анализа гомологов PARG виды *F. coffeatum* и *F. venenatum* формировали отдельный подкластер, поддержанный значением бутстрепа 100%. Этот результат выглядит необычно, поскольку, несмотря на сходство токсинных профилей (способность к синтезу трихотеценовых токсинов А типа), эти два вида относятся к разным комплексам видов (*F. coffeatum* – к *Fusarium incarnatum-equiseti species complex*, а *F. venenatum* – к *F. sambucinum species complex*). При этом топология филогенетического дерева, построенного на основании сравнения последовательностей нуклеотидов фрагмента гена, кодирующего гомолог PARP, имела более классический вид: *F. venenatum* формировал подкластер с близкородственным *F. roae*, а *F. coffeatum* – отдельную ветвь.

В рамках проведенного исследования впервые оценена динамика экспрессии генов, кодирующих гомологи PARP и PARG, у токсигенного *F. graminearum* в условиях, благоприятствующих синте-

зу токсинов, и на среде, где токсин не образовывался. Показано, что усиление уровня относительной экспрессии *FgPARP* коррелировало с накоплением токсина и усилением экспрессии *TRI5* – ключевого гена биосинтетического каскада. На более поздних этапах культивирования (6–7 сутки) наблюдалось повышение уровня экспрессии гена *FgPARG*, что, вероятно, связано с процессом депарилирования и снижения биосинтеза токсина. При этом необходимо отметить, что эти результаты лишь косвенно свидетельствуют о связи активности генов, кодирующих белки системы парилирования, с биосинтезом токсина. Для получения более достоверных данных, доказывающих эти факты, необходимы дальнейшие исследования, включающие получение мутантных штаммов и/или подавление экспрессии целевых генов с помощью других подходов, не подразумеваю-

щих генетическую трансформацию, таких, как РНК-интерференция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами существенно расширен и систематизирован объем информации, касающейся наличия компонентов системы парилирования у фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, а также структуры, полиморфизма и активности соответствующих генов. Полученные результаты являются основой для дальнейшего изучения роли, которую играет парилирование в жизнедеятельности грибов, а также возможной разработки новых подходов в борьбе с этими патогенами. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00049).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Almeida F., Rodriguez M.L., Coelho C. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 214.
- Fones H.N., Bebbler D.P., Chaloner T.M., Kay W.T., Steinberg G., Gurr S.J. // *Nat. Food.* 2020. V. 1. № 6. P. 332–342.
- Latham R.L., Boyle J.T., Barbano A., Loveman W.G., Brown N.A. // *Essays Biochem.* 2023. V. 67. № 5. P. 797–809.
- Woloshuk C.P., Shim W.-B. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. V. 37. № 1. P. 94–109.
- Escrivá L., Font G., Manyes L. // *Food Chem. Toxicol.* 2015. V. 78. P. 185–206.
- Kamle M., Mahato D.K., Gupta A., Pandhi S., Sharma B., Dhawan K., Vasundhara Mishra S., Kumar M., Tripathi A.D., et al. // *Microbiol. Res.* 2022. V. 13. № 2. P. 292–314.
- Jansen C., von Wettstein D., Schafer W., Kogel K.H., Felk A., Maier F.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 46. P. 16892–16897.
- Maier F.J., Miedaner T., Haderl B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schäfer W. // *Mol. Plant. Pathol.* 2006. V. 7. № 6. P. 449–461.
- Alexander N.J., Proctor R.H., McCormick S.P. // *Toxin Rev.* 2009. V. 28. P. 198–215.
- Wang W., Liang X., Li Y., Wang P., Keller N.P. // *J. Fungi.* 2023. V. 9. № 1. P. 21.
- Keller N. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. № 3. P. 167–180.
- Gallo A., Perrone G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 15. P. 7878.
- Bellocchi D., Costantino G., Pellicciari R., Re N., Marrone A., Coletti C. // *ChemMedChem.* 2006. V. 1. № 5. P. 533–539.
- Gibson B.A., Kraus W.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 13. № 7. P. 411–424.
- Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. // *BioEssays.* 2004. V. 26. № 8. P. 882–893.
- Alemasova E.E., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 8. P. 3811–3827.
- Mikolčević P., Hloušek-Kasun A., Ahel I., Mikoč A. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021. V. 19. P. 2366–2383.
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 1951–1967.
- Thomas C., Ji Y., Wu C., Datz H., Boyle C., MacLeod B., Patel S., Ampofo M., Currie M., Harbin J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 20. P. 9941–9946.
- Suskiewicz M.J., Munnur D., Strömmland Ø., Yang J.-C., Easton L.E., Chartin C., Zhu K., Baretić D., Goffinont S., Schuller M., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. № 15. P. 8217–8236.
- Caldecott K.W. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 8. P. 619–631.
- Chaudhuri A.R., Nussenzweig A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. № 10. P. 610–621.
- Spechenkova N., Kalinina N.O., Zavriev S.K., Love A.J., Taliatsky M. // *Viruses.* 2023. V. 15. № 1. P. 241.
- Matveeva E., Maiorano J., Zhang Q., Eteleeb A.M., Convertini P., Chen J., Infantino V., Stamm S., Wang J., Rouchka E.C., et al. // *Cell Discov.* 2016. V. 2. P. 15046.
- Sousa F.G., Matuo R., Soares D.G., Escargueil A.E., Henriques J.A.P., Larsen A.K., Saffi J. // *Carcinogenesis.* 2012. V. 33. № 8. P. 1433–1440.
- Slade D., Dunstan M.S., Barkauskaite E., Weston R., Lafite P., Dixon N., Ahel M., Leys D., Ahel I. // *Nature.* 2012. V. 477. № 7366. P. 616–620.
- Kamaletdinova T., Fanaei-Kahrani Z., Wang Z.-Q. // *Cells.* 2019. V. 8. № 12. P. 1625.
- Dunstan M.S., Barkauskaite E., Lafite P., Knezevic C.E., Brassington A., Ahel M., Hergenrother P.J., Leys D., Ahel I. // *Nat. Commun.* 2012. V. 6. № 3. P. 878.
- Sharon A., Finkelstein A., Shlezinger N., Hatam I. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. № 5. P. 833–854.
- Chen L., Ma Y., Peng M., Chen W., Xia H., Zhao J., Zhang Y., Fan Z., Xing X., Li H. // *mSphere.* 2021. V. 6. № 1. P. e01140–20.
- Kothe G.O., Kitamura M., Masutani M., Selker E.U., Inoue H. // *Fungal Genet. Biol.* 2010. V. 47. № 4. P. 297–309.
- Semighini C.P., Savoldi M., Goldman G.H., Harris S.D. // *Genetics.* 2006. V. 173. № 1. P. 87–98.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.
- Stakheev A.A., Khairulina D.R., Zavriev S.K. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 225. P. 27–37.

35. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.
36. Stakheev A.A., Erokhin D.V., Meleshchuk E.A., Mikityuk O.D., Statsyuk N.V. // *Microorganisms.* 2022. V. 10. № 7. P. 1347.
37. Simon P. // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. № 11. P. 1439–1440.
38. Kumar S., Stecher G., Tamura K. // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
39. Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. // *Comput. Appl. Biosci.* 1992. V. 8. № 3. P. 275–282.
40. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York: Oxford Univ. Press, 2000. 352 p.
41. Farber J.M., Sanders G.W. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1986. V. 51. № 2. P. 381–384.
42. Holbourn K.P., Shone C.C., Acharya K.R. // *FEBS J.* 2006. V. 273. № 20. P. 4579–4593.
43. Della Corte L., Foreste V., Di Filippo C., Giampaolino P., Bifulco G. // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2021. V. 30. № 5. P. 543–554.
44. Keller K.M., Koetsier J., Schild L., Amo-Addae V., Eising S., van den Handel K., Ober K., Koopmans B., Essing A., van den Boogaard M.L., et al. // *BMC Cancer.* 2023. V. 23. № 1. P. 310.
45. Rissel D., Peiter E. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 7. P. 1638.
46. Feng B., Liu C., Shan L., He P. // *PLoS Pathog.* V. 12. № 12. P. e1005941.
47. Citarelli M., Teotia S., Lamb R.S. // *BMC Evol. Biol.* 2010. V. 13. № 10. P. 308.
48. Anand G., Waiger D., Vital N., Maman J., Ma L.J., Covo S. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 329.
49. Soukup A.A., Chiang Y.-M., Bok J.W., Reyes-Dominguez Y., Oakley B.R., Wang C.C.C., Strauss J., Kellep N.P. // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 86. № 2. P. 314–330.
50. Reyes-Dominguez Y., Boedi S., Sulyok M., Wiesenberger G., Stoppacher N., Krska R., Strauss J. // *Fungal Genet. Biol.* 2012. V. 49. № 1. P. 39–47.
51. Delulio G.A., Guo L., Zhang Y., Goldberg J.M., Kistler H.C., Ma L.-J. // *mSphere.* 2018. V. 3. № 3. P. e00231–18.
52. Yang H., Yu H., Ma L.-J. // *Phytopathology.* 2020. V. 110. № 9. P. 1488–1496.
53. Малюченко Н.В., Котова Е.Ю., Кирпичников М.П., Студитский В.М., Феофанов А.В. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биология.* 2019. Т. 74. № 3. С. 200–206.
54. Cohen M.S., Chang P. // *Nat. Chem. Biol.* 2018. V. 14. № 3. P. 236–243.