

ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2022 • 26 • 1



Молекулярная и клеточная биология / Генетика и селекция растений / Генетика человека /
Медицинская генетика / Популяционная генетика / Актуальные технологии

vavilov.ejpub.ru/
biomet.nsc.ru/vogjs
vavilov_journal@biomet.nsc.ru
Индекс издания 42153



Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJGB-22-01

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)

Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)

О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)

Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)

С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)

П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

А.В. Васильев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)

И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)

Н.Е. Грунтенко – д-р биол. наук (Россия)

С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)

И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)

И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)

С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.Н. Лаврик – д-р биол. наук (Германия)

Д.М. Ларкин – канд. биол. наук (Великобритания)

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)

В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)

В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)

М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

С.Р. Мурсалимов – канд. биол. наук (Россия)

Л.Ю. Новикова – д-р с.-х. наук (Россия)

Е.К. Потокина – д-р биол. наук (Россия)

В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)

В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, проф. РАН (Россия)

Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)

Ю.Н. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

Р.И. Шейко – чл.-кор. НАНБ, д-р с.-х. наук (Беларусь)

С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJGB-22-01

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief*A.V. Kochetov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia**Deputy Editor-in-Chief***N.A. Kolchanov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.N. Leonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*N.B. Rubtsov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.K. Shumny*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial board***O.S. Afanasenko*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.I. Aftanas*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*L.A. Bespalova*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*N.P. Bondar*, Cand. Sci. (Biology), Russia*S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia*P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A. Börner*, Dr. Sci., Germany*M. Chen*, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China*S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*T.A. Gavrilenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany*N.E. Gruntenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khlestkina*, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Kilchevsky*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology),
Belarus*S.V. Kostrov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia*A.M. Kudryavtsev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.M. Larkin*, Cand. Sci. (Biology), Great Britain*I.N. Lavrik*, Dr. Sci. (Biology), Germany*J. Le Gouis*, Dr. Sci., France*I.N. Lebedev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands*L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.Yu. Makeev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.),
Russia*V.I. Molodin*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.R. Mursalimov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.Yu. Novikova*, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*E.K. Potokina*, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.P. Puzyrev*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
Russia*D.V. Pyshnyi*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry),
Russia*I.B. Rogozin*, Cand. Sci. (Biology), United States*A.O. Ruvinsky*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia*E.Y. Rykova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*Y.N. Shavrukov*, Dr. Sci. (Biology), Australia*R.I. Sheiko*, Corr. Member of the NAS of Belarus,
Dr. Sci. (Agricul.), Belarus*S.V. Shestakov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*V.A. Stepanov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.A. Tikhonovich*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*A.V. Vasiliev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*M.I. Voevoda*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
Russia*N.K. Yankovsky*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corr. Member of the RAS,
Dr. Sci. (Biology), Russia

Молекулярная и клеточная биология

- 5 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды как праймеры для РНК-зависимого ДНК синтеза с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей.
Е.С. Дюдеева, И.А. Пышина

- 14 **ОБЗОР**
Опухоль-ассоциированные фибробласты и их роль в опухолевой прогрессии.
М.С. Ермаков, А.А. Нуштаева, В.А. Рихтер, О.А. Коваль

Генетика и селекция растений

- 22 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Особенности побегообразования в популяциях *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) под влиянием экологических факторов и паспортизация с помощью ISSR-маркеров. *О.В. Дорогина, Н.С. Нуждина, Г.А. Зуева, Ю.А. Гисматулина, О.Ю. Васильева*

- 30 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Динамические изменения содержания бетанина в столовой свекле в течение вегетационного периода: их взаимодействие с абиотическими факторами. *Д.В. Соколова*

Генетика человека

- 40 **ОБЗОР**
Взаимосвязь ламинов с эпигенетическими факторами при старении. *Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова*

- 50 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Транскрипционная активность генов репарации, апоптоза и клеточного цикла (*TP53, MDM2, ATM, BAX, BCL-2, CDKN1A, OGG1, XPC, PADI4, MAPK8, NF-KB1, STAT3, GATA3*) у хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза лимфоцитов периферической крови.
В.С. Никифоров, Е.А. Блинова, А.И. Котикова, А.В. Аклев

Медицинская генетика

- 59 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Ассоциация полиморфизма генов *TP53, MDM2* и *NQO1* с вирусной нагрузкой среди женщин с вирусом папилломы человека. *А.Х. Албосале, Е.В. Машкина (на англ. языке)*

- 65 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Функциональный подход к изучению генетики сердечно-сосудистых заболеваний: post-GWAS исследование. *Л.О. Брызгалов, Е.Е. Корболина, И.С. Дамаров, Т.И. Меркулова (на англ. языке)*

Популяционная генетика

- 74 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Разграничение видов и анализ криптического разнообразия микроводорослей рода *Micractinium* (*Chlorophyta*). *Е.С. Кривина, А.Д. Темралеева, Ю.С. Букин*

- 86 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
ДНК-метабаркодинг бентосных водорослей и ассоциированных с ними эукариот оз. Байкал в условиях быстрых экологических изменений. *Ю.С. Букин, Л.С. Кравцова, Т.Е. Перетолчина, А.П. Федотов, А.Е. Тупикин, М.Р. Кабилов, Д.Ю. Щербаков, Е.В. Минчева*

Актуальные технологии

- 96 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Биоинформатический поиск соответствия дифференциально экспрессируемых генов домашних и диких животных с ортологичными генами, изменяющими репродуктивный потенциал человека. *М.П. Пономаренко, И.В. Чадаева, П.М. Пономаренко, А.Г. Богомолов, Д.Ю. Ощепков, Е.Б. Шарыпова, В.В. Суслов, А.В. Осадчук, Л.В. Осадчук, Ю.Г. Матушкин*

- 109 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
De novo сборка и анализ транскриптома сибирской лягушки *Rana amurensis*. *Д.Н. Смирнов, С.В. Шеховцов, А.А. Шипова, Г.Р. Газизова, Е.И. Шагимарданова, Н.А. Булахова, Е.Н. Мещерякова, Т.В. Полубоярова, Е.Е. Храмеева, С.Е. Пельтек, Д.И. Берман (на англ. языке)*

Molecular and cell biology

- 5 ORIGINAL ARTICLE
Phosphoryl guanidine oligonucleotides as primers for RNA-dependent DNA synthesis using murine leukemia virus reverse transcriptase. *E.S. Dyudeeva, I.A. Pyshnaya*

- 14 REVIEW
Cancer-associated fibroblasts and their role in tumor progression. *M.S. Ermakov, A.A. Nushtaeva, V.A. Richter, O.A. Koval*

Plant genetics and breeding

- 22 ORIGINAL ARTICLE
Specific shoot formation in *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) under different environmental factors and DNA passportization using ISSR markers. *O.V. Dorogina, N. S. Nuzhdina, G.A. Zueva, Yu.A. Gismatulina, O.Yu. Vasilyeva*

- 30 ORIGINAL ARTICLE
Dynamic changes in betanin content during the growing season of table beet: their interplay with abiotic factors. *D.V. Sokolova*

Human genetics

- 40 REVIEW
The relationship of lamins with epigenetic factors during aging. *R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova*

- 50 ORIGINAL ARTICLE
Transcriptional activity of repair, apoptosis and cell cycle genes (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) in chronically exposed persons with different intensity of apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *V.S. Nikiforov, E.A. Blinova, A.I. Kotikova, A.V. Akleyev*

Medical genetics

- 59 ORIGINAL ARTICLE
Association between *TP53*, *MDM2* and *NQO1* gene polymorphisms and viral load among women with human papillomavirus. *A.H. AlBosale, E.V. Mashkina*

- 65 ORIGINAL ARTICLE
The functional insight into the genetics of cardiovascular disease: results from the post-GWAS study. *L.O. Bryzgalov, E.E. Korbolina, I.S. Damarov, T.I. Merkulova*

Population genetics

- 74 ORIGINAL ARTICLE
Species delimitation and microalgal cryptic diversity analysis of the genus *Micractinium* (Chlorophyta). *E.S. Krivina, A.D. Temraleeva, Yu.S. Bukin*

- 86 ORIGINAL ARTICLE
DNA metabarcoding of benthic algae and associated eukaryotes from Lake Baikal in the face of rapid environmental changes. *Yu.S. Bukin, L.S. Kravtsova, T.E. Peretolchina, A.P. Fedotov, A.E. Tupikin, M.R. Kabilov, D.Yu. Sherbakov, E.V. Mincheva*

Mainstream technologies

- 96 ORIGINAL ARTICLE
A bioinformatic search for correspondence between differentially expressed genes of domestic versus wild animals and orthologous human genes altering reproductive potential. *M.P. Ponomarenko, I.V. Chadaeva, P.M. Ponomarenko, A.G. Bogomolov, D.Yu. Oshchepkov, E.B. Sharypova, V.V. Suslov, A.V. Osadchuk, L.V. Osadchuk, Yu.G. Matushkin*

- 109 ORIGINAL ARTICLE
De novo assembly and analysis of the transcriptome of the Siberian wood frog *Rana amurensis*. *D.N. Smirnov, S.V. Shekhovtsov, A.A. Shipova, G.R. Gazizova, E.I. Shagimardanova, N.A. Bulakhova, E.N. Meshcheryakova, T.V. Poluboyarova, E.E. Khrameeva, S.E. Peltek, D.I. Berman*

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды как праймеры для РНК-зависимого ДНК синтеза с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей

Е.С. Дюдеева, И.А. Пышная 

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 pyshnaya@niboch.nsc.ru


Аннотация. Современные подходы к обнаружению и анализу низкокопийных РНК часто основываются на использовании РНК-зависимых ДНК-полимераз, например, метод ОТ-ПЦР. Точность и эффективность синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ), катализируемой ревертазой (РНК-зависимой ДНК-полимеразой), значительно влияют на корректность результатов ПЦР-диагностики и/или секвенирования РНК. В связи с этим множество исследований посвящено оптимизации реакции ОТ, в том числе поиску более совершенных праймеров, необходимых для наработки полноразмерной ДНК-копии исследуемой РНК. Наиболее известные полностью незаряженные аналоги олигонуклеотидов – морфолиновые олигонуклеотиды и пептидонуклеиновые кислоты – не могут являться субстратами для ферментов, процессирующих НК. Целью нашей работы было пилотное исследование незаряженных фосфорилгуанидиновых олигодезоксирибонуклеотидов (ФГО) в качестве праймеров для обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей (MMLV H-). Изучены особенности превращения частично и полностью незаряженных ФГО-праймеров. Продемонстрировано, что ФГО способны эффективно удлиняться, в том числе в присутствии фрагмента рРНК человека, обладающего сложной пространственной структурой. Доля abortивных продуктов удлинения ФГО-праймера зависит от ионной силы использованного буферного раствора, нуклеотидной последовательности праймера и наличия и расположения в его составе ФГ-групп. Полученные данные показывают возможность использования ФГО, включая полностью электронейтральные, как праймеров в реакциях ОТ-ПЦР, что открывает новые перспективы для создания систем анализа высокоструктурированных РНК.

Ключевые слова: незаряженные аналоги олигонуклеотидов; фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды; обратная транскрипция; ревертаза; обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей; MMLV H-.

Для цитирования: Дюдеева Е.С., Пышная И.А. Фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды как праймеры для РНК-зависимого ДНК синтеза с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):5-13. DOI 10.18699/VJGB-22-02

Phosphoryl guanidine oligonucleotides as primers for RNA-dependent DNA synthesis using murine leukemia virus reverse transcriptase

E.S. Dyudeeva, I.A. Pyshnaya 

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 pyshnaya@niboch.nsc.ru

Abstract. Modern approaches to the detection and analysis of low-copy-number RNAs are often based on the use of RNA-dependent DNA polymerases, for example, in reverse-transcription PCR. The accuracy and efficiency of cDNA synthesis in the reverse-transcription reaction catalyzed by reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase) significantly affect the correctness of the results of PCR diagnostic assays and/or RNA sequencing. In this regard, many studies are focused on the optimization of the reverse-transcription reaction, including the search for more perfect primers necessary to obtain a full-length DNA copy of RNA under study. The best-known completely uncharged analogs of oligonucleotides – morpholine oligonucleotides and peptide nucleic acids – cannot be substrates for enzymes that process nucleic acids. The aim of this work was to conduct a pilot study of uncharged phosphoryl guanidine oligodeoxyribonucleotides (PGOs) as primers for mouse leukemia virus reverse transcriptase (MMLV H-). Specific features of elongation of partially and completely uncharged PGO primers were investigated. It was demonstrated that PGOs can be elongated efficiently, e.g., in the presence of a fragment of human ribosomal RNA having complex spatial structure. It was shown that the proportion (%) of abortive elongation products of a PGO primer depends on buffer ionic strength, nucleotide sequence of the

primer, and the presence and location of phosphoryl guanidine groups in the primer. The results indicate the suitability of PGOs, including completely electroneutral ones, as primers for reverse-transcription PCR, thereby opening up new prospects for the creation of experimental models for the analysis of highly structured RNA. Key words: uncharged analogs of oligonucleotides; phosphoryl guanidine oligonucleotides; reverse transcription; reverse transcriptase; mouse leukemia virus reverse transcriptase; MMLV H-.

For citation: Dyudeeva E.S., Pyshnaya I.A. Phosphoryl guanidine oligonucleotides as primers for RNA-dependent DNA synthesis using murine leukemia virus reverse transcriptase. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):5-13. DOI 10.18699/VJGB-22-02

Введение

Обнаружение специфических РНК – одних из наиболее значимых природных биополимеров – является чрезвычайно актуальной задачей молекулярной диагностики, поскольку такие молекулы служат маркерами состояния клетки или организма в целом, его метаболического статуса или наличия инфекции. Быстрая и высокочувствительная детекция РНК может способствовать ранней диагностике и, как следствие, более эффективной терапии многих заболеваний. Наибольшей популярностью среди методов детекции РНК пользуется метод ОТ-ПЦР, заключающийся в двух последовательных этапах: ферментативный синтез кДНК по матрице РНК при помощи обратной транскриптазы (ревертазы) и наработка соответствующего фрагмента дцДНК с помощью стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В случае использования флуорофор-содержащих праймеров или зондов можно осуществить ПЦР в «реальном времени», сканируя нарастание сигнала флуоресценции, по которому достаточно точно вычисляется количество исследуемой РНК на клетку/образец. ОТ-ПЦР широко распространена при исследовании паттернов экспрессии мРНК (Bustin, 2000), этот метод применяют на этапе создания библиотек для высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq) – одного из мощнейших инструментов для изучения транскриптомов и др. (Mortazavi et al., 2008; Haas, Zody, 2010).

Как правило, для проведения реакции ОТ используют обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей Молони (MMLV). Данная ревертаза способна: катализировать синтез ДНК по матрице ДНК или РНК (Palikša et al., 2018; Li R. et al., 2020); осуществлять нематричный синтез коротких фрагментов ДНК (Ohtsubo et al., 2017); проводить синтез ДНК с вытеснением цепи (Kelleher, Champroux, 1998; Malik et al., 2017); осуществлять «смену» матричной цепи (Wulf et al., 2019); расщеплять РНК в составе гибридного РНК/ДНК комплекса (Schultz, Champroux, 2008; Li R. et al., 2020). В лабораторных исследованиях задействуют рекомбинантный вариант, лишенный активности РНКазы H (MMLV H-). Обширный пласт работ посвящен оптимизации реакции ОТ, в том числе поиску более эффективных праймеров на основе модифицированных олигонуклеотидов, обладающих повышенным сродством к комплементарным НК (Heuverswyn et al., 2016; Menéndez-Arias et al., 2016; Palikša et al., 2018; Li R. et al., 2020). Известные на сегодняшний день полностью незаряженные аналоги олигонуклеотидов – морфолиновые олигонуклеотиды и пептидонуклеиновые кислоты – не могут вступать в ферментативные реакции, вероятно, из-за чужеродного остова, значительно отличающегося по

структуре от природного углеводофосфатного. Частично модифицированные Р-алкил-фосфонатные олигонуклеотиды и фосфорилгуанидиновые олигодезоксирибонуклеотиды (ФГО), в которых фрагмент рибозы остается неизменным, используют как праймеры для дискриминации «неправильного» комплекса в ходе ПЦР (Li T.-L. et al., 2019; Chubarov et al., 2020). В случае ФГО показано, что они образуют комплексы с комплементарной ДНК или РНК в растворах с пониженной ионной силой и даже в деионизованной воде, причем термическая стабильность этих комплексов сопоставима с таковой для нативного комплекса в условиях, близких к физиологическим (Kurgushkin et al., 2014; Dyudeeva et al., 2019). Более того, установлено, что пространственная структура дуплексов, содержащих ФГО, практически не отличается от структуры нативной двойной НК/НК спирали (Lomzov et al., 2019). Сочетание этих факторов делает ФГ-содержащие олигонуклеотиды перспективной платформой для разработки высокоспецифичных зондов и, возможно, допускает их участие в некоторых ферментативных превращениях НК, катализируемых как ревертазой, так и ДНК-зависимыми ДНК-полимеразами (Kurgushkin et al., 2017; Chubarov et al., 2020).

Целью данной работы было исследование влияния числа фосфорилгуанидиновых групп (ФГ-групп) и профиля модификации ими ДНК-праймера на возможность РНК-зависимого удлинения такого праймера с помощью ревертазы MMLV H-, анализ перспектив использования ФГО в качестве праймеров для ОТ-ПЦР при выявлении протяженных РНК.

Материалы и методы

Получение нуклеиновых кислот. Синтез нативных олигодезоксирибонуклеотидов и их ФГ-содержащих аналогов проводили в рамках фосфитамидного метода синтеза на автоматическом ДНК/РНК синтезаторе ASM-800 («Биосет», Россия) с использованием коммерческих фосфитамидных мономеров и пористых полимерных носителей (GlenResearch, США). Для введения ФГ-групп применяли протокол, описанный в работе (Kurgushkin et al., 2014). Фрагмент 18S рРНК человека любезно предоставлен М.Р. Кабиловым (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН).

Выделение олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов из реакционной смеси осуществляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на хроматографе Agilent 1200 series (Agilent, США), используя колонку (4.6 × 150 мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм) (Agilent). Элюцию олигонуклео-

Таблица 1. Состав реакционных смесей для обратной транскрипции в случае короткой синтетической РНК-матрицы и протяженного фрагмента рРНК

17-звенная РНК-матрица		Фрагмент 18S рРНК	
Компонент	Количество	Компонент	Количество
ДНК	10 ⁻⁵ М	ДНК	10 ⁻⁶ М
РНК	10 ⁻⁵ М	РНК	10 ⁻⁶ М
MMLV H-	200 ед. акт.	MMLV H-	200 ед. акт.
dATP, dCTP, dGTP	300 мкМ каждого	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	300 мкМ каждого
dUTP ^{FAM}	50 мкМ	dUTP ^{FAM}	–
Буферный раствор	1 × St	Буферный раствор	1 × St или L

тидов выполняли в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–90 %) в 0.02 М растворе триэтиламоний ацетата за 30 мин, скорость потока 1.5 мл/мин.

Электрофоретический анализ олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов в денатурирующих условиях проводили в 15 % ПААГ (акриламид : N,N'-метиленабисакриламид (29:1), 8 М мочевины) в буфере TBE (89 мМ Tris-борат, рН 8.3, 2 мМ Na₂EDTA) при напряжении 50 В/см. Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием геля реактивом StainsAll. При наличии флуорофора в составе олигонуклеотидов проводили сканирование флуоресценции при помощи системы геле-документирования VersaDoc MP 4000 Molecular Imager System (Bio-Rad, США).

Для разделения протяженных продуктов удлинения праймеров реакции ОТ использовали 1.5 % агарозный гель в буфере TBE в горизонтальной ячейке (Bio-Rad). Относительную электрофоретическую подвижность образцов оценивали с помощью двуцепочечного ДНК-маркера GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoScientific, Литва). Результаты электрофоретического разделения визуализировали, окрашивая гель бромистым этидием (0.0001 % водный раствор) и сканируя сигнал флуоресценции, как описано выше. Относительное содержание основных продуктов удлинения праймеров вычисляли, анализируя сканированный сигнал флуоресценции соответствующих пятен при помощи программного обеспечения GelPro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США).

Реакции обратной транскрипции. Ферментативное удлинение олигонуклеотидов и их ФГ-аналогов в реакции ОТ проводили с рекомбинантным ферментом – обратной транскриптазой вируса лейкемии мышей MMLV H- («СибЭнзим», Россия). В качестве буферного раствора использовали следующие составы: стандартный (St) – 30 мМ Tris-HCl, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 5 мМ дитиотреит; низкосолевого (L) – 30 мМ Tris-HCl, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит). Соотношение компонентов реакционной смеси ОТ приведено в табл. 1 (если не указано иное), суммарный объем смеси составил 10 мкл.

Реакцию ОТ проводили при 37 °С. Время реакции составило 1 ч в случае 17-звенной РНК-матрицы и 3 ч в случае высокомолекулярной РНК-матрицы – фрагмента 18S рРНК человека. По окончании реакции фермент инактивировали термически, выдерживая реакционную смесь при 95 °С в течение 5 мин, или гидролизировали

РНК-матрицу, добавляя к реакционной смеси избыток концентрированного водного аммиака и выдерживая 2 ч при 56 °С. Аммиак удаляли, упаривая растворы в вакуумном концентраторе до исчезновения запаха.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы мы рассмотрели серию декамерных дезоксирибонуклеотидов, идентичных по нуклеотидной последовательности, но различающихся по числу введенных в их структуру незаряженных ФГ-групп (рис. 1) и их взаимному расположению (табл. 2).

Рассматриваемые декануклеотиды были комплементарны 3'-концевому участку модельной 18-звенной РНК-матрицы гМ (рис. 2). Нуклеотидная последовательность матрицы в составе формируемого комплекса содержала в одноцепочечной части лишь одну позицию г_A, напротив которой возможно встраивание в состав удлиняемой ДНК-цепи только одного флуоресцентного остатка dUMP^{FAM} с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей Молони (MMLV H-).

Первоначально был осуществлен поиск оптимальных условий реакции ОТ на примере нативного субстрата X/гМ. Была проведена серия экспериментов, в которых варьировали: 1) температуру реакции, 2) количество фермента, 3) концентрацию трифосфатов, 4) концентрацию субстратного ДНК/РНК комплекса. Продукты реакции ОТ разделяли в 15 % полиакриламидном геле (ПААГ) и визуализировали, сканируя сигнал флуоресценции в канале FAM и затем окрашивая этот же гель реактивом StainsAll. Следует отметить, что окрашивание геля при помощи StainsAll позволяет контролировать материальный баланс каждой реакции, поскольку данный краситель «проявляет» все продукты элонгации, а также исходные матрицу и праймер. Флуоресцентный сигнал, в свою очередь, отражает накопление только целевых продуктов реакции ОТ, длина которых не менее 15 нуклеотидов, т. е. содержащих включенный остаток dUMP^{FAM}. Типичный результат анализа реакции ОТ приведен на рис. 3.

Видно, что увеличение концентрации флуоресцентного dUTP^{FAM} при прочих равных условиях (см. рис. 3, дорожки 2 и 3) не влияет на эффективность накопления продуктов элонгации нативного праймера в составе комплекса X/гМ. Напротив, в случае повышения концентрации немеченых dNTP при постоянной концентрации

Таблица 2. Структура декануклеотидов

Обозначение	Последовательность 5'→3'	n
X	G ^o C ^o G ^o C ^o C ^o A ^o A ^o C ^o A	0
X _{1,4;7}	G* ^o C ^o G ^o C ^o *C ^o A ^o A ^o C ^o A	3
X _{1,5;9}	G* ^o C ^o G ^o C ^o C ^o *A ^o A ^o C ^o *A	3
X _{2,4;6;8}	G ^o C* ^o G ^o C* ^o C ^o *A ^o A ^o *C ^o A	4
X _{1-2;5-6;9}	G* ^o C* ^o G ^o C ^o *A ^o A ^o C ^o *A	5
X _{1-2;5;8-9}	G* ^o C* ^o G ^o C ^o C ^o *A ^o A ^o *C ^o *A	5
X _{1,3;5;7;9}	G* ^o C ^o G* ^o C ^o C ^o *A ^o A ^o C ^o *A	5
X _{1-3;7-9}	G* ^o C* ^o G* ^o C ^o C ^o *A ^o A ^o *C ^o *A	6
X _{2-3;5-6;8-9}	G ^o C* ^o G* ^o C ^o C ^o *A ^o A ^o *C ^o *A	6
X ₁₋₉	G* ^o C* ^o G* ^o C* ^o C* ^o A* ^o A* ^o C* ^o A	9

Примечание. «o» – нативная межнуклеотидная фосфатная группа; n – число ФГ-групп, обозначенных «*»; X – общее название серии 10-звенных олигонуклеотидов, нижний индекс – порядковый номер (с 5'-конца) модифицированных ФГ-групп. Все декануклеотиды были выделены и очищены унифицированным образом (см. Материалы и методы).

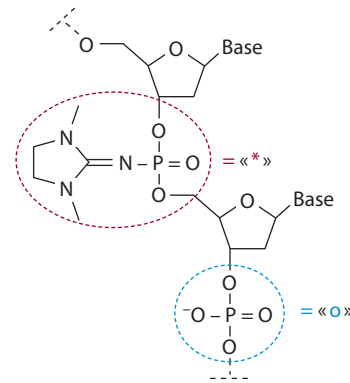


Рис. 1. Структуры модифицированной ФГ-группы (обозначено «*») и нативного фосфата (обозначено «o») в составе ДНК-цепи.

Base – азотистое основание.

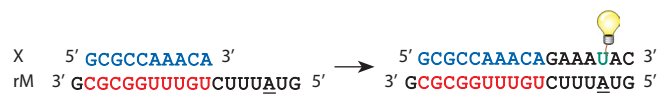


Рис. 2. Схема удлинения декануклеотида серии X по РНК-матрице rM с образованием флуоресцентного продукта.

dUTP^{FAM} (см. рис. 3, А, дорожки 3–5) наблюдается снижение доли abortивных продуктов элонгации праймера и, как следствие, увеличение выхода флуоресцентного продукта элонгации. Максимальный выход полноразмерного продукта реакции (согласно сигналу флуоресценции на рис. 3, Б) при минимальном количестве abortивных продуктов элонгации наблюдается в дорожке 5.

Именно такие условия были использованы в дальнейшем для сравнения эффективности реакции ОТ нативного и ФГ-содержащих праймеров, остов которых был частично или полностью лишен отрицательного заряда. На рис. 4 приведен результат электрофоретического анализа продуктов реакции ОТ, действующих в качестве

субстрата комплексы rM с каждым из декануклеотидов, которые представлены в табл. 2.

По данным окрашивания геля StainsAll (см. рис. 4, А), как и по данным сигнала флуоресценции (см. рис. 4, Б), можно утверждать, что происходит ферментативное удлинение всех олигонуклеотидов, включая полностью электронейтральный X₁₋₉. Отметим, что степень накопления полноразмерного флуоресцентного продукта несколько снижается при увеличении числа ФГ-групп в составе праймера (см. рис. 4, Б, дорожки 11–20). Вероятно, это связано с нарушением электростатических взаимодействий внутри фермент-субстратного комплекса. Тем не менее полученные данные свидетельствуют о том, что незаря-

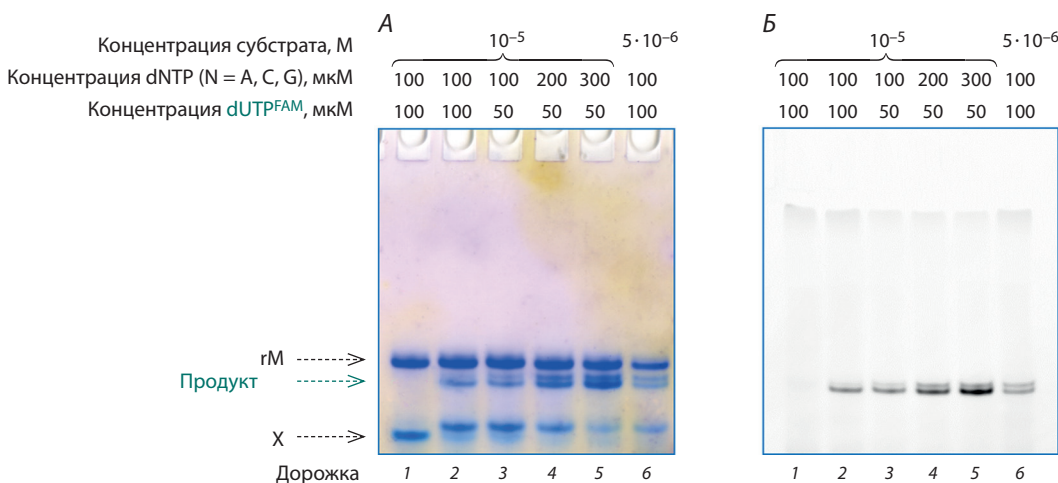


Рис. 3. Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ нативного субстрата X/rM при 37 °C и 200 ед. акт. фермента с различной концентрацией трифосфатов и ДНК/РНК субстрата в денатурирующем 15 % ПААГ после окрашивания реактивом StainsAll (А) и сканирования сигнала флуоресценции (Б).

Стрелками указаны матрица (rM), продукт реакции ОТ и нативный декануклеотид (X).

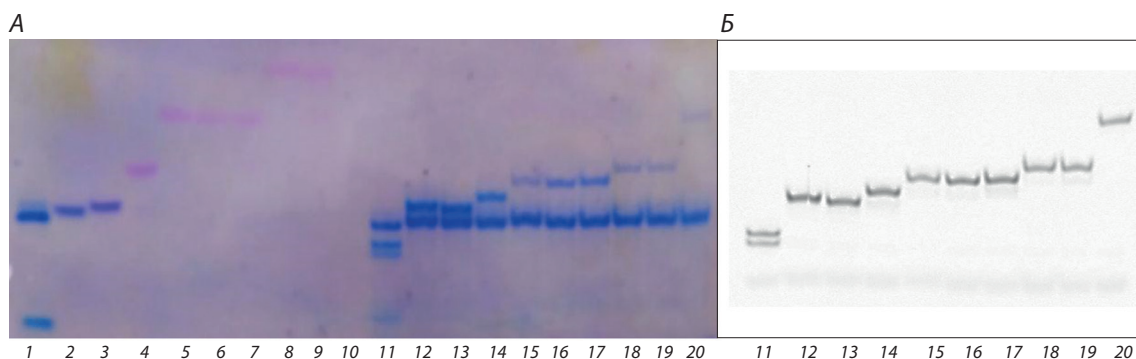


Рис. 4. Результат электрофоретического разделения продуктов реакций ОТ в денатурирующем 15 % ПААГ после окрашивания реактивом StainsAll (А) и сканирования сигнала флуоресценции (Б).

Дорожки 1–10 – контроли без фермента: смеси гМ и праймера X (дор. 1), индивидуальные праймеры X_{1,4;7} (дор. 2), X_{1,5;9} (дор. 3), X_{2,4;6;8} (дор. 4), X_{1-2;5;8-9} (дор. 5), X_{1,3;5;7;9} (дор. 6), X_{1-2;5-6;9} (дор. 7), X_{1-3;7-9} (дор. 8), X_{2-3;5-6;8-9} (дор. 9), X₁₋₉ (дор. 10); дорожки 11–20 – реакции ОТ с участием праймеров X (дор. 11), X_{1,4;7} (дор. 12), X_{1,5;9} (дор. 13), X_{2,4;6;8} (дор. 14), X_{1-2;5;8-9} (дор. 15), X_{1,3;5;7;9} (дор. 16), X_{1-2;5-6;9} (дор. 17), X_{1-3;7-9} (дор. 18), X_{2-3;5-6;8-9} (дор. 19), X₁₋₉ (дор. 20).

женные ФГО могут являться праймерами в реакции ОТ, что не было ранее описано для полностью модифицированных незаряженных аналогов олигонуклеотидов.

Детально проанализировать степень конверсии ФГО-праймеров в случае данной модельной системы не представлялось возможным (см. рис. 4, А, дорожки 2–10 и 11–20), поскольку повышение степени модификации ФГО резко снижает эффективность их окрашивания с помощью НК-специфических красителей, например StainsAll (Dyudeeva et al., 2019). Учитывая это обстоятельство, для реализации следующего этапа работы были сконструированы нативные и ФГ-содержащие олигонуклеотиды, несущие на 5'-конце остаток флуорофора (табл. 3). Это позволило в дальнейшем детектировать весь спектр продуктов ферментативного превращения праймеров на протяженной матрице – фрагменте 18S рРНК человека. Структуры праймеров варьировали по степени модификации их углеводофосфатного остова относительно 3'-конца. Наряду с нативными праймерами (J1.о и J2.о) использовали их частично незаряженные аналоги, содержащие 5'-модифицированный и 3'-нативный остов с шестью немодифицированными фосфатными группами (J1.6 и J2.6) и тремя немодифицированными фосфатными группами (J1.3 и J2.3), а также полностью электронейтральные аналоги (J1.x и J2.x).

Нуклеотидные последовательности этих праймеров были комплементарны участкам фрагмента 18S рРНК человека (протяженность фрагмента 558 нуклеотидов) (рис. 5).

Первый из двух выбранных участков для гибридизации – J1-серия на рис. 5 – расположен ближе к 3'-концевой области фрагмента рРНК. В процессе ОТ с данного сайта возможно получить продукты, теоретическая длина которых должна составлять 439 нуклеотидов. Второй сайт связывания праймеров J2-серии находится ближе к середине фрагмента рРНК, теоретическая длина полноразмерных продуктов элонгации этого праймера составляет 276 нуклеотидов. При выборе сайтов связывания олигонуклеотидов со структурированными РНК-матрицами учитывали принципы, заложенные в работе (Petyuk et al., 1999).

Таблица 3. Структуры праймеров для реакции ОТ с участием высокомолекулярной РНК-матрицы, фрагмента 18S рРНК человека

Код	Последовательность 5'→3'
J1.о	[Flu]°A°T°C°G°T°T°T°A°T°G°G°T°C°G°G°A°A°C°T°A
J1.6	[Flu]°A°T°C°G°T°T°T°A°T°G°G°T°C°G°G°A°A°C°T°A
J1.3	[Flu]°A°T°C°G°T°T°T°A°T°G°G°T°C°G°G°A°A°C°T°A
J1.x	[Flu]°A°T°C°G°T°T°T°A°T°G°G°T°C°G°G°A°A°C°T°A
J2.о	[Flu]°C°C°C°T°C°T°T°A°A°T°C°A°T°G°G°C°C°T°C°A°G°T
J2.6	[Flu]°C°C°C°T°C°T°T°A°A°T°C°A°T°G°G°C°C°T°C°A°G°T
J2.3	[Flu]°C°C°C°T°C°T°T°A°A°T°C°A°T°G°G°C°C°T°C°A°G°T
J2.x	[Flu]°C°C°C°T°C°T°T°A°A°T°C°A°T°G°G°C°C°T°C°A°G°T

Примечание. «°» – нативная межнуклеотидная фосфатная группа; «*» – ФГ-группа; [Flu] – остаток флуоресцеина.

Как показано ранее, ФГО обладают способностью образовывать комплементарный комплекс в растворах с ультранизкой ионной силой (Kupryushkin et al., 2014; Dyudeeva et al., 2019), поэтому было принципиально сравнить эффективность протекания реакции ОТ для нативного и ФГ-содержащих праймеров в буферных растворах с различающейся ионной силой. Для этого из состава «стандартного» буферного раствора был полностью удален хлорид калия, а концентрация хлорида магния понижена с 5 до 2 мМ. Возможно, понижение ионной силы буферного раствора позволит дестабилизировать внутреннюю вторичную структуру РНК-матрицы и тем самым «облегчить» протекание реакции. Протяженные продукты удлинения праймеров анализировали методом гель-электрофореза в 1.5 % агарозном геле, детектируя их по сигналу флуоресценции и с помощью окрашивания геля бромистым этидием. Результат электрофоретического разделения продуктов реакции ОТ в буферных растворах со «стандартной» и пониженной ионной силой для праймеров серии J1 приведен на рис. 6. Видно, что введение

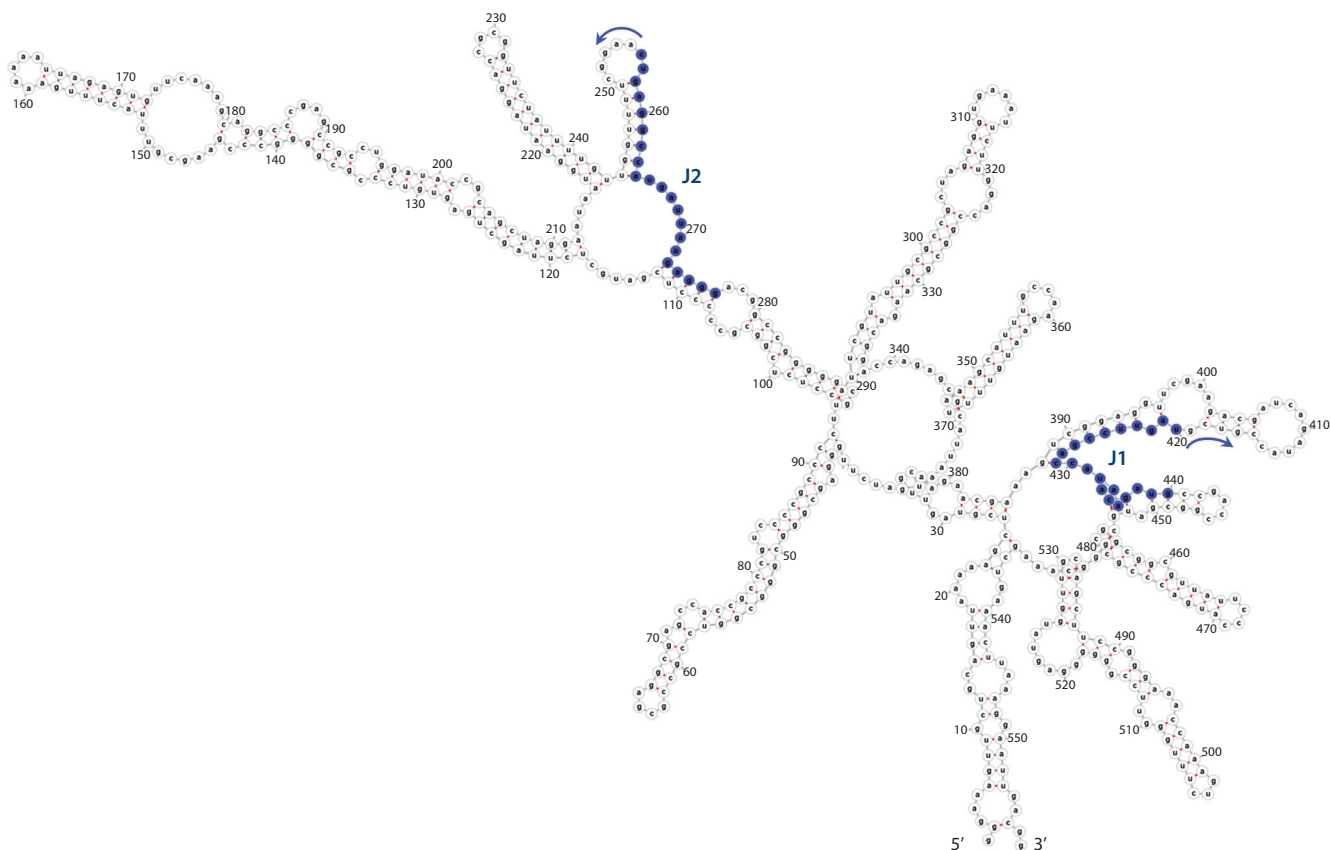


Рис. 5. Предполагаемая вторичная структура фрагмента 18S рРНК человека, построенная при помощи онлайн-сервиса RNAfold web server. J1 и J2 – сайты, выбранные для гибридизации праймеров. Стрелками показано направление удлинения праймеров.

ФГ-групп в состав праймера приводит к ожидаемому понижению его электрофоретической подвижности за счет уменьшения суммарного заряда молекулы (см. рис. 6, А, дорожки 1, 4, 7, 10). Ферментативная элонгация праймера наблюдается во всех случаях, даже для праймера J1.x, обладающего полностью электронейтральным углеводофосфатным остовом (см. рис. 6, А, дорожки 11, 12).

На примере нативного праймера J1.o рассмотрим общий вид реакционной смеси, полученной в результате ОТ (см. рис. 6, дорожки 1–3). Исходный праймер J1.o (дорожка 1) практически отсутствует среди продуктов его реакции ОТ (дорожки 2 и 3), что свидетельствует об эффективном протекании реакции. Тем не менее продукты элонгации праймера достаточно разнородны по своей электрофоретической подвижности и, соответственно, длине: наблюдаются abortивные продукты элонгации. Вероятно, это связано с высокой степенью структурированности РНК-матрицы, поскольку ревертаза, не обладая хеликазной активностью, не способна преодолеть шпильки РНК или другие вторичные структуры, что может привести к диссоциации фермента и ДНК-РНК субстрата (Okano et al., 2017). Как следствие, снижается ожидаемая процессивность реакции ОТ. В рассматриваемых реакционных смесях (см. рис. 6, дорожки 2 и 3) можно выделить два превалирующих продукта (а и б). Электрофоретическая подвижность продукта а сопоставима с подвижностью исходной РНК-матрицы (см. рис. 6, Б, дорожка 14), длина которой 558 нуклеотидов, и с подвижностью полос в ДНК-

маркере (дорожка 13), соответствующим длинам 500 и 600 пар оснований. Можно полагать, что данный продукт по своей длине близок к полноразмерному теоретическому. Продукт б обладает меньшей электрофоретической подвижностью, приблизительно соответствующей подвижности 300 пар оснований в дцДНК-маркере. Даже введение дополнительной стадии денатурации рРНК при 95 °С для уменьшения вероятности ее структурирования не привело к увеличению выхода продукта а (данные не представлены).

Интересно, что электрофоретическая подвижность исходных праймеров J1.6, J1.3 и J1.x (см. рис. 6, А, дорожки 4, 7, 10) ниже, чем у продуктов их удлинения в реакции ОТ (см. рис. 6, А, дорожки 5–6, 8–9 и 11–12). По всей видимости, на начальных этапах реакции включение очередного dNTP в растущую цепь модифицированного ФГО-праймера влечет за собой увеличение скорости миграции олигонуклеотида в геле за счет более заметного изменения заряда; размер молекулы при этом еще не изменился настолько значительно, чтобы вызвать задержку в порах агарозного геля. Однако при достижении некой критической длины, на более поздних этапах реакции, общий размер молекул оказывает большее влияние на скорость миграции в геле, нежели увеличение заряда при включении очередного dNTP. Таким образом, протяженные продукты реакции ОТ для ФГ-содержащих праймеров демонстрируют «классическое» поведение в геле, замедляясь при увеличении размера молекулы. Вклад

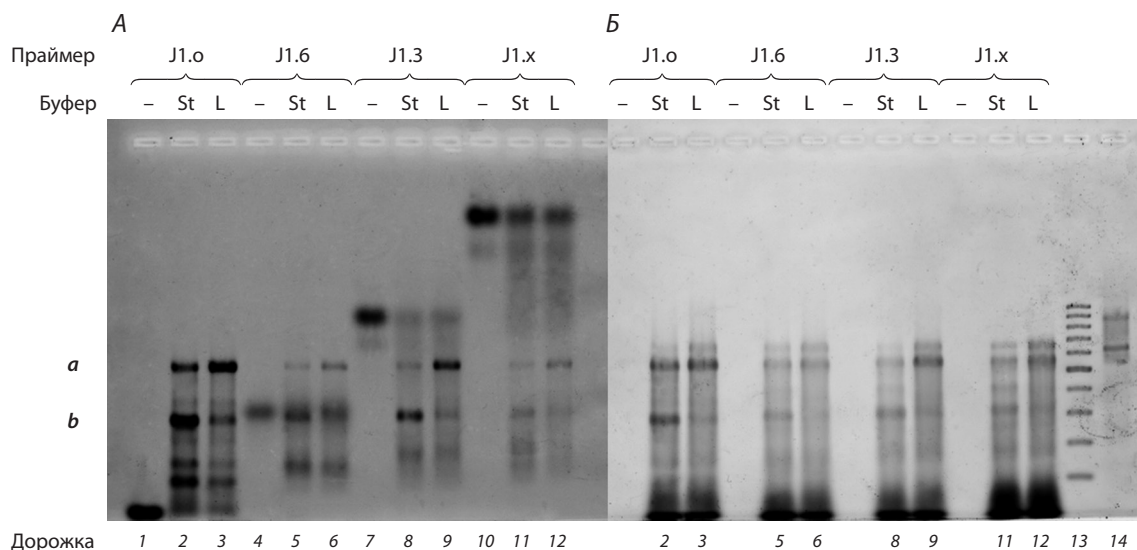


Рис. 6. Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и бромистого этидия (Б) после разделения продуктов реакции ОТ в 1.5 % агарозном геле:

индивидуальных ДНК-праймеров J1.o (дор. 1), J1.6 (дор. 4), J1.3 (дор. 7), J1.x (дор. 10), которые видны только при сканировании флуоресценции FAM; продуктов реакции ОТ праймеров J1.o (дор. 2), J1.6 (дор. 5), J1.3 (дор. 8), J1.x (дор. 11) в «стандартных» буферных условиях (St); продуктов реакции ОТ праймеров J1.o (дор. 3), J1.6 (дор. 6), J1.3 (дор. 9), J1.x (дор. 12) в буфере с пониженной ионной силой (L); ДНК-маркера 100–1000 п. о. (дор. 13), который виден только при сканировании флуоресценции бромистого этидия; РНК-матрицы (дор. 14), которая видна только при сканировании флуоресценции бромистого этидия.

Тип праймера и буферных растворов указаны на рисунке, **a** и **b** соответствуют положениям превалирующих продуктов реакции ОТ.

относительно небольшого числа ФГ-групп в этом случае становится незначителен. Благодаря этому, вероятно, электрофоретическая подвижность наиболее представленных продуктов реакции ОТ (**a** и **b**) практически не зависит от числа модификаций в исходном ФГ-содержащем праймере.

Понижение ионной силы реакционного буфера (см. рис. 6, дорожки 3, 6, 9, 12) приводит к накоплению более длинных продуктов **a** реакции ОТ по сравнению со стандартными реакционными условиями (дорожки 2, 5, 8, 11), вне зависимости от наличия модификаций в составе праймера. Наиболее выражено изменение ионной силы повлияло на соотношение продуктов элонгации нативного праймера J1.o: согласно интенсивностям сигнала флуоресценции, относительное содержание наиболее протяженного продукта **a** выросло втрое (с 9 до 27%), в то время как содержание abortивного продукта **b** уменьшилось (с 26 до 10%) при понижении ионной силы буферного раствора. Вероятно, удаление части солей из состава буфера позволило дестабилизировать внутреннюю структуру РНК, но не оказало значительного влияния на формирование тройного комплекса «ДНК–РНК–фермент». Для модифицированных ФГ-содержащих праймеров перераспределение продуктов элонгации при смене буферного раствора тоже наблюдалось, но на уровне нескольких процентов.

Следует отметить, что для полностью электронейтрального ФГО J1.x (см. рис. 6, А, дорожки 10–12) мы наблюдали меньшую конверсию в реакции ОТ относительно нативного праймера (дорожки 1–3). Можно предположить, что лимитирующая стадия реакции ОТ для полностью электронейтрального ФГО J1.x – присоединение первых dNMP к 3'-концу полностью электронейтрального прай-

мера (по аналогии с работой (Skasko et al., 2005)). Затем фермент полностью переключается на «предпочтительный» субстрат, содержащий на 3'-конце немодифицированные нуклеотиды, «не замечая» пусть даже избыточного количества исходного праймера.

Аналогичные результаты были получены для праймеров серии J2 (рис. 7). В данном случае среди продуктов удлинения праймера наблюдается меньшее количество abortивных продуктов. Вероятнее всего, это связано с тем, что теоретическая максимальная длина продуктов элонгации меньше, чем в случае праймера J1, и в ходе элонгации преодолевается меньшее количество шпилек или других структурных элементов РНК-матрицы, из-за чего процессивность работы фермента оказывается выше.

Основной продукт элонгации праймеров серии J2 обладает электрофоретической подвижностью, сопоставимой с двуцепочечным ДНК-маркером длиной 400 пар оснований. Предположительно, этот продукт близок по длине к полноразмерному (276 нуклеотидов для данного праймера). Его относительное содержание в реакционных смесях представлено на рис. 8. Как и для праймеров серии J1, мы наблюдали более эффективное накопление целевого продукта в буферном растворе с пониженной ионной силой (L) для нативного праймера J2.o (увеличение доли основного продукта с 45 до 61%) и для ФГ-праймера J2.3 (с 33 до 46%).

Интересно, что другие ФГ-праймеры оказались практически индифферентны к изменению ионной силы. Возможно, расположение ФГ-групп в активном центре фермента оказывает влияние на конформацию фермент-субстратного комплекса и, как следствие, на его чувствительность к ионному составу среды и сольватации.

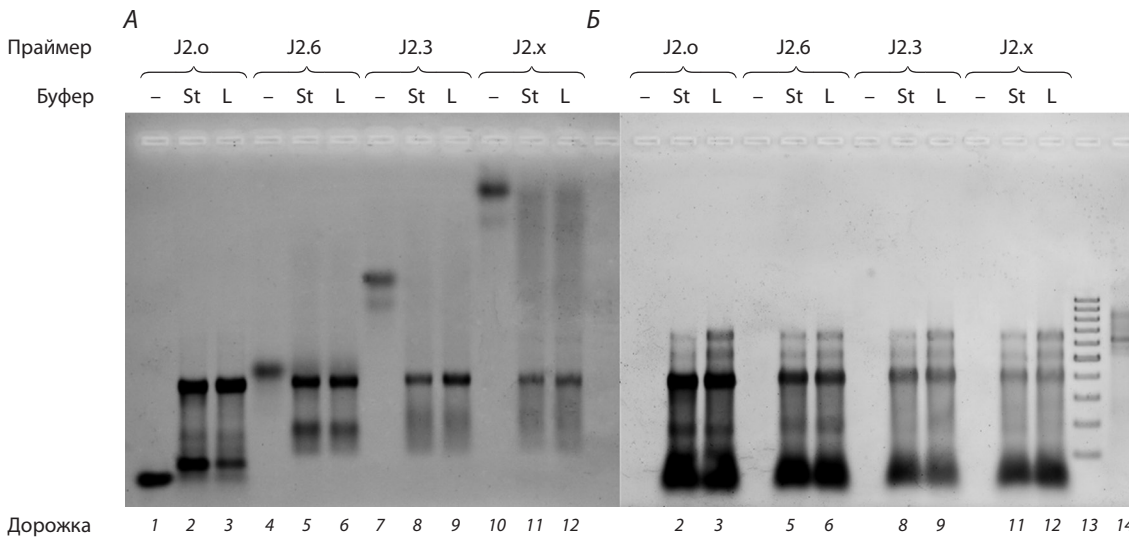


Рис. 7. Результат сканирования сигнала флуоресценции FAM (А) и бромистого этидия (Б) после разделения продуктов реакции ОТ в 1.5 % агарозном геле:

индивидуальных ДНК-праймеров J2.o (дор. 1), J2.6 (дор. 4), J2.3 (дор. 7), J2.x (дор. 10), которые видны только при сканировании флуоресценции FAM; продуктов реакции ОТ праймеров J2.o (дор. 2), J2.6 (дор. 5), J2.3 (дор. 8), J2.x (дор. 11) в «стандартных» буферных условиях (St); продуктов реакции ОТ праймеров J2.o (дор. 3), J2.6 (дор. 6), J2.3 (дор. 9), J2.x (дор. 12) в буфере с пониженной ионной силой (L); ДНК-маркера 100–1000 п. о. (дор. 13), который виден только при сканировании флуоресценции бромистого этидия; РНК-матрицы (дор. 14), которая видна только при сканировании флуоресценции бромистого этидия. Тип праймера и буферных растворов указаны на рисунке.

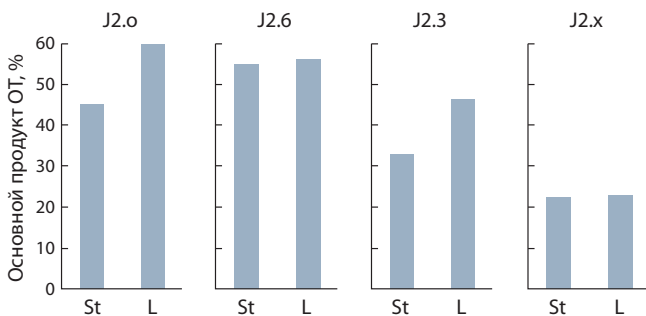


Рис. 8. Относительное содержание основного продукта элонгации праймеров серии J2, образующегося в результате реакции ОТ в растворе со «стандартной» (St) и пониженной (L) ионной силой.

Заклучение

Таким образом, нами изучены особенности удлинения частично и полностью не заряженных фосфорилгуанидиновых олигодезоксирибонуклеотидов (ФГО) в реакции обратной транскрипции с помощью ревертазы MMLV H-. Продемонстрировано, что ФГ-содержащие праймеры способны эффективно удлиняться, в том числе в присутствии фрагмента рРНК человека, обладающего сложной пространственной структурой. Снижение ионной силы буферного раствора позволяет повысить эффективность синтеза полноразмерной кДНК при использовании как нативных, так и ФГ-содержащих праймеров. Полученные данные показывают возможность применения ФГО, включая полностью электронейтральные, как праймеров в реакциях ОТ-ПЦР, что открывает новые перспективы для создания систем анализа высокоструктурированных РНК и требует дальнейших исследований.

Список литературы / References

- Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000;25(2):169-193. DOI 10.1677/jme.0.0250169.
- Chubarov A.S., Oскорbin I.P., Filipenko M.L., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V. Allele-specific PCR for *KRAS* mutation detection using phosphoryl guanidine modified primers. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(11):872. DOI 10.3390/diagnostics10110872.
- Dyudeeva E.S., Kupryushkin M.S., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V. Physicochemical properties of the phosphoryl guanidine oligodeoxyribonucleotide analogs. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019;45(6):709-718. DOI 10.1134/S1068162019060153.
- Haas B.J., Zody M.C. Advancing RNA-Seq analysis. *Nat. Biotechnol.* 2010;28(5):421-423. DOI 10.1038/nbt0510-421.
- Heuverswyn F.V., Karczmarczyk M., Schimmel H., Trapmann S., Emons H. Influence of primer & probe chemistry and amplification target on reverse transcription digital PCR quantification of viral RNA. *Biomol. Detect. Quantif.* 2016;9:20-28. DOI 10.1016/j.bdq.2016.08.003.
- Kelleher C.D., Champoux J.J. Characterization of RNA strand displacement synthesis by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* 1998;273(16):9976-9986. DOI 10.1074/jbc.273.16.9976.
- Kupryushkin M.S., Pyshnaya I.A., Dmitrienko E.V., Stetsenko D.A., Filipenko M.L., Oскорbin I.P., Stepanov G.A., Richter V.A., Ivanov M.K., Pyshnyi D.V. Template-directed enzymatic DNA synthesis using phosphoryl guanidine oligonucleotides. 2017. Publication Number WO/2019/112485. Appl. Date 17.09.2018. Publ. Date 13.06.2019.
- Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues. *Acta Naturae*. 2014; 6(4):116-118.
- Li R., Wu R., Li H., Zhang Y., Peng D., Wang N., Shen X., Wang Z., Sun H. Characterizing stutter variants in forensic STRs with massively parallel sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2020;45: 102225. DOI 10.1016/j.fsigen.2019.102225.

- Li T.-L., Wu M.-W., Lin W.-C., Lai C.-H., Chang Y.-H., Su L.-J., Chen W.-Y. Designed phosphate-methylated oligonucleotides as PCR primers for SNP discrimination. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019; 411:3871-3880. DOI 10.1007/s00216-019-01865-4.
- Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Shernyukov A.V., Nekrasov M.D., Dovydenko I.S., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V. Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: isolation and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 513(4):807-811. DOI 10.1016/j.bbrc.2019.04.024.
- Malik O., Khamis H., Rudnizky S., Kaplan A. The mechano-chemistry of a monomeric reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(22):12954-12962. DOI 10.1093/nar/gkx1168.
- Menéndez-Arias L., Sebastián-Martín A., Álvarez M. Viral reverse transcriptases. *Virus Res.* 2016;234:153-176. DOI 10.1016/j.virusres.2016.12.019.
- Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptome by RNA-Seq. *Nat. Methods.* 2008;5(7):621-628. DOI 10.1038/nmeth.1226.
- Ohtsubo Y., Nagata Y., Tsuda M. Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Sci. Rep.* 2017;7:41759. DOI 10.1038/srep41769.
- Okano H., Katano Y., Baba M., Fujiwara A., Hidese R., Fujiwara S., Yanagihara I., Hayashi T., Kojima K., Takita T., Yasukawa K. Enhanced detection of RNA by MMLV reverse transcriptase coupled with thermostable DNA polymerase and DNA/RNA helicase. *Enzyme Microb. Technol.* 2017;96:111-120. DOI 10.1016/j.enzmictec.2016.10.003.
- Palikša S., Alzbutas G., Skirgaila R. Decreased K_m to dNTPs in an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption requires to perform efficient cDNA synthesis in One-Step RT-PCR assay. *Protein Eng. Des. Sel.* 2018;31(3):79-89. DOI 10.1093/protein/gzy003.
- Petyuk V.A., Zenkova M.A., Giege R., Vlassov V.V. Hybridization of antisense oligonucleotides with the 3' part of tRNA^{Phe}. *FEBS Lett.* 1999;444(2-3):217-221. DOI 10.1016/s0014-5793(99)00063-0.
- Schultz S.J., Champoux J.J. RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus Res.* 2008;134(1-2):86-103. DOI 10.1016/j.virusres.2007.12.007.
- Skasko M., Weiss K.K., Reynolds H.M., Jamburuthugoda V., Lee K., Kim B. Mechanistic differences in RNA-dependent DNA polymerization and fidelity between murine leukemia virus and HIV-1 reverse transcriptases. *J. Biol. Chem.* 2005;280(13):12190-12200. DOI 10.1074/jbc.M412859200.
- Wulf M.G., Maguire S., Humbert P., Dai N., Bei Y., Nichols N.M., Corrêa I.R., Jr, Guan S. Non-templated addition and template switching by Moloney murine leukemia virus (MMLV)-based reverse transcriptases co-occur and compete with each other. *J. Biol. Chem.* 2019;294:18220-18231. DOI 10.1074/jbc.RA119.010676.

ORCID ID

I.A. Pyshnaya orcid.org/0000-0002-7559-2376


Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-34-90132.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.09.2021. После доработки 07.10.2021. Принята к публикации 08.10.2021.


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Опухоль-ассоциированные фибробласты и их роль в опухолевой прогрессии

М.С. Ермаков¹, А.А. Нуштаева¹, В.А. Рихтер¹, О.А. Коваль^{1, 2} 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия


 o_koval@ngs.ru

Аннотация. Стромальные элементы опухоли могут стимулировать прогрессию опухолевого роста и метастазирование. В структуру опухолевой стромы входят соединительнотканые элементы, сосуды, нервы и внеклеточный матрикс. Одним из клеточных элементов стромы опухоли являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), происхождение и функции которых активно изучают на протяжении последних тридцати лет. ОАФ продуцируют основной каркасный белок внеклеточного матрикса – коллаген, избыток которого в строме опухоли стимулирует фиброз, повышает жесткость опухолевой ткани и нарушает передачу сигналов пролиферации и дифференцировки. ОАФ контролируют ангиогенез в опухоли, подвижность опухолевых клеток, иммуногенные свойства опухоли и развитие резистентности к химиопрепаратам и иммунотерапии. В результате метаболической адаптации быстрорастущей опухолевой ткани к нехватке питательных веществ и кислорода, при конверсии основного типа производства энергии в клетках с окислительного фосфорилирования на анаэробный гликолиз инициируются молекулярные изменения, в том числе индукция определенных транскрипционных факторов, которые обуславливают активацию ОАФ. Молекулярный фенотип активированных ОАФ имеет сходство с фибробластами, активированными в процессе воспаления. В активированных ОАФ происходит *de novo* синтез альфа-актина гладкой мускулатуры (α -SMA), продукция различных протеаз и фибронектина. Поскольку ОАФ обнаружены во всех типах карцином, эти клетки могут быть мишенями для разработки новых подходов противоопухолевой терапии. Часть ОАФ происходит из резидентных фибробластов пораженного опухолью органа, другие берут свое начало из опухолевых эпителиоцитов, претерпевая эпителиально-мезенхимальный переход. На сегодняшний день обнаружено большое количество молекулярных и метаболических индукторов эпителиально-мезенхимального перехода, к которым относят трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), гипоксию и воспаление. В данном обзоре систематизированы современные представления о молекулярных маркерах ОАФ, их функциональных особенностях, этапах эпителиально-мезенхимального перехода и обсуждается возможность использования ОАФ в качестве мишеней для противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: опухоль-ассоциированные фибробласты; эпителиально-мезенхимальный переход; карцинома; гипоксия.


Для цитирования: Ермаков М.С., Нуштаева А.А., Рихтер В.А., Коваль О.А. Опухоль-ассоциированные фибробласты и их роль в опухолевой прогрессии. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):14-21. DOI 10.18699/VJGB-22-03

Cancer-associated fibroblasts and their role in tumor progression

M.S. Ermakov¹, A.A. Nushtaeva¹, V.A. Richter¹, O.A. Koval^{1, 2} 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 o_koval@ngs.ru

Abstract. The stromal elements of a malignant tumor can promote cancer progression and metastasis. The structure of the tumor stroma includes connective tissue elements, blood vessels, nerves, and extracellular matrix (ECM). Some of the cellular elements of the tumor stroma are cancer-associated fibroblasts (CAFs). The origin and function of CAFs have been actively studied over the past thirty years. CAFs produce collagen, the main scaffold protein of the extracellular matrix. Collagen in the tumor stroma stimulates fibrosis, enhances the rigidity of tumor tissue, and disrupts the transmission of proliferation and differentiation signaling pathways. CAFs control tumor angiogenesis, cell motility, tumor immunogenic properties, and the development of resistance to chemo- and immunotherapy. As a result of metabolic adaptation of rapidly growing tumor tissue to the nutrients and oxygen deprivation, the main type of energy production in cells changes from oxidative phosphorylation to anaerobic glycolysis. These changes lead to sequential molecular alterations, including the induction of specified transcriptional factors that result in the CAFs activation. The molecular phenotype of activated CAFs is similar to fibroblasts activated during inflammation. In activated CAFs, alpha-smooth muscle actin (α -SMA) is synthesized *de novo* and various proteases

and fibronectin are produced. Since CAFs are found in all types of carcinomas, these cells are potential targets for the development of new approaches for anticancer therapy. Some CAFs originate from resident fibroblasts of the organs invaded by the tumor, while others originate from epithelial tumor cells, which are undergoing an epithelial-mesenchymal transition (EMT). To date, many molecular and metabolic inducers of the EMT have been discovered including the transforming growth factor-beta (TGF- β), hypoxia, and inflammation. This review classifies modern concepts of molecular markers of CAFs, their functional features, and discusses the stages of epithelial-mesenchymal transition, and the potential of CAFs as a target for antitumor therapy.

Key words: cancer-associated fibroblasts; epithelial-to-mesenchymal transition; carcinoma; hypoxia.

For citation: Ermakov M.S., Nushtaeva A.A., Richter V.A., Koval O.A. Cancer-associated fibroblasts and their role in tumor progression. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):14-21. DOI 10.18699/VJGB-22-03

Биология опухоль-ассоциированных фибробластов

Согласно современным представлениям, в микроокружении солидных опухолей присутствуют эпителиальные и стромальные клетки, среди которых можно выделить фибробласты, эндотелиоциты, а также иммунные клетки (Wang et al., 2017). Клетки стромы с фибробластоподобным фенотипом – так называемые опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), в отличие от нормальных фибробластов, содержат различные хромосомные нарушения, такие как дупликации, множественные перестройки и даже утрата целых хромосом (Hosein et al., 2010). ОАФ контролируют ангиогенез в опухоли, подвижность и метастазирование, иммуногенные свойства опухоли и развитие резистентности к химиопрепаратам и иммунотерапии (Tripathi et al., 2012; Alkasalias et al., 2018; Nushtaeva et al., 2018).

В метаанализе клинической значимости опухолевой стромы была продемонстрирована связь высокого содержания ОАФ с поздними стадиями опухолевой прогрессии, а также с вероятностью местного рецидива после удаления опухоли (Knops et al., 2020).

Гетерогенность клеток-предшественников ОАФ

В 1995 г. было выдвинуто предположение о гетерогенном происхождении ОАФ, когда L. Rønnov-Jessen с коллегами показали, что ОАФ в злокачественных новообразованиях молочной железы происходят из резидентных фибробластов, гладкомышечных клеток сосудов и перicyтов (Rønnov-Jessen et al., 1995). К настоящему времени установлено, что источниками ОАФ могут быть предшественники мезенхимальных клеток из красного костного мозга, эндотелиальные и эпителиальные клетки, собственные или резидентные фибробласты органа, в котором развилась опухоль, адипоциты и клетки адвентиции сосудов (Puré, Hingorani, 2018; Yin et al., 2019). Для реализации фенотипа ОАФ в некоторых клетках-предшественниках необходима дополнительная стимуляция цитокинами и факторами роста, такими как трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β), фактор роста фибробластов (FGF) и другие сигнальные молекулы (табл. 1) (Bordignon et al., 2019).

Эпителиальные клетки опухоли могут претерпевать трансформацию в ОАФ в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) (рис. 1). Это динамический процесс, при котором эпителиоциты трансдифференцируются в фибробластоподобные клетки. Он характерен не только для опухолевых клеток, но, прежде всего, для

формирования мезодермы и нервного гребня в эмбриогенезе, а также при воспалении и заживлении ран (Kim et al., 2017). Динамическая трансформация морфологии клетки при ЭМП обусловлена изменением экспрессии генов-регуляторов, ведущей к продукции определенных белков, что позволяет считать эти белки маркерами ЭМП (см. рис. 1). Среди таких маркеров наиболее значимыми являются N-кадгерин и виментин, которые обеспечивают перестройку цитоскелета и изменение формы клетки, а также контактов с соседними клетками и внеклеточным матриксом (ВКМ) (Massagué, 2008; Ye, Weinberg, 2015).

Помимо молекулярных стимуляторов ЭМП, показана важная роль гипоксических условий. Гипоксия активирует ЭМП за счет связывания фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1) с генами-регуляторами ЭМП. HIF-1 увеличивает экспрессию транскрипционного фактора ZEB1 из семейства белков, содержащих мотив цинковых пальцев, а также транскрипционных факторов Snail и SLUG. Гиперэкспрессия этих факторов связана с мезенхимальным фенотипом и снижением представленности маркеров эпителиальных клеток – E-кадгерина и белка плотных контактов 1-го типа (TJP1 или ZO-1) (Nushtaeva et al., 2019; Tam et al., 2020).

Эндотелиальные клетки сосудов опухоли могут претерпевать эндотелиально-мезенхимальный переход (ЭндМП) и приобретать фенотип и функциональные особенности ОАФ с потерей молекулярных маркеров эндотелиоцитов, таких как молекула адгезии эндотелиоцитов/тромбоцитов (CD31), и продукцией маркеров, специфичных для мезенхимальных клеток, например α -SMA и фибробласто-специфического белка 1 (FSP-1) (Zeisberg et al., 2007).

Важной частью стромы злокачественных опухолей молочной железы являются клетки жировой ткани – адипоциты, которые могут трансформироваться в опухоль-ассоциированные адипоциты и далее в ОАФ. Такие изменения сопровождаются увеличением экспрессии молекулярных маркеров, характерных для мезенхимальных клеток, а именно: рецепторов, индуцируемых активаторами пероксисом гамма (PPARG), транскрипционного фактора, содержащего ДНК-связывающий домен Runt 2-го типа (RUNX-2), и транскрипционного фактора семейства HMG ДНК-связывающих белков (SOX9) (Bochet et al., 2013; Liu et al., 2021).

На клеточной модели рака простаты было показано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут дифференцироваться в ОАФ после активации хемокинового рецептора 6-го типа (CXCR6) его лигандом CXCL16. Помимо того, что активация CXCR6 ведет к трансформации

Таблица 1. Активаторы ОАФ

Индуктор	Путь активации	Литературный источник
TGF-β	CLIC4/Arf6	Calon et al., 2014
FGF	RAS/MAPK, PI3k/AKT	Bordignon et al., 2019; Mossahebi-Mohammadi et al., 2020
PDGF	PI3k/AKT	Yoshida, 2020
HSF-1	TRiC/CCT	Scherz-Shouval et al., 2014; Grantham, 2020

Примечание. PDGF – тромбоцитарный фактор роста; HSF-1 – фактор теплового шока 1-го типа; CLIC4/Arf6 – хлоридный внутриклеточный канал 4, фактор АДФ-рибозилирования 6-го типа; RAS/MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; PI3k/AKT – фосфоинозитид-3-киназа, альфа серин/треонин протеинкиназа; TRiC/CCT – шаперонин, содержащий TCP-1.

МСК в ОАФ, происходит секреция стромального фактора-1, известного также как CXCL12, который принимает участие в ЭМП (Jung et al., 2013). В работе (Weber et al., 2015) продемонстрировано, что внеклеточный структурный белок остеоопонтин (OPN), который играет ключевую роль в формировании костной ткани, при раке молочной железы индуцирует экспрессию TGF-β в интегрин-зависимых МСК, чтобы обеспечивать поддержание фенотипа ОАФ. Интересно, что даже специализированные клетки, такие как клетки Ито в печени, звездчатые клетки поджелудочной железы и миофибробласты молочной железы, могут приобретать фенотип ОАФ (Weber et al., 2015). Данные примеры иллюстрируют широкий спектр клеток, которые в результате молекулярных изменений в опухоли могут приобретать фенотип ОАФ и, как следствие, вовлекаться в биологию опухоли.

Маркеры опухоль-ассоциированных фибробластов

Вовлеченность ОАФ в онкогенез и опухолевую прогрессию делает их привлекательными для применения таргетной терапии. Потенциально клинически значимым маркером ОАФ является трансмембранный муциноподобный белок подоплагин (PDPN) (табл. 2). На сегодняшний день PDPN описан как маркер клеток-предшественников капилляров лимфоидного русла и ОАФ в раковых опухолях легких. Экспрессия подоплагина была зарегистрирована в 54 (30.5%) из 177 исследованных популяций ОАФ (Yurugi et al., 2017). При этом все подоплагин-положительные ОАФ были характерны для инвазивных аденокарцином, тогда как для неинвазивных аденокарцином был показан подоплагин-отрицательный фенотип (Yurugi et al., 2017).

Важными маркерами ОАФ служат рецепторы тромбоцитарного фактора роста PDGFRα и PDGFRβ, которые относятся к 3-му классу тирозинкиназ и активируются при взаимодействии с лигандом PDGF. При функционировании вне патологии PDGFR регулирует органогенез различных систем в эмбриогенезе, однако значение активации рецепторов PDGFRα и -β в опухолях еще не до конца ясно. Показано, что экспрессия рецептора PDGFRβ повышена в клетках микроокружения опухоли, в особенности в ОАФ, где тромбоцитарный фактор роста активирует ОАФ и может стимулировать опухолевую прогрессию (Anderberg et al., 2009). PDGFRα-положительные ОАФ были обнаружены в строме меланомы, что позволяет предположить, что эти ОАФ происходят из резидентных фибробластов в результате активации (Lynch, Watt, 2018). Одной из потенциальных мишеней для таргетного воздействия на ОАФ является сывороточный белок амилоида А (SAA-1); его экспрессия и роль в опухолевой прогрессии

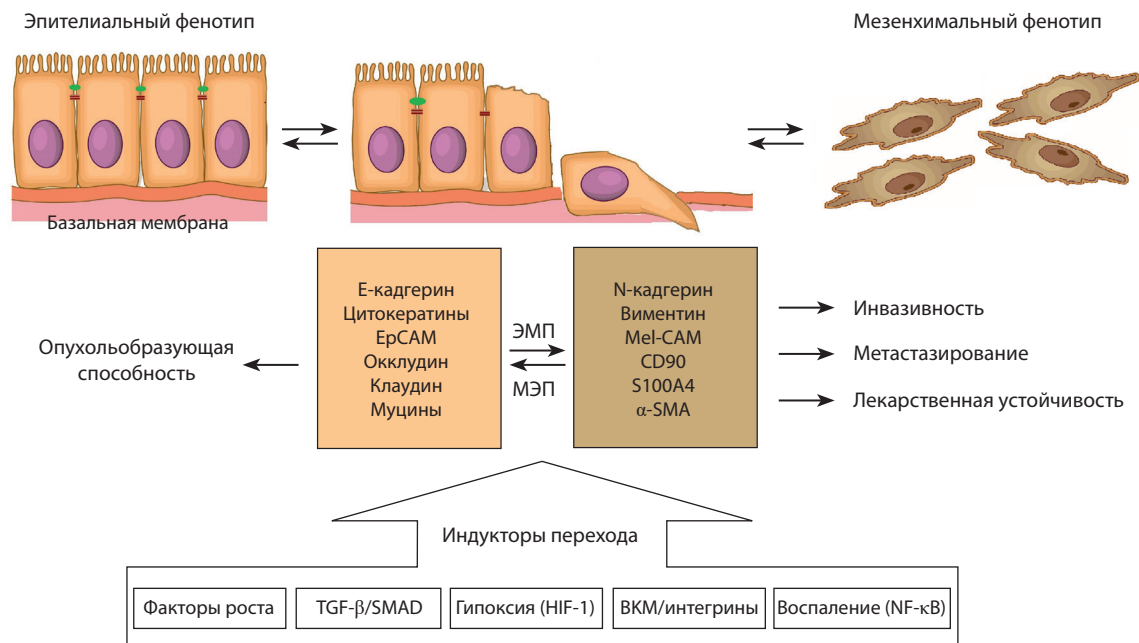


Рис. 1. Клеточные и молекулярные изменения при ЭМП и МЭП.

МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход; EpCAM – молекула адгезии эпителиоцитов; Mel-CAM – молекула адгезии меланомы; α-SMA – альфа-актин гладкой мускулатуры; HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1-го типа.

Таблица 2. Потенциальные маркеры ОАФ

Маркеры ОАФ	Распространенность в опухолях	Литературный источник
α -SMA	РМЖ	Yang et al., 2021
SAA-1	Рак желудка	Yasukawa et al., 2021
Остеопонтин	РМЖ	Weber et al., 2015
Кавеолин-1	РМЖ: люминальный тип (повышен), базальный (понижен)	Witkiewicz et al., 2009; Goetz et al., 2011
PDGFR α/β	РМЖ, меланома	Jansson et al., 2018; Lynch, Watt, 2018
CD90	Аденокарцинома простаты, РМЖ, рак легкого	True et al., 2010; Lobba et al., 2018
Подопланин	Опухоли легкого	Yurugi et al., 2017
Металлопротеиназы	Опухоли головы и шеи	Glentis et al., 2017
S100A4	РМЖ	Grum-Schwensen et al., 2005

Примечание. α -SMA – альфа-актин гладкой мускулатуры; PDGFR α/β – рецепторы тромбоцитарного фактора роста; РМЖ – рак молочной железы.

были описаны на клеточной модели ОАФ из опухолей желудка (Yasukawa et al., 2021).

В процессе поиска специфических маркеров опухолевой стромы в ОАФ аденокарциномы простаты была показана повышенная экспрессия поверхностного белка с одиночным V-доменом иммуноглобулина (CD90), исходно обнаруженного на Т-клетках и нейронах. Высокий уровень CD90 позволил отличать опухоль-ассоциированную строму от «доброкачественной». Поскольку экспрессия CD90 была обнаружена только в фибробластах, ассоциированных с опухолью, такой маркер является потенциальной терапевтической мишенью для таргетной терапии (True et al., 2010).

Определенные белки ОАФ могут выступать прогностическими маркерами инвазивности опухоли. Одним из таких маркеров может быть белок S100A4 из семейства S100 низкомолекулярных кальций-связывающих белков (Fei et al., 2017). Белки семейства S100 интересны наличием как внутри-, так и внеклеточной активности, обусловленной участием в поддержании баланса кальция, и процессов, зависящих от уровня внутриклеточного кальция. S100A4 активирует каскад реакций, связанных в основном с секрецией провоспалительных цитокинов и экспрессией факторов роста, белков внеклеточного матрикса, металлопротеиназ и др. Особый интерес представляет внутриклеточная активность S100A4, которая сопряжена с усилением инвазивных возможностей опухолевых клеток, уходом от апоптоза и стволовым фенотипом клетки (Ambartsumian et al., 2019). При исследовании роли S100A4 в опухолевой прогрессии выявлено, что супрессия белка способствует снижению роста опухоли (Joyce, Pollard, 2009; Grum-Schwensen et al., 2015). Роль стромальных клеток, которые секретируют S100A4, была продемонстрирована на модели мышей MMTV-PyVmT с нокаутированным геном *S100A4*: при совместной ортотопической трансплантации клеток аденокарциномы молочной железы мыши CSML100 и эмбриональных фибробластов мыши MEF. Клеточные линии MEF были получены путем спонтанной иммортализации первичных эмбриональных фибробластов мышей с фенотипом S100A4⁺ и S100A4⁻. При совместной трансплантации опухолевых клеток и фибробластов с фенотипом S100A4⁻

сингенным мышам метастазы не образовывались, однако при трансплантации S100A4⁺-фибробластов метастатический потенциал клеток опухоли возвращался. S100A4⁺-фибробласты характеризовались повышенной подвижностью и инвазивностью по сравнению с фибробластами S100A4⁻, а также способностью секретировать S100A4 в микроокружение опухоли (Grum-Schwensen et al., 2005).

Сегодня уже стало очевидным, что экспрессия определенных маркеров ОАФ не позволяет однозначно предсказать агрессивность опухоли. Например, потеря кавеолина-1 в ОАФ связана с плохим прогнозом при раке молочной железы, потому что популяция этих ОАФ стимулирует рост трижды негативных (ER-/PR-/HER2-) опухолевых клеток молочной железы (Witkiewicz et al., 2009). В параллельном исследовании экспрессия кавеолина-1 в ОАФ трансформированной молочной железы стимулировала перестройку микроокружения опухоли, вследствие чего облегчалась инвазия злокачественных клеток и уровень увеличения инвазивности коррелировал с метастатическим потенциалом опухоли (Witkiewicz et al., 2009; Goetz et al., 2011). Такие противоречивые результаты указывают на то, что кавеолин-1 играет различную роль при разных гистологических типах опухолей. Для определения его в качестве опухолевого прогностического маркера должны быть проведены более масштабные исследования.

Роль опухоль-ассоциированных фибробластов в опухолевой прогрессии

Особый интерес в исследовании опухолевой прогрессии представляет стимулирующее действие ОАФ на пролиферацию опухолевых клеток и их инвазию. Такой интерес связан в первую очередь с тем, что еще в предраковом фенотипе эпителиальных клеток резидентные фибробласты трансформируются в ОАФ (Liotta, Kohn, 2001). На модели фибробластов из опухолей и полипов кишечника была показана стимуляция ими пролиферации опухолевых клеток и клеток полипов, что подтверждает вклад стромальных клеток в опухолевый рост и прогрессию (Mukaiida, Sasaki, 2016).

Взаимодействие опухолевых эпителиоцитов с ОАФ было проанализировано при сравнении гистологической картины различных типов рака желудка. В исследовании

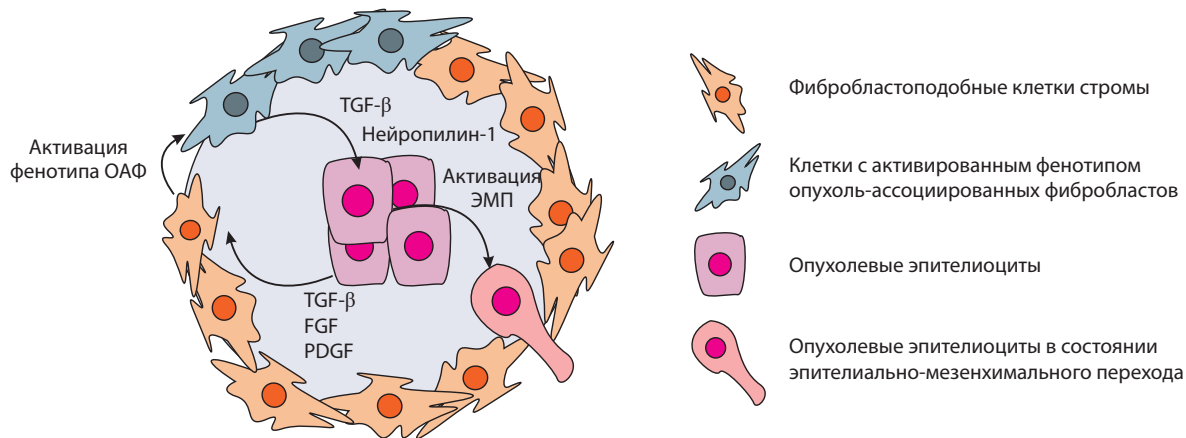


Рис. 2. Схема взаимодействия опухолевых эпителиоцитов и стромальных элементов опухоли.

TGF-β – трансформирующий фактор роста-β; FGF – фактор роста фибробластов; PDGF – тромбоцитарный фактор роста.

рака желудка диффузного типа (Orimo, Weinberg, 2006) ОАФ и эпителиоциты расположены более тесно, тогда как при кишечном типе ОАФ формируют стромоподобный матрикс, благодаря которому опухолевые эпителиоциты сохраняют железистое строение.

T. Dang с коллегами показали на гетерогенных 3D клеточных моделях, состоящих из опухолевых эпителиоцитов и ОАФ молочной железы, что ОАФ молочной железы стимулировали миграцию опухолевых клеток в случае базального типа РМЖ (ER-/PR-/HER2-). В моделях люминальных типов РМЖ (ER+/PR+/HER2+, ER+/PR+/HER2-) такого эффекта не наблюдалось (Dang et al., 2011). Эти данные согласуются с клиническими наблюдениями, которые указывают на доминирование метастазирования в случаях трижды негативного РМЖ в сравнении с другими типами опухолей молочной железы, однако не дают понимания, почему клетки базального типа РМЖ более чувствительны к стимуляции ОАФ (Al-Mahmood et al., 2018).

Поскольку для проникновения в кровеносное и лимфатическое русло опухолевым клеткам необходимо преодолеть базальную мембрану (БМ), отделяющую опухолевые клетки, ОАФ должны синтезировать металлопротеиназы – эндопептидазы, способные разрушать все типы белков внеклеточного матрикса БМ (Gonzalez-Avila et al., 2019). В это же время было опубликовано исследование, согласно которому ОАФ способны преодолевать БМ по независимо от металлопротеиназ пути, за счет способности ОАФ растягивать БМ с образованием в ней пор, через которые не только они, но и опухолевые эпителиоциты могут мигрировать в кровеносное русло и образовывать метастазы в отдаленных органах. Растяжению хорошо поддаются области БМ с низкой экспрессией ламинина и коллагена IV типа (Glentis et al., 2017). Открытие альтернативного пути миграции ОАФ объясняет неэффективность применения ингибиторов металлопротеиназ у пациентов с опухолями головы и шеи.

Яркий пример стимуляции опухолевого роста ОАФ – секреция ими IL-1β при раке мочевого пузыря и активация пути Wnt в опухолевых клетках (Yang et al., 2021). Более того, ОАФ рака мочевого пузыря, секретирующие IL-8, способны стимулировать секрецию нейропилина-1,

который усиливает пролиферацию опухолевых клеток и признан одним из потенциальных прогностических маркеров (Chen C. et al., 2020). В недавних исследованиях было показано, что нейропилин-1 может быть потенциальным кофактором при индукции ЭМП (Chen Z. et al., 2020).

Паракринная стимуляция опухоль-ассоциированными фибробластами эпителиально-мезенхимального перехода в опухолевых эпителиоцитах считается важным фактором, способствующим опухолевой прогрессии. Центральным механизмом индукции ЭМП в опухолевом узле является активация пути TGF-β/Smad, который реализуется за счет секреции фактора TGF-β фибробластами стромы (рис. 2) (Yu et al., 2014). Smad – это транскрипционный фактор, контролирующий экспрессию генов ЭМП. В исследовании M. Vered с коллегами клетки с маркерами ЭМП встречались в первичных очагах плоскоклеточной карциномы языка и в метастазах региональных лимфатических узлов, что подтверждает значимость ОАФ в индукции метастазирования и в формировании вторичного опухолевого очага (Vered et al., 2010).

При раке яичника ключевую роль в процессе активации ЭМП играет индукция CXCR4/Wnt/β-катенинового пути в опухолевых эпителиоцитах через взаимодействие со стромальным фактором роста-1 (SDF-1 или CXCL12), секретируемым ОАФ. Помимо индукции процесса трансформации, SDF-1 стимулирует устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам, например цисплатину (Zhang et al., 2020).

В 2020 г. E. Franzè с коллегами продемонстрировали феномен активации фенотипа ОАФ в нормальных фибробластах полипов прямой кишки при сокультивировании с ОАФ. Они показали, что ОАФ, полученные из колоректальных опухолей, могут секретировать IL-34, который активирует в нормальных фибробластах экспрессию белков, характерных для ОАФ: α-SMA, виментина и белка, активирующего фибробласты (FAP) (Franzè et al., 2020).

Несмотря на то что большая часть описанных функций ОАФ связана со стимуляцией опухолевой прогрессии, некоторые авторы сообщают и об опухоль-супрессирующих функциях ОАФ. Например, наличие в опухолях молочной железы субпопуляции клеток, экспрессирующих молекулу

адгезии меланомы (CD146), среди ОАФ коррелировало с замедлением пролиферации в эстроген-зависимых люминальных типах РМЖ (Vrechbuhl et al., 2017). Поскольку ОАФ секретируют цитокины, которые участвуют в привлечении и созревании макрофагов, Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (IL-10, TGF- β , TNF, IFN- γ и IL-6), они увеличивают доступность опухоли для клеток иммунной системы и способствуют развитию противоопухолевого иммунного ответа (Marlow et al., 2008). При исследовании рака ротовой полости также было показано, что ОАФ способны замедлять пролиферацию опухолевых клеток: популяция ОАФ, секретирующая костный морфогенетический белок 4 (BMP4) и экспрессирующая α -SMA, тормозила деление опухолевых стволовых клеток (Patel et al., 2018). Создание модели мышей с предрасположенностью к развитию опухолей поджелудочной железы позволило выявить, что исключение α -SMA-положительной популяции ОАФ или ингибирование сигнального пути Hedgehog сдерживает рост протоковой аденокарциномы поджелудочной железы. Согласно гистологическому анализу препаратов опухолей, это происходит из-за нарушения процессов, связанных с ангиогенезом (Rhim et al., 2014).

Данные примеры демонстрируют опухоль-супрессирующую функцию ОАФ только для высокодифференцированных типов опухолей, в низкодифференцированных опухолях таких эффектов не наблюдается. Можно предположить, что функция ОАФ определяется не только происхождением фибробластов, тканью или органом, где возникла опухоль, но и уровнем дифференцировки опухолевых клеток (Vu et al., 2019).

Получение ОАФ для исследовательских целей

При исследовании свойств ОАФ чаще всего используют культуры клеток, выделенные из опухолей пациентов после оперативного вмешательства. Необходимость в получении нового материала ОАФ существует, поскольку *in vitro* ОАФ имеют тенденцию к быстрому старению, и потому возможности их применения ограничены ранними пассажами (Taddei et al., 2014). Более того, в коммерчески доступных коллекциях клеточных культур (Американская коллекция культур (ATCC), Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур (ECACC), Российская коллекция клеточных культур и др.) присутствует ограниченное количество линий клеток с фенотипом ОАФ. Например, в ATCC представлена лишь одна клеточная линия ОАФ, полученная из аденокарциномы простаты и модифицированная введением трансгена теломеразы под контролем конститутивного промотора вируса полиомы SV40 hTERT PF179T CAF. Такая модификация фибробластов направлена на сохранение пролиферативных свойств ОАФ (Madar et al., 2009).

Для создания клеточных культур из опухолевой ткани применяют механическую дезагрегацию, ферментативную диссоциацию, диссоциацию с хелатирующими агентами и их комбинацию. Для разрушения стромы опухолевой ткани чаще всего используют трипсин и коллагеназу IV типа. Выбор методики должен учитывать гистологическое происхождение ткани, из которой получают культуру клеток. При дезагрегации ОАФ могут представлять небольшую популяцию клеток, и такие монокультуры требу-

ют дополнительной стадии их отделения от общей массы клеток. С этой целью применяют магнитную сепарацию или проточную сортировку клеток с иммуноокрашиванием специфических маркеров ОАФ. К таким маркерам можно отнести FAP или α -SMA (Sharon et al., 2013; Huang et al., 2017; Sha et al., 2018). Основная сложность в выделении ОАФ заключается в адаптации протоколов для витального окрашивания внутриклеточных маркеров, например α -SMA, FAP и виментина, поэтому дополнение панели специфическими поверхностными маркерами, такими как CD90, крайне желательно.

Заключение

Углубленное понимание роли компонентов микроокружения опухоли имеет решающее значение для разработки новых подходов диагностики и лечения онкологических заболеваний различного гистогенеза. Многогранное влияние ОАФ на опухолевую прогрессию делает их важным объектом для изучения канцерогенеза и разработки новых противоопухолевых средств. Применение таргетных препаратов, направленных на компоненты микроокружения опухоли, не показало предполагаемой эффективности как в случае с ингибиторами металлопротеиназ, так и в случае с ингибиторами ангиогенеза и ингибиторами контрольных точек Т-клеточного иммунитета при некоторых видах рака (Wang-Gillam, 2019). Неоднородность молекулярного фенотипа ОАФ может являться важным фактором неэффективности таргетного лечения рака, поэтому следует уделить внимание разработке более подробных классификаций различных подтипов ОАФ, с учетом их вовлеченности в прогрессирование опухоли.

Таким образом, подробная классификация ОАФ и исследование функций каждого фенотипического подмножества, возможно, будут полезны для разработки новых методов лечения и диагностики онкологических заболеваний, учитывающих ОАФ.

Список литературы / References

- Alkasalias T., Moyano-Galceran L., Arsenian-Henriksson M., Lehti K. Fibroblasts in the tumor microenvironment: shield or spear? *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(5):1532. DOI 10.3390/ijms19051532.
- Al-Mahmood S., Sapiezynski J., Garbuzenko O.B., Minko T. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2018;8(5):1483-1507. DOI 10.1007/s13346-018-0551-3.
- Ambartsumian N., Klingelhöfer J., Grigorian M. The multifaceted S100A4 protein in cancer and inflammation. In: Heizmann C. (Ed.). Calcium-Binding Proteins of the EF-Hand Superfamily: From Basics to Medical Applications. (Ser. Methods in Molecular Biology). New York: Humana Press, 2019;1929:339-365. DOI 10.1007/978-1-4939-9030-6_22.
- Anderberg C., Li H., Fredriksson L., Andrae J., Betsholtz C., Li X., Eriksson U., Pietras K. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2009;69(1):369-378. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-2724.
- Bochet L., Lehuède C., Dauvillier S., Wang Y.Y., Dirat B., Laurent V., Dray C., Guet R., Maridonneau-Parini I., Le Gonidec S., Couderc B., Escourrou G., Valet P., Muller C. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 2013;73(18):5657-5668. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-13-0530.

- Bordignon P., Bottoni G., Xu X., Popescu A.S., Truan Z., Guenova E., Kofler L., Jafari P., Ostano P., Röcken M., Neel V., Dotto G.P. Dualism of FGF and TGF- β signaling in heterogeneous cancer-associated fibroblast activation with ETV1 as a critical determinant. *Cell Rep.* 2019;28(9):2358-2372.e6. DOI 10.1016/j.celrep.2019.07.092.
- Brechbuhl H.M., Finlay-Schultz J., Yamamoto T.M., Gillen A.E., Citelley D.M., Tan A.-C., Sams S.B., Pillai M.M., Elias A.D., Robinson W.A., Sartorius C.A., Kabos P. Fibroblast subtypes regulate responsiveness of luminal breast cancer to estrogen. *Clin. Cancer Res.* 2017;23(7):1710-1721. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-15-2851.
- Bu L., Baba H., Yoshida N., Miyake K., Yasuda T., Uchihara T., Tan P., Ishimoto T. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene.* 2019;38(25):4887-4901. DOI 10.1038/s41388-019-0765-y.
- Calon A., Tauriello D.V.F., Batlle E. TGF- β in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2014;25:15-22. DOI 10.1016/j.semcancer.2013.12.008.
- Chen C., Zhang R., Ma L., Li Q., Zhao Y., Zhang G., Zhang D., Li W., Cao S., Wang L., Geng Z. Neuropilin-1 is up-regulated by cancer-associated fibroblast-secreted IL-8 and associated with cell proliferation of gallbladder cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 2020;24(21):12608-12618. DOI 10.1111/jcmm.15825.
- Chen Z., Gao H., Dong Z., Shen Y., Wang Z., Wei W., Yi J., Wang R., Wu N., Jin S. NRP1 regulates radiation-induced EMT via TGF- β /Smad signaling in lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 2020;96(10):1281-1295. DOI 10.1080/09553002.2020.1793015.
- Dang T.T., Prechtel A.M., Pearson G.W. Breast cancer subtype-specific interactions with the microenvironment dictate mechanisms of invasion. *Cancer Res.* 2011;71(21):6857-6866. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-1818.
- Fei F., Qu J., Zhang M., Li Y., Zhang S. S100A4 in cancer progression and metastasis: a systematic review. *Oncotarget.* 2017;8(42):73219-73239. DOI 10.18632/oncotarget.18016.
- Franzè E., Di Grazia A., Sica G.S., Biancone L., Laudisi F., Monteleone G. Interleukin-34 enhances the tumor promoting function of colorectal cancer-associated fibroblasts. *Cancers.* 2020;12(12):3537. DOI 10.3390/cancers12123537.
- Glentis A., Oertle P., Mariani P., Chikina A., El Marjou F., Attieh Y., Zaccarini F., Lae M., Loew D., Dingli F., Sirven P., Schoumacher M., Gurchenkov B.G., Plodinec M., Vignjevic D.M. Cancer-associated fibroblasts induce metalloproteinase-independent cancer cell invasion of the basement membrane. *Nat. Commun.* 2017;8(1):924. DOI 10.1038/s41467-017-00985-8.
- Goetz J.G., Minguet S., Navarro-Lérida I., Lazcano J.J., Samaniego R., Calvo E., Tello M., Osteso-Ibáñez T., Pellinen T., Echarri A., Cerezo A., Klein-Szanto A.J.P., Garcia R., Keely P.J., Sánchez-Mateos P., Cukierman E., Del Pozo M.A. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell.* 2011;146(1):148-163. DOI 10.1016/j.cell.2011.05.040.
- Gonzalez-Avila G., Sommer B., Mendoza-Posada D.A., Ramos C., Garcia-Hernandez A.A., Falfan-Valencia R. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2019;137:57-83. DOI 10.1016/j.critrevonc.2019.02.010.
- Grantham J. The molecular chaperone CCT/TRiC: an essential component of proteostasis and a potential modulator of protein aggregation. *Front. Genet.* 2020;11:172. DOI 10.3389/fgene.2020.00172.
- Grum-Schwensen B., Klingelhöfer J., Beck M., Bonefeld C.M., Hammerlik P., Guldberg P., Grigorian M., Lukanidin E., Ambartsumian N. S100A4-neutralizing antibody suppresses spontaneous tumor progression, pre-metastatic niche formation and alters T-cell polarization balance. *BMC Cancer.* 2015;15(1):44. DOI 10.1186/s12885-015-1034-2.
- Grum-Schwensen B., Klingelhofer J., Berg C.H., El-Naaman C., Grigorian M., Lukanidin E., Ambartsumian N. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res.* 2005;65(9):3772-3780. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-04-4510.
- Hosein A.N., Wu M., Arcand S.L., Lavallée S., Hébert J., Tonin P.N., Basik M. Breast carcinoma-associated fibroblasts rarely contain p53 mutations or chromosomal aberrations. *Cancer Res.* 2010;70(14):5770-5777. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-10-0673.
- Huang Yingying, Zhou S., Huang Yong, Zheng D., Mao Q., He J., Wang Y., Xue D., Lu X., Yang N., Zhao Y. Isolation of fibroblast-activation protein-specific cancer-associated fibroblasts. *BioMed Res. Int.* 2017;2017:4825108. DOI 10.1155/2017/4825108.
- Jansson S., Aaltonen K., Bendahl P.-O., Falck A.-K., Karlsson M., Pietras K., Rydén L. The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple-negative subtype and early recurrence. *Breast Cancer Res. Treat.* 2018;169(2):231-241. DOI 10.1007/s10549-018-4664-7.
- Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 2009;9(4):239-252. DOI 10.1038/nrc2618.
- Jung Y., Kim J.K., Shiozawa Y., Wang Jingcheng, Mishra A., Joseph J., Berry J.E., McGee S., Lee E., Sun H., Wang Jianhua, Jin T., Zhang H., Dai J., Krebsbach P.H., Keller E.T., Pienta K.J., Taichman R.S. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat. Commun.* 2013;4(1):1795. DOI 10.1038/ncomms2766.
- Kim D., Xing T., Yang Z., Dudek R., Lu Q., Chen Y.-H. Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: a comprehensive overview. *J. Clin. Med.* 2017;7(1):1. DOI 10.3390/jcm7010001.
- Knops A.M., South A., Rodeck U., Martinez-Outschoorn U., Harshyne L.A., Johnson J., Luginbuhl A.J., Curry J.M. Cancer-associated fibroblast density, prognostic characteristics, and recurrence in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Front. Oncol.* 2020;10:565306. DOI 10.3389/fonc.2020.565306.
- Liotta L.A., Kohn E.C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001;411(6835):375-379. DOI 10.1038/35077241.
- Liu B., Pan S., Liu J., Kong C. Cancer-associated fibroblasts and the related Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) promote bladder cancer progression. *Gene.* 2021;775:145451. DOI 10.1016/j.gene.2021.145451.
- Lobba A.R.M., Carreira A.C.O., Cerqueira O.L.D., Fujita A., DeOcesano-Pereira C., Osorio C.A.B., Soares F.A., Rameshwar P., Sogayar M.C. High CD90 (THY-1) expression positively correlates with cell transformation and worse prognosis in basal-like breast cancer tumors. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199254. DOI 10.1371/journal.pone.0199254.
- Lynch M.D., Watt F.M. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J. Clin. Investig.* 2018;128(1):26-35. DOI 10.1172/JCI93555.
- Madar S., Brosh R., Buganim Y., Ezra O., Goldstein I., Solomon H., Kogan I., Goldfinger N., Klocker H., Rotter V. Modulated expression of WFDC1 during carcinogenesis and cellular senescence. *Carcinogenesis.* 2009;30(1):20-27. DOI 10.1093/carcin/bgn232.
- Marlow R., Strickland P., Lee J.S., Wu X., Pebenito M., Binnewies M., Le E.K., Moran A., Macias H., Cardiff R.D., Sukumar S., Hinck L. SLITs suppress tumor growth *in vivo* by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Res.* 2008;68(19):7819-7827. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-1357.
- Massagué J. TGF β in cancer. *Cell.* 2008;134(2):215-230. DOI 10.1016/j.cell.2008.07.001.
- Mossahebi-Mohammadi M., Quan M., Zhang J.-S., Li X. FGF signaling pathway: a key regulator of stem cell pluripotency. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:79. DOI 10.3389/fcell.2020.00079.
- Mukaida N., Sasaki S. Fibroblasts, an inconspicuous but essential player in colon cancer development and progression. *World J. Gastroenterol.* 2016;22(23):5301. DOI 10.3748/wjg.v22.i23.5301.
- Nushtaeva A.A., Karpushina A.A., Ermakov M.S., Gulyaeva L.F., Gerasimov A.V., Sidorov S.V., Gayner T.A., Yunusova A.Y., Tkachenko A.V., Richter V.A., Koval O.A. Establishment of primary human breast cancer cell lines using "pulsed hypoxia" method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice. *Cancer Cell Int.* 2019;19(1):46. DOI 10.1186/s12935-019-0766-5.

- Nushtaeva A.A., Stepanov G.A., Semenov D.V., Juravlev E.S., Balahonova E.A., Gerasimov A.V., Sidorov S.V., Savelyev E.I., Kuligina E.V., Richter V.A., Koval O.A. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. *BMC Cancer*. 2018;18(1):728. DOI 10.1186/s12885-018-4635-8.
- Orimo A., Weinberg R.A. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 2006;5(15):1597-1601. DOI 10.4161/cc.5.15.3112.
- Patel A.K., Vipparthi K., Thatikonda V., Arun I., Bhattacharjee S., Sharan R., Arun P., Singh S. A subtype of cancer-associated fibroblasts with lower expression of alpha-smooth muscle actin suppresses stemness through BMP4 in oral carcinoma. *Oncogenesis*. 2018;7(10):78. DOI 10.1038/s41389-018-0087-x.
- Puré E., Hingorani S.R. Mesenchymal cell plasticity and perfidy in epithelial malignancy. *Trends Cancer*. 2018;4(4):273-277. DOI 10.1016/j.trecan.2018.02.007.
- Rhim A.D., Oberstein P.E., Thomas D.H., Mirek E.T., Palermo C.F., Sastra S.A., Dekleva E.N., Saunders T., Becerra C.P., Tattersall I.W., Westphalen C.B., Kitajewski J., Fernandez-Barrera M.G., Fernandez-Zapico M.E., Iacobuzio-Donahue C., Olive K.P., Stanger B.Z. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2014;25(6):735-747. DOI 10.1016/j.ccr.2014.04.021.
- Rønnov-Jessen L., Petersen O.W., Kotliansky V.E., Bissell M.J. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1995;95(2):859-873. DOI 10.1172/JCI117736.
- Scherz-Shouval R., Santagata S., Mendillo M.L., Sholl L.M., Ben-Aharon I., Beck A.H., Dias-Santagata D., Koeva M., Stemmer S.M., Whitesell L., Lindquist S. The reprogramming of tumor stroma by HSF1 is a potent enabler of malignancy. *Cell*. 2014;158(3):564-578. DOI 10.1016/j.cell.2014.05.045.
- Sha M., Jeong S., Qiu B., Tong Y., Xia L., Xu N., Zhang J., Xia Q. Isolation of cancer-associated fibroblasts and its promotion to the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Med*. 2018;7(9):4665-4677. DOI 10.1002/cam4.1704.
- Sharon Y., Alon L., Glanz S., Servais C., Erez N. Isolation of normal and cancer-associated fibroblasts from fresh tissues by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). *J. Vis. Exp.* 2013;71:4425. DOI 10.3791/4425.
- Taddei M.L., Cavallini L., Comito G., Giannoni E., Folini M., Marini A., Gandellini P., Morandi A., Pintus G., Raspollini M.R., Zaffaroni N., Chiarugi P. Senescent stroma promotes prostate cancer progression: the role of miR-210. *Mol. Oncol.* 2014;8(8):1729-1746. DOI 10.1016/j.molonc.2014.07.009.
- Tam S.Y., Wu V.W.C., Law H.K.W. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in cancers: HIF-1 α and beyond. *Front. Oncol.* 2020;10:468. DOI 10.3389/fonc.2020.00486.
- Tripathi M., Billet S., Bhowmick N.A. Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. *Cell Adh. Migr.* 2012;6(3):231-235. DOI 10.4161/cam.20419.
- True L.D., Zhang H., Ye M., Huang C.-Y., Nelson P.S., von Haller P.D., Tjoelker L.W., Kim J.-S., Qian W.-J., Smith R.D., Ellis W.J., Liebeskind E.S., Liu A.Y. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Mod. Pathol.* 2010;23(10):1346-1356. DOI 10.1038/modpathol.2010.122.
- Vered M., Dayan D., Yahalom R., Dobriyan A., Barshack I., Bello I.O., Kantola S., Salo T. Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2010;127(6):1356-1362. DOI 10.1002/ijc.25358.
- Wang M., Zhao J., Zhang L., Wei F., Lian Y., Wu Y., Gong Z., Zhang S., Zhou J., Cao K., Li X., Xiong W., Li G., Zeng Z., Guo C. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer*. 2017;8(5):761-773. DOI 10.7150/jca.17648.
- Wang-Gillam A. Targeting stroma: a tale of caution. *J. Clin. Oncol.* 2019;37(13):1041-1043. DOI 10.1200/JCO.19.00056.
- Weber C.E., Kothari A.N., Wai P.Y., Li N.Y., Driver J., Zapf M.A.C., Franzen C.A., Gupta G.N., Osipo C., Zlobin A., Syn W.K., Zhang J., Kuo P.C., Mi Z. Osteopontin mediates an MZF1-TGF- β 1-dependent transformation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts in breast cancer. *Oncogene*. 2015;34(37):4821-4833. DOI 10.1038/ncr.2014.410.
- Witkiewicz A.K., Dasgupta A., Sotgia F., Mercier I., Pestell R.G., Sabel M., Kleer C.G., Brody J.R., Lisanti M.P. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am. J. Pathol.* 2009;174(6):2023-2034. DOI 10.2353/ajpath.2009.080873.
- Yang F., Guo Z., He C., Qing L., Wang H., Wu J., Lu X. Cancer-associated fibroblasts promote cell proliferation and invasion via paracrine Wnt/IL1 β signaling pathway in human bladder cancer. *Neoplasma*. 2021;68(1):79-86. DOI 10.4149/neo_2020_200202N101.
- Yasukawa Y., Hattori N., Iida N., Takeshima H., Maeda M., Kiyono T., Sekine S., Seto Y., Ushijima T. SAA1 is upregulated in gastric cancer-associated fibroblasts possibly by its enhancer activation. *Carcinogenesis*. 2021;42(2):180-189. DOI 10.1093/carcin/bgaa131.
- Ye X., Weinberg R.A. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2015;25(11):675-686. DOI 10.1016/j.tcb.2015.07.012.
- Yin Z., Dong C., Jiang K., Xu Z., Li R., Guo K., Shao S., Wang L. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts and roles in the progression, prognosis, and therapy of hepatocellular carcinoma. *J. Hematol. Oncol.* 2019;12(1):101. DOI 10.1186/s13045-019-0782-x.
- Yoshida G.J. Regulation of heterogeneous cancer-associated fibroblasts: the molecular pathology of activated signaling pathways. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2020;39(1):112. DOI 10.1186/s13046-020-01611-0.
- Yu Y., Xiao C.-H., Tan L.-D., Wang Q.-S., Li X.-Q., Feng Y.-M. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br. J. Cancer*. 2014;110(3):724-732. DOI 10.1038/bjc.2013.768.
- Yurugi Y., Wakahara M., Matsuoka Y., Sakabe T., Kubouchi Y., Haruki T., Nosaka K., Miwa K., Araki K., Taniguchi Y., Shiomi T., Nakamura H., Umekita Y. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the lung. *Anticancer. Res.* 2017;37(1):207-214. DOI 10.21873/anticancer.11308.
- Zeisberg E.M., Potenta S., Xie L., Zeisberg M., Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007;67(21):10123-10128. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127.
- Zhang F., Cui J., Gao H., Yu H., Gao F., Chen J., Chen L. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer via CXCL12/CXCR4 axis. *Future Oncol.* 2020;16(32):2619-2633. DOI 10.2217/fon-2020-0095.

ORCID ID

M.S. Ermakov orcid.org/0000-0001-7107-4187
A.A. Nushtaeva orcid.org/0000-0001-9367-807X
O.A. Koval orcid.org/0000-0001-7788-2249

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-74-10039) и проекта базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН № АААА-А17-11702010023-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.07.2021. После доработки 10.11.2021. Принята к публикации 12.11.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Особенности побегообразования в популяциях *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) под влиянием экологических факторов и паспортизация с помощью ISSR-маркеров

О.В. Дорогина^{1,3}✉, Н.С. Нуждина¹, Г.А. Зуева¹, Ю.А. Гисматулина², О.Ю. Васильева¹

¹ Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ olga-dorogina@yandex.ru

Аннотация. Уникальным примером травянистых растений, характеризующихся высокими значениями нарастания надземной вегетативной массы и практическим применением в качестве источника альтернативной энергии, является родовой комплекс *Miscanthus* Anderss. (Poaceae). Мискантус относится к числу наиболее эффективных аккумуляторов солнечной энергии, и поскольку фитомелиоративное использование подразумевает выращивание этих ресурсных видов на неудобьях и полутенистых участках, то встает вопрос о влиянии недостаточного освещения на показатели продуктивности мискантуса. В результате длительной интродукции в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН создана перспективная для условий лесостепи Западной Сибири популяция *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Benth. Целью данного исследования было изучение особенностей побегообразования, оценка целлюлозы и лигнина в популяциях *M. sacchariflorus* при различных условиях освещенности и паспортизация перспективной популяции с помощью ISSR-маркеров. Оценка побегообразования и количества накапливаемой целлюлозы и лигнина у растений проводилась в зависимости от освещенности (один вариант выращивался на солнечном участке, а другой – в полутени). В результате дисперсионного анализа установлено, что число побегов зависит не от экологических условий, а от возраста растения, в то время как на высоту растений существенно воздействуют экологические условия. Несмотря на то что для образцов обоих вариантов *M. sacchariflorus* была характерна различная скорость создания сплошного проективного покрытия, растения на полутенистых участках образовывали до 89.34 % побегов в сравнении с растениями на освещенных участках, что не оказывало существенного влияния на величину надземной массы и содержание в ней целлюлозы. В результате электрофореза геномной ДНК в популяции *M. sacchariflorus* при амплификации с пятью ISSR-праймерами выявлены уникальные молекулярные полиморфные фрагменты, которые были применены для идентификации и паспортизации данной популяции. Таким образом, комплексное использование *M. sacchariflorus* в качестве средоулучшающей и биоэнергетической культуры обусловлено высоким адаптивным потенциалом вида. Обнаружено, что фактор освещенности практически не влияет на количество целлюлозы в стебле, а пониженное содержание технологически нежелательного компонента, лигнина, отмечено при выращивании в условиях полутени. Ключевые слова: род *Miscanthus*; биоэнергетика; целлюлоза; лигнин; побегообразование; паспортизация; ISSR-маркеры.

Для цитирования: Дорогина О.В., Нуждина Н.С., Зуева Г.А., Гисматулина Ю.А., Васильева О.Ю. Особенности побегообразования в популяциях *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) под влиянием экологических факторов и паспортизация с помощью ISSR-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):22-29. DOI 10.18699/VJGB-22-04

Specific shoot formation in *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) under different environmental factors and DNA passportization using ISSR markers

O.V. Dorogina^{1,3}✉, N.S. Nuzhdina¹, G.A. Zueva¹, Yu.A. Gismatulina², O.Yu. Vasilyeva¹

¹ Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Biysk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ olga-dorogina@yandex.ru

Abstract. The generic complex *Miscanthus* Anderss. (Poaceae) is a unique example among herbaceous plants characterized by high values of growth of aboveground vegetative mass and practical use as a valuable source of alternative energy. *Miscanthus* is one of the most efficient solar energy accumulators, and since phytomeliorative use implies the cultivation of these resource plants in inconvenient and semi-shady areas, the question about the effect of insufficient

lighting on the productivity of *Miscanthus* arises. As a result of a long-lasting introduction effort, the Central Siberian Botanical Garden SB RAS created a population of *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Benth., which has good prospects for growing under the conditions of the forest-steppe area in Western Siberia. The goals of our study were: (1) to determine the peculiarities of shoot formation, (2) to assess the cellulose and lignin accumulation in *M. sacchariflorus* populations under different lighting conditions and (3) to perform a DNA passportization of the *Miscanthus* population by ISSR marking. Evaluation of shoot formation and the amount of accumulated cellulose and lignin in plants was carried out under different degrees of illumination: one variant was grown in a sunny area, and the other, in partial shade. As a result of analysis of variance, it was found that the number of shoots does not depend on environmental conditions, but on the age of the plant, while environmental conditions have a significant effect on plant height. Although the samples of both *M. sacchariflorus* variants were characterized by different rates of creation of a continuous projective cover, plants in semi-shaded areas formed up to 89.34 % of shoots compared to their peers in illuminated areas, which did not affect significantly the size of the aboveground mass and the cellulose content in it. As a result of ISSR-analysis of genomic DNA in the *M. sacchariflorus* population, unique molecular polymorphic fragments were identified, which can be used for identification and DNA passportization at the inter-population level. Thus, the complex use of *M. sacchariflorus* as a valuable meliorative and bioenergetic culture is due to the high adaptive potential of this species. It was found that the illumination factor has virtually no effect on the amount of the cellulose content in the shoot, and a reduced content of the technologically undesirable lignin was observed in plants growing in the partial shade conditions. Key words: *Miscanthus*; bioenergy; cellulose; lignin; shoot formation; DNA passportization; ISSR markers.

For citation: Dorogina O.V., Nuzhdina N.S., Zueva G.A., Gismatulina Yu.A., Vasilyeva O.Yu. Specific shoot formation in *Miscanthus sacchariflorus* (Poaceae) under different environmental factors and DNA passportization using ISSR markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):22-29. DOI 10.18699/VJGB-22-04

Введение

За последние два десятилетия виды рода *Miscanthus* вошли в число растительных объектов, считающихся практически неисчерпаемыми источниками возобновляемого сырья для получения глюкозы, которая является базовым продуктом для многих разработок в области альтернативной энергетики (Слынько и др., 2013). Мискантус относится к числу наиболее эффективных аккумуляторов солнечной энергии на планете (Dohleman, Long, 2009). Согласно исследованиям физиологов, виды *Miscanthus* обладают высокой потенциальной продуктивностью. Получение до 40 тонн сухой биомассы с гектара связывают с характерным для всех представителей данного рода C₄-типом фотосинтеза. В отличие от большинства традиционно культивируемых C₄-растений, таких как сахарный тростник и кукуруза, мискантусы способны поддерживать высокую интенсивность фотосинтеза даже в условиях сравнительно пониженных температур (Naidu et al., 2003; Анисимов и др., 2016). Этим объясняется высокая продуктивность веерников, выращиваемых в более суровых, чем естественные, климатических условиях лесостепи Западной Сибири в качестве технической (биоэнергетической) культуры. Фитомелиоративное использование подразумевает выращивание ресурсных видов на неудобьях и полутенистых участках. В частности, это относится и к растениям *M. sacchariflorus*, для осуществления фотосинтеза которых требуется значительный приток фотосинтетически активной радиации. Литературных сведений по этому вопросу, относящихся к *M. sacchariflorus*, практически нет.

В настоящее время проблема генетической идентификации дикорастущих видов и популяций растений чрезвычайно актуальна и находится на начальном этапе развития, а для регистрации и сертификации новых сортов важным этапом считается генетическая паспортизация (Калаев и др., 2012). Основой системы маркирования отборных форм или сортов с целью генетической паспортизации является получение генетически детерминированных ха-

рактеристик с помощью молекулярных маркеров. В качестве таких маркеров могут использоваться белки, в частности запасные белки, изоферменты или локусы ДНК (ДНК-маркеры) (Naeem, 2014; Челюстникова и др., 2019). С помощью ISSR- и IRAP-маркеров проведена паспортизация сортов и гибридов многих сельскохозяйственных культур (Сухарева, Кулуев, 2018), а также молекулярно-генетическая паспортизация редких и нуждающихся в охране травянистых видов растений, разработанная на примере природных популяций двух видов – *Adonis vernalis* и *A. sibirica* (Боронникова, 2009). На основе этой методики получен патент на изобретение «Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений» (Бобошина, Боронникова, 2014). Для аутентификации сырья лекарственных растений по корням или другим фрагментам материала используются ДНК-маркеры и химические характеристики, так как они нетканеспецифичны и обладают высокой разрешающей способностью (Wallinger et al., 2012; Ganica et al., 2015). Литературных данных по паспортизации перспективных популяций или сортов мискантуса нами не обнаружено.

Цель нашего исследования – изучение особенностей побегообразования, оценка целлюлозы и лигнина в популяциях *Miscanthus sacchariflorus* при различных условиях освещенности и паспортизация популяции с помощью ISSR-маркеров.

Материалы и методы

Экспериментальные участки Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (ЦСБС СО РАН) расположены в лесостепи Западной Сибири, в Новосибирской области, которая относится к IV световой зоне и по общему числу часов солнечного сияния приближается к Краснодару и Ялте. Объектом исследования явилась отборная популяция *M. sacchariflorus*, выявленная по итогам многолетних интродукционных экспериментов, которая была сформирована из материала, собранного в Хасанском районе Приморского края. Одна выборка из этой попу-

Таблица 1. Характеристики ISSR-праймеров, испытанных и выбранных (выделены жирным) для исследования генетического полиморфизма популяции *M. sacchariflorus*

№ п/п	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Температура отжига, °С
1	(CA)₆GT	42
2	(CA)₆GG	42
3	(CA)₆AG	47
4	(CT)₈GC	48
5	(CT)₈TG	51
6	(AC) ₈ YG	55
7	(CT) ₈ AC	48
8	(AC) ₈ CG	47
9	(AG) ₁₀ G	64
10	(CA) ₆ RG	49
11	(CTC) ₃ GC	42
12	(CA) ₆ AC	42
13	(CAC) ₃ GC	41
14	(GACA) ₄	45
15	(GT) ₆ GG	48
16	(GAA) ₆	48

ляции выращивалась в полутени (образец 1), а другая выборка (образец 2) – на открытом, хорошо освещенном месте. Контролем (образец 3) служила интродукционная популяция *M. sacchariflorus*, из которой были сделаны отборы для изучения особенностей побегообразования.

Экспериментальные растения были высажены в 2017 г. на делянки размером 2×2 м в четырехкратной повторности. Образец 1 размещен в полутени (фактор A₀), а образец 2 – на открытом, хорошо освещенном месте (фактор A₁). На делянках в каждую из расположенных в шахматном порядке 16 лунок (4 лун./м²) было высажено по одному ризому (отрезку корневища) с 5 побегами. Таким образом, общее число побегов при посадке составило 20 шт./м². Образец 3 (контроль) представлял сплошную многолетнюю куртину, расположенную на освещенном месте. Осенью, по окончании вегетации провели обрезку растений, оставляя высоту побегов 15 см от уровня почвы.

В дальнейшем по окончании вегетационных периодов проводили учет числа образовавшихся побегов у растений, сформировавшихся из ризомов. В 2018 г. – у растений второго года (фактор B₀), в 2019 г. – у растений третьего года (фактор B₁). Результаты двухфакторного опыта были обработаны методом дисперсионного анализа по Б.А. Доспехову (1985).

Динамику роста и развития побегов *M. sacchariflorus* изучали методом фенологических наблюдений, путем проведения биометрических измерений и подсчетов количества побегов, сформированных за время вегетационного периода, в течение трех лет.

Химический состав изучали в 2019 г. в надземной части мискантуса, срезанной с отступом 10–15 см от земли. Перед выполнением химического анализа сырье было высушено на воздухе до влажности не более 8 % и измельчено до размера 5–10 мм. Измерения проводили стандартными аналитическими методами на оборудовании Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск). Определение массовой доли целлюлозы выполнено с помощью метода Кюршнера (в пересчете на абсолютно сухое сырье – а.с.с.), с учетом массовой доли кислотонерастворимого лигнина (а.с.с.), пентозанов (а.с.с.), зольности (а.с.с.), экстрактивных веществ – жировосковой фракции (ЖВФ) (экстрагент – дихлорметан, а.с.с.), по стандартным методикам анализа растительного сырья (Оболенская и др., 1991).

Экстракцию геномной ДНК из высушенных листьев осуществляли СТАВ-методом (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990). Концентрацию ДНК находили спектрофотометрически с помощью BioSpectrometer kinetic и микрокюветы µCuvette G1.0 (Eppendorf, Германия).

Для молекулярного анализа популяций испытано 16 ISSR-праймеров, из них пять наиболее полиморфных были выбраны для получения молекулярно-генетических формул (табл. 1).

Полимеразную цепную реакцию проводили при следующих условиях: 1) денатурация ДНК: 90 с при 94 °С; 2) 35 циклов амплификации: 40 с при 94 °С, 45 с при 41–56 °С (отжиг праймера) и 90 с при 72 °С; 3) элонгация цепи: 5 мин при 72 °С. ПЦР-смесь объемом 25 мкл состояла из 2.7 mM MgCl₂, 1.25 mM праймера, 0.4 mM dNTPs, 2.5 мкл 10× PCR-буфера, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы и 20 нг геномной ДНК. ПЦР выполняли на амплификаторе Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad, США). Продукты реакции разделяли в 1 % агарозном геле. Амплифицированные фрагменты окрашивались SYBR-Green (ThermoFischer Scientific). Визуализацию и видеофиксацию полученных ПЦР-фрагментов осуществляли с помощью системы геледокументирования Gel-Doc XR+ и программного обеспечения ImageLab Software Imaging System (Bio-Rad).

Молекулярно-генетические формулы для паспортизации популяции *M. sacchariflorus* были составлены по принципу, предложенному А.А. Новиковой с соавторами (Новикова и др., 2012).

Статистический анализ проводился в программе MS Excel.

Результаты

В условиях эксперимента у растений *M. sacchariflorus* в третьей декаде мая – первой декаде июня 2018 г. отмечалось отрастание и дальнейшее развитие, но активного наращивания вегетативной массы не наблюдалось, так как температура воздуха в третьей декаде мая не превышала 9.6 °С (рис. 1). Начиная со второй декады июня, с повышением температуры, растения наращивали число побегов за счет активного кущения, и происходил их интенсивный рост.

Благоприятным для веерников с метеорологической точки зрения оказался 2019 г. Среднемесячная температура мая составила 10.8 °С, что способствовало активно-

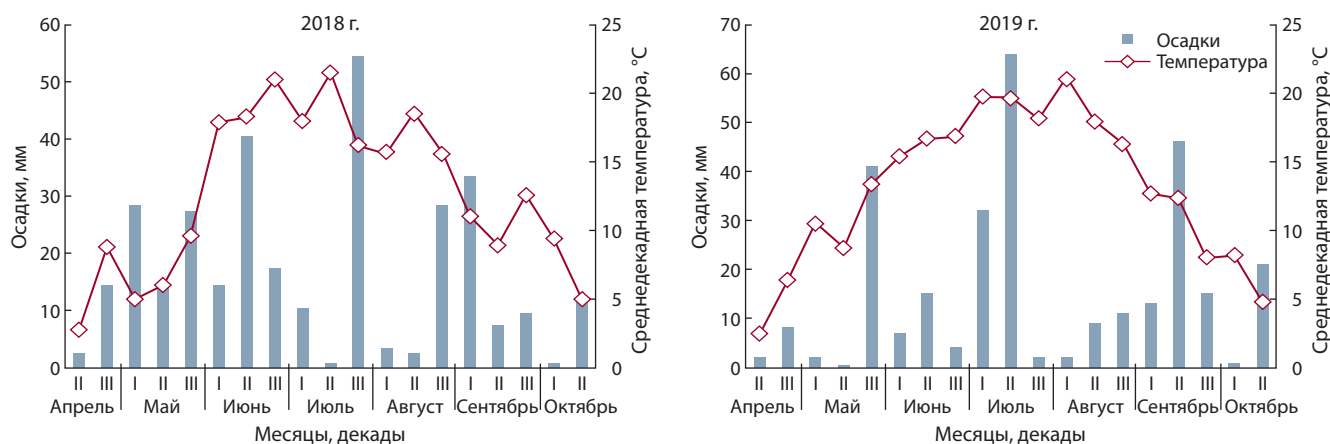


Рис. 1. Гидротермические условия вегетационных периодов 2018 и 2019 гг.

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа двухфакторного опыта по изучению влияния на число побегов *M. sacchariflorus* экологических условий и возраста ризомов

Освещенность участка (A)	Возраст ризомов (B)	Число побегов, повторности			
		I	II	III	IV
A ₀	B ₀	8.3	12.0	8.0	8.8
	B ₁	22.8	26.0	27.5	32.0
A ₁	B ₀	6.8	8.3	15.0	14.3
	B ₁	20.5	29.3	28.3	56.3
Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт}	F _{0.5}
Общая	2555.3	15	—	—	—
Освещенности участка A	69.7	1	69.7	1.0	4.75
Возраста ризомов B	1624.1	1	1624.1	22.7	4.75
Взаимодействия AB	4.1	1	4.1	0.1	4.75
Остаток (ошибки)	857.4	12	71.5	—	—

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа двухфакторного опыта по изучению влияния на высоту растений *M. sacchariflorus* экологических условий и возраста ризомов

Освещенность участка (A)	Возраст ризомов (B)	Высота растений, повторности			
		I	II	III	IV
A ₀	B ₀	96.5	116.0	107.8	136.3
	B ₁	115.5	140.3	172.3	175.0
A ₁	B ₀	112.3	138.5	129.5	130.3
	B ₁	139.0	166.3	182.0	190.8
Дисперсия	Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F _{факт}	F _{0.5}
Общая	12394.4	15	—	—	—
Освещенности участка A	6162.2	1	6162.2	14.3	4.75
Возраста ризомов B	1040.1	1	1040.1	2.4	4.75
Взаимодействия AB	27.6	1	27.6	0.1	4.75
Остаток (ошибки)	5164.5	12	430.4	—	—

му отрастанию. Далее у растений с хорошо развитой и успешно перезимовавшей подземной побеговой системой формировалась надземная часть, напоминающая явнополицентрическую биоморфу: на плагитропных побегах этого вида образуются диаспоры, в момент появления собственной корневой системы они закрепляются, сохраняя связь с материнской особью.

В июне температура медленно, без перепадов, повышалась (см. рис. 1). Процесс кушения происходил с июля (особенно в период максимального выпадения осадков) до начала августа. Растения во всех вариантах сформировали за вегетационный период большее число побегов по сравнению с 2018 г. Во второй половине августа активность процесса кушения изменилась в связи с понижением температуры и влажности ниже нормы (22 мм осадков, или 33 % от нормы). Растения в таких условиях переходят к генеративному развитию. В это время наблюдается активное удлинение побегов за счет вытягивания полого

цветоноса, образование верхнего «флагового» листа и появление соцветий – метелок; соответственно, сокращается нарастание вегетативной массы побегов.

Для выявления влияния на побегообразование *M. sacchariflorus* экологических условий и возраста растений в 2018 и 2019 гг. был проведен дисперсионный анализ двухфакторного опыта (табл. 2 и 3). На число образовавшихся побегов существенно влияет фактор возраста ризомов (B), а экологические условия (A) и взаимодействие факторов (AB) – незначительно (см. табл. 2). На высоту растений существенное влияние оказывает фактор экологических условий (A), тогда как возраст ризомов (B) и взаимодействие факторов (AB) влияют незначительно (см. табл. 3).

Таким образом, в результате дисперсионного анализа (см. табл. 2, при F = 0.5) обнаружено, что число побегов сильно зависит от фактора возраста ризомов (B 22.7 > 4.75), но не от экологических условий, а высота

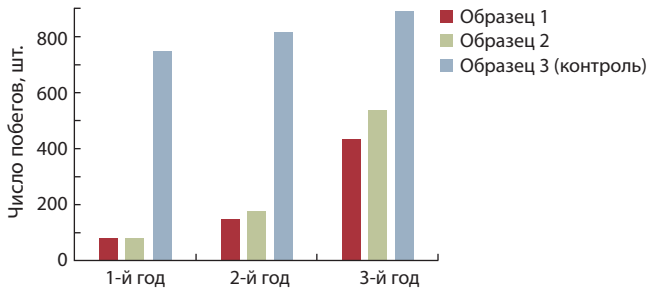


Рис. 2. Особенности побегообразования образцов *M. sacchariflorus* в различных экологических условиях.

Образец 1 – полутенистый участок; образец 2 – открытый участок; образец 3 (контроль) – многолетние посадки, куртина.

растений в большей степени зависит от экологических условий ($A_{14.3} > 4.75$), но не от возраста (см. табл. 3).

Контрольный образец представлял сплошную многолетнюю куртину, расположенную на освещенном месте. У контрольных растений, ранее сформировавших плотную куртину, отмечалось незначительное увеличение числа побегов (рис. 2). У молодых растений, изначально представленных ризомами, напротив, наблюдалось интенсивное побегообразование на второй и третий годы жизни. Растения *M. sacchariflorus* на полутенистых участках уже на второй год жизни образовывали до 89.34 % побегов в сравнении с освещенными участками (см. рис. 2).

Однако образец 1, произрастающий в тени, по количеству побегов на второй (148) и третий (433) годы жизни отстает от образца 2 (177 и 537 побегов соответственно). Более высокая освещенность стимулирует кущение у растений образца 2, что приводит к быстрому смыканию отдельно высаженных растений.

Менее интенсивное кущение наблюдалось у образца 1 в полутени, но и в этом случае проективное покрытие на третий год жизни оказалось достаточно высоким – от 65 до 75 %. Образец 3 произрастает на одном месте более 15 лет. Отмечено, что растения ежегодно активно растут и развиваются, деградации не наблюдается. Проективное покрытие составило более 70 %. Однако возможности интенсивного побегообразования практически исчерпаны, поэтому в 2019 г. увеличение числа побегов по сравнению с 2018 г. составило лишь 9.06 % (816 и 890 шт.), тогда как у образца 1 на полутенистом участке – 192.57 % (148 и 433 шт.), а у образца 2 на освещенном участке – 203.40 % (177 и 537 шт.).

Химический анализ этих трех образцов, выполненный на материале *M. sacchariflorus* 2019 г. отдельно на стеблях (поскольку целлюлоза стебеля ценится выше) и листьях, показал, что содержание целлюлозы в полутени (50.9 %) выше, чем на освещенном участке (50.1 %), а пониженное (на 12 %) содержание технологически нежелательного компонента (лигнина) отмечено на наименее хозяйственно ценном полутенистом участке (табл. 4). Это связано с тем, что дифференциация тканей побегов, включая одревеснение, более интенсивно происходит в условиях достаточной освещенности.

Массовая доля целлюлозы в листе независимо от условий освещенности (40.2 % в полутени и 42.2 % на открытом участке) значительно ниже, чем в стебле, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами (Гисматулина и др., 2019). Аналогично стеблю, массовая доля лигнина в листе на 7.6 % ниже в полутени, чем на открытом участке. Массовые доли пентозанов, ЖВФ и золы находятся примерно на одном уровне как в стебле, так и в листе, независимо от условий освещенности плантации.

Таблица 4. Химический состав трех образцов *M. sacchariflorus* 2019 г.

Химико-технологический показатель	Образец 1, полутенистый участок	Образец 2, открытый участок	Образец 3 (контроль), многолетние посадки
Стебель			
Масса, г	339	295	294
Влажность, %	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.1
Зола, %	1.91 ± 0.05	1.60 ± 0.05	1.48 ± 0.05
Лигнин, %	18.7 ± 0.1	21.3 ± 0.1	25.5 ± 0.1
Целлюлоза по Кюршнеру, %	50.9 ± 0.1	50.1 ± 0.1	52.0 ± 0.1
Пентозаны, %	23.2 ± 0.1	23.9 ± 0.1	22.1 ± 0.1
ЖВФ, %	0.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Лист			
Масса, г	180	134	134
Влажность, %	9.3 ± 0.1	7.5 ± 0.1	7.5 ± 0.1
Зола, %	4.74 ± 0.05	4.83 ± 0.05	4.83 ± 0.05
Лигнин, %	20.1 ± 0.1	21.7 ± 0.1	21.7 ± 0.1
Целлюлоза по Кюршнеру, %	40.2 ± 0.1	42.2 ± 0.1	42.2 ± 0.1
Пентозаны, %	23.8 ± 0.1	23.3 ± 0.1	23.3 ± 0.1
ЖВФ, %	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1

Примечание. ЖВФ – жировосковая фракция; полуширина доверительного интервала определена при уровне значимости 0.05.

В результате электрофореза ПЦР-продуктов геномной ДНК в популяции *M. sacchariflorus*, полученных при амплификации с пятью выбранными ISSR-праймерами, был обнаружен высокий генетический полиморфизм исследуемых объектов (рис. 3).

Для каждой популяции, в зависимости от использованного праймера, было выявлено от одного до четырех эффективных стабильных молекулярных маркеров – уникальных ПЦР-фрагментов, отсутствующих у остальных популяций (табл. 5). Длина полиморфных фрагментов при ISSR-анализе варьировала от 660 до 2000 п. н. Обнаруженные уникальные молекулярные полиморфные фрагменты, представляющие собой последовательности определенной длины, были выбраны для паспортизации популяции *M. sacchariflorus*.

Таким образом, принимая во внимание генетическую формулу, предложенную для *Rhododendron canadense* (Новикова и др., 2012), генетическая формула для популяции *M. sacchariflorus* будет выглядеть следующим образом: ISSR/(CA)₆AG-925,980/(CT)₈GC-600,690,780,940/(CT)₈TG-1060/(CT)₈AC-690,800,1030,1390/(AC)₈YG-650,975,1470,2000.

Обсуждение

Изучение особенностей побегообразования *M. sacchariflorus*, интродуцированного в ЦСБС СО РАН в условиях континентального климата Западной Сибири, показало, что для выращивания этого вида в качестве биоэнергетической культуры нежелателен ранний переход растений к генеративному развитию, так как происходит остановка накопления биомассы. Установлено, что у данного злака достаточно длинный период активного роста. При этом следует учесть, что в рост такое растение трогается лишь после того, как воздух прогреется до 25 °С. У экспериментальных растений на третий год жизни проективное покрытие надземной фитомассы в трех повторностях варьировало от 70 до 80 %.

По результатам дисперсионного анализа можно заключить, что число побегов зависит от возраста растений, а влияние на этот показатель экологических условий и взаимодействия факторов незначительно. На высоту растений, напротив, существенное воздействие оказывают экологические условия, а возраст и взаимодействие этих факторов практически не влияют. В связи с этим важным этапом при изучении побегообразования злаков является

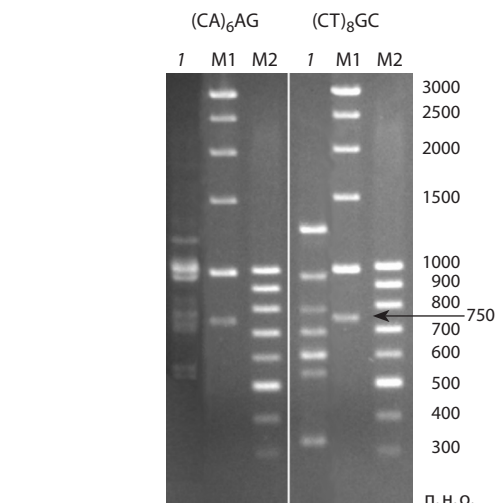


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации популяции мискантуса с двумя ISSR-праймерами: (CA)₆AG и (CT)₈GC.
1 – *M. sacchariflorus* (обр. 1); M1 и M2 – маркеры молекулярного веса.

переход растений к кущению, который исследователи связывают либо с началом роста боковых побегов в зоне укороченных междоузлий (Langer, 1963; Смелов, 1966), либо с началом роста этой зоны (Добрынин, 1969; Горчакова, 2003).

Необходимо также отметить, что массовая доля в стебле технологически значимого компонента – целлюлозы – не изменяется в зависимости от условий освещенности (50.9 % в полутени и 50.1 % на открытом участке). В то же время массовая доля лигнина, отрицательно сказывающегося на технологических процессах, ниже в полутени на 12 %. С увеличением возраста плантаций *M. sinensis* Andersson var. (рассматривался сорт Сорановский) урожайность биомассы возросла с 2.1 до 14.9 т/га, а содержание целлюлозы в биомассе – с 42 до 54 % (Gismatulina, Budaeva, 2017).

Таким образом, в результате многолетних исследований обнаружено, что высокий адаптивный потенциал *M. sacchariflorus*, высокое содержание целлюлозы (52.04 %) при относительно небольшом содержании лигнина (21.3 %) позволяют использовать популяцию этого вида в качестве средоулучшающей и технической биоэнергетической культуры.

Таблица 5. Характеристика ISSR-маркеров, использованных при составлении молекулярно-генетической формулы в популяции *M. sacchariflorus*

Праймер 5'–3'	Количество маркеров*	Длина полиморфных фрагментов, п. н.
(CA) ₆ AG	2/8 (25 %)	(CA) ₆ AG ₉₂₅ , (CA) ₆ AG ₉₈₀
(CT) ₈ GC	4/7 (57 %)	(CT) ₈ GC ₆₀₀ , (CT) ₈ GC ₆₉₀ , (CT) ₈ GC ₇₈₀ , (CT) ₈ GC ₉₄₀
(CT) ₈ TG	1/3 (33 %)	(CT) ₈ TG ₁₀₆₀
(CT) ₈ AC	4/7 (57 %)	(CT) ₈ AC ₆₉₀ , (CT) ₈ AC ₈₀₀ ** , (CT) ₈ AC ₁₀₃₀ , (CT) ₈ AC ₁₃₉₀
(AC) ₈ YG	4/13 (31 %)	(AC) ₈ YG ₆₅₀ , (AC) ₈ YG ₉₇₅ , (AC) ₈ YG ₁₄₇₀ ** , (AC) ₈ YG ₂₀₀₀

* В знаменателе указано общее количество маркеров; в числителе – количество маркеров, уникальных для популяции; в скобках – их процентное соотношение.

** ISSR-маркеры со слабым флуоресцирующим сигналом.

Для генетической паспортизации этой перспективной популяции было выбрано пять ISSR-маркеров. На основании проведенных нами исследований и результатов, представленных другими авторами, можно заключить, что ISSR-праймеры являются полиморфными и могут использоваться для идентификации образцов, популяций, видов, а также для составления генетических формул и паспортов не только рода *Miscanthus*, но и других видов и сортов (Боронникова, 2009; Артюхова и др., 2010; Новикова и др., 2012; Лебедев и др., 2018). И.А. Клименко с коллегами провели идентификацию и паспортизацию сортов клевера с помощью SSR- и SRAP-маркеров и предложили набор ДНК-идентификационных маркеров (Клименко и др., 2020). Данные, полученные с помощью анализа ДНК, наиболее объективны для описания сортов и видов растений, так как в меньшей степени подвержены генотипической изменчивости и в большинстве случаев имеют кодоминантный тип наследования (Рамазанова, Коломыцева, 2020).

Генетический паспорт *M. sacchariflorus*, приведенный нами в виде генетической формулы, составленной на основе амплифицированной ДНК, содержит сведения об использованном методе, праймерах и обнаруженных у изучаемого образца амплифицированных фрагментах ДНК. При необходимости усовершенствования формы записи молекулярно-генетической формулы указывается тип фрагмента (родовой, видовой, полиморфный), как это предложено в работе (Боронникова, 2009). В целом по молекулярно-генетической формуле для популяции *M. sacchariflorus* можно установить принадлежность отдельных особей не только к роду, виду и сорту, но и к определенной популяции.

Заключение

В результате проведенных нами исследований обнаружено, что *M. sacchariflorus* способен успешно произрастать на малоплодородных участках, причем содержание лигнина к моменту заготовки сырья в этих микроэкологических условиях будет пониженным.

Высокое проективное покрытие в различных экологических условиях, а также долговечность клонов указывают на перспективы фитомелиоративного использования отборных форм данного вида в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири. Содержание целлюлозы в стебле – важнейшего компонента при оценке растения в качестве технического сырья, незначительно изменяется в зависимости от условий освещенности, а содержание лигнина, отрицательно влияющего на технологические процессы, оказалось ниже у растений, выращенных в полутени.

На основании полученной молекулярно-генетической формулы для популяции *M. sacchariflorus* возможно усовершенствование формы записи с указанием типа фрагмента, характеризующего принадлежность отдельных особей не только к роду и виду, сортовой популяции и сорту, но и к определенной популяции.

Паспортизация с помощью молекулярно-генетических маркеров перспективных форм мискантуса и разработка научных и практических рекомендаций и комплекса приемов возделывания открывают возможности для исполь-

зования представителей этого рода в селекции в условиях континентального климата Западной Сибири.

Создание сортов путем размножения перспективных форм, представляющих интерес в качестве сырьевых растений, и их молекулярно-генетическая идентификация позволяют рекомендовать представителей рода *Miscanthus* в качестве экологически чистого и возобновляемого растительного сырья, перспективного для реализации программы альтернативной биоэнергетики в Западной Сибири.

Список литературы / References

- Анисимов А.А., Хохлов Н.Ф., Тараканов И.Г. Особенности фотопериодической регуляции онтогенеза у различных видов мискантуса (*Miscanthus* spp.). *Изв. Тимирязев. с.-х. академии*. 2016; 6:56-72.
- [Anisimov A.A., Khokhlov N.F., Tarakanov I.G. Photoperiodic regulation of ontogenesis in different *Miscanthus* species (*Miscanthus* spp.). *Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 2016;6:56-72. (in Russian)]
- Артюхова А.В., Гришин С.Ю., Лукашевич М.И., Заякин В.В., Нам И.Я. Разработка метода паспортизации сортов люпина. *Вестн. Брян. гос. ун-та*. 2010;4:81-84.
- [Artyukhova A.V., Grishin S.Yu., Lukashovich M.I., Zayakin V.V., Nam I.Ya. Development of a method for Lupinus variety certification. *Vestnik Bryanskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Herald of the Bryansk State University*. 2010;4:81-84. (in Russian)]
- Бобошина И.В., Боронникова С.В. Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений. Пат. на изобр. RU 2505956 C2. Опубл. 10.02.2014. Бюл. № 4.
- [Boboshina I.V., Boronnikova S.V. Method of molecular-genetic identification of woody plant species populations. Patent for invention RU 2505956 C2. Publ. 10.02.2014. Bull. 4. (in Russian)]
- Боронникова С.В. Генетическая паспортизация популяций редких видов растений рода *Adonis* с использованием ISSR- и IRAP-маркеров. *Изв. Тимирязев. с.-х. академии*. 2009;1:82-88.
- [Boronnikova S.V. Genetic certification of populations of rare *Adonis* species using ISSR and IRAP markers. *Izvestiya Timiryazevskoy Selskokhozyaystvennoy Akademii = Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy*. 2009;1:82-88. (in Russian)]
- Гисматулина Ю.А., Будаева В.В., Сакович Г.В., Васильева О.Ю., Зуева Г.А., Гусар А.С., Дорогина О.В. Особенности ресурсного вида *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. при интродукции в Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(7):933-940. DOI 10.18699/VJ19.569.
- [Gismatulina Yu.A., Budaeva V.V., Sakovich G.V., Vasilyeva O.Yu., Zueva G.A., Gusar A.S., Dorogina O.V. Features of the resource species *Miscanthus sacchariflorus* (Maxim.) Hack. when introduced in West Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7):933-940. DOI 10.18699/VJ19.569.]
- Горчакова А.Ю. Новое о ветвлении злаков. *Бюл. Бот. сада Кубанского гос. агр. ун-та*. 2003;21:39-40.
- [Gorchakova A.Yu. New about the branching of cereals. *Bulleten Botanicheskogo Sada Kubanskogo Gosudarstvennogo Agronomicheskogo Universiteta = Bulletin of the Botanical Garden of the Kuban State Agrarian University*. 2003;21:39-40 (in Russian)]
- Добрынин Г.М. Рост и формирование хлебных и кормовых злаков. Л.: Колос, 1969.
- [Dobrynin G.M. Growth and Formation of Bread and Fodder Cereals. Leningrad: Kolos Publ., 1969. (in Russian)]
- Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. М.: Агропромиздат, 1985.
- [Dospikhov B.A. Methodology of Field Experiments with the Fundamentals of Statistical Processing of Results, 5th revised edition. Moscow: Agropromizdat Publ., 1985. (in Russian)]

- Калаев В.Н., Землянухина О.А., Карпеченко И.Ю., Карпеченко К.А., Кондратьева А.М., Вепринцев В.Н., Карпеченко Н.А., Карпова С.С., Моисеева Е.В., Баранова Т.В. Использование методов молекулярно-генетического анализа для изучения полиморфизма ДНК растений рода *Rhododendron* с целью их паспортизации. *Фундам. исследования*. 2012;6(2):323-328. [Kalayev V.N., Zemlyanukhina O.A., Karpechenko I.Yu., Karpechenko K.A., Kondratyeva A.M., Veprintsev V.N., Karpechenko N.A., Karpova S.S., Moiseeva E.V., Baranova T.V. The use of molecular genetic analysis methods to study DNA polymorphism in plants of the genus *Rhododendron* for the purpose of their certification. *Fundamentalnye Issledovaniya = Fundamental Research*. 2012;6(2):323-328. (in Russian)]
- Клименко И.А., Козлов Н.Н., Костенко С.И., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав на основе ДНК-маркеров: Метод. рекомендации. М.: Угрешат, 2020. [Klimenko I.A., Kozlov N.N., Kostenko S.I., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Identification and Certification of Forage Grass Varieties Based on DNA Markers: Recommended Practice. Moscow: Ugreshat Publ., 2020. (in Russian)]
- Лебедев В.Г., Субботина Н.М., Киркач В.В., Видягина Е.О., Позднякова И.А., Шестибратов К.А. Анализ микросателлитных локусов как первый этап на пути к маркерной селекции малины и земляники. *Селекция и сорторазведение садовых культур*. 2018; 5(1):65-68. [Lebedev V.G., Subbotina N.M., Kirkach V.V., Vidyagina E.O., Pozdnyakova I.A., Shestibratov K.A. Analysis of microsatellite loci as the first step in the marker-assisted selection of raspberry and strawberry. *Seleksiya i Sortorazvedenie Sadovykh Kultur = Breeding and Variety Cultivation of Horticultural Crops*. 2018;5(1):65-68. (in Russian)]
- Новикова А.А., Шейкина О.В., Новиков П.С., Доронина Г.У. Оценка возможности применения ISSR-маркеров для систематизации и генетической паспортизации растений рода *Rhododendron*. *Политемат. сетевой электрон. науч. журн. Кубанского гос. аграр. ун-та*. 2012;82:79-89. [Novikova A.A., Sheikina O.V., Novikov P.S., Doronina G.U. Assessment of the possibility of using ISSR markers for the systematization and genetic certification of plants of the genus *Rhododendron*. *Politematicheskij Setevoy Elektronny Nauchny Zhurnal Kubanskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Polythematic Scientific Online Journal of the Kuban State Agrarian University*. 2012;82:79-89. (in Russian)]
- Оболеская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: Учеб. пособие для вузов. М.: Экология, 1991. [Obolenskaya A.V., Elnitskaya Z.P., Leonovich A.A. Laboratory Work on the Chemistry of Wood and Cellulose: Textbook for universities. Moscow: Ecology Publ., 1991. (in Russian)]
- Рамазанова, Коломыцева А.С. Оптимизация технологии генотипирования сои на основе анализа полиморфизма SSR-локусов ДНК. *Масличные культуры*. 2020;1:42-48. [Ramazanova S.A., Kolomytseva A.S. Optimization of soybean genotyping process using analysis of a polymorphism of SSR-loci in DNA. *Maslichnye Kultury = Oil Crops*. 2020;1:42-48. (in Russian)]
- Слынько Н.М., Горячковская Т.Н., Шеховцов С.В., Банникова С.В., Бурмакина Н.В., Старостин К.В., Розанов А.С., Нечипоренко Н.Н., Вепрев С.Г., Шумный В.К., Колчанов Н.А., Пельтек С.Е. Биотехнологический потенциал новой технической культуры – Мискантус сорт Сорановский. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/1):765-771. [Slyn'ko N.M., Goryachkovskaya T.N., Shekhovtsov S.V., Bannikova S.V., Burmakina N.V., Starostin K.V., Rozanov A.S., Nechiporenko N.N., Veprev S.G., Shumny V.K., Kolchanov N.A., Pel'tek S.E. The biotechnological potential of the new crops, *Miscanthus* cv. Soranovskii. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/1):765-771. (in Russian)]
- Смелов С.П. Теоретические основы луговодства. М.: Колос, 1966. [Smelov S.P. Theoretical Foundations of Meadow Farming. Moscow: Kolos Publ., 1966. (in Russian)]
- Сухарева А.С., Кулуев Б.Р. ДНК маркеры для генетического анализа сортов культурных растений. *Биомика*. 2018;10(1):69-84. DOI 10.31301/2221-6197.bmc.2018-15. [Sukhareva A.S., Kuluev B.R. DNA markers for genetic analysis of crops. *Biomika = Biomics*. 2018;10(1):69-84. DOI 10.31301/2221-6197.bmc.2018-15. (in Russian)]
- Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Антонова Т.С. Микросателлитные локусы для идентификации сортов льна масличного селекции ВНИИМК: подбор информативных праймеров и оптимальных условий ПЦР ДНК. *Масличные культуры*. 2019;2:41-46. [Chelyustnikova T.A., Guchetl S.Z., Antonova T.S. Microsatellite loci for identification of oil flax varieties of the breeding of V.S. Pustovoit All-Russian Research Institute of Oil Crops: selection of informative primers and optimal conditions for DNA PCR. *Maslichnye Kultury = Oil Crops*. 2019;2:41-46. (in Russian)]
- Dohleman F.G., Long S.P. More productive than maize in the midwest: how does *Miscanthus* do it? *Plant. Physiol.* 2009;50(4):2104-2115.
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990;12:13-15.
- Ganiea S.H., Upadhyaya P., Maheshwer S.D., Sharmab P. Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*. 2015;4: 83-99. DOI 10.1016/j.plgene.2015.10.002.
- Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Chemical composition of five *Miscanthus sinensis* harvests and nitric-acid cellulose therefrom. *Ind. Crops Prod*. 2017;109:227-232. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.08.026.
- Langer R.H.M. Tillering in herbage grasses. *Herb. Abstr.* 1963;33(3): 141-148.
- Naem R. Molecular markers in plant genotyping. *J. Bio-Mol. Sci.* 2014;2(3):78-85.
- Naidu S.L., Moose S.P., Al-Shoaibi A.K., Raines C.A., Long S.P. Cold tolerance of C₄ photosynthesis in *Miscanthus × giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C₄ photosynthetic enzymes. *Plant Physiol.* 2003;132:1688-1697. DOI 10.1104/pp.103.021790.
- Wallinger C., Juen A., Staudacher K., Schallhart N., Mitterrutzner E., Steiner E.-M., Thalinger B., Traugott M. Rapid plant identification using species- and group-specific primers targeting chloroplast DNA. *PLoS One*. 2012;7(1):e29473. DOI 10.1371/journal.pone.0029473.

ORCID ID

O.V. Dorogina orcid.org/0000-0001-5729-3594
N.S. Nuzhdina orcid.org/0000-0002-0634-8820

G.A. Zueva orcid.org/0000-0001-7950-054X
Yu.A. Gismatulina orcid.org/0000-0001-5480-7449
O.Yu. Vasilyeva orcid.org/0000-0003-0730-3365

Благодарности. Исследования выполнены по комплексной программе фундаментальных научных исследований СО РАН по проекту «Анализ биоразнообразия, сохранение и восстановление редких и ресурсных видов растений с использованием экспериментальных методов» (номер гос. регистрации АААА-А21-121011290025-2), с использованием материалов биоресурсной научной «Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте» USU 440534 и при финансовой поддержке проекта FSU5-2021-0012 «Экосистемы травяных сосновых и мелколиственных лесов как регуляторы азотного и углеродного баланса в лесостепном ландшафте Западной Сибири».

Исследования по химическому составу выполнены в рамках госзадания ИПХЭТ СО РАН «Фундаментальные основы создания интегрированной технологии переработки легковозобновляемого непищевого растительного сырья в востребованные экономикой РФ продукты».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.04.2021. После доработки 26.07.2021. Принята к публикации 26.07.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Динамические изменения содержания бетанина в столовой свекле в течение вегетационного периода: их взаимодействие с абиотическими факторами

Д.В. Соколова

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
✉ dianasokol@bk.ru

Аннотация. Для производства натурального пищевого красителя красного цвета используется широко распространенная корнеплодная культура – столовая свекла, характеризующаяся лечебными, антиоксидантными свойствами, скороспелостью, длительной сохранностью корнеплодов, высоким содержанием биологически активных веществ, витаминов и минеральных элементов. Актуальность исследования продиктована недостатком знаний о динамических изменениях в содержании бетанина в течение вегетации при создании сортов свеклы, ориентированных на получение красителя. В работе приведены результаты изучения 29 красноокрашенных образцов коллекции столовой свеклы Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова. Наблюдение за динамическими изменениями содержания пигмента в процессе вегетации выполнено на двух образцах свеклы: 'Русская односемянная' и 'Бордо односемянная'. Приведены результаты тестирования четырех вариантов pH буферного раствора. Рекомендован буферный раствор с pH 6.5. В результате исследования определена амплитуда изменчивости содержания бетанина в кожице (39.9–239.2 мг/100 г) и мякоти (14.4–127.5 мг/100 г) корнеплодов столовой свеклы. Подтверждено, что содержание бетанина в кожице у всех образцов превышало его содержание в мякоти. Выявлена положительная взаимосвязь этих показателей ($r = 0.74, p \leq 0.05$). Установлено, что в процессе вегетации значимой аккумуляции бетанина в корнеплодах не происходит. Показаны значительные колебания пигмента, сопряженные с абиотическими факторами среды. Определены корреляционные связи между температурой воздуха и бетанином в мякоти корнеплода ($r = 0.32-0.31, p \leq 0.05$). Отрицательный эффект температуры среды на бетанин в кожице проявлялся на третьи сутки ($r = -0.34...-0.35, p \leq 0.05$). Негативная реакция на осадки была менее выражена у сорта 'Бордо односемянная', благодаря более активному метаболизму и пластичности генотипа. Описаны морфологические особенности строения фотосинтетического аппарата опытных образцов, отмечены взаимосвязи с изучаемым признаком. Даны рекомендации по выбору схемы посадки и сроков уборки урожая столовой свеклы для выделения красителя.

Ключевые слова: бетанин; натуральный пищевой краситель; динамика; кожица; мякоть; *Beta vulgaris* L.; факторы среды.

Для цитирования: Соколова Д.В. Динамические изменения содержания бетанина в столовой свекле в течение вегетационного периода: их взаимодействие с абиотическими факторами. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):30-39. DOI 10.18699/VJGB-22-05

Dynamic changes in betanin content during the growing season of table beet: their interplay with abiotic factors

D.V. Sokolova

Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
✉ dianasokol@bk.ru

Abstract. The table beet, a widespread edible root crop known for its medicinal and antioxidant properties, early maturation, good shelf life, and high contents of bioactive compounds, vitamins and minerals, is used for the production of a natural red food dye. The relevance of this study is dictated by the lack of knowledge about the dynamic changes in the content of betanin during the growing season when developing table beet cultivars with a focus on pigment extraction. The article presents the results of a study of 29 red-colored table beet accessions from the collection of the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR). Dynamic changes in the content of the pigment during the growing season were observed on two beet accessions, cvs. 'Russkaya odnosemyannaya' and 'Bordo odnosemyannaya'. Four pH versions of the buffer solution were tested, and the test results are presented. A buffer solution with pH 6.5 is recommended for research purposes. The amplitude of variability in the content of betanin in the peel (39.9–239.2 mg/100 g) and flesh (14.4–127.5 mg/100 g) of beets was determined. It was confirmed that the content of betanin in the peel exceeded that in the flesh in all samples. A positive relationship between these indicators was revealed ($r = 0.74, p \leq 0.05$). It was found that betanin accumulation did not occur in beet roots during the growing

season. The pigment showed considerable fluctuations associated with abiotic environmental factors. Correlation analysis showed a significant positive relationship between air temperature and betanin content in the root flesh ($r = 0.32-0.31, p \leq 0.05$). A negative impact of environmental temperature on betanin content in the peel manifested itself on the third day ($r = -0.34 \dots -0.35, p \leq 0.05$). The negative response to precipitation was less expressed in cv. 'Bordo odnosemyannaya' due to the genotype's more active metabolism and plasticity. Structural morphological features of the photosynthetic apparatus were described for the tested accessions, and their interrelations with the studied character were specified. Recommendations are given concerning the choice of a planting pattern and the timing of table beet harvesting for pigment extraction.

Key words: betanin; natural food coloring; dynamics; peel; flesh; *Beta vulgaris* L.; environmental factors.

For citation: Sokolova D.V. Dynamic changes in betanin content during the growing season of table beet: their interplay with abiotic factors. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):30-39. DOI 10.18699/VJGB-22-05

Введение

Используемые в промышленности оттенки красного цвета производятся в основном двумя группами растительных пигментов: антоцианами и беталаинами. Большинство цветковых растений вырабатывает красно-фиолетовые пигменты – антоцианы (Юдина и др., 2021). Исключение составляют представители нескольких семейств порядка *Caryophyllales*, в которых синтезируются беталаины.

Бетанин (бетанидин 5-О-β-глюкозид) – основной пигмент (70–95 %) в группе беталаинов (von Elbe, 2001; Sawicki et al., 2016). Он представляет собой гликозид: его сахарной частью служит глюкоза, а агликоном – бетанидин. Это нетоксичное соединение, проявляющее выраженные противовоспалительные, антиканцерогенные и антиоксидантные свойства, что вызывает интерес к нему не только при производстве продуктов питания, но и в фармацевтической и косметической промышленности (Jiratanan, Liu, 2004; Tesoriere et al., 2004; Stintzing, Carle, 2007). Важное преимущество красителя бетанина над антоцианами – стабильность в диапазоне pH от 3 до 7, что позволяет использовать его для окрашивания продукции как с кислотой, так и с нейтральной средой (Herbach et al., 2006). В то же время значимым недостатком бетанина считается деградация пигмента при нагревании – молекула бетанина в результате декарбоксилирования теряет свои свойства и преобразуется в необетанин (Aztatzi-Ruggerio et al., 2019).

Основными источниками бетанина служат корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *conditiva* Alef.), плоды опунции (*Opuntia vulgaris* Mill.) и красноокрашенные формы амаранта (*Amaranthus* L.) (Cai et al., 1998; Castellanos-Santiago, Yahia, 2008). Главенствующее место занимает культура столовой свеклы, отличающаяся высокой урожайностью (50–60 т/га), экологической пластичностью и высоким выходом бетанина (Stintzing et al., 2000; Sokolova, 2018), что не позволяет конкурировать с ней другим источникам этого пигмента.

Использовать бетанин для колорирования продуктов питания научились еще в начале XX в.: им подкрашивали кондитерские изделия, сухие смеси, молочную и мясную продукцию. Известно применение красителя в виде сокового концентрата и сухого порошка, получаемого методом лиофильного высушивания или распылением (Nemzer et al., 2011). При изучении влияния обработки сырья свеклы на содержание пигмента методика включает обязательную очистку кожицы корнеплода (Azeredo et al., 2009; Burak, Zavaley, 2020), что, безусловно, необходимо для приготовления соков, для детского и диетического питания. Но

при производстве красителя используется бланшировка целых корнеплодов, без удаления кожицы (Фролов, Чижик, 1997).

Считается, что образование и накопление беталаиновых пигментов, в частности бетанина, в растениях столовой свеклы являются динамическим процессом, зависящим как от конкретного генотипа, фазы онтогенеза, так и от различных факторов внешней среды, а также от зрелости корнеплодов, их размеров, агротехники и почвенного плодородия (Мглинец, Осипова, 2010; Vulić et al., 2013). На стабильность беталаина влияют многочисленные внешние и внутренние факторы: температура, кислотность, наличие или отсутствие света, кислорода, ферментов, азота и катионов металлов, степень гликозилирования и ацилирования. Эти результаты в большинстве случаев получены при изучении пигмента, выделенного из зрелых корнеплодов (Saguy et al., 1978; Saguy, 1979; Schliemann, Strack, 1998; Herbach et al., 2006).

Целью нашего исследования было проследить динамические изменения в содержании пигмента в процессе вегетации отдельно в кожице и мякоти корнеплодов столовой свеклы, выявить силу влияния факторов среды.

Материалы и методы

Объектом исследования послужила группа из 29 образцов красноокрашенной столовой свеклы (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva* Alef.) из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). Наблюдение за динамическими изменениями содержания бетанина в процессе вегетации выполнено на двух образцах свеклы – 'Русская односемянная' (к-3698) и 'Бордо односемянная' (к-3151), отмеченных как наиболее перспективные при проведении скрининга и эколого-географического изучения коллекции ВИР в 2008–2018 гг. (Соколова, 2019; Соколова, Соловьева, 2019).

Полевые опыты проводили по единой методике (Изучение..., 1989) в 2020 г. на научно-производственной базе «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (г. Пушкин, Санкт-Петербург, Россия). Почвы в Пушкине преимущественно дерново-подзолистые супесчаные. Образцы выращивали на естественном фоне, без применения удобрений и пестицидов. Площадь учетных делянок 24 м². Посев произведен вручную 28 мая, уборка – 24 сентября. Расстояние между рядами 70 см, в ряду между растениями – 6–8 см.

Наблюдения за погодными условиями вегетационного периода осуществлялись на гидрометеостанции ВИР.

Условия 2020 г. были благоприятны для выращивания столовой свеклы и характеризовались умеренной температурой воздуха в течение всего периода. Сумма активных температур (выше +10 °С) с 20 мая по 24 сентября составила 2009 °С, сумма осадков за тот же период – 290 мм, что на 36 мм ниже среднегодовых значений.

Забор корнеплодов сортов ‘Русская односемянная’ (к-3698) и ‘Бордо односемянная’ (к-3151) на анализ динамических изменений по содержанию пигмента проводили дважды в неделю с 13 июля по 24 сентября 2020 г. Содержание пигмента анализировали, используя отдельно кожицу (срезали ножом 1–2 мм) и мякоть десяти корнеплодов. Все измерения выполнены в течение 3 ч после извлечения корнеплодов из почвы. Сок опытного материала отжимали при помощи соковыжималки Bork JU CUP 21085 WT (Германия) и фильтровали через мембранный фильтр (0.45 мкм). Взвешивали по 1–1.5 г отфильтрованного сока и разбавляли его фосфатным буфером (рН 6.5) до метки 100 мл. Содержание бетанина определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 538 нм. Измерение при 600 нм фиксировали для корректировки на наличие примесей. Пик поглощения при 538 нм отражает структуру и используется для анализа бетанина без выделения конкретных пигментов. Фильтрат из корнеплодов исследовали методом спектрометрии на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония). Концентрацию бетанина (C_B) определяли по Нильсону (Nilsson, 1970) как

$$C_B = \frac{(A_{538} - A_{600}) \times V}{1120 \times m},$$

где A_{538} и A_{600} – оптическая плотность при 538 и 600 нм соответственно; V – коэффициент разбавления; m – масса навески образца, г; 1120 – удельная абсорбция 1 % раствора бетанина в 1 см кювете.

Статистическую обработку данных выполняли в программах Excel и Statistica 8.0. Изменчивость структуры взаимосвязей признаков оценивали с помощью факторного анализа. Факторные нагрузки рассчитывали по методу главных компонент. Значения коэффициента кор-

реляции Пирсона при $r < 0.3$ рассматривались как слабые, $0.3 < r < 0.5$ – умеренные, $0.5 < r < 0.7$ – заметные, $0.7 < r < 0.9$ – сильные, при $r > 0.9$ – как очень сильные.

Результаты и обсуждение

Бетанин имеет максимум светопоглощения в видимой области спектра при длине волны в диапазоне от 535 до 540 нм. Для подбора оптимального рН буферного раствора на примере сорта ‘Русская односемянная’ (к-3698, Россия) были протестированы четыре варианта рН (рис. 1). Наблюдались изменения в спектрах растворов бетанина с одинаковой начальной концентрацией в диапазоне рН 3–7.5. Незначительный гипохромный сдвиг происходил при значениях рН 3 и 7.5. Смещения максимума абсорбции не выявлено. В исследовании использовался фосфатный буферный раствор с рН 6.5.

Фенотипическое многообразие столовой свеклы принято группировать по сортотипам. Такая группировка основана на сходстве морфологических параметров (рис. 2). В данном исследовании изучались образцы шести сорто-типов.

Наибольшей урожайностью отличалась группа образцов сорто типа Кросби (Crosby), характеризующаяся округлой формой корнеплода. Результат испытания 29 красноокрашенных образцов столовой свеклы показал, что на 24 сентября средняя урожайность составила 16.5 кг/10 м² (табл. 1). Показатель урожайности значительно варьировал в зависимости от генотипа конкретного образца ($p < 0.05$). Средняя масса одного корнеплода составила 127.9 г. Варьирование этого показателя внутри каждого сорта незначительное (коэффициент вариации $C_v < 33.3\%$), что свидетельствует о выровненности популяций. Исключение – сорт ‘Русская односемянная’ (к-3698) и местная сортопопуляция из Казахстана (к-3885), у которых коэффициент вариации равен 35.1 и 40.1 % соответственно.

Содержание бетанина на момент уборки значительно различалось и колебалось в широком диапазоне. Среднее значение в кожице составило 116.9 мг/100 г, в мякоти – 58.9 мг/100 г. Прослеживалась зависимость содержания

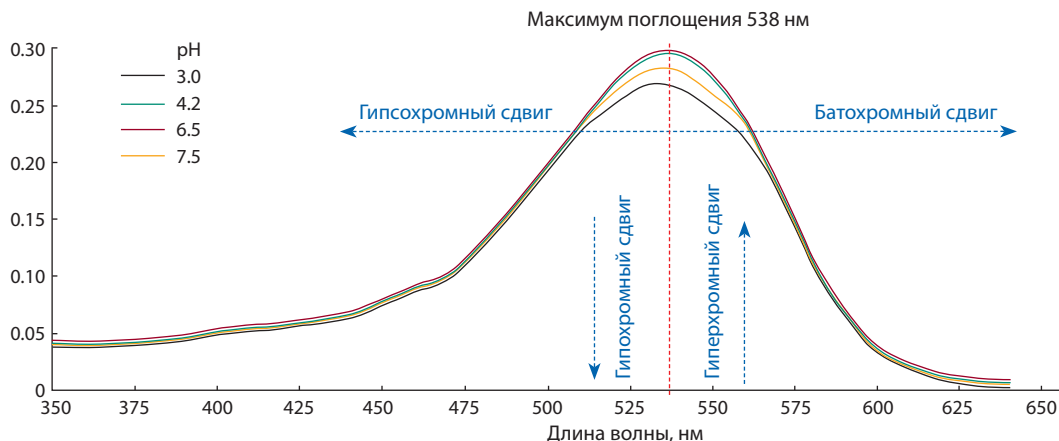


Рис. 1. Спектры растворов бетанинов *Beta vulgaris* L. при различных рН буферного раствора. Сорт ‘Русская односемянная’ (к-3698).

По вертикали дана оптическая плотность растворов.

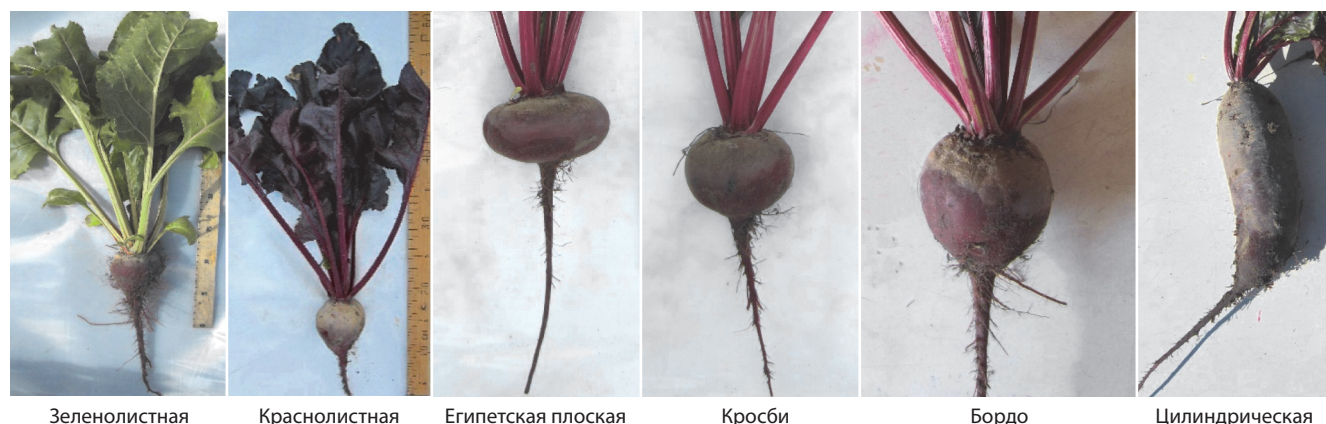


Рис. 2. Типы сортообразцов столовой свеклы в опыте.

Таблица 1. Урожайность и содержание бетаина 29 исследуемых образцов свеклы

Номер каталога ВИР	Название образца	Происхождение	Сортотип	Урожайность, кг/10 м ²	Масса корнеплода, г		Бетанин*, мг/100 г	
					Mean ± SE	Cv, %	Кожица	Мякоть
7	Rouge naine de Dell	Франция	Бордо	11.92	101.0 ± 6.5	17.1	72.20	28.33
10	Rouge ronde precose	»	Кросби	8.14	68.6 ± 4.8	18.6	59.77	14.38
478	Breck's beat's all	США	Кросби	17.46	148.3 ± 7.1	12.6	39.89	19.66
1297	Ранняя круглая	Россия	Бордо	12.27	103.9 ± 5.2	13.1	58.52	25.54
1561	Раннее чудо	»	Кросби	12.63	106.9 ± 5.8	14.5	55.74	26.57
1587	Crosby Egyptian	США	Египетская плоская	36.82	312.4 ± 17.2	14.6	191.93	44.23
1671	Донская плоская 367	Россия	Египетская плоская	7.43	62.7 ± 6.8	28.7	69.44	59.12
1757	Detroit dark red improved	Франция	Кросби	14.28	120.7 ± 7.1	15.5	107.22	87.42
1937	Burpee's Red Ball	США	Кросби	16.17	137.4 ± 3.4	6.5	154.66	54.41
1938	Forma nova	»	Цилиндрическая	10.62	90.3 ± 8.7	25.4	102.10	46.01
2040	Avonearly	Италия	Кросби	12.74	108.1 ± 5.4	13.3	142.45	77.17
2227	Vitenu Bordo	Литва	Кросби	10.03	84.6 ± 5.3	16.5	122.77	74.63
2237	Славянка	Россия	Кросби	10.74	90.9 ± 3.8	11.1	60.24	20.47
3012	Uniball	Нидерланды	Египетская плоская	4.37	37.4 ± 4.0	28.3	43.72	19.15
3110	Regala	»	Кросби	11.92	100.7 ± 5.2	13.7	133.63	69.86
3119	84/49	Россия	Бордо	8.40	69.9 ± 4.0	15.0	101.39	78.66
3151	Бордо односемянная	»	Кросби	31.20	264.6 ± 14.1	14.1	239.20	89.69
3595	Green top	Канада	Зеленолистная	13.72	98.3 ± 9.5	25.6	120.30	36.45
3600	Dwergina	Нидерланды	Кросби	27.86	198.7 ± 8.5	11.3	163.11	65.30
3627	Detroit Dark Red Morse	Мексика	Бордо	7.00	50.1 ± 3.2	17.1	67.92	55.93
3698	Русская односемянная	Россия	Кросби	28.90	133.4 ± 17.7	35.1	225.57	110.35
3718	Baby Beat	Нидерланды	Кросби	15.41	115.0 ± 4.6	10.7	157.02	75.39
3720	Zerro	»	Кросби	23.45	174.9 ± 9.8	14.8	171.25	84.05
3721	Bulls Blood	»	Краснолистная	12.60	94.3 ± 7.7	21.5	73.96	44.56
3762	Bridzhit F1	»	Кросби	24.66	184.1 ± 13.4	19.3	86.53	58.57
3806	Креолка	Россия	Кросби	23.85	178.4 ± 6.9	10.2	130.29	47.74
3879	Manolo F1	Нидерланды	Кросби	38.86	289.7 ± 13.5	12.3	86.62	48.06
3885	Свекла местная	Казахстан	Египетская плоская	7.64	57.0 ± 8.6	40.1	174.62	127.54
3887	Свекла бордовая	»	Кросби	16.88	126.0 ± 7.7	16.1	177.09	106.46
Mean ± SE				16.5 ± 1.7	127.9 ± 12.8		116.9 ± 10.7	58.9 ± 5.5
НСР ₀₅				6.65			25.0	

* Значение получено с 10 корнеплодов каждого образца.

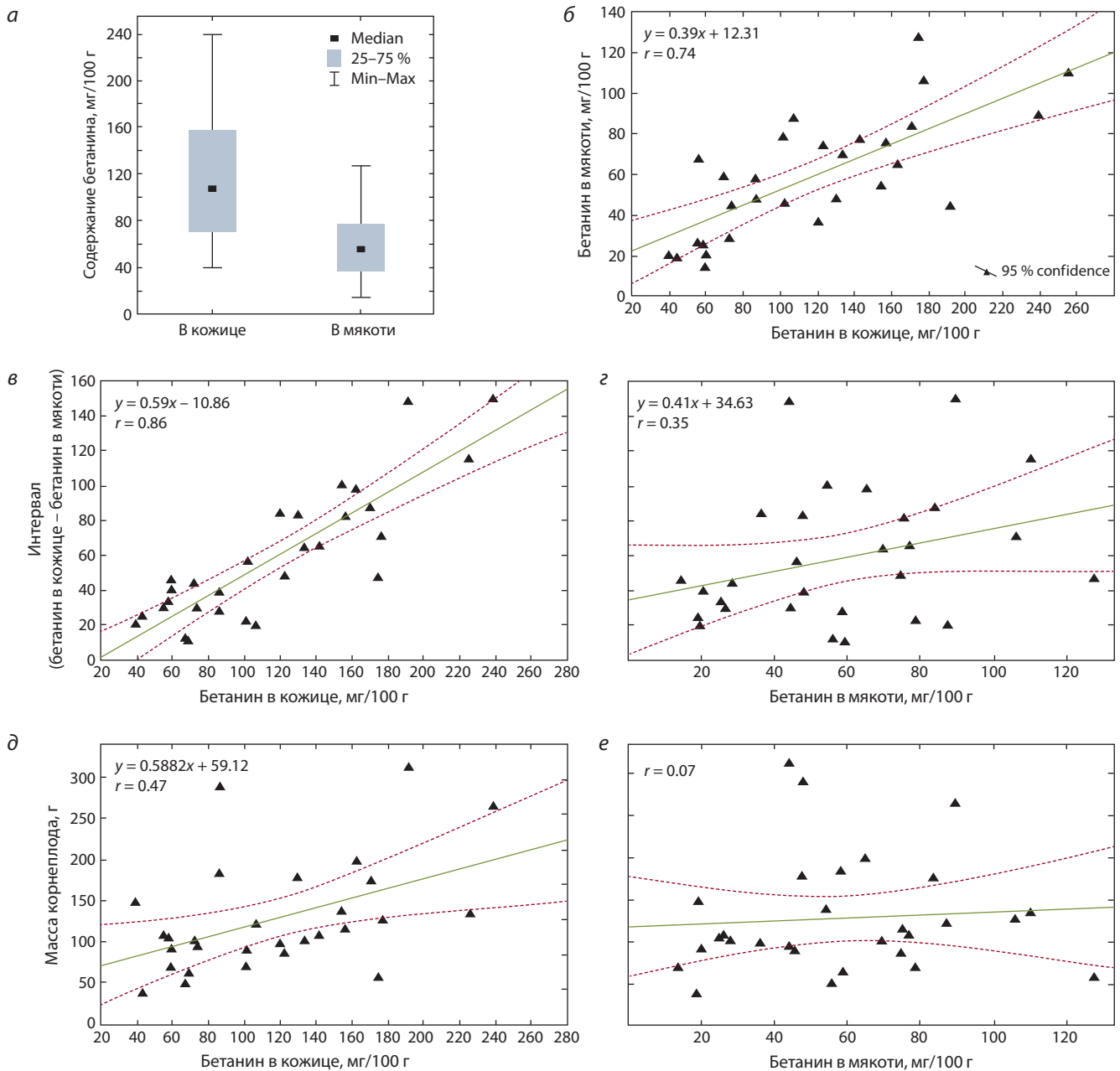


Рис. 3. Среднее содержание бетанина в коже и мякоти корнеплодов столовой свеклы (а) и результаты линейного корреляционного анализа (б–е): б – корреляция между содержанием бетанина в коже и мякоти красной свеклы; в – между бетанином в коже и интервалом (бетанин в коже – бетанин в мякоти); г – между бетанином в мякоти и интервалом; д – между бетанином в коже и массой корнеплода; е – между бетанином в мякоти и массой корнеплода.

пигмента от морфологического типа корнеплода и интенсивности окраски. Подтверждены сделанные нами ранее выводы о предпочтении округлой и округло-овальной формы корнеплода для селекции на высокое содержание бетанина (Соколова, Соловьева, 2019). Стоит отметить и исключения, наблюдавшиеся среди плоскоокруглых образцов, как правило, являвшихся скороспелыми формами с невысоким содержанием бетанина (Соколова, 2019). Так, сорт американского происхождения ‘Crosby Egyptian’ (к-1587) и местная сортопопуляция из Казахстана ‘Свекла местная’ (к-3885) тоже отличались высокими значениями бетанина в коже: 191.93 и 174.62 мг/100 г соответственно.

Максимальные содержания бетанина в коже корнеплода отмечены у образцов отечественного происхождения ‘Бордо односемянная’ (к-3151) и ‘Русская односемянная’ (к-3698) – 239.20 и 225.57 мг/100 г соответственно. Эти генотипы представляют интерес для дальнейшей селекционной работы на увеличение содержания пигмента.

Раздельный анализ содержания бетанина в коже и мякоти корнеплодов выявил статистически достоверные различия. Содержание пигмента в коже у всех изученных образцов превышало этот показатель в мякоти (рис. 3, а). Минимальная разница отмечена у образца ‘Донская плоская 367’ (к-1671) – 10.3 мг/100 г. Максимальная разница у образца ‘Бордо односемянная’ соста-

вила 149.5 мг/100 г; при этом 73 % бетанина присутствует в кожце, а 27 % – в мякоти. Корреляционный анализ свидетельствует о наличии значимой положительной взаимосвязи между содержанием пигмента в кожце и мякоти ($r = 0.74$) (см. рис. 3, б). С увеличением количества бетанина в кожце увеличивается и интервал между показателями ($r = 0.86$) (см. рис. 3, в). В отличие от бетанина в кожце, значимой взаимосвязи содержания пигмента в мякоти и варьирования между показателями не обнаружено, что свидетельствует о его большей стабильности в мякоти в течение вегетации (см. рис. 3, г). То есть повышенное содержание пигмента связано преимущественно с бетанином в кожце.

Заметной корреляции ($r > 0.5$) между массой корнеплода и содержанием бетанина в кожце и мякоти не выявлено (см. рис. 3, д, е).

Для производства красителя из корнеплодов свеклы важно, чтобы содержание пигмента в общей биомассе было высоким. Схематично принимая форму корнеплода столовой свеклы за шар, можно рассчитать, как изменится соотношение объема и площади поверхности в зависимости от радиуса. Как видно на диаграмме (рис. 4), увеличение объема шара имеет кубическую зависимость, тогда как площадь поверхности – квадратичную. Экстраполируя теоретическую раскладку на объект нашего исследования, можно утверждать, что в предположении постоянства толщины кожцы у зрелых, готовых к уборке корнеплодов доля мякоти значительно превышает долю кожцы, что в итоге отрицательно отразится на выходе пигмента. У небольших корнеплодов на кожцу приходится

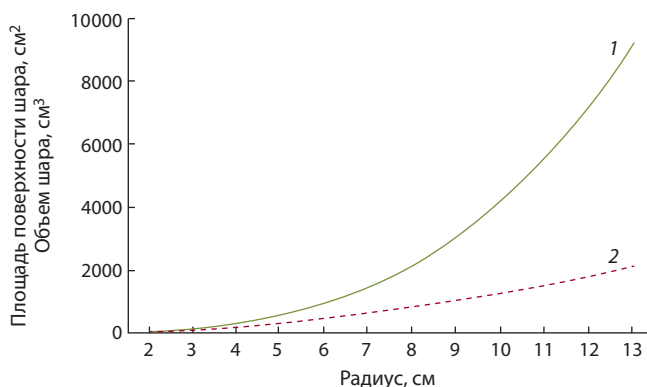


Рис. 4. Зависимость объема (1) и площади поверхности (2) шара от его радиуса.

ся большая доля, чем у крупных. Можно предположить, что из мелких корнеплодов суммарный выход бетанина будет выше при условии высокого содержания пигмента на момент уборки урожая.

Для изучения динамики нарастания корнеплода и аккумуляции пигмента отдельно в кожце и мякоти мы провели сравнительный анализ двух перспективных образцов свеклы: ‘Русская односемянная’ (к-3698) и ‘Бордо односемянная’ (к-3151). Материал для анализа отбирали 22 раза через равные промежутки времени с момента превышения корнеплодами веса 10 г. За вегетационный период значимого накопления бетанина в кожце и мякоти у обоих сортов не выявлено (рис. 5), что подтверждает

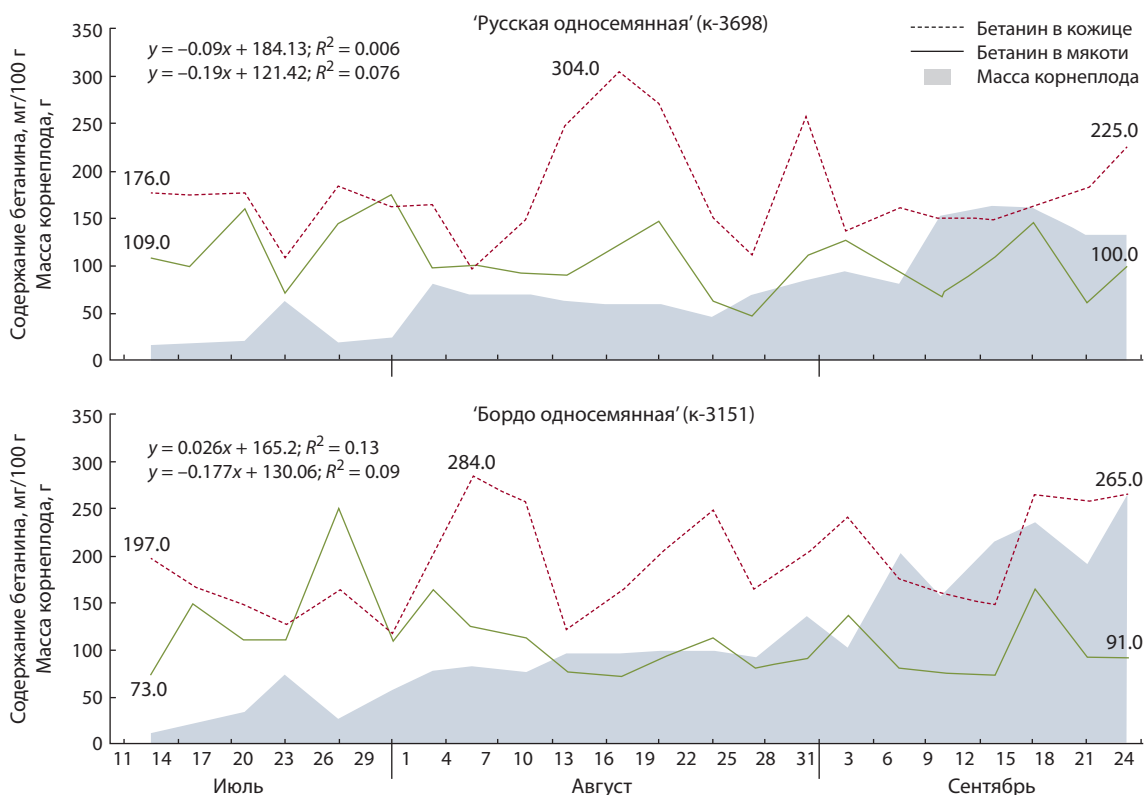


Рис. 5. Изменения содержания бетанина и массы корнеплода у сортов столовой свеклы ‘Русская односемянная’ и ‘Бордо односемянная’.

Таблица 2. Метрические параметры листовой поверхности опытных образцов столовой свеклы на момент уборки урожая

Метрический параметр	'Бордо односемянная', к-3151	'Русская односемянная', к-3698
Лист		
Количество, шт.	14	12
Длина, см	15	11
Ширина, см	6	5
Площадь одного листа, см ²	67.5	41.2
Площадь листовой поверхности, см ²	945.0	494.2
Длина черешка, см	14	12

результаты проведенного ранее эколого-географического изучения (Соколова, 2019). При этом размах колебания в отдельные периоды развития статистически значим ($p < 0.05$). Динамика имела волновой характер и достаточно синхронный рисунок у обоих сортов как в кожице, так и в мякоти корнеплодов. Можно заметить, что резкие восходящие движения содержания бетанина и нарастание массы корнеплодов часто носили разнонаправленный характер. Причем содержание пигмента в мякоти изменялось более консервативно, чем в кожице.

Известно, что путь биосинтеза бетанина достаточно гибкий и подвержен сильному влиянию экзогенных фак-

торов (Tzin, Galili, 2010; Cabanes et al., 2014; Sakuta, 2014; Esatbeyoglu et al., 2015). Единоразы за всю вегетацию было отмечено превышение содержания бетанина в мякоти над кожицей у обоих сортов (период с 27 по 31 июля). При этом зафиксировано максимальное его содержание в мякоти за всю вегетацию. Обильные продолжительные осадки, установившиеся с 21 июля, на фоне средненежных температур воздуха выше +15 °С вызвали угнетение роста корнеплодов, что, скорее всего, и привело к увеличению содержания бетанина в мякоти.

В отличие от содержания пигмента, нарастание биомассы корнеплода было положительно взаимосвязано с продолжительностью вегетационного периода ($R^2 = 0.76-0.86$).

Активность фотосинтеза и, как следствие, метаболизма растений связана с площадью поверхности листовой биомассы растения. Образец 'Русская односемянная' отличался мелкими пигментированными и слегка волнистыми листовыми пластинками с более короткими черешками (табл. 2, рис. 6). Количество листьев на растении меньше, чем у образца 'Бордо односемянная'. Площадь листовой поверхности на момент уборки у образца 'Русская односемянная' составила 494.2 см², что почти в два раза меньше, чем у образца 'Бордо односемянная'. Эти характеристики имеют значение для понимания различий в реакции сортов на абиотические факторы среды.

Среднедневная температура воздуха и количество осадков – два наиболее влиятельных, постоянно колеблющихся экзогенных фактора. Столовая свекла достаточно пластичная культура, способная давать урожай как в южных



Рис. 6. Анатомо-морфологическое строение и вид полевых посевов опытных образцов столовой свеклы 'Русская односемянная' (к-3698) и 'Бордо односемянная' (к-3151).

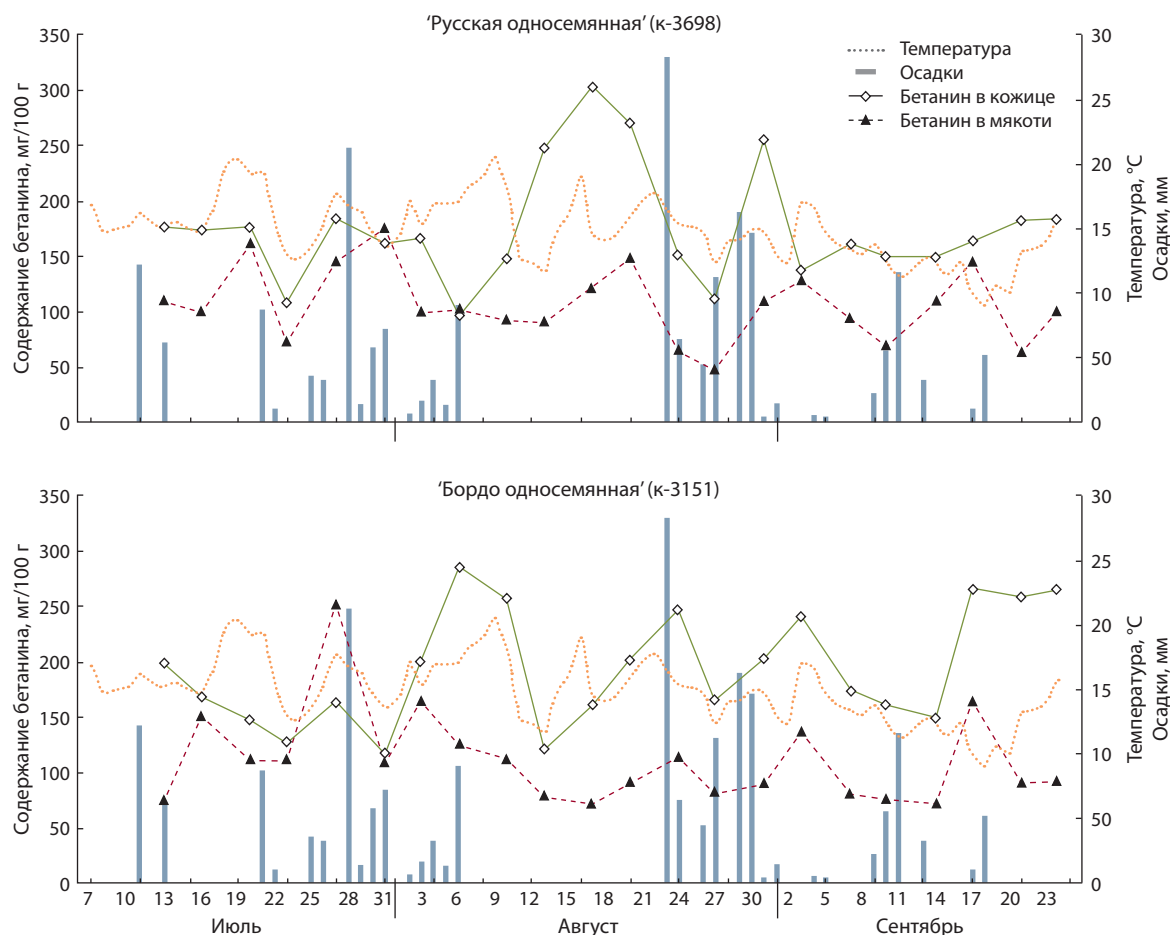


Рис. 7. Изменение содержания бетанина у сортов столовой свеклы 'Русская односемянная' и 'Бордо односемянная' в зависимости от характеристик погодных условий.

регионах Российской Федерации, так и в условиях северного региона (Буренин и др., 2013). Именно это качество обеспечило широкое ее распространение. Исследование выявило, что высокая пластичность генотипа – ценное свойство, позволяющее культуре благополучно переносить неблагоприятные периоды. На рис. 7 приведены изменения осадков, температуры воздуха и содержания пигмента в течение лета 2020 года. Вегетационный период характеризовался двумя стрессовыми периодами с полным отсутствием осадков – с 14 по 20 июля и с 7 по 22 августа, а также двумя периодами затяжных дождей – с 21 июля по 6 августа и с 23 августа по 1 сентября. За один день 28 июля и 23 августа выпало значительное количество осадков (21.2 и 28.2 мм соответственно), которые продолжались с меньшей интенсивностью еще на протяжении девяти дней. Это негативно отразилось на содержании бетанина в кожице и мякоти. В целом тенденция у сортов схожа, но имеются некоторые различия. Прослеживается также «отставание» реакции сорта 'Русская односемянная' на 7–10 дней (см. рис. 7).

Для выяснения взаимосвязей между изучаемыми параметрами был проведен корреляционный анализ сортов в динамике (сдвиг параметров среды на три и шесть дней) (табл. 3). Для обоих сортов характерна умеренная отрицательная корреляция между массой корнеплода и темпера-

турой воздуха, которая сохранялась на протяжении шести дней. Повышенная температура усиливала транспирацию растений, вызывая остановку нарастания корнеплода и увеличивая содержание пигмента в мякоти ($r = 0.32–0.31$). Через три дня эффект повышения концентрации пигмента в ответ на температуру уже не проявлялся.

Содержание бетанина в кожице тоже отрицательно коррелировало с повышением температуры воздуха, причем эффект проявлялся не сразу, а на третьи сутки. Для сорта 'Бордо односемянная' корреляция сохранялась до шестого дня ($r = -0.48$).

Для осадков в целом были характерны слабые отрицательные взаимосвязи со всеми изучаемыми признаками. Они имели слабую корреляцию с содержанием пигмента ($r < 0.3$). Биосинтез бетанина в кожице у сорта 'Русская односемянная' негативно реагировал на выпадение осадков ($r = -0.48$). Но уже через три дня растения адаптировались и взаимосвязь не проявлялась. Различия в реакции сортов, возможно, объясняются разницей в площади фотосинтетической поверхности генотипов.

Определение структуры взаимосвязей между изученными параметрами (PCA) выявило два неравновесных фактора (рис. 8). Компоненты факторов 1 и 2 объясняют вместе 87% общей дисперсии: 32.6 и 54.4% соответственно. Фактор 1 включил в себя основной параметр продук-

Таблица 3. Корреляционная матрица содержания бетанина, массы корнеплода и погодных характеристик опытных образцов столовой свеклы

Показатель	Масса корнеплода	Бетанин в кожице	Бетанин в мякоти
В день забора корнеплодов			
Температура	-0.50/-0.47*	0.02/0.27	0.32/0.31
Осадки	-0.16/-0.23	-0.48/0.05	-0.26/-0.16
Масса корнеплода		-0.08/ 0.36	-0.28/-0.30
Бетанин в кожице			0.31/0.15
Через три дня			
Температура	-0.47/-0.39	-0.34/-0.35	-0.07/-0.10
Осадки	-0.14/-0.26	-0.05/0.08	-0.19/-0.12
Масса корнеплода		-0.08/ 0.36	-0.28/-0.30
Бетанин в кожице			0.31/0.15
Через шесть дней			
Температура	-0.40/-0.54	0.10/ -0.48	-0.13/0.21
Осадки	-0.12/-0.17	-0.01/0.12	0.17/0.19
Масса корнеплода		-0.08/ 0.36	-0.28/-0.30
Бетанин в кожице			0.31/0.15

*'Русская односемянная' / 'Бордо односемянная'.

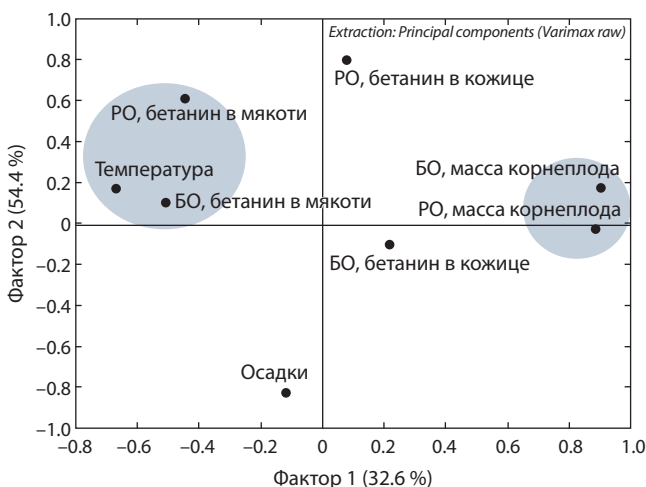


Рис. 8. Вклад основных компонентов факторного анализа в общую дисперсию.

PO – сорт 'Русская односемянная'; БО – 'Бордо односемянная'.

тивности – массу одного корнеплода. Фактор 2 объединил параметры «температура воздуха» и «бетанин в мякоти», подтверждая результаты корреляционного анализа. Параметры фактора 2 имели наиболее тесную взаимосвязь, т.е. на их долю приходилась большая часть дисперсии. При этом другие переменные также имели достаточно высокую дисперсию, что говорит о значительном вкладе каждого из них. Таким образом, можно сделать вывод, что процесс биосинтеза бетанина у столовой свеклы очень гибкий и находится под сильным влиянием факторов внешней среды.

Заключение

В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что в течение вегетации аккумуляции бетанина у столовой свеклы не происходило. Содержание пигмента было связано в первую очередь с исходным генотипом образца. Среднее значение бетанина в изученных коллекционных образцах составило: в кожице – 116.9 мг/100 г, в мякоти – 58.9 мг/100 г. Содержание пигмента в кожице у всех образцов превышало его содержание в мякоти. При положительной корреляции этих показателей ($r = 0.74$) увеличение интервала между ними зависело именно от бетанина в кожице ($r = 0.86$).

Содержание пигмента подвержено значительному колебанию в течение вегетации. Активность метаболических процессов, зависящая от фотосинтетической поверхности растений, имела большое значение для реакции генотипов столовой свеклы на различные факторы среды.

Процесс биосинтеза пигмента крайне чувствителен к погодным условиям, особенно к температуре воздуха. Увеличение бетанина в кожице в ответ на повышение температуры воздуха проявлялось на третьи сутки. Увеличение массы одного корнеплода отрицательно коррелировало с уровнем бетанина в мякоти, который, в свою очередь, тесно связан с температурой окружающего воздуха.

Наиболее подходящими для целей селекции на повышенное содержание бетанина являются округлые и плоскоокруглые сортотипы столовой свеклы. Для получения максимального выхода бетанина лучше подходят некрупные корнеплоды. При их выращивании рекомендуется использовать более загущенные схемы посадки или более раннюю уборку урожая, а также подбирать оптимальные сроки. При выборе конкретной даты уборки необходимо ориентироваться на характеристики погодных условий. Для выделения красителя рекомендуются отечественные сорта столовой свеклы 'Бордо односемянная' (к-3151) и 'Русская односемянная' (к-3698), дающие при благоприятных условиях высокий выход бетанина.

Список литературы / References

- Бурак А.Д., Завалей А.П. Влияние способа обработки свеклы столовой на антиоксидантную активность сока и фруктово-овощных соков. *Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания*. 2020;4:51-61. [Burak L.Ch., Zavaley A.P. Influence of the method of processing table beets on the antioxidant activity of beetroot and mixed juices. *Tekhnologii Pishchevoy i Pererabatyvayushchey Promyshlennosti APK – Produkty Zdorovogo Pitaniya = Technologies of Food and Processing Industry of AIC: Healthy Food*. 2020;4:51-61. (in Russian)]
- Буренин В.И., Соколова Д.В., Емельянов А.В. Изменчивость количественных признаков сортообразцов столовой свеклы при эколого-географическом изучении. *Сахар. свекла*. 2013;8:16-19. [Burenin V.I., Sokolova D.V., Emelyanov A.V. Variability of quantitative traits of red beet varieties in an ecogeographical study. *Sakharnaya Svekla = Sugar Beet*. 2013;8:16-19. (in Russian)]
- Изучение и поддержание мировой коллекции корнеплодов: (Свекла, репа, турнепс, брюква). Методические указания. Под ред. В.И. Буренина. Л.: ВИР, 1989.
- [Burenin V.I. (Ed.). *Methodological Guidelines for the Study and Maintenance of the World Collection of Root Crops*. Leningrad: VIR Publ., 1989. (in Russian)]

- Мглинец А.В., Осипова З.А. Генетический контроль формирования окраски корнеплода у кормовой свеклы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2010;14(4):720-728.
- [Mglinets A.V., Osipova Z.A. Formation of root color and its genetic control in fodder beet. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2010;14(4):720-728. (in Russian)]
- Соколова Д.В. Оценка взаимодействия генотип-среда у сортов свеклы столовой коллекции ВИР. *Овощи России*. 2018;6:26-30. DOI 10.18619/2072-9146-2018-6-26-30.
- [Sokolova D.V. The evaluation of genotype-environment interaction in red beet varieties of VIR collection. *Ovoshchi Rossii* = *Vegetable Crops of Russia*. 2018;6:26-30. DOI 10.18619/2072-9146-2018-6-26-30. (in Russian)]
- Соколова Д.В. Эколого-географическое изучение накопления бетанина у перспективных образцов столовой свеклы коллекции ВИР. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(4):66-74. DOI 10.30901/2227-8834-2019-4-66-74.
- [Sokolova D.V. Environmental and geographic study of betanin accumulation in promising red beet accessions from the VIR collection. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii* = *Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2019;180(4):66-74. DOI 10.30901/2227-8834-2019-4-66-74. (in Russian)]
- Соколова Д.В., Соловьева А.Е. Перспективный исходный материал для селекции сортов свеклы с высоким содержанием бетанина. *Аграр. Россия*. 2019;8:26-32. DOI 10.30906/1999-5636-2019-8-26-32.
- [Sokolova D.V., Solovieva A.E. Promising starting material for selection of beet varieties with a high content of betanin. *Agrarnaya Rossiya* = *Agricultural Russia*. 2019;8:26-32. DOI 10.30906/1999-5636-2019-8-26-32. (in Russian)]
- Фролов В.Л., Чижик Ю.Л. Способ получения пищевого красителя из свеклы. Пат. на изобретение. RU 2081136 C1. Опубл. 10.06.1997.
- [Frolov V.L., Chizhik Ju.L. Method of Preparing Food Dye from Beet. Invention patent. RU 2081136 C1. Publ. 10.06.1997. (in Russian)]
- Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022.
- [Yudina R.S., Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Tikhonova M.A., Khlestkina E.K. Anthocyanins as functional food components. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):178-189. DOI 10.18699/VJ21.022. (in Russian)]
- Azeredo H.M.C., Pereira A.C., de Souza A.C.R., Gouveia S.T., Mendes K.C.B. Study on efficiency of betacyanin extraction from red beetroots. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2009;44(12):2464-2469. DOI 10.1111/j.1365-2621.2009.02037.x.
- Aztatzi-Ruggerio L., Granados-Balbuena S.Y., Zainos-Cuapio Y., Ocaranza-Sánchez E., Rojas-López M. Analysis of the degradation of betanin obtained from beetroot using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Food Sci. Technol.* 2019;56(8):3677-3686. DOI 10.1007/s13197-019-03826-2.
- Cabanes J., Gandia-Herrero F., Escribano J., Garcia-Carmona F., Jimenez-Atienzar M. One-step synthesis of betalains using a novel betalamic acid derivatized support. *J. Agric. Food Chem.* 2014;62(17):3776-3782. DOI 10.1021/jf500506y.
- Cai Y., Sun M., Wu H., Huang R., Corke H. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46(6):2063-2070. DOI 10.1021/jf9709966.
- Castellanos-Santiago E., Yahia E.M. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56(14):5758-5764. DOI 10.1021/jf800362t.
- Esatbeyoglu T., Wagner A.E., Schini-Kerth V.B., Rimbach G. Betanin – a food colorant with biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015;59(1):36-47. DOI 10.1002/mnfr.201400484.
- Herbach K.M., Stintzing F.C., Carle R. Stability and color changes of thermally treated betanin, phyllocactin, and hydroxybetanin solutions. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54(2):390-398. DOI 10.1021/jf051854b.
- Jiratanan T., Liu R.H. Antioxidant activity of processed table beets (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) and green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(9):2659-2670. DOI 10.1021/jf034861d.
- Nemzer B., Pietrkowski Z., Spórna A., Stalica P., Thresher W., Michałowski T., Wybranie S. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chem.* 2011;127(1):42-53. DOI 10.1016/j.foodchem.2010.12.081.
- Nilsson T. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbrukshogskolans Annaler*. 1970;36:179-219.
- Saguy I. Thermostability of red beet pigments (betanin and vulgaxanthin-I): influence of pH and temperature. *J. Food Sci.* 1979;44(5):1554-1555. DOI 10.1111/j.1365-2621.1979.tb06488.x.
- Saguy I., Kopelman I.J., Mizrahi S. Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *J. Agric. Food Chem.* 1978;26(2):360-362. DOI 10.1021/jf60216a052.
- Sakuta M. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. *Plant Biotechnol Rep.* 2014;8:37-48. DOI 10.1007/s11816-013-0294-z.
- Sawicki T., Bączek N., Wiczkowski W. Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *J. Funct. Foods*. 2016;27:249-261. DOI 10.1016/j.jff.2016.09.004.
- Schliemann W., Strack D. Intramolecular stabilization of acylated betacyanins. *Phytochemistry*. 1998;49(2):585-588. DOI 10.1016/S0031-9422(98)00047-8.
- Stintzing F.C., Carle R. Betalains – emerging prospects for food scientists. *Trends Food Sci. Technol.* 2007;18(10):514-525. DOI 10.1016/j.tifs.2007.04.012.
- Stintzing F.C., Schieber A., Carle R. Rote Bete als färbendes Lebensmittel – eine Bestandsaufnahme. *Obst- Gemüse- Kartoffelverarb.* 2000;85:196-204.
- Tesoriere L., Allegra M., Butera D., Livrea M.A. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;80(4):941-945. DOI 10.1093/ajcn/80.4.941.
- Tzin V., Galili G. New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Mol. Plant.* 2010;3(6):956-972. DOI 10.1093/mp/ssp048.
- von Elbe J.H. Betalains. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 2001;F3.1.1–F3.1.7. DOI 10.1002/0471142913.faf0301s00.
- Vulić J.J., Čebović T.N., Čanadanović V.M., Četković G.S., Djilas S.M., Čanadanović-Brunet J.M., Velićanski A.S., Cvetković D.D., Tumbas V.T. Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food Funct.* 2013;4(5):713-721. DOI 10.1039/C3FO30315B.

ORCID ID

D.V. Sokolova orcid.org/0000-0002-9967-7454

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 19.07.2021. После доработки 10.10.2021. Принята к публикации 18.11.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Взаимосвязь ламинов с эпигенетическими факторами при старении

Р.Н. Мустафин¹✉, Э.К. Хуснутдинова²

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

² Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

✉ ruji79@mail.ru

Аннотация. Дисбаланс активации транспозонов – один из важнейших факторов нестабильности генома при старении. Причинами этого явления могут быть ассоциированные с возрастом изменения экспрессии ламинов, которые влияют на эпигенетическую регуляцию мобильных генетических элементов. Взаимосвязь ламинов и транспозонов может быть обусловлена специфическим физическим контактом между молекулами, а также опосредована эпигенетическими регуляторами, такими как SIRT7, BAF и микроРНК. Характерна взаиморегуляция ламинов с мобильными элементами, которые являются источниками микроРНК, влияющими на ламины. Ламины входят в состав NURD (nucleosome remodeling deacetylase complex), взаимодействуют с гистоновыми деацетилазами и регулируют экспрессию генов без изменения структуры нуклеотидных последовательностей. Роль ядерной ламинины в этиопатогенезе синдромов преждевременного старения может быть обусловлена взаимодействием с транспозонами, так как истощение ламинов приводит к активации мобильных генетических элементов. В различных клетках человека LINE1 представлены в связанных с ламинами гетерохроматиновых доменах генома, при этом SIRT7 способствует взаимодействию данного ретроэлемента с ядерной ламининой. В противовирусном ответе организмов важную роль играют как ретроэлементы, так и ядерная ламина. Это согласуется с ролью ламинов в защите как от вирусов, так и от транспозонов, которые характеризуются филогенетическим родством. Мобильные генетические элементы и ламины – вторичные мессенджеры средовых стрессорных воздействий, которые могут служить пусковыми факторами для старения и канцерогенеза. Транспозоны играют роль в развитии злокачественных новообразований, при этом происходящие от них микроРНК, участвующие в этиопатогенезе опухолей, имеют значение в старении человека. Сходные свойства типичны для ламинов, поскольку при злокачественных новообразованиях выявлена дисрегуляция ламинов, а влияющие на них микроРНК участвуют в канцерогенезе. Изменение экспрессии специфических микроРНК отмечено также при ламинопатиях. Определение точных эпигенетических механизмов взаимодействия ламинов с мобильными генетическими элементами при старении может стать основой для разработки методов продления жизни и таргетной терапии ассоциированных с возрастом злокачественных новообразований.
Ключевые слова: ламины; микроРНК; транспозоны; эпигенетические факторы.

Для цитирования: Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Взаимосвязь ламинов с эпигенетическими факторами при старении. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):40-49. DOI 10.18699/VJGB-22-06

The relationship of lamins with epigenetic factors during aging

R.N. Mustafin¹✉, E.K. Khusnutdinova²

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

✉ ruji79@mail.ru

Abstract. The key factor of genome instability during aging is transposon dysregulation. This may be due to senile changes in the expression of lamins, which epigenetically modulate transposons. Lamins directly physically interact with transposons. Epigenetic regulators such as SIRT7, BAF, and microRNA can also serve as intermediaries for their interactions. There is also an inverse regulation, since transposons are sources of miRNAs that affect lamins. We suggest that lamins can be attributed to epigenetic factors, since they are part of the NURD, interact with histone deacetylases and regulate gene expression without changing the nucleotide sequences. The role of lamins in the etiopathogenesis of premature aging syndromes may be associated with interactions with transposons. In various human cells, LINE1 is present in the heterochromatin domains of the genome associated with lamins, while SIRT7 facilitates the interaction of this retroelement with lamins. Both retroelements and the nuclear lamina play an important role in the antiviral response of organisms. This may be due to the role of lamins in protection from both viruses and transposons, since viruses and transposons are evolutionarily related. Transposable elements and lamins are secondary messengers of environmental stressors that can serve as triggers for aging and carcinogenesis. Transposons play a role in the development of cancer, while the microRNAs derived from them, participating in the etiopathogenesis of tumors, are important in human aging. Lamins have similar properties, since lamins are dysregulated in cancer, and microRNAs

affecting them are involved in carcinogenesis. Changes in the expression of specific microRNAs were also revealed in laminopathies. Identification of the epigenetic mechanisms of interaction of lamins with transposons during aging can become the basis for the development of methods of life extension and targeted therapy of age-associated cancer.

Key words: lamins; microRNAs; transposons; epigenetic factors.

For citation: Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The relationship of lamins with epigenetic factors during aging. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):40-49. DOI 10.18699/VJGB-22-06

Введение

Ядерная ламина (ЯЛ) представляет собой белковую сеть, связанную с внутренней стороной ядерной оболочки клетки. Она выполняет структурные, сигнальные и регуляторные функции. При изучении эволюции ее компонентов обнаружено широкое разнообразие доменов и архитектуры последовательностей, которые выходят за рамки классических альфа-спиралей (Kollmar, 2015). Ядерная ламина состоит из ламинов и ассоциированных с ними белков (Lemaitre, Bickmore, 2015). Основные компоненты – ламинины (Cibulka et al., 2012), гены которых присутствовали на самых ранних этапах эволюции эукариот. Они выявлены у многоклеточных, амёб и примитивных опистхококтов, таких как *Ichthyospora* и *Choanoflagellates* (Kollmar, 2015). Помимо поддержания формы ядра, ламинины необходимы для управления репликацией и транскрипцией. Они принадлежат к семейству белков промежуточных филаментов (класс V) и обладают их типичной структурой. Клетки млекопитающих образуют 4 типа ламинов: А и С (сплайсинговые изоформы одного гена), В1 и В2 (Cibulka et al., 2012). Кроме ламинов А и С, существуют минорные изоформы Аδ10 и С2. Преламин А – это белковый прекурсор ламина А, который подвергается посттрансляционной модификации С-концевой области, где происходит фарнезилирование, карбоксиметилирование и протеолиз мотива СааХ под влиянием металлопротеазы ZMPSTE24 (кодирует метаболизирующую ламин А металлопротеиназу) (Wang et al., 2016). Ламинины А, С, Аδ10 и С2 кодируются одним геном *LMNA* (Turgay et al., 2017).

К белкам, взаимодействующим с ламинами и тесно с ними связанным функционально, относятся LBR (lamin B receptor), BAF (barrier to autointegration factor), SUN1, SUN2, несприн. Они выполняют функции в структурной организации ядра и регуляции ядерных процессов. Белок LBR и эндопротеаза преламин А обладают ферментативными свойствами (Meinke et al., 2014).

На периферии ядра геномная ДНК связана с ламинами А и В в виде гетерохроматиновых доменов. Ламин А связан также с хроматином внутри ядра – нуклеоплазматическое окружение представлено главным образом эухроматином, что свидетельствует о роли ламина А в регуляции генной экспрессии всего генома (Briand et al., 2018). Ламин В взаимодействует с относительно бедными генами и транскрипционно неактивными доменами генома (Guelen et al., 2008). Предполагается, что у последнего общего предшественника всех эукариот (LECA – last eukaryotic common ancestor) конфигурации ядерной оболочки и связанной с ней ЯЛ играли важную роль в определении активности ядра.

В последующей эволюции изменялись механизмы регуляции генной экспрессии ламинов у разных таксо-

нов. Их белковое разнообразие у растений и трипаносом таксономически ограничено, тогда как у многоклеточных животных проявляется более широким диапазоном. Филогенетическое древо генов ламинов характеризуется вертикальной эволюцией. Например, два ламина протистов из сильно расходящихся таксонов имеют мишени в ядрах клеток млекопитающих и полимеризуются в нитевые структуры, что говорит о функциональном сохранении отдаленных гомологов ламинов. В определенных группах эукариот установлена выраженная эволюционная пластичность структур ЯЛ по механизмам связывания хроматина и эпигенетического контроля вследствие высокого уровня дивергенции гомологов ламинов (Koreny, Field, 2016).

Изменения ламинов тесно связаны со старением, а также с ассоциированными с возрастом болезнями, такими как злокачественные новообразования. Например, при раке легкого выявлено значительное снижение уровня ламина В1 (Garvalov et al., 2019). Доказано, что активность mTOR (mechanistic target of rapamycin) регулируется ламинном А, тогда как низкая активность mTOR способствует увеличению продолжительности жизни. Ингибирование mTOR (например, при помощи рапамицина) приводит к деградации дефектных молекул и органелл, которые накапливаются в клетках во время старения, поскольку низкая активность аутофагии – характерная черта связанных со старением болезней (Cenni et al., 2020).

Ламинины можно отнести к эпигенетическим факторам, поскольку они обеспечивают наследование функционального статуса гена. Так, присоединение ламина В1 к специфическим локусам генома ведет к подавлению транскрипции расположенных в них генов. Для большинства дифференциально экспрессируемых генов характерна активация вследствие потери ламина В1. К таким генам относятся онкоген *RET* и его корепрессор *GFRα1*. Соответственно, при истощении ламина В1 с возрастом повышается риск развития опухолей. Другой механизм активации *RET* – метилирование гистона H3K27me3 (Garvalov et al., 2019).

К эпигенетическим факторам относятся ремоделирование хроматина, модификации гистонов и нуклеотидов ДНК, а также влияние некодирующих РНК (нкРНК). Во время клеточного старения у млекопитающих снижаются уровни H3K56ac и H4K16ac, что способствует изменению экспрессии генов, геномной нестабильности и повреждению теломер. При старении происходит глобальное снижение уровней метилирования ДНК, совпадающее с возрастной потерей гетерохроматина. В результате нарушается регуляция экспрессии генов и активации мобильных генетических элементов, TE (transposable elements). При этом участие ламинов в эпигенетической регуляции,

связанной со старением, происходит посредством прямого взаимодействия с хроматином в областях специфических последовательностей ДНК, называемых ламин-ассоциированными доменами (LAD).

Ламины способствуют эпигенетическим изменениям при старении путем функциональных взаимодействий с сиртуинами. Например, ламин А усиливает деацетилазную активность SIRT1, стимулирует функционирование SIRT6 при репарации ДНК, а также рекрутирует гистоновую деацетилазу 2 (HDAC2). Ламины А/С являются также непосредственными участниками эпигенетической регуляции, так как служат компонентами NURD (nucleosome remodeling deacetylase complex). Этот комплекс образован также из HDAC1, RBBP4, RBBP7 (Cenni et al., 2020). Кроме того, ламины А/С взаимодействуют с деацетилазой гистонов 2 (HDAC2) и ацетилтрансферазой PCAF (p300-CBP ассоциированный фактор) (Santi et al., 2020). Ламин В1 рекрутирует комплекс PRC2 (polycomb repressive complex 2), с помощью которого изменяется ландшафт H3K27me3 с репрессией специфических генов, участвующих в передаче сигналов и миграции клеток (Jia et al., 2019).

Роль ламин в синдромах преждевременного старения

Веским доказательством влияния ламин на продолжительность жизни является факт развития прогерии у больных с герминативными мутациями в генах этих белков. Для прогероидных ламинопатий (ПЛ) характерны преждевременное старение и смерть от осложнений атеросклероза, таких как инфаркт миокарда, инсульт или сердечная недостаточность. Они обычно не наследуются, так как пациенты не доживают до половозрелого возраста.

Важная генетическая особенность прогерий – укорочение теломер с каждым циклом репликации (Ahmed et al., 2018). Наиболее известна прогерия Хатчинсона–Гилфорда (ПХГ), проявляющаяся выраженным укорочением теломер. Болезнь диагностируется с двухлетнего возраста, когда определяются заметные симптомы преждевременного старения. Продолжительность жизни у пациентов составляет 10–20 лет. У 90 % пациентов с ПХГ определяются мутации в гене *LMNA* (Ahmed et al., 2018). Частота встречаемости ПХГ составляет один случай на 8 млн новорожденных (Burla et al., 2018). Наиболее частая мутация в гене *LMNA*, C1824T, ведет к накоплению прогерина (доминантная негативная форма ламина А).

Интересно, что прогерин накапливается также в клетках при физиологическом старении как одна из редких сплайсинговых форм транскриптов ламина А. Однако при ПХГ наблюдаются более тяжелые, чем при физиологическом старении, эпигенетические изменения – ковалентные модификации гистонов с тенденцией к потере разделения на гетеро- и эухроматин, что сопровождается изменением пространственной компарментализации и конформации хроматина в ядре. В этом процессе участвуют микроРНК, такие как miR-9, которые могут быть использованы в качестве мишени для защиты центральной нервной системы (ЦНС) у пациентов с ПХГ (Arancio et al., 2014). MiR-9 взаимодействует с 3'-нетранслируемой областью (UTR) мРНК ламина А, не оказывая влияния на ламин С.

Выявлен также дополнительный сайт связывания с miR-9 в области 3'-UTR преламина А. В экспериментах на мышцах и клеточных культурах человека HeLa доказано, что экспрессия miR-9 значительно снижает уровни ламина А (Jung et al., 2012).

Подобно нормальному старению, при аккумуляции прогерина подавляются взаимодействия ламина А с SIRT1, HDAC2 и SIRT6. Кроме того, при ПХГ нарушается регуляция гетерохроматинового белка HP1, снижаются уровни H3K9me3, подавляется функция NURD (компонент которого – ламины А/С). При ПХГ взаимосвязь ламин А/С с HDAC2 вызывает активацию гена *CDKN1A*, важнейшего детерминанта клеточного старения (Cenni et al., 2020).

К прогероидным ламинопатиям, обусловленным мутациями в гене *LMNA*, относятся также атипичный синдром Вернера (AWS), мандибулоакральная дисплазия типа А (MADA), атипичный синдром прогерии (APS) (Burla et al., 2018). Они отличаются по специфическим для каждой болезни мутациям в *LMNA* и клиническим проявлениям. Семейная парциальная липодистрофия Дуннигана вызвана миссенс-мутацией R482W в ламине А, приводящей к нарушению влияния этого ламина на периферии и внутри ядра на трехмерную перегруппировку хроматина (Briand et al., 2018). Причиной MADA могут быть мутации в генах *LMNA* или *ZMPSTE24*. Это редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся аномалиями костей с локальным остеолитом и генерализованным остеопорозом, пигментацией кожи, липодистрофией и ускоренным старением. Мутации вызывают накопление преламина А, что приводит к нарушению динамики хроматина. Подобные изменения обнаружены также при физиологическом старении (Cenni et al., 2018).

Прогероидные ламинопатии могут возникать вследствие мутаций в генах, взаимодействующих с ламинами. Так, прогерия Нестора–Гильермо (NGPS) развивается при мутации в гене *BAF* (Loi et al., 2016). Синдромы преждевременного старения могут быть обусловлены не только мутациями в генах ламин и взаимодействующих с ними белков, но и мутациями в генах ферментов репарации и поддержания ДНК. Например, мутации в генах геликаз вызывают синдромы Ротмунда–Томсона (ген *RECQL4*), Блума (ген *BLM*), Вернера (ген *WRN*); генов репарации ДНК – врожденный дискератоз (гены *DKC1*, *TERC*, *TERT*), синдром Коккейна (гены *ERCC8* или *ERCC6*). Однако, в отличие от этих синдромов преждевременного старения, для ПЛ характерны раннее начало, более тяжелые проявления старения и отсутствие предрасположенности к раку (Burla et al., 2018). При всех ПЛ определяются генерализованный остеопороз и остеолит, скученность зубов с нарушением прикуса. К ПЛ со специфическим поражением опорно-двигательной системы относится синдром «сердце-рука» словенского типа (HHS-S) (Gargiuli et al., 2018). Мутации в гене *ZMPSTE24* являются причинами развития ограничительной дермопатии (RD – restrictive dermopathy) и мандибулоакральной дисплазии типа В (MADB) (Burla et al., 2018).

При атаксии-телеангиэктазии накопление ламина В1 – причина изменения формы ядра и старения клеток. Оксидативный стресс при этом синдроме увеличивает уров-

ни ламина В1 путем стимуляции митоген-активируемой протеинкиназы p38 (p38 MAPK). В экспериментах на клеточных культурах для определения влияния p38 MAPK на уровни ламина В1 использованы активатор MAPK аннотации и ингибитор MAPK SB203580. Показано, что активация p38 MAPK значительно повышает уровни ламина В1, тогда как ингибирование p38 MAPK снижает уровни ламина В1. При помощи метода PLA (proximity ligation assay) доказано, что p38 MAPK взаимодействует с ламин В1, вызывая его фосфорилирование (Varascu et al., 2012). Эти изменения характерны и для естественного старения. Прогероидным ламинопатиям свойственны также уменьшение перинуклеарного гетерохроматина и усиление клеточного старения – два состояния, которые коррелируют с дисрегуляцией ТЕ (Andrenacci et al., 2020). Можно предположить, что в эволюции ламины возникли как один из защитных механизмов, направленных на сайленсинг ТЕ для защиты хозяев от геномной нестабильности (Cavaliere et al., 2020). Поэтому ламинопатии, вызывающие преждевременное старение и ассоциированную со старением патологию, наиболее вероятно должны вызывать активацию ТЕ как ключевой механизм развития болезней (Andrenacci et al., 2020). Действительно, в эксперименте на моделях клеток, экспрессирующих прогерин, характерный для ПХГ, обнаружено выраженное повышение экспрессии LINE, SINE, HERV и ДНК-ТЕ (Arancio, 2019).

Взаимосвязь ламинов и транспозонов

Мобильные генетические элементы являются элементами генома, способными к транспозиции в его пределах. Различают два класса ТЕ: ретроэлементы (РЭ), размножающиеся с помощью обратной транскрипции и промежуточных РНК, и ДНК-ТЕ, которые перемещаются за счет транспозазы по механизму вырезания и вставки (Andrenacci et al., 2020). Все ТЕ подразделяют на автономные (содержат в своем составе гены ферментов транспозиции) и неавтономные (используют белковые продукты других ТЕ для своих перемещений). Ретроэлементы классифицируют на содержащие LTR (long terminal repeats – длинные концевые повторы) – LTR-РЭ и на non-LTR-РЭ. Наиболее распространены в геноме человека автономные non-LTR-РЭ – LINE1 (long interspersed nuclear elements) и неавтономные – SINE (small interspersed nuclear elements). К LTR-РЭ относятся эндогенные ретровирусы человека (HERV – human endogenous retrovirus) (Arancio, 2019). Сайленсинг ТЕ в норме обеспечивается деградацией их РНК и формированием гетерохроматина. Соответственно, ТЕ характеризуются активацией при старении организмов в результате возраст-ассоциированной дерегуляции гетерохроматина и микроРНК (Cavaliere et al., 2020).

Взаимосвязь между активацией ТЕ и старением продемонстрирована на термитах, у которых репродуктивные королевы живут десятки лет без значительного возрастания экспрессии ТЕ, а рабочие термиты живут всего несколько недель, что связано с дисрегуляцией ТЕ в их геномах вследствие изменения экспрессии рiРНК (Elsner et al., 2018). Интересно, что для представителей стрекающих (*Cnidaria*), характеризующихся практически неограниченными способностями к регенерации и бессмертием,

в соматических клетках также экспрессируются рiРНК и белки Piwi. Это сопровождается низкими уровнями активности ТЕ в их геномах. Эти свойства выявлены у гидры *Hydra vulgaris* (Juliano et al., 2014). Гомологи Piwi, названные Spiwi, обнаружены на всех стадиях развития *Podocoryne carnea* не только в половых, но и в дифференцированных соматических клетках (Seipel et al., 2004). Поскольку системы репарации ДНК у стрекающих не обладают специфической эффективностью, отличающей их от других животных, можно предположить, что экспрессия рiРНК в их организмах служит причиной замедленных процессов старения (Juliano et al., 2014).

У человека доказана прогрессирующая активация LINE1 при старении, которая ведет к активации интерферонного ответа вследствие накопления кДНК LINE1. Эти изменения являются причиной асептического воспаления и активации интерферона, наблюдаемого с возрастом (De Sesto et al., 2019). В то же время повышение уровня провоспалительных цитокинов в миелоидных иммунных клетках в тимусе во время старения сопровождается постепенным снижением уровня ламина В1, который специфически функционирует для правильного органогенеза тимуса за счет поддержания экспрессии генов эпителиальных клеток. Обнаружено, что снижение уровня ламина В1 приводило к усилению транскрипции 533 специфических генов и подавлению экспрессии 778 генов. Анализ этих генов показал участие их в адгезии клеток, развитии иммунной системы, дифференцировке Т-лимфоцитов и продукции цитокинов (Yue et al., 2019). Интересно, что хроническое воспаление свойственно также прогероидным ламинопатиям. При этом STAT1-регулируемый интерферон-подобный ответ индуцируется гибридами ДНК:РНК через сигнальные пути cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) и STING (stimulator of interferon genes) (Kreienkamp et al., 2018).

Транспозоны – важнейшие сенсоры средовых стрессовых воздействий, оказывают адаптивное регуляторное влияние на белок-кодирующие гены (Мустафин, Хуснутдинова, 2019). Согласно теории «буферной функции хвоста ламин», ЯЛ также действует в качестве внутриклеточного сенсора реактивной формы кислорода (через консервативные изменения цистеинового остатка в хвостовом домене ламина). На протяжении всего филогенеза млекопитающих три остатка цистеина, C522, C588, C591, на С-конце ламина А являются консервативными. Из них C588 и C591 присутствуют также у других позвоночных, а C522 отсутствует у животных, не относящихся к млекопитающим.

В экспериментах на фибробластах кожи человека показано, что эти аминокислоты в функциональном хвостовом домене ламина А повышают чувствительность к активным формам кислорода, а их замена на аланин способствует клеточному старению (Pekovic et al., 2011). Таким образом, как ламины, так и ТЕ представляют собой сенсоры стрессорных воздействий, которые могут быть причиной их дисрегуляции. Более того, нарушения экспрессии ТЕ и ламинов могут потенцировать друг друга, способствуя старению. Действительно, в экспериментах на дрозофиле доказана взаимосвязь между возрастным уменьшением ламина В и активацией различных РЭ (Chen H. et al., 2016).

Старение может индуцироваться не только пониженными уровнями ламин, но также их повышенной выработкой (Dreesen et al., 2013). Сходные свойства имеют и ретроэлементы. Например, при исследовании 111 известных РЭ у молодых и старых дрозофил определено не только усиление экспрессии 18 специфических РЭ, но и снижение уровней других 18 РЭ (Chen H. et al., 2016). То есть при старении происходят не просто активация ТЕ или снижение уровней ламин, а разнообразные изменения их экспрессии, которые потенцируют друг друга.

Встает вопрос о том, что первично – дисрегуляция ламин или мобильные генетические элементы. Но в любом случае исследование взаимосвязей ламин с ТЕ может стать основой для определения ключевых механизмов физиологического старения и разработки новых путей продления жизни. Возможно, что изменение уровней ламин и экспрессии ТЕ при старении является корреляцией, а не причинно-следственной связью, однако имеющиеся данные об их взаимосвязях позволяют предположить взаимное потенцирование этих структур при старении.

В различных клетках в геноме человека LINE1 представлены в большом количестве в связанных с ламинами доменах гетерохроматиновых областей на периферии ядра. Сиртуин SIRT7 участвует в эпигенетической транскрипционной репрессии LINE1 по всему геному. Важную роль в этом процессе играет взаимодействие SIRT7 с ламинами А/С. При этом SIRT7 обеспечивает деацетилирование H3K18, способствуя взаимодействию LINE1 с ядерной ламиной. Деацетилирование H3K18 недостаточно для подавления экспрессии LINE1 при отсутствии ламин А/С, а истощение ламин приводит к транскрипционной активации LINE1, т. е. для репрессии LINE1 необходима их взаимосвязь с ламинами А/С (Vazquez et al., 2019).

При исследовании дифференцировки нейтрофилов человека показано, что при суперкомпактизации их генома происходит перемещение центромер, прицентромер и LINE в область ядерной ламин. В дефицитных по LBR клетках это свойство сохранялось для LINE, тогда как для других гетерохроматиновых участков утрачивалось (Zhu et al., 2017). Имеются доказательства взаимосвязи ретроэлементов LTR7/HERV-H, LTR5_{Hs} и L1HS человека с ламин B1. Эти РЭ формируют специфические регуляторные области в геноме, характеризующиеся селективным и сайт-специфическим связыванием с ламин B1, наряду с NANOG гомеобоксом, POU5F1 и CCCEC-связывающимся фактором (Glinsky, 2015).

В то же время существует обратная взаимосвязь, когда ламин В поддерживает целостность ядерного генома путем репрессии ТЕ, что обнаружено в экспериментах на дрозофиле (Chen C.K. et al., 2016). Имеются также сведения о взаимосвязи преламина А с ТЕ, опосредованной фактором BAF, который ингибирует интеграцию ретровирусов, а также находится в белковых комплексах, содержащих транспозазу Sleeping Beauty (Wang et al., 2014). Фактор BAF необходим для модулирования эффекта преламина А на структуру хроматина, так как вызывает индукцию триметилирования гистона H3K9, а также реклокализацию в ядре ассоциированных с ламинами белков LAP2-α и HP1-α (Loi et al., 2016).

Взаимосвязь ламин и транспозонов с вирусами

Поскольку и ламин (Pekovic et al., 2011), и транспозоны (Mustafin, Khusnutdinova, 2019) являются сенсорами средовых стрессорных воздействий, характеризуясь при этом взаимосвязью и возможным потенцированием дисрегуляции при старении, необходимо рассмотреть другие возможные механизмы, влияющие на их активность при старении. В качестве средовых факторов, вызывающих дисрегуляцию ламин и ТЕ, могут служить экзогенные вирусы. Кроме того, участие ламин в вирусной инфекции может стать основой для определения возможных новых путей противовирусной терапии, а также использования вирусных векторов для коррекции процессов старения путем воздействия на специфические ламин.

Индукция ламин А/С происходит в наивных CD4⁺ Т-клетках при распознавании антигена. При этом ламин А/С действуют как связующее звено между ядром и плазматической мембраной во время активации Т-клеток. В экспериментах на мышах показано, что ламин А/С играют роль в ответе на вирус коровьей оспы (Toribio-Fernandez et al., 2018). Белки hnRNP и ламин А/С служат в качестве носителей и медиаторов для перемещения белка p17 между ядром и цитоплазмой реовируса птиц (Chiu et al., 2019). Латентность ВИЧ-1 после интеграции характеризуется обратимым сайленсингом транскрипции, управляемой при помощи LTR генома ВИЧ. Взаимодействующий с ламинами белок SUN2 поддерживает репрессивный хроматин и ингибирует транскрипцию провирусной ДНК, которая регулируется при помощи LTR ВИЧ через взаимосвязь с ламинами А/С. Для блокирования инициации и элонгации транскрипции вируса ламин А/С связывают SUN2 с нуклеосомами к 5'-LTR ВИЧ-1 (Sun et al., 2018).

Выход герпесвирусов из ядра сопровождается изменением архитектуры ЯЛ (Vu et al., 2016). Вирус простого герпеса первого типа индуцирует фосфорилирование и реорганизацию ламин А/С через фактор вирулентности – продукт гена *γ134.5*, что позволяет вирусу выходить через ядро (Wu et al., 2016). В свою очередь, ламин облегчают доступ капсида к внутренней ядерной мембране и искривление ее участков вокруг капсида вируса герпеса во время почкования (Vu et al., 2016).

Лигаза TRIM E3 контролирует репликацию герпесвирусов HSV-1 за счет влияния на целостность ламин через изменение структуры центросом клетки хозяина. TRIM43 убиквитинирует центросомный белок перичентрин, вызывая его протеасомную деградацию. Это приводит к изменениям в ламинах, которые подавляют активное состояние вирусного хроматина (Full et al., 2019). Механизм этого явления связан с тем, что ламин А/С специфически взаимодействует с геномной ДНК вируса на периферии клеточного ядра. При этом ламин подавляет образование гетерохроматина в области промоторов HSV (Silva et al., 2008).

Для проникновения вируса *SV40* важное значение имеет зависящее от каспазы-6 дефосфорилирование ламин А/С (Butin-Israeli et al., 2011). Бакуловирус способствует фосфорилированию ламин В и разрушению ядерной ламин во время инфекции (Zhang et al., 2017). Парвовирус собак

(CPV – canine parvovirus) на поздней стадии инфекции реорганизует ЯЛ со снижением уровней ламинов А/С в апикальной части ядра (Mantyla et al., 2015).

Связь ламинов с вирусами может свидетельствовать о возможном участии ЯЛ во взаимопревращениях вирусов с ТЕ, а также в контролируемых транспозонами регуляторных сетях геномов. Аналогично ламинам, ТЕ участвуют в противовирусном ответе, который может быть обусловлен их филогенетическим родством. В эволюции LTR-РЭ стали источниками возникновения экзогенных ретровирусов (Xiong, Eickbush, 1990). Для ERV различных видов млекопитающих показаны способность переходить в инфекционную форму и превращение обратно в РЭ (Zhuo, Feschotte, 2015). Продукты генов *env* LTR-РЭ вызывают рестрикцию экзогенных ретровирусов у животных (Malfavon-Bořja, 2015). Ферменты РЭ можно использовать также для интеграции экзогенных вирусов в геномы хозяев (Speiseder et al., 2014), а сами вирусы способны оказывать регуляторное влияние на мобильные генетические элементы. Так, цитомегаловирус человека вызывает тканеспецифическую активацию LTR-РЭ (Assinger et al., 2013). Возможными посредниками во взаимодействиях вирусов с ТЕ и ламинами могут служить микроРНК, исследование которых перспективно как для разработки методов замедления процессов старения, так и для противовирусной терапии.

Взаимосвязь ламинов с транспозонами и микроРНК при старении

МикроРНК тесно связаны с регуляцией ламинов (Sylvius et al., 2011; Togo et al., 2018) и мобильных генетических элементов. Более того, доказано происхождение генов микроРНК от транспозонов человека. Впервые данные сведения получены в 2007 г. для 55 (Piriyaongsa et al., 2007), в 2009 г. – 73 (Gu et al., 2009) микроРНК человека, происходящих от мобильных генетических элементов. В 2011 г. выявлена 191 микроРНК. Они возникли от ТЕ (Filshstein et al., 2012). В том же году другой исследовательской группой определено 226 микроРНК человека, произошедших от ТЕ (Yuan et al., 2011). В 2012 г. идентифицировано 235 (Tempel et al., 2012), в 2015 г. – 409 (Qin et al., 2015), а в 2020 г. – 34 новых микроРНК, образованных из генов мобильных генетических элементов. В связи с появлением большого объема информации о возникновении микроРНК из ТЕ создана база данных MDTE (miRNAs derived from TEs). В ней содержатся сведения о микроРНК, происходящих непосредственно из ТЕ (Wei et al., 2016).

Старение – важнейший фактор риска развития онкопатологии, что может быть связано с едиными эпигенетическими механизмами, поскольку при старении происходят глобальное гипометилирование ДНК, активация ТЕ и развитие геномной нестабильности (Anwar et al., 2017). Это подтверждают данные о роли микроРНК в канцерогенезе и старении. Накоплено множество сведений об ассоциации с развитием опухолей различных микроРНК. Создана биоинформационная база данных OncomiR (www.oncomir.org) (Wong et al., 2018). Нами проведен анализ 410 различных микроРНК, представленных в OncomiR, при помощи базы данных MDTE (Wei et al., 2016). Оказалось,

что 94 из этих микроРНК произошли от ТЕ, что говорит об их роли в развитии злокачественных образований и о возможности использования их в качестве мишени для противоопухолевой терапии.

Подобно ТЕ, ламины также играют роль в канцерогенезе. Показано, что дефицит ламина А/С можно использовать как независимый фактор риска развития рака шейки матки (Caro-chichi et al., 2016). Обнаружено, что уровень ламина В1 значительно повышается у больных с гепатоцеллюлярным раком (Abdelghany et al., 2018). Ламин В2 экспрессируется на высоком уровне при немелкоклеточном раке легкого и положительно коррелирует с метастазами в лимфоузлы. Это связано со взаимодействием ламина В2 с циклином D1, активирующим влиянием на экспрессию G9α и повышением уровней H3K9me2. В результате H3K9me2 связывается с промоторной областью гена Е-кадгерина *CDH1* и стимулирует клеточную миграцию (Zhang et al., 2020).

В то же время при раке желудка экспрессия ламина В1 снижается в ткани опухоли, а низкие уровни ламина В1 значительно коррелируют с тяжестью клинической стадии, глубиной инвазии и плохим прогнозом. Более того, в экспериментах продемонстрировано, что ингибирование ламина В1 вызывает пролиферацию и миграцию клеток рака желудка, что обусловлено активацией путей PI3K/PTEN/Akt и MAPK/ERK, а также подавлением p53/h21WAF1/CIP1 (Yu et al., 2020).

Низкие уровни экспрессии ламина А/С при раке специфичны для плохого прогноза. При раке молочной железы (РМЖ) потеря или снижение экспрессии ламина А/С значительно ассоциировали с большими размерами опухоли, плохим прогнозом и развитием отдаленных результатов (снижение сроков выживаемости) (Alhudiri et al., 2019). При сравнении клеточных линий остеобластов и клеток остеосаркомы показана экспрессия у последних более низких уровней ламина А. При этом способность к миграции раковых клеток снижается, когда уровни ламина А повышены (Evangelisti et al., 2020). Таким образом, канцерогенез может быть обусловлен как усилением, так и (наиболее часто) снижением экспрессии или инактивацией ламинов, т. е. их дисрегуляцией.

Такие явления обусловлены глобальным регуляторным влиянием ламинов на экспрессию различных генов. Поэтому важно определить специфические особенности изменения экспрессии ламинов в каждом типе опухоли для таргетного воздействия на них при противоопухолевой терапии. Большинству опухолей свойственно снижение экспрессии ламинов, что может быть одним из ключевых механизмов инициации и поддержания канцерогенеза, поскольку ламины служат защитными системами хозяев, направленными на сайленсинг мобильных генетических элементов. Соответственно, потеря контроля со стороны ламинов приводит к патологической активации ТЕ с последующей геномной нестабильностью и развитием опухоли. Влияние не только сниженных, но и повышенных уровней ламинов на развитие опухолей, вероятно, обусловлено возможностью противоположных регуляторных эффектов ламинов на ТЕ, в зависимости от локализации транспозонов в активных или репрессированных областях генома (Cavaliere et al., 2020).

Аналогично ТЕ, дисрегуляция ламин при старении и канцерогенезе также характеризуется взаимосвязью с изменением уровней микроРНК. Так, мишенью онкогенной miR-129, экспрессия которой повышается при РМЖ, служит ламин А, а мишенью онкосупрессорной miR-218, уровень которой снижается при РМЖ, – ламин В1 (Setijono et al., 2018). Экспрессию *LMNA* в клетках РМЖ подавляет miR-9, что ведет к прогрессированию болезни из-за изменения деформируемости ядра и инвазивной способности клеток (Guinde et al., 2018). Обнаружена способность miR-122 ингибировать пролиферацию клеток гепатоцеллюлярного рака за счет подавления экспрессии ламина В2 (Li et al., 2019). Регулирующая экспрессию ламина В1 miR-351-5p способствует индуцированному флоксуридином апоптозу опухолевых клеток (Sato et al., 2020). Белок LBR является прямой мишенью для miR-222, экспрессия которой повышена в ассоциированных с РМЖ фибробластах по сравнению с нормальными клетками, в связи с чем рассматривается для таргетной терапии (Chatterjee et al., 2019).

В старости у людей снижаются уровни белковых продуктов *LMNB1* в фибробластах и кератиноцитах кожи, что опосредуется влиянием miR-23a (Dreesen et al., 2013). В то же время повышение экспрессии *LMNB1* вследствие дупликации гена при аутосомно-доминантной лейкодистрофии у взрослых ведет к прогрессирующей демиелинизации ЦНС. Это связано с ролью ламина В1 в регуляции формирования миелина и его поддержании при старении. Мишенями miR-23a служат также транскрипт гена *PTEEN* (phosphatase and tensin homolog on chromosome 10) и длинная некодирующая РНК 2700046G09Rik (Lin et al., 2014). Экспрессия *LMNA* подавляется также при помощи miR-124-3p, которая связывается с 3'-UTR гена (Bao et al., 2019). Активация miR-141-3p при репликативном старении снижает активность HDAC1 и HDAC2. Мишенью miR-141-3p является эндопроtease ZMPSTE24 преламина А (Yu et al., 2013).

Как и ТЕ, микроРНК влияют на ламин по принципу взаиморегуляции, поскольку гены микроРНК располагаются в связанных с ламинами областях генома. Так, у мыши обнаружены ассоциированные со старением гены микроРНК на X-хромосоме в кластере, расположенном в связанном с ламиндомеиене (Elias et al., 2019). Длинная некодирующая РНК *Xist* участвует в инактивации X-хромосомы за счет прямого взаимодействия с LBR и ее рекрутирования к ядерной ламине. Это приводит к моделированию трехмерной структуры ДНК, что позволяет *Xist* распределяться по X-хромосоме и вызывать сайленсинг транскрипционно активных генов (Chen C.K. et al., 2016).

В скелетных мышцах больных мышечными дистрофиями, обусловленными мутациями в гене *LMNA*, показана выраженная дисрегуляция 16 различных микроРНК, которые вовлечены в Wnt-сигнальные пути, MAPK и регуляция трансформирующего фактора роста β . Из них 9 микроРНК участвуют в регенеративных процессах (miR-100, -127-3p, -148a, -136*, -192, -335, -376c, -489, -502-3p), а их концентрации выявляются на высоких уровнях в мышцах плода (Sylvius et al., 2011). Экспрессия *LMNA* с мутацией R482W сопровождается увеличением

уровней miR-335, обладающей антилипогенным свойством (Briand et al., 2018). Обнаружено значительное повышение экспрессии *let-7a-5p*, miR-142-3p, miR-145-5p и miR-454-3p у больных с семейной дилатационной кардиомиопатией, связанной с мутациями в *LMNA* (Togo et al., 2018).

Среди микроРНК, ассоциированных с патологией ламин, происхождение от LINE2 доказано для miR-192 и miR-502, от MIR (SINE-РЭ) – для miR-335, согласно базе данных MDTE (Wei et al., 2016). Интересно, что miR-335 играет роль также в физиологическом старении человека и ассоциированной с возрастом неврологической патологии (Raihan et al., 2018). Это, вероятно, обусловлено участием ламин в защите геномов от транспозиций (Cavaliere et al., 2020), а также влиянием ТЕ на эпигенетическую регуляцию ламин. Таким образом, структурно-функциональная взаимосвязь ламин и ТЕ является двусторонней. С одной стороны, ламин участвуют в управлении активностью мобильных генетических элементов, с другой, ТЕ могут оказывать эпигенетическое регуляторное воздействие на ЯЛ, что опосредовано влиянием микроРНК, происходящих из мобильных генетических элементов.

Заключение

Ламин играют важную роль в управлении экспрессией генов и в замалчивании транспозонов, предотвращая, таким образом, геномную нестабильность. Ввиду этого дисрегуляция ламин, главным образом связанная с инактивирующими мутациями в их генах или снижением экспрессии, ведет к активации мобильных генетических элементов. Это обстоятельство согласуется с обнаруженными изменениями уровней ламин при злокачественных новообразованиях, в развитии которых важное значение имеют патологическая активация ТЕ и возникающая вследствие этого геномная нестабильность. Приведенные в настоящем обзоре данные о роли ламин в вирусной инфекции подтверждают это предположение.

Существуют сходные свойства ТЕ и ламин – их дисрегуляция при старении и канцерогенезе, взаимодействие с микроРНК. Кроме того, описанные свойства взаиморегуляции ламин и ТЕ свидетельствуют о потенцировании ТЕ в отношении дисрегуляции ламин, которые, в свою очередь, нарушают экспрессию ТЕ при ламинопатиях, канцерогенезе и физиологическом старении. Определение ключевых изменений ТЕ и происходящих от них микроРНК может стать основой для проведения таргетной терапии ламинопатий, злокачественных новообразований и для продления жизни. Изучение роли ламин во взаимодействии с ТЕ и вирусами является также перспективным направлением в разработке противовирусной терапии и вакцинации.

Список литературы / References

- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506.
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under the influence of stress. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Ge-*

- netics and Breeding*. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506. (in Russian)]
- Abdelghany A.M., Rezk N.S., Osman M.M., Hamid A.I., Al-Breedy A.M., Abdelsattar H.A. Using Lamin B1 mRNA for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma: a cross-selectional diagnostic accuracy study. *F1000Res*. 2018;7:1339. DOI 10.12688/f1000research.14795.1.
- Ahmed M.S., Ikram S., Bibi N., Mir A. Hutchinson–Gilford progeria syndrome: a premature aging disease. *Mol. Neurobiol*. 2018;55:4417-4427. DOI 10.1007/s12035-017-0610-7.
- Alhudiri I.M., Nolan C.C., Ellis I.O., Elzagheid A., Rakha E.A., Green A.R., Chapman C.J. Expression of Lamin A/C in early-stage breast cancer and its prognostic value. *Breast Cancer Res. Treat.* 2019;174(3):661-668. DOI 10.1007/s10549-018-05092-w.
- Andrenacci D., Cavaliere V., Lattanzi G. The role of transposable elements activity in aging and their possible involvement in laminopathic diseases. *Ageing Res. Rev.* 2020;57:1000995. DOI 10.1016/j.arr.2019.100995.
- Anwar S.L., Wulaningsih W., Lehmann U. Transposable elements in human cancer: causes and consequences of deregulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:974. DOI 10.3390/ijms1850974.
- Arancio W. Progerin expression induces a significant downregulation of transcription from human repetitive sequences in iPSC-derived dopaminergic neurons. *Geroscience*. 2019;41:39-49. DOI 10.1007/s11357-018-00050-2.
- Arancio W., Pizzolanti G., Genovese S.I., Pitrone M., Giordano C. Epigenetic involvement in Hutchinson–Gilford progeria syndrome: a mini-review. *Gerontology*. 2014;60:197-203. DOI 10.1159/000357206.
- Assinger A., Yaiw K.C., Gottesdorfer I., Leib-Mosch C., Soderberg-Naucler C. Human cytomegalovirus (HCMV) induces human endogenous retrovirus (HERV) transcription. *Retrovirology*. 2013;10:132. DOI 10.1186/1742-4690-10-132.
- Bao H., Li H.P., Shi Q., Huang K., Chen X., Chen Y., Han Y., Xiao Q., Yao Q., Qi Y. Lamin A/C negatively regulated by miR-124-3p modulates apoptosis of vascular smooth muscle cells during cyclic stretch application in rats. *Acta Physiol. (Oxf.)*. 2019;8:e13374. DOI 10.1111/apha.13374.
- Barascu A., Le Chalony C., Pennarun G., Genet D., Imam N., Lopez B., Bertrand P. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J*. 2012;31:1080-1094. DOI 10.1038/emboj.2011.492.
- Briand N., Cahyani I., Madsen-Osterbye J., Paulen J., Ronningen T., Sorensen A.L., Collas P. Lamin A, chromatin and FPLD2: not just a peripheral *menage-a-trois*. *Front. Cell Dev. Biol.* 2018;6:73. DOI 10.3389/fcell.2018.00073.
- Burla R., La Torre M., Merigliano C., Verni F., Saggio I. Genomic instability and DNA replication defects in progeroid syndromes. *Nucleus*. 2018;9(1):368-379. DOI 10.1080/19491034.2018.1476793.
- Butin-Israeli V., Ben-nun-Shaul O., Kopatz I., Adam S.A., Shimi T., Goldman R.D., Oppenheim A. Simian virus 40 induces lamin A/C fluctuations and nuclear envelope deformation during cell entry. *Nucleus*. 2011;2(4):320-330. DOI 10.4161/nucl.2.4.16371.
- Capo-chichi C.D., Aguida B., Chabi N.W., Cai Q.K., Offrin G., Agosou V.K., Sanni A., Xu X. Lamin A/C deficiency is an independent risk factor for cervical cancer. *Cell. Oncol. (Dordr.)*. 2016;39:59-68. DOI 10.1007/s13402-015-0252-6.
- Cavaliere V., Lattanzi G., Andrenacci D. Silencing of euchromatic transposable elements as a consequence of nuclear lamina dysfunction. *Cells*. 2020;9(3):625. DOI 10.3390/cells9030625.
- Cenni V., Capanni C., Mattioli E., Schena E., Squarzone S., Bacalini M.G., Garagnani P., Salvioli S., Franceschi C., Lattanzi G. Lamin A involvement in aging processes. *Ageing Res. Rev.* 2020;62:101073. DOI 10.1016/j.arr.2020.101073.
- Cenni V., D'Apice M.R., Garagnani P., Colombaro M., Novelli G., Franceschi C., Lattanzi G. Mandibuloacral dysplasia: A premature ageing disease with aspects of physiological ageing. *Ageing Res. Rev.* 2018;42:1-13. DOI 10.1016/j.arr.2017.12.001.
- Chatterjee A., Jana S., Chatterjee S., Wastall L.M., Nargis N., Roy H., Hughes T., Bhattacharyya A. MicroRNA-222 reprogrammed cancer-associated fibroblasts enhance growth and metastasis of breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2019;121(8):679-689. DOI 10.1038/s41416-019-0566-7.
- Chen C.K., Blanco M., Jackson C., Aznauryan E., Ollikainen N., Surka C., Chow A., Ceras A., McDonel P., Guttman M. Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing. *Science*. 2016;354(6311):468-472. DOI 10.1126/science.aae0047.
- Chen H., Zheng X., Xiao D., Zheng Y. Age-associated de-repression of retrotransposons in the *Drosophila* fat body, its potential cause and consequence. *Ageing Cell*. 2016;15(3):542-552. DOI 10.1111/accel.12465.
- Chiu H.C., Huang W.R., Wang Y.Y., Li J., Liao T., Nielsen B.L., Liu H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and lamin A/C modulate nucleocytoplasmic shuttling of avian reovirus p17. *J. Virol*. 2019;93(20):e00851-19. DOI 10.1128/JVI.00851-19.
- Cibulka J., Fraiberk M., Forstova J. Nuclear actin and lamins in viral infections. *Viruses*. 2012;4(3):325-347. DOI 10.3390/v4030325.
- De Cecco M., Ito T., Petrashen A.P., Elias A., Skvir N.J., Criscione S.W., Caligiana A., Broccoli G., Neretti N., Sedivy J.M. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*. 2019;572(7767):E5. DOI 10.1038/s41586-019-1350-9.
- Dreesen O., Cojnowski A., Ong P.F., Zhao T.Y., Common J.E., Lunny D., Lane E.B., Vardy L.A., Stewart C.L., Colman A. Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *J. Cell. Biol.* 2013;200(5):605-617. DOI 10.1083/jcb.201206121.
- Elias A.E., Kun B., Sabula I.M.C. The mir-465 family is upregulated with age and attenuates growth hormone signaling in mouse liver. *Ageing Cell*. 2019;18(2):e12892. DOI 10.1111/accel.12892.
- Elsner D., Meusemann K., Korb J. Longevity and transposon defense, the case of termite reproductives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115(21):5504-5509. DOI 10.1073/pnas.1804046115.
- Evangelisti C., Paganelli F., Giuntini G., Mattioli E., Cappellini A., Ramazzotti G., Faenza I., Maltarello M.C., Martelli A.M., Scotlandi K., Chiarini F., Lattanzi G. Lamin A and prelamin A counteract migration of osteosarcoma cells. *Cells*. 2020;9(3):774. DOI 10.3390/cells9030774.
- Filshstein T.J., Mackenzie C.O., Dale M.D., Dela-Cruz P.S., Ernst D.M., Frankenberger E.A., He C., Heath K.L., Jones A.S., Jones D.K., King E.R., Maher M.B., Mitchell T.J., Morgan R.R., Sirobhushnam S., Halkyard S.D., Tiwari K.B., Rubin D.A., Borchert G.M., Larson E.D. Origin-based identification of microRNA targets. *Mob. Genet. Elements*. 2012;2(4):184-192. DOI 10.4161/mge.21617.
- Full F., van Gent M., Sparrer K.M.J., Chiang C., Zurenski M.A., Scherer M., Brockmeyer N.H., Heinzerling L., Sturz M., Korn K., Stamminger T., Ensser A., Gack M.U. Centrosomal protein TRIM43 restricts herpesvirus infection by regulating nuclear lamina integrity. *Nat. Microbiol.* 2019;4:164-176. DOI 10.1038/s41564-018-0285-5.
- Gargiuli C., Schena E., Mattioli E., Greggi T., Lattanzi G. Lamins and bone disorders: current understanding and perspectives. *Oncotarget*. 2018;9(32):22817-22831. DOI 10.18632/oncotarget.25071.
- Garvalov B.K., Muhammad S., Dobrova G. Lamin B1 in cancer and aging. *Ageing (Albany NY)*. 2019;11:7336-7338. DOI 10.18632/ageing.102306.
- Glinsky G.V. Transposable elements and DNA methylation create in embryonic stem cells human-specific regulatory sequences associated with distal enhancers and noncoding RNAs. *Genome Biol. Evol.* 2015;7(6):1432-1454. DOI 10.1093/gbe/evv081.
- Gu T.J., Yi X., Zhao X.W., Zhao Y., Yin J.Q. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics*. 2009;10:563. DOI 10.1186/1471-2164-10-563.
- Guelen L., Pagie L., Brasset E., Meuleman W., Faza M.B., Talhout W., Eussen B.H., de Klein A., Wessels L., de Laat W., van Steensel B. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping

- of nuclear lamina interactions. *Nature*. 2008;453(7197):948-951. DOI 10.1038/nature06947.
- Guinde J., Frankel D., Perrin S., Kaspi E. Lamins in lung cancer: Biomarkers and key factors for disease progression through miR-9 regulation? *Cells*. 2018;7(7):78. DOI 10.3390/cells7070078.
- Jia Y., Vong J.S., Asafova A., Garvalov B.K., Caputo L., Cordero J., Singh A., Boettger T., Gunther S., Fink L., Acker T., Barreto G., Seeger W., Braun T., Savai R., Dobreva G. Lamin B1 loss promotes lung cancer development and metastasis by epigenetic derepression of RET. *J. Exp. Med.* 2019;216(6):1377-1395. DOI 10.1084/jem.20181394.
- Juliano C.E., Reich A., Liu N., Gotzfriend J., Zhong M., Uman S., Reenan R.A., Wessel G.M., Steele R.E., Lin H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs function in *Hydra* somatic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111(1):337-342. DOI 10.1073/pnas.1320965111.
- Jung H.J., Coffinier C., Choe Y., Beigneux A.P., Davies B.S.J., Yang S.H., Barnes R.H. 2nd, Hong J., Sun T., Pleasure S.J., Young S.G., Fong L.G. Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(7):E423-E431. DOI 10.1073/pnas.1111780109.
- Kollmar M. Polyphyly of nuclear lamin genes indicates an early eukaryotic origin of the metazoan-type intermediate filament proteins. *Sci. Rep.* 2015;5:10652. DOI 10.1038/srep10652.
- Koreny L., Field M.C. Ancient eukaryotic origin and evolutionary plasticity of nuclear lamina. *Genome Biol. Evol.* 2016;8(9):2663-2671. DOI 10.1093/gbe/evw087.
- Kreienkamp R., Graziano S., Coll-Bonfill N., Bedia-Diaz G., Cybulka E., Vindigni A., Dorsett D., Kubben N., Batista L.F.Z., Gonzalo S. A cell-intinsic interferon-like response links replication stress to cellular ageing caused by progerin. *Cell Rep.* 2018;22(8):2006-2015. DOI 10.1016/j.celrep.2018.02.090.
- Lemaitre C., Bickmore W.A. Chromatin at the nuclear periphery and the regulation of genome functions. *Histochem. Cell Biol.* 2015;144(2):111-122. DOI 10.1007/s00418-015-1346-y.
- Li X.N., Yang H., Yang T. MiR-122 inhibits hepatocarcinoma cell progression by targeting LMNB2. *Oncol. Res.* 2019;28:41-49. DOI 10.3727/096504019X1561579.
- Lin S., Heng M.Y., Ptacek L.J., Fu Y. Regulation of myelination in the central nervous system by nuclear lamin B1 and non-coding RNAs. *Transl. Neurodegener.* 2014;3(1):4. DOI 10.1186/2047-9158-3-4.
- Loi M., Cenni V., Duchi S., Squarzone S., Lopez-Otin C., Foisner R., Lattanzi G., Capanni C. Barrier-to-autointegration factor (BAF) involvement in preamin A-related chromatin organization changes. *Oncotarget*. 2016;7(13):15662-15677. DOI 10.18632/oncotarget.6697.
- Malfavon-Borja R., Feschotte C. Fighting fire with fire: endogenous retrovirus envelopes as restriction factors. *J. Virol.* 2015;89(8):4047-4050. DOI 10.1128/JVI.03653-14.
- Mantyla E., Niskanen E.A., Ihalainen T.O., Vihinen-Ranta M. Reorganization of nuclear pore complexes and the lamina in late-stage parvovirus infection. *J. Virol.* 2015;89(22):11706-11710. DOI 10.1128/JVI.01608-15.
- Meinke P., Mattioli E., Haque F., Antoku S., Columbaro M., Straatman K.R., Worman H.J., Gundersen G.G., Lattanzi G., Wehnert M., Shackleton S. Muscular dystrophy-associated SUN1 and SUN2 variants disrupt nuclear-cytoskeletal connections and myonuclear organization. *PLoS Genet.* 2014;10(9):e1004605. DOI 10.1371/journal.pgen.1004605.
- Pekovic V., Gibbs-Seymour I., Markiewicz E., Alzogaiba F., Benham A.M., Edwards R., Wehnert M., von Zglincki T., Hutchison C.J. Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation. *Aging Cell*. 2011;10(6):1067-1079. DOI 10.1111/j.1474-9726.2011.00750.x.
- Piriyaopongsa J., Marino-Ramirez L., Jordan I.K. Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements. *Genetics*. 2007;176(2):1323-1337. DOI 10.1534/genetics.107.072553.
- Raihan O., Brishti A., Molla M.R., Li W., Zhang Q., Xu P., Khan M.I., Zhang J., Liu Q. The age-dependent elevation of miR-335-3p leads to reduced cholesterol and impaired memory in brain. *Neuroscience*. 2018;390:160-173. DOI 10.1016/j.neuroscience.2018.08.003.
- Qin S., Jin P., Zhou X., Chen L., Ma F. The role of transposable elements in the origin and evolution of microRNAs in human. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131365. DOI 10.1371/journal.pone.0131365.
- Santi S., Cenni V., Capanni C., Lattanzi G., Mattioli E. PCAF Involvement in Lamin A/C-HDAC2 interplay during the early phase of muscle differentiation. *Cells*. 2020;9(7):1735. DOI 10.3390/cells9071735.
- Sato A., Ogino Y., Shimotsuma A., Hiramoto A., Kim H., Wataya Y. Direct interaction analysis of microRNA-351-5p and nuclear scaffold lamin B1 mRNA by the cell-free in vitro mRNA/miRNA binding evaluation system. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2020;39(6):799-805. DOI 10.1080/15257770.2019.1702675.
- Seipel K., Yanze N., Schmid V. The germ line and somatic stem cell gene *Cniwi* in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Int. J. Dev. Biol.* 2004;48(1):1-7. DOI 10.1387/ijdb.15005568.
- Setijono S.R., Park M., Kim G., Kim Y., Cho K.W., Song S.J. miR-218 and miR-129 regulate breast cancer progression by targeting Lamins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;496:826-833. DOI 10.1016/j.bbrc.2018.01.146.
- Silva L., Cliffe A., Chang L., Knipe D.M. Role for A-type lamins in herpesviral DNA targeting and heterochromatin modulation. *PLoS Patholog.* 2008;4(5):e1000071. DOI 10.1371/journal.ppat.1000071.
- Speiseder T., Nevels M., Dobner T. Determination of the transforming activities of adenovirus oncogenes. *Methods Mol. Biol.* 2014;1089:105-115. DOI 10.1007/978-1-62703-679-5_8. PMID: 24132481.
- Sun W.W., Jiao S., Sun L., Zhou Z., Jin X., Wang J. SUN2 modulates HIV-1 infection and latency through association with lamin A/C to maintain the repressive chromatin. *mBio*. 2018;9:e02408-17. DOI 10.1128/mBio.02408-17.
- Sylvius N., Bonne G., Straatman K., Reddy T., Gant T.W., Shackleton S. MicroRNA expression profiling in patients with lamin A/C-associated muscular dystrophy. *FASEB J.* 2011;25:3966-3978. DOI 10.1096/fj.11-182915.
- Tempel S., Pollet N., Tahi F. NcRNAClassifier: a tool for detection and classification of transposable element sequences in RNA hairpins. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:246-258. DOI 10.1186/1471-2105-13-246.
- Toribio-Fernandez R., Zorita V., Rocha-Perugini V., Iborra S., Hoyo G.M., Andres V., Gonzalez-Granado J. Lamin A/C augments Th1 differentiation and response against vaccinia virus and *Leishmania major*. *Cell Death Dis.* 2018;9:9. DOI 10.1038/s41419-017-0007-6.
- Toro R., Blasco-Turrion S., Morales-Ponce F.J., Gonzalez P., Mangas A., Llorente-Cortes V., Gonzalo-Calvo D. Plasma microRNA as biomarkers for Lamin A/C-related dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Med. (Berl.)*. 2018;96(8):845-856. DOI 10.1007/s00109-018-1666-1.
- Turgay Y., Eibauer M., Goldman A.E., Shimi T., Khayat M., Ben-Harush K., Dubrovsky-Gaupp A., Sapra K.T., Goldman R.D., Medalia O. The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature*. 2017;543(7644):261-264. DOI 10.1038/nature21382.
- Vazquez B.N., Thackray J.K., Simonet N.G., An W., Vaquero A., Tischfield J.A., Serrano L. SIRT7 mediates L1 elements transcriptional repression and their association with the nuclear lamina. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(15):7870-7885. DOI 10.1093/nar/gkz519.
- Vu A., Poyzer C., Roller R. Extragenic suppression of a mutation in herpes simplex virus 1 UL34 that affects lamina disruption and nuclear egress. *J. Virol.* 2016;90(23):10738-10751. DOI 10.1128/JVI.01544-16.
- Wang Y., Lichter-Konecki U., Anyane-Yeboah K., Shaw J.E., Lu J.T., Ostlund C., Shin J., Clark L.N., Gundersen G.G., Nagy P.L., Worman H.J. A mutation abolishing the ZMPSTE24 cleavage site in prelamin A causes a progeroid disorder. *J. Cell. Sci.* 2016;129(10):1975-1980. DOI 10.1242/jcs.187302.

- Wang Y., Wang J., Devaraj A., Izsvak Z. Suicidal autointegration of sleeping beauty and piggyBac transposons in eukaryotic cells. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004103. DOI 10.1371/journal.pgen.1004103.
- Wei G., Qin S., Li W., Chen L., Ma F. MDTE DB: a database for microRNAs derived from transposable element. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 2016;13(6):1155-1160. DOI 10.1109/TCBB.2015.2511767.
- Wong N.W., Chen Y., Chen S., Wang X. OncomiR: an online resource for exploring pan-cancer microRNA dysregulation. *Bioinformatics.* 2018;34:713-715.
- Wu S., Pan S., Zhang L., Baines J., Roller R., Zhang C., Cao Y., He B. Herpes simplex virus 1 induces phosphorylation and reorganization of lamin A/C through the y134.5 protein that facilitates nuclear egress. *J. Virol.* 2016;90(22):10414-10422. DOI 10.1128/JVI.01392-16.
- Xiong Y., Eickbush T.H. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequence. *EMBO J.* 1990;9(10):3353-3362.
- Yu K.R., Lee S., Jung J.W., Hong I., Kim H., Seo Y., Shin T., Kang K.S. MicroRNA-141-3p plays a role in human mesenchymal stem cell ageing by directly targeting ZMPSTE24. *J. Cell Sci.* 2013;126:5422-5431. DOI 10.1242/jcs.133314.
- Yu Z.Y., Jiang X.Y., Zhao R.R., Luo C.J., Ren Y.X., Ma Z.J., Ye H.L., Shi W.G., Wang C., Jiao Z.Y. Lamin B1 deficiency promotes malignancy and predicts poor prognosis in gastric cancer. *Neoplasma.* 2020;67(6):1303-1313. DOI 10.4149/neo_2020_200109N33.
- Yuan Z., Sun X., Liu H., Xie J. MicroRNA genes derived from repetitive elements and expanded by segmental duplication events in mammalian genomes. *PLoS One.* 2011;6:e17666. DOI 10.1371/journal.pone.0017666.
- Yue S., Zheng X., Zheng Y. Cell-type-specific role of lamin-B1 in thymus development and its inflammation-driven reduction in thymus aging. *Aging Cell.* 2019;18:e12952. DOI 10.1111/ace1.12952.
- Zhang M.Y., Han Y.C., Han Q., Liang Y., Luo Y., Wei L., Yan T., Yang Y., Liu S.L., Wang E.H. Lamin B2 promotes the malignant phenotype of non-small cell lung cancer cells by upregulating dimethylation of histone 3 lysine 9. *Exp. Cell Res.* 2020;393(2):112090. DOI 10.1016/j.yexcr.2020.112090.
- Zhang X., Xu K., Wei D., Wu W., Yang K., Yuan M. Baculovirus infection induces disruption of the nuclear lamina. *Sci. Rep.* 2017;7(1):7823. DOI 10.1038/s41598-017-08437-5.
- Zhu Y., Gong K., Denholtz M., Chandra V., Kamps M.P., Alber F., Murre C. Comprehensive characterization of neutrophil genome topology. *Genes Dev.* 2017;31(2):141-153. DOI 10.1101/gad.293910.116.
- Zhuo X., Feschotte C. Cross-species transmission and differential fate of an endogenous retrovirus in three mammal lineages. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1005279. DOI 10.1371/journal.ppat.1005279.

ORCID ID

R.N. Mustafin orcid.org/0000-0002-4091-382X

E.K. Khusnutdinova orcid.org/0000-0003-2987-3334

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.03.2021. После доработки 23.05.2021. Принята к публикации 28.09.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Транскрипционная активность генов репарации, апоптоза и клеточного цикла (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) у хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза лимфоцитов периферической крови

В.С. Никифоров^{1,2}✉, Е.А. Блинова^{1,2}, А.И. Котикова^{1,2}, А.В. Аклеев^{1,2}

¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России, Челябинск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

✉ nikiforovx@mail.ru

Аннотация. Исследовали транскрипционную активность генов, вовлеченных в поддержание генетического гомеостаза клетки (репарации, клеточного цикла и апоптоза: *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*), у лиц, подвергшихся хроническому радиационному облучению, с повышенной интенсивностью раннего, позднего апоптоза и некроза лимфоцитов периферической крови. Объектом изучения служили мононуклеарные клетки периферической крови, полученные от 132 жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому облучению. Доза облучения красного костного мозга составляла 426.4 ± 48.2 мГр (1.3–2930.0 мГр), доза облучения тимуса и периферических органов иммунной системы – 58.9 ± 7.9 мГр (0.1–489.0 мГр). Исследование проводили в отдаленные сроки (более 60 лет с начала облучения), возраст людей на время проведения обследования был 68 ± 0.6 года (55–86 лет). Анализ апоптотической и некротической гибели лимфоцитов периферической крови основывался на наличии на поверхности мембраны клеток фосфолипида фосфатидилсерина, а также ее проницаемости для интеркалирующего ДНК-красителя. Оценку относительного содержания мРНК генов репарации, клеточного цикла и апоптоза проводили с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. В группе хронически облученных людей с повышенной интенсивностью раннего апоптоза отмечено увеличение относительного содержания мРНК гена *PADI4* ($p = 0.006$). Для хронически облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза зафиксирована модуляция относительного содержания мРНК генов *TP53* ($p = 0.013$) и *BCL-2* ($p = 0.021$). В отдаленные сроки у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью некроза лимфоцитов периферической крови отмечен статистически значимый рост транскрипционной активности гена *TP53* ($p = 0.015$). Установлено, что у облученных людей с повышенной интенсивностью апоптоза регистрируются в первую очередь изменения со стороны транскрипционной активности апоптотических генов, что согласуется с существующими представлениями об активации программированной гибели клеток.

Ключевые слова: мРНК; апоптоз; некроз; лимфоциты; хроническое облучение.

Для цитирования: Никифоров В.С., Блинова Е.А., Котикова А.И., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов репарации, апоптоза и клеточного цикла (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) у хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза лимфоцитов периферической крови. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):50-58. DOI 10.18699/VJGB-22-08

Transcriptional activity of repair, apoptosis and cell cycle genes (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) in chronically exposed persons with different intensity of apoptosis of peripheral blood lymphocytes

V.S. Nikiforov^{1,2}✉, E.A. Blinova^{1,2}, A.I. Kotikova^{1,2}, A.V. Akleyev^{1,2}

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

✉ nikiforovx@mail.ru

Abstract. Transcriptional activity of genes involved in maintaining genetic homeostasis (genes for repair, cell cycle and apoptosis: *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) was studied in chronically exposed persons with an increased intensity of early and late stages of apoptosis and necrosis of

peripheral blood lymphocytes. The object of this study was peripheral blood mononuclear cells obtained from 132 chronically exposed residents of the Techa riverside villages. The mean accumulated dose to red bone marrow was 426.4 ± 48.2 mGy (1.3–2930.0 mGy), to thymus and peripheral immune organs, 58.9 ± 7.9 mGy (0.1–489.0 mGy). The study was performed more than 60 years after the onset of exposure, the average age of exposed persons was 68 ± 0.6 years (55–86 years). The study of apoptotic and necrotic death of peripheral blood lymphocytes was based on the presence of phosphatidylserine on the cell membrane surface, as well as on its permeability for DNA-intercalating dye. Evaluation of the relative content of mRNA genes for repair, cell cycle, and apoptosis was carried out using real-time PCR. An increased relative content of *PADI4* gene mRNA was registered in the group of chronically exposed persons with the increased intensity of early apoptosis ($p = 0.006$). Modulation of the relative content of mRNA of the *TP53* ($p = 0.013$) and *BCL-2* ($p = 0.021$) genes was detected in the group of chronically exposed individuals with the increased intensity of the late stage of apoptosis. A statistically significant increase in the transcriptional activity of the *TP53* gene was observed in the group of chronically exposed persons with the increased intensity of peripheral blood lymphocyte necrosis in the long-term period ($p = 0.015$). In the course of the study it was noted that exposed people with increased intensity of apoptosis, first of all, demonstrate changes in the transcriptional activity of apoptotic genes. These data are consistent with current views on the activation of programmed cell death.

Key words: mRNA; apoptosis; necrosis; lymphocytes; chronic exposure.

For citation: Nikiforov V.S., Blinova E.A., Kotikova A.I., Akleyev A.V. Transcriptional activity of repair, apoptosis and cell cycle genes (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) in chronically exposed persons with different intensity of apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):50-58. DOI 10.18699/VJGB-22-08

Введение

Ионизирующее излучение – фактор, способный приводить к изменению транскрипционной активности генов, выполняющих ключевую роль в поддержании стабильности клеточного гомеостаза (Kabacik et al., 2011). Сложные молекулярные ответы на генотоксический стресс запускают множество регуляторных механизмов, включая апоптоз (Zeegers et al., 2017).

Процесс апоптоза играет важную роль в реализации как ранних, так и отдаленных эффектов действия ионизирующего излучения (Verheij, Bartelink, 2000). Его активация начинается с изменения экспрессии генов, регулирующих процессы репарации повреждений ДНК, контроля клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки клеток и др. (Verheij, Bartelink, 2000). По мере реализации клеточной гибели разворачивается генетическая программа, регулирующая баланс внутриклеточных про- и антиапоптозных факторов. На ранней стадии апоптоза на внешней поверхности мембраны начинает экспрессироваться фосфатидилсерин, однако его наличие не является обязательным условием успешной реализации клеточной гибели, большое значение имеют его концентрация и образование комплекса с другими белками, что служит сигналом к распознаванию апоптотических клеток фагоцитами (Bevers, Williamson, 2016).

Важную роль в активации сигнального каскада, запускающего апоптотическую гибель клеток, играет белок p53, который регулирует апоптотические гены, кодирующие белки клеточной мембраны (CD95, DR5), белки цитоплазмы и белки, локализованные на мембране митохондрий (белки семейства BCL-2) (Chiruk, 2006). Кроме того, соотношение белков BAX/BCL-2 обуславливает реализацию апоптотической гибели клеток. Показано, что при ионизирующем излучении инициация апоптоза происходит на фоне ранней репрессии гена *BAX* и повышения активности *BCL-2* в клетках крови человека (Azimian et al., 2015).

В физиологических условиях поддерживается строгое равновесие про- и антиапоптотических белков, однако

после радиационного воздействия, а также при наличии различных патологических состояний наблюдается смещение этого баланса, обусловленное изменением экспрессии генов, принимающих участие в апоптозе. В связи с этим изучение транскрипционной активности генов, контролирующих пролиферацию и гибель клеток, – актуальная задача радиационной биологии, поскольку нарушения процесса апоптоза способствуют развитию патологических состояний, которые могут сопровождаться сохранением в облученном организме клеток с неограниченным пролиферативным потенциалом (Барышников, Шишкин, 2002) или развитием цитопенических состояний, связанных с повышенной гибелью клеток (Квачева, 2000).

В ранее проведенных исследованиях у хронически облученных жителей прибрежных сел реки Течи зарегистрированы изменения интенсивности апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови в отдаленные сроки (Блинова и др., 2020a). Кроме того, показано изменение транскрипционной активности со стороны апоптотических генов, которое сопровождалось снижением относительного содержания мРНК гена *BCL-2* и увеличением относительного содержания мРНК гена *BAX* у облученных лиц спустя более 60 лет после начала хронического радиационного воздействия (Никифоров и др., 2020).

Следующий этап работы – исследование относительного содержания мРНК генов, вовлеченных в клеточный гомеостаз, у жителей прибрежных сел р. Течи, которые отличаются нарушением механизма элиминации клеток, а именно повышенной интенсивностью апоптотической и некротической гибели клеток.

В связи с этим целью исследования заключалась в количественной оценке содержания мРНК генов *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3* и *GATA3* в отдаленные сроки у хронически облученных жителей прибрежных сел р. Течи, имеющих повышенную частоту лимфоцитов периферической крови (ЛПК), находящихся на разных стадиях апоптоза и некроза.

Материалы и методы

Объектом исследования служили ЛПК 132 жителей прибрежных сел р. Течи, подвергшиеся хроническому радиационному воздействию в 1949–1950 гг. (Последствия..., 2016). Средняя накопленная доза облучения красного костного мозга всех обследованных людей составила 426.4 ± 48.2 мГр (1.3–2930.0 мГр), средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических органов иммунной системы была 58.9 ± 7.9 мГр (0.1–489.0 мГр). Средний возраст людей на время проведения обследования составлял 68 ± 0.6 года (55–86 лет).

Облученные лица были условно разделены по принципу превышения критического значения интенсивности апоптоза и некроза ЛПК, которая была рассчитана по формуле (1), в контрольной группе лиц, не подвергавшихся аварийному радиационному воздействию (контрольная группа составила 32 человека, проживающих в сходных социально-экономических условиях, но не подвергавшихся хроническому радиационному воздействию). Средний возраст на момент обследования составил 67 ± 1.25 года (57–81 год).

$$\text{Интенсивность апоптоза} = \frac{\sum x}{n} + 2\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (1)$$

где $\frac{\sum x}{n}$ – среднее значение частоты апоптоза/некроза ЛПК;

$\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ – стандартное отклонение.

Среднее значение частоты клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза в группе необлученных людей, составило 3.04, стандартное отклонение – 4.52. Среднее значение частоты клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза в группе сравнения, было 0.03, стандартное отклонение – 0.06. Среднее значение частоты клеток, находящихся на стадии некроза в группе сравнения, было 0.02, стандартное отклонение – 0.04. Таким образом, критическое значение частоты клеток для раннего апоптоза составило 12.08, для позднего апоптоза – 0.15 и для некроза – 0.1. Облученные лица, у которых частоты клеток на

разных этапах апоптотической гибели превышали критические значения, попадали в группы людей с повышенной частотой апоптоза/некроза лимфоцитов периферической крови (табл. 1).

Кровь для исследования апоптотической/некротической гибели ЛПК брали из локтевой вены в объеме 6 мл в пробирки типа Vacuette с Li-гепарином (Improvacuter, Китай). Исследование проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов Annexin V FITC (BD, Франция). Выделение лейкоцитарной фракции из цельной крови проходило на градиенте плотности фиколл-урографина (плотность $1077\text{--}1078$ г/см³) в соответствии со стандартной методикой (Хейфец, Абалакин, 1973). К клеточной суспензии добавляли рекомбинантный человеческий Annexin-V, конъюгированный с FITC, и ДНК-связывающий краситель PI. В ходе анализа были выделены популяции клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза, а также на стадии некроза. Данные в виде процентного соотношения клеток, вступивших на ту или иную стадию апоптоза и некроза, представлены в табл. 1.

Для оценки относительного содержания мРНК кровь брали из локтевой вены в объеме 3 мл в стерильные вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (Applied Biosystem, США). Выделение РНК осуществляли колоночным методом при помощи набора Tempus Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystem). Информацию о концентрации и чистоте выделенных образцов РНК получали с применением спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Чистоту препарата оценивали по значениям поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280). Отношение оптических плотностей, измеренных при A260/280 для очищенной РНК, выделенной из всех образцов крови, составило 2.1 ± 0.02 . Выход общей РНК был от 50 до 90 мкг/мл. Реакцию обратной транскрипции для синтеза кДНК проводили с использованием коммерческого набора реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem). Относитель-

Таблица 1. Характеристика обследованных людей

Группы хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза и некроза		Кол-во человек	Частота апоптотических клеток, % M ± SD	Возраст на момент проведения обследования, лет M ± SD	Накопленная доза облучения ККМ, мГр M ± SE	Накопленная доза облучения тимуса и периферических органов иммунной системы, мГр
Ранний апоптоз	Нормальная интенсивность	104	5.69 ± 2.46 (0.1–11.75)	68.19 ± 0.6 (55–86)	427.6 ± 58.1 (1.3–2930.0)	62.7 ± 9.65 (0.15–489.0)
	Повышенная интенсивность	26	17.17 ± 4.25 (13.09–30.45)	67.69 ± 1.3 (58–85)	415.5 ± 75.4 (10.4–1226.3)	41.3 ± 10.5 (0.74–252.2)
Поздний апоптоз	Нормальная интенсивность	88	0.05 ± 0.04 (0–0.14)	68.00 ± 0.7 (56–86)	380.2 ± 47.3 (2.13–187.1)	52.9 ± 8.1 (0.15–456.2)
	Повышенная интенсивность	43	0.67 ± 0.75 (0.15–3.66)	68.61 ± 0.9 (55–82)	523.1 ± 109.6 (1.3–2930.0)	70.7 ± 17.7 (0.18–489.0)
Некроз	Нормальная интенсивность	106	0.02 ± 0.02 (0–0.09)	67.91 ± 0.6 (56–86)	395.4 ± 50.5 (1.3–2870.5)	59.5 ± 9.26 (0.2 – 489.0)
	Повышенная интенсивность	26	0.31 ± 0.36 (0.1–1.86)	69.31 ± 1.4 (55–82)	548.5 ± 130.4 (2.1–2930.0)	56.9 ± 14.5 (0.2–300.2)

Таблица 2. Относительное содержание мРНК (отн. ед.) генов в группах обследованных лиц с разной интенсивностью раннего апоптоза ЛПК ($M \pm SE$; min–max)

Ген	Облученные лица с частотой апоптоза ЛПК на ранней стадии		<i>p</i>
	нормальная, <i>N</i> = 106	повышенная, <i>N</i> = 26	
<i>TP53</i>	1.15 ± 0.04 (0.31–2.55)	1.05 ± 0.05 (0.59–1.46)	0.523
<i>MDM2</i>	1.06 ± 0.05 (0.37–2.27)	1.08 ± 0.08 (0.39–2.22)	0.629
<i>BCL-2</i>	1.06 ± 0.05 (0.28–2.48)	0.90 ± 0.08 (0.23–2.01)	0.106
<i>OGG1</i>	0.98 ± 0.03 (0.34–2.00)	0.94 ± 0.07 (0.42–1.69)	0.460
<i>ATM</i>	0.99 ± 0.02 (0.55–1.83)	1.00 ± 0.06 (0.32–1.67)	0.441
<i>BAX</i>	1.12 ± 0.03 (0.40–1.81)	1.17 ± 0.07 (0.61–1.96)	0.438
<i>XPC</i>	1.07 ± 0.02 (0.68–1.73)	1.10 ± 0.05 (0.70–1.66)	0.693
<i>CDKN1A</i>	0.99 ± 0.05 (0.43–1.51)	0.98 ± 0.05 (0.48–1.45)	0.756
<i>STAT3</i>	1.05 ± 0.06 (0.21–2.71)	1.08 ± 0.13 (0.28–2.60)	0.919
<i>GATA3</i>	1.05 ± 0.07 (0.27–2.82)	1.03 ± 0.10 (0.39–2.50)	0.664
<i>MAPK8</i>	1.17 ± 0.07 (0.26–2.85)	1.14 ± 0.13 (0.32–2.07)	0.864
<i>NF-KB1</i>	0.99 ± 0.07 (0.22–2.88)	0.94 ± 0.12 (0.32–2.39)	0.610
<i>PADI4</i>	0.93 ± 0.07 (0.18–2.79)	1.37 ± 0.14 (0.30–2.51)	0.006

ное количественное содержание мРНК определяли с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

Определение относительного количества мРНК в исследуемых образцах выполняли $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -методом. Данные оценивали относительно уровня мРНК генов домашнего хозяйства *COMT* и *B2M* и усредненных значений группы сравнения. Анализ кривых амплификации осуществляли в программе Bio-Rad CFX Manager 2.1 (Bio-Rad Laboratories) методом пороговой линии. Расчет делали с учетом трех повторов для каждого гена и эффективности амплификации, полученной путем построения калибровочных кривых. Олигонуклеотидная последовательность праймеров, температурные условия ПЦР-РВ взяты из зарубежных работ и адаптированы к нашим экспериментам. Характеристика праймеров детально описана в работах (Блинова и др., 2020б; Никифоров и др., 2020).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Statistica 10.0 и SigmaPlot. Проверку выборок на нормальность распределения данных осуществляли с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку многие из исследованных показателей не имели нормального распределения, для сравнения групп использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни и H-критерий Краскела–Уоллиса. Результаты представлены в виде среднего значения, ошибки среднего значения и диапазона данных (*M*; min–max) в табл. 2–4.

С целью выявления зависимостей изменения относительного содержания мРНК исследуемых генов от радиационных факторов (дозы облучения красного костного мозга (ККМ), тимуса и периферических органов иммунной системы) использовали корреляционно-регрессионный анализ, который был проведен без учета измерений, выделяющихся из общей выборки (выбросов). Для исключения ошибки формулировки гипотезы уровень значимости брали $p \leq 0.05$ с учетом поправки на множественные сравнения.

Результаты

Транскрипционная активность генов у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью раннего апоптоза

В рамках исследования зафиксировано статистически значимое увеличение (в 1.5 раза) относительного содержания мРНК гена *PADI4* в группе облученных людей с повышенной интенсивностью раннего апоптоза ЛПК по сравнению с облученными людьми, имеющими нормальную интенсивность раннего апоптоза ЛПК (см. табл. 2).

Увеличение относительного содержания мРНК гена *PADI4* обусловлено смещением медианных данных в область высоких значений в группе хронически облученных лиц с повышенной интенсивностью раннего апоптоза ЛПК, а не изменением транскрипционной активности этого гена у отдельных облученных людей (рис. 1).

Проверка связи относительного содержания мРНК с дозовыми характеристиками (накопленной дозой облучения ККМ и накопленной дозой облучения тимуса и периферических органов иммунной системы) в группе облученных людей с повышенной интенсивностью раннего апоптоза не выявила статистически значимых зависимостей.

Транскрипционная активность генов у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза

При исследовании поздней стадии апоптоза показано, что у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза наблюдается статистически значимое увеличение содержания мРНК генов *TP53* и *BCL-2* по сравнению с облученными лицами, имеющими нормальную частоту ЛПК на поздней стадии апоптоза (см. табл. 3). Распределение данных продемонстрировано на рис. 2.

В результате корреляционного анализа у хронически облученных лиц с повышенной частотой ЛПК на поздней стадии апоптоза зафиксированы отрицательные корреляционные связи относительного содержания мРНК генов

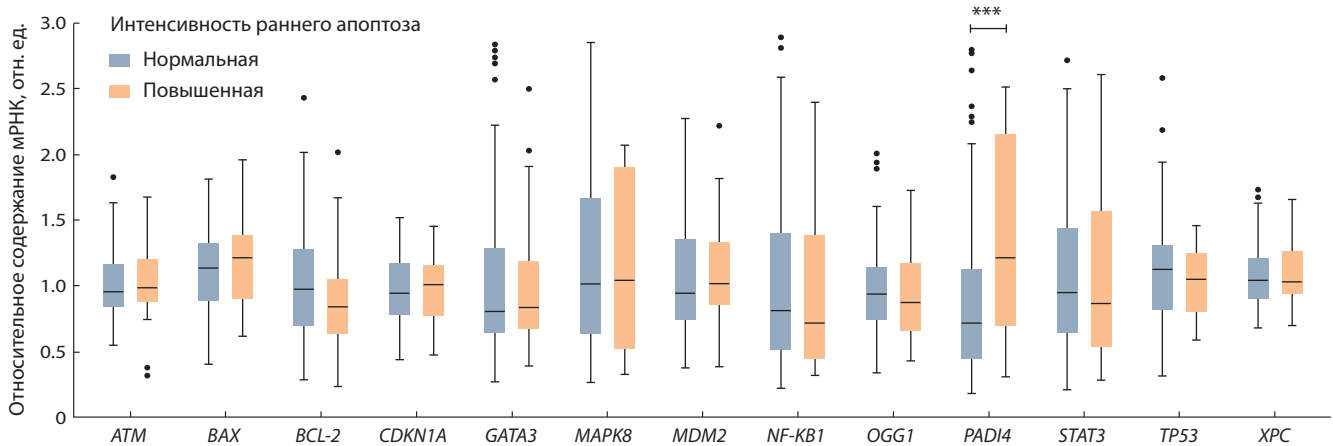


Рис. 1. Распределение относительного содержания мРНК исследуемых генов у хронически облученных людей с нормальной и повышенной интенсивностью раннего апоптоза ЛПК.

Здесь и на рис. 2 и 4 данные представлены в виде медианы (25 и 75-й процентиля) и диапазона (min–max); *** отличия между группами статистически значимы ($p < 0.05$).

Таблица 3. Относительное содержание мРНК (отн. ед.) генов в группах обследованных лиц с разной интенсивностью позднего апоптоза ЛПК (Me; Q1–Q3)

Ген	Облученные лица с частотой апоптоза ЛПК на поздней стадии		p
	нормальная, $N = 89$	повышенная, $N = 43$	
<i>MDM2</i>	1.01 ± 0.04 (0.37–2.27)	1.18 ± 0.09 (0.37–2.23)	0.140
<i>BCL-2</i>	0.94 ± 0.04 (0.23–2.01)	1.19 ± 0.09 (0.28–2.29)	0.021
<i>OGG1</i>	0.95 ± 0.03 (0.33–1.90)	1.02 ± 0.06 (0.53–2.00)	0.405
<i>ATM</i>	0.98 ± 0.03 (0.32–1.67)	1.02 ± 0.04 (0.58–1.82)	0.700
<i>BAX</i>	1.13 ± 0.03 (0.40–1.96)	1.14 ± 0.05 (0.59–1.81)	0.912
<i>XPC</i>	1.08 ± 0.03 (0.68–1.73)	1.08 ± 0.03 (0.74–1.51)	0.679
<i>CDKN1A</i>	0.95 ± 0.02 (0.43–1.51)	1.07 ± 0.12 (0.53–1.50)	0.940
<i>STAT3</i>	1.08 ± 0.07 (0.22–2.71)	0.99 ± 0.09 (0.21–2.17)	0.559
<i>GATA3</i>	1.06 ± 0.07 (0.27–2.83)	1.04 ± 0.11 (0.27–2.73)	0.902
<i>MAPK8</i>	1.13 ± 0.07 (0.29–2.84)	1.22 ± 0.13 (0.26–2.55)	0.699
<i>NF-KB1</i>	1.02 ± 0.07 (0.24–2.80)	0.95 ± 0.12 (0.22–2.89)	0.699
<i>PADI4</i>	1.06 ± 0.08 (0.18–2.77)	0.94 ± 0.12 (0.23–2.79)	0.345

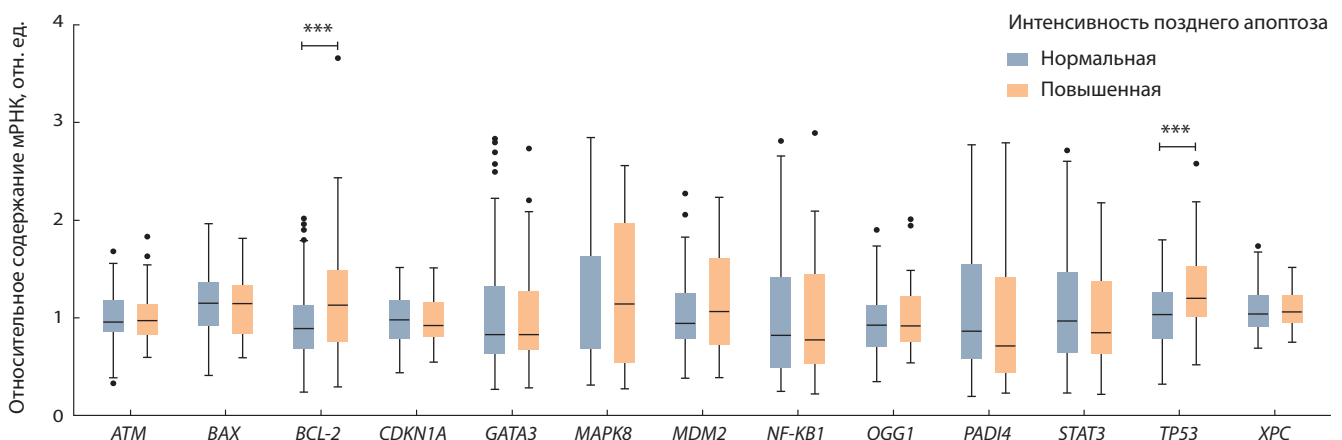


Рис. 2. Распределение относительного содержания мРНК исследуемых генов у хронически облученных людей с нормальной и повышенной интенсивностью позднего апоптоза ЛПК.

BCL-2 ($r = -0.6; p = 0.001$) и *ATM* ($r = -0.4; p = 0.02$) от дозы облучения ККМ. Дополнительно для гена *BCL-2* ($r = -0.4; p = 0.002$) отмечена отрицательная корреляционная связь содержания мРНК от величины дозы облучения тимуса и периферических органов иммунной системы. Полученные зависимости исследованы методом линейного регрессионного анализа (рис. 3).

Транскрипционная активность генов у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью некроза

Статистически значимые различия между группами облученных людей с различной интенсивностью некроза ЛПК были показаны только для гена *TP53*. Так, у хронически облученных людей, имеющих повышенную интенсивность некроза ЛПК, отмечено увеличение относительного содержания мРНК гена *TP53* (почти в 1.5 раза) по сравнению с хронически облученными лицами, имеющими нормальную частоту ЛПК, вышедших в некроз (см. табл. 4). Распределение данных продемонстрировано на рис. 4.

В группе облученных людей с повышенной частотой ЛПК на стадии некроза зарегистрированы отрицательные корреляционные связи относительного содержания мРНК генов *BCL-2* ($r = -0.47; p = 0.02$) и *ATM* ($r = -0.6; p = 0.001$) от дозы облучения ККМ. Результаты линейного регрессионного анализа не позволили отметить достоверную зависимость изменения количества мРНК гена *BCL-2* от величины накопленной дозы облучения ККМ ($p = 0.13$), в то время как для гена *ATM* была показана статистически значимая отрицательная линейная зависимость содержания мРНК от дозы облучения ККМ в группе хронически облученных лиц, имеющих повышенную интенсивность некроза ЛПК (рис. 5).

Проверка связи относительного содержания мРНК с интенсивностью некротической гибели клеток выявила отрицательную корреляцию для гена *MAPK8* ($r = -0.62; p = 0.01$) у облученных людей, имеющих повышенную частоту ЛПК, вышедших в некроз.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что у хронически облученных людей с повышенной частотой ЛПК на ранней стадии апоптоза наблюдается увеличение содержания мРНК гена *PADI4* по сравнению с облученными людьми, имеющими нормальную интенсивность раннего апоптоза. Белок *PADI4* является Ca^{2+} -зависимым ферментом, который катализирует цитруллинирование белка в присутствии Ca^{2+} (Rogers et al., 1977). В частности, *PADI4* может опосредовать цитруллинирование гистонов H3 на промоторах генов-мишеней p53, таких как *CDKN1A*, *VAX*, *BCL-2* и др., а также связываться с C-концевым регуляторным доменом белка p53, что является причиной репрессии его активности (Tanikawa et al., 2012). В связи с этим можно предположить, что белок *PADI4* – важный медиатор сигнального пути p53, способный приводить к активации апоптоза.

В группе облученных людей с повышенной интенсивностью апоптотической гибели ЛПК на поздней стадии наблюдается модификация транскрипционной активности

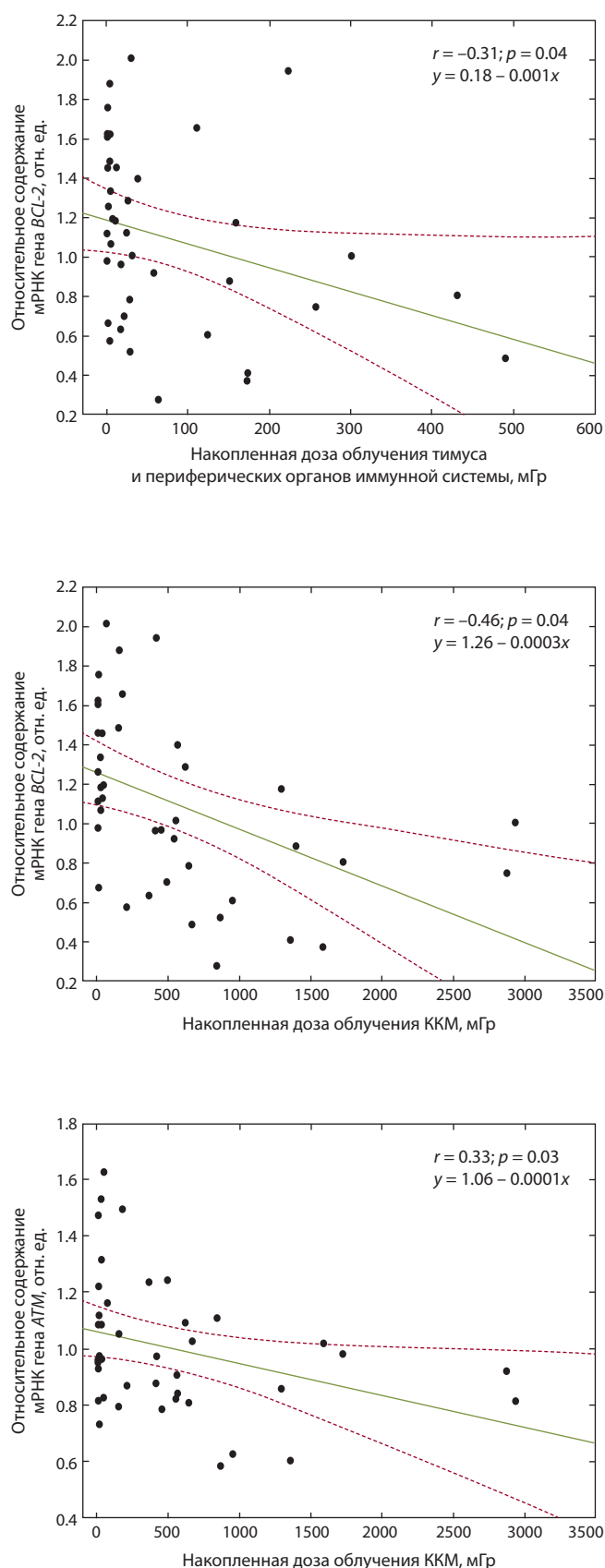


Рис. 3. Линейная зависимость изменения относительного содержания мРНК генов *ATM* и *BCL-2* от величины накопленной дозы облучения ККМ, тимуса и периферических органов иммунной системы в группе хронически облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза ЛПК.

Таблица 4. Относительное содержание мРНК (отн. ед.) генов в группах обследованных лиц с разной интенсивностью некроза ЛПК ($M \pm SE$; min–max)

Ген	Облученные лица с частотой некроза ЛПК		p
	нормальная, N = 106	повышенная, N = 26	
<i>MDM2</i>	1.05 ± 0.04 (0.37–2.27)	1.12 ± 0.13 (0.37–2.23)	0.741
<i>BCL-2</i>	1.00 ± 0.04 (0.23–2.43)	1.10 ± 0.12 (0.41–1.73)	0.750
<i>OGG1</i>	0.95 ± 0.04 (0.33–2.00)	1.08 ± 0.08 (0.61–1.94)	0.150
<i>ATM</i>	1.01 ± 0.02 (0.32–1.83)	0.96 ± 0.06 (0.55–1.63)	0.151
<i>BAX</i>	1.12 ± 0.03 (0.40–1.95)	1.19 ± 0.07 (0.65–1.81)	0.390
<i>XPC</i>	1.07 ± 0.02 (0.68–1.73)	1.17 ± 0.05 (0.85–1.67)	0.079
<i>CDKN1A</i>	0.95 ± 0.02 (0.43–1.51)	1.18 ± 0.19 (0.59–1.50)	0.411
<i>STAT3</i>	1.08 ± 0.06 (0.21–2.71)	0.89 ± 0.12 (0.23–2.06)	0.220
<i>GATA3</i>	1.05 ± 0.07 (0.27–2.83)	1.06 ± 0.14 (0.27–2.56)	0.592
<i>MAPK8</i>	1.16 ± 0.07 (0.29–2.84)	1.15 ± 0.15 (0.27–2.04)	0.960
<i>NF-KB1</i>	1.04 ± 0.07 (0.22–2.89)	0.78 ± 0.11 (0.32–1.69)	0.185
<i>PADI4</i>	1.03 ± 0.07 (0.20–2.64)	1.03 ± 0.19 (0.18–2.79)	0.893

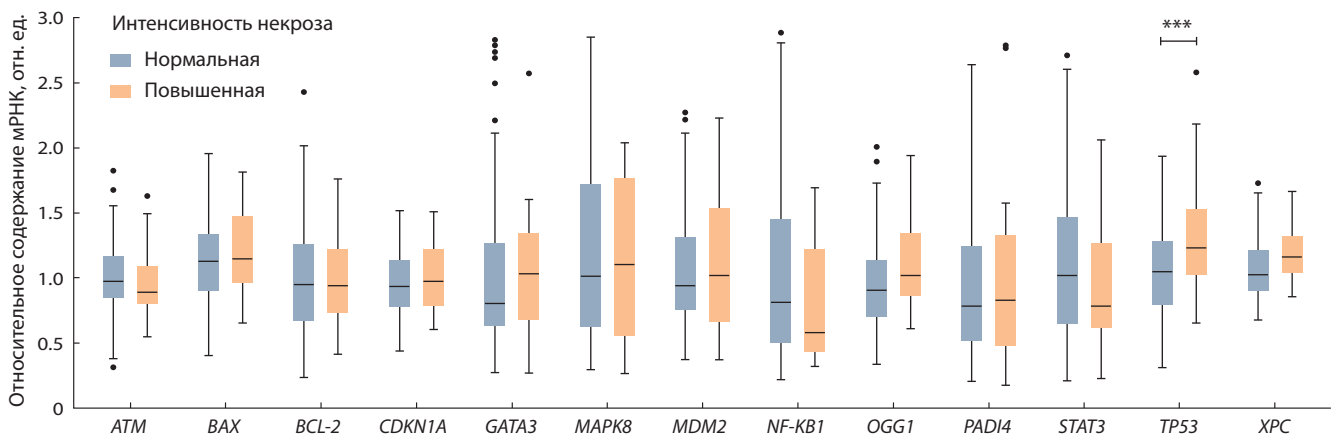


Рис. 4. Распределение относительного содержания мРНК исследуемых генов у хронически облученных людей с нормальной и повышенной интенсивностью некроза ЛПК.

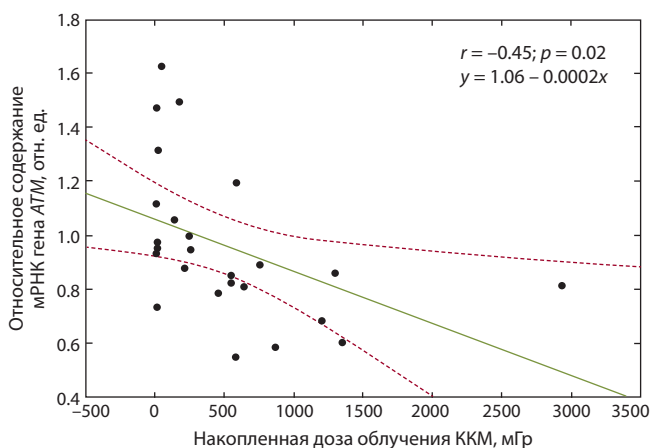


Рис. 5. Линейная зависимость изменения относительного содержания мРНК генов *ATM* от величины накопленной дозы облучения КМК в группе хронически облученных людей, имеющих повышенную интенсивность некротической гибели ЛПК.

генов *TP53* и *BCL-2*. В частности, показано достоверное увеличение относительного содержания мРНК этих генов.

Одна из главных функций белка p53 отведена индукции сигнальных механизмов, направленных на элиминацию потенциально опасных для организма клеток (Miyashita et al., 1994), однако на фоне увеличения транскрипционной активности *TP53* отмечается увеличение антиапоптогического гена *BCL-2* в группе облученных лиц с повышенной интенсивностью апоптоза. При этом с увеличением дозы облучения КМК, тимуса и периферических органов иммунной системы регистрируется снижение количества мРНК гена *BCL-2*. На этом этапе работы сложно объяснить данный феномен, вероятно, у части облученных людей с повышенной интенсивностью апоптоза происходит нарушение механизма элиминации клеток на фоне гиперэкспрессии антиапоптогических факторов. На это указывает и факт, что транскрипционная активность гена *TP53* увеличена у облученных лиц с повышенной интенсивностью некроза.

Кроме того, у облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза зафиксирована отрицательная корреляционная связь относительного содержания мРНК генов *ATM* от дозы облучения красного костного мозга. Дисфункция гена *ATM* приводит к прогрессии нестабильности генома, которая в первую очередь сопровождается увеличением частоты хромосомных aberrаций (сокращение длины теломер, увеличение уровня парных и одиночных фрагментов хромосом, частоты транслокаций) (Hahn, Weinberg, 2002; Franco et al., 2006). Не исключено, что пониженная регуляция транскрипции этого гена, которая усиливается с увеличением дозы облучения красного костного мозга у жителей прибрежных сел р. Течи, связана с истощением внутриклеточных резервов для нейтрализации возникших повреждений ДНК, и тем самым является ведущей причиной повышенной интенсивности гибели клеток.

В группе хронически облученных людей, имеющих повышенную интенсивность некроза, на фоне увеличения транскрипционной активности гена *TP53* наблюдается снижение относительного содержания мРНК гена *MAPK8* с увеличением интенсивности некротической гибели ЛПК.

Белок *MAPK8* фосфорилирует сотни субстратов, ответственных за контроль стрессового ответа и регуляцию апоптоза, включая *p53* (Guimaraes, Hainaut, 2002). *MAPK8* фосфорилирует также *BMF* (фактор, модулирующий *BCL-2*) на специфических остатках серина, расположенных внутри и непосредственно прилегающих к связывающему домену *BMF*. Освобожденный от актлина *BMF* поступает в митохондрии, физически взаимодействует с белком *BCL-2*, что в последующем также запускает инициацию апоптоза (Puthalakath et al., 2001).

Заключение

Таким образом, выявлено, что у облученных людей с повышенной интенсивностью апоптоза регистрируются в первую очередь изменения со стороны транскрипционной активности апоптотических генов, что согласуется с текущими представлениями активации запрограммированной гибели клеток. Показано, что экспрессия генов зависит от стадии апоптоза ЛПК.

Необходимо продолжать исследование с расширенной выборкой обследуемых людей и изучаемых мишеней, что позволит определить значимость показателей транскрипционной активности некоторых генов как маркеров риска развития заболеваний опухолевого и неопухолевого генеза, связанных с апоптозом, которые регистрируются у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки.

Список литературы / References

Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М., 2002.
[Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. Immunological Problems of Apoptosis. Moscow, 2002. (in Russian)]
Блинова Е.А., Котикова А.И., Янишевская М.А., Аклеев А.В. Апоптоз лимфоцитов и полиморфизм генов регуляции апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2020a;65(4):36-42. DOI 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42.

[Blinova E.A., Kotikova A.I., Yanishevskaya M.A., Akleyev A.V. Apoptosis of lymphocytes and polymorphisms of apoptosis regulation genes in individuals exposed to chronic radiation exposure. *Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost' = Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020a;65(4):36-42. DOI 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42. (in Russian)]
Блинова Е.А., Никифоров В.С., Янишевская М.А., Аклеев А.А. Полиморфизм и экспрессия генов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток у лиц, подвергшихся радиационному воздействию. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020b;24(4):399-406. DOI 10.18699/VJ20.632.
[Blinova E.A., Nikiforov V.S., Yanishevskaya M.A., Akleyev A.A. Single nucleotide polymorphism and expression of genes for immune competent cell proliferation and differentiation in radiation-exposed individuals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020b;24(4):399-406. DOI 10.18699/VJ20.632. (in Russian)]
Квачева Ю.А. Восстановительные процессы и межпопуляционные клеточные взаимоотношения в костном мозге людей с острой лучевой болезнью: морфологическое исследование. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2000;40(1):5-9.
[Kvatcheva Yu.E. Human bone marrow repair processes and cell populations in acute radiation injury: morphological study. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiological Biology. Radioecology*. 2000;40(1):5-9. (in Russian)]
Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов. *Радиация и риск*. 2020;29(2):89-100. DOI 10.21870/0131-3878-2020-29-2-89-100.
[Nikiforov V.S., Blinova E.A., Akleyev A.V. The transcriptional activity of cell cycle and apoptosis genes in chronically exposed people with an increased frequency of TCR mutant lymphocytes. *Radiatsiya i Risk = Radiation and Risk*. 2020;29(2):89-100. DOI 10.21870/0131-3878-2020-29-2-89-100. (in Russian)]
Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи. Под ред. д-ра мед. наук, проф. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга, 2016.
[Akleyev A.V. (Ed.) Consequences of Radioactive Contamination of the Techa River. Chelyabinsk: Kniga Publ., 2016. (in Russian)]
Хейфец Л.Б., Абалакин В.А. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл. *Лабораторное дело*. 1973;10:579-581.
[Kheifets L.B., Abalakin V.A. Separation of human blood corpuscles in the verografin-ficoll density gradient. *Laboratornoye Delo = Laboratory Science*. 1973;10:579-581. (in Russian)]
Azimian H., Bahreini-Toossi M.T., Rezaei A.R., Rafatpanah H., Hamzehloei T., Fardid H. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation. *J. Med. Phys.* 2015;40(1):38-44. DOI 10.4103/0971-6203.152249.
Bever E.M., Williamson P.L. Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 2016;96(2):605-645. DOI 10.1152/physrev.00020.2015.
Chipuk J.E. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006;13(6):994-1002. DOI 10.1038/sj.cdd.4401908.
Franco S., Alt F.W., Manis J.P. Pathways that suppress programmed DNA breaks from progressing to chromosomal breaks and translocations. *DNA Repair (Amst.)*. 2006;5(9-10):1030-1041. DOI 10.1016/j.dnarep.2006.05.024.
Guimaraes D.P., Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie*. 2002;84(1):83-93. DOI 10.1016/s0300-9084(01)01356-6.
Hahn W.C., Weinberg R.A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2002;2(5):331-341. DOI 10.1038/nrc795.
Kabcak S., Mackay A., Tamber N., Manning G., Fannon P., Paillier F., Ashworth A., Bouffler S., Badie C. Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *Int. J. Radiat. Biol.* 2011;87(2):115-129. DOI 10.3109/09553002.2010.519424.

- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B., Reed J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*. 1994;9(6):1799-1805.
- Puthalakath H., Villunger A., O'Reilly L.A., Beaumont J.G., Coultas L., Cheney R.E., Huang D.C., Strasser A. BMF: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*. 2001;293(5536):1829-1832. DOI 10.1126/science.1062257.
- Rogers G.E., Harding H.W., Llewellyn-Smith I.J. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. *Biochim. Biophys. Acta*. 1977;495(1):159-175. DOI 10.1016/0005-2795(77)90250-1.
- Tanikawa C., Espinosa M., Suzuki A., Masuda K., Yamamoto K., Tsuchiya E., Ueda K., Daigo Y., Nakamura Y., Matsuda K. Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. *Nat. Commun.* 2012;3:676. DOI 10.1038/ncomms1676.
- Verheij M., Bartelink H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):133-142. DOI 10.1007/s004410000188.
- Zeegers D., Venkatesan S., Koh S.W., Low G.K., Srivastava P., Sundaram N., Sethu S., Banerjee B., Jayapal M., Belyakov O., Baskar R., Balajee A.S., Hande M.P. Biomarkers of ionizing radiation exposure: A multiparametric approach. *Genome Integr.* 2017;8:6. DOI 10.4103/2041-9414.198911.

ORCID ID

V.S. Nikiforov orcid.org/0000-0002-6685-1823
E.A. Blinova orcid.org/0000-0002-2567-7945
A.I. Kotikova orcid.org/0000-0002-1695-1340
A.V. Akleyev orcid.org/0000-0003-2583-5808

Благодарности. Исследование выполнено в рамках государственного контракта № 27.501.21.2 от 11.06.2021 «Модернизация высокотехнологичных методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО "Маяк" и население Уральского региона».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.06.2021. После доработки 15.11.2021. Принята к публикации 16.11.2021.

Association between *TP53*, *MDM2* and *NQO1* gene polymorphisms and viral load among women with human papillomavirus

A.H. AlBosale^{1, 2}✉, E.V. Mashkina²

¹ Al-Dour Technical Institute, Northern Technical University, Department of Medical Laboratory Techniques, Mosul, Iraq

² Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

✉ abbashammadi4@gmail.com

Abstract. The risk of cervical cancer is caused by persistent human papillomavirus (HPV) infection. Cervical cancer is the most frequent cancer among women. Our purpose was to investigate the association between *TP53* 215C>G (Pro72Arg), *MDM2* -410T>G, and *NQO1* 609C>T gene polymorphisms with a high HPV load and the influence of gene-gene interactions on prolonged HPV infection. Eighty-nine women with a high HPV viral load and 114 healthy women were involved in a case-control study. Genotyping for *TP53* 215C>G (Pro72Arg) and *MDM2* -410T>G SNPs was carried out by allele-specific PCR and genotyping for *NQO1* 609C>T was performed by a TaqMan assay. Quantitative analysis of HPV DNA was performed by AmpliSens® HPV HCR screen-titer-FRT test system. Gene-gene interactions were analyzed using the multifactor dimensionality reduction (MDR) method. The study of separate SNPs of *MDM2* -410T>G and *NQO1* 609C>T genes did not reveal any statistically significant difference in genotype and allele frequencies among women within the two groups. The frequency of the 215G (72Arg) allele and 215GG (72Arg/Arg) genotype of the *TP53* gene was significantly higher in the case group than in the control group (OR = 1.74, 95 % CI = 1.10–2.73; $p = 0.02$ and OR = 1.97, 95 % CI = 1.13–3.46; $p = 0.04$, respectively). MDR analysis showed the significance of intergenic interactions of the three studied loci *TP53* (rs1042522) – *MDM2* (rs2279744) – *NQO1* (rs1800566) for the formation of a high HPV load (OR = 3.05, 95 % CI = 1.73–5.46; $p = 0.0001$).

Key words: polymorphism; human papillomavirus; viral load; *TP53*; *MDM2*; *NQO1*.

For citation: AlBosale A.H., Mashkina E.V. Association between *TP53*, *MDM2* and *NQO1* gene polymorphisms and viral load among women with human papillomavirus. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):59-64. DOI 10.18699/VJGB-22-09

Ассоциация полиморфизма генов *TP53*, *MDM2* и *NQO1* с вирусной нагрузкой среди женщин с вирусом папилломы человека

A.X. АлБосале^{1, 2}✉, Е.В. Машкина²

¹ Аль-Доур технический институт, Северный технический университет, кафедра медицинской лабораторной техники, Мосул, Ирак

² Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

✉ abbashammadi4@gmail.com

Аннотация. Риск рака шейки матки вызван персистирующей инфекцией вируса папилломы человека (ВПЧ). Наша цель – исследовать связь между полиморфизмами генов *TP53* 215C>G (Pro72Arg), *MDM2* -410T>G и *NQO1* 609C>T с риском формирования высокой вирусной нагрузки при ВПЧ-инфекции. Восемьдесят девять женщин с высокой вирусной нагрузкой ВПЧ и 114 здоровых женщин были вовлечены в исследование случай-контроль. Генотипирование для SNP *TP53* Pro72Arg и *MDM2* -410T>G проводили методом аллель-специфичной ПЦР, а для *NQO1* 609C>T – путем анализа ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. Количественный анализ ДНК ВПЧ выполняли с использованием тест-системы «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL». Анализ межгенных взаимодействий осуществляли с помощью алгоритма многофакторного снижения размерности (MDR). Исследование отдельных SNP генов, *MDM2* -410T>G и *NQO1* 609C>T, не выявило статистически значимой разницы в частотах генотипов и аллелей среди женщин в двух группах. Частота аллеля 72Arg и генотипа 72Arg/Arg гена *TP53* в группе ВПЧ-инфицированных женщин была значительно выше, чем в контрольной группе (OR = 1.74, 95 % CI = 1.10–2.73; $p = 0.02$ и OR = 1.97, 95 % CI = 1.13–3.46; $p = 0.04$ соответственно). MDR-анализ показал значимость межгенных взаимодействий исследуемых локусов *TP53* (rs1042522) – *MDM2* (rs2279744) – *NQO1* (rs1800566) для формирования высокой нагрузки ВПЧ (OR = 3.05, 95 % CI = 1.73–5.46; $p = 0.0001$).

Ключевые слова: полиморфизм; вирус папилломы человека; вирусная нагрузка; *TP53*; *MDM2*; *NQO1*.

Introduction

Human papillomavirus (HPV) is implicated in the development of cervical cancer. A key critical step in papillomavirus-related carcinogenesis is a persistent viral infection (Vonsky et al., 2019). There is heterogeneity in the development of human papillomavirus infection due to genetic variations, ethnicity, viral types involved in infection, viral load, and oncogenic expression, as well as environmental, and hormonal, physiological, and nutritional factors (Roura et al., 2016; Tasic et al., 2018). After HPV-infection, especially with high-risk HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, and 59), HPV oncoproteins induce mutations in oncogenes, epigenetic modifications, and chromosomal rearrangements (Mittal, Banks, 2017). A disequilibrium in the relationship between virus and host results in a decrease in the effectiveness of the immune system, the imbalance between cellular and humoral immune processes, as well as alteration in pro- and anti-inflammatory cytokine levels, which increases the replicative ability of the virus (Fernandes et al., 2015; Bordignon et al., 2017). In addition, modifications that alter the stability of cell cycle proteins such as retinoblastoma protein (pRb), tumor suppressor p53, result in uncontrolled cell cycle progression and induce oncogenic transformation of cells (Sen et al., 2017; Balasubramaniam et al., 2019).

The *TP53* tumor suppressor gene plays a crucial role in regulating DNA repair, apoptosis, and cell cycle control. It has been observed that most human tumors contain mutated p53, with about 50 % of those mutations causing a reduction in DNA repair ability, irregular cell growth, and, eventually, progression to malignancy (Aubrey et al., 2016). Polymorphisms in the *TP53* gene change p53 protein conformation, which leads to p53 degradation through a process mediated by ubiquitin (Rampias et al., 2014). The most widely studied of the non-synonymous SNP *TP53* Pro72Arg (rs1042522) replaces proline (Pro) with arginine (Arg) in the p53 protein due to a substituted C to G base in the *TP53* gene. Both variants have the same binding affinity for DNA while their ability to bind components of the transcription factor is different. So, the two variants of the p53 protein are not functionally equivalent (Thomas et al., 1999). The p53 is ubiquitinated in the proteasome, which is regulated by MDM2 via a ubiquitin-dependent degradation pathway and NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 via a ubiquitin-independent degradation pathway (Tsvetkov et al., 2010; Karni-Schmidt et al., 2016). As a result, the level of p53 is affected by MDM2 and NQO1 activity.

Oncoprotein MDM2 is a negative regulator of the p53 tumor protein (Saadatzadeh et al., 2017). A functional SNP in the *MDM2* gene promoter (-410T>G rs2279744) regulates MDM2 protein expression. When T is replaced with G, this increases the affinity of the transcriptional activator Sp1, resulting in higher MDM2 expression and subsequent suppression of the p53 pathway (Bond et al., 2004).

The NQO1 enzyme can catalyze the reduction of various quinones to hydroquinones by a two-electron reduction mechanism (NADH or NADPH) as a reducing cofactor. This two-electron reduction prevents the formation of free radicals (semiquinones) that protect the cells from oxidative stress (Atia, Abdullah, 2020). The SNP of *NQO1* at nucleotide position 609C>T in exon 6 (rs1800566) with the proline to serine amino acid substitution at codon 187 induces a change

of enzyme activity. The homozygotes (*TT*) genotype gives rise to an inactive enzyme NQO1, heterozygotes (*CT*) have the enzyme displays mild activity, while the wild homozygotes (*CC*) have the highest activity of the NQO1 (Ross, Siegel, 2004). Wild type NQO1 partially inhibits HPV E6-mediated p53 degradation, although this does not occur with the mutant type NQO1 (Niwa et al., 2005).

Thus, the efficiency of the cell cycle repair and control system depends not only on the p53 protein. Also, the levels of MDM2 and NQO1 proteins in the cell can affect the stability of the p53 protein and the activity of its degradation processes. However, human papillomavirus, as an exogenous factor, can be an additional cause affecting the work of the repair system. Most of the studies on the association of SNPs of genes with HPV infection and cervical cancer are devoted to the analysis of individual nucleotide substitutions. There is practically no data in the literature on the combined effect of polymorphic variants of these three genes in the presence of HPV load.

Our work aims to analyze the distribution of the polymorphisms of the *TP53* gene (rs1042522), *MDM2* gene (rs2279744), and *NQO1* gene (rs1800566) in patients with HPV load versus HPV-negative women.

Materials and methods

Two hundred and three samples of epithelial cells scraped from the urogenital tract of women were used for molecular genetic studies. The study equipment has been provided by the clinical diagnostic laboratory, Nauka (Rostov-on-Don, Russia). The women were divided into two groups: women with a high HPV load (above 3 log of HPV genomes per 100 thousand human cells) ($n = 89$), and HPV-negative women ($n = 114$). All the women included in the study were over thirty years old. Criteria for women being included in the control group: a normal result of colposcopy, HPV-negative PCR-test. The comparative group of cases included women with symptoms such as vaginal discharge, bleeding menstrual abnormalities, and HPV-positive PCR-test with an HPV load of more than 3 log of HPV genomes per 10^5 human cells. The ethnic composition of the women involved in the study groups was as follows: Russians accounted for 86 %, Armenians accounted for 9 %, and other nationalities of the Caucasian race – 5 %.

All women have given formal written consent to take part in the study. The study was approved by the Bioethics Committee of the Academy of Biology and Biotechnology of the Southern Federal University (Protocol No. 2 of March 29, 2016). All the tests for clinical experimentation were carried out in line with the standards and ethical guidelines of the World Medical Association (Helsinki Declaration).

The total DNA was isolated from scraping epithelial cells of the cervical canal of women according to the DNA-sorb-AM (NextBio, Russia) reagent kit protocol. The quantification of DNA for high-risk HPV types (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, and 59) in biological material was analyzed according to the AmpliSens-HPV HCR screen-titre-FRT PCR kit (Interlabservice, Russia) protocol. According to the kit manufacturer's instructions and clinical reports, the viral load is interpreted as follows: $\log \leq 3$ per 10^5 human cells – low clinical significance, 3–5 log per 10^5 human cells – clinically significance, risk of dysplasia; and > 5 log per 10^5 human cells – clinically significance, strongly probable dysplasia.

Genotyping was performed for the SNP of *TP53* 215C>G (Pro72Arg) (rs1042522), *MDM2* -410T>G (rs2279744) genes by allele-specific PCR and the SNP-express reagent (Lytech, Russia) according to the kit protocol. *NQO1* 609C>T (rs1800566) was genotyped by a TaqMan genotyping assay. The amplification was carried out in a 25-ml reaction containing 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mmol/L of the forward primer (5'-CAG AGT GGC ATT CTG CAT TTC T-3') and reverse (5'-CTG GAG TGT GCC CAA TGC TA-3') primers and 0.5 µl mmol/L *NQO1* wild-type (5'-6FAM-CTT AGA ACC TCAACT GA-MGBNFQ-3') and mutant (5'-VIC-CTT AGA ATC TCA ACT GAC A-MGBNFQ-3') probes, 0.5 µl Taq-polymerase (5 U/µl), 2.5 µl 2.5 mM of dNTP, 2 µl 10×PCR buffer B, 12 µl ddH₂O (Syntol, Russia) and 3 µl DNA. Cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 15 sec, then annealing at 54 °C for 60 sec. The PCR products for *NQO1* 609C>T (rs1800566) were analyzed in real-time using RotorGene thermocycler. PCR products for the *TP53* Pro72Arg and *MDM2* -410T>G genes were analyzed by 3 % agarose gel horizontal electrophoresis and visualized under the ultraviolet (UV) transilluminator GelDoc (Bio-Rad, USA).

To calculate the statistical data, the χ^2 test was used to compare the allele and genotype frequencies of the *TP53* 215C>G (Pro72Arg) (rs1042522), *MDM2* -410T>G (rs2279744), and *NQO1* 609C>T (rs1800566) genes in the case group and control group. The Hardy–Weinberg equilibrium test was performed to determine the goodness-of-fit of the χ^2 test with one degree of freedom by comparing the observed genotype frequencies with the expected genotype frequencies. The SNP

genetic association was assessed by the χ^2 test, odds ratio (OR), and its confidence interval (CI). A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad InStat 3.05 software.

The analysis of intergenic interactions was performed using the MDR software (<http://www.multifactorialityreduction.org/>) and by using the exhaustive search algorithm. All potential combinations of genotypes were evaluated with respect to the risk of developing an HPV infection. Multilocus genotypes are summed up in the MDR program into groups of increased and reduced disease risk, which reduces the dimension of the number of calculated parameters. Using multiple cross-recalculations of the input primary data, the optimal model is selected for intergenic interaction, with the highest accuracy and, accordingly, with the least error, to predict the presence or absence of predisposition to the studied pathology.

Results

In 89 HPV-positive women, the average age was 40.1 ± 7.3 years and 41.1 ± 7.6 years in 114 HPV-negative women. Among 89 HPV-infected women the minimum, middle, and maximum HPV DNA load were 3.2, 5.1, and 8.6 log of HPV genomes per 100 thousand human cells, respectively.

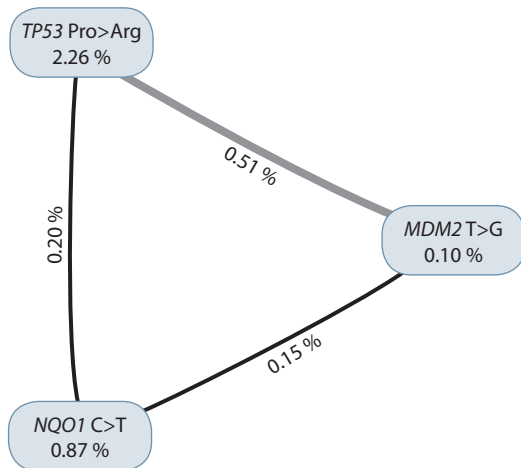
Frequency distributions for the three investigated *TP53*, *MDM2*, and *NQO1* gene polymorphisms are given in Table 1. The polymorphic variants of *MDM2* -410T>G and *NQO1* 609C>T were not associated with a high HPV load. At the same time females with a high HPV load had a significantly higher frequency of *TP53* 215G (72Arg) allele (OR = 1.74, 95 % CI = 1.10–2.73; *p* = 0.02) and 215GG (72ArgArg) genotype (OR = 1.97, 95 % CI = 1.13–3.46; *p* = 0.04) than

Table 1. Genotypes (abs., %) and alleles frequencies for *MDM2* -410T>G, *TP53* 215C>G (Pro72Arg), and *NQO1* 609C>T genes among women with high HPV load and without HPV

Gene, polymorphism	Group with high HPV load (n = 89)	Control group without HPV (n = 114)	<i>p</i>	OR (95 % CI)
<i>MDM2</i> -410T>G (rs2279744)				
<i>T</i>	0.651	0.671	0.68	0.92 (0.61–1.39)
<i>G</i>	0.348	0.328		1.09 (0.72–1.65)
<i>T/T</i>	35 (39.3)	47 (41.2)	0.86	0.92 (0.53–1.62)
<i>T/G</i>	46 (51.7)	59 (51.8)		1.00 (0.57–1.73)
<i>G/G</i>	8 (9)	8 (7)		1.31 (0.47–3.62)
<i>TP53</i> 215C>G (Pro72Arg) (rs1042522)				
<i>C</i>	0.213	0.321	0.02	0.58 (0.37–0.91)
<i>G</i>	0.787	0.679		1.74 (1.10–2.73)
<i>C/C</i>	3 (3.3)	9 (7.9)	0.04	0.41 (0.11–1.54)
<i>C/G</i>	32(36)	55 (48.2)		0.60 (0.34–1.06)
<i>G/G</i>	54 (60.7)	50 (43.9)		1.97 (1.13–3.46)
<i>NQO1</i> 609C>T (rs1800566)				
<i>C</i>	0.516	0.587	0.18	0.75 (0.51–1.11)
<i>T</i>	0.483	0.412		1.33 (0.90–1.98)
<i>C/C</i>	20 (22.5)	36 (31.6)	0.29	0.63 (0.33–1.18)
<i>C/T</i>	52 (58.4)	62 (54.4)		1.18 (0.68–2.06)
<i>T/T</i>	17 (19.1)	16 (14)		1.45 (0.54–3.84)

Table 2. Analysis of intergenic interactions by the multifactor dimensional reduction algorithm (MDR)

Genes, polymorphisms in model	Testing balanced accuracy	Cross-validation consistency	χ^2	<i>p</i>	OR (95 % CI)
<i>MDM2</i> (rs2279744) <i>TP53</i> (rs1042522) <i>NQO1</i> (rs1800566)	0.64	10/10	14.673	0.0001	3.05 (1.73–5.46)



Interaction analysis among three loci of *MDM2* -410T>G, *TP53* 215C>G (Pro72Arg), and *NQO1* 609C>T of women with high HPV viral load.

The informational value of each marker is presented on vertices; the informational value of the interaction for a pair of loci is presented on the edges. The nature of the interaction between genes is shown by the color of the line (gray – pronounced synergism, black – moderate synergism).

healthy controls. The existence of multiple allelic variations in genes that encode for protein molecules can lead to several related changes in the genome and proteome function. Therefore, an analysis of intergenic interactions of allelic variants was conducted.

An analysis of intergenic interactions showed that the three-locus model of gene interaction has a prediction accuracy of 64 % and cross-validation consistency (10/10) (Table 2). Interaction of *TP53* (rs1042522) – *MDM2* (rs2279744) – *NQO1* (rs1800566) genes is associated with the risk of high HPV load among women (OR = 3.05, 95 % CI = 1.73–5.46; *p* = 0.0001).

A radial diagram demonstrates the contribution of polymorphism of each gene, both individually and in combination with others for the three-loci. In the vertices of the diagram, the values of information for individual genes are indicated, on the edges – the information value of the interaction of a pair of genes. The studied SNPs affect the formation of the viral load to varying degrees. According to the model of loci interaction (see the Figure), the highest predictive potential is possessed by the SPN of the *TP53* gene (2.26 %). The *TP53* and *MDM2* loci have the greatest effect by intergenic interaction. A pronounced synergism was revealed between these loci – the total effect of the combination is 2.87 %. Its information value is higher than the sum of its individual effects.

Discussion

Cervical cancer is the most common gynecological cancer among women and the high-risk HPV genotypes play a major role in abnormal lesion development and cervical malignant

neoplasms (Malagón et al., 2019; So et al., 2019). The presence of a high viral load in HPV-positive women indicates that the virus has not been entirely removed and will likely continue to replicate in the body cells for a long time. Long-term virus persistence contributes to the incorporation of HPV DNA into the human genome, the expression of E6/E7 oncogenic proteins, and the development of cancer (McBride, Warburton, 2017; Gheit, 2019).

Human papillomatosis appears to be a polygenic disease, suggesting that recurrent, small-effect genetic variations can have consequences for disease susceptibility (Khoury et al., 2018). Tumor development is largely attributed to genetic variations in the host’s cell cycle control (Litwin et al., 2017). The relationships between the *TP53* gene (rs1042522), *MDM2* gene (rs2279744), *NQO1* gene (rs1800566), and the risk of high HPV load have been investigated in this study.

In our study, 43.8 % of women (89 out of 203) were positive for high-risk HPV types. Our analysis revealed an association of high viral load formation risk with 215G (72Arg) allele carriage (OR = 1.74, 95 % CI = 1.10–2.73; *p* = 0.02) and 215GG (72Arg/Arg) genotype of *TP53* gene (OR = 1.97, 95 % CI = 1.13–3.46; *p* = 0.04). On the contrary, 215C (Pro72) allele (OR = 0.58, 95 % CI = 0.37–0.91; *p* = 0.02) and 215CC (72ProPro) genotype (OR = 0.41, 95 % CI = 0.11–1.54; *p* = 0.002) showed protective effect compared to the control group. The polymorphic variants of the p53 protein with Pro or Arg in codon 72 have been shown to vary in the efficiency of interaction with the E6 oncoprotein of HPV (Storey et al., 1998). The Arg variant is degraded by the E6 oncoprotein more readily than the Pro variant. Therefore, the carriers of the Arg/Arg genotype have p53 protein more vulnerable to viral protein-induced degradation (Hu et al., 2010). Our results are consistent with several other studies suggesting that HPV-positive women are more vulnerable to cervical malignant neoplasms when having *TP53* 72Arg/Arg genotype and *TP53* 72Arg allele (Basyar et al., 2016; Moschonas et al., 2017).

MDM2 promotes cell cycle progression through the activation of S-phase, via interaction with the retinoblastoma tumor suppressor protein and the transcriptional factor E2F (Oliner et al., 2016). *MDM2* is one of the central nodes in the p53 pathway regulation. It has been shown that even a small change in *MDM2* level may affect the p53 pathway and, subsequently, cancer development (Mendoza et al., 2014). Our analysis showed no statistically significant difference in the genotypes (*p* = 0.86) and allele frequencies (*p* = 0.68) distribution of *MDM2* -410T>G gene polymorphism in two women groups.

Our analysis showed no statistically significant difference in the genotypes (*p* = 0.29) and allele (*p* = 0.18) distribution of *NQO1* 609C>T gene polymorphism in the two groups of women. In agreement with our results, J. Chansaenroj and his coworkers showed no association of the *NQO1* 609C>T polymorphism with the risk of cervical cancer (Chansaenroj

et al., 2013). At the same time, several studies reported a relationship between *NQO1* 609TT genotypes and the risk of cervical cancer (Niwa et al., 2005; Yang et al., 2020). The *NQO1* gene (rs1800566) TT genotype is associated with null enzyme activity and could influence cancer progression by reducing cytotoxic agents containing the quinone moiety (Diao et al., 2017).

Favorable conditions for HPV persistence include multiple genetic substitutions which result in gene expression changes. In our work, the analysis of gene-gene interactions (MDR) showed significant interaction of the polymorphic loci (OR = 3.05, 95 % CI = 1.73–5.46; $p = 0.0001$) for increased viral load (see Table 2). The interaction of the polymorphic variants for the three loci of the genes *TP53* 215C>G (Pro72Arg), *MDM2* -410T>G, and *NQO1* 609C>T are associated with HPV viral load increase.

A synergistic effect was revealed between the studied loci. That is, the combined effect of these loci is more pronounced than individual effects. Thus, we revealed an increased risk of a high viral load in HPV infection in the case of a combination of polymorphic variants of the *TP53*, *MDM2*, and *NQO1* genes. The risk may be due to disturbances in the work of the checkpoints of the cell cycle due to the activation of the processes of degradation of the p53 protein.

The current study has several limitations. First, the small sample size: our results should be verified in larger populations as well as in other ethnic groups. Second, women with cervical cancer were not included in our research. Comparison of the different histological types of cervical cancer may also be warranted for future studies to determine whether the frequency of *TP53*, *MDM2*, and *NQO1* gene polymorphisms differ based on the histological types of cervical cancer. Third, the influence of epidemiologic risk factors such as smoking, alcohol intake, and sexual behavior or pathogenic factors like bacteria with the risk of HPV infection was not included. It would be interesting to analyze if *TP53*, *MDM2*, and *NQO1* production is associated with environmental or pathogenic factors.

Conclusion

Our results demonstrate that the risk of high viral load formation is associated with *TP53* 215G (72Arg) allele and *TP53* 215GG (72ArgArg) genotype in HPV-positive women. Although the individual SNPs of *MDM2* -410T>G and *NQO1* 609C>T genes did not reveal a statistically significant frequency difference in our study, intergenic interactions analysis revealed significant interaction for all polymorphic variants. This demonstrated that the infection development depends on the synergistic effect of several polymorphisms that induce changes in gene expression and represent an allelic load for HPV-positive cells. However, the role of the genetic susceptibility to HPV infections and high HPV load with *TP53* rs1042522, *MDM2* rs2279744, *NQO1* rs1800566 polymorphisms requires further investigation.

References

Atia A., Abdullah A. NQO1 enzyme and its role in cellular protection; an insight. *Iberoam. J. Med.* 2020;2(4):306-313. DOI 10.5281/zenodo.3877528.
Aubrey B.J., Strasser A., Kelly G.L. Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016;6(5):a026062. DOI 10.1101/cshperspect.a026062.

Balasubramaniam S.D., Balakrishnan V., Oon C.E., Kaur G. Key molecular events in cervical cancer development. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(7):384. DOI 10.3390/medicina55070384.
Basyar R., Saleh A.Z., Sastradinata I., Yuwono Y. p53 gene codon 72 polymorphisms among cervical carcinoma patients. *Indones. J. Obstet. Gynecol.* 2016;3(3):165-169. DOI 10.32771/inajog.v3i3.48.
Bond G.L., Hu W., Bond E.E., Robins H., Lutzker S.G., Arva N.C. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004;119(5):591-602. DOI 10.1016/j.cell.2004.11.022.
Bordignon V., Di Domenico E., Trento E., D'Agosto G., Cavallo I., Pontone M. How human papillomavirus replication and immune evasion strategies take advantage of the host DNA damage repair machinery. *Viruses*. 2017;9(12):390. DOI 10.3390/v9120390.
Chansaenroj J., Theamboonlers A., Junyangdikul P., Swangvaree S., Karalak A., Chinchai T. Polymorphisms in TP53 (rs1042522), p16 (rs11515 and rs3088440) and NQO1 (rs1800566) genes in Thai cervical cancer patients with HPV 16 infection. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013;14(1):341-346. DOI 10.71314/APJCP.2013.14.1.341.
Diao J., Bao J., Peng J., Mo J., Ye Q., He J. Correlation between NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 C609T polymorphism and increased risk of esophageal cancer: evidence from a meta-analysis. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2017;9(1):13-21. DOI 10.1177/1758834016668682.
Fernandes J.V., De Medeiros T.A.A., De Azevedo J.C.V., Cobucci R.N.O., De Carvalho M.G.F., Andrade V.S. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). *Oncol. Lett.* 2015;9(3):1015-1026. DOI 10.3892/ol.2015.2884.
Gheit T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. *Front. Oncol.* 2019;9:355. DOI 10.3389/fonc.2019.00355.
Hu X., Zhang Z., Ma D., Huettner P.C., Massad L.S., Nguyen L. TP53, MDM2, NQO1, and susceptibility to cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010;19(3):755-761. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-09-0886.
Karni-Schmidt O., Lokshin M., Prives C. The roles of MDM2 and MDMX in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 2016;11:617-644. DOI 10.1146/annurev-pathol-012414-040349.
Khoury R., Sauter S., Butsch Kovacic M., Nelson A., Myers K., Mehta P. Risk of human papillomavirus infection in cancer-prone individuals: What we know. *Viruses*. 2018;10(1):47. DOI 10.3390/v10010047.
Litwin T., Clarke M., Dean M., Wentzensen N. Somatic host cell alterations in HPV carcinogenesis. *Viruses*. 2017;9(8):206. DOI 10.3390/v9080206.
Malagón T., Louvanto K., Ramanakumar A.V., Koushik A., Coutlée F., Franco E.L. Viral load of human papillomavirus types 16/18/31/33/45 as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia and cancer by age. *Gynecol. Oncol.* 2019;155(2):245-253. DOI 10.1016/j.ygyno.2019.09.010.
McBride A.A., Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog.* 2017;13(4):e1006211. DOI 10.1371/journal.ppat.1006211.
Mendoza M., Mandani G., Momand J. The MDM2 gene family. *Biomol. Concepts*. 2014;5(1):9-19. DOI 10.1515/bmc-2013-0027.
Mittal S., Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 2017;772:23-35. DOI 10.1016/j.mrrev.2016.08.001.
Moschonas G.D., Tsakogiannis D., Lamprou K.A., Mastora E., Dimitriou T.G., Kyriakopoulou Z. Association of codon 72 polymorphism of p53 with the severity of cervical dysplasia, E6-T350G and HPV16 variant lineages in HPV16-infected women. *J. Med. Microbiol.* 2017;66(9):1358-1365. DOI 10.1099/jmm.0.000563.
Niwa Y., Hirose K., Nakanishi T., Nawa A., Kuzuya K., Tajima K. Association of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase C609T poly-

- morphism and the risk of cervical cancer in Japanese subjects. *Gynecol. Oncol.* 2005;96(2):423-429. DOI 10.1016/j.ygyno.2004.10.015.
- Oliner J.D., Saiki A.Y., Caenepeel S. The role of MDM2 amplification and overexpression in tumorigenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016;6(6):a026336. DOI 10.1101/cshperspect.a026336.
- Rampias T., Sasaki C., Psyri A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral. Oncol.* 2014;50(5):356-363. DOI 10.1016/j.oraloncology.2013.07.011.
- Ross D., Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol.* 2004;382:115-144. DOI 10.1016/S0076-6879(04)82008-1.
- Roura E., Travier N., Waterboer T., de Sanjosé S., Bosch F.X., Pawlita M. The influence of hormonal factors on the risk of developing cervical cancer and pre-Cancer: results from the EPIC cohort. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147029. DOI 10.1371/journal.pone.0147029.
- Saadatzadeh M., Elmi A., Pandya P., Bijangi-Vishehsaraei K., Ding J., Stamatkin C. The role of MDM2 in promoting genome stability versus instability. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(10):2216. DOI 10.3390/ijms18102216.
- Sen P., Ganguly P., Ganguly N. Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer (Review). *Oncol. Lett.* 2017;15(1):11-22. DOI 10.3892/ol.2017.7292.
- So K.A., Lee I.H., Lee K.H., Hong S.R., Kim Y.J., Seo H.H. Human papillomavirus genotype-specific risk in cervical carcinogenesis. *J. Gynecol. Oncol.* 2019;30(4):e52. DOI 10.3802/jgo.2019.30.e52.
- Storey A., Thomas M., Kalita A., Harwood C., Gardiol D., Mantovani F. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* 1998;393(6682):229-234. DOI 10.1038/30400.
- Tasic D., Lazarevic I., Knezevic A., Tasic L., Pikula A., Perisic Z. The impact of environmental and behavioural cofactors on the development of cervical disorders in HR-HPV-infected women in Serbia. *Epidemiol. Infect.* 2018;146(13):1714-1723. DOI 10.1017/S0950268818001668.
- Thomas M., Kalita A., Labrecque S., Pim D., Banks L., Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell Biol.* 1999;19(2):1092-1100. DOI 10.1128/MCB.19.2.1092.
- Tsvetkov P., Reuven N., Shaul Y. Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death Differ.* 2010;17(1):103-108. DOI 10.1038/cdd.2009.67.
- Vonsky M., Shabaeva M., Runov A., Lebedeva N., Chowdhury S., Palefsky J.M. Carcinogenesis associated with human papillomavirus infection. Mechanisms and potential for immunotherapy. *Biochemistry.* 2019;84(7):782-799. DOI 10.1134/S0006297919070095.
- Yang S., Zhao J., Li L. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene rs1800566 polymorphism increases the risk of cervical cancer in a Chinese Han sample. *Medicine (Baltimore).* 2020;99(20):e19941. DOI 10.1097/MD.00000000000019941.

ORCID ID

A.H. AlBosale orcid.org/0000-0003-1520-8245
E.V. Mashkina orcid.org/0000-0002-4424-9508

Acknowledgements. This study was performed with the equipment of the Center of collective use "High technologies" (Southern Federal University, Russia).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.


Received May 11, 2021. Revised September 30, 2021. Accepted October 1, 2021.

The functional insight into the genetics of cardiovascular disease: results from the post-GWAS study

L.O. Bryzgalov¹, E.E. Korbolina¹ , I.S. Damarov¹, T.I. Merkulova^{1, 2}

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 lungry@bionet.nsc.ru

Abstract. Cardiovascular diseases (CVDs), the leading cause of death worldwide, generally refer to a range of pathological conditions with the involvement of the heart and the blood vessels. A sizable fraction of the susceptibility loci is known, but the underlying mechanisms have been established only for a small proportion. Therefore, there is an increasing need to explore the functional relevance of trait-associated variants and, moreover, to search for novel risk genetic variation. We have reported the bioinformatic approach allowing effective identification of functional non-coding variants by integrated analysis of genome-wide data. Here, the analysis of 1361 previously identified regulatory SNPs (rSNPs) was performed to provide new insights into cardiovascular risk. We found 773,471 coding co-segregating markers for input rSNPs using the 1000 Genomes Project. The intersection of GWAS-derived SNPs with a relevance to cardiovascular traits with these markers was analyzed within a window of 10 Kbp. The effects on the transcription factor (TF) binding sites were explored by DeFine models. Functional pathway enrichment and protein-protein interaction (PPI) network analyses were performed on the targets and the extended genes by STRING and DAVID. Eighteen rSNPs were functionally linked to cardiovascular risk. A significant impact on binding sites of thirteen TFs including those involved in blood cells formation, hematopoiesis, macrophage function, inflammation, and vasoconstriction was found in K562 cells. 21 rSNP gene targets and 5 partners predicted by PPI were enriched for spliceosome and endocytosis KEGG pathways, endosome sorting complex and mRNA splicing REACTOME pathways. Related Gene Ontology terms included mRNA splicing and processing, endosome transport and protein catabolic processes. Together, the findings provide further insight into the biological basis of CVDs and highlight the importance of the precise regulation of splicing and alternative splicing.

Key words: non-coding genetic variation; rSNPs; cardio-vascular disease risk; GWAS association; 1000 Genomes Project; gene expression regulation; transcription factor binding.


For citation: Bryzgalov L.O., Korbolina E.E., Damarov I.S., Merkulova T.I. The functional insight into the genetics of cardiovascular disease: results from the post-GWAS study. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):65-73. DOI 10.18699/VJGB-22-10

Функциональный подход к изучению генетики сердечно-сосудистых заболеваний: post-GWAS исследование

Л.О. Брызгалов¹, Е.Е. Корболина¹ , И.С. Дамаров¹, Т.И. Меркулова^{1, 2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 lungry@bionet.nsc.ru

Аннотация. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают одно из ведущих мест по уровню смертности в развитых странах. На сегодняшний день значительное число геномных локусов продемонстрировали ассоциации с ССЗ, в основном в полногеномных исследованиях (GWAS), но лишь в немногих случаях установлены молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе ассоциации. Таким образом, задача определения функционально значимых для предрасположенности к ССЗ генетических вариантов остается актуальной. Ранее мы разработали биоинформатический подход, позволяющий эффективно идентифицировать регуляторные SNP (rSNP) – функциональные однонуклеотидные полиморфизмы, влияющие на экспрессию генов, путем анализа комплекса полногеномных данных. В данной работе с использованием данных проекта «1000 геномов» найден 773 471 кодирующий SNP, являющийся косегрегирующим маркером для 1361 идентифицированного нами rSNP. Проанализировано расположение этих маркеров в пределах геномного окна размером 10 Кб вокруг маркеров GWAS, ассоциированных с риском развития ССЗ или потенциально связанными с этим риском фенотипическими признаками. Влияние rSNP на сайты связывания транскрипционных факторов исследовано с помощью модели DeFine. Анализ межбелковых взаимодействий и обогащения биологических путей для соответствующих генов-мишеней проведен с использованием баз STRING и DAVID. Найдено восемнадцать rSNP, функционально

связанных с риском развития ССЗ. В клеточной линии K562 выявлено значительное влияние этих rSNP на сайты связывания тринадцати транскрипционных факторов, в том числе участвующих в процессах кроветворения, функционирования макрофагов, воспаления и вазоконстрикции. Для двадцати одного соответствующего генамишени, а также пяти функционально взаимодействующих с ними генов показано обогащение биологическими категориями сплайсосомы и эндоцитоза (KEGG), комплекса сортировки эндосом и процессов сплайсинга (REACTOME), а также некоторыми терминами генетических онтологий, в том числе сплайсинга и процессинга мРНК. В целом полученные результаты расширяют имеющиеся представления о роли rSNP и связанных с ними изменений экспрессии генов в развитии ССЗ и подчеркивают важность точной регуляции процессов сплайсинга мРНК и альтернативного сплайсинга для формирования определенного фенотипа.

Ключевые слова: некодирующие полиморфизмы; регуляторные SNP; предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям; полногеномные исследования ассоциаций, проект «1000 геномов»; регуляция экспрессии генов; транскрипционные факторы.

Introduction

While the running data indicate that the prevalence of cardiovascular disease may vary among regions of the world, they remain one of the leading causes of death and health loss and a large proportion of their forms are shown to have a familial aggregation and high heritability (Smith J.G., Newton-Cheh, 2015; Roth et al., 2017; Wang Y., Wang J.-G., 2018). The previous efforts led to the identification of candidate risk genes including the genes of renal homeostasis for Mendelian forms of abnormal blood pressure levels and several transcription factors (including NKX25, GATA4, TBX) for congenital septal (Kathiresan, Srivastava, 2012). However, the broad group of cardiovascular traits such as myocardial infarction/ischemia or coronary artery disease (CAD) show complex inheritance patterns, which suggest the collective and non-linear effects from multiple genetic and non-genetic factors. With the recent technological advances, the whole-exome sequencing (Li A.H. et al., 2017; Seidelmann et al., 2017; Khera et al., 2019) and genome-wide association studies, GWASs (in particular (Erdmann et al., 2018; Schunkert et al., 2018)) have been shown to be a powerful tool for discovering the genetic variation associated with cardiovascular risk. The outcomes from multiple GWASs and their meta-analysis completed during the past decade have been deposited in the catalogs, such as the catalog of published GWASs from The National Human Genome Research Institute (Buniello et al., 2019), the Coronary ARtery Disease Genome-wide Replication And Meta-analysis, CARDIoGRAM (Preuss et al., 2010) plus The Coronary Artery Disease (C4D) Consortium and UK Biobank (Ge et al., 2017).

The genes related to regulating blood pressure, the tone and elasticity of the vascular wall, the inflammation process, the proliferation of vascular smooth muscle cells and the levels of low density lipoprotein cholesterol (LDC-C) are 'traditionally' involved in cardiovascular risk. Moreover, the GWA studies resulted in numerous loci for cardiometabolic risk factors such as plasma biomarkers of lipid metabolism, thrombosis, inflammation and metabolic status playing a role in risk analysis. In the case of long QT syndrome, in particular, fifteen candidate genes have been reported to date, including several genes for ion channels (Refsgaard et al., 2012; Arking et al., 2014). Notably, three candidates (*KCNQ1*, *KCNH2*, and *SCN5A*) account for approximately 75 % of cases (Wallace et al., 2019). And there are more than 150 suggestive loci estimated for CAD although only 46 from them have reached the genome-wide significance threshold (den Hoed et al., 2015). Interestingly,

a considerable overlap has been shown between the risk genes for monogenic forms of CVDs and those generating an association signal in GWAS (Rau et al., 2015).

Together, these findings have developed a relatively comprehensible picture of the biology underlying the cardiovascular disease, but despite the advances, we are not able to analyze the functionality for the majority of the reported associated genetic loci. Among the reasons, there may be important limitation of GWAS for identifying risk genomic regions instead of risk genes and the non-coding localization of the majority of the susceptibility SNPs (Ward, Kellis, 2012). Current theories assume that so-called regulatory non-coding SNPs (rSNPs) seem to make the greatest contribution to the development of various multifactorial diseases including oncological and CAD as these are directly involved in the control of the gene expression levels.

One of the lessons learned is the growing need for the comprehensive post-GWAS analysis in order to translate the reported statistical association to uncover the causal variants amongst those in linkage disequilibrium (Mansur et al., 2018; Smith A.J.P. et al., 2018). Moreover, only some of GWAS-implicated loci (i. e. sixteen of 46 validated loci for CAD) are also associated with 'classic' genes of risk, therefore showing the potential involvement of 'non-traditional' biological pathways in the disease (Smith J.G., Newton-Cheh, 2015).

Since the advances in next-generation sequencing technologies have provided an expanding amount of large-scale *-omics* datasets, the research strategies have started to focus on the integration of various genome-wide information layers (Huang S. et al., 2017) using functional genomics assays. One way to find putative functional variants is to detect regions with allele-specific binding of transcription factors or histone modifications, suggesting their different regulatory downstream role. ChIP-seq data will provide the snapshots of protein-DNA interactions allowing the analysis of sites with significant difference in signal between the alleles or allelic differences. The employment of transcriptome (RNA-seq) data will provide the snapshots of gene expression levels depending on the allele. The epigenome (iTEA) analysis (Meng et al., 2018) in combination with the regulatory sequence annotations, i. e. DNase-seq and ChIP-seq datasets (Cavalli et al., 2019), is beginning to be used to screen for the causal variants changing gene expression, including within GWAS-derived loci. However, the researchers have not come close to solving the issue of identifying the rSNPs at the genome-wide scale. The limitations are imposed by the incomplete experimen-

tal data collected to date and some critical methodological problems. Notably, one of the major challenges has become the development of effective *in silico* (bioinformatic) approaches but these are relatively few in number to date and only the individual studies have been reported to elucidate the underlying mechanisms of CVDs (Gong et al., 2018; Roman, Mohlke, 2018).

To address the challenges, we have recently reported an effective bioinformatic approach that facilitates the systematic identification of functional non-coding variants from available genome-wide data (Korbolina et al., 2018). Our pipeline utilized multiple positional and functional criteria to reveal non-coding regulatory variants in the human genome and imputed curated GWAS association signals to select the potentially colorectal cancer-causal rSNPs within a 1 Kb window of genomic sequence centered at the GWAS-SNP. Initially, the regulatory properties of found rSNPs were shown on a number of human cell lines of different origins (HCT116, K562, MCF7). However, expression of tissue-specific transcription factors is suppressed in cell lines. For this reason, here we have adopted the list of 1361 regulatory SNPs from the said study. The data from 1000 Genomes Project (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015) were incorporated in the analysis to improve matching rSNPs with the phenotypic outcome that would be the risk of CVDs. Further, we tried to narrow the focus toward rSNPs that potentially result in a difference in predicted binding status of various transcription factors and performed the functional annotation of the targeted genes.

Materials and methods

Input data on non-coding regulatory variants in human genome. Regulatory SNPs from our earlier study (Korbolina et al., 2018) were used for input including the data on identified targeted genes. All of these were associated with the allele-specific binding of various TFs and allele-specific expression from raw data.

Genetics data. Genetic variants and allele information were retrieved from dbSNP150 (Database resources..., 2016) and four 1000 Genomes Project super populations (AFR, AMR, ASN and EUR) (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015). The GRCh37 annotation was used to map genetic variants to gene loci.

Assessment of the SNP clustering with a distance measure. To map significant GWAS associations to novel functional variants here we implemented the data of 1000 Genomes Project. First, we extracted the data on 2500 individual haplotype-resolved human genomes from various super populations (AFR, AMR, ASN and EUR). We found 1361 variants from the 1476 input rSNPs reported earlier (Korbolina et al., 2018) within this genomic data. Next, we extracted the data on all SNPs within the transcribed genomic regions. The lists of rSNPs defined from 1000 genomes ('population' set of 1361 variant) and coding SNPs defined from 1000 genomes were consolidated. Each individual from 2500 genome samples was genotyped separately by each SNP from the consolidated list. The genotype data were turned to binary, where "0" represented the most frequent allele and "1" – the minor allele within the individual genotype. The resulting genotype data were set to the 2D matrix containing 2500 individual genomes and genotypes for all SNPs from the consolidated

SNP1	11010011010011		
SNP2	11000011010011	XOR	Relative distance
Distance	00010000000000	=	1
SNP1	11010011010011		
SNPn	11010010010000	XOR	Relative distance
Distance	00000001000011	=	3

Fig. 1. Finding the relative SNP-to-SNP distance using XOR.

The binary code was used for genotypes (the symbols 0 and 1 were used to represent two different alleles in a heterozygous site).

list. The initial matrix was then transformed to the distance matrix using XOR logic gate. Figure 1 shows an example of SNP distance measurement by XOR.

All the relative distances were normalized on the number of times the minor allele was found there in the genomic data of 2500 genomes. Based on the analysis of the resulting distances, we quantified the likelihood of the repeated recognition of rSNPs and the coding SNP within one genotype in human populations. Here we found that in total 773 471 coding SNPs ($p < 0.01$) may be merely co-segregating markers for our input rSNPs.

Implementing GWAS data to interpret the input rSNPs functionality. Next, we examined GWAS index SNPs available up to date (May 2019). We used the 'cardio' signature for querying the GWAS Catalog (including 'heart', 'coronary artery disease', 'CAD', 'platelet', 'blood', 'blood cells', 'pressure', 'count', 'vessel', 'caliber', 'pulse', 'artery'). Next, we evaluated whether the input rSNPs or any of the corresponding coding markers lying within a 10 Kbp window of GWAS SNPs (Brodie et al., 2016) could be related to heart and vascular disease association signals (Suppl. Table 1)¹.

A functional protein association network. STRING v 11 (Szklarczyk et al., 2019) was selected as the PPI database with a subset of 21 genes targeted by 18 rSNPs that were found to be associated with cardiovascular risk, as input (see Suppl. Table 2 for details of enrichment analysis).

Functional annotation by DAVID. DAVID Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (Database resources..., 2016) was used to further interpret the same targeted genes with the default values set for all parameters. The outputs of DAVID functional annotation and clustering tools are given in the Suppl. Table 3.

In silico analysis of potentially affected TF binding sites. The sequence-based DeFine deep learning models were employed to predict the effects on transcription factor binding in K562 cells (the data are accessible online via the DeFine tool) and to rank 18 rSNPs identified for cardiovascular risk. The DeFine functional scores predict the transcriptional factor-DNA binding intensities and are appointed in the view of the differences between the reference sequence and the altered sequence, as reviewed in (Wang M. et al., 2018). The outputs including the maximum TF functional scores, the most likely candidate TFs and top 10 contact genes for each rSNP position are given in the Suppl. Table 4.

R code. The R package, version 3.1.0, was used for data analysis. The custom-made Perl scripts employed are available upon request.

¹ Supplementary Tables 1–4 are available in the online version of the paper: <https://disk.icgbio.ru/s/zBiq4fm632zRywe>

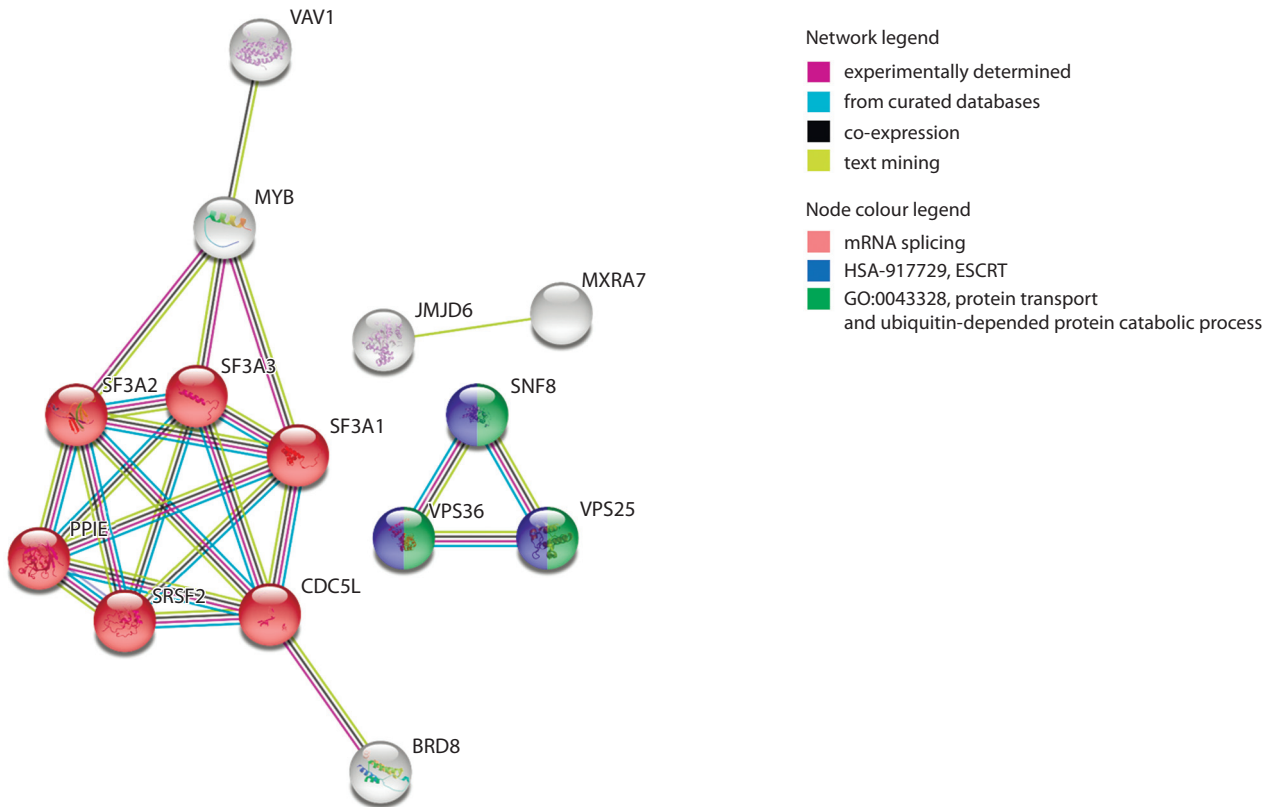


Fig. 2. Protein association network for 21 rSNP-targeted genes and 5 gene partners with a functional relevance to cardiovascular risk in STRING.

The network for rSNP targets has been expanded by additional 5 proteins (via the 'More' button in the STRING interface and default confidence cut-off). The network contains 26 nodes with 24 edges (vs 10 expected edges, the disconnected nodes are hidden); enrichment p -value < 0.001. The legend inset at the right shows the various types of evidence for the predicted association and the enriched annotation term for the protein (by different colours of the nodes).

Results

Investigating rSNP functional relevance to cardiovascular risk via GWAS associations

We analyzed 438 GWAS-SNPs with relevance for cardiovascular traits and defined eighteen candidate rSNP variants at a 10 Kbp window size (see Suppl. Table 1) including within the associated loci for coronary heart and artery disease (CAD, 3 loci), HLD cholesterol, QT interval, red blood cells and platelet cells traits. One interesting result was that ten GWAS-derived SNPs including the ones for phenotypical associations with systolic and diastolic blood pressure, pulse pressure, retinal arteriolar microcirculation and one for CAD entered the list of founded regulatory SNPs in the study. We considered the input rSNP targets (Korbolina et al., 2018), and any gene targeted to these ten GWAS-SNPs (initially from GWAS catalog) to be a candidate for mediating the association. Actually, only one cardio-related SNP out of eighteen was linked to more than one target gene: rs3744061 (*MFSD11*, *JMJD6*).

Functional annotation of the rSNP targeted genes

We further looked into the target genes to these eighteen cardio-vascular risk rSNPs as candidates for mediating the effects on CVDs. In our STRING enrichment analysis (Szklarczyk et al., 2019), 21 rSNP targeted genes had five predicted partners and these were shown significantly enriched in Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) spliceosome

pathway, two REACTOME pathways (endosomal sorting complex required for transport and mRNA splicing) and 40 Gene Ontology terms including gene expression, RNA splicing, regulation of mRNA splicing, regulation of alternative mRNA splicing via spliceosome, protein transport to vacuole involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway; ubiquitin-dependent protein catabolic process (see Suppl. Table 2 for the details of STRING enrichment analysis). Figure 2 shows the corresponding protein association network with evidence for association between the targets. Such an enrichment indicates that the input proteins are at least partially biologically connected as a group.

The same enriched groups were found by DAVID functional annotation tool (Huang D.W. et al., 2008), including mRNA splicing and mRNA 3'-splice site recognition, regulation of transcription and endosomal transport GO terms (see Suppl. Table 3). However, these processes could all be linked to the pathological features of CVDs, but the most notable is the group of targets that are associated with splicing and alternative splicing regulation (given in red nodes).

DeFine rSNP prioritization

The DeFine online tool revealed that eight rSNPs had positive functional scores meeting the pathogenic potential to enhance TF binding, and five – to weaken TF binding (see Suppl. Table 4) in the supported K562 cell line. The binding sites of

ten TFs were most strongly altered by 13 rSNPs according to DeFine models: TAL1, REST, NR1H2, SP2, RFX5, MXI1, PBX2, NFYB, ZNF274 and ZNF263. Nine out of ten of these TFs (with the exception of ZNF274) were the proteins with antibodies to which the immunoprecipitation was made by the original authors (as given in the Supplementary material, Korbolina et al., 2018). This would be expected in principle when examining certain regulatory regions.

In more detail, rs210962 (GWAS-derived) and rs7920217 functional variants shared the potential to weaken the binding of RE1 silencing transcription factor (REST) to the related genomic loci (the DeFine scores of -0.0778 and -0.0888 , respectively). rs2270574 and rs8106212 within the GWAS loci for CAD and platelet trait, respectively, shared the association with SP2 transcription factor, but had the opposite effects on TF binding according to DeFine scores (0.05020 to enhance and -0.0973 to weaken the binding, respectively). And again, two rSNPs shared the effects on TF binding sites for T-cell acute leukemia protein 1 (TAL1) in this study: rs140492 within the locus for HDL cholesterol (DeFine score 0.0996 to enhance the TF binding was counted) and rs10445033 – within GWAS locus for red blood cell levels with the DeFine score -0.0891 to weaken the TF binding. Again, DeFine identified the same targeted genes (i. e. *SNF8* for rs2270574) with additional potential targets in each rSNP case (ten top candidate genes are listed in the DeFine output data, see Suppl. Table 4).

Discussion

As has been mentioned in the Results, we have identified eighteen rSNPs with a functional relevance to CVDs that matched the GWAS loci for coronary heart and artery disease, HDL cholesterol, retinal arteriolar microcirculation, QT interval, red blood cells and platelet cells traits from this study (see Suppl. Table 1). The genome position of rSNP coincided with that for GWAS-derived SNP for ten identified variants out of eighteen. It was an interesting find as this was a relatively large part compared to our previously reported results for colorectal cancer (Korbolina et al., 2018) and cognitive disorders (Bryzgalov et al., 2018).

What we should like to mention is that a number of truly critical processes depend on the blood cells functionality and biological activities as has been widely demonstrated. Regarding erythrocytes, these include not only oxygen transport, but immune response (Astle et al., 2016), redox homeostasis (Kuhn et al., 2017) and regulation of vascular function (Helms et al., 2018; Rifkind et al., 2018). Moreover, several *ex vivo* studies on diabetes mellitus identified that red blood cells do act to mediate the development of endothelial dysfunction and cardiac injury (Yang et al., 2013; Zhou et al., 2018; Pernow et al., 2019). This means that any qualitative or quantitative deviations from the physiological ranges may be closely linked to the disease (Leal et al., 2018). The data suggest that the blood cell count and hematological parameters could be useful markers to improve the cardiovascular risk prediction; however, they have limited sensitivity (Mozos, 2015; Samman Tahhan et al., 2017; Lassale et al., 2018; Haybar et al., 2019). Interestingly, it was shown that the level of expression of some curated genes may independently aid in the prediction of heart failure prognosis when combined with neutrophil-to-lymphocyte ratio (Wan et al., 2018). The risk for CVDs

correlates well with platelet traits (Sloan et al., 2015; Vélez, García, 2015; Reinthaler et al., 2016; Gill et al., 2018), the initiation and progression of CAD in particular (Uysal et al., 2016). However, some have argued that shared genetic pathways linking blood cells with complex pathologies, including autoimmune diseases, schizophrenia, and CAD may be non-causal (Astle et al., 2016).

Still, our current knowledge of splicing regulation and alternative splicing in the heart is limited, but splicing analysis has emerged as an important line of research for the cardiovascular risk. The studies revealed that the regulation of splicing and alternative splicing events (reviewed in (van den Hoogenhof et al., 2016)) seem to play a causative role in heart development and cardiovascular disease. The promising therapeutic targets (Rexiati et al., 2018) have already been proposed. There is evidence that a significant number of alternate transcripts are increased in diseased hearts compared to controls, and can be involved in disease. Thus, abnormal splicing of apoptotic genes contributes to the pathogenesis of several CVDs including dilated and diabetic cardiomyopathy, atherosclerosis and heart failure as reviewed in (Dlamini et al., 2015). The dysregulation of cardiac splicing factors can also be sufficient to affect heart function and lead to disease. Thus, there is evidence that the decrease in RNA-binding motif protein 20 (RBM20) levels may be involved in dilated cardiomyopathy by providing input to splicing of at least several known target genes (Maatz et al., 2014). In the study, the target gene of the rs4360494 functional variant within the GWAS-derived locus for pulse pressure is the *SF3A3* gene that encodes subunit 3 of the splicing factor 3a protein heterotrimeric complex. As is known, the splicing factor 3a plays an important role in U2 snRNP biogenesis and thus, pre-mRNA splicing (Krämer et al., 2005; Huang C.-J. et al., 2011). With respect to other pathological states, targeting the components of the spliceosome has full potential as a strategy for cancer treatment and prognosis (Lin, 2017; El Marabti, Younis, 2018; Martinez-Montiel et al., 2018). Thus, the data suggest that SF3A3 is involved in the p53 activation, the induction of cell cycle arrest and cell death in non-small cell lung cancer (Siebring-van Olst et al., 2017). The *SRSF2* gene, encoding another splicing machinery component, could be used as a reliable prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma (Luo et al., 2017).

The role of endosomal system in the heart functioning and cardiovascular disease is described as critical, too (Yang et al., 2019), as endosomes contribute to control of cholesterol (LDL) plasma levels (Wijers et al., 2018), Ca^{2+} homeostasis and protein trafficking (Curran et al., 2015) and play an important part in atherosclerosis risk (Cai et al., 2018). However, surprisingly little is known regarding the regulation of endosome-based protein trafficking in the heart. Thus, our results could serve as useful background for further research. Protein quality and control and ubiquitin-proteasome system, UPS (Gilda et al., 2016; Barac et al., 2017; Gilda, Gomes, 2017; Dorsch et al., 2019; Shukla, Rafiq, 2019) have also played an essential role in the initiation and progression of CVDs. In short, the findings suggest that UPS contributes to structural remodeling of the myocardium, ischemia-reperfusion injury and myocardial cell loss, important components of progressive heart failure. There is evidence for the non-degradative role as well, as the ubiquitination was shown to affect the important

regulators of signaling pathways including those for the cell growth and apoptosis, DNA damage response, the innate immune response, endocytosis, and protein activity (reviewed partly in (Gupta et al., 2018)). Given that proteostasis is a dynamic multiple-step process involving complex molecular machinery, the deregulation at any stage could therefore be implicated in a wide variety of outcomes.

When addressing directly the list of targets for our 18 rSNPs that are likely relevant to cardiovascular function, a member of the VAV gene family – *VAV1* is the target of the rs8106212 variant for platelet distribution. Overall, the VAV proteins are known to interact with the receptors on cell surface to activate various downstream biological pathways thus leading to the alterations of transcription. *VAV1* is important in hematopoiesis, playing a role in T-cell and B-cell development and activation (Rodríguez-Fdez, Bustelo, 2019). Another candidate, the *PIEZO1* gene targeted by rs10445033 is widely associated with hereditary human diseases (Alper, 2017) and tissue homeostasis (Zhong et al., 2018). The homotetramer of the *PIEZO1* protein functions as a pore-forming subunit of a mechanically activated cation channel and contributes a lot to vascular biology and development (Li J. et al., 2014) including mechanistic signaling in endothelium (Albarrán-Juárez et al., 2018). Some studies suggest that the molecular events involved in the development of acute myocardial infarction may include MiR-103a microRNA expression in plasma and the subsequent regulation of the expression of *PIEZO1* protein (Huang L. et al., 2013). However, the up-regulation of *Piezo1* was demonstrated in rat model of heart failure (Liang et al., 2017).

Since the rSNPs do induce the variation in the gene expression, the significant rSNPs' effects on the binding affinity of a genomic locus for transcription factors can be a cause (Deplancke et al., 2016). There is relative evidence for the GWAS loci for complex diseases to be associated with not only ultimate changes in gene expression (Gallagher, Chen-Plotkin, 2018) but with the activity of various TFs (Harley et al., 2018). Here, we used the online classifier of variant pathogenicity, DeFine (Wang M. et al., 2018), to explore the functional effects of 18 rSNPs with the relevance to cardiovascular traits on the TF binding sites. DeFine classification approach employs the sequence-based deep learning models between the reference sequence and the altered sequence centered at the variant. The authors have shown that the given tool is capable to identify the causal non-coding variants within the reported GWAS loci for complex human diseases.

In this study, a significant functional impact on binding sites of thirteen TFs, including five genomic positions with potentially weakened and eight – with potentially enhanced TF binding, was found in K562 cells. Among ten identified TFs with maximum DeFine functional scores (see Suppl. Table 4), four TFs (NFYB, PBX2, SP2 and TAL1) were functionally reliable to CVDs when considering well-known roles. Thus, TAL1 is the erythroid differentiation factor that cooperates with various TFs to regulate hematopoiesis and normal differentiation of myeloid cells, and may also contribute to the process of malignant transformation (Vagapova et al., 2018). *PBX* genes encode homeodomain transcription factors, that were shown to determine the allele-specific phenotypic presentation of heart defects in mice and their loss

resulted in the insufficient expression of both genes controlling the blood vessel widening and narrowing and finally led to persistent vasoconstriction by multiple pathways (McCulley et al., 2017). NFYB (nuclear transcription factor Y subunit beta) is a subunit of a highly conserved trimeric TF that binds with high specificity to CCAAT motifs in the promoter regions in a variety of genes. Interestingly, the evidence for Nf-y, SP family factors (that bind to GC-boxes) and PBX1 to cooperate was identified (Suske, 2017; Völkel et al., 2018).

It is important that the regulatory elements of genome, the distribution of TF binding sites, and the effects of rSNPs on the gene expression can be highly tissue or cell line specific (Zhang et al., 2018). But since the tissue samples, in particular of the brain and heart, are very difficult to obtain from humans, it is not surprising that the approaches to genome-wide identifying of the functional variants were trained and available in cells and animal models first. It can be argued that genome-wide studying of the functional effects of non-coding variants on transcription very often relies on the modeling of the cell type-specific binding of transcription factors to regulatory elements of genome. The interest in the field of reliable *in silico* methods is increasing, but there are only a few that have been more or less broadly implemented according to PubMed analysis (Wang M. et al., 2018). Moreover, the evidence suggests that the performance of different functional prediction tools varies by disease phenotype (Anderson, Lassmann, 2018) and thus may give contradictory statements.

Overall, to date, using GWAS associations seems the most common way to explore the non-coding variants in the terms of functionality. Still, a survey from published studies showed that this approach helps to interpret just a minor part of thousands of identified rSNPs (Cavalli et al., 2016, 2019). Our results suggest that the reported analysis pipeline integrating the datasets from 1000 Genomes Project may serve as a general framework for future research and would eventually lead to investigation of novel functional variants within significant GWAS loci that confer human disease risk. Considering our previously obtained data for colorectal cancer (Korbolina et al., 2018) and a number of cognitive disorders (Bryzgalov et al., 2018), we have more evidence for the precise regulation of splicing mechanisms and alternative splicing to be among the key mechanisms underlying the effects of non-coding genetic variation on the phenotype including various pathological conditions.

Conclusions

Overall using GWAS associations seems the most commonly used way to explore the non-coding variants in the terms of functionality to date. Still, a survey from published studies showed that this approach helps to interpret just a minor part of thousands of identified rSNPs (Cavalli et al., 2016, 2019). Our results suggest that the reported analysis pipeline integrating the datasets from 1000 Genomes Project may serve as a general framework for future research and would eventually lead to investigation of novel functional variants within significant GWAS loci that confer human disease risk. In consideration of our previously obtained data for colorectal cancer (Korbolina et al., 2018) and a number of cognitive disorders (Bryzgalov et al., 2018), we have got another evidence for the precise regulation of splicing mechanisms and alternative splicing to

be among the key mechanisms underlying the effects of non-coding genetic variation on the phenotype including various pathological conditions.

References

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton A., Brooks L.D., Durbin R.M., Garrison E.P., Kang H.M., Korbel J.O., Marchini J.L., McCarthy S., McVean G.A., Abecasis G.R. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68-74. DOI 10.1038/nature15393.
- Albarrán-Juárez J., Iring A., Wang S., Joseph S., Grimm M., Strlic B., Wetschurck N., Althoff T.F., Offermanns S. Piezo1 and G_q/G₁₁ promote endothelial inflammation depending on flow pattern and integrin activation. *J. Exp. Med.* 2018;215(10):2655-2672. DOI 10.1084/jem.20180483.
- Alper S.L. Genetic Diseases of PIEZO1 and PIEZO2 Dysfunction. *Curr. Top. Membr.* 2017;79:97-134. DOI 10.1016/bs.ctm.2017.01.001.
- Anderson D., Lassmann T. A phenotype centric benchmark of variant prioritisation tools. *NPJ Genom. Med.* 2018;3:5. DOI 10.1038/s41525-018-0044-9.
- Arking D.E., Pulit S.L., Crotti L., van der Harst P., Munroe P.B., Koopmann T.T., Sotoodehnia N., Rossin E.J., Morley M., Wang X., ... Schwartz P.J., Käb S., Chakravarti A., Ackerman M.J., Pfeufer A., de Bakker P.I.W., Newton-Cheh C. Genetic association study of QT interval highlights role for calcium signaling pathways in myocardial repolarization. *Nat. Genet.* 2014;46(8):826-836. DOI 10.1038/ng.3014.
- Astle W.J., Elding H., Jiang T., Allen D., Ruklisa D., Mann A.L., Mead D., Bouman H., Riveros-Mckay F., Kostadima M.A., ... Bourque G., Frontini M., Danesh J., Roberts D.J., Ouwehand W.H., Butterworth A.S., Soranzo N. The allelic landscape of human blood cell trait variation and links to common complex disease. *Cell*. 2016; 167(5):1415-1429.e19. DOI 10.1016/j.cell.2016.10.042.
- Barac Y.D., Emrich F., Krutzwald-Josefson E., Schrepfer S., Sampaio L.C., Willerson J.T., Robbins R.C., Ciechanover A., Mohr F.-W., Aravot D., Taylor D.A. The ubiquitin-proteasome system: a potential therapeutic target for heart failure. *J. Heart Lung Transplant.* 2017;36(7):708-714. DOI 10.1016/j.healun.2017.02.012.
- Brodie A., Azaria J.R., Ofran Y. How far from the SNP may the causative genes be? *Nucleic Acids Res.* 2016;44(13):6046-6054. DOI 10.1093/nar/gkw500.
- Bryzgalov L.O., Korbolina E.E., Brusentsov I.I., Leberfarb E.Y., Bondar N.P., Merkulova T.I. Novel functional variants at the GWAS-implicated loci might confer risk to major depressive disorder, bipolar affective disorder and schizophrenia. *BMC Neurosci.* 2018; 19(Suppl.1):22. DOI 10.1186/s12868-018-0414-3.
- Buniello A., MacArthur J.A.L., Cerezo M., Harris L.W., Hayhurst J., Malangone C., McMahon A., Morales J., Mountjoy E., Sollis E., Suveges D., Vrousitou O., Whetzel P.L., Amode R., Guillen J.A., Riat H.S., Trevanion S.J., Hall P., Junkins H., Flicek P., Burdett T., Hindorf L.A., Cunningham F., Parkinson H. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(1): 1005-1012. DOI 10.1093/nar/gky1120.
- Cai Y., Wang X.-L., Flores A.M., Lin T., Guzman R.J. Inhibition of endo-lysosomal function exacerbates vascular calcification. *Sci. Rep.* 2018;8(1):3377. DOI 10.1038/s41598-017-17540-6.
- Cavalli M., Baltzer N., Pan G., Bárcenas Walls J.R., Smolinska Garbulowska K., Kumar C., Skrtic S., Komorowski J., Wadelius C. Studies of liver tissue identify functional gene regulatory elements associated to gene expression, type 2 diabetes, and other metabolic diseases. *Hum. Genomics.* 2019;13(1):20. DOI 10.1186/s40246-019-0204-8.
- Cavalli M., Pan G., Nord H., Wallén Arzt E., Wallerman O., Wadelius C. Allele-specific transcription factor binding in liver and cervix cells unveils many likely drivers of GWAS signals. *Genomics.* 2016; 107(6):248-254. DOI 10.1016/j.ygeno.2016.04.006.
- Curran J., Makara M.A., Mohler P.J. Endosome-based protein trafficking and Ca²⁺ homeostasis in the heart. *Front. Physiol.* 2015;6:34. DOI 10.3389/fphys.2015.00034.
- Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D7-D19. DOI 10.1093/nar/gkv1290.
- den Hoed M., Strawbridge R.J., Almgren P., Gustafsson S., Axelsson T., Engström G., de Faire U., Hedblad B., Humphries S.E., Lindgren C.M., Morris A.P., Östling G., Syvänen A.-C., Tremoli E., Hamsten A., Ingelsson E., Melander O., Lind L. GWAS-identified loci for coronary heart disease are associated with intima-media thickness and plaque presence at the carotid artery bulb. *Atherosclerosis.* 2015;239(2):304-310. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.032.
- Deplancke B., Alpern D., Gardeux V. The genetics of transcription factor DNA binding variation. *Cell.* 2016;166(3):538-554. DOI 10.1016/j.cell.2016.07.012.
- Dlamini Z., Tshidino S., Hull R. Abnormalities in alternative splicing of apoptotic genes and cardiovascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(11):27171-27190. DOI 10.3390/ijms161126017.
- Dorsch L.M., Schuld M., Knežević D., Wiersma M., Kuster D.W.D., van der Velden J., Brundel B.J.J.M. Untying the knot: protein quality control in inherited cardiomyopathies. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 2019;471(5):795-806. DOI 10.1007/s00424-018-2194-0.
- El Marabti E., Younis I. The cancer spliceome: reprogramming of alternative splicing in cancer. *Front. Mol. Biosci.* 2018;5:80. DOI 10.3389/fmolb.2018.00080.
- Erdmann J., Kessler T., Munoz Venegas L., Schunkert H. A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. *Cardiovasc. Res.* 2018;114(9):1241-1257. DOI 10.1093/cvr/cvy084.
- Gallagher M.D., Chen-Plotkin A.S. The post-GWAS era: from association to function. *Am. J. Hum. Genet.* 2018;102(5):717-730. DOI 10.1016/j.ajhg.2018.04.002.
- Ge T., Chen C.-Y., Neale B.M., Sabuncu M.R., Smoller J.W. Phenome-wide heritability analysis of the UK Biobank. *PLoS Genet.* 2017; 13(4):e1006711. DOI 10.1371/journal.pgen.1006711.
- Gilda J.E., Gomes A.V. Proteasome dysfunction in cardiomyopathies. *J. Physiol.* 2017;595(12):4051-4071. DOI 10.1113/JP273607.
- Gilda J.E., Lai X., Witzmann F.A., Gomes A.V. Delineation of molecular pathways involved in cardiomyopathies caused by troponin T mutations. *Mol. Cell. Proteom.* 2016;15(6):1962-1981. DOI 10.1074/mcp.M115.057380.
- Gill D., Monori G., Georgakis M.K., Tzoulaki I., Laffan M. Genetically determined platelet count and risk of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018;38(12):2862-2869. DOI 10.1161/ATVBAHA.118.311804.
- Gong J., Qiu C., Huang D., Zhang Y., Yu S., Zeng C. Integrative functional analysis of super enhancer SNPs for coronary artery disease. *J. Hum. Genet.* 2018;63(5):627-638. DOI 10.1038/s10038-018-0422-2.
- Gupta I., Varshney N.K., Khan S. Emergence of members of TRAF and DUB of ubiquitin proteasome system in the regulation of hypertrophic cardiomyopathy. *Front. Genet.* 2018;9:336. DOI 10.3389/fgene.2018.00336.
- Harley J.B., Chen X., Pujato M., Miller D., Maddox A., Forney C., Magnusen A.F., Lynch A., Chetal K., Yukawa M., Barski A., Salomonis N., Kaufman K.M., Kottyan L.C., Weirauch M.T. Transcription factors operate across disease loci, with EBNA2 implicated in autoimmunity. *Nat. Genet.* 2018;50(5):699-707. DOI 10.1038/s41588-018-0102-3.
- Haybar H., Pezeshki S.M.S., Saki N. Evaluation of complete blood count parameters in cardiovascular diseases: an early indicator of prognosis? *Exp. Mol. Pathol.* 2019;110:104267. DOI 10.1016/j.yexmp.2019.104267.
- Helms C.C., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B. Erythrocytes and vascular function: oxygen and nitric oxide. *Front. Physiol.* 2018;9:125. DOI 10.3389/fphys.2018.00125.

- Huang C.-J., Ferfoglía F., Raleff F., Krämer A. Interaction domains and nuclear targeting signals in subunits of the U2 small nuclear ribonucleoprotein particle-associated splicing factor SF3a. *J. Biol. Chem.* 2011;286(15):13106-13114. DOI 10.1074/jbc.M110.201491.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2008;4(1):44-57. DOI 10.1038/nprot.2008.211.
- Huang L., Li L., Chen X., Zhang H., Shi Z. MiR-103a targeting Piezo1 is involved in acute myocardial infarction through regulating endothelium function. *Cardiol. J.* 2013;23(5):556-562. DOI 10.5603/CJ.a2016.0056.
- Huang S., Chaudhary K., Garmire L.X. More is better: recent progress in multi-omics data integration methods. *Front. Genet.* 2017;8:84. DOI 10.3389/fgene.2017.00084.
- Kathiresan S., Srivastava D. Genetics of human cardiovascular disease. *Cell.* 2012;148(6):1242-1257. DOI 10.1016/j.cell.2012.03.001.
- Khera A.V., Chaffin M., Zekavat S.M., Collins R.L., Roselli C., Natarajan P., Lichtman J.H., D'Onofrio G., Mathera J., Dreyer R., Speratus J.A., Taylor K.D., Psaty B.M., Rich S.S., Post W., Gupta N., Gabriel S., Lander E., Ida Chen Y.-D., Talkowski M.E., Rotter J.I., Krumholz H.M., Kathiresan S. Whole-genome sequencing to characterize monogenic and polygenic contributions in patients hospitalized with early-onset myocardial infarction. *Circulation.* 2019;139(13):1593-1602. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035658.
- Korbolina E.E., Brusentsov I.I., Bryzgalov L.O., Leberfarb E.Y., Degtyareva A.O., Merkulova T.I. Novel approach to functional SNPs discovery from genome-wide data reveals promising variants for colon cancer risk. *Hum. Mutat.* 2018;39(6):851-859. DOI 10.1002/humu.23425.
- Krämer A., Ferfoglía F., Huang C.-J., Mulhaupt F., Nesic D., Tanackovic G. Structure-function analysis of the U2 snRNP-associated splicing factor SF3a. *Biochem. Soc. Trans.* 2005;33(Pt.3):439-442. DOI 10.1042/BST0330439.
- Kuhn V., Diederich L., Keller T.C.S., Kramer C.M., Lückstädt W., Panknin C., Suvorova T., Isakson B.E., Kelm M., Cortese-Krott M.M. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia. *Antioxid. Redox Signal.* 2017;26(13):718-742. DOI 10.1089/ars.2016.6954.
- Lassale C., Curtis A., Abete I., van der Schouw Y.T., Verschuren W.M.M., Lu Y., Bueno-de-Mesquita H.B. Elements of the complete blood count associated with cardiovascular disease incidence: findings from the EPIC-NL cohort study. *Sci. Rep.* 2018;8(1):3290. DOI 10.1038/s41598-018-21661-x.
- Leal J.K.F., Adjubo-Hermans M.J.W., Bosman G.J.C.G.M. Red blood cell homeostasis: mechanisms and effects of microvesicle generation in health and disease. *Front. Physiol.* 2018;9:703. DOI 10.3389/fphys.2018.00703.
- Li A.H., Hanchard N.A., Furthner D., Fernbach S., Azamian M., Nicosia A., Rosenfeld J., Muzny D., D'Alessandro L.C.A., Morris S., Jhangiani S., Parekh D.R., Franklin W.J., Lewin M., Towbin J.A., Penny D.J., Fraser C.D., Martin J.F., Eng C., Lupski J.R., Gibbs R.A., Boerwinkle E., Belmont J.W. Whole exome sequencing in 342 congenital cardiac left sided lesion cases reveals extensive genetic heterogeneity and complex inheritance patterns. *Genome Med.* 2017;9(1):95. DOI 10.1186/s13073-017-0482-5.
- Li J., Hou B., Tumova S., Muraki K., Bruns A., Ludlow M.J., Sedo A., Hyman A.J., McKeown L., Young R.S., Yuldasheva N.Y., Majeed Y., Wilson L.A., Rode B., Bailey M.A., Kim H.R., Fu Z., Carter D.A.L., Bilton J., Imrie H., Ajuh P., Dear T.N., Cubbon R.M., Kearney M.T., Prasad K.R., Evans P.C., Ainscough J.F.X., Beech D.J. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature.* 2014;515(7526):279-282. DOI 10.1038/nature13701.
- Liang J., Huang B., Yuan G., Chen Y., Liang F., Zeng H., Zheng S., Cao L., Geng D., Zhou S. Stretch-activated channel Piezo1 is up-regulated in failure heart and cardiomyocyte stimulated by AngII. *Am. J. Transl. Res.* 2017;9(6):2945-2955.
- Lin J.-C. Therapeutic applications of targeted alternative splicing to cancer treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;19(1):75. DOI 10.3390/ijms19010075.
- Luo C., Cheng Y., Liu Y., Chen L., Liu L., Wei N., Xie Z., Wu W., Feng Y. SRSF2 regulates alternative splicing to drive hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res.* 2017;77(5):1168-1178. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-16-1919.
- Maatz H., Jens M., Liss M., Schafer S., Heinig M., Kirchner M., Adami E., Rintisch C., Dauksaite V., Radke M.H., Selbach M., Barton P.J.R., Cook S.A., Rajewsky N., Gotthardt M., Landthaler M., Hubner N. RNA-binding protein RBM20 represses splicing to orchestrate cardiac pre-mRNA processing. *J. Clin. Investig.* 2014;124(8):3419-3430. DOI 10.1172/JCI74523.
- Mansur Y.A., Rojano E., Ranea J.A.G., Perkins J.R. Analyzing the effects of genetic variation in noncoding genomic regions. In: Deigner H.-P., Kohl M. (Eds.). Precision Medicine. Tools and Quantitative Approaches. Acad. Press, 2018;119-144. DOI 10.1016/B978-0-12-805364-5.00007-X.
- Martinez-Montiel N., Rosas-Murrieta N., Anaya Ruiz M., Monjaraz-Guzman E., Martinez-Contreras R. Alternative splicing as a target for cancer treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:545. DOI 10.3390/ijms19020545.
- McCulley D.J., Wienhold M.D., Hines E.A., Hacker T.A., Rogers A., Pewowaruk R.J., Zewdu R., Chesler N.C., Selleri L., Sun X. PBX transcription factors drive pulmonary vascular adaptation to birth. *J. Clin. Investig.* 2017;128(2):655-667. DOI 10.1172/JCI93395.
- Meng F., Yuan G., Zhu X., Zhou Y., Wang D., Guo Y. Functional variants identified efficiently through an integrated transcriptome and epigenome analysis. *Sci. Rep.* 2018;8(1):2959. DOI 10.1038/s41598-018-21024-6.
- Mozos I. Mechanisms linking red blood cell disorders and cardiovascular diseases. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:682054. DOI 10.1155/2015/682054.
- Pernow J., Mahdi A., Yang J., Zhou Z. Red blood cell dysfunction: a new player in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2019;115(11):1596-1605. DOI 10.1093/cvr/cvz156.
- Preuss M., König I.R., Thompson J.R., Erdmann J., Absher D., Assimes T.L., Blankenberg S., Boerwinkle E., Chen L., Cupples L.A., Hall A.S., Halperin E., Hengstenberg C., Holm H., Laaksonen R., Li M., März W., McPherson R., Musunuru K., Nelson C.P., Burnett M.S., Epstein S.E., O'Donnell C.J., Quertermous T., Rader D.J., Roberts R., Schillert A., Stefansson K., Stewart A.F.R., Thorleifsson G., Voight B.F., Wells G.A., Ziegler A., Kathiresan S., Reilly M.P., Samani N.J., Schunkert H., and on behalf of the CARDIOGRAM Consortium. Design of the Coronary ARtery Disease Genome-wide Replication And Meta-analysis (CARDIOGRAM) study: a genome-wide association meta-analysis involving more than 22000 cases and 60000 controls. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010;3(5):475-483. DOI 10.1161/CIRCGENETICS.109.899443.
- Rau C.D., Lusa A.J., Wang Y. Genetics of common forms of heart failure. *Curr. Opin. Cardiol.* 2015;30(3):222-227. DOI 10.1097/HCO.0000000000000160.
- Refsgaard L., Holst A.G., Sadjadieh G., Haunso S., Nielsen J.B., Olesen M.S. High prevalence of genetic variants previously associated with LQT syndrome in new exome data. *Eur. J. Hum. Genet.* 2012;20(8):905-908. DOI 10.1038/ejhg.2012.23.
- Reinthal M., Braune S., Lendlein A., Landmesser U., Jung F. Platelets and coronary artery disease: interactions with the blood vessel wall and cardiovascular devices. *Biointerphases.* 2016;11(2):29702. DOI 10.1116/1.4953246.
- Rexiati M., Sun M., Guo W. Muscle-specific mis-splicing and heart disease exemplified by RBM20. *Genes.* 2018;9(1):18. DOI 10.3390/genes9010018.
- Rifkind J.M., Mohanty J.G., Nagababu E., Salgado M.T., Cao Z. Potential modulation of vascular function by nitric oxide and reactive oxygen species released from erythrocytes. *Front. Physiol.* 2018;9:690. DOI 10.3389/fphys.2018.00690.

- Rodríguez-Fdez S., Bustelo X.R. The Vav GEF family: an evolutionary and functional perspective. *Cells*. 2019;8(5):465. DOI 10.3390/cells8050465.
- Roman T.S., Mohlke K.L. Functional genomics and assays of regulatory activity detect mechanisms at loci for lipid traits and coronary artery disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2018;50:52-59. DOI 10.1016/j.gde.2018.02.004.
- Roth G.A., Johnson C., Abajobir A., Abd-Allah F., Abera S.F., Abyu G., Ahmed M., Aksut B., Alam T., Alam K., ... Yip P., Yonemoto N., Younis M., Yu C., Vos T., Naghavi M., Murray C. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017;70:1-25. DOI 10.1016/j.jacc.2017.04.052.
- Samman Tahhan A., Hammadah M., Sandesara P.B., Hayek S.S., Kalogeropoulos A.P., Alkholder A., Mohamed Kelli H., Topel M., Ghasemzadeh N., Chivukula K., Ko Y.-A., Aida H., Hesaroihi I., Mahar E., Kim J.H., Wilson P., Shaw L., Vaccarino V., Waller E.K., Quyyumi A.A. Progenitor cells and clinical outcomes in patients with heart failure. *Circ. Heart. Fail.* 2017;10(8):e004106. DOI 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004106.
- Shunkert H., von Scheidt M., Kessler T., Stiller B., Zeng L., Vilne B. Genetics of coronary artery disease in the light of genome-wide association studies. *Clin. Res. Cardiol.* 2018;107(Suppl.2):2-9. DOI 10.1007/s00392-018-1324-1.
- Seidemann S.B., Smith E., Subrahmanyam L., Dykas D., Abou Ziki M.D., Azari B., Hannah-Shmouni F., Jiang Y., Akar J.G., Marieb M., Jacoby D., Bale A.E., Lifton R.P., Mani A. Application of whole exome sequencing in the clinical diagnosis and management of inherited cardiovascular diseases in adults. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2017;10(1):e001573. DOI 10.1161/CIRCGENETICS.116.001573.
- Shukla S.K., Rafiq K. Proteasome biology and therapeutics in cardiac diseases. *Transl. Res.* 2019;205:64-76. DOI 10.1016/j.trsl.2018.09.003.
- Siebring-van Olst E., Blijlevens M., de Menezes R.X., van der Meulen-Muileman I.H., Smit E.F., van Beusechem V.W. A genome-wide siRNA screen for regulators of tumor suppressor p53 activity in human non-small cell lung cancer cells identifies components of the RNA splicing machinery as targets for anticancer treatment. *Mol. Oncol.* 2017;11(5):534-551. DOI 10.1002/1878-0261.12052.
- Sloan A., Gona P., Johnson A.D. Cardiovascular correlates of platelet count and volume in the Framingham Heart Study. *Ann. Epidemiol.* 2015;25(7):492-498. DOI 10.1016/j.annepidem.2015.01.010.
- Smith A.J.P., Deloukas P., Munroe P.B. Emerging applications of genome-editing technology to examine functionality of GWAS-associated variants for complex traits. *Physiol. Genomics.* 2018;50(7):510-522. DOI 10.1152/physiolgenomics.00028.2018.
- Smith J.G., Newton-Cheh C. Genome-wide association studies of late-onset cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2015;83:131-141. DOI 10.1016/j.yjmcc.2015.04.004.
- Suske G. NF-Y and SP transcription factors – new insights in a long-standing liaison. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2017;1860(5):590-597. DOI 10.1016/j.bbagr.2016.08.011.
- Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D607-D613. DOI 10.1093/nar/gky1131.
- Uysal H.B., Dağlı B., Akgüllü C., Avcil M., Zencir C., Ayhan M., Sönmez H.M. Blood count parameters can predict the severity of coronary artery disease. *Korean J. Intern. Med.* 2016;31(6):1093-1100. DOI 10.3904/kjim.2015.199.
- Vagapova E.R., Spirin P.V., Lebedev T.D., Prassolov V.S. The role of TAL1 in hematopoiesis and leukemogenesis. *Acta Naturae.* 2018;10(1):15-23.
- van den Hoogenhof M.M.G., Pinto Y.M., Creemers E.E. RNA splicing. *Circ. Res.* 2016;118:454. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.115.307872.
- Vélez P., García Á. Platelet proteomics in cardiovascular diseases. *Transl. Proteomics.* 2015;7:15-29. DOI 10.1016/j.trprot.2014.09.002.
- Völkel S., Stielow B., Finkernagel F., Berger D., Stiewe T., Nist A., Suske G. Transcription factor Sp2 potentiates binding of the TALE homeoproteins Pbx1:Prep1 and the histone-fold domain protein NF-y to composite genomic sites. *J. Biol. Chem.* 2018;293(50):19250-19262. DOI 10.1074/jbc.RA118.005341.
- Wallace E., Howard L., Liu M., O'Brien T., Ward D., Shen S., Prendiville T. Long QT syndrome: genetics and future perspective. *Pediatr. Cardiol.* 2019;40(7):1419-1430. DOI 10.1007/s00246-019-02151-x.
- Wan G., Ji L., Xia W., Cheng L., Zhang Y. Screening genes associated with elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio in chronic heart failure. *Mol. Med. Rep.* 2018;18(2):1415-1422. DOI 10.3892/mmr.2018.9132.
- Wang M., Tai C., E W., Wei L. DeFine: deep convolutional neural networks accurately quantify intensities of transcription factor-DNA binding and facilitate evaluation of functional non-coding variants. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(11):e69-e69. DOI 10.1093/nar/gky215.
- Wang Y., Wang J.-G. Genome-wide association studies of hypertension and several other cardiovascular diseases. *Pulse.* 2018;6(3-4):169-186. DOI 10.1159/000496150.
- Ward L.D., Kellis M. Interpreting noncoding genetic variation in complex traits and human disease. *Nat. Biotechnol.* 2012;30(11):1095-1106. DOI 10.1038/nbt.2422.
- Wijers M., Rimbart A., Dalila N., Fedoseienko A., Wolters K., Dekker D., Smit M., Levels H., Huijckman N., Kloosterhuis N., Hofker M., Billadeau D., van Deursen J., Horton J., Burstein E., Tybjaerg-Hansen A., Kuivenhoven J.A., van de Sluis B. A regulatory role of the endosomal sorting machinery in controlling plasma LDL cholesterol levels and atherosclerosis in mice and humans. *Atheroscler. Suppl.* 2018;32:18. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.053.
- Yang J., Gonon A.T., Sjoquist P.-O., Lundberg J.O., Pernow J. Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(37):15049-15054. DOI 10.1073/pnas.1307058110.
- Yang J., Villar V.A.M., Rozyyev S., Jose P.A., Zeng C. The emerging role of sorting nexins in cardiovascular diseases. *Clin. Sci.* 2019;133(5):723-737. DOI 10.1042/CS20190034.
- Zhang L., Xue G., Liu J., Li Q., Wang Y. Revealing transcription factor and histone modification co-localization and dynamics across cell lines by integrating ChIP-seq and RNA-seq data. *BMC Genom.* 2018;19(Suppl.10):914. DOI 10.1186/s12864-018-5278-5.
- Zhong M., Komarova Y., Rehman J., Malik A.B. Mechanosensing Piezo channels in tissue homeostasis including their role in lungs. *Pulm. Circ.* 2018;8(2):1-6. DOI 10.1177/2045894018767393.
- Zhou Z., Mahdi A., Tratsiakovich Y., Zahorán S., Kövamees O., Nordin F., Uribe Gonzalez A.E., Alvarsson M., Östenson C.-G., Andersson D.C., Hedin U., Hermesz E., Lundberg J.O., Yang J., Pernow J. Erythrocytes from patients with type 2 diabetes induce endothelial dysfunction via arginase I. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018;72(7):769-780. DOI 10.1016/j.jacc.2018.05.052.

Acknowledgements. We greatly thank the people who contributed to a valuable, worldwide reference for human genetic variation, 1000 Genomes Project, by contributing their samples and their efforts. The study was funded by the grant 18-29-09041 from the Russian Foundation for Basic Research and the State Budget Project FWNR-2022-0016.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received September 7, 2021. Revised November 22, 2021. Accepted November 23, 2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Разграничение видов и анализ криптического разнообразия микроводорослей рода *Micractinium* (*Chlorophyta*)

Е.С. Кривина¹✉, А.Д. Темралеева¹, Ю.С. Букин²

¹ Федеральное исследовательское учреждение «Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пушино, Московская область, Россия

² Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

✉ pepelisa@yandex.ru

Аннотация. В статье рассматривается система зеленых микроводорослей рода *Micractinium*, построенная на основании морфологических, физиологических, экологических и молекулярно-генетических данных. Обсуждаются главные диагностические признаки видов, а также систематическое положение некоторых таксонов. Филогенетический анализ показал, что род *Micractinium* характеризуется достаточно высоким криптическим разнообразием. Используемые алгоритмы разграничения видов имели различные результаты по количеству выделенных кластеров потенциально видового уровня. Метод ABGD, основанный на дистанциях, является менее «чувствительным». Алгоритмы GMYC и PTP, анализирующие топологию филогенетического дерева, более реалистично отражают систематику рода *Micractinium* и служат эффективными вспомогательными инструментами для разграничения видов. Кластеризация, полученная двумя последними методами, хорошо согласуется с морфологическими (размеры и форма клеток, способность формировать колонии, продуцирование щетинок, тип хлоропласта), физиологическими (потребность в витаминах, реакция на воздействие высоких и низких температур), молекулярно-генетическими (наличие интронов и их длина, уровень генетических различий, наличие компенсаторных замен (СВС) или характерных особенностей вторичной структуры в ITS1 и ITS2) и экологическими признаками (среда обитания). Показана полифилетичность типового вида рода *M. pusillum*, а также *M. belenophorum*. Интрон был эффективен как вспомогательный инструмент для разграничения видов, однако результаты анализа интронов необходимо учитывать в совокупности с другими признаками. Применение СВС-подхода, базирующегося на поиске компенсаторных замен в консервативных регионах ITS2, было успешным только для отграничения криптических видов от «истинных» представителей *M. pusillum*. При разграничении видов эффективнее учитывать все СВС в ITS1 и ITS2 и анализировать характерные структурные различия (молекулярные подписи) во вторичной структуре внутренних транскрибируемых спейсеров. Анализ генетических дистанций нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 показал, что внутривидовые различия у представителей рода колебались в пределах 0–0.5 %, межвидовые – 0.6–4.7 %. Благодаря полифазному подходу удалось охарактеризовать 29 кластеров и филогенетических линий видового уровня в рамках рода *Micractinium* и выдвинуть предположения о видах внутри выделенных групп. Ключевые слова: зеленые микроводоросли; ABGD; GMYC; PTP; морфология; экология; филогения; фрагмент 18S–ITS1–5.8S–ITS2.

Для цитирования: Кривина Е.С., Темралеева А.Д., Букин Ю.С. Разграничение видов и анализ криптического разнообразия микроводорослей рода *Micractinium* (*Chlorophyta*). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):74-85. DOI 10.18699/VJGB-22-11

Species delimitation and microalgal cryptic diversity analysis of the genus *Micractinium* (*Chlorophyta*)

E.S. Krivina¹✉, A.D. Temraleeva¹, Yu.S. Bukin²

¹ Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”, Pushchino, Moscow region, Russia

² Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

✉ pepelisa@yandex.ru

Abstract. In this article, the system of the green microalgal genus *Micractinium*, based on morphological, physiological, ecological and molecular data, is considered. The main diagnostic species characteristics and the taxonomic placement of some taxa are also discussed. Phylogenetic analysis showed that the genus *Micractinium* is characterized by high cryptic diversity. The algorithms used for species delimitation had different results on the number of potentially species-level clusters allocated. The ABGD method was less “sensitive”. The tree-based approaches GMYC and PTP showed a more feasible taxonomy of the genus *Micractinium*, being an effective additional tool for distinguishing species. The clustering obtained by the latter two methods is in good congruence with morphological (cell size and shape, ability to form colonies, production of bristles, chloroplast type), physiological (vitamin requirements, reaction to high and low temperatures), molecular (presence of introns, level of genetic differences, presence of CBCs

or special features of the secondary structure in ITS1 and ITS2) and ecological characteristics (habitat). The polyphyly of the holotype of the genus *M. pusillum* as well as *M. belenophorum* is shown. The intron was effective as an additional tool for distinguishing species, and the results of the intron analysis should be taken into account together with other characteristics. The CBC approach, based on the search for compensatory base changes in conservative ITS2 regions, was successful only for distinguishing cryptic species from "true" members of *M. pusillum*. Therefore, to distinguish species, it is more effective to take into account all the CBC in ITS1 and ITS2 and analyze characteristic structural differences (molecular signatures) in the secondary structure of internal transcribed spacers. The genetic distances analysis of 18S–ITS1–5.8S–ITS2 nucleotide sequences showed that intraspecific differences in the genus ranged from 0 to 0.5 % and interspecific differences, from 0.6 to 4.7 %. Due to the polyphasic approach, it was possible to characterize 29 clusters and phylogenetic lines at the species level within the genus *Micractinium* and to make assumptions about the species.

Key words: green microalgae; ABGD; GMYC; PTP; species delimitation; morphology; ecology; phylogeny; 18S–ITS1–5.8S–ITS2 fragment.

For citation: Krivina E.S., Temraleeva A.D., Bukin Yu.S. Species delimitation and microalgal cryptic diversity analysis of the genus *Micractinium* (Chlorophyta). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):74-85. DOI 10.18699/VJGB-22-11

Введение

Род *Micractinium* был описан G. Fresenius в 1858 г. и отнесен к семейству Micractiniaceae. Долгое время считалось, что данный род включает только микроводоросли, которые, в отличие от рода *Chlorella* и прочих «маленьких зеленых шариков», формируют колонии и имеют щетинки, состоящие из белка, лишённые целлюлозных волокон и развивающиеся после образования клеточной стенки (Schnepf et al., 1980). Видовые различия основывались на незначительных изменениях в формировании колоний, а также длины и количества щетинок.

В результате филогенетического анализа последовательностей гена 18S рРНК М. Wolf с коллегами (Wolf et al., 2003) показали, что штаммы рода *Micractinium* входят в класс *Trebouxiophyceae* и тесно связаны с родом *Chlorella* Beijerinck. Позже было установлено (Luo et al., 2005, 2006), что формирование колоний и продуцирование щетинок нередко являются реакцией на так называемую пастбищную нагрузку со стороны альгофагов (в первую очередь коловраток и инфузорий); в этой работе высказано также предположение о полифилетичности типового вида рода – *M. pusillum*. Т. Pröschold с соавторами (Pröschold et al., 2010) по данным молекулярно-генетических исследований доказали, что род *Diacanthos* с его типовым видом *D. belenophorus* является частью рода *Micractinium*. Обобщив результаты молекулярно-генетического, морфологического и онтогенетического анализов, исследователи предложили новую концепцию клады *Chlorella*, в соответствии с которой род *Micractinium* был перенесен в семейство Chlorellaceae (Wolf et al., 2003; Krienitz et al., 2004; Fawley et al., 2005; Luo et al., 2010; Pröschold et al., 2010).

В настоящее время в составе рода *Micractinium* насчитывается 20 видов микроводорослей. Однако фрагмент 18S–ITS1–5.8S–ITS2 секвенирован только для 9 видов, среди которых встречаются как микроводоросли с классическим *Micractinium*-подобным морфотипом, т. е. формирующие колонии и продуцирующие щетинки, так и организмы, имеющую типичную *Chlorella*-подобную морфологию (например, *M. singularis*, *M. variabile*, *M. simplicissimum*, *M. inermum*, *M. tetrahymenae*), у которых у стандартных условий клетки одиночные, а щетинки отсутствуют (Hoshina, Fujiwara, 2013; Chae et al., 2019; Pröschold et al., 2020).

Представители рода *Micractinium* широко распространены в различных биотопах, в том числе в пресноводных и солоноватоводных водоемах, горячих источниках и в холодных водах Антарктиды, при температурах от нуля и выше 70 °C (Hoshina, Fujiwara, 2013; Onay et al., 2014; Adar et al., 2016; Chae et al., 2019). Они играют важную роль в жизни экосистем, активно участвуя в процессах фотосинтеза органических веществ и фотосинтетической аэрации, а также естественного самоочищения водоема путем аккумуляции, трансформации и минерализации поллютантов (Вайшля, Кулятов, 2011; Mehrabadi et al., 2017). Данные микроводоросли активно используются для производства кормов для животных, пищевых добавок и для очистки сточных вод (Lipstein, Hurwitz, 1983; Onay et al., 2014; Mehrabadi et al., 2017). Кроме того, некоторые виды рода *Micractinium* признаны подходящим сырьем для биотоплива из-за высокой скорости роста в сочетании с высоким содержанием липидов (Onay et al., 2014; Adar et al., 2016). В настоящее время значительный интерес для биотехнологии представляют термофильные и криотолерантные микроводоросли рода *Micractinium*, которые способны накапливать липиды или другие ценные вещества (Onay et al., 2014; Adar et al., 2016; Chae et al., 2021). Точная видовая идентификация в этом случае становится первоочередной задачей, поскольку экологическая пластичность видов к абиотическим факторам среды может существенно варьировать не только в рамках всего рода, но и между близкородственными видами (Onay et al., 2014; Chae et al., 2021).

Цель нашей работы заключалась в комплексном исследовании представителей рода *Micractinium*, включая новые штаммы Альгологической коллекции Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (ИФХиБПП РАН) – Algal Collection of Soil Science Institute (ACSSI), для надежного разграничения близкородственных таксонов на уровне вида. Впервые для всех описанных видов *Micractinium* были обобщены морфологические, физиологические и экологические характеристики, рассмотрены результаты филогенетического анализа фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2, включая наличие интронов и их характеристики, значения генетических дистанций, оценены различия во вторичных структурах спейсеров ITS1 и ITS2, в том числе присутствие

компенсаторных замен (СВС) и структурные отличия, а также определены видовые границы с помощью методов GMYC, PTP и ABGD. На основании полифазного подхода выдвинуты предположения о критериях разделения видов внутри рода.

Материалы и методы

Объектами исследования стали описанные и депонированные в GenBank генетические последовательности штаммов, принадлежащих роду *Micractinium*, а также шесть новых штаммов микроводорослей коллекции ACSSI. Штаммы ACSSI 198, ACSSI 287 и ACSSI 345 были изолированы из воды с поверхностного горизонта пелагической зоны оз. Прудовиков (53°31'44.4" с. ш., 49°30'58.0" в. д., г. Тольятти, Самарская область, Россия), ACSSI 343 и ACSSI 344 – из воды с поверхностного горизонта пелагической зоны и зарослей макрофитов оз. Большое Васильевское соответственно (53°32'45.2" с. ш., 49°32'02.0" в. д., Тольятти, Самарская область, Россия). Штамм ACSSI 332 (= IPPAS C-16) является субкультурой Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS и изолирован из горячих источников на Чукотском полуострове.

Изоляция и культивирование новых штаммов. Каплю озерной воды без предварительной фильтрации наносили на твердую среду BG-11 с азотом (1 % агар, pH = 7.2) и далее многократно пересевали отдельные колонии. Полученные изоляты культивировали в климатостате при стандартных условиях (температура +23...+25 °C, свет 60–75 мкмоль фотонов/(м²·с), фотопериод 12 ч).

Микроскопия. Морфологию и жизненный цикл указанных штаммов изучали методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) в ЦКП ИФХиБПП РАН. Результаты наблюдений документированы рабочими рисунками и фотографиями, снятыми с помощью цветных цифровых камер «Видеозавр» (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Сроки наблюдения составили от 2 недель до 12 месяцев. Для определения границ варьирования морфологических признаков были проанализированы характеристики 200 вегетативных клеток каждого штамма.

Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК. Суммарную ДНК из штаммов выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь Screen Mix-HS («Евроген», Россия). Праймеры для ПЦР генов 18S и 5.8S рРНК и спейсеров ITS1, ITS2 и условия амплификации приведены в работе (Krivina, Temraleeva, 2020). Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1 % агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Standard («Евроген»). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО «Синтол» (Россия).

Молекулярно-филогенетический анализ. Для анализа филогении и уточнения таксономического положения исследуемых штаммов был выполнен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Отбор последовательностей осуществляли исходя из критериев максимального родства (сходство $\geq 95\%$), качества прочтения, длины прочтения (не менее 2300 п. н.) и принадлежности к типовым видам и аутентичным штаммам. В состав выборки для филогенетического анализа вошли 59 штаммов. Названия таксонов приведены согласно Международной электронной базе данных AlgaeBase (Guiry M.D., Guiry G.M., 2021). В программе BioEdit по алгоритму ClustalW было выполнено множественное выравнивание. Реконструированное методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-TREE (с оценкой достоверности топологии сверхбыстрым бутстреп-анализом и тестированием эволюционной модели с помощью AIC критерия) филогенетическое дерево было использовано для разграничения видов с помощью алгоритма Poisson tree processes (PTP) на онлайн-сервере <https://species.h-its.org/>.

Для разграничения видов в массиве данных применяли метод автоматического поиска межвидового пробела/разрыва (gap) в генетических дистанциях (automatic barcode gap discovery, ABGD) (Puillandre et al., 2012) на онлайн-сервере <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>. Для анализа ABGD использовалась матрица генетических дистанций, рассчитанная по методу максимального правдоподобия в программе IQ-TREE. При ABGD методе результаты анализировались как в режиме начального разделения (initial partition), так и в режиме рекурсивного разделения (recursive partition). Третьим методом была обобщенная смешанная модель Юла с учетом целостности видов (general mixed Yule coalescent model, GMYC) (Fujisawa, Barraclough, 2013), реализованная в пакете 'splits' для языка программирования R v. 3.4.4 (<https://www.R-project.org/>). Для GMYC анализа использовалось ультраметрическое дерево, реконструированное в программе BEAST v. 1.10.4.

Реконструкция дерева в BEAST проводилась по четырем видообразовательным моделям: модель видообразования Юла (Yule speciation model) (Aldous, 2001) со строгими молекулярными часами; модель видообразования Юла с расслабленными молекулярными часами со скоростями эволюции, распределенными по логнормальному распределению; модель видообразования рождения–гибели видов (birth-death speciation model) (Lambert, Stadler, 2013) со строгими молекулярными часами; модель видообразования рождения–гибели видов с расслабленными молекулярными часами со скоростями эволюции, распределенными по логнормальному распределению. Выбор лучшей видообразовательной модели осуществляли с помощью сравнения значений маргинального правдоподобия, рассчитанных методом последовательного семплирования (path sampling analysis) (Lartillot, Philippe, 2006) в программе BEAST v. 1.10.4. При реконструкции дерева в программе BEAST задавалось 50000000 генераций для Марковских цепей и 250000 генераций Марковских цепей и 200 шагов для расчета маргинального правдоподобия. При данных параметрах все значения ESS статистики – показателя сходимости BEAST анализа – были более 200. Для визуализации результатов использовалось ультраметрическое байесовское филогенетическое дерево. Выборка деревьев сверхбыстрого бутстреп-анализа, полученная

в программе IQ-TREE, была совмещена с топологией байесовского ультраметрического дерева для расчета бутстреп-поддержек методом максимального правдоподобия (сверхбыстрый бутстреп-анализ). Таким образом, поддержка топологии ультраметрического байесовского дерева была оценена байесовским методом с помощью апостериорных вероятностей и бутстреп-анализа. Для расчета бутстреп-поддержек применяли ранее разработанный нами алгоритм (Temraleeva et al., 2018), реализованный с помощью функций пакета APE (Paradis et al., 2004) для языка программирования R v. 3.4.4. В качестве внешней группы при филогенетических реконструкциях выбрали представителя сестринского рода *Chlorella* (*Trebouxio-phyceae*, *Chlorophyta*) – *C. vulgaris*. Распределения генетических дистанций были визуализированы в виде гистограммы в среде статистического программирования R v. 3.4.4.

Генетические различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических дистанций (K2P дистанций), которые вычислялись в программе MEGA 6.0. Боксплот генетических дистанций построен в среде статистического программирования R v. 3.4.4 (<https://www.R-project.org/>). Для сравнения топологии деревьев использовали данные статей (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006; Hoshina et al., 2010, 2017; Pröschold et al., 2010, 2011, 2020; Bock et al., 2011; Hoshina, Nakada, 2018).

Фолдинг ITS1 и ITS2 проводили с помощью веб-сервера RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) в соответствии с принципом минимальной энергии. При оценке правильности предсказания вторичной структуры ITS1 и ITS2 ориентировались на работы А. Coleman (2015) и L. Caisová с соавторами (Caisová et al., 2013) соответственно. Сравнение вторичной структуры спейсеров между штаммами, поиск консервативных мотивов и компенсаторных замен (CBC) осуществляли в программе 4SALE (Seibel et al., 2008). При анализе ITS2 для разделения видов особое внимание уделено подходу *sensu* А. Coleman (2000, 2015), согласно которому наличие даже одной CBC в консервативных регионах ITS2 (5 п. н. шпильки I, 10 п. н. шпильки II, вся шпилька III) у двух микроводорослей коррелирует с их половой несовместимостью. Вторичные структуры спейсеров визуализированы в программе PseudoViewer3.

Статистический анализ различных признаков представителей рода *Micractinium*. Для сравнительного анализа признаки штаммов были закодированы в виде бинарных векторов. Длина бинарного вектора была равна количеству его возможных состояний, при этом каждый элемент соответствовал определенному состоянию. Для анализируемых штаммов в позиции, соответствующей состоянию признака, записывалась 1, остальные элементы имели значение 0. Все бинарные векторы, определяющие состояния каждого из признаков для всех исследуемых штаммов, были сведены в единую таблицу. В анализе использовались штаммы, для которых были известны состояния 80 % рассматриваемых признаков и более, остальные штаммы исключались из анализа.

На основе бинарной таблицы состояний признаков была проведена визуализация сходства и различия штаммов с

Таблица 1. Размеры вегетативных клеток исследуемых штаммов

Штамм	Размер, мкм		
	средний	минимальный	максимальный
ACSSI 198, ACSSI 287	4.3 ± 1.08*	2.2	6.2
ACSSI 343, ACSSI 344, ACSSI 345	5.7 ± 1.61	3.2	10.5
ACSSI 332	4.4 ± 1.04	2.5	6.1

Примечание. Для каждого штамма проведено 200 измерений.
* Указано стандартное отклонение.

помощью многомерного шкалирования, для которого использовалась матрица дистанций Жаккарда (единица минус доля общих ненулевых состояний в общем количестве ненулевых состояний у двух сравниваемых штаммов). При расчете для каждой пары штаммов исключались признаки, не определенные для одного из штаммов. Значимость признака в общем распределении дистанций между штаммами определяли с помощью теста Мантела (Mantel, 1967) на базе коэффициента корреляции Пирсона; достоверность корреляции устанавливали перестановочным тестом (10000 перестановок). При проведении теста Мантела сопоставляли общую матрицу дистанций Жаккарда с матрицами дистанций, рассчитанными для каждого признака в отдельности. Чем выше значение коэффициента корреляции Пирсона для рассматриваемого признака, тем больший вклад он вносит в разделение штаммов. Все расчеты выполнены с помощью функций пакета ‘vegan’ (Dixon, 2003) для языка программирования R.

Результаты

Морфология штаммов ACSSI. Все изученные штаммы имели *Chlorella*-подобный морфотип: клетки одиночные, шаровидной формы, не продуцируют щетинки. Размеры вегетативных клеток ACSSI 343, ACSSI 344 и ACSSI 345 были выше, чем ACSSI 198, ACSSI 287 и ACSSI 332 (табл. 1).

Хлоропласт пристенный, преимущественно чашевидный. Однако у штаммов ACSSI 343, ACSSI 344 и ACSSI 345 во взрослых клетках встречается блюдцевидный хлоропласт (~20 %) и полый шаровидный с отверстием (~20 %). Пиреноид один, шаровидный или широкоовальный с сегментированной крахмальной оберткой. У всех штаммов наблюдали бесполое размножение с помощью автоспор. У штаммов ACSSI 343, ACSSI 344 и ACSSI 345 их количество варьировало от 2 до 8. У штаммов ACSSI 198, ACSSI 287 отмечалось, как правило, 2–4 автоспоры (редко 8), тогда как у ACSSI 332 – не более 4 автоспор. Исходя из морфологических характеристик, исследуемые штаммы изначально были отнесены к роду *Chlorella*.

Филогенетический анализ. Лучшей моделью эволюции ДНК для исследуемого набора нуклеотидных последовательностей (18S–ITS1–5.8S–ITS2) считается GTR + I + G (AIC = 38198.0101), которая использовалась во всех дальнейших расчетах. Результаты path sampling анализа показали, что оптимальной моделью для рекон-

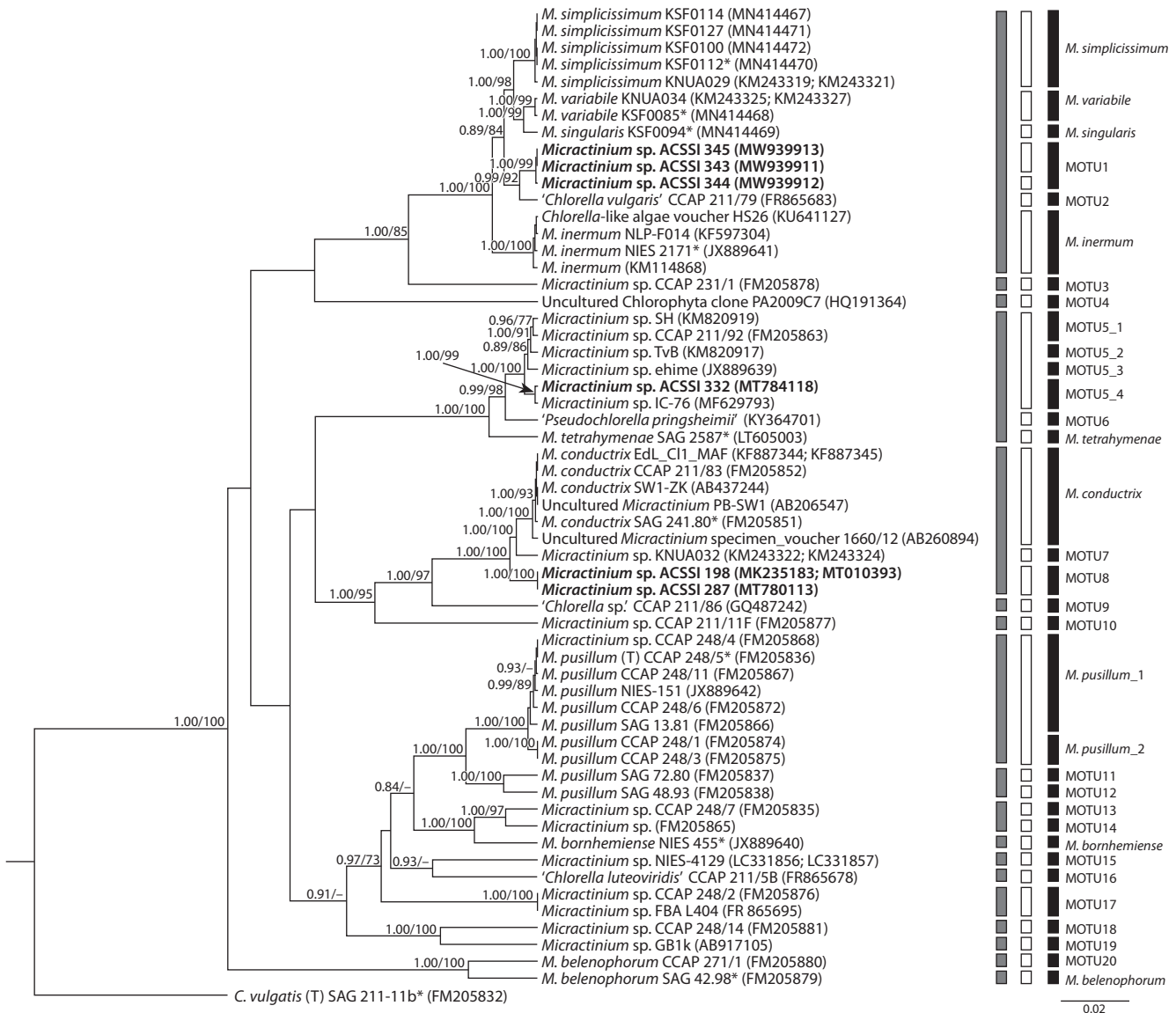


Рис. 1. Укорененное ультраметрическое филогенетическое дерево зеленых микроводорослей рода *Micractinium*, построенное методом Байеса (BI) на основе последовательностей генов 18S и 5.8S рРНК и спейсеров ITS1 и ITS2 (2546 п. н.).

В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны апостериорные вероятности (PP) и бутстреп-значения (BP); значения PP < 0.7 и BP < 70 % не показаны. Модель нуклеотидных замен – GTR + I + G. Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI; звездочкой отмечены аутентичные штаммы; (T) – типовой вид. Прямоугольниками обозначена кластеризация различными методами разграничения видов: серый цвет – ABGD, белый – PTP, черный – GMYC.

струкции филогенетического дерева байесовским методом в программе BEAST является модель видообразования рождения–гибели видов с расслабленными молекулярными часами со скоростями эволюции, распределенными по логнормальному распределению (наименьшее значение показателя маргинального правдоподобия $L_n(L) = -18996.049$). Филогенетическое дерево, реконструированное по этой видообразовательной модели, использовалось для дальнейшего анализа. Принципиальных отличий топологии BEAST дерева (рис. 1) от топологии IQ-TREE (Прил. 1)¹ в узлах с высокой поддержкой не выявлено.

По итогам анализа все шесть штаммов принадлежали роду *Micractinium* (см. рис. 1). Штаммы ACSSI 343,

ACSSI 344 и ACSSI 345 с высокими статистическими поддержками (апостериорные вероятности PP = 0.89, бутстреп-значения BP = 84 %) объединяются с одноклеточными, не продуцирующими щетинки видами *M. simplicissimum*, *M. variabile*, *M. singularis* и штаммом CCAP 211/79. Сестринским к ним стал *M. inermum* (PP = 1.00, BP = 100 %). Уровень генетических различий между штаммами ACSSI 343, ACSSI 344, ACSSI 345 и сестринскими кластерами составлял 0.7–0.9 %. Штамм ACSSI 332 с максимальными статистическими поддержками кластеризовался с *Chlorella*-подобными штаммами TvB, SH, CCAP 211/92, ehime, IC-80. Сестринскими филогенетическими линиями к данному кластеру являются неверно идентифицированная *Pseudochlorella pringsheimii* и *M. tetrahymenae* (PP = 0.99–1.00, BP = 98–100 %). Штамм ACSSI 332 в составе гена 18S рРНК, в отличие от TvB, SH,

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx1.pdf>

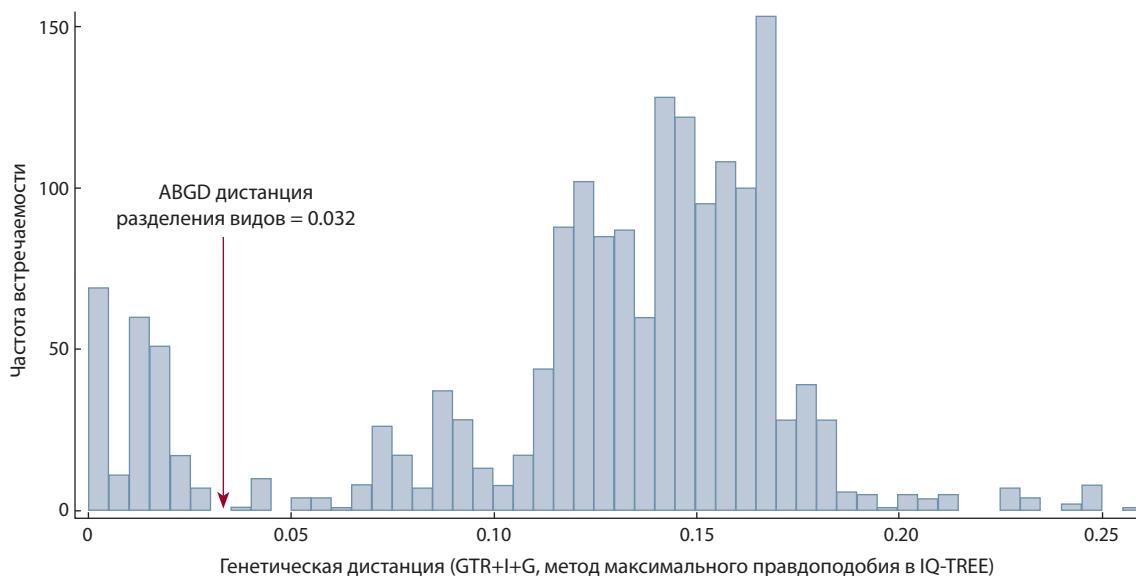


Рис. 2. Распределение генетических дистанций между представителями рода *Micractinium*. Показана граница разделения видов, определенная методом ABGD.

CCAP 211/92, не имеет интрона. Генетические дистанции между ним и штаммами TvB, SH, CCAP 211/92, ehime, IC-80 варьировали в диапазоне 0.1–0.5 %, с линиями *P. pringsheimii* и *M. tetrahymenae* – 1.1–1.2 %. *M. conductrix* и штамм KNUA032 с *Chlorella*-подобным морфотипом (статистические поддержки максимальны) – сестринские к штаммам ACSSI 198, 287. Уровень генетических различий находился в диапазоне от 0.7 до 1.3 %.

Вторичная структура ITS1 и ITS2. Длина ITS1 изучаемых штаммов составляла 238–267 н., ITS2 – 242–243 н. Вторичные структуры ITS1 и ITS2 в целом соответствовали моделям, предложенным А. Coleman (2000, 2015) для эукариотических организмов. Штаммы ACSSI 343, ACSSI 344 и ACSSI 345 имели 1 CBC в шпильке III ITS1 по сравнению с *M. inermum*, 1 CBC в консервативном регионе шпильки II и 1 CBC в варибельной шпильке IV ITS2 по сравнению с *M. simplicissimum*. Штаммы ACSSI 332, 198, 287 не имели CBC по сравнению с сестринскими видами. Однако штаммы ACSSI 198, 287 отличались от *M. conductrix* структурой шпильки II ITS2. Мисматч в ее верхней части у штаммов ACSSI 198, 287 состоял из четырех неспаренных нуклеотидов, а у *M. conductrix* – из десяти.

Разграничение видов. Дистанционный метод разграничения видов ABGD выделил в составе рода *Micractinium* 18 MOTU (операционных таксономических единиц) видового уровня, не считая внешнюю группу. ABGD дистанция разделения видов при попарном сравнении последовательностей равнялась 0.032 (рис. 2). Результаты ABGD анализа в диапазоне дистанций разделения видов по вариантам алгоритма начального разделения (initial partition) и рекурсивного разделения (recursive partition) совпали друг с другом.

С помощью метода GMYC было выделено наибольшее количество кластеров видового уровня – 33 (дистанция разделения видов 0.0015). Статистическая поддержка результатов разграничения $P = 1.07493e-07 < 0.05$, следо-

вательно, в массиве достаточно данных для получения достоверных результатов. С помощью метода PTP выделено 30 видов, что близко к результатам метода GMYC. Результаты разграничения видов методами ABGD, GMYC и PTP приведены на филогенетическом дереве (см. рис. 1). Все кластеры видового уровня, выделенные указанными методами, имеют высокие статистические поддержки ($PP = 0.95-1.00$, $BP = 90-100$ %).

Многомерное шкалирование. Для уточнения таксономического статуса мы соотнесли MOTU, выделенные алгоритмом GMYC, с их морфологическими, физиологическими, экологическими и молекулярно-генетическими характеристиками (Прил. 2). Отметим, что при проведении многомерного шкалирования из генетических характеристик учитывали только наличие интрона, тогда как остальные параметры обсуждаем отдельно. По результатам анализа исследованные MOTU были разделены на две группы (рис. 3).

Группа 1 объединяла штаммы с одиночными клетками, не продуцирующие щетинки. Внутри нее только представители MOTU5_1 и MOTU5_2 объединялись в одну подгруппу. Остальные виды/MOTU имели уникальное положение. Отдельно отметим, что исследуемые штаммы ACSSI 343, ACSSI 344, ACSSI 345 (MOTU1) и штаммы ACSSI 198, ACSSI 287 (MOTU8) не формировали одного комплекса видами, родственными согласно результатам филогенетического анализа. Штамм ACSSI 332 и IC-80 (MOTU5_4) локализованы рядом со штаммом ehime (MOTU5_3), тогда как представители MOTU5_1, MOTU5_2 несколько удалены.

Все штаммы группы 2, напротив, имеют щетинки и, как правило, образуют колонии. Штаммы, изначально идентифицированные как *M. pusillum*, образовали единую группу. Остальные виды были весьма удалены друг от друга. Промежуточное положение между группами занимает *M. variabile*, у которого лишь часть популяции способна в присутствии альгофагов продуцировать

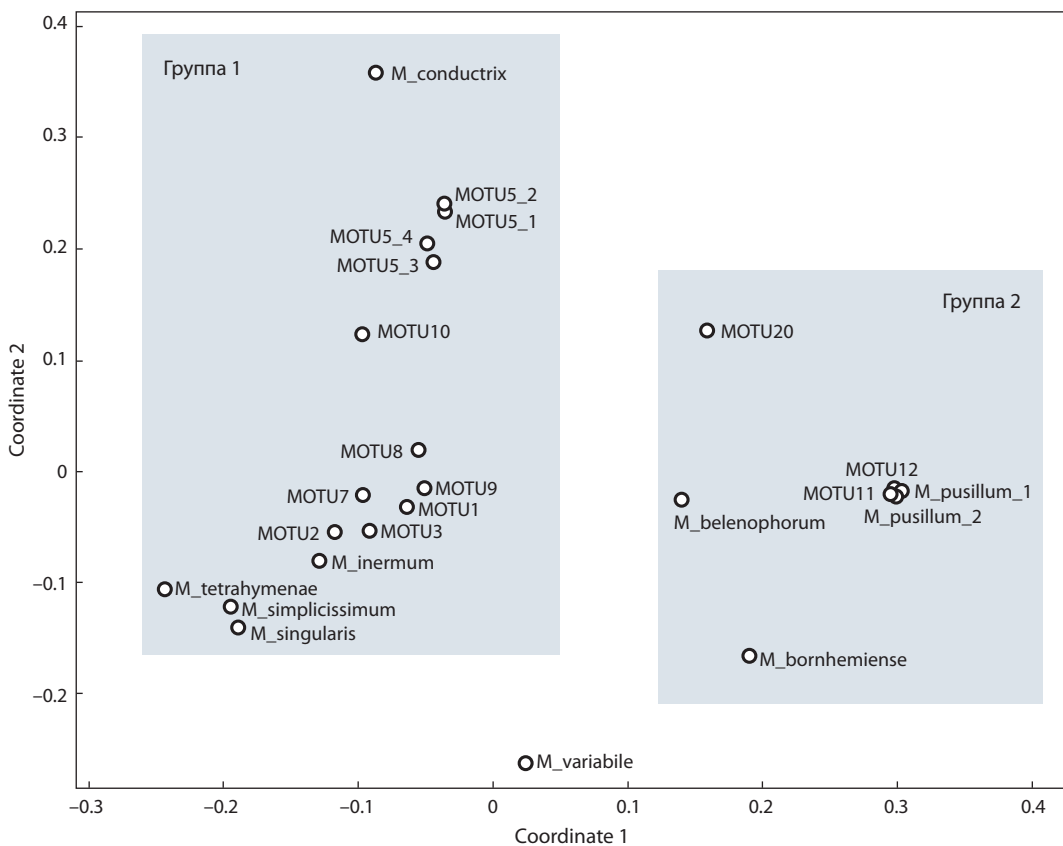


Рис. 3. Диаграмма рассеяния точек (MOTU) в пространстве двух координат многомерного шкалирования, построенная на основе сходства и различия штаммов по совокупности признаков.

Таблица 2. Результаты теста Мантелла

Признак	Кодировка признака	Значение коэффициента корреляции Пирсона	<i>p</i> -значение перестановочного теста для оценки достоверности значения коэффициента корреляции
Способность продуцировать щетинки	B	0.56	0.0001
Форма (одиночные клетки или колонии)	A	0.50	0.0001
Тип хлоропласта	E	0.45	0.0001
Количество интронов	J	0.38	0.0001
Тип размножения	F	0.37	0.0002
Максимальный размер клеток	D	0.36	0.0002
Форма клеток	C	0.35	0.0004
Образ жизни	H	0.32	0.0003
Потребность в витаминах группы B	G	0.19	0.087
Отношение к температуре	I	0.12	0.13

Примечание. Признаки с достоверной значимостью выделены жирным шрифтом.

щетинки и формировать колонии. Согласно результатам теста Мантелла, помимо способности продуцировать щетинки и формировать колонии, значимыми признаками при разграничении MOTU считались тип хлоропласта, количество интронов, тип размножения, максимальный размер клеток и их форма, образ жизни (табл. 2).

Обсуждение

Метод ABGD, основанный на анализе матриц генетических дистанций, по сравнению с другими методами выделил наименьшее количество MOTU видового уровня при наибольшей дистанции их разделения. Это согласуется с исследованиями S. Zou с коллегами (Zou et al., 2016a, b),

которые также отмечали более низкую чувствительность данного метода. Алгоритмы GMYC и PTP, использующие в качестве исходных данных филогенетические деревья, способны фиксировать особенности генетической дивергенции между штаммами, выделяют большее количество предполагаемых видов и лучше согласуются с современной концепцией статуса MOTU результаты алгоритма GMYC, который выявил максимальное количество потенциальных видов, были соотнесены с их морфологическими, физиологическими, экологическими и молекулярно-генетическими характеристиками.

Морфологические характеристики. Все представители рода *Micractinium*, для которых известны морфологические характеристики, имели ряд общих черт: коккоидная организация таллома, один пристенный хлоропласт, один пиреноид, окруженный сегментированной крахмальной оберткой, бесполое размножение автоспорами. Важными морфологическими критериями являются способность продуцировать щетинки и формировать колонии (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006). В соответствии с этими признаками в рамках рода можно выделить два морфотипа: *Chlorella*-подобный (в стандартных условиях клетки одиночные, не продуцируют щетинки) и *Micractinium*-подобный (одиночные клетки или колонии, продуцирующие щетинки), что подтверждается результатами многомерного шкалирования (см. рис. 3). К значимым морфологическим характеристикам для представителей рода *Micractinium* относятся также тип хлоропласта, максимальный размер и форма клеток. Однако в целом морфология рода достаточно скудна. В ходе исследования не выявлено ни одного признака, который можно было бы рассматривать как универсальный инструмент для разграничения видов. Так, фенотипы *M. simplicissimum* и *M. singularis* крайне схожи, и морфологически их разделить достаточно проблематично. Отметим, что микроводоросли рода *Micractinium* обладают высокой фенотипической пластичностью и их морфотип может изменяться в зависимости от «пастбищной» нагрузки со стороны альгофагов (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006). Например, у части клеток вида *M. variabile*, который обычно демонстрирует *Chlorella*-подобный морфотип, при высоком трофическом давлении альгофагов наблюдается формирование колоний и продуцирование щетинок (Chae et al., 2019). В то же время *M. pusillum*, *M. bornhemiense*, *M. belenophorum* при длительном культивировании, особенно на твердом агаре, могут перестать продуцировать щетинки и формировать колонии (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006).

Размножение. Основной тип размножения видов рода *Micractinium* – бесполое, посредством автоспор. Исключение на данный момент составляют штаммы *M. pusillum*, для которого отмечен половой процесс по типу оогамии (Krienitz et al., 2004; Luo et al., 2006). Однако, по данным полногеномного анализа, у многих микроводорослей класса *Trebouxiophyceae* с бесполом размножением были обнаружены мейотические гены, наличие которых предполагает половой процесс (Fučíková et al., 2015). В отношении представителей *Micractinium* этот вопрос пока остается открытым и нуждается в изучении.

Потребность в витаминах и образ жизни. Большая часть видов относится к свободноживущим организмам и не испытывает необходимости в добавлении витаминов при культивировании в лабораторных условиях. При этом специфической чертой *M. conductrix* является потребность в витаминах B₁ и B₁₂ для нормального осуществления процессов жизнедеятельности. Данный вид – облигатный эндосимбионт, в естественной среде получающий витамины от организма-хозяина (Vorobyev et al., 2009; Hoshina et al., 2010; Pröschold et al., 2011). Примечательно, что другие облигатные эндосимбионты клады *Chlorella* (*C. variabilis*, *Carolibrandtia ciliaticola*) также растут только на средах, обогащенных витаминами (Pröschold et al., 2011; Hoshina et al., 2017; Hoshina, Nakada, 2018). Штамм CCAP 211/11F, изолированный из лишайника, и факультативный эндосимбионт *M. tetrahymenae* культивируются на средах, в составе которых есть B₁ и B₁₂. Однако информация о том, что без них жизнедеятельность штаммов невозможна, отсутствует. Согласно результатам многомерного шкалирования, образ жизни – одна из значимых характеристик при разграничении видов, тогда как потребность в витаминах группы B – узкоспецифическое свойство, характерное лишь для *M. conductrix*. Тем не менее оно является уникальной чертой данного вида и помогает отделить его от «сестринских» еще на стадии культивирования.

Температура. По отношению к температуре представители рода *Micractinium* в большинстве своем проявляют мезофильность (Hong et al., 2015). В то же время *M. simplicissimum*, *M. variabile*, *M. singularis* и штамм *Micractinium* sp. KNUA032 выдерживают воздействие низких температур. Они способны выживать и размножаться при температурах до +5 °С, демонстрируя свои криотолерантные свойства. Одной из основных стратегий адаптации этих видов микроводорослей является поддержание жизнедеятельности за счет накопления ненасыщенных жирных кислот (Hong et al., 2015; Chae et al., 2019). Штаммы TvV, SH, CCAP 211/92 – термофилы, способные выдерживать воздействие высоких температур (Adar et al., 2016). Штамм ACSSI 332 предположительно устойчив к высоким температурам, так как был изолирован из горячего источника. Вопрос о термофильности родственных им штаммов ehime и IC-76 остается неизученным. Многомерное шкалирование показало, что устойчивость к воздействию экстремально низких или высоких температур – это специфические свойства, характерные лишь для небольшого числа видов. Однако именно такие виды имеют большой биотехнологический потенциал, в связи с чем нуждаются в тщательном изучении (Onay et al., 2014; Adar et al., 2016; Chae et al., 2021).

Интрон. Как вспомогательный инструмент для разграничения видов он был эффективен при доказательстве видового статуса штамма KNUA032, кластера ACSSI 198, ACSSI 287 и представителей *M. conductrix*, все штаммы которого имеют в составе гена 18S рРНК интрон длиной 324 н. Состав этого интрона и его специфическое положение в 18S рРНК неоднократно рассматривались исследователями как характерная особенность данного вида (Vorobyev et al., 2009; Hoshina et al., 2010; Spanner et al., 2020). Также интрон был полезен при разграничении штаммов

M. belenophorum: штамм ССАР 271/1, в отличие от аутентичного штамма SAG 42.98, в гене 18S рРНК имеет интрон длиной 315 н. В то же время наличие интронов у части видов может указывать на начавшиеся процессы видообразования, происходящие пока на популяционном уровне (Gaonkar et al., 2018). Так, например, R. Hoshina с коллегами (Hoshina et al., 2021) в рамках клады *Chlorella* обнаружили в некоторых географически изолированных друг от друга популяциях *C. variabilis*, что длина интронов может варьировать. В роде *Micractinium* сходная ситуация наблюдается среди представителей MOTU5, имеющих сходную морфологию, генетические дистанции внутри-видового уровня и без СВС (см. Прил. 2). У штаммов TvB, SH (MOTU5_1), ССАР 211/92 (MOTU5_2), в отличие от родственных eHime (MOTU5_3), АСССИ 332 и IC-76 (MOTU5_4), в составе гена 18S рРНК присутствует интрон длиной 351 н. Иными словами, несмотря на то что интрон является статистически значимым признаком при разграничении MOTU, его нельзя использовать как ключевой критерий при разделении видов, а лишь как вспомогательный.

Сравнительный анализ вторичной структуры внутренних транскрибируемых спейсеров. Применение СВС-подхода *sensu* (Coleman, 2000, 2015), основанного на поиске СВС исключительно в консервативных регионах ITS2, было успешным для отделения штаммов SAG 48.93 и SAG 72.80 от «истинных» представителей *M. pusillum*, *M. conductrix* от штамма KNUA032, а также аутентичного штамма *M. belenophorum* SAG 42.98 от штамма ССАР 271/1. Низкая эффективность СВС-подхода *sensu* Coleman для разграничения видов зеленых микродорослей с невысокой генетической дивергенцией отмечена также в работах (Hoshina, Fujiwara, 2013; Song et al., 2018). Поэтому сейчас при разграничении видов рода *Micractinium* часто учитываются все СВС в ITS1 и ITS2 (Hoshina, Fujiwara, 2013; Chae et al., 2019; Pröschold et al., 2020). Однако, например, между видами *M. singularis* и *M. variabile* СВС отсутствуют как в ITS1, так и в ITS2. При этом виды различаются между собой структурой шпильки I ITS2 (Chae et al., 2019).

Использовать характерные структурные различия во вторичной структуре внутренних транскрибируемых спейсеров в качестве аналога СВС среди членов рода *Micractinium* впервые предложили R. Hoshina с коллегами (Hoshina et al., 2010), которые обнаружили специфическую особенность во вторичной структуре ITS2 у *M. conductrix*. У всех представителей клады *Chlorella* в целом и рода *Micractinium* в частности шпилька II ITS2 состоит из двух двуцепочечных областей, сочлененных «локтеобразной» выпуклостью (elbow-like bulge). По сравнению с другими видами *M. conductrix* имеет большой «локоть» из 10 неспаренных нуклеотидов (bachelor nucleotides), тогда как у других видов – от трех до шести неспаренных нуклеотидов. Мы считаем, что данную особенность можно рассматривать в качестве «молекулярной подписи» *M. conductrix*. Для сравнения: у сестринских штаммов KNUA032, АСССИ 198 и АСССИ 287 было всего четыре неспаренных нуклеотида в этой области. Таким образом, СВС-подход не является универсальным инструментом для разграничения видов рода *Micractinium*. Кроме того,

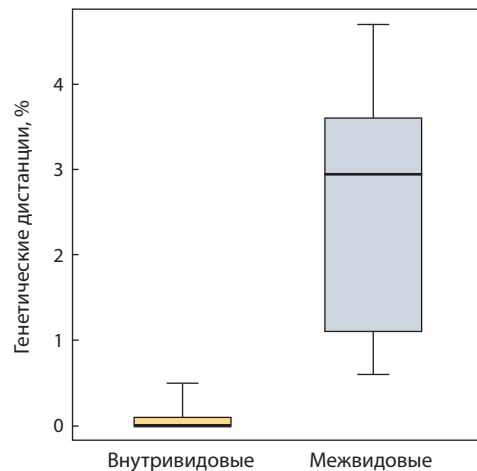


Рис. 4. Генетические дистанции внутри рода *Micractinium*.

Границы бокса показывают первый и третий квартили; жирная горизонтальная линия – медианное значение; «усы» – размах.

при анализе внутренних транскрибируемых спейсеров не следует ограничиваться только поиском СВС в консервативных областях, важно также учитывать особенности строения их вторичных структур.

Генетические дистанции. Сравнительный анализ уровня генетических различий фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2 исследуемых штаммов с такими диакритическими признаками, как форма и размеры клеток, способность продуцировать щетинки, тип хлоропласта, наличие интронов в гене 18S рРНК, наличие СВС в ITS1 и ITS2, молекулярные подписи, отношение к температуре, потребность в витаминах, образ жизни, кластеризация методами ABGD, GMYC, PTP, позволил уточнить внутри- и межвидовые уровни генетических различий (рис. 4). Внутри видов генетические дистанции варьировали в диапазоне 0–0.5 %, между видами – 0.6–4.7 %. Минимальные генетические дистанции были отмечены между одноклеточными и не продуцирующим щетинки криотолерантными антарктическими видами *M. singularis* и *M. variabile*, который под влиянием «пастбищной» нагрузки способен формировать колонии и выпускает щетинки. Максимальные генетические дистанции – между *Chlorella*-подобным криотолерантом *M. simplicissimum* и *M. bornhemiense*, обладающим в стандартных условиях классическим *Micractinium*-подобным морфотипом.

По итогам комплексного анализа вышеописанных параметров в рамках рода *Micractinium* было выявлено 29 видов (рис. 5), в том числе кандидаты в три новых вида из Альгологической коллекции АСССИ, валидацию которых еще предстоит выполнить.

Заключение

К настоящему времени в составе рода *Micractinium* описано с применением совокупности морфологических и молекулярно-генетических методов всего 9 видов, но по результатам проведенного анализа его истинное видовое богатство оказалось существенно выше – не менее 29 видов. Метод разграничения ABGD, использующий матрицу генетических дистанций, является менее «чув-

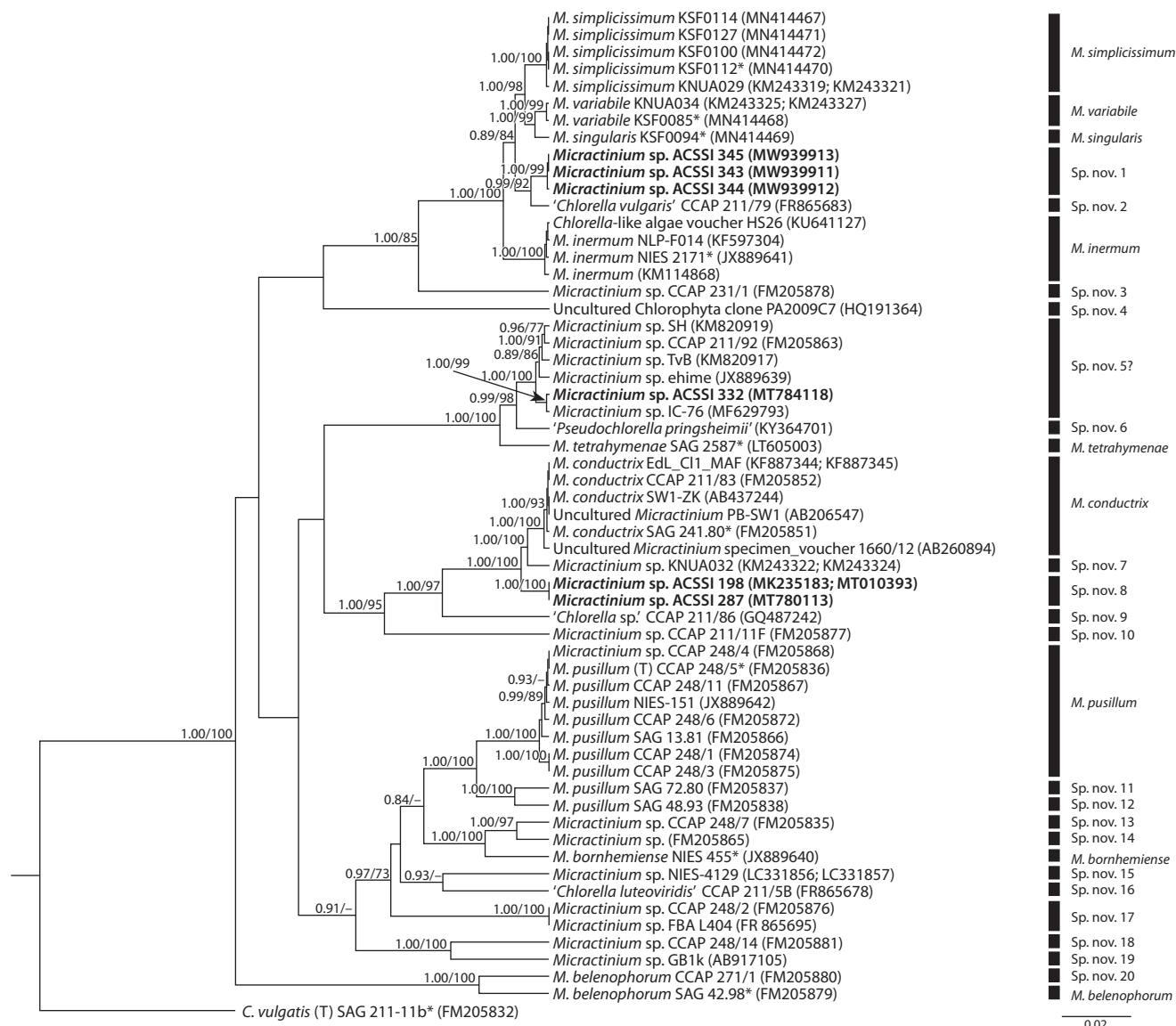


Рис. 5. Предполагаемое разделение видов внутри рода *Micractinium* на основании комплексного анализа признаков.

Жирным шрифтом выделены штаммы ACSSI, исследуемые в рамках данной работы; звездочкой отмечены аутентичные штаммы; (Т) – типовый вид, «?» – таксономический статус нуждается в уточнении.

ствительным» и позволил выделить всего 18 MOTU видо-вого уровня, тогда как более совершенные топологические алгоритмы GMYC и PTP – 33 и 30 соответственно. По нашему мнению, GMYC и PTP более реалистично отражают систематику рода *Micractinium* и могут быть использованы как эффективный вспомогательный инструмент для разграничения видов.

Многомерное шкалирование качественных признаков рассматриваемых штаммов показало, что наиболее значимыми для представителей рода *Micractinium* являются способность продуцировать щетинки и формировать колонии, тип хлоропласта, наличие интронов, тип размножения, максимальный размер клетке и их форма, образ жизни. Однако не обнаружено ни одного признака, который можно было бы рассматривать в качестве универсального видо-вого критерия. Потребность в витаминах группы В и устойчивость к воздействию экстремально низких или

высоких температур – это узкоспецифические свойства, характерные лишь для небольшого числа видов и помогающие при их отграничении от «сестринских» видов. Применение СВС-подхода, основанного на поиске СВС в консервативных регионах ITS2, было успешным только для отделения «истинных» представителей криптических видов (SAG 48.93, SAG 72.80) от *M. pusillum*, *M. conductrix* от штамма KNUA032 и *M. belenophorum* от штамма CCAP 271/1. При анализе ITS1 и ITS2 помимо поиска СВС следует учитывать особенности строения их вторичных структур. По итогам анализа генетических дистанций нуклеотидных последовательностей 18S–ITS1–5.8S–ITS2 можно предположить, что внутривидовые различия находятся в пределах 0–0.5 %, а межвидовые – в пределах 0.6–4.7 %.

Таким образом, используя морфологические, физиологические, экологические и генетические характеристики

(полифазный подход), удалось охарактеризовать 29 видов в рамках рода *Micractinium* и предложить дополнительные критерии их разделения. Среди штаммов Альгологической коллекции АСССИ были обнаружены кандидаты в три новых вида рода *Micractinium*, валидацию которых еще предстоит выполнить.

Список литературы

- Вайшля О.Б., Кулятов Д.В. Перспективные виды микроводорослей для биодegradации поллютантов водных экосистем юга Западной Сибири. *Изв. СамГЦ РАН*. 2011;1(4):787-789.
[Vayshlya O.B., Kulyatov D.V. Microscopic alga species promising as biodegraders of water ecosystem pollutants in southern West Siberia. *Izvestia Samarskogo Nauchnogo Tsentra RAN = Proceedings of the Samara Research Center of the Russian Academy of Sciences*. 2011;1(4):787-789. (in Russian)]
- Adar O., Kaplan-Levy R.N., Banet G. High temperature Chlorellaceae (Chlorophyta) strains from the Syrian-African Rift Valley: the effect of salinity and temperature on growth, morphology and sporulation mode. *Eur. J. Phycol.* 2016;51(4):387-400. DOI 10.1080/09670262.2016.1193772.
- Aldous D.J. Stochastic models and descriptive statistics for phylogenetic trees, from Yule to today. *Stat. Sci.* 2001;16:23-24. DOI 10.1214/ss/998929474.
- Bock C., Krienitz L., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*. 2011; 11(2):293-312. DOI 10.5507/fof.2011.028.
- Caisová L., Marin B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*. 2013;164:482-496. DOI 10.1016/j.protis.2013.04.005.
- Chae H., Lim S., Kim H., Choi H.-G., Kim J.H. Morphology and phylogenetic relationships of *Micractinium* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) taxa, including three new species from Antarctica. *Algae*. 2019;34(4):267-275. DOI 10.4490/algae.2019.34.10.15.
- Chae H., Seo J.B., Kim S., Youn E.J. Antarctic freshwater microalga, *Micractinium simplicissimum*, suppresses inflammation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2021;21(7):4098-4103(6). DOI 10.1166/jnn.2021.19158.
- Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*. 2000;151:1-9. DOI 10.1078/1434-4610-00002.
- Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genet.* 2015;31(3):157-163. DOI 10.1016/j.tig.2015.01.002.
- Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 2003;14(6):927-930.
- Fawley M.W., Fawley K.P., Owen H.A. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. *Phycologia*. 2005;44:35-48.
- Fučíková K., Pažoutová M., Rindi F. Meiotic genes and sexual reproduction in the green algal class Trebouxiophyceae (Chlorophyta). *J. Phycol.* 2015;51(3):419-430. DOI 10.1111/jpy.12293.
- Fujisawa T., Barraclough T.G. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed Yule coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Syst. Biol.* 2013; 62(5):707-724. DOI 10.1093/sysbio/syt033.
- Gaonkar C.C., Piredda R., Minucci C., Mann D.G., Montresor M., Sarno D., Kooistra W.H.C.F. Annotated 18S and 28S rDNA reference sequences of taxa in the planktonic diatom family Chaetocerotaceae. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208929. DOI 10.1371/journal.pone.0208929.
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. (Cited on April 16, 2021). Available from: <http://www.algaebase.org>
- Hong J.W., Jo S.-W., Cho H.-W., Nam S.W., Shin W., Park K.M., Lee K.I., Yoon H.-S. Phylogeny, morphology, and physiology of *Micractinium* strains isolated from shallow ephemeral freshwater in Antarctica. *Phycol. Res.* 2015;63:212-218. DOI 10.1111/pre.12097.
- Hoshina R., Fujiwara Y. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environment Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov. and *Didymogenes soliella* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 2013;61(2):124-132. DOI 10.1111/pre.12010.
- Hoshina R., Iwataki M., Imamura N. *Chlorella variabilis* and *Micractinium reisseri* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae): redescription of the endosymbiotic green algae of *Paramecium bursaria* (Peniculia, Oligohymenophorea) in the 120th year. *Phycol. Res.* 2010;58(3):188-210. DOI 10.1111/j.1440-1835.2010.00579.x.
- Hoshina R., Kobayashi M., Suzuki T., Kusuok Y. *Brandtia ciliaticola* gen. et sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) a common symbiotic green coccoid of various ciliate species. *Phycol. Res.* 2017; 66(1):76-81. DOI 10.1111/pre.12194.
- Hoshina R., Nakada T. *Carolibrandtia* nom. nov. as a replacement name for *Brandtia* Hoshina (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 2018;66(1):82-83. DOI 10.1111/pre.12208.
- Hoshina R., Tsukii Y., Harumoto T., Suzuki T. Characterization of a green *Stentor* with symbiotic algae growing in an extremely oligotrophic environment and storing large amounts of starch granules in its cytoplasm. *Sci. Rep.* 2021;11:2865. DOI 10.1038/s41598-021-82416-9.
- Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*. 2004;43:529-542. DOI 10.2216/i0031-8884-43-5-529.1.
- Krivina E., Temraleeva A. Identification problems and cryptic diversity of *Chlorella*-clade microalgae (Chlorophyta). *Microbiology*. 2020; 89(6):720-732. DOI 10.1134/S0026261720060107.
- Lambert A., Stadler T. Birth-death models and coalescent point processes: the shape and probability of reconstructed phylogenies. *Theor. Popul. Biol.* 2013;90:113-128. DOI 10.1016/j.tpb.2019.07.002.
- Lartillot N., Philippe H. Computing Bayes factors using thermodynamic integration. *Syst. Biol.* 2006;55:195-207.
- Lipstein B., Hurwitz S. The nutritional value of sewage-grown samples of *Chlorella* and *Micractinium* in broiler diets. *Poultry Sci.* 1983;62(7):1254-1260. DOI 10.3382/ps.0621254.
- Luo W., Krienitz L., Pflugmacher S., Walz N. Genus and species concept in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Chlorellaceae): genotype versus phenotypical variability under ecosystem conditions. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 2005;29:170-173. DOI 10.1080/03680770.2005.11901988.
- Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T., Walz N., Krienitz L. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist*. 2006;157:315-333. DOI 10.1016/j.protis.2006.05.006.
- Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Plant Biol.* 2010;12:545-553. DOI 10.1111/j.1438-8677.2009.00221.x.
- Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 1967;27(2):209-220.
- Mehrabadi A., Farid M.M., Craggs R. Potential of five different isolated colonial algal species for wastewater treatment and biomass energy production. *Algal Res.* 2017;21:1-8. DOI 10.1016/j.algal.2016.11.002.
- Onay M., Sonmez C.A., Oktem H., Yücel M. Thermo-resistant green microalgae for effective biodiesel production: isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia. *Bioresour. Technol.* 2014;169:62-71. DOI 10.1016/j.biortech.2014.06.078.
- Paradis E., Claude J., Strimmer K. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004;20(2):289-290. DOI 10.1093/bioinformatics/btg412.

- Pröschold T., Bock C., Luo W., Krienitz L. Polyphyletic distribution of bristle formation in Chlorellaceae: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 2010;58:1-8. DOI 10.1111/j.1440-1835.2009.00552.x.
- Pröschold T., Darienko T., Silva P.C., Reisser W., Krienitz L. The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. *Environ. Microbiol.* 2011;13:350-364. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02333.x.
- Pröschold T., Pitsch G., Darienko T. *Micractinium tetrahymenae* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a new endosymbiont isolated from ciliates. *Diversity.* 2020;12:200. DOI 10.3390/d12050200.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol. Ecol.* 2012;21:1864-1877. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x.
- Schnepf E., Deichgräber G., Glaab M., Hegewald E. Bristles and spikes in chlorococcales: ultrastructural studies in *Acanthosphaera*, *Micractinium*, *Pediastrum*, *Polyedriopsis*, *Scenedesmus*, and *Siderocystopsis*. *J. Ultrastr. Res.* 1980;72:367-379. DOI 10.1016/S0022-5320(80)90071-4.
- Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Wolf M. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. *BMC Res. Notes.* 2008;1:1-91.
- Song H., Qinghua W.Q., Liu X., Hu Y., Long J., Guoxiang L.G., Hu Z. Phylogenetic diversity and taxonomic problems of the *Dictyosphaerium* morphotype within the *Parachlorella* clade (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 2018;65:382-391. DOI 10.1111/jeu.12482.
- Spanner C., Darienko T., Biehler T., Sonntag B., Pröschold T. Endosymbiotic green algae in *Paramecium bursaria*: a new isolation method and a simple diagnostic PCR approach for the identification. *Diversity.* 2020;12(6):240. DOI 10.3390/d12060240.
- Temraleeva A., Moskalenko S., Mincheva E., Bukin Y., Sinetova M. *Spongiosarcinopsis terrestris* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Chlorophyceae): a new genus of green algae from gray forest soil, Russia. *Phytotaxa.* 2018;376(6):291-300. DOI 10.11646/phytotaxa.376.6.4.
- Vorobyev K., Andronov E., Rautian M., Skoblo I., Migunova A., Kvitko K. An atypical *Chlorella* symbiont from *Paramecium bursaria*. *Protistology.* 2009;6(1):39-44.
- Wolf M., Hegewald E., Hepperle D., Krienitz L. Phylogenetic position of the Golenkiniaceae (Chlorophyta) as inferred from 18S rDNA sequence data. *Biologia.* 2003;58:433-6.
- Zou S., Fei C., Song J., Bao Y., He M., Wang C. Combining and comparing coalescent, distance and character-based approaches for barcoding microalgae: a test with *Chlorella*-like species (Chlorophyta). *PLoS One.* 2016a;11(4):e0153833. DOI 10.1371/journal.pone.0153833.
- Zou S., Fei C., Wang C., Gao Z., Bao Y., He M., Wang C. How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Sci. Rep.* 2016b;6:36822. DOI 10.1038/srep36822.

ORCID ID

E.S. Krivina orcid.org/0000-0002-0849-5832
A.D. Temraleeva orcid.org/0000-0002-3445-0507
Yu.S. Bukin orcid.org/0000-0002-4534-3846

Благодарности. Культивирование, микроскопия штаммов АССSI и анализ литературы выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60002, молекулярно-филогенетические работы проведены при поддержке РФФИ в рамках проекта № 19-74-00030.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.04.2021. После доработки 28.07.2021. Принята к публикации 06.08.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

ДНК-метабаркодинг бентосных водорослей и ассоциированных с ними эукариот оз. Байкал в условиях быстрых экологических изменений

Ю.С. Букин^{1, 2}✉, Л.С. Кравцова¹, Т.Е. Перетолчина¹, А.П. Федотов¹, А.Е. Тупикин³, М.Р. Кабилов³, Д.Ю. Щербаков^{1, 4}, Е.В. Минчева¹

¹ Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия

² Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ bukinyura@mail.ru

Аннотация. Впервые приводится оценка разнообразия фитобентосных сообществ на основе ДНК-метабаркодинга с использованием ампликонов фрагмента гена 18S рРНК и технологии Illumina MiSeq. Исследование проведено в связи с цветением нитчатых водорослей (преимущественно рода *Spirogyra*) и цианобактерий в прибрежной зоне озера Байкал в условиях изменения климата и антропогенного воздействия. С помощью ДНК-метабаркодинга определен видовой состав водорослей, а также таксономическое разнообразие ассоциированных с ними эукариот в разных районах Байкала (у острова Большой Ушканий, в заливе Лиственничный) и в р. Кая (в черте г. Иркутска), находящейся в одном водосборном бассейне с оз. Байкал. С помощью NGS (next generation sequencing) получено более 15 тыс. прочтений 18S рРНК маркера. Выявлены виды водорослей, доминирующие по количеству прочтений, а также трудно идентифицируемые таксоны Stramenopiles, Alveolata, Euglenozoa, Chromista, Rhizaria, Amoebozoa и др., играющие важную роль в функционировании и формировании структуры водорослевых сообществ. Охарактеризовано разнообразие грибов и грибоподобных организмов в изучаемых сообществах. Индекс Шеннона рассмотренных сообществ колеблется от 1.56 до 2.72. Показаны преимущества и слабые стороны использования ДНК-метабаркодинга на основе фрагмента гена 18S рРНК для изучения структуры сообществ водорослей. Метод позволяет более полно учесть разнообразие таксонов эукариот, трудно идентифицируемых по морфологии, без привлечения большого числа специалистов, что характеризует его преимущество. Недостатком метода являются искажения, возникающие при проведении ПЦР. Предложены пути решения для устранения этого недостатка. Результаты исследования показывают, что для анализа минорной компоненты сообщества эукариот в образцах (организмы с малой биомассой), состоящих из смеси многоклеточных и одноклеточных организмов, требуется глубина прочтения не менее чем 100 000 последовательностей на пробу. В целом метод ДНК-метабаркодинга рекомендован для исследования структуры сообществ водорослей и ассоциированных с ними эукариот. Ключевые слова: водорослевые сообщества; метабаркодинг; 18S рРНК; Illumina MiSeq; озеро Байкал; зеленые водоросли; *Spirogyra*.

Для цитирования: Букин Ю.С., Кравцова Л.С., Перетолчина Т.Е., Федотов А.П., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Щербаков Д.Ю., Минчева Е.В. ДНК-метабаркодинг бентосных водорослей и ассоциированных с ними эукариот оз. Байкал в условиях быстрых экологических изменений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022; 26(1):86-95. DOI 10.18699/VJGB-22-12

DNA metabarcoding of benthic algae and associated eukaryotes from Lake Baikal in the face of rapid environmental changes

Yu.S. Bukin^{1, 2}✉, L.S. Kravtsova¹, T.E. Peretolchina¹, A.P. Fedotov¹, A.E. Tupikin³, M.R. Kabilov³, D.Yu. Sherbakov^{1, 4}, E.V. Mincheva¹

¹ Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ bukinyura@mail.ru

Abstract. Here we report new data describing the biodiversity of phytobenthic communities based on DNA-metabarcoding using the 18S rDNA marker and the Illumina MiSeq system. The study was initiated due to the blooming of filamentous algae (mainly of the genus *Spirogyra*) and cyanobacteria in the coastal zone of Lake Baikal under climate change and anthropogenic impact. The composition and taxonomic diversity of algae and other organisms associated with them on different sites of Lake Baikal (near Bolshoi Ushkaniy Island, in Listvennichny Bay) and in

the Kaya (within the city of Irkutsk, located in the same drainage basin as Lake Baikal) were determined using DNA-metabarcoding. About 15 thousand reads of the 18S rRNA marker were obtained by applying NGS (next-generation sequencing). The species of algae dominating in the number of reads, as well as the difficult-to-identify taxa (Stramenopiles, Alveolata, Euglenozoa, Chromista, Rhizaria, Amoebozoa, etc.), which play an important role in the functioning and formation of the structure of algal communities, were revealed. The Shannon index of the communities studied ranges from 1.56 to 2.72. The advantages and weaknesses of using DNA-metabarcoding based on the 18S rRNA gene fragment for studying the structure of algal communities are shown. The advantage of this method is the possibility to more fully determine the diversity of eukaryotes taxa, which are difficult to identify by morphology, without involving a large number of specialists, while the disadvantage of the method is the distortion that may occur during the PCR. Here, ways of solving this problem are proposed. The results of the study show that the analysis of the minor component of the eukaryotic community in samples (organisms with low biomass) consisting of a mixture of multicellular and unicellular organisms requires a read-depths of at least 100,000 sequences per sample. In general, the DNA-metabarcoding method is recommended for studying the structure of algal communities and eukaryotes associated with them.

Key words: algal communities; metabarcoding; 18S rDNA; Illumina MiSeq; Lake Baikal; green algae; *Spirogyra*.

For citation: Bukin Yu.S., Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Fedotov A.P., Tupikin A.E., Kabilov M.R., Sherbakov D.Yu., Mincheva E.V. DNA metabarcoding of benthic algae and associated eukaryotes from Lake Baikal in the face of rapid environmental changes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1): 86-95. DOI 10.18699/VJGB-22-12

Введение

В последние годы для ряда районов прибрежной зоны озера Байкал широко известен ряд катастрофических, быстро развивающихся экологических явлений, в том числе взрывообразное распространение нитчатых водорослей и цианобактерий (Timoshkin et al., 2016). Впервые сообщения о подобных изменениях появились в 2011 г. (Кравцова и др., 2012; Kravtsova et al., 2014). До этого момента подобные явления для прибрежной зоны озера не были описаны, за исключением инвазии *Elodea canadensis* в 1970-х гг. (Ижболдина, 1990).

Известно, что для водорослей Байкала характерны зональность в пространственном распределении и сезонная динамика, которая сохранялась в течение длительного времени (Мейер, 1930; Ижболдина, 1990, 2007; Ижболдина и др., 2017), однако с 2011 г. исследователи стали отмечать зарастание дна нитчатками водорослями (тиной) в заливе Лиственничный (Кравцова и др., 2012; Kravtsova et al., 2014). Зарастание дна нитчатками регистрируется также в других районах озера вблизи населенных пунктов пос. Култук, г. Байкальск, г. Северобайкальск (Timoshkin et al., 2018; Kravtsova et al., 2020). Среди нитчатых водорослей, разросшихся в литоральной зоне вблизи пос. Листвянка, доминируют представители рода *Spirogyra*. Впервые (почти за 100 лет наблюдений) бентосные нитчатые водоросли *Spirogyra* отмечены в составе планктонных сообществ прибрежной зоны (Бондаренко, Логачева, 2016). На байкальских пляжах в отдельных районах озера стали регистрировать большие скопления водорослей, выброшенные на берег (Сутурин и др., 2016; Timoshkin et al., 2016, 2018; Bukin et al., 2020). Формируя водорослевые маты вдоль береговой линии, нитчатые водоросли препятствуют проникновению света, концентрируют взвесь и таким образом негативно воздействуют на организмы-фильтраторы, в частности на байкальские губки (Khanaev et al., 2018). Надо сказать, что водоросли рода *Spirogyra* встречались в оз. Байкал и ранее. Исследователи эпизодически обнаруживали единичные нити спирогиры в составе донных фитоценозов в сорах и заливах озера. Среди них были зарегистрированы четыре вида рода *Spirogyra* и три формы: *S. calospora*, *S. decimina*

(*S. decimina* f. *jurgensis*, *S. decimina* f. *longata*), *S. weberi* (*S. weberi* f. *weberi*), *S. hassallii* (Ижболдина, 2007). Позднее был обнаружен вид *S. fluviatilis*, доминировавший в литоральной зоне Лиственничного залива в скоплениях нитчатых водорослей в 2012 г. (Тимошкин и др., 2014). Не исключено, что в Байкале могут обитать и эндемичные виды рода *Spirogyra*, приспособившиеся к специфическим условиям экосистемы озера. В настоящее время вопрос о том, какие еще виды встречаются в скоплениях нитчатых водорослей, остается открытым.

Изменение состава сообществ водорослей (и соотношения биомасс водорослей) влечет за собой и изменение в составе ассоциированных с ними эукариотических организмов (одноклеточных водорослей, простейших и грибоподобных организмов). Роль паразитических форм эукариот (грибоподобных организмов), негативно влияющих на развитие типичных для литоральной зоны водорослей, практически не изучена.

Водоросли литоральной зоны открытого Байкала – достаточно сложный объект для таксономической идентификации. Поэтому анализ видового разнообразия водорослей и их обилия в донных сообществах с помощью классических морфологических, а также гидробиологических методов является трудоемким и длительным процессом. Еще более сложная задача – изучение таксономического состава и количественного соотношения различных групп эукариотических организмов (в том числе микроэукариот), ассоциированных с водорослями. Идентификация таких таксонов может потребовать длительного культивирования на селективных средах и трудоемкого микроскопического анализа.

Упростить и ускорить подобные исследования может применение современных молекулярно-генетических методов метагеномного анализа, например таких, как ДНК-метабаркодинг, позволяющий определить принадлежность организма к определенному таксону. Метод заключается в амплификации каких-либо универсальных генетических маркеров в смеси ДНК организмов природной и/или лабораторной пробы с последующей расшифровкой ампликонов с помощью NGS (next generation sequencing) – секвенирования нового поколения. Метод

позволяет установить видовой состав и количественное соотношение таксонов в пробе.

Наибольшее распространение ДНК-метабаркодинг получил при изучении бактериальных сообществ с помощью универсального маркера 16S рибосомальной РНК (Petrosino et al., 2009). Подобные исследования проводились и для различных бактериальных сообществ оз. Байкал (Kurilkina et al., 2016). Но в литературе увеличивается количество работ, в которых этот метод с успехом применяется для эукариотических сообществ. При этом в качестве молекулярно-генетического маркера используется 18S рРНК (Taylor, Cunliffe, 2014; Hawkins et al., 2015; Smith et al., 2017) и фолмеровский фрагмент митохондриального гена CO1 (Leray et al., 2013). Эти же маркеры применялись для изучения сообществ из оз. Байкал, в частности, 18S рРНК – для ДНК-метабаркодинга сообществ микроэукариот (Yi et al., 2017), а CO1 – для сообществ беспозвоночных животных (Metazoa) (Кравцова и др., 2021). Сведения о ДНК-метабаркодинге бентосных водорослей Байкала крайне ограничены (Минчева и др., 2017), а данные об их сообществах и ассоциированных с водорослями эукариотах в настоящее время отсутствуют.

Для исследования водорослевых сообществ и ассоциированных с ними организмов больше всего подходит 18S рРНК. Для амплификации различных участков этого гена разработаны универсальные праймеры, охватывающие широкий спектр видов, принадлежащих разным далеким таксонам. Интерпретация результатов секвенирования облегчается наличием баз данных, содержащих шаблоны, которые позволяют провести выравнивание больших массивов последовательностей с учетом вторичной структуры.

Целью исследования была апробация метода ДНК-метабаркодинга с использованием 18S рРНК маркера для оценки разнообразия сообществ бентосных водорослей и ассоциированных с ними эукариотических организмов.

Материалы и методы

Отбор проб водорослей (мейо-, макрофитов размерами ≥ 2 мм) проведен в июле–августе 2015 г. на каменистой литорали у острова Бол. Ушканий в Северном Байкале (фоновый район, каменистая литораль), в заливе Лиственничный напротив пос. Листвянка в Южном Байкале (район зарастания дна нитчатыми водорослями, каменистая литораль). Для сравнения пробы были взяты в р. Кая, протекающей в черте г. Иркутска и находящейся в одном водосборном бассейне с оз. Байкал (табл. 1).

В Северном и Южном Байкале водоросли были собраны водолазами с трех глубин: 0–2, 2–5 и 6–10 м, а в р. Кая – с глубины 0.05–0.10 м. В каждом местообитании образцы водорослей с разных глубин были объединены в одну интегральную пробу. Идентификацию водорослей проводили по Л.А. Ижболдиной (2007).

Для молекулярно-генетического анализа собранные образцы водорослей фиксировали 80 % этиловым спиртом, затем через сутки перификсировали 70 % этанолом.

Тотальную ДНК выделяли по модифицированной методике Дойла и Диксона (Doyle, Dickson, 1987). В качестве молекулярно-генетического маркера использовали фрагмент гена 18S рРНК (Katana et al., 2001). Амплификацию прово-

дили с набором реактивов ПЦР с HS-Taq («Биолабмикс», г. Новосибирск, www.biolabmix.ru) в 25 мкл реакционной смеси в термодиклере Bio-Rad-T100 (Bio-Rad, США). Генетический маркер (длиной около 400 пар нуклеотидов), кодирующий V1–V2 вариабельный регион 18S рРНК, амплифицировали с использованием универсальных праймеров 18SF: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' и 416-37R: 5'-ATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCC-3' (Katana et al., 2001). Условия амплификации: предденатурация при 95 °C – 5 мин, далее 25 циклов: денатурация при 95 °C – 1 мин, отжиг праймеров при 55 °C – 1 мин, элонгация при 72 °C – 2 мин (5 мин на последнем цикле).

Продукты реакции анализировали электрофоретически в 1 % агарозном геле. Полосу ожидаемого размера вырезали и очищали с помощью набора для элюции ДНК из агарозного геля («Биосилика», Новосибирск).

Парноконцевую расшифровку продуктов амплификации проводили с помощью технологии Illumina MiSeq в ЦКП «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

Все этапы анализа данных Illumina MiSeq прочтений – выборочная расшифровка последовательностей ДНК – осуществлялись с использованием программы MOTHUR (Schloss et al., 2009) и базы данных последовательностей 18S рРНК SILVA (Quast et al., 2012) по схеме MiSeq standard operating procedure (MiSeq SOP) (Kozich et al., 2013). Анализ состоял из следующих процедур: 1) сшивка парноконцевых MiSeq прочтений продуктов амплификации в консенсусные последовательности; 2) тримминг консенсусных последовательностей по качеству прочтения (удаление последовательностей со средним качеством прочтения ниже 20 баллов); 3) удаление химерных последовательностей из набора данных; 4) удаление последовательностей, не соответствующих амплифицированному фрагменту 18S рРНК в базе данных SILVA; 5) выравнивание последовательностей по шаблону базы данных SILVA; 6) расчет матрицы генетических дистанций (в качестве метрики дистанций использовалась доля несовпадающих нуклеотидов при попарном сравнении последовательностей); 7) кластеризация последовательностей на основе генетических дистанций; 8) выделение ОТЕ (операционных таксономических единиц) на уровне кластерного расстояния (0.01), соответствующего межвидовым различиям (1 %); 9) составление таблицы с указанием количества последовательностей, приходящихся на ОТЕ в пробе; 10) выделение репрезентативных последовательностей для каждого ОТЕ; 11) таксономическая идентификация репрезентативных последовательностей с помощью онлайн-приложения BLAST.

Статистическую сходимость результатов оценки таксономического разнообразия характеризовали с помощью кривых насыщения и индекса Chao1 (Chao, 1987). Индекс Chao1 дает оценку ожидаемого α разнообразия в изучаемом сообществе исходя из наблюдаемого количества таксонов при текущем количестве прочтений в пробе. Другими словами, расчеты Chao1 позволяют исследователю понять, сколько еще таксонов (видов) может быть потенциально обнаружено в пробе при увеличении количества прочтений от имеющегося значения до бесконечности. Значительное превышение ожидаемого α разнообразия,

Таблица 1. Общая характеристика исследуемых проб

Район сбора	Геогр. координаты	Виды-доминанты, идентифицированные по морфологии	Количество прочтений	Видовое богатство	Chao1	Индекс Шеннона
Остров Бол. Ушканий, южный берег (проба UI) (каменистая литораль)	N 53.848626° E 108.616931°	<i>Draparnaldioides baicalensis</i>	6610	19	22	2.72
Залив Лиственничный (проба LB) (каменистая литораль)	N 51.867102° E 104.832101°	<i>Spirogyra</i> sp.	5054	15	16	2.45
Река Кая (проба KR)	N 52.265051° E 104.235322°	<i>Cladophora glomerata</i> , <i>Draparnaldia plumosa</i>	3400	7	10	1.56

рассчитанного с помощью индекса Chao1, над наблюдаемым свидетельствует о недостаточном количестве прочтений в пробе и потере таксонов.

Данные о таксономическом составе сообществ (представленности ОТЕ видового ранга) сравнивали с помощью кластерного анализа методом UPGMA, где в качестве меры расстояния использовали коэффициент сходства Брея–Кертиса. Перед проведением кластеризации данные о количестве последовательностей, приходящихся на каждое представленное ОТЕ в пробах, были нормированы на среднее количество прочтений на пробу. Структуру выявленных сообществ визуализировали на тепловой карте.

Разнообразие сообществ оценивали по индексу Шеннона, а также по кривым обилия, с учетом того, что чем медленней кривая обилия выходит в нулевое значение, тем более разнообразным является сообщество.

Статистические расчеты (индекс разнообразия, кластеризация, визуализация данных) проводились в пакете ‘vegan’ (Dixon, 2003) для языка программирования R.

Результаты

Массив данных после фильтрации исходных прочтений включал 6610 последовательностей из района у о. Бол. Ушканий, 5054 – из Лиственничного залива и 3400 – из р. Кая (см. табл. 1).

Операционные таксономические единицы, выделенные на уровне генетических дистанций 0.01, представлены разным числом прочтений: 88 ОТЕ содержали более чем одну последовательность (две – 4000 последовательностей) и 378 ОТЕ – по одной последовательности. На долю единично представленных ОТЕ (из одного прочтения) приходилось 2.57 % от всего набора прочтений, что ниже допустимого 5 % порога (Kozich et al., 2013) и свидетельствует об отсутствии погрешностей на стадии амплификации, секвенирования и фильтрации данных по качеству. Для дальнейшего анализа, согласно рекомендациям (Kozich et al., 2013), брали только ОТЕ, содержащие 4 прочтения и более (табл. 2).

Видовое обилие в образцах из разных местообитаний далеко от насыщения, судя по кривым сходимости (рис. 1, а). Эту же информацию дают значения индекса Chao1 (см. табл. 1), согласно которому количество видов в сообществах было также недооценено. Причем наиболее недооценен видовой состав минорной составляющей, представленной одноклеточными эукариотическими организмами.

Выделенные 27 ОТЕ характеризуют разные таксоны водорослей и ассоциированные с ними организмы (рис. 2 и 3, см. табл. 2). Большинство таксонов, идентифицированных с помощью BLAST, принадлежало водорослям

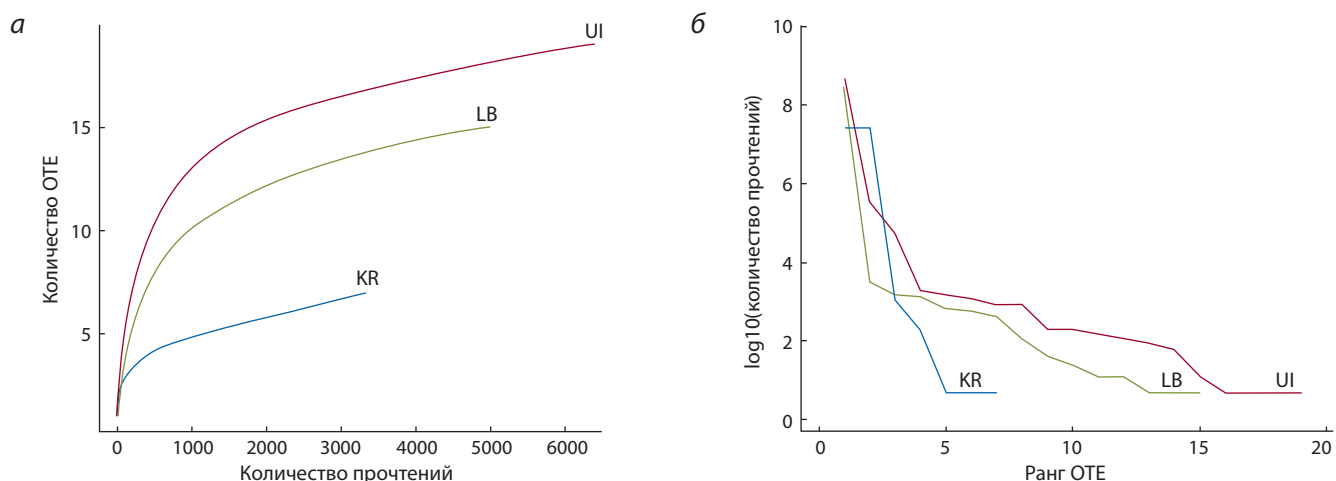


Рис. 1. Кривые насыщения количества таксонов видового ранга в пробах при различных размерах выборок прочтений (а) и кривые видовой обилия (б).

Здесь и на рис. 2 и 3: UI – оз. Байкал, каменистая литораль о. Бол. Ушканий; LB – оз. Байкал, каменистая литораль, залив Лиственничный; KR – Иркутск, р. Кая.

Таблица 2. Результаты идентификации таксономической принадлежности ОТЕ на основе гомологии с последовательностями из базы данных NCBI

Таксон видового ранга	Таксон высокого ранга	Степень сходства с референсными последовательностями из NCBI	Доля от общего количества прочтений, %		
			Байкал, о. Бол. Ушканий (каменистая литораль)	Байкал, залив Лиственничный (каменистая литораль)	Река Кая (в черте г. Иркутска)
<i>Draparnaldioides baicalensis</i>	Plantae	100	91.88	0.04	–
<i>Spirogyra</i> sp. 1		100	0.078	97.157	–
<i>Cladophora glomerata</i>		100	–	0.02	49.836
<i>Draparnaldia plumosa</i>		99	–	–	49.21
<i>Navicula radiosa</i>	Stramenopiles	100	3.928	–	–
Eukaryote sp.	Неклассифицированные эукариоты	99	1.761	–	–
<i>Vorticella</i> sp.	Alveolata	100	0.358	0.26	0.03
<i>Gomphonema</i> cf. <i>angustum</i>	Stramenopiles	99	–	0.641	0.03
<i>Didymosphenia geminata</i>		99	0.405	0.02	–
<i>Spumella</i> sp.		100	0.016	0.45	–
<i>Procryptobia sorokini</i>	Euglenozoa	100	–	0.44	–
<i>Nitzschia aequorea</i>	Stramenopiles	99	0.3	–	–
<i>Pythium myophilum</i>		100	0.15	0.03	0.596
<i>Adriamonas</i> sp.		93	0.25	–	–
<i>Pseudovorticella coscinodisci</i>	Alveolata	98	0.281	–	–
<i>Oikomonas</i> sp.	Stramenopiles	99	0.016	0.3	–
Неидентифицированные Stramenopiles		100	–	0.3	–
<i>Ulnaria ulna</i>	Chromista	100	0.140	0.02	–
<i>Aspidisca</i> sp.	Alveolata	93	0.140	–	–
<i>Cladophora</i> sp.	Plantae	93	–	–	0.268
<i>Ichthyobodo</i> sp.	Euglenozoa	90	0.125	–	–
<i>Bodomorpha</i> sp.	Rhizaria	99	–	0.14	–
<i>Chaetophora</i> sp.	Plantae	97	0.109	–	–
<i>Hartmannellidae</i> sp.	Amoebozoa	93	0.094	–	–
<i>Achnanthydium</i> sp.	Stramenopiles	98	0.031	0.06	–
<i>Amphileptus</i> sp.	Alveolata	99	0.016	0.08	–
<i>Cocconeis</i> sp.	Stramenopiles	99	0.016	0.04	0.03

Charophyta и Chlorophyta: *Spirogyra*, *Draparnaldioides*, *Cladophora* и *Draparnaldia* (см. табл. 2). Доминирующие таксоны, идентифицированные с помощью ДНК-метабаркодирования, полностью соответствовали таксонам, выявленным в результате морфологического анализа образцов (см. табл. 1). Кроме того, значительная часть последовательностей принадлежала таксонам высокого уровня: Stramenopiles, Alveolata, Euglenozoa, Chromista, Rhizaria и Amoebozoa (см. рис. 2). Все исследованные пробы отличались по спектру доминирующих видов водорослей

(см. рис. 3, табл. 2). Эндемик *Draparnaldioides baicalensis* доминировал в фоновом районе Северного Байкала у о. Бол. Ушканий, *Spirogyra* sp. – в сообществе Лиственничного залива. Сообщества у о. Бол. Ушканий и залива Лиственничного образуют один кластер на дендрограмме (см. рис. 3) и имеют в своем составе 10 общих таксонов. В сообществе р. Кая преобладали *Cladophora glomerata* и *Draparnaldia plumosa*; оно существенно отличалось от двух других сообществ по таксономическому составу (см. рис. 3) и содержало два общих таксона с сообществом ли-

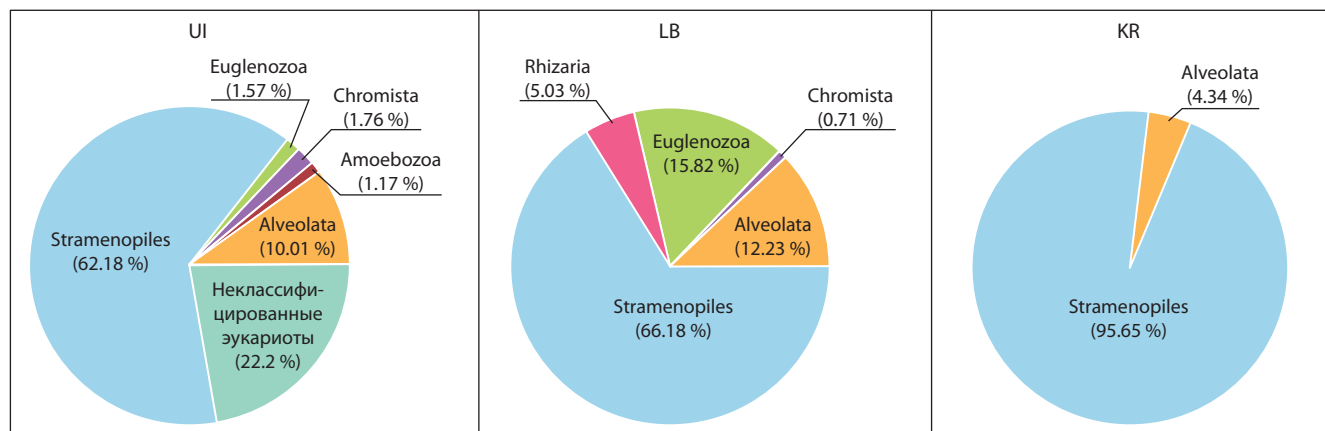


Рис. 2. Распределение таксонов высокого ранга, ассоциированных с водорослями (процентное соотношение от их количества прочтений).

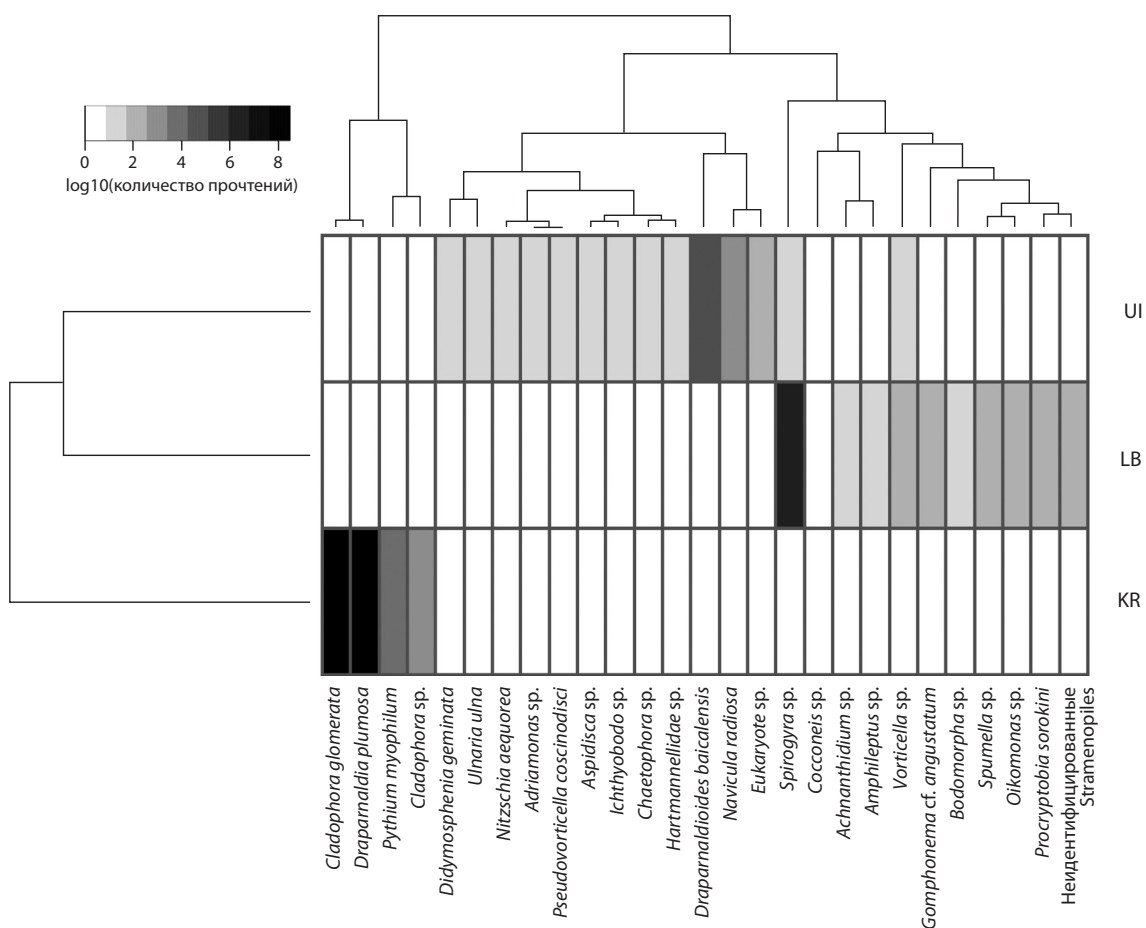


Рис. 3. Тепловая карта структуры сообществ бентосных водорослей с ассоциированными с ними эукариотами и их кластеризация по степени сходства на основе дистанций Брея–Кертиса.

Градиент серого цвета показывает нормализованное количество прочтений (в логарифмическом масштабе), приходящихся на таксон.

торали у о. Бол. Ушканий, а также четыре общих таксона с сообществом из залива Лиственничный.

В целом сообщества у о. Бол. Ушканий и залива Лиственничный, судя по показателям Шеннона, были более разнообразны, чем таковое в р. Кая (см. табл. 1). Кривые обилия также подтверждают этот результат (см. рис. 1, б).

Обсуждение

В прибрежной зоне о. Бол. Ушканий, расположенного в центральной природоохранной зоне Байкала, где практически отсутствует антропогенное воздействие, типичными представителями водорослевой флоры каменистой литорали озера являются эндемичные виды *Draparnaldio-*

des baicalensis, *D. arnoldii*, *D. arenaria* и *Cladophora floccosa* f. *floccosa* (Ижболдина, 1990). Согласно результатам проведенного исследования, структурных изменений в сообществе вблизи острова не наблюдалось (см. табл. 2, рис. 3), хотя в его составе в следовых количествах присутствовала *Spirogyra* sp. 1. Находки ее в этом районе обусловлены циркуляционными течениями, существующими в оз. Байкал (Kravtsova et al., 2020).

В заливе Лиственничный до 2000 г. на глубине более 1.5 м в летний период преобладали виды *Dermatochrysis reticulata*, *Didymosphenia geminata* и *Nitella flexilis*. Однако в настоящее время они утратили ведущую роль в фитоценозах из-за разрастания нитчатых водорослей *Spirogyra*, нетипичных для открытой литорали оз. Байкал (Kravtsova et al., 2014, 2020), что подтверждают наши результаты (см. табл. 2, рис. 3). Расшифрованный фрагмент нитчатых водорослей из Лиственничного залива был на 100 % идентичен ранее опубликованной последовательности *Spirogyra* sp. 1, найденной в литоральной зоне залива в 2013 г. (Романова и др., 2013). Можно предположить, что в период с 2011 по 2015 г. в Лиственничном заливе развивался один и тот же вид *Spirogyra* sp. 1. Распространение нитчаток создает стрессовые условия для типичных водорослевых сообществ оз. Байкал. Известно, что вследствие экспансии видов в экосистемах происходит уменьшение разнообразия по Шеннону (Ling, 2008; Powell et al., 2013). Подобные закономерности наблюдаются и в заливе Лиственничный, где типичные для этого периода водоросли подавлены; к тому же показатель Шеннона здесь ниже, чем в сообществе у о. Бол. Ушканий (см. табл. 1). Еще меньшее разнообразие по Шеннону наблюдалось в р. Кая (см. табл. 1). Но какие-либо выводы о нахождении этого сообщества в стрессовых условиях сделать сложно. В литературных данных мы не нашли информации о значении индекса разнообразия Шеннона, характерном для сообществ донных водорослей и ассоциированных с ними эукариотических организмов речных экосистем. Возможно, полученное значение индекса для р. Кая в принципе характерно для экосистем такого рода.

Состав эукариот, ассоциированных с водорослями, довольно разнообразен: Stramenopiles, Alveolata, Euglenozoa, Chromista, Rhizaria и Amoebozoa, особый интерес представляют оомицеты рода *Pythium* (см. рис. 3, табл. 2) в пробах литоральной зоны Байкала. Надо отметить, что в настоящее время микобиота Байкала практически не изучена, хотя ДНК грибов рода *Pythium* была обнаружена при исследовании микроразнообразия поверхностного слоя глубоководных донных осадков озера (Yi et al., 2017). Однако известно, что большинство пресноводных грибоподобных организмов рода *Pythium* являются паразитами зеленых водорослей (Raghukumar, 1987; Li et al., 2010; Carney, Lane, 2014). Увеличение концентрации *Pythium* в фитоценозах происходит в конце вегетационного периода, он способствует более быстрой деградации первичного органического вещества растительного происхождения. Возможно, водоросли в сообществе у о. Бол. Ушканий заканчивали вегетацию, поэтому в большей мере были поражены паразитическими грибами, о чем свидетельствует большее количество ДНК *P. myophilum* в пробах из этого района по сравнению с пробами из Лиственничного за-

лива. С одной стороны, в сообществе литоральной зоны Лиственничного залива *P. myophilum*, по-видимому, еще не успел распространиться, так как во время исследования *Spirogyra* sp. 1 была в хорошем фенологическом состоянии. С другой стороны, *Spirogyra* sp. 1 потенциально может быть устойчива к поражению *P. myophilum*, в отличие от других традиционных видов (например, *Ulothrix*), распространенных в литорали Байкала. В таком случае *Spirogyra* sp. 1 получает конкурентное преимущество над другими видами и становится сообществообразующим таксоном. Вероятно, распространение *P. myophilum* вносит определенный вклад в изменение структуры донных сообществ водорослей литорали оз. Байкал.

Несмотря на оригинальность полученных результатов, мы бы хотели обратить внимание на особенности использования метода ДНК-метабаркодинга при исследовании водорослевых сообществ и ассоциированных с ними эукариот. При анализе данных ДНК-метабаркодинга по 18S рРНК перед нами встала проблема определения порога генетического расстояния между видами внутри рода. Для 16S рибосомальной РНК (маркер бактериальных сообществ) таким расстоянием выбрано 3 % (0.03) несовпадающих нуклеотидов между сравниваемыми последовательностями (Petrosino et al., 2009; Kurilkina et al., 2016). Некоторые исследователи при анализе эукариотических сообществ на основе 18S рРНК тоже используют меру в 3 % (0.03) замен для разделения ОТЕ видового уровня (Yi et al., 2017). Если для микроразнообразия это в какой-то степени оправданно (в силу высокой скорости эволюции из-за быстрой смены поколений), то для многоклеточных организмов такая мера не может быть применена для разделения видов, поскольку для них 18S рРНК считается одним из медленно эволюционирующих маркеров (Anne, 2006). Проведенный нами анализ литературных данных показал, что для многоклеточных водорослей порог дистанций, соответствующий 3 % несовпадающих нуклеотидов, разделяет не только виды, но и различные роды, а также семейства (Chen et al., 2012; Романова и др., 2013; Sherwood et al., 2014; Taylor, Cunliffe, 2014). Если бы для выделения ОТЕ был использован порог в 3 %, то все выделенные виды образовали бы один кластер, соответствующий таксонам высокого ранга, и изучение видового разнообразия в этой группе организмов стало бы невозможным. Более детальный анализ опубликованной информации (Chen et al., 2012; Романова и др., 2013; Sherwood et al., 2014; Taylor, Cunliffe, 2014) позволил нам выбрать порог в 1 % (0.01) замен для разделения разных видов внутри одного рода и использовать его в нашем исследовании.

В ходе исследования установлено, что при наличии от 3400 до 6610 прочтений фрагмента 18S рРНК на каждую пробу явно недооценено видовое разнообразие эукариотических организмов, ассоциированных с бентосными водорослями. В смеси ДНК, состоящей из макро- и микроорганизмов, многоклеточные виды (водоросли) составили основную пул прочтений. В каждой пробе на многоклеточные водоросли приходится от 91 до 99 % всех прочтений 18S рРНК. В этом случае мы адекватно оцениваем видовое разнообразие макроорганизмов – водорослей – и теряем большую часть разнообразия ассоциированных

с ними эукариотических организмов. В методических работах по изучению сообществ бактерий на основе ДНК-метабаркодинга по 16S рРНК маркеру (Bukin et al., 2019) приводится цифра в 10000 конечных, фильтрованных по качеству, прочтений на пробу для адекватной оценки видового разнообразия микроорганизмов. Учитывая это, для оценки видового разнообразия минорной компоненты сообщества эукариотических организмов, ассоциированных с водорослями, необходимо увеличить количество прочтений на пробу в 50 раз и более. Тогда на минорную компоненту будет приходиться приблизительно 10000 расшифрованных последовательностей ДНК. В совокупности потребуется несколько сотен тысяч прочтений на пробу. При современном уровне развития NGS секвенирования это вполне посильная задача. Другой способ, позволяющий получить 10000 прочтений на минорную составляющую сообщества, – это предварительное механическое разделение пробы на две части – водорослевую компоненту и компоненту ассоциированных с водорослями организмов. В таком случае ДНК выделенных компонент должна расшифровываться по отдельности в разных запусках секвенирования.

Следует также обратить внимание на то, что при ДНК-метабаркодинге могут возникать искажения из-за разной специфичности используемых универсальных праймеров к разным таксонам, входящим в состав природных образцов. В результате при ПЦР будут возникать искажения, меняющие изначальное соотношение концентраций ДНК таксонов в пробе по сравнению с ее конечным продуктом. Снизить этот эффект можно путем проведения меньшего количества циклов ПЦР при подготовке образца для секвенирования, а также использованием в исследовании одних и тех же наборов реактивов и стандартизацией методики пробоотбора. Другое важное замечание относится к методологии статистического анализа, которая обязательно должна содержать стадию нормировки данных. Для этого можно перевести количество прочтений на таксон в пробе в долю прочтений, приходящихся на него в пробе, либо нормировать весь массив данных (как сделано в нашей работе) к среднему количеству прочтений на пробу. Такая нормировка, несмотря на искажения, связанные с ПЦР, позволит при использовании методов многомерной статистики (кластеризации и т. п.) определить тренд изменений в концентрации ДНК какого-либо таксона в разных сравниваемых природных образцах.

Заключение

Для исследования таксономической структуры водорослевых сообществ и ассоциированных с водорослями эукариотических организмов был применен метод ДНК-метабаркодинга на основе фрагмента гена 18S рРНК, позволивший получить статистически репрезентативные результаты. Метабаркодинг показал, что в литорали залива Лиственничный в сообществе водорослей стал доминировать один из видов рода *Spirogyra*, что согласуется с результатами морфологической идентификации. ДНК этого вида обнаружена также в пробах фоновой участка оз. Байкал у острова Бол. Ушканий. Метод оказался эффективным для точной таксономической идентификации морфологически сложной группы организмов и позволил

определить представленность в выборках трудно изучаемых таксонов, ассоциированных с водорослями, которые играют важную роль в формировании разнообразия и функционировании сообществ. Для репрезентативной оценки минорной составляющей сообщества – эукариотических организмов, ассоциированных с водорослями, необходимо значительное увеличение размеров выборки расшифрованных последовательностей ДНК.

Список литературы / References

- Бондаренко Н.А., Логачева Н.Ф. Структурные изменения в фитопланктоне прибрежной зоны озера Байкал. *Гидробиол. журн.* 2016;52(6):17-26.
- [Bondarenko N.A., Logacheva N.F. Structural changes in phytoplankton of the littoral zone of Lake Baikal. *Gidrobiologicheskii Zhurnal = Hydrobiological Journal.* 2017;53(2):16-24. DOI 10.1615/Hydrobiol.v53.i2.20.]
- Ижболдина Л.А. Мейо- и макрофитобентос озера Байкал (водоросли). Под ред. А.А. Батраева. Иркутск: Изд-во Иркут гос. ун-та, 1990.
- [Izhboldina L.A. Meio- and Macrophytobenthos of Lake Baikal (algae). Irkutsk: Irkutsk State Univ. Publ. House, 1990. (in Russian)]
- Ижболдина Л.А. Атлас и определитель водорослей бентоса и перифитона озера Байкал (мейо- и макрофиты) с краткими очерками по их экологии. Новосибирск: Наука-Центр, 2007.
- [Izhboldina L.A. Atlas and Keys to Algae of Benthos and Periphyton of Lake Baikal (meio and macrophytes) with Brief Essays on Their Ecology. Novosibirsk: Nauka-Tsentr Publ., 2007. (in Russian)]
- Ижболдина Л.А., Чепинога В.В., Минчева Е.В. Распределение мейо- и макрофитобентоса в литоральной зоне открытых прибрежных оз. Байкал по данным профилирования 1963–1988 гг. Часть 2. Восточный берег. *Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. «Биология. Экология».* 2017;19:36-57.
- [Izhboldina L.A., Chepinoga V.V., Mincheva E.V. Meio- and macrophytobenthos distribution in the littoral zone along the open coasts of Lake Baikal according to profiling data from 1963–1988. Part 2. Eastern coast. *Izvestiya Irkutskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Ser. Biologiya, Ekologiya = Irkutsk State University Bulletin. Ser. "Biology. Ecology"*. 2017;19:36-57. (in Russian)]
- Кравцова Л.С., Ижболдина Л.А., Ханаев И.В., Помазкина Г.В., Домышева В.М., Кравченко О.С., Грачев М.А. Нарушение вертикальной зональности зеленых водорослей в прибрежной части залива Лиственничный озера Байкал. *Докл. АН (Общ. биология).* 2012;447(2):227-229.
- [Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V., Pomazkina G.V., Domyshova V.M., Kravchenko O.S., Grachev M.A. Disturbances of the vertical zoning of green algae in the coastal part of the Listvennichnyi gulf of Lake Baikal. *Doklady Biological Sciences.* 2012;447(1):350-352. DOI 10.1134/S0012496612060026.]
- Кравцова Л.С., Перетолчина Т.Е., Трибой Т.И., Небесных И.А., Купчинский А.Б., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р. Исследование разнообразия гидробионтов Лиственничного залива озера Байкал с использованием ДНК-метабаркодинга. *Генетика.* 2021; 57(4):445-453. DOI 10.31857/S0016675821040056.
- [Kravtsova L.S., Peretolchina T.E., Triboy T.I., Nebesnykh I.A., Kupchinskiy A.B., Tupikin A.E., Kabilov M.R. The study of the diversity of hydrobionts from Listvennichny Bay of Lake Baikal by DNA metabarcoding. *Russ. J. Genet.* 2021;57(4):460-467. DOI 10.1134/S1022795421040056.]
- Мейер К.И. Введение во флору водорослей озера Байкал. *Бюл. МОИП. Отд. биол.* 1930;38:179-396.
- [Meyer K.I. Introduction to the algal flora of Lake Baikal. *Bulleten MOIP. Otdelenie Biol. = Bulletin of Moscow Society of Naturalists. Biological Series.* 1930;38:179-396. (in Russian)]

- Минчева Е.В., Букин Ю.С., Кравцова Л.С., Коваль В.В., Кабилов М.Р., Тупикин А.Е., Щербakov Д.Ю. Исследование водорослево-грибных сообществ в районе Лиственничного залива и острова Большой Ушканий озера Байкал. В: Бычков И.В., Казаков А.Л. (ред.) Актуальные проблемы науки Прибайкалья. Вып. 2. Иркутск, 2017;138-143.
[Mincheva E.V., Bukin Yu.S., Kravtsova L.S., Koval V.V., Kabilov M.R., Tupikin A.E., Shcherbakov D.Yu. Study of algal-fungal communities in Listvennichny Bay and Bol'shoi Ushkaniy island of Lake Baikal. In: Bychkov I.V., Kazakov A.L. (Eds.) Topical Problems in Baikal Region Studies. Iss. 2. Irkutsk, 2017;138-143. (in Russian)]
- Романова Е.В., Кравцова Л.С., Ижболдина Л.А., Ханаев И.В., Щербakov Д.Ю. Идентификация зеленых нитчатых водорослей из района локального биогеогенного загрязнения озера Байкал (залив Лиственничный) с помощью молекулярного маркера 18S рДНК. *Экол. генетика*. 2013;11(4):23-33. DOI 10.17816/ecogen11423-33.
[Romanova E.V., Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V., Shcherbakov D.Yu. Identification of filamentous green algae from an area of local biogenic pollution of Lake Baikal (Listvennichnyy bay) using SSU 18S rDNA molecular marker. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2013;11(4):23-33. DOI 10.17816/ecogen11423-33. (in Russian)]
- Сутурин А.Н., Чебыкин Е.П., Мальник В.В., Ханаев И.В., Минаев А.В., Минаев В.В. Роль антропогенных факторов в развитии экологического стресса в литорали оз. Байкал (акватория пос. Листвянка). *География и природ. ресурсы*. 2016;6:43-54. DOI 10.21782/GIPR0206-1619-2016-6(43-54).
[Suturin A.N., Chebykin E.P., Malnik V.V., Khanaev I.V., Minaev A.V., Minaev V.V. The role of anthropogenic factors in the development of ecological stress in Lake Baikal littoral (the Listvyanka settlement lakescape). *Geografiya i Prirodnye Resursy = Geography and Natural Resources*. 2016;6:43-54. DOI 10.21782/GIPR0206-1619-2016-6(43-54). (in Russian)]
- Тимошкин О.А., Бондаренко Н.А., Волкова Е.А., Томберг И.В., Вишняков В.С., Мальник В.В. Массовое развитие зеленых нитчатых водорослей родов *Spirogyra* Link и *Stigeoclonium* Kutz. (Chlorophyta) в прибрежной зоне Южного Байкала. *Гидробиол. журн.* 2014;50(5):15-26.
[Timoshkin O.A., Bondarenko N.A., Volkova E.A., Tomberg I.V., Vishnyakov V.S., Malnik V.V. Mass development of green filamentous algae of the genera *Spirogyra* and *Stigeoclonium* (Chlorophyta) in the littoral zone of the southern part of Lake Baikal. *Gidrobiologicheskij Zhurnal = Hydrobiological Journal*. 2015;51(1):13-23. DOI 10.1615/HydrobJ.v51.i1.20. (in Russian)]
- Anne C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*. 2006;127(1-3):101-120. DOI 10.1007/s10709-006-9118-1.
- Bukin Y.S., Galachyants Y.P., Morozov I.V., Bukin S.V., Zakharenko A.S., Zemskaya T.I. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci. Data*. 2019;6(1):1-14. DOI 10.1038/sdata.2019.7.
- Bukin Yu.S., Bondarenko N.A., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Bukin S.V., Pogodaeva T.V., Chernitsyna S.M., Shubenkova O.V., Ivanov V.G., Zakharenko A.S., Zemskaya T.I. Interconnection of bacterial and phytoplanktonic communities with hydrochemical parameters from ice and under-ice water in coastal zone of Lake Baikal. *Sci. Rep.* 2020;10(11087):1-12. DOI 10.1038/s41598-020-66519-3.
- Carney L.T., Lane T.W. Parasites in algae mass culture. *Front. Microbiol.* 2014;5:278. DOI 10.3389/fmicb.2014.00278.
- Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*. 1987;43:783-791. DOI 10.2307/2531532.
- Chen C., Barfuss M.H., Pröschold T., Schagerl M. Hidden genetic diversity in the green alga *Spirogyra* (Zygnematophyceae, Streptophyta). *BMC Evol. Biol.* 2012;12:77. DOI 10.1186/1471-2148-12-77.
- Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J. Veg. Sci.* 2003;14(6):927-930. DOI 10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x.
- Doyle J.J., Dickson E.E. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*. 1987;36(4):715-722. DOI 10.2307/1221122.
- Hawkins J., de Vere N., Griffith A., Ford C., Allainguillaume J., Hegarty M., Baillie L., Adams-Groom B. Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: a new tool for investigating honey bee foraging preferences. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134735. DOI 10.1371/journal.pone.0134735.
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakryś B., Szalacha E., Szymańska H. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *J. Phycology*. 2001;37(3):443-451. DOI 10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x.
- Khanaev I.V., Kravtsova L.S., Maikova O.O., Bukshuk N.A., Sakirko M.V., Kulakova N.V., Butina T.V., Nebesnukh I.A., Belikov S.I. Current state of the sponge fauna (Porifera: Lubomirskiidae) of Lake Baikal: sponge disease and the problem of conservation of diversity. *J. Great Lakes Res.* 2018;44(1):77-85. DOI 10.1016/j.jglr.2017.10.004.
- Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(17):5112-5120. DOI 10.1128/AEM.01043-13.
- Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V., Pomazkina G.V., Rodionova E.V., Domyshva V.M., Sakirko M.V., Tomberg I.V., Kostornova T.Ya., Kravchenko O.S., Kupchinsky A.B. Nearshore benthic blooms of filamentous green algae in Lake Baikal. *J. Great Lakes Res.* 2014;40(2):441-448. DOI 10.1016/j.jglr.2014.02.019.
- Kravtsova L.S., Mizandrontsev I.B., Vorobyova S.S., Izhboldina L.A., Mincheva E.V., Potyomkina T.G., Golobokova L.P., Sakirko M.V., Triboy T.I., Khanaev I.V., Sherbakov D.Yu., Fedotov A.P. Influence of water motion on the spatial distribution of *Spirogyra* in Lake Baikal. *J. Great Lakes Res.* 2020;46(1):29-40. DOI 10.1016/j.jglr.2019.09.004.
- Kurilkina M.I., Zakharova Yu.R., Galachyants Yu.P., Petrova D.P., Bukin Yu.S., Domyshva V.M., Blinov V.V., Likhoshvay Ye.V. Bacterial community composition in the water column of the deepest freshwater Lake Baikal as determined by next-generation sequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2016;92(7):1-19. DOI 10.1093/femsec/fiw094.
- Leray M., Yang J.Y., Meyre C.P., Mills S.C., Agudelo N., Ranwez V., Machida R.J. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front. Zool.* 2013;10(1):1-14. DOI 10.1186/1742-9994-10-34.
- Li W., Zhang T., Tang X., Wang B. Oomycetes and fungi: important parasites on marine algae. *Acta Oceanologica Sinica*. 2010;29(5):74-81. DOI 10.1007/s13131-010-0065-4.
- Ling S.D. Range expansion of a habitat-modifying species leads to loss of taxonomic diversity: a new and impoverished reef state. *Oecologia*. 2008;156(4):883-894. DOI 10.1007/s00442-008-1043-9.
- Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem.* 2009;55(5):856-866. DOI 10.1373/clinchem.2008.107565.
- Powell K.I., Chase J.M., Knight T.M. Invasive plants have scale-dependent effects on diversity by altering species-area relationships. *Science*. 2013;339(6117):316-318. DOI 10.1126/science.1226817.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2012;41(D1):D590-D596. DOI 10.1093/nar/gks1219.
- Raghukumar C. Fungal parasites of the green alga *Chaetomorpha media*. *Infection*. 1987;50:100. DOI 10.3354/dao00314.7.

- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Sahl J.W. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(23):7537-7541. DOI 10.1128/AEM.01541-09.
- Sherwood A.R., Carlile A.L., Neumann J.M., Kocielek J.P., Johansen J.R., Lowe R.L., Presting G.G. The Hawaiian freshwater algae biodiversity survey (2009–2014): systematic and biogeographic trends with an emphasis on the macroalgae. *BMC Ecol.* 2014;14(1): 28. DOI 10.1186/s12898-014-0028-2.
- Smith K.F., Kohli G.S., Murray S.A., Rhodes L.L. Assessment of the metabarcoding approach for community analysis of benthic-epiphytic dinoflagellates using mock communities. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 2017;51(1):555-576. DOI 10.1186/s12898-014-0028-2.
- Taylor J.D., Cunliffe M. High-throughput sequencing reveals neustonic and planktonic microbial eukaryote diversity in coastal waters. *J. Phycol.* 2014;50(5):960-965. DOI 10.1111/jpy.12228.
- Timoshkin O.A., Moore M.V., Kulikova N.N., Tomberg I.V., Malnik V.V., Shimaraev M.N., Troitskaya E.S., Shirokaya A.A., Sinyukovich V.N., Zaitseva E.P., Domysheva V.M., Yamamuro M., Pobrezhnaya A.E., Timoshkina E.M. Groundwater contamination by sewage causes benthic algal outbreaks in the littoral zone of Lake Baikal (East Siberia). *J. Great Lakes Res.* 2018;44(2):230-244. DOI 10.1016/j.jglr.2018.01.008.
- Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M., Moore M.V., Belykh O.I., Malnik V.V., Sakirko M.V., Shirokaya A.A., Bondarenko N.A., Domysheva V.M., Fedorova G.A., Kochetkov A.I., Kuzmin A.V., Lukhnev A.G., Medvezhonkova O.V., Nepokrytykh A.V., Pasyukova E.M., Pobrezhnaya A.E., Potapskaya N.V., Rozhkova N.A., Sheveleva N.G., Tikhonova I.V., Timoshkina E.M., Tomberg I.V., Volkova E.A., Zaitseva E.P., Zvereva Yu.M., Kupchinsky A.B., Bukshuk N.A. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *J. Great Lakes Res.* 2016;42(3): 487-497. DOI 10.1016/j.jglr.2016.02.011.
- Yi Z., Berney C., Hartikainen H., Mahamdallie S., Gardner M., Boenigk J., Bass D. High-throughput sequencing of microbial eukaryotes in Lake Baikal reveals ecologically differentiated communities and novel evolutionary radiations. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2017; 93(8):fix073. DOI 10.1093/femsec/fix073.

ORCID ID

Yu.S. Bukin orcid.org/0000-0002-4534-3846
L.S. Kravtsova orcid.org/0000-0003-0862-4726
T.E. Peretolchina orcid.org/0000-0002-2950-9762
A.P. Fedotov orcid.org/0000-0003-3020-9895

A.E. Tupikin orcid.org/0000-0002-8194-0322
M.R. Kabilov orcid.org/0000-0003-2777-0833
D.Yu. Sherbakov orcid.org/0000-0002-1410-392X
E.V. Mincheva orcid.org/0000-0003-4447-6345


Благодарности. Работа выполнена при поддержке темы бюджетного финансирования ЛИИ СО РАН № 121032300196-8, гранта РФФИ – Иркутская область № 17-44-388071_р, частичной поддержке гранта РФФИ 19-05-00398_а. Авторы выражают благодарность Иркутскому суперкомпьютерному центру СО РАН за предоставление доступа к высокопроизводительному кластеру «Академик В.М. Матросов». Мы благодарим администратора Иркутского суперкомпьютерного центра СО РАН Ивана Сидорова за помощь в проведении вычислений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.07.2021. После доработки 05.10.2021. Принята к публикации 21.10.2021.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Биоинформатический поиск соответствия дифференциально экспрессируемых генов домашних и диких животных с ортологичными генами, изменяющими репродуктивный потенциал человека

М.П. Пономаренко , И.В. Чадаева, П.М. Пономаренко, А.Г. Богомолов, Д.Ю. Ощепков, Е.Б. Шарыпова, В.В. Суслов, А.В. Осадчук, Л.В. Осадчук, Ю.Г. Матушкин


Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 pon@bionet.nsc.ru

Аннотация. Одним из крупнейших достижений генетики XX в. стало открытие Д.К. Беляевым дестабилизирующего отбора при одомашнивании животных, который затрагивает регуляцию экспрессии генов, но не их структуру, и влияет на системы нейроэндокринного контроля онтогенеза при стрессовом воздействии окружающей среды. Среди экспериментов, результаты которых были обобщены этим открытием, были также наблюдения ускоренного угасания гормональной функции семенников и нарушения сезонности размножения одомашненных лисиц по сравнению с дикими сородичами. На сегодняшний день открытие Д.К. Беляева уже многократно подтверждено независимыми наблюдениями при одомашнивании, например, оленя, использовании крыс как лабораторных животных, восстановлении таких исчезающих видов, как лошадь Пржевальского, а также при создании резервной популяции дикуши, оказавшейся на грани исчезновения в естественных местах обитания. В результате сравнения геномов человека, ряда домашних животных и некоторых их диких сородичей был введен термин «синдром самодоместикации», в симптомы которого включены расстройства аутистического спектра. Ранее мы создали биоинформатическую модель синдрома самодоместикации человека с использованием дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) домашних животных по сравнению с дикими сородичами, ортологичных генам преимущественно нервной системы человека, чьи изменения экспрессии могут влиять на репродуктивный потенциал, т.е. рост численности людей при отсутствии ограничений со стороны лимитирующих факторов. В настоящей работе мы применили эту модель к 68 генам человека, изменения экспрессии которых влияют на репродуктивное здоровье женщин и мужчин, и к 3080 ДЭГ животных. Обнаружено 16 и 4 ДЭГ домашних животных, изменения экспрессии которых являются сопоставимыми изменениям экспрессии генов-ортологов человека, соответственно понижающим и повышающим его репродуктивный потенциал, тогда как у диких животных было 9 и 11 таких ДЭГ. Это различие было достоверно по критерию χ^2 Пирсона ($p < 0.05$) и точному критерию Фишера ($p < 0.05$). Полученный результат обсуждается в связи с восстановлением видов животных, исчезающих под антропогенной нагрузкой. Ключевые слова: человек; репродуктивный потенциал; модель болезни человека с использованием животных; доместикация; RNA-Seq; ближайший общий предок.

Для цитирования: Пономаренко М.П., Чадаева И.В., Пономаренко П.М., Богомолов А.Г., Ощепков Д.Ю., Шарыпова Е.Б., Суслов В.В., Осадчук А.В., Осадчук Л.В., Матушкин Ю.Г. Биоинформатический поиск соответствия дифференциально экспрессируемых генов домашних и диких животных с ортологичными генами, изменяющими репродуктивный потенциал человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):96-108. DOI 10.18699/VJGB-22-13

A bioinformatic search for correspondence between differentially expressed genes of domestic versus wild animals and orthologous human genes altering reproductive potential

M.P. Ponomarenko , I.V. Chadaeva, P.M. Ponomarenko, A.G. Bogomolov, D.Yu. Oshchepkov, E.B. Sharypova, V.V. Suslov, A.V. Osadchuk, L.V. Osadchuk, Yu.G. Matushkin

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 pon@bionet.nsc.ru

Abstract. One of the greatest achievements of genetics in the 20th century is D.K. Belyaev's discovery of destabilizing selection during the domestication of animals and that this selection affects only gene expression regulation (not gene structure) and influences systems of neuroendocrine control of ontogenesis in a stressful environment. Among the experimental data generalized by Belyaev's discovery, there are also findings about accelerated extinc-

tion of testes' hormonal function and disrupted seasonality of reproduction of domesticated foxes in comparison with their wild congeners. To date, Belyaev's discovery has already been repeatedly confirmed, for example, by independent observations during deer domestication, during the use of rats as laboratory animals, after the reintroduction of endangered species such as Przewalski's horse, and during the creation of a Siberian reserve population of the Siberian grouse when it had reached an endangered status in natural habitats. A genome-wide comparison among humans, several domestic animals, and some of their wild congeners has given rise to the concept of self-domestication syndrome, which includes autism spectrum disorders. In our previous study, we created a bioinformatic model of human self-domestication syndrome using differentially expressed genes (DEGs; of domestic animals versus their wild congeners) orthologous to the human genes (mainly, nervous-system genes) whose changes in expression affect reproductive potential, i. e., growth of the number of humans in the absence of restrictions caused by limiting factors. Here, we applied this model to 68 human genes whose changes in expression alter the reproductive health of women and men and to 3080 DEGs of domestic versus wild animals. As a result, in domestic animals, we identified 16 and 4 DEGs, the expression changes of which are codirected with changes in the expression of the human orthologous genes decreasing and increasing human reproductive potential, respectively. The wild animals had 9 and 11 such DEGs, respectively. This difference between domestic and wild animals was significant according to Pearson's χ^2 test ($p < 0.05$) and Fisher's exact test ($p < 0.05$). We discuss the results from the standpoint of restoration of endangered animal species whose natural habitats are subject to an anthropogenic impact.

Key words: human; reproductive potential; animal model of human disease; domestication; RNA-Seq; most recent common ancestor.

For citation: Ponomarenko M.P., Chadaeva I.V., Ponomarenko P.M., Bogomolov A.G., Oshchepkov D.Yu., Sharypova E.B., Suslov V.V., Osadchuk A.V., Osadchuk L.V., Matushkin Yu.G. A bioinformatic search for correspondence between differentially expressed genes of domestic versus wild animals and orthologous human genes altering reproductive potential. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):96-108. DOI 10.18699/VJGB-22-13

Введение

Одним из крупнейших достижений генетики XX в. является открытие Д.К. Беляевым дестабилизирующего отбора при одомашнивании животных, затрагивающего регуляцию экспрессии генов (т. е. специфичность и уровень), но не их структуры. При этом дестабилизирующий отбор прямо или косвенно влияет на системы нейроэндокринного контроля онтогенеза при усилении прежних или появлении новых факторов стресса в окружающей среде: "In a genetic and biochemical sense, what may be selected for are changes in the regulation of genes – that is, in the timing and the amount of gene expression rather than changes in individual structural genes. Selection having such an effect is called by me destabilizing selection. The selection becomes destabilizing when it affects, directly or indirectly, the systems of neuroendocrine control of ontogenesis. This seems always to be the case when some new stressful factors appear in the environment, or when stresses usual for the species increase in strength." (Belyaev, 1979, p. 307).

Это открытие – итог многолетних уникальных экспериментов по одомашниванию норки (Беляев и др., 1972) и лисицы (Belyaev et al., 1975), а также мыши как лабораторной модели рака у человека (Belyaev, Gruntenko, 1972). Среди этих экспериментов были также наблюдения ускоренного угасания гормональной функции семенников (Осадчук и др., 1978а) и нарушения сезонности размножения (Осадчук и др., 1978б) одомашненных лисиц по сравнению с дикими, которые были выполнены с участием одного из соавторов настоящей работы.

Дальнейший сравнительный анализ репродуктивных показателей одомашненных лисиц относительно диких (принятых за норму) выявил снижение показателей эндокринной системы самок (Osadchuk, 1992a), сексуальной активности самцов-первогодков (Osadchuk, 1992b, Осадчук, 2006), массы гонад эмбрионов и гетерохронии развития у них гипофизарно-семенникового комплекса

(Осадчук, 1998) в качестве свидетельств дестабилизирующего отбора при одомашнивании животных (Belyaev, 1979). На лабораторной модели одомашнивания животных человеком с использованием аутбредных линий крыс была отмечена задержка полового созревания самцов ручной линии по сравнению с самцами агрессивной линии (Prasolova et al., 2014). Результаты сравнения геномов человека, ряда домашних животных и некоторых из их диких сородичей обобщены термином «синдром самодоместикации», в симптомы которого включены расстройства аутистического спектра (Theofanopoulou et al., 2017), хотя идея самодоместикации человека остается в фокусе дискуссий (Del Savio, Mameli, 2020) по сей день.

Следуя тренду постгеномной эры наук о жизни (Qian et al., 2021), мы создали биоинформатическую модель синдрома самодоместикации с использованием дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) домашних животных в сравнении с их дикими сородичами, которые ортологичны генам человека, связанных с ревматоидным артритом (Klimova et al., 2021) и репродуктивным потенциалом (Vasiliev et al., 2021), т. е. с ростом численности людей, без ограничений со стороны лимитирующих факторов (Chapman, 1931; Pianka, 1976).

В настоящей работе мы исследовали 68 генов человека, изменения экспрессии которых влияют на репродуктивное здоровье женщин (Chadaeva et al., 2018) и мужчин (Ponomarenko et al., 2020). Полученный результат обсуждается в связи с восстановлением видов животных, исчезающих под антропогенной нагрузкой (Esmacili et al., 2019).

Материалы и методы

Исследуемые гены человека. Проанализировано 68 генов человека, в промоторах которых мы ранее оценили кандидатные SNP-маркеры изменений репродуктивного здоровья женщин (Chadaeva et al., 2018) и мужчин (По-

Таблица 1. Примеры 68 исследуемых генов человека, для которых ранее были оценено достоверное влияние SNP сайтов связывания ТАТА-связывающего белка (ТВР) на сродство ТВР к промоторам этих генов, а также на уровни их экспрессии и, соответственно, изменения репродуктивной сферы женщин (Chadaeva et al., 2018) и мужчин (Ponomarenko et al., 2020). Полный список см. в Приложении

№	Ген человека	Пониженная экспрессия (-)			Повышенная экспрессия (+)		
		N_{SNP} (лит. источник)	Влияние на репродуктивную сферу и здоровье (лит. источник)	♂♀	N_{SNP} (лит. источник)	Влияние на репродуктивную сферу и здоровье (лит. источник)	♂♀
i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii
1	<i>ACKR1</i>	1 (Chadaeva et al., 2018)	Повышенный риск преэклампсии как одной из самых острых проблем современного акушерства (Velzing-Aarts et al., 2002)	↓	–	Согласно паталого-анатомическим данным, выше смертность от атеросклероза и заболеваний коронарной артерии (Hernandez-Aguilera et al., 2020)	↓
18	<i>DNMT1</i>	2 (Chadaeva et al., 2018)	Децитабин в качестве противоопухолевого препарата снижает уровень DNMT1 (Awada et al., 2020)	↑	7 (Chadaeva et al., 2018)	В модели болезней человека на мыши: нарушения развития мозга плода при стрессе (Matriciano et al., 2013)	↓
49	<i>PLCXD1</i>	15 (Ponomarenko et al., 2020)	Гендерное повышение рисков у мужчин среднего (репродуктивного) возраста для ишемического инсульта (Tian et al., 2012)	↓	35 (Ponomarenko et al., 2020)	Трансфекция вектора с геном <i>PLCXD1</i> в клеточные культуры меланомы человека подавляет их рост (Mithani et al., 2011)	↑
68	<i>ZFY</i>	–	В модели заболеваний человека с использованием быка: астенозооспермия (Xi et al., 2019)	↓	2 (Ponomarenko et al., 2020)	Выше риск остановки мейоза сперматоцитов, ведущей к их апоптозу и бесплодию (Jan et al., 2018)	↓

Примечание. № – порядковый номер гена в списке, упорядоченном по алфавиту, в Приложении. N_{SNP} – число кандидатных SNP-маркеров, значимо снижающих или повышающих сродство ТВР к промоторам гена (Chadaeva et al., 2018; Ponomarenko et al., 2020) и, соответственно, понижающих (-) или повышающих (+) его экспрессию (Mogno et al., 2010; Ponomarenko et al., 2010); влияние на репродуктивную сферу человека: ухудшение (↓) или улучшение (↑). Гены: *ACKR1* – атипичный хемокиновый рецептор 1; *DNMT1* – ДНК-метилтрансфераза 1; *PLCXD1* – белок-1, содержащий фосфатидилинозитол-специфический домен фосфолипазы CX; *ZFY* – Y-связанный белок с цинковым пальцем.

номаренко et al., 2020), примеры которых представлены в табл. 1, а их полное описание – в Приложении¹.

Например, в промоторе гена *ACKR1* (атипичный хемокиновый рецептор 1) человека ранее мы нашли SNP rs2814778, который понижает сродство ТАТА-связывающего белка (ТВР) к этому промотору (Chadaeva et al., 2018) и таким путем (Mogno et al., 2010), экспрессию этого гена (см. табл. 1, колонка iii, $N_{\text{SNP}} = 1$). Это согласуется с независимыми клиническими данными для пациентоносителей SNP rs2814778 (Michon et al., 2001; Nalls et al., 2008), вследствие чего мы предложили кандидатный SNP-маркер rs2814778 для преэклампсии как одной из наиболее острых проблем современного акушерства (Velzing-Aarts et al., 2002), ухудшающей репродуктивное здоровье женщин (Chadaeva et al., 2018) (см. табл. 1, колонка v, обозначено символом «↓»). Вместе с тем, согласно паталого-анатомическим данным (Hernandez-Aguilera et al., 2020), избыток белка *ACKR1* способствует увеличению смертности людей от атеросклероза и других заболеваний коронарной артерии (см. табл. 1, колонка vii), что снижает их репродуктивный потенциал (см. табл. 1, колонка viii).

Другим примером исследованного нами (Ponomarenko et al., 2020) ранее гена, чьи понижение и повышение экспрессии ухудшают репродуктивную сферу людей, является ген *ZFY* белка с цинковым пальцем на хромосоме Y (см. табл. 1).

Кроме того, ранее мы нашли два кандидатных SNP-маркера, rs758026532 и rs772821225, в промоторе гена *DNMT1*, кодирующего ДНК-метилтрансферазу 1 человека, которые снижают его экспрессию (Chadaeva et al., 2018), как это делает противоопухолевый препарат децитабин (Awada et al., 2020), повышая таким путем репродуктивный потенциал людей (см. табл. 1, колонка v, символ «↑»). В промоторе этого гена мы ранее выявили семь кандидатных SNP-маркеров избытка DNMT1 (Chadaeva et al., 2018), что, согласно модели заболеваний человека с использованием мыши (Matriciano et al., 2013), может вызывать эпигенетические нарушения развития мозга плода при воздействии стрессирующих факторов, ухудшая репродуктивную сферу человека (см. табл. 1, колонка viii, символ «↓»).

Наконец, в табл. 1 показано, что исследованный нами ранее (Ponomarenko et al., 2020) ген *PLCXD1* (содержащий фосфатидилинозитол-специфический домен фосфолипазы CX белок-1) человека, представляет диаметрально противоположную ситуацию (см. табл. 1, символы «↓» и «↑» в колонках v и viii соответственно). Действительно, пониженная экспрессия этого гена является фактором риска инсульта у мужчин репродуктивного возраста (Tian et al., 2012), тогда как его повышенная экспрессия улучшает репродуктивный потенциал благодаря подавлению развития меланом как одних из самых смертельно опасных злокачественных опухолей человека (Mithani et al., 2011).

¹ Приложение см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx2.pdf>

Таблица 2. Исследуемые данные RNA-Seq о дифференциально экспрессируемых генах домашних и диких животных, доступных в базе данных PubMed (Lu, 2011)

№	Домашние животные	Дикие животные	Орган	Число ДЭГ	Литературный источник
i	ii	iii	iv	v	vi
1	Собака (<i>Canis familiaris</i>)	Волк (<i>C. lupus</i>)	Кровь	450	Yang X. et al., 2018
2	Собака (<i>C. familiaris</i>)	Волк (<i>C. lupus</i>)	Лобная кора	19	Albert et al., 2012
3	Ручная лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	Агрессивная лисица (<i>V. vulpes</i>)	Гипофиз	327	Hekman et al., 2018
4	Свинья (<i>Sus scrofa</i>)	Кабан (<i>S. scrofa</i>)	Лобная кора	61	Albert et al., 2012
5	Свинья (<i>S. scrofa</i>)	Кабан (<i>S. scrofa</i>)	Лобная кора	34	Long et al., 2018
6	Свинья (<i>S. scrofa</i>)	Кабан (<i>S. scrofa</i>)	Гипофиз	22	Yang Y. et al., 2018
7	Домашняя морская свинка (<i>Cavia porcellus</i>)	Дикая морская свинка (<i>C. aperea</i>)	Лобная кора	1174	Albert et al., 2012
8	Домашний кролик (<i>Oryctolagus cuniculus domesticus</i>)	Дикий кролик (<i>O. cuniculus</i>)	Лобная кора	19	Albert et al., 2012
9	Домашний кролик (<i>O. cuniculus domesticus</i>)	Дикий кролик (<i>O. cuniculus</i>)	Теменная и височная кора	216	Sato et al., 2020
10	Домашний кролик (<i>O. cuniculus domesticus</i>)	Дикий кролик (<i>O. cuniculus</i>)	Миндалевидное тело	118	Sato et al., 2020
11	Домашний кролик (<i>O. cuniculus domesticus</i>)	Дикий кролик (<i>O. cuniculus</i>)	Гипоталамус	43	Sato et al., 2020
12	Домашний кролик (<i>O. cuniculus domesticus</i>)	Дикий кролик (<i>O. cuniculus</i>)	Гиппокамп	100	Sato et al., 2020
13	Ручная крыса (<i>Rattus norvegicus</i>)	Агрессивная крыса (<i>R. norvegicus</i>)	Лобная кора	23	Albert et al., 2012
14	Домашние куры (<i>Gallus gallus</i>)	Дикие куры (<i>G. gallus</i>)	Гипофиз	474	Fallahshahroudi et al., 2019
Всего				3080	

Аналогично рассмотренным выше генам, *ACKR1*, *DNMT1*, *PLCXD1* и *ZFY*, в Приложении описаны все 68 генов человека, исследуемых в этой работе, среди которых нам не удалось найти пример, в котором как понижение, так и повышение экспрессии гена могут улучшить репродуктивный потенциал людей.

Исследуемые ДЭГ домашних животных в сравнении с дикими. Проанализировано 3080 ДЭГ домашних животных в сравнении с дикими, которые доступны в базе данных PubMed (Lu, 2011), как это описано в табл. 2 и охарактеризовано примерами в табл. 3. При этом, согласно (Klimova et al., 2021; Vasiliev et al., 2021), к анализу данных RNA-Seq применяли одно из самых древних (Samet, 1985), широко используемых (Sun et al., 2008; Morozova et al., 2020; Nakizimana et al., 2021) и основополагающих (Zhang et al., 2021) понятий филогенетического анализа – «ближайший общий предок» (Samet, 1985). В связи с этим домашних животных и их диких сородичей характеризовали равновеликими минимально возможными противоположно направленными изменениями экспрессии генов в сравнении с их неизвестным «ближайшим общим предком».

Например, ген *Ckbl* (креатинкиназа В-подобный белок) охарактеризован в табл. 1 (колонка v) положительной оценкой 4.33 логарифмических единиц по основанию 2 (\log_2 -единиц) относительной экспрессии в крови собаки (*Canis familiaris*) в сравнении с таковой у волка (*C. lupus*), согласно работе (Yang X. et al., 2018). Поэтому собаке и

волку соответствуют повышенная и пониженная экспрессия этого гена в сравнении с таковой у их ближайшего общего предка (см. табл. 3, колонки vii и viii). Аналогично негативная оценка (–1.55), относительной экспрессии гена *Adm* (адреномедуллин) в лобной коре собаки в сравнении с таковой у волка (см. табл. 3, колонка v) соответствует пониженной и повышенной экспрессии *Adm* у них в этом отделе мозга в ходе дивергенции от их ближайшего общего предка (см. табл. 3, колонки vii и viii). Всего, таким образом, охарактеризовано 450 ДЭГ в крови (Yang X. et al., 2018) и 19 ДЭГ в лобной коре (Albert et al., 2012) собаки и волка (см. табл. 2, колонка v).

Оценка (–0.47) дифференциальной экспрессии гена *Hpd*, который кодирует 4-гидроксифенилпируват диоксигеназу, в гипофизе ручных vs агрессивных лисиц *Vulpes vulpes* (Hekman et al., 2018) также соответствует пониженной и повышенной экспрессии этого гена у них при дивергенции от ближайшего предка (см. табл. 3).

Кроме того, позитивные оценки относительной экспрессии генов *Mdk* (Albert et al., 2012) и *C7* (Long et al., 2018), кодирующих мидкин, и компонент 7 системы комплемента врожденного иммунитета, соответственно, в лобной коре свиньи (*Sus scrofa*) по сравнению с кабаном (*S. scrofa*), отвечают повышенной их экспрессии у свиньи сравнительно с кабаном по мере дивергенции от ближайшего общего предка (см. табл. 3). Напротив, для отрицательной оценки (–1.32) для гена *Ano3* в гипофизе свиньи относительно кабана (Yang Y. et al., 2018) подходят дефицит и избыток

Таблица 3. Примеры исследуемых ДЭГ домашних и диких животных, которые интегрально охарактеризованы в табл. 2

Животные		RNA-Seq				Изменение экспрессии при дивергенции животных от ближайшего общего предка		Литературный источник
домашние	дикие	Орган	ДЭГ	log_2	p	домашние животные	дикие животные	
i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	ix
Собака	Волк	Кровь	<i>Ckbl</i>	4.33	10^{-3}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	Yang X. et al., 2018
Собака	Волк	Лобная кора	<i>Adm</i>	-1.55	10^{-4}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	Albert et al., 2012
Ручная лисица	Агрессивная лисица	Гипофиз	<i>Hpd</i>	-0.47	10^{-5}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	Hekman et al., 2018
Свинья	Кабан	Лобная кора	<i>Mdk</i>	1.10	10^{-8}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	Albert et al., 2012
Свинья	Кабан	Лобная кора	<i>C7</i>	1.64	10^{-4}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	Long et al., 2018
Свинья	Кабан	Гипофиз	<i>Ano3</i>	-1.32	0.05	Пониженная (-)	Повышенная (+)	Yang Y. et al., 2018
Домашняя морская свинка	Дикая морская свинка	Лобная кора	<i>Agt</i>	-1.80	10^{-16}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	Albert et al., 2012
Домашний кролик	Дикий кролик	Лобная кора	<i>Gp2</i>	6.36	10^{-3}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	Albert et al., 2012
Домашний кролик	Дикий кролик	Теменная и височная кора	<i>ApoD</i>	1.05	0.05	Повышенная (+)	Пониженная (-)	Sato et al., 2020
Домашний кролик	Дикий кролик	Миндалевидное тело	<i>Pgk1</i>	-1.22	0.05	Пониженная (-)	Повышенная (+)	Sato et al., 2020
Домашний кролик	Дикий кролик	Гипоталамус	<i>Aqp1</i>	-3.46	0.05	Пониженная (-)	Повышенная (+)	Sato et al., 2020
Домашний кролик	Дикий кролик	Гиппокамп	<i>Irf6</i>	1.66	0.05	Повышенная (+)	Пониженная (-)	Sato et al., 2020
Ручная крыса	Агрессивная крыса	Лобная кора	<i>Alb</i>	1.64	10^{-6}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	Albert et al., 2012
Домашние куры	Дикие куры	Гипофиз	<i>Fst</i>	-1.21	10^{-3}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	Fallahshahroudi et al., 2019

Примечание. log_2 – экспрессия у домашних животных относительно диких (в log_2 -ед.); p – статистическая значимость, согласно оценке авторов, цитируемых в колонке ix. Гены: *Ckbl* – креатинкиназа В-подобный белок; *Adm* – аденомедуллин; *Hpd* – 4-гидроксифенилпируват диоксигеназа; *Mdk* – мидкин; *C7* – компонент 7 системы комплемента врожденного иммунитета; *Ano3* – аноктамин 3; *Agt* – ангиотензиноген; *Gp2* – гликопротеин 2; *ApoD* – аполипопротеин D; *Pgk1* – фосфоглицераткиназа 1; *Aqp1* – аквапорин 1; *Irf6* – регуляторный фактор интерферона б; *Alb* – альбумин; *Fst* – фоллистатин.

аноктамина 3, кодируемого *Ano3*, в этом отделе мозга у них по мере дивергенции от их ближайшего общего предка (см. табл. 3).

В свою очередь, негативная оценка дифференциальной экспрессии гена *Agt* (ангиотензиноген) в лобной коре домашних морских свинок *Cavia porcellus* по сравнению с дикими *C. aperea* (Albert et al., 2012) соответствует пониженной и повышенной экспрессии этого гена у них по мере дивергенции от их ближайшего общего предка (см. табл. 3, колонки v, vii и viii). В табл. 2 и 3 даны аналогичные примеры описания всех 3080 ДЭГ домашних животных в сравнении с их дикими сородичами, исследованных в этой работе.

Поиск ортологичных генов человека и животных. Для каждого анализируемого ДЭГ домашних животных в сравнении с их дикими сородичами, которые охарактеризованы в табл. 2 и 3, искали ген-ортолог среди всех 68 исследуемых генов человека (см. табл. 1 и Приложение). Если таковой ген человека не был найден, то рассматриваемые ДЭГ животных исключали из анализа. То есть сопоставляли влияние сопоставленных изменений экспрессии найденных ортологичных генов на репродуктивный потенциал людей (см. табл. 1 и Приложение, колонки v и viii) и на возникновение domesticiрованной формы

или сохранение дикой соответствующих животных в процессе микроэволюции их ближайшего общего предка (см. табл. 3, колонки vii и viii). Например, ген *ApoA1* (аполипопротеин А1) характеризуется негативной оценкой (-3.2) дифференциальной экспрессии у домашних морских свинок в сравнении с дикими (Albert et al., 2012), что соответствует пониженной и повышенной экспрессии этого гена в процессе дивергенции от их ближайшего общего предка (табл. 4, колонки ii, iv и vi). При этом пониженная экспрессия ортологичного гена *APOA1* человека была клинически ассоциирована предрасположенностью к когнитивным расстройствам (Peng et al., 2017), тогда как повышенная экспрессия этого гена – с бесплодием у женщин (Manohar et al., 2014), как показано в табл. 4 (колонки vii и ix). Таким образом, дефицит и избыток *APOA1* у человека, в сравнении с нормой, ухудшают репродуктивную сферу людей (см. табл. 4, колонки viii и x).

В рамках применяемой здесь ранее предложенной биоинформатической модели заболеваний человека с использованием ДЭГ домашних *versus* диких животных (Klimova et al., 2021; Vasiliev et al., 2021) все это означает, что изменения экспрессии гена *ApoA1* в процессе дивергенции домашних и диких морских свинок от их ближайшего общего предка соответствуют негативному влиянию из-

Таблица 4. Сравнение влияния изменений экспрессии ортологичных генов на репродуктивный потенциал человека и дивергенцию домашних и диких животных от их ближайшего общего предка

Животные					Человек				
RNA-Seq		Изменение экспрессии при дивергенции животных от ближайшего общего предка			Ген	Влияние изменения экспрессии гена на репродуктивный потенциал (♂♀)			
ДЭГ	\log_2	p	домашние	дикие		пониженная (-)	♂♀	повышенная (+)	♂♀
i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	ix	x
Домашние и дикие морские свинки (Albert et al., 2012)									
<i>Apoa1</i>	-3.2	10^{-2}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	<i>APOA1</i>	Выше риск когнитивных расстройств (Peng et al., 2017)	↓	Бесплодие женщин (Manohar et al., 2014)	↓
<i>Cetp</i>	2.1	10^{-4}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>CETP</i>	Замедление атерогенеза против инсульта и инфаркта (Plengpanich et al., 2011)	↑	При беременности выше риск гиперхолестеринемии (Silliman et al., 1993)	↓
<i>Cyp17a1</i>	-1.1	10^{-2}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	<i>CYP17A1</i>	Выше риск нарушения фертильности (Marsh, Auchus, 2014)	↓	Малайзийский прополис повышает CYP17A1, чем лечит субфертильность (Nna et al., 2020)	↑
<i>Gcg</i>	3.0	10^{-2}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>GCG</i>	Ниже частота беременности (Sugiyama et al., 2012)	↓	Ниже частота беременности (Sun et al., 2019)	↓
<i>Il1b</i>	2.3	10^{-4}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>IL1B</i>	Нет деформации костей при бактериальной инвазии (Sasaki et al., 2020)	↑	Выше циркадная гиперчувствительность боли (Olkkonen et al., 2015)	↓
<i>Nr5a1</i>	-2.2	10^{-3}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	<i>NR5A1</i>	Дисгенезия гонад (Nagaraja et al., 2019)	↓	Лучше дифференцировка клеток Сертоли и качество спермы (Wood et al., 2011)	↑
<i>Proc</i>	1.8	10^{-2}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>PROC</i>	Выше риск смертельно опасной молниеносной пурпуры новорожденных (Dinarvand, Moser, 2019)	↓	Выше риск прерывания беременности (Lay et al., 2005)	↓
Собака и волк (Yang X. et al., 2018)									
<i>Gh1</i>	2.8	10^{-4}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>GH1</i>	Выше смертность от сердечно-сосудистых патологий (Jorgensen, Juul, 2018)	↓	Соматотропин продлевает репродуктивный возраст женщин (Regan et al., 2018)	↑
<i>Hba1</i>	-4.1	10^{-7}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	<i>HBB</i>	Талассемия ухудшает репродуктивное здоровье женщин (Takhviji et al., 2020)	↓	В китайской медицине отвар Цзянь-Пи-Йи-Шен повышает гемоглобин против хронической анемии (Wang et al., 2020)	↑
<i>Hbb1</i>	-5.9	10^{-11}	Пониженная (-)	Повышенная (+)					
<i>Hbm</i>	-6.5	10^{-9}	Пониженная (-)	Повышенная (+)					
<i>Hbz1</i>	-7.1	10^{-4}	Пониженная (-)	Повышенная (+)					
Ручные и агрессивные лисицы (Nekman et al., 2018)									
<i>Esr2</i>	-0.3	10^{-2}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	<i>ESR2</i>	Дефицит ESR2 у подростков снижает качество спермы у взрослых (Ivanski et al., 2020)	↓	Избыток ESR2 у подростков снижает качество спермы у взрослых (Ivanski et al., 2020)	↓
<i>Il9r</i>	0.4	10^{-5}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>IL9R</i>	Нарушена имплантация трофобластов (Sun et al., 2020)	↓	Выше риск смертельно опасного анафилактического шока (Osterfeld et al., 2010)	↓
Домашние и дикие кролики (Albert et al., 2012)									
<i>F7</i>	-0.3	10^{-2}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	<i>F7</i>	Спонтанные трудно останавливаемые опасные для жизни кровотечения (Senol, Zulfikar, 2020)	↓	Экзогенный F7 – лекарство для спасения жизни при акушерских кровотечениях (Burad et al., 2012)	↑

Окончание табл. 4

Животные					Человек				
RNA-Seq		Изменение экспрессии при дивергенции животных от ближайшего общего предка			Ген	Влияние изменения экспрессии гена на репродуктивный потенциал (♂♀)			
ДЭГ	\log_2	p	домашние	дикие		пониженная (-)	♂♀	повышенная (+)	♂♀
i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	ix	x
Домашние и дикие куры (Fallahshahroudi et al., 2019)									
<i>Cyp17a1</i>	0.6	10^{-9}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>CYP17A1</i>	Выше риск нарушения фертильности (Marsh, Auchus, 2014)	↓	Малазийский прополис повышает CYP17A1, чем лечит субфертильность (Nna et al., 2020)	↑
<i>F3</i>	0.8	10^{-4}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>F3</i>	Озонотерапия снижает F3 для лечения тромбоэмических повреждений кишечника (Yu et al., 2020)	↑	Выше риск инсульта и инфаркта миокарда (Arnaud et al., 2000)	↓
<i>Hbad</i>	-1.1	10^{-2}	Пониженная (-)	Повышенная (+)	<i>HBD</i>	Талассемия ухудшает репродуктивное здоровье женщин (Takhviji et al., 2020)	↓	В китайской медицине отвар Цзянь-Пи-Йи-Шен повышает гемоглобин против хронической анемии (Wang et al., 2020)	↑
<i>Pgr</i>	1.3	10^{-6}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>PGR</i>	Бесплодие из-за нарушений сексуального поведения (Kubota et al., 2016)	↓	Повышенная фертильность (Yao et al., 2020)	↑
<i>Slc25a6</i>	0.5	10^{-5}	Повышенная (+)	Пониженная (-)	<i>SLC25A6</i>	Выше риск дистрофии мышц (Clemencon et al., 2013)	↓	Выше устойчивость к вирусу герпеса (Guo et al., 2015)	↑

Примечание. См. примечание к табл. 3. Гены: *Apoa1* – аполипопротеин A1; *Cetp* – переносчик холестерина; *Cyp17a1* – стероид-17 α -монооксигеназа; *Gcg* – глюкагон; *Il1b* – интерлейкин 1 β ; *Nr5a1* – стероидогенный фактор 1; *Gh1* – соматотропин; *HBD*, *Hba1*, *Hbad*, *Hbb1*, *Hbm* и *Hbz1* – субъединицы δ , $\alpha 1$, αD , β -подобная, μ и $\zeta 1$ гемоглобина; *Esr2* – рецептор эстрогена 2; *Il9r* – рецептор интерлейкина 9; *F3*, *F7* и *Proc* – факторы свертывания крови III, VII и XIV; *Pgr* – рецептор прогестерона; *Slc25a6* – митохондриальный переносчик растворенных веществ.

менений экспрессии гена-ортолога *APOA1* человека на репродуктивный потенциал людей.

Аналогично, ген *SETP*, кодирующий переносчик сложного эфира холестерина, суперэкспрессируется при гиперхолестеринемии беременных (Silliman et al., 1993), ухудшая репродуктивное здоровье женщин (см. табл. 4, колонки ix и x). Избыток *SETP* у человека согласуется с избытком *Cetp* у домашней морской свинки в ходе ее дивергенции от ближайшего общего предка с дикой морской свинкой (Albert et al., 2012), как это показано в табл. 4 (колонки ii и iv). Напротив, дефицит *SETP* у человека является клинически доказанным маркером замедления атерогенеза, а также снижения риска инсульта и инфаркта (Plengpanich et al., 2011), что можно расценивать как фактор повышения репродуктивного потенциала человека (см. табл. 4, колонки vii и viii). Дефицит *SETP* у человека соотносится с дефицитом *Cetp* у дикой морской свинки при ее дивергенции от ближайшего общего предка с домашней морской свинкой (Albert et al., 2012) (см. табл. 4, колонка v).

Наконец, ген *CYP17A1* человека несет стероид-17 α -монооксигеназу, дефицит которой нарушает фертильность людей (Marsh, Auchus, 2014), что снижает их репродуктивный потенциал (см. табл. 4). Недостаточность *CYP17A1* у человека аналогична дефициту *Cyp17a1* у домашней морской свинки (Albert et al., 2012) и у диких кур *Gallus gallus* (Fallahshahroudi et al., 2019) при дивергенции до-

машних и диких форм этих видов (см. табл. 4). Напротив, избыток *CYP17A1* у человека преодолевает субфертильность (Nna et al., 2020), повышая репродуктивный потенциал людей (см. табл. 4, колонки ix и x). Это соответствует повышенной экспрессии ортологичных генов *Cyp17a1* дикой морской свинки и у домашних кур в сравнении с соответствующими ближайшими общими предками (см. табл. 4).

В табл. 4 приведены аналогичные описания для каждого из всех выявленных нами генов-ортологов человека и животных среди 68 изучаемых здесь генов человека (см. табл. 1 и Приложение) и всех 3080 ДЭГ домашних животных в сравнении с их дикими сородичами (см. табл. 2 и 3). При этом существенно, что благодаря использованию понятия «дивергенция от ближайшего общего предка» удалось сопоставлять фенотипические проявления повышенной и пониженной экспрессии генов человека (см. табл. 1, колонки v и viii; табл. 4, колонки viii и x) с изменениями экспрессии ортологичных им генов у домашних и диких животных при дивергенции от их ближайшего общего предка (см. табл. 3, колонки v и vi; табл. 4, колонки iv и v).

База знаний PetDEGsDB о заболеваниях человека в качестве кандидатных симптомов для синдрома самодоместикации. Выявленные как основной результат настоящей работы соответствия между влиянием ортологичных генов человека и животных на репродуктивный

потенциал человека и дивергенцию домашних и диких животных от их ближайших общих предков привели к плоскому текстовому Excel-совместимому формату и, наконец, преобразовали в базу знаний PetDEGsDB о заболеваниях человека как кандидатные симптомы для синдрома самодоместикации (Vasiliev et al., 2021) в Web-среде MariaDB 10.2.12 (MariaDB Corp AB, Эспоо, Финляндия). База знаний о заболеваниях человека в качестве синдромов самодоместикации доступна по адресу: URL = <https://www.sysbio.ru/domestic-wild>.

Статистический анализ. Описанные в табл. 4 соответствия между фенотипическими проявлениями сопоставленных изменений генов-ортологов человека и животных суммировали в стандартную таблицу соответствий Фишера 2×2, представленную пересечением строк «домашние животные» и «дикие животные» (табл. 5, колонки iii и iv). Эту таблицу анализировали с использованием пакета Statistica (Statsoft™, Талса, США), режим работы которого выбрали последовательностью команд Statistics→Nonparametrics→2×2 Table, позволившей проверить биномиальное распределение, точный критерий Фишера и критерий χ^2 Пирсона (см. табл. 5, колонки v, vi, vii и viii).

Результаты и обсуждение

В настоящей работе мы исследовали 68 генов человека (см. табл. 1 и Приложение) и 3080 ДЭГ домашних животных по сравнению с дикими сородичами (см. табл. 2 и 3), которые описаны в разделе «Материалы и методы». В результате применения методики, изложенной в подразделе «Поиск ортологических генов человека и животных», найдено 20 ДЭГ животных, которые оказались ортологичными исследуемым генам человека, как это представлено в табл. 4 и описано в разделе «Материалы и методы» на иллюстративных примерах генов *APOA1*, *SETP* и *CYP17A1* человека. Рассмотрим выявленные гены-ортологи человека и животных.

Ген *CGC* человека несет глюкогон, дефицит (Sugiyama et al., 2012) и избыток (Sun et al., 2019) которого являются клинически доказанными маркерами пониженной частоты беременности и, таким образом, ухудшения репродуктивной сферы людей (см. табл. 4). Избыток и дефицит глюкогона у человека соответствуют повышенной и пониженной экспрессии гена *Gcg* домашних и диких морских свинок (Albert et al., 2012) при дивергенции от ближайшего общего предка.

Ген *IL1B* кодирует интерлейкин 1 β . Избыток этого интерлейкина повышает циркадную чувствительность к боли (Oikkonen et al., 2015), чем снижает репродуктивный потенциал человека (см. табл. 4). Однако дефицит *IL1B* препятствует деформации костей при бактериальной инвазии (Sasaki et al., 2020), в этом случае репродуктивный потенциал человека ожидаемо повышается (см. табл. 4). Избыток и дефицит *IL1B* у человека является сопоставленным избытку и дефициту *Il1b* у дикой морской свинки при ее дивергенции от общего предка с домашней морской свинкой (Albert et al., 2012).

Ген *NR5A1*, кодирующий стероидогенный фактор 1 человека, характеризуется дефицитом экспрессии при дис-

генезии гонад (Nagaraja et al., 2019), которая снижает репродуктивный потенциал человека (см. табл. 4), в то время как избыток фактора *NR5A1* способствует улучшению качества спермы (Wood et al., 2011). И дефицит *NR5A1*, и его избыток у человека соответствуют пониженной и повышенной экспрессии гена *Nr5a1* у домашней морской свинки в процессе дивергенции с дикой морской свинкой от общего предка (Albert et al., 2012).

Ген *PROC* соответствует фактору свертывания крови XIV человека, недостаток которого у новорожденных может вызвать смертельно опасную молниеносную пурпуру (Dinarvand, Moser, 2019), в то время как его избыток повышает риск прерывания беременности (Lay et al., 2005). Этим изменениям экспрессии *PROC* сопоставляются пониженная и повышенная экспрессия *Proc* диких и домашних морских свинок (Albert et al., 2012) в процессе их микроэволюции (см. табл. 4).

Ген *GHI* несет соматотропин, повышающий репродуктивный потенциал женщин (Regan et al., 2018). Избыток *GHI* у человека аналогичен избытку *Gh1* у собак (*C. familiaris*) при сравнении с ближайшим общим предком собак и волков (*C. lupus*) (Yang X. et al., 2018). Дефицит *GHI* повышает смертность людей от сердечно-сосудистых заболеваний (Jorgensen, Juul, 2018) и согласуется с дефицитом *Gh1* у волка в процессе его эволюции.

Гены *HBB* и *HBD* кодируют субъединицы β и δ гемоглобина, дефицит которых связан с талассемией – фактором снижения репродуктивного потенциала женщин (Takhviji et al., 2020). Дефицит гемоглобина у человека отвечает дефициту гемоглобина у собак (Yang X. et al., 2018) и домашних кур (Fallahshahroudi et al., 2019) при сравнении с таковым у ближайших общих предков с их дикими потомками (см. табл. 4). Избыток гемоглобина у человека соответствует избытку гемоглобина у волков и диких кур (см. табл. 4).

Ген *ESR2* (рецептор эстрогена 2) человека как в случае пониженной экспрессии у подростков, так и при его повышенной экспрессии у них был ассоциирован со снижением качества спермы у взрослых (Ivanski et al., 2020). Эти изменения его экспрессии у человека подходят таковым для ортологичного гена *Esr2* у ручных и агрессивных лисиц (Некман et al., 2018) в ходе их микроэволюции (см. табл. 4).

Ген *IL9R* несет рецептор интерлейкина 9 человека, дефицит которого нарушает имплантацию трофобластов (Sun et al., 2020), тогда как его избыток способствует смертельно опасному анафилактическому шоку (Osterfeld et al., 2010). Избыток и дефицит этого рецептора у человека соответствуют повышенной и пониженной экспрессии гена *Il9r* у ручных и агрессивных лисиц (Некман et al., 2018) по мере дивергенции от их ближайшего общего предка (см. табл. 4).

Ген *F7* кодирует проконвертин, чью рекомбинантную активированную форму применяют для экстренного спасения жизни при акушерских кровотечениях (Burdad et al., 2012). Избыток *F7* у человека соответствует ортологу у диких кроликов в процессе дивергенции от общего предка с домашними кроликами (Albert et al., 2012). Дефицит проконвертина сопровождается спонтанные опасные для

Таблица 5. Достоверное соответствие влияний сонаправленных изменений экспрессии генов-ортологов на репродуктивный потенциал человека и дивергенцию диких и домашних животных от их ближайшего общего предка

Животные	Человек		Статистика				
	Изменение экспрессии генов, вызывающее изменения репродуктивного потенциала (♂♀)		Биномиальное распределение	Критерий χ^2 Пирсона		Точный критерий Фишера	
	хуже (↓)	лучше (↑)	p	χ^2	p	p	
i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii
Изменение экспрессии ДЭГ во время дивергенции от ближайшего общего предка	Домашние	16	4	0.01	5.2	0.05	0.05
	Дикие	9	11	> 0.4			

жизни кровотока (Senol, Zulfikar, 2020) и согласуется с дефицитом F7 у домашних кроликов (см. табл. 2).

Ген **F3** (тромбопластин) суперэкспрессируется при инсульте и инфаркте миокарда (Arnaud et al., 2000), что может выступать как фактор снижения репродуктивного потенциала человека (см. табл. 4). Избыток F3 у человека является аналогом избытка F3 у домашних кур (Fallahshahroudi et al., 2019). При этом дефицит тромбопластина способствует повышению репродуктивного потенциала человека (Yu et al., 2020) и соответствует дефициту F3 у диких кур в ходе их дивергенции от ближайшего общего предка с домашними курами.

Ген **PGR** кодирует рецептор прогестерона. В модели заболеваний человека с использованием *Pgr*-нокаутных крыс наблюдали бесплодие из-за нарушения сексуального поведения (Kubota et al., 2016). Дефицит PGR у человека является сонаправленным дефициту *Pgr* у диких кур в ходе их дивергенции от общего предка с домашними курами (Fallahshahroudi et al., 2019). Модель фертильности человека с использованием овцематок обнаружила позитивную корреляцию уровня *Pgr* и плодовитости (Yao et al., 2020). Избыток PGR у человека согласуется с избытком *Pgr* у домашних кур как итог их селекции человеком на яйценоскость (см. табл. 4).

Ген **SLC25A6**, кодирующий стероидогенный фактор 1 человека, имеет высокую экспрессию при устойчивости к вирусу герпеса (Guo et al., 2015), что соответствует избытку *Slc25a6* у домашних кур относительно их ближайшего общего предка с дикими курами (Fallahshahroudi et al., 2019). Дефицит SLC25A6 сопровождается повышенным риском дистрофии мышц (Clemenson et al., 2013) и является аналогом дефицита *Slc25a6* у диких кур относительно их ближайшего общего предка с домашними курами, которых человек отбирал на рост мышечной массы.

Все представленные в этой работе результаты обобщены в табл. 5, где у домашних животных 16 и 4 ДЭГ, изменения экспрессии которых являются сонаправленными изменениям экспрессии генов-ортологов у человека, понижающих и повышающих его репродуктивный потенциал, тогда как у диких животных было 9 и 11 таких ДЭГ соответственно. Это различие между дикими и домашними животными статистически достоверно по критерию χ^2 Пирсона ($p < 0.05$) и точному критерию Фишера ($p < 0.05$). Наконец, биномиальное распределение ($p < 0.01$) свидетельствует о том, что антропогенные условия обитания животных при их одомашнивании чаще изменяют уровни

экспрессии генов в направлении, сходном с изменениями экспрессии генов-ортологов у человека при снижении репродуктивного потенциала.

Напротив, микроэволюция диких животных в естественных условиях обитания варьирует экспрессию генов в равной мере сравнительно с таковой у генов-ортологов человека при понижении или повышении его репродуктивного потенциала (биномиальное распределение: $p > 0.4$) в согласии с общепринятым выбором дикого типа в качестве нормы (wild type, WT).

Этот результат согласуется также с тем, что в лабораторных моделях заболеваний человека с использованием животных выявляют ДЭГ у инбредных линий с симптомами соответствующих заболеваний по сравнению с аутбредными линиями в качестве нормы (Fedoseeva et al., 2019).

Тем не менее нам не удалось найти в литературных источниках однозначных свидетельств того, что сонаправленные изменения экспрессии генов-ортологов вызывают сходные патологии у человека и животных, вероятно, вследствие разного генетического контекста этих изменений у разных видов.

Среди факторов вредного антропогенного воздействия на популяции животных весьма часто упоминают снижение их эффективной численности, что повышает степень их инбридинга, негативно коррелирующую с качеством спермы, например у домашних кошек *Felis catus* (Pukazhenthil et al., 2006), оленей *Cervus elaphus* (Gomendio et al., 2007) и зябликов *Taeniopygia guttata* (Forstmeier et al., 2017), а также у мексиканских волков *Canis lupus baileyi*, исчезнувших в дикой природе в XX в. и существующих лишь в рамках программы их восстановления и реинтродукции в прежние места обитания (Asa et al., 2007).

При реинтродукции исчезающих журавлей *Grus americana* высокая степень инбридинга их популяции *ex situ* (~400 особей) задерживает начало размножения и в итоге снижает яйценоскость, что планируют преодолеть методом криоконсервации спермы и искусственного оплодотворения (Songsasen et al., 2019).

Для семейства кошачьих *Felidae* криоконсервацию спермы и искусственное оплодотворение уже успешно осуществили для реинтродукции исчезающей дикой кошки *Prionailurus bengalensis euptilurus* (Amstislavsky et al., 2018). Создание охраняемых территорий естественного обитания амурского тигра *Panthera tigris altaica* способствовало восстановлению популяции (Xiao et al., 2016).

Из-за антропогенного сокращения ареала флоридской пумы *Puma concolor coryi* осталось лишь ~20 особей. На основе теоретико-популяционных расчетов (Hedrick, 1995) для восстановления этого вида были перевезены особи близкородственной техасской пумы *Puma concolor couguar*, обеспечившие успех реинтродукции (Hedrick, 2010).

Межподвидовое скрещивание помогло при реинтродукции лошадей Пржевальского *Equus caballus przewalskii*, исчезнувших в дикой природе полвека назад (Der Sarkissian et al., 2015).

Как продолжение этих успехов можно привести примеры сравнения геномного разнообразия инбредных и аутбредных популяций быков *Bos taurus*, потомков F₁ от скрещиваний между ними и потомков возвратных скрещиваний F₁ с родительскими популяциями, а также для бизонов *Bison bison*. Результаты этих работ независимо воспроизводят факт снижения степени инбридинга при скрещиваниях инбредных линий животных с их аутбредными сородичами (Cronin, Leesburg, 2016). Наконец, благодаря расшифрованному геному австрийского быка породы флекви *Bos (primigenius) taurus* были выявлены районы, влияющие на качество спермы, и успешно подобраны варианты межпородного скрещивания, улучшающие ее (Ferencakovic et al., 2017).

Кроме того, как существенно менее изученный фактор негативного антропогенного воздействия на популяции животных считают рост в них смертности от инфекций, например, в начале реинтродукции лошадей Пржевальского (Robert et al., 2005).

Аналогично в процессе создания резервной популяции дикуши *Falci pennis falci pennis*, оказавшейся на грани исчезновения в естественных местах обитания, у птиц изменился кишечный микробиом, выступающий как стрессор иммунной системы (Коняев и др., 2013). Анализ филогенетической инерции сети «инфекции–хозяин» обнаружил рост числа общих инфекций человека и домашних животных по мере приручения новых диких животных как эпидемиологического моста, соединяющего антропогенную среду с дикой природой (Morand et al., 2014).

Наконец, контраргументами вышеназванных фактов снижения репродуктивного потенциала животных под воздействием человека могут быть домашние свиньи, превосходящие диких кабанов по качеству спермы (Almeida et al., 2006), из-за селекции на плодовитость ради мяса, а также рост доли самок у домашних кур в сравнении с дикими курами как итог селекции на яйценоскость (Zhang et al., 2020).

Таким образом, снижение репродуктивного потенциала при одомашнивании новых хозяйственно ценных видов животных (например, куланов *Equus hemionus hemionus* (Soilemetzidou et al., 2020)) можно компенсировать как искусственным отбором на плодовитость в дополнение к таковому по основному, целевому, признаку, так и с использованием межпородных скрещиваний. При вовлечении в хозяйственный землеоборот человека мест естественного обитания диких животных возникает инбредное снижение их репродуктивного потенциала вплоть до исчезновения, что могут компенсировать межподвидовые скрещивания этих животных, а также методы вспомогательной репродуктивной медицины.

Заключение

Исследовано 68 генов человека (см. табл. 1 и Приложение) и 3080 ДЭГ домашних животных по сравнению с дикими сородичами. Показано, что антропогенное воздействие при одомашнивании животных изменяет экспрессию их генов достоверно чаще в том же направлении, в каком изменения экспрессии ортологичных генов человека ухудшают репродуктивный потенциал людей. Напротив, естественные условия обитания диких животных поддерживают внутривидовую изменчивость уровней экспрессии их генов в неразлично равной мере, соответствующей изменениям экспрессии ортологичных генов человека, ухудшающим или улучшающим репродуктивное здоровье людей.

Список литературы / References

- Беляев Д.К., Евсиков В.И., Матыско Е.К. Генетика плодовитости животных. Сообщение III. Эффект моногибридного гетерозиса на плодовитость и жизнеспособность норок и перспективы его использования в селекции. *Генетика*. 1972;8(1):62-70.
- [Belyaev D.K., Evisikov V.I., Matysko E.K. Genetics of animal fertility: 3. Effect of monohybrid heterosis on the fertility and viability of minks and prospects of its use in breeding. *Sov. Genet.* 1972;8(1): 46-51.]
- Коняев С.В., Климова С.Н., Шило В.А. Инвазии диких птиц отряда курообразных (Galliformes), разводимых в неволе. *Рос. ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные*. 2013;5:19-22.
- [Konyaev S.V., Klimova S.N., Shilo V.A. Invasions of wild birds from the order Galliformes bred in captivity. *Rossiyskiy Veterinarnyy Zhurnal. Melkiye Domashniye i Dikiye Zhitovnye = Russian Veterinary Journal. Small Pets and Wild Animals*. 2013;5:19-22. (in Russian)]
- Осадчук Л.В. Биосинтез тестостерона в гонадах у эмбрионов серебристо-черных лисиц после длительной селекции на доместикационный тип поведения. *Генетика*. 1998;34(7):941-946.
- [Osadchuk L.V. Biosynthesis of testosterone in the fetal gonads of the silver fox after long-term domestication. *Russ. J. Genet.* 1998; 34(7):780-784.]
- Осадчук Л.В. Репродуктивный потенциал самцов серебристо-черных лисиц *Vulpes vulpes* после длительной селекции на доместикационный тип поведения. *Журн. эволюционной биохимии и физиологии*. 2006;42(2):146-152.
- [Osadchuk L.V. Reproductive potential of male silver foxes *Vulpes vulpes* after long selection for the domesticated behavior type. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2006;42(2): 182-189.]
- Осадчук Л.В., Красс П.М., Трут Л.Н., Беляев Д.К. Влияние селекции по поведению на эндокринную функцию гонад у самцов серебристо-черных лисиц. *Докл. АН СССР*. 1978a;240(5):1255-1258.
- [Osadchuk L.V., Krass P.M., Trut L.N., Belyaev D.K. Effects of selection for behavior on the endocrine function of the gonads in male silver-black foxes. *Doklady Akademii Nauk SSSR = Proceedings of the USSR Academy of Sciences*. 1978a;240(5):1255-1258. (in Russian)]
- Осадчук Л.В., Красс П.М., Трут Л.Н., Иванова Л.И. Эндокринная функция гонад у самцов серебристо-черных лисиц с различными наследственно детерминированными формами оборонительного поведения. *Изв. Сиб. отд-ния АН СССР*. 1978b;10:79-86.
- [Osadchuk L.V., Krass P.M., Trut L.N., Ivanova L.N. Gonadal endocrine function in male silver foxes with different hereditary determined forms of defensive behavior. *Izvestiya Sibirskogo Otdeleniya Akademii Nauk SSSR = Proceedings of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences*. 1978b;10:79-86. (in Russian)]

- Albert F.W., Somel M., Carneiro M., Aximu-Petri A., Halbwax M., Thalmann O., Blanco-Aguilar J.A., Plyusnina I.Z., Trut L., Villafruerte R., Ferrand N., Kaiser S., Jensen P., Paabo S. A comparison of brain gene expression levels in domesticated and wild animals. *PLoS Genet.* 2012;8(9):e1002962. DOI 10.1371/journal.pgen.1002962.
- Almeida F.F., Leal M.C., França L.R. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol. Reprod.* 2006;75(5):792-799. DOI 10.1095/biolreprod.106.053835.
- Amstislavsky S., Brusentsev E., Kizilova E., Mokrousova V., Kozhevnikova V., Abramova T., Rozhkova I., Naidenko S. Sperm cryopreservation in the Far-Eastern wildcat (*Prionailurus bengalensis euptilurus*). *Reprod. Domest. Anim.* 2018;53(5):1219-1226. DOI 10.1111/rda.13230.
- Arnaud E., Barbalat V., Nicaud V., Cambien F., Evans A., Morrison C., Arveiler D., Luc G., Ruidavets J.B., Emmerich J., Fiessinger J.N., Aiach M. Polymorphisms in the 5' regulatory region of the tissue factor gene and the risk of myocardial infarction and venous thromboembolism: the ECTIM and PATHROS studies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20(3):892-898. DOI 10.1161/01.atv.20.3.892.
- Asa C., Miller P., Agnew M., Rebollo J.A.R., Lindsey S.L., Callahan M., Bauman K. Relationship of inbreeding with sperm quality and reproductive success in Mexican gray wolves. *Anim. Conserv.* 2007;10(3):326-331. DOI 10.1111/j.1469-1795.2007.00116.x.
- Awada H., Mahfouz R.Z., Kishtagari A., Kuzmanovic T., Durrani J., Kerr C.M., Patel B.J., Visconte V., Radivoyevitch T., Lichtin A., Carraway H.E., Maciejewski J.P., Saunthararajah Y. Extended experience with a non-cytotoxic DNMT1-targeting regimen of decitabine to treat myeloid malignancies. *Br. J. Haematol.* 2020;188(6):924-929. DOI 10.1111/bjh.16281.
- Belyaev D.K. The Wilhelmine E. Key 1978 invitational lecture. Destabilizing selection as a factor in domestication. *J. Hered.* 1979;70(5):301-308. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a109263.
- Belyaev D.K., Gruntenko E.V. Strain differences in thymus weight in mice with different predispositions to spontaneous mammary cancer. *Nature.* 1972;237(5355):401-402. DOI 10.1038/237401a0.
- Belyaev D.K., Trut L.N., Ruvinsky A.O. Genetics of the *W* locus in foxes and expression of its lethal effects. *J. Hered.* 1975;66(6):331-338. DOI 10.1093/oxfordjournals.jhered.a108643.
- Burad J., Bhakta P., Sharma J. Timely 'off-label' use of recombinant activated factor VII (NovoSeven®) can help in avoiding hysterectomy in intractable obstetric bleeding complicated with disseminated intravascular coagulation: A case report and review of the literature. *Indian J. Anaesth.* 2012;56(1):69-71. DOI 10.4103/0019-5049.93349.
- Chadaeva I.V., Ponomarenko P.M., Rasskazov D.A., Sharypova E.B., Kashina E.V., Zhechev D.A., Drachkova I.A., Arkova O.V., Savinkova L.K., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A., Osadchuk L.V., Osadchuk A.V. Candidate SNP markers of reproductive potential are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genomics.* 2018;19(Suppl. 3). DOI 10.1186/s12864-018-4478-3.
- Chapman R.N. Animal Ecology with Special Reference to Insects. New York: McGraw-Hill, 1931.
- Clemençon B., Babot M., Trezeguet V. The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): pathological implications of its dysfunction. *Mol. Aspects Med.* 2013;34(2-3):485-493. DOI 10.1016/j.mam.2012.05.006.
- Cronin M.A., Leesburg V.L. Genetic variation and differentiation in parent-descendant cattle and bison populations. *J. Anim. Sci.* 2016;94(11):4491-4497. DOI 10.2527/jas.2016-0476.
- Del Savio L., Mameli M. Human domestication and the roles of human agency in human evolution. *Hist. Philos. Life Sci.* 2020;42(2):21. DOI 10.1007/s40656-020-00315-0.
- Der Sarkissian C., Ermini L., Schubert M., Yang M.A., Librado P., Fu magalli M., Jonsson H., Bar-Gal G.K., Albrechtsen A., Vieira F.G., Petersen B., Ginolhac A., Seguin-Orlando A., Magnussen K., Fages A., Gamba C., Lorente-Galdos B., Polani S., Steiner C., Neuditschko M., Jagannathan V., Feh C., Greenblatt C.L., Ludwig A., Abramson N.I., Zimmermann W., Schafberg R., Tikhonov A., Sicheritz-Ponten T., Willerslev E., Marques-Bonet T., Ryder O.A., McCue M., Rieder S., Leeb T., Slatkin M., Orlando L. Evolutionary genomics and conservation of the endangered Przewalski's Horse. *Curr. Biol.* 2015;25(19):2577-2583. DOI 10.1016/j.cub.2015.08.032.
- Dinarvand P., Moser K.A. Protein C deficiency. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019;143(10):1281-1285. DOI 10.5858/arpa.2017-0403-rs.
- Esmaili S., Hemami M.R., Goheen J.R. Human dimensions of wildlife conservation in Iran: Assessment of human-wildlife conflict in restoring a wide-ranging endangered species. *PLoS One.* 2019;14(8):e0220702. DOI 10.1371/journal.pone.0220702.
- Fallahshahroudi A., Lotvedt P., Belteky J., Altimiras J., Jensen P. Changes in pituitary gene expression may underlie multiple domesticated traits in chickens. *Hereditas (Edinb.)*. 2019;122(2):195-204. DOI 10.1038/s41437-018-0092-z.
- Fedoseeva L.A., Klimov L.O., Ershov N.I., Efimov V.M., Markel A.L., Orlov Y.L., Redina O.E. The differences in brain stem transcriptional profiling in hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats. *BMC Genomics.* 2019;20(Suppl. 3):297. DOI 10.1186/s12864-019-5540-5.
- Ferencakovic M., Solkner J., Kaps M., Curik I. Genome-wide mapping and estimation of inbreeding depression of semen quality traits in a cattle population. *J. Dairy Sci.* 2017;100(6):4721-4730. DOI 10.3168/jds.2016-12164.
- Forstmeier W., Ihle M., Opatova P., Martin K., Knief U., Albrechtova J., Albrecht T., Kempnaers B. Testing the phenotype-linked fertility hypothesis in the presence and absence of inbreeding. *J. Evol. Biol.* 2017;30(5):968-976. DOI 10.1111/jeb.13062.
- Gomendio M., Malo A.F., Garde J., Roldan E.R. Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction.* 2007;134(1):19-29. DOI 10.1530/rep-07-0143.
- Guo X., Huang Y., Qi Y., Liu Z., Ma Y., Shao Y., Jiang S., Sun Z., Ruan Q. Human cytomegalovirus miR-UL36-5p inhibits apoptosis via downregulation of adenine nucleotide translocator 3 in cultured cells. *Arch. Virol.* 2015;160(10):2483-2490. DOI 10.1007/s00705-015-2498-8.
- Hakizimana J.N., Yona C., Kamana O., Nauwynck H., Misinzo G. African swine fever virus circulation between Tanzania and neighboring countries: a systematic review and meta-analysis. *Viruses.* 2021;13(2):306. DOI 10.3390/v13020306.
- Hedrick P. Genetic future for Florida panthers. *Science.* 2010;330(6012):1744. DOI 10.1126/science.330.6012.1744-a.
- Hedrick P.W. Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conserv. Biol.* 1995;9(5):996-1007. DOI 10.1046/j.1523-1739.1995.9050988.x-11.
- Hekman J.P., Johnson J.L., Edwards W., Vladimirova A.V., Gulevich R.G., Ford A.L., Kharlamova A.V., Herbeck Y., Acland G.M., Raetzman L.T., Trut L.N., Kukekova A.V. Anterior pituitary transcriptome suggests differences in ACTH release in tame and aggressive foxes. *G3 (Bethesda)*. 2018;8(3):859-873. DOI 10.1534/g3.117.300508.
- Hernandez-Aguilera A., Fibla M., Cabre N., Luciano-Mateo F., Camps J., Fernandez-Arroyo S., Martin-Paredero V., Menendez J.A., Sirvent J.J., Joven J. Chemokine (C-C motif) ligand 2 and coronary artery disease: tissue expression of functional and atypical receptors. *Cytokine.* 2020;126:154923. DOI 10.1016/j.cyto.2019.154923.
- Ivanski F., de Oliveira V.M., de Oliveira I.M., de Araújo Ramos A.T., de Oliveira Tonete S.T., de Oliveira Hykavei G., Bargi-Souza P., Schiessel D.L., Martino-Andrade A.J., Romano M.A., Marino Romano R. Prepubertal acrylamide exposure causes dose-response decreases in spermatid production and functionality with modulation of genes involved in the spermatogenesis in rats. *Toxicology.* 2020;436:152428. DOI 10.1016/j.tox.2020.152428.
- Jan S.Z., Jongejan A., Korver C.M., van Daalen S.K.M., van Pelt A.M.M., Repping S., Hamer G. Distinct prophase arrest mechanisms in human male meiosis. *Development.* 2018;145(16):dev160614. DOI 10.1242/dev.160614.

- Jorgensen J.O.L., Juul A. Therapy of endocrine disease: growth hormone replacement therapy in adults: 30 years of personal clinical experience. *Eur. J. Endocrinol.* 2018;179(1):R47-R56. DOI 10.1530/EJE-18-0306.
- Klimova N.V., Oshchepkova E., Chadaeva I., Sharypova E., Ponomarenko P., Drachkova I., Rasskazov D., Oshchepkov D., Ponomarenko M., Savinkova L., Kolchanov N.A., Kozlov V. Disruptive selection of human immunostimulatory and immunosuppressive genes both provokes and prevents rheumatoid arthritis, respectively, as a self-domestication syndrome. *Front. Genet.* 2021;12:610774. DOI 10.3389/fgene.2021.610774.
- Kubota K., Cui W., Dhakal P., Wolfe M.W., Rumi M.A., Vivian J.L., Roby K.F., Soares M.J. Rethinking progesterone regulation of female reproductive cyclicality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113(15):4212-4217. DOI 10.1073/pnas.1601825113.
- Lay A.J., Liang Z., Rosen E.D., Castellino F.J. Mice with a severe deficiency in protein C display prothrombotic and proinflammatory phenotypes and compromised maternal reproductive capabilities. *J. Clin. Invest.* 2005;115(6):1552-1561. DOI 10.1172/jci24030.
- Long K., Mao K., Che T., Zhang J., Qiu W., Wang Y., Tang Q., Ma J., Li M., Li X. Transcriptome differences in frontal cortex between wild boar and domesticated pig. *Anim. Sci. J.* 2018;89(6):848-857. DOI 10.1111/asj.12999.
- Lu Z. PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature. *Database (Oxford).* 2011;2011:baq036. DOI 10.1093/database/baq036.
- Manohar M., Khan H., Sirohi V.K., Das V., Agarwal A., Pandey A., Siddiqui W.A., Dwivedi A. Alteration in endometrial proteins during early- and mid-secretory phases of the cycle in women with unexplained infertility. *PLoS One.* 2014;9(11):e111687. DOI 10.1371/journal.pone.0111687.
- Marsh C.A., Auchus R.J. Fertility in patients with genetic deficiencies of cytochrome P450c17 (CYP17A1): combined 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency and isolated 17,20-lyase deficiency. *Fertil. Steril.* 2014;101(2):317-322. DOI 10.1016/j.fertnstert.2013.11.011.
- Matriciano F., Tueting P., Dalal I., Kadriu B., Grayson D.R., Davis J.M., Nicoletti F., Guidotti A. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology.* 2013;68:184-194. DOI 10.1016/j.neuropharm.2012.04.013.
- Michon P., Woolley L., Wood E.M., Kastens W., Zimmerman P.A., Adams J.H. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. *FEBS Lett.* 2001;495(1-2):111-114. DOI 10.1016/S0014-5793(01)02370-5.
- Mithani S.K., Smith I.M., Califano J.A. Use of integrative epigenetic and cytogenetic analyses to identify novel tumor-suppressor genes in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2011;21(4):298-307. DOI 10.1097/CMR.0b013e328344a003.
- Mogno I., Vallania F., Mitra R.D., Cohen B.A. TATA is a modular component of synthetic promoters. *Genome Res.* 2010;20(10):1391-1397. DOI 10.1101/gr.106732.110.
- Morand S., McIntyre K.M., Baylis M. Domesticated animals and human infectious diseases of zoonotic origins: domestication time matters. *Infect. Genet. Evol.* 2014;24:76-81. DOI 10.1016/j.meegid.2014.02.013.
- Morozova O.V., Alekseeva A.E., Sashina T.A., Brusnigina N.F., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Zverev V.V., Novikova N.A. Phylogenetics of G4P[8] and G2P[4] strains of rotavirus A isolated in Russia in 2017 based on full-genome analyses. *Virus Genes.* 2020; 56(5):537-545. DOI 10.1007/s11262-020-01771-3.
- Nagaraja M.R., Gubbala S.P., Delphine Silvia C.R.W., Amanchy R. Molecular diagnostics of disorders of sexual development: an Indian survey and systems biology perspective. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2019;65(2):105-120. DOI 10.1080/19396368.2018.1549619.
- Nalls M.A., Wilson J.G., Patterson N.J., Tandon A., Zmuda J.M., Huntsman S., Garcia M., Hu D., Li R., Beamer B.A., Patel K.V., Akylbekova E.L., Files J.C., Hardy C.L., Buxbaum S.G., Taylor H.A., Reich D., Harris T.B., Ziv E. Admixture mapping of white cell count: genetic locus responsible for lower white blood cell count in the Health ABC and Jackson Heart studies. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82(1):81-87. DOI 10.1016/j.ajhg.2007.09.003.
- Nna V.U., Bakar A.B.A., Ahmad A., Umar U.Z., Suleiman J.B., Zakaria Z., Othman Z.A., Mohamed M. Malaysian propolis and metformin mitigate subfertility in streptozotocin-induced diabetic male rats by targeting steroidogenesis, testicular lactate transport, spermatogenesis and mating behaviour. *Andrology.* 2020;8(3):731-746. DOI 10.1111/andr.12739.
- Olkkonen J., Kouri V.P., Hynninen J., Kontinen Y.T., Mandelin J. Differentially expressed in chondrocytes 2 (DEC2) increases the expression of IL-1 β and is abundantly present in synovial membrane in rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145279. DOI 10.1371/journal.pone.0145279.
- Osadchuk L.V. Endocrine gonadal function in silver fox under domestication. *Scientific (Denmark).* 1992a;16(2):116-121.
- Osadchuk L.V. Some peculiarities in reproduction in silver fox males under domestication. *Scientific (Denmark).* 1992b;16(4):285-288.
- Osterfeld H., Ahrens R., Strait R., Finkelman F.D., Renaud J.C., Hogan S.P. Differential roles for the IL-9/IL-9 receptor alpha-chain pathway in systemic and oral antigen-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125(2):469-476.e2. DOI 10.1016/j.jaci.2009.09.054.
- Peng Y., Zhou L., Cao Y., Chen P., Chen Y., Zong D., Ouyang R. Relation between serum leptin levels, lipid profiles and neurocognitive deficits in Chinese OSAHS patients. *Int. J. Neurosci.* 2017;127(11): 981-987. DOI 10.1080/00207454.2017.1286654.
- Pianka E.R. Natural selection of optimal reproductive tactics. *Amer. Zool.* 1976;16(4):775-784.
- Plengpanich W., Le Goff W., Poolsuk S., Julia Z., Guerin M., Khovidhunkit W. CETP deficiency due to a novel mutation in the CETP gene promoter and its effect on cholesterol efflux and selective uptake into hepatocytes. *Atherosclerosis.* 2011;216:370-373. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.051.
- Ponomarenko M., Kleshchev M., Ponomarenko P., Chadaeva I., Sharypova E., Rasskazov D., Kolmykov S., Drachkova I., Vasiliev G., Gutorova N., Ignatieva E., Savinkova L., Bogomolov A., Osadchuk L., Osadchuk A., Oshchepkov D. Disruptive natural selection by male reproductive potential prevents underexpression of protein-coding genes on the human Y chromosome as a self-domestication syndrome. *BMC Genomics.* 2020;21(Suppl. 1):89. DOI 10.1186/s12863-020-00896-6.
- Ponomarenko P.M., Suslov V.V., Savinkova L.K., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A. A precise equilibrium equation for four steps of binding between TBP and TATA-box allows for the prediction of phenotypical expression upon mutation. *Biophysics (Mosk.).* 2010; 55(3):358-369. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20586319/>.
- Prasolova L.A., Gerbek Y.E., Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Konoshenko M.Yu., Kozhemyakina R.V., Oskina I.N., Plyusnina I.Z. The effects of prolonged selection for behavior on the stress response and activity of the reproductive system of male grey mice (*Rattus norvegicus*). *Russ. J. Genet.* 2014;50(8):846-852. DOI 10.1134/S1022795414080031.
- Pukazhenthil B.S., Neubauer K., Jewgenow K., Howard J., Wildt D.E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology.* 2006;66(1):112-121. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.03.020.
- Qian Y., Li L., Sun Z., Liu J., Yuan W., Wang Z. A multi-omics view of the complex mechanism of vascular calcification. *Biomed. Pharmacother.* 2021;135:111192. DOI 10.1016/j.biopha.2020.111192.
- Regan S.L.P., Knight P.G., Yovich J.L., Arfuso F., Dharmarajan A. Growth hormone during *in vitro* fertilization in older women modulates the density of receptors in granulosa cells, with improved pregnancy outcomes. *Fertil. Steril.* 2018;110(7):1298-1310. DOI 10.1016/j.fertnstert.2018.08.018.
- Robert N., Walzer C., Ruegg S.R., Kaczynsky P., Ganbaatar O., Stauffer C. Pathologic findings in reintroduced Przewalski's horses

- (*Equus caballus przewalskii*) in southwestern Mongolia. *J. Zoo Wildl. Med.* 2005;36(2):273-285. DOI 10.1638/03-035.1.
- Samet H. A top-down quadtree traversal algorithm. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 1985;7(1):94-98. DOI 10.1109/tpami.1985.4767622.
- Sasaki Y., Otsuka K., Arimochi H., Tsukumo S.I., Yasutomo K. Distinct roles of IL-1 β and IL-18 in NLR4-induced autoinflammation. *Front. Immunol.* 2020;11:591713. DOI 10.3389/fimmu.2020.591713.
- Sato D.X., Rafati N., Ring H., Younis S., Feng C., Blanco-Aguilar J.A., Rubin C.J., Villafuerte R., Hallbook F., Carneiro M., Andersson L. Brain transcriptomics of wild and domestic rabbits suggests that changes in dopamine signaling and ciliary function contributed to evolution of tameness. *Genome Biol. Evol.* 2020;12(10):1918-1928. DOI 10.1093/gbe/evaa158.
- Senol B.K., Zulfikar B. Clinical problems and surgical interventions in inherited factor VII deficiency. *Turk. Pediatri Ars.* 2020;55(2):184-190. DOI 10.14744/TurkPediatriArs.2020.79069.
- Silliman K., Tall A.R., Kretschmer N., Forte T.M. Unusual high-density lipoprotein subclass distribution during late pregnancy. *Metabolism.* 1993;42(12):1592-1599. DOI 10.1016/0026-0495(93)90156-i.
- Soilemetzidou E.S., de Bruin E., Eschke K., Azab W., Osterrieder N., Czirják G.A., Buuveibaatar B., Kaczynski P., Koopmans M., Walzer C., Greenwood A.D. Bearing the brunt: Mongolian khulan (*Equus hemionus hemionus*) are exposed to multiple influenza A strains. *Vet. Microbiol.* 2020;242:108605. DOI 10.1016/j.vetmic.2020.108605.
- Songsasen N., Converse S.J., Brown M. Reproduction and reproductive strategies relevant to management of whooping cranes *ex situ*. In: Biodiversity of the World: Conservation from Genes to Landscapes. San Diego, California: Academic Press, 2019;373-387. DOI 10.1016/B978-0-12-803555-9.00017-7.
- Sugiyama C., Yamamoto M., Kotani T., Kikkawa F., Murata Y., Hayaishi Y. Fertility and pregnancy-associated β -cell proliferation in mice deficient in proglucagon-derived peptides. *PLoS One.* 2012;7(8):e43745. DOI 10.1371/journal.pone.0043745.
- Sun G.L., Shen W., Wen J.F. Triosephosphate isomerase genes in two trophic modes of euglenoids (euglenophyceae) and their phylogenetic analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2008;55(3):170-177. DOI 10.1111/j.1550-7408.2008.00324.x.
- Sun S., Liu S., Luo J., Chen Z., Li C., Looor J.J., Cao Y. Repeated pregnant mare serum gonadotropin-mediated oestrous synchronization alters gene expression in the ovaries and reduces reproductive performance in dairy goats. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(6):873-881. DOI 10.1111/rda.13439.
- Sun Y., Liu S., Hu R., Zhou Q., Li X. Decreased placental IL9 and IL9R in preeclampsia impair trophoblast cell proliferation, invasion, and angiogenesis. *Hypertens. Pregnancy.* 2020;39(3):228-235. DOI 10.1080/10641955.2020.1754852.
- Takhviji V., Zibara K., Azarkeivan A., Mehrvar N., Mehrvar N., Mezginejad F., Khosravi A. Fertility and pregnancy in Iranian thalassemia patients: An update on transfusion complications. *Transfus. Med.* 2020;30(5):352-360. DOI 10.1111/tme.12707.
- Theofanopoulou C., Gastaldon S., O'Rourke T., Samuels B.D., Martins P.T., Delogu F., Alamri S., Boeckx C. Self-domestication in *Homo sapiens*: Insights from comparative genomics. *PLoS One.* 2017;12(10):e0185306. DOI 10.1371/journal.pone.0185306.
- Tian Y., Stamova B., Jickling G.C., Xu H., Liu D., Ander B.P., Bushnell C., Zhan X., Turner R.J., Davis R.R., Vero P., Pevco W.C., Hedayati N., Dawson D.L., Khoury J., Jauch E.C., Pancioli A., Broderick J.P., Sharp F.R. Y chromosome gene expression in the blood of male patients with ischemic stroke compared with male controls. *Genet. Med.* 2012;9(2):68-75.e3. DOI 10.1016/j.genm.2012.01.005.
- Vasiliev G., Chadaeva I., Rasskazov D., Ponomarenko P., Sharypova E., Drachkova I., Bogomolov A., Savinkova L., Ponomarenko M., Kolchanov N., Osadchuk A., Oshchepkov D., Osadchuk L. A bioinformatics model of human diseases on the basis of differentially expressed genes (of domestic versus wild animals) that are orthologs of human genes associated with reproductive-potential changes. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(5):2346. DOI 10.3390/ijms22052346.
- Velzing-Aarts F.V., van der Dijks F.P., Muskiet F.A., Duits A.J. The association of pre-eclampsia with the Duffy negative phenotype in women of West African descent. *BJOG.* 2002;109(4):453-455. DOI 10.1111/j.1471-0528.2002.01181.x.
- Wang F., Yu H., Huang S., Zheng L., Zheng P., Zhang S., Li S., Chen J. Jian-Pi-Yi-Shen regulates EPO and iron recycling protein expressions in anemic rats with chronic kidney disease: accumulation of hypoxia inducible factor-2 α via ERK signaling. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2020;2020:8894257. DOI 10.1155/2020/8894257.
- Wood M.A., Mukherjee P., Toocheck C.A., Walker W.H. Upstream stimulatory factor induces *Nr5a1* and *Shbg* gene expression during the onset of rat Sertoli cell differentiation. *Biol. Reprod.* 2011;85(5):965-976. DOI 10.1095/biolreprod.111.093013.
- Xi J.F., Wang X.Z., Zhang Y.S., Jia B., Li C.C., Wang X.H., Ying R.W. Sex control by Zfy siRNA in the dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2019;200:1-6. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.05.015.
- Xiao W., Feng L., Mou P., Miquelle D.G., Hebblewhite M., Goldberg J.F., Robinson H.S., Zhao X., Zhou B., Wang T., Ge J. Estimating abundance and density of Amur tigers along the Sino-Russian border. *Integr. Zool.* 2016;11(4):322-332. DOI 10.1111/1749-4877.12210.
- Yang X., Zhang H., Shang J., Liu G., Xia T., Zhao C., Sun G., Dou H. Comparative analysis of the blood transcriptomes between wolves and dogs. *Anim. Genet.* 2018;49(4):291-302. DOI 10.1111/age.12675.
- Yang Y., Adeola A.C., Xie H.B., Zhang Y.P. Genomic and transcriptomic analyses reveal selection of genes for puberty in Bama Xiang pigs. *Zool. Res.* 2018;39(6):424-430. DOI 10.24272/j.issn.2095-8137.2018.068.
- Yao X., Wang Z., Gao X., Li X., Yang H., Ei-Samahy M.A., Bao Y., Xiao S., Meng F., Wang F. Unconservative_15_2570409 suppresses progesterone receptor expression in the granulosa cells of Hu sheep. *Theriogenology.* 2020;157:303-313. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.08.011.
- Yu Q., Yang X., Zhang C., Zhang X., Wang C., Chen L., Liu X., Gu Y., He X., Hu L., Liu W.T., Li Y. AMPK activation by ozone therapy inhibits tissue factor-triggered intestinal ischemia and ameliorates chemotherapeutic enteritis. *FASEB J.* 2020;34(9):13005-13021. DOI 10.1096/fj.201902717rr.
- Zhang J., Nie C., Li X., Ning Z., Chen Y., Jia Y., Han J., Wang L., Lv X., Yang W., Qu L. Genome-wide population genetic analysis of commercial, indigenous, game, and wild chickens using 600K SNP microarray data. *Front. Genet.* 2020;11:543294. DOI 10.3389/fgene.2020.543294.
- Zhang Y., Katoh T.K., Finet C., Izumitani H.F., Toda M.J., Watabe H.A., Katoh T. Phylogeny and evolution of mycophagy in the *Zygothrica* genus group (Diptera: Drosophilidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2021;163:107257.

ORCID ID

M.P. Ponomarenko orcid.org/0000-0003-1663-318X
I.V. Chadaeva orcid.org/0000-0002-2724-5441
P.M. Ponomarenko orcid.org/0000-0003-2715-9612
A.G. Bogomolov orcid.org/0000-0003-4359-6089

D.Yu. Oshchepkov orcid.org/0000-0002-6097-5155
E.B. Sharypova orcid.org/0000-0002-5517-920X
V.V. Suslov orcid.org/0000-0002-1940-9389
A.V. Osadchuk orcid.org/0000-0002-4210-7354
L.V. Osadchuk orcid.org/0000-0002-7597-9204

Благодарности. Идея (ЛВО, АВО, МПП, ИВЧ) поддержана грантом РНФ № 19-15-00075. Анализ данных (ДЮО, ПМП, ЕБШ, АГБ) вели на вычислительных ресурсах ЦКП «Биоинформатика» за счет бюджетного проекта № FWNR-2022-0020. База знаний (ВВС) и координация работ (ЮГМ) поддержаны Федеральной научно-технической программой развития генетических технологий России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.10.2020. После доработки 20.08.2021. Принята к публикации 24.08.2021.

De novo assembly and analysis of the transcriptome of the Siberian wood frog *Rana amurensis*

D.N. Smirnov^{1,2}, S.V. Shekhovtsov^{3,4}✉, A.A. Shipova⁴, G.R. Gazizova⁵, E.I. Shagimardanova⁵, N.A. Bulakhova³, E.N. Meshcheryakova³, T.V. Poluboyarova⁴, E.E. Khrameeva¹, S.E. Peltek⁴, D.I. Berman³

¹ Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

² Ben-Gurion University of the Negev, Department of Life Sciences, Beer Sheva, Israel

³ Institute of the Biological Problems of the North of the Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, Russia

⁴ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁵ Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

✉ shekhovtsov@bionet.nsc.ru

Abstract. The Siberian wood frog *Rana amurensis* Boulenger, 1886 is the most hypoxia-tolerant amphibian. It can survive for several months in an almost complete absence of oxygen. Little is known about the mechanisms of this remarkable resilience, in part because studies of amphibian genomes are impeded by their large size. To make the Siberian wood frog more amenable for genetic analysis, we performed transcriptome sequencing and *de novo* assembly for the *R. amurensis* brain under hypoxia and normoxia, as well as for the normoxic heart. In order to build a *de novo* transcriptome assembly of *R. amurensis*, we utilized 125-bp paired-end reads obtained from the brain under normoxia and hypoxia conditions, and from the heart under normoxia. In the transcriptome assembled from about 100,000,000 reads, 81.5 % of transcripts were annotated as complete, 5.3 % as fragmented, and 13.2 % as missing. We detected 59,078 known transcripts that clustered into 22,251 genes; 11,482 of them were assigned to specific GO categories. Among them, we found 6696 genes involved in protein binding, 3531 genes involved in catalytic activity, and 576 genes associated with transporter activity. A search for genes encoding receptors of the most important neurotransmitters, which may participate in the response to hypoxia, resulted in a set of expressed receptors of dopamine, serotonin, GABA, glutamate, acetylcholine, and norepinephrine. Unexpectedly, no transcripts for histamine receptors were found. The data obtained in this study create a valuable resource for studying the mechanisms of hypoxia tolerance in the Siberian wood frog, as well as for amphibian studies in general.

Key words: Siberian wood frog; *Rana amurensis*; transcriptome; *de novo* assembly; neurotransmitters.

For citation: Smirnov D.N., Shekhovtsov S.V., Shipova A.A., Gazizova G.R., Shagimardanova E.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N., Poluboyarova T.V., Khrameeva E.E., Peltek S.E., Berman D.I. *De novo* assembly and analysis of the transcriptome of the Siberian wood frog *Rana amurensis*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):109-116. DOI 10.18699/VJGB-22-07

De novo сборка и анализ транскриптома сибирской лягушки *Rana amurensis*

Д.Н. Смирнов^{1,2}, С.В. Шеховцов^{3,4}✉, А.А. Шипова⁴, Г.Р. Газизова⁵, Е.И. Шагимарданова⁵, Н.А. Булахова³, Е.Н. Мещерякова³, Т.В. Полубоярова⁴, Е.Е. Храмеева¹, С.Е. Пельтек⁴, Д.И. Берман³

¹ Центр наук о жизни Сколковского института науки и технологий, Москва, Россия

² Университет им. Давида Бен-Гуриона в Негеве, Отделение наук о жизни, Беэр-Шева, Израиль

³ Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁵ Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, Казань, Россия

✉ shekhovtsov@bionet.nsc.ru

Аннотация. Сибирская лягушка *Rana amurensis* Boulenger, 1886 – наиболее устойчивый к гипоксии вид амфибий. Она может прожить несколько месяцев при почти полном отсутствии кислорода. О механизмах этой замечательной устойчивости мало что известно, отчасти потому, что исследования геномов амфибий затруднены из-за их большого размера. Чтобы сделать сибирскую лягушку более доступной для генетического анализа, мы провели секвенирование и сборку *de novo* транскриптома мозга *R. amurensis* в условиях гипоксии и нормоксии, а также для сердца – в нормоксии. Для сборки транскриптома *de novo* использовали парные прочтения длиной 125 п. н., полученные для мозга сибирской лягушки в нормоксии и гипоксии, а также для сердца контрольных особей. В транскриптоме, собранном из примерно 100 млн ридов, 81.5 % транскриптов были аннотированы как полные, 5.3 – как фрагментированные и 13.2 % – как отсутствующие. Мы обнаружили 59 078 известных транскриптов, которые были сгруппированы в 22 251 ген, 11 482 из них были отнесены к определенным категориям

Gene Ontology. Среди них – 6696 генов, участвующих в белок-белковом взаимодействии, 3531 ген, кодирующий белок с каталитической функцией, и 576 генов, связанных с транспортной активностью. Для большинства транскриптов были установлены тканеспецифичные различия в экспрессии. Известно, что нейротрансмиттеры играют важную роль в ответе на гипоксию различных организмов, устойчивых к недостатку кислорода. Поиск генов, кодирующих рецепторы важнейших нейромедиаторов, которые могут участвовать в реакции на гипоксию, выявил набор экспрессируемых рецепторов дофамина, серотонина, гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), глутамата, ацетилхолина и норадреналина. При этом не обнаружено транскриптов для рецепторов гистамина. Данные, полученные в нашей работе, представляют собой ценный ресурс для исследования механизмов толерантности к гипоксии у сибирской лягушки, а также для изучения амфибий в целом.
Ключевые слова: сибирская лягушка; *Rana amurensis*; транскриптом; сборка *de novo*; нейромедиаторы.

Introduction

Next-generation sequencing revolutionized the studies in the field of molecular genetics. In contrast to early whole-genome projects, this technology presents a quick and relatively cheap way to obtain genome-wide information for non-model organisms. However, for organisms with large genome sizes, such as amphibians, this is still a challenge due to many repeat sequences, frequent cases of polyploidy and high costs associated with the sequences of large genomes (Schatz et al., 2010). Among the family Ranidae, there are currently only three genome assemblies: *Rana temporaria*, *Glandirana rugosa*, and *Lithobates catesbeianus* (Hammond et al., 2017; Katsura et al., 2021; Streicher et al., 2021). Available transcriptomes are more numerous; however, they are still provided only for a limited number of members of the family Ranidae and do not always meet the high-quality standards of modern transcriptome assemblies.

Assembled transcriptomes would be useful resources for studies on the emergent model species. Among these species are the northern amphibians that adapted to extreme conditions of the northern Palearctic. These include highly freeze-tolerant *Rana sylvatica* LeConte, 1825 (Storey, 1984), *R. arvalis* Nilsson, 1842 (Berman et al., 2020), *Hyla japonica* Günther, 1859 (Berman et al., 2016a), and the urodela *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870 and *S. schrenkii* (Strauch, 1870) (Berman et al., 1984, 2010, 2016b), as well as the hypoxia-tolerant Siberian wood frog *Rana amurensis* Boulenger, 1886 (Berman et al., 2019). These species are intensely studied because they represent one of the most remarkable adaptations of vertebrates to extreme conditions and could give insights into ischemia treatment and organ transplantation. Earlier studies of freeze- and hypoxia tolerant amphibians were mostly aimed at their physiology and biochemistry, but studying genetic systems becomes more important (Bickler, Buck, 2007; Storey K.B., Storey J.M., 2017).

Amphibians in general are believed to be not particularly tolerant to hypoxia: adults of the different studied species can survive for a few hours to a few days even at low (near-zero) temperatures in water with low oxygen content (Bickler, Buck, 2007). However, the Siberian wood frog *R. amurensis* Boulenger, 1886 is unique among amphibians in its ability to survive almost complete anoxia for several months (Berman et al., 2019). This makes it a promising model object for studying hypoxia tolerance. Metabolomic patterns in its organs indicate dramatic changes in biochemical pathways under hypoxia (Shekhovtsov et al., 2020). However, these patterns are not easy to interpret, and this could be facilitated by the analysis of gene expression and gene networks. In order to create a resource for studying gene expression in the Siberian

wood frog, we performed sequencing, *de novo* assembly, and annotation of the transcriptome of this species.

Brain and heart are the most sensitive to hypoxia (Nilsson et al., 2015; Swenson, 2016), so we used transcripts from these organs for transcriptome construction. To test the assembled transcriptome, we also performed a search for neurotransmitter receptor genes: it was demonstrated (Nilsson et al., 1990, 1991) that neurotransmitters mediate hypoxia response in turtles, so we hypothesized that this might also be true for the Siberian wood frog.

Materials and methods

RNA extraction and sequencing. Specimens of the Siberian wood frog were collected in September 2019 near the Lesopilnoye village, Khabarovsk Krai (46° N, 134° E). We followed approved methods under appropriate permits issued by cognizant governmental agencies (No. 001/04-19). Frog handling, hypoxia exposure, and organ extraction were performed as described in S.V. Shekhovtsov et al. (2020): briefly, the frogs were distributed by 5–7 individuals into 10 L containers filled with water (oxygen level 7–8 mg/L) and acclimated to low temperatures: 2 days at 14–15 °C, for 4 days at 8, 4, and 2–3 °C. Acclimation was performed in a TSO-1/80 SPU thermostat (SKTB SPU, Russia) and in a WT-64/75 climatic test chamber (Weiss Umwelttechnik GmbH, Germany). Control animals were kept in open containers; those exposed to hypoxia, in closed airtight bottles. The dissolved oxygen content was measured daily by a HACH HQ30D Flexi digital single-channel device with a luminescent LDO101 sensor until it reached 0.2 mg/L. After 17 days in hypoxia, animals were slaughtered as quickly as possible, and the organs were extracted and immediately submerged in liquid nitrogen. RNA was extracted using commercial kits (Biolabmix, Russia) following the manufacturer's protocol.

The purity of total RNA was estimated on a NanoPhotometer (Implen, Germany). The quantity of total RNA was measured by fluorimeter Qubit 4.0 (ThermoFisher Scientific, USA). The quality of total RNA was evaluated using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA). Then, from 800–1000 ng of pure and good quality total RNA (RIN ≥ 7), polyA mRNA was isolated using NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs, USA).

cDNA libraries were prepared using NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) according to the manufacturer's protocol. The concentration of amplified libraries was estimated by fluorimeter Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific). Size selection of pooled libraries was performed on the BluePippin system (SAGE Science, USA) using 1.5 % agarose gel cassettes with

300–400 bp target size. The quality of libraries was verified on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) using DNA High Sensitivity Kit. Range of library fragment size was 200–1000 bp. The concentration of libraries was validated by qPCR using 2.5× EVA Green Mix (Synthol, Russia) and primers for Illumina adapters (Evrogen, Russia). Libraries were then sequenced on a HiSeq 2500 (Illumina, USA) with paired-end 125 bp reads.

Transcriptome assembly. RNA reads from *R. amurensis* brain and heart samples (brain+normoxia, brain+hypoxia, heart+normoxia, 3 samples in total) were used for *de novo* transcriptome assembly. The quality of raw reads was estimated with FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Adaptor trimming and read filtering were performed using fastp (Chen et al., 2018) with default parameters. The rCorrector tool (Song, Florea, 2015) was used for correcting the non-solid k-mers within reads and removing unfixable ones. Transcriptome assembly was performed on all samples via Trinity (Grabherr et al., 2011) with `--SS_lib_type FR` parameter for a stranded library. The basic assembly metrics were calculated using the ‘*TrinityStats.pl*’ script incorporated in Trinity. Redundant transcripts were identified and removed from the assembly via *CD-HIT* (Fu et al., 2012) with the following parameters: `-c 0.98 -p 1 -d 0 -b 3 -T 5 -M 2000`. Completeness of the assembled transcriptome was estimated using BUSCO (Simão et al., 2015) with the mode `-m transcriptome` and lineage ‘*tetrapoda_odb10*’ parameters.

Transcript quantification. The transcript abundance was estimated using the ‘*align_and_estimate_abundance.pl*’ script (`--est_method salmon`) included in Trinity. Both gene- and isoform-level abundance matrices for all samples were constructed with the ‘*abundance_estimates_to_matrix.pl*’ script. The comparison of samples based on their expression level and the subsequent visualization procedures were performed using the ‘*PtR*’ script as well as custom scripts.

Assembly annotation and candidate coding regions identification. We used a collection of scripts from TransDecoder (Grabherr et al., 2011) to identify the candidate coding regions. First, open reading frames (ORF) were retrieved from the assembly file. A set of the longest obtained ORFs were then queried against Swiss-Prot (Bairoch, Apweiler, 1999; The Uniprot Consortium, 2021) and Pfam (Mistry et al., 2021) databases to search for sequence similarity with known proteins and Pfam protein domains. To achieve better computational efficiency, we used hmmssearch v3.3.2 (Eddy, 2011) scripts instead of hmmscan for domain identification, and the homology search was done with Blast+ (Camacho et al., 2009). The output generated from the database searching step was then used for the prediction of coding regions using the *TransDecoder.Predict* script from TransDecoder and for transcriptome assembly annotation via the Trinotate (Bryant et al., 2017) pipeline.

Gene Ontology (GO) analysis. The Trinotate report obtained in the assembly annotation step was used to characterize the annotated genes according to their biological role and the occupied cell compartments. We counted the number of annotated genes per GO category for the cellular component (CC), biological process (BP), and molecular function (MF) sub-ontologies at level 2. Graphical representation was done

using an in-house R script. Annotated genes without assigned GO categories were classified according to the PFAM protein families they associated with.

Searching for neurotransmitter receptors. We extracted a set of genes encoding receptors of the main neurotransmitters (dopamine, serotonin, GABA, glutamate, acetylcholine, histamine, and norepinephrine) from the *Xenopus* genome database (Xenbase; <http://www.xenbase.org>). Xenbase was chosen over more closely related species due to its longer history and better annotation. For each annotated gene, the transcripts were taken for *Xenopus tropicalis*, or, if absent, for *X. laevis*. We performed a blastn search for this *Xenopus* transcript dataset in the assembled transcriptome (*Trinity_filtered.fasta*) with e -value $< 1e^{-5}$. Transcripts with > 70 % sequence similarity were included in the final dataset.

Results and discussion

De novo transcriptome assembly

In order to build a *de novo* transcriptome assembly of *R. amurensis*, we utilized 125 bp paired-end reads obtained from the brain under normoxia and hypoxia conditions (RABN and RABH samples, respectively) and from the heart under normoxia (RAHN sample).

After filtering out low-quality reads, a total of 98,948,825 reads from all three samples were used for the subsequent transcriptome assembling procedure. An initial assembly consisted of 610,890 Trinity ‘genes’ composed of 839,939 transcripts with an average contig length of 639 bp (or 481 bp based on the longest isoform per Trinity ‘gene’). In addition, we filtered out 56,044 redundant transcripts using CD-HIT. Once filtering was done, the final assembly was generated (Table 1).

Estimates using BUSCO demonstrated that 81.5 % of the transcripts were annotated as complete, 5.3 % as fragmented, and 13.2 % as missing.

Abundance quantification

For each RNA sample, we calculated the levels of transcript abundances using the resulting assembled transcriptome. The Salmon alignment rate varied from 87.9 to 91 % across all samples, which is an additional indicator of good quality of the final assembly. The majority of Trinity ‘genes’ turned out to be low-expressed, and only 20,251 out of 588,475 ‘genes’ had expression levels ≥ 10 TPM (transcripts per million) in at least one sample. The sum of gene expression counts per sample

Table 1. The statistics of the final Trinity assembly

Number of assembled transcripts	783,895
Number of ‘genes’	588,475
Median contig length	347/323*
Average contig	616,66/487,50*
Contig N50	857/533*
Total assembled bases	483,398,726
Percent GC	43,37

* Indicates values for statistics based on the longest isoform per Trinity ‘gene’.

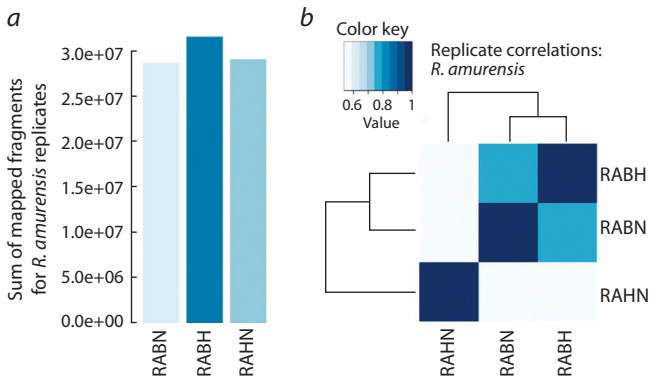


Fig. 1. Comparative analysis of expression of *R. amurensis* samples. *a* – barplot representing the distribution of the total number of mapped fragments across all samples; *b* – heatmap showing hierarchical clustering of samples based on their expression levels. In both panels, RABH corresponds to *R. amurensis* brain sample under hypoxia; RABN – *R. amurensis* brain sample under normoxia, and RAHN is a *R. amurensis* heart sample under normoxia.

varied from 28,587,718 to 31,477,299 with the largest value for the *R. amurensis* brain sample under hypoxia (Fig. 1, *a*).

Moreover, we observed tissue-specific differences in gene expression levels between brain and heart samples (see Fig. 1, *b*).

As was expected, we found that the brain transcriptomes correlated better with each other (Pearson’s $r = 0.770$) than with the heart transcriptome (Pearson’s $r = 0.538$ and 0.535 for RAHN correlation with RABN and RABH, respectively). In addition, we counted the number of genes with more than 2-fold expression change between each pair of samples (Fig. 2). For brain-brain transcriptome comparisons, the number of such genes was equal to 34,488, while for brain-heart comparisons, this number almost doubled (70,005 genes for RABN versus RAHN and 68,497 genes for RABH versus RAHN). Taken together, all these findings on gene and transcript quantification indicate the correctness of the transcriptome assembly.

Transcriptome assembly and annotation

Once the expression quantification step was done, we annotated the obtained transcripts to evaluate the number of biologically relevant ones. We first identified a total of 141,950 candidate coding regions using TransDecoder and obtained information about known protein homologs and protein domains. Using the Trinotate pipeline for functional annotation of transcripts, we then detected 59,078 known transcripts in our assembly that clustered into 22,251 genes. Finally, we explored the fraction of annotated genes with TPM > 0 that are common between replicates. We retrieved a total of

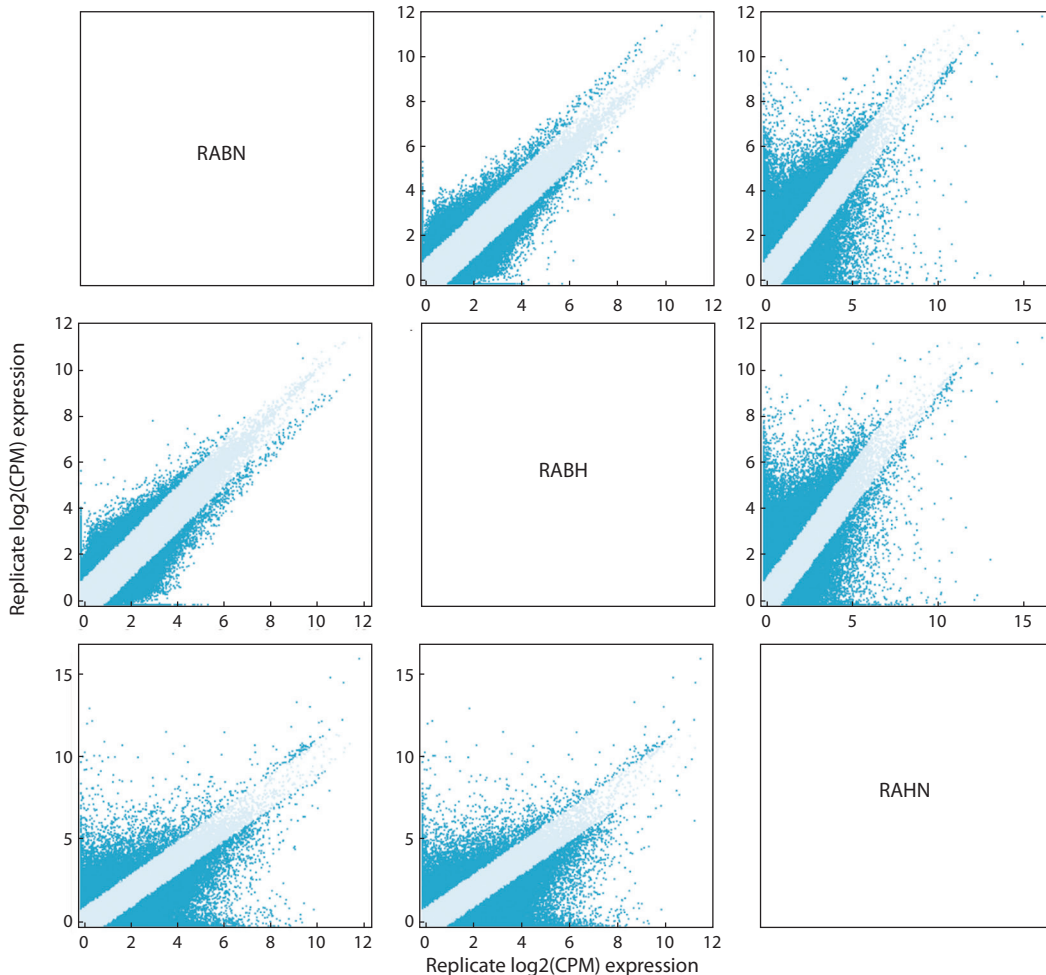


Fig. 2. Sample-to-sample scatter plots showing gene expression differences between *R. amurensis* samples. Circles corresponding to 2-fold changes are marked in blue.

18,229 genes with expression in all three replicates as well as 2680 and 448 genes expressed only in brain and heart samples, respectively (Fig. 3).

Gene Ontology analysis

During the annotation step, we identified a total of 11,482 genes for which corresponding GO categories were described. In particular, we found 6696 genes involved in binding (including 2988 genes associated with protein binding and 878 genes responsible for DNA binding), 3531 genes involved in catalytic activity, and 576 genes associated with transporter activity (Fig. 4).

For 10,769 annotated genes without assigned GO categories, we performed an additional analysis of their functional roles. Among them, we found several large functional gene groups, including 1969 genes associated with the RVT_1 (Reverse transcriptase) family, 1365 genes encoding zf-C2H2 (zinc finger) protein domains, and 455 genes belonging to the endonuclease/exonuclease/phosphatase family.

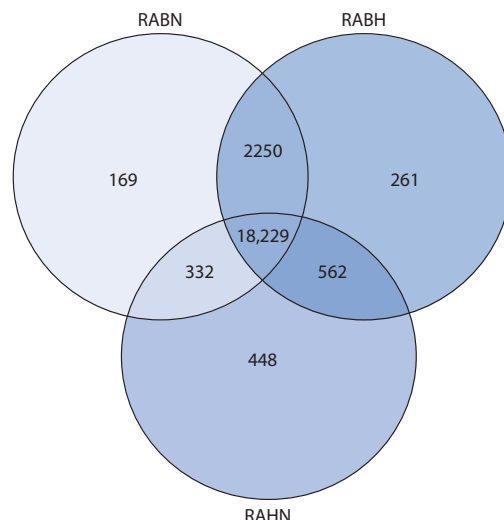


Fig. 3. Venn diagram showing the number of common and sample-specific expressed genes between *R. amurensis* samples.

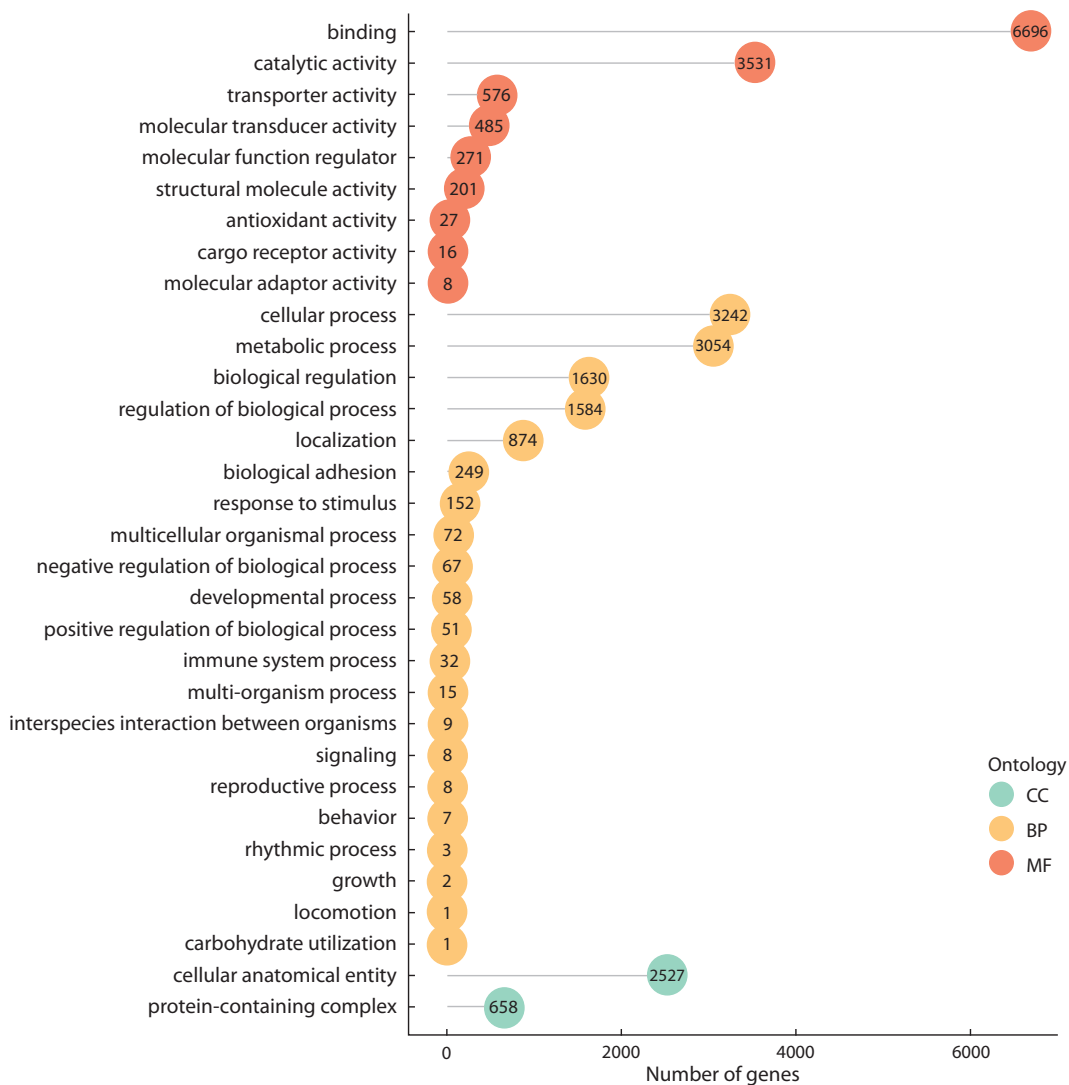


Fig. 4. Distribution of the gene number per GO category in the transcriptome of *R. amurensis*.

Red circles represent molecular function (MF) terms, yellow circles represent biological process (BP) terms, and light green circles show terms related to the cellular component (CC) sub-ontology.

Table 2. Transcripts of neurotransmitter receptors detected in *R. amurensis* transcriptome

Receptors	% id.	Receptors	% id.	Receptors	% id.
Dopamine receptors		GABA receptors		Glutamate receptors	
Dopamine receptor d1	83.9	GABAA receptor α 1	84.4	NMDA receptor 2B	84.8
Dopamine receptor d1c	78.5	GABAA receptor α 2	85.5	NMDA receptor 2C	82.6
Dopamine receptor d2	83.2	GABAA receptor α 3	79.3	NMDA receptor 2D	83.2
Dopamine receptor d4	80.9	GABAA receptor α 5	76.1	NMDA receptor 3A	78.8
Dopamine receptor d5	82.2	GABAA receptor β 1	82.1	Delta receptor GRID1	82.3
Acetylcholine receptors		GABAA receptor γ 3		Delta receptor GRID2	
Muscarinic receptor 5	81.8	GABAA receptor rho1	81.9	Metabotropic receptor 1	80.4
Nicotinic receptor α 5	91.7	GABAA receptor rho3	83.1	Metabotropic receptor 3	81.1
Nicotinic receptor α 6	85.6	Glutamate receptors		Metabotropic receptor 4	81.4
Nicotinic receptor β 2	82.4	AMPA receptor 1/2	82.9	Metabotropic receptor 5	81.0
Nicotinic receptor β 3	83.2	AMPA receptor 3	86.0	Metabotropic receptor 7	80.0
Serotonin receptors		AMPA receptor 4	84.7	Metabotropic receptor 8	85.1
Serotonin receptor 1A	80.1	Kainate receptor 1	83.7	Norepinephrine receptors	
Serotonin receptor 1B	82.7	Kainate receptor 2	86.5	Adrenoreceptor α 2a	78.35
Serotonin receptor 4	82.5	Kainate receptor 4	80.8	Adrenoreceptor α 2b	80.00
Serotonin receptor 6	80.6	Kainate receptor 5	82.0	Adrenoreceptor α 2c	78.46
		NMDA receptor 1	81.0	Adrenoreceptor α 2d	83.97
		NMDA receptor 2A	81.5	Adrenoreceptor β 2	77.00

Note. % id. shows the percentage of identity to the respective *X. tropicalis* transcript along the alignable part.

Neurotransmitter receptor genes

A search for neurotransmitter receptors recovered a total of 47 transcripts belonging to six classes (Table 2). All detected transcripts could be unambiguously attributed to particular classes of receptors. Unexpectedly, we failed to detect any transcripts of histamine receptors. Our blastn and blastx search for these genes in the available ranid genome and transcriptome data resulted in no expressed histamine receptors in any sequenced cDNA data from any tissue. However, the genome of *R. temporaria* was found to contain the full gene set of histamine receptor genes. This may indicate that the histamine pathway has very limited expression in the family Ranidae.

The information on neurotransmitters is of special interest because they are known to be involved in hypoxia response in various organisms. G.E. Nilsson et al. (1990, 1991) found that levels of different neurotransmitters in the brain and other organs changed significantly upon exposure to hypoxia: the concentrations of GABA increased, and those of glutamate decreased in the crucian carp and the red-eared slider turtle, but not in the hypoxia-intolerant species. The authors also found that the levels of serotonin, dopamine, and norepinephrine remained unchanged, although their synthesis is oxygen-dependent. This response probably involves not just an upregulation of neurotransmitter synthesis, but the rearrangement of the whole pathway, and thus the obtained transcriptome data will be of particular use to elucidate this issue.

Conclusion

In recent years, transcriptome analysis is increasingly used for amphibians, e. g., to study the effects of pathogens (Price et al., 2015; Xu et al., 2017), insecticides (Ma et al., 2018), or the changes occurring during metamorphosis (Birol et al., 2015; Zhao et al., 2016). Many of those studies combine data from different tissues to obtain a more or less comprehensive set of transcripts expressed in the most important organs (Yang et al., 2012; Qiao et al., 2013; Robertson, Cornman, 2014; Christenson et al., 2014). In this study, we sequenced and assembled the transcriptome of the Siberian frog *R. amurensis*. We also provided a quality assessment of the obtained assembly and characterized the functional roles of annotated transcripts. The available information on amphibian transcriptomes is still limited; therefore, our dataset contributes to the understanding of genome functioning and evolution of amphibians. Moreover, the majority of the previously published transcriptome assemblies for other species of the genus *Rana*, e. g., in I. Birol et al. (2015) and S.J. Price et al. (2015), are probably not the best option for studying the mechanisms of the hypoxia tolerance in these species. Because these studies do not focus on hypoxia and are not based on hypoxia samples, the assembled transcriptomes might miss or under-represent some transcripts specific for hypoxia. In contrast, our work creates a useful resource for studying the mechanisms of the tolerance of *R. amurensis* to hypoxia.

References

- Bairoch A., Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(1):49-54. DOI 10.1093/nar/27.1.49.
- Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N. The Siberian wood frog survives for months underwater without oxygen. *Sci. Rep.* 2019;9(1):13594. DOI 10.1038/s41598-018-31974-6.
- Berman D.I., Bulakhova N.A., Meshcheryakova E.N., Shekhovtsov S.V. Overwintering and cold tolerance in the moor frog (*Rana arvalis*) across its range. *Can. J. Zool.* 2020;98(11):705-714. DOI 10.1139/cjz-2019-0179.
- Berman D.I., Leirikh A.N., Meshcheryakova E.N. The Schrenck newt (*Salamandrella schrenckii*, Amphibia, Caudata, Hynobiidae) is the second amphibian that withstands extremely low temperatures. *Dokl. Biol. Sci.* 2010;431(1):131-134. DOI 10.1134/S0012496610020171.
- Berman D.I., Leirikh A.N., Mikhailova E.I. Winter hibernation of the Siberian salamander *Hynobius keyserlingi*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 1984;3(1-2):323-327. (in Russian)
- Berman D.I., Meshcheryakova E.N., Bulakhova N.A. The Japanese tree frog (*Hyla japonica*), one of the most cold-resistant species of amphibians. *Dokl. Biol. Sci.* 2016;471(1):276-279. DOI 10.1134/S0012496616060065.
- Berman D.I., Meshcheryakova E.N., Bulakhova N.A. Extreme negative temperatures and body mass loss in the Siberian salamander (*Salamandrella keyserlingii*, Amphibia, Hynobiidae). *Dokl. Biol. Sci.* 2016b;468(1):137-141. DOI 10.1134/S001249661603011X.
- Bickler P.E., Buck L.T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: Life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.* 2007;69(1):145-170. DOI 10.1146/annurev.physiol.69.031905.162529.
- Biról I., Behszaz B., Hammond S.A., Kucuk E., Veldhoen N., Helbing C.C. De novo transcriptome assemblies of *Rana (Lithobates) catesbeiana* and *Xenopus laevis* tadpole livers for comparative genomics without reference genomes. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130720. DOI 10.1371/journal.pone.0130720.
- Bryant D.M., Johnson K., DiTommaso T., Tickle T., Couger M.B., Payzin-Dogru D., Lee T.J., Leigh N.D., Kuo T.-H., Davis F.G., Bateman J. A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Rep.* 2017;18(3):762-776. DOI 10.1016/j.celrep.2016.12.063.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10(1):421. DOI 10.1186/1471-2105-10-421.
- Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;34(17):i884-i890. DOI 10.1093/bioinformatics/bty560.
- Christenson M.K., Trease A.J., Potluri L.P., Jezewski A.J., Davis V.M., Knight L.A., Kolok A.S., Davis P.H. De novo assembly and analysis of the northern leopard frog *Rana pipiens* transcriptome. *J. Genomics.* 2014;2:141-149. DOI 10.7150/jgen.9760.
- Eddy S.R. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput. Biol.* 2011;7(10):e1002195. DOI 10.1371/journal.pcbi.1002195.
- Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics.* 2012;28(23):3150-3152. DOI 10.1093/bioinformatics/bts565.
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(7):644. DOI 10.1038/nbt.1883.
- Hammond S.A., Warren R.L., Vandervalk B.P., Kucuk E., Khan H., Gibb E.A., Pandoh P., Kirk H., Zhao Y., Jones M., Mungall A.J., Coope R., Pleasance S., Moore R.A., Holt R.A., Round J.M., Ohora S., Walle B.V., Veldhoen N., Helbing C.C., Biról I. The North American bullfrog draft genome provides insight into hormonal regulation of long noncoding RNA. *Nat. Commun.* 2017;8:1433. DOI 10.1038/s41467-017-01316-7.
- Katsura Y., Ikemura T., Kajitani R., Toyoda A., Itoh T., Ogata M., Miura I., Wada K., Wada Y., Satta Y. Comparative genomics of *Glandirana rugosa* using unsupervised AI reveals a high CG frequency. *Life Sci. Alliance.* 2021;4(5):e202000905. DOI 10.26508/lsa.202000905.
- Ma Y., Li B., Ke Y., Zhang Y., Zhang Y. Transcriptome analysis of *Rana chensinensis* liver under trichlorfon stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018;147:487-493. DOI 10.1016/j.ecoenv.2017.09.016.
- Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G.A., Sonnhammer E.L.L., Tosatto S.C.E., Paladin L., Raj S., Richardson L.J., Finn R.D., Bateman A. Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D412-D419. DOI 10.1093/nar/gkaa913.
- Nilsson G.E. Long-term anoxia in crucian carp: changes in the levels of amino acid and monoamine neurotransmitters in the brain, catecholamines in chromaffin tissue, and liver glycogen. *J. Exp. Biol.* 1990;150(1):295-320. DOI 10.1242/jeb.150.1.295.
- Nilsson G.E., Lutz P.L., Jackson T.L. Neurotransmitters and anoxic survival of the brain: a comparison of anoxia-tolerant and anoxia-intolerant vertebrates. *Physiol. Zool.* 1991;64(3):638-652. DOI 10.1086/physzool.64.3.30158198.
- Nilsson G.E., Vaage J., Stensløkken K.O. Oxygen- and temperature-dependent expression of survival protein kinases in crucian carp (*Carassius carassius*) heart and brain. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2015;308(1):R50-R61. DOI 10.1152/ajpregu.00094.2014.
- Price S.J., Garner T.W.J., Balloux F., Ruis C., Paszkiewicz K.H., Moore K., Griffiths A.G. A de novo assembly of the common frog (*Rana temporaria*) transcriptome and comparison of transcription following exposure to *Ranavirus* and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130500. DOI 10.1371/journal.pone.0130500.
- Qiao L., Yang W., Fu J., Song Z. Transcriptome profile of the green odorous frog (*Odorrana margaretae*). *PLoS One.* 2013;8(9):e75211. DOI 10.1371/journal.pone.0075211.
- Robertson L.S., Comman R.S. Transcriptome resources for the frogs *Lithobates clamitans* and *Pseudacris regilla*, emphasizing antimicrobial peptides and conserved loci for phylogenetics. *Mol. Ecol. Resour.* 2014;14(1):178-183. DOI 10.1111/1755-0998.12164.
- Schatz M.C., Delcher A.L., Salzberg S.L. Assembly of large genomes using second-generation sequencing. *Genome Res.* 2010;20(9):1165-1173. DOI 10.1101/gr.101360.109.
- Shekhovtsov S.V., Bulakhova N.A., Tsentlovich Y.P., Zelentsova E.A., Yanshola L.V., Meshcheryakova E.N., Berman D.I. Metabolic response of the Siberian wood frog *Rana amurensis* to extreme hypoxia. *Sci. Rep.* 2020;10(1):14604. DOI 10.1038/s41598-020-71616-4.
- Simão F.A., Waterhouse R.M., Ioannidis P., Kriventseva E.V., Zdobnov E.M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics.* 2015;31(19):3210-3212. DOI 10.1093/bioinformatics/btv351.
- Song L., Florea L. Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *GigaScience.* 2015;4(1):48. DOI 10.1186/s13742-015-0089-y.
- Storey K.B. Freeze tolerance in the frog, *Rana sylvatica*. *Experientia.* 1984;40(11):1261-1262. DOI 10.1007/BF01946664.
- Storey K.B., Storey J.M. Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. *Physiol. Rev.* 2017;97(2):623-665. DOI 10.1152/physrev.00016.2016.
- Streicher J.W. Wellcome Sanger Institute Tree of Life programme, Wellcome Sanger Institute Scientific Operations (Mead D., Saccheri I., Yung C.J., Lohse K., Lohse C., Ashmole P., Smith M., Corton C., Oliver K., Skelton J., Betteridge E., Quail M.A., Dolucan J., McCarthy S.A., Howe K., Wood J., Torrance J., Tracey A., Whiteford S., Challis R., Durbin R., Blaxter M.). The genome sequence of

- the common frog, *Rana temporaria* Linnaeus 1758. *Wellcome Open Res.* 2021;6:286. DOI 10.12688/wellcomeopenres.17296.1.
- Swenson E.R. Hypoxia and its acid-base consequences: from mountains to malignancy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016;903:301-323. DOI 10.1007/978-1-4899-7678-9_21. PMID: 27343105.
- The Uniprot Consortium. UniProt: the universal protein knowledge-base in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D480-D489. DOI 10.1093/nar/gkaa1100.
- Xu Y.G., Chai L.H., Shi W., Wang D.D., Zhang J.Y., Xiao X.H. Transcriptome profiling and digital gene expression analysis of the skin of Dybowski's frog (*Rana dybowskii*) exposed to *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017;101(14):5799-5808. DOI 10.1007/s00253-017-8385-3.
- Yang W., Qi Y., Bi K., Fu J. Toward understanding the genetic basis of adaptation to high-elevation life in poikilothermic species: a comparative transcriptomic analysis of two ranid frogs, *Rana chensinensis* and *R. kukunoris*. *BMC Genomics.* 2012;13:588. DOI 10.1186/1471-2164-13-588.
- Zhao L., Liu L., Wang S., Wang H., Jiang J. Transcriptome profiles of metamorphosis in the ornamented pygmy frog *Microhyla fissipes* clarify the functions of thyroid hormone receptors in metamorphosis. *Sci. Rep.* 2016;6:27310. DOI 10.1038/srep27310.

ORCID ID

D.N. Smirnov orcid.org/0000-0002-9842-8181
S.V. Shekhovtsov orcid.org/0000-0001-5604-5601
A.A. Shipova orcid.org/0000-0001-7167-4481
G.R. Gazizova orcid.org/0000-0003-4978-8495
E.I. Shagimardanova orcid.org/0000-0003-2339-261X

D.I. Berman orcid.org/0000-0002-2137-1324
N.A. Bulakhova orcid.org/0000-0002-3000-6476
E.N. Meshcheryakova orcid.org/0000-0001-8089-4734
T.V. Poluboyarova orcid.org/0000-0002-5652-0553
E.E. Khrameeva orcid.org/0000-0001-6188-9139
S.E. Peltek orcid.org/0000-0002-3524-0456

Data availability. Raw sequencing reads and transcriptome assembly are available through NCBI BioSample (accession number PRJNA774040). The datasets described in this study are provided at GitHub (https://github.com/Khrameeva-Lab/Rana_amurensis_transcriptome_2021), as well as at <http://arcuda.skoltech.ru/~d.smirnov/Frogs/>

Acknowledgements. This study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 21-74-20050.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received August 10, 2021. Revised November 2, 2021. Accepted November 2, 2021.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, PubMed Central, Ebsco, DOAJ, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

.....
Подписано в печать 21.02.2022. Выход в свет 28.02.2022. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 13.48.

Уч.-изд. л. 15.7. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.) Заказ № 128. Цена свободная.

.....
Отпечатано в Сибирском отделении РАН, Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

