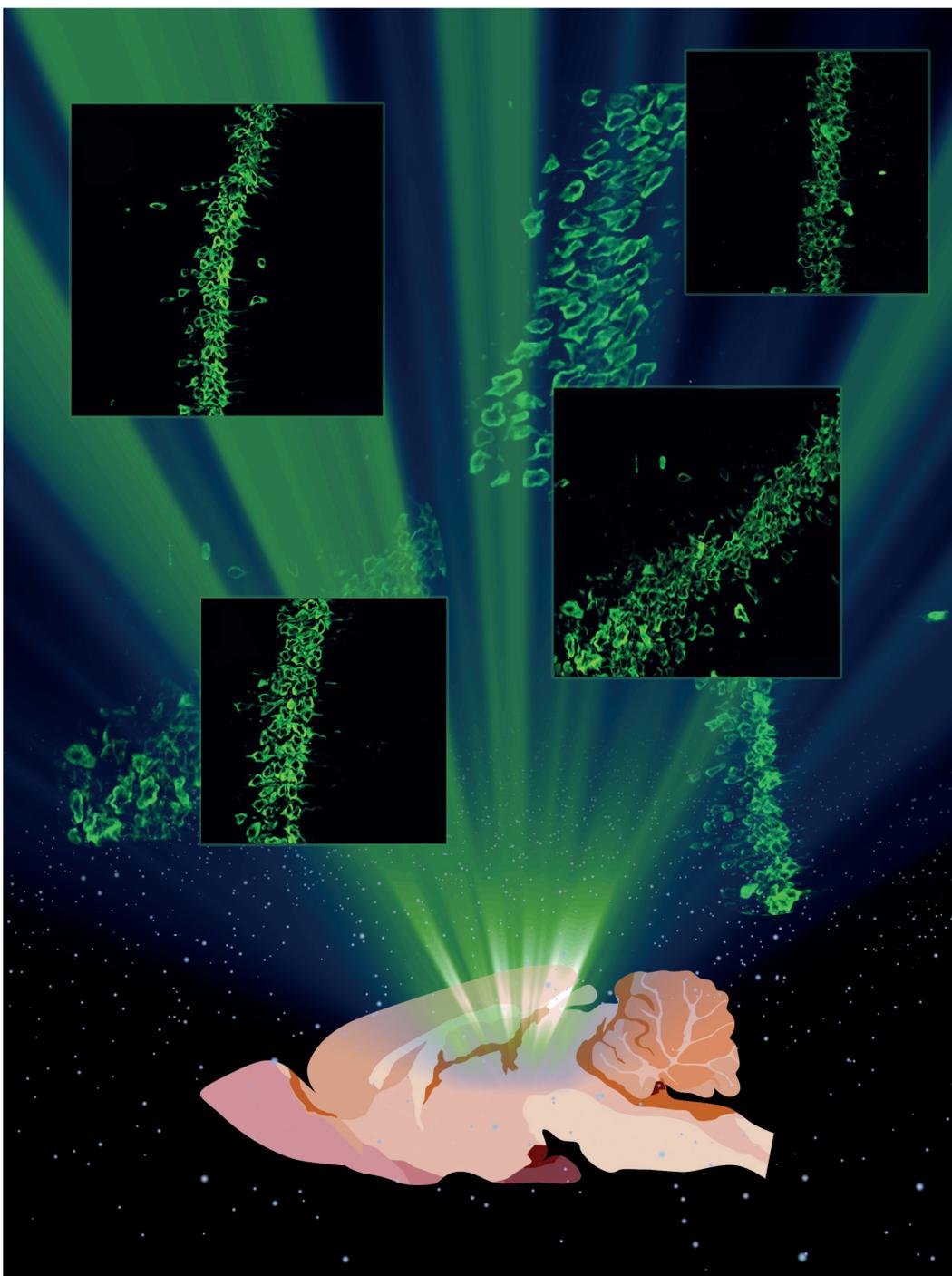


ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2022 • 26 • 4



Молекулярная биология / Генетика и селекция растений / Генетика животных /
Биотехнология микроорганизмов / Тест-системы и вакцинопрофилактика

vavilov.ejpub.ru/
biomet.nsc.ru/vogjis
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-22-40

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 – академик 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 – академик 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-22-40

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, Full Member of the Russian Academy of Sciences, 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),
RussiaD.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.), BelarusS.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
RussiaV.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
RussiaI.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),
RussiaN.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 биология

- 341 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Характеристика деметилирующей ДНК-гликозилазы ROS1 из *Nicotiana tabacum* L. Д.В. Петрова, Н.В. Пермякова, И.Р. Грин, Д.О. Жарков

Генетика и селекция растений

- 349 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изучение генетического полиморфизма российских сортов рапса и сурепицы с использованием SSR- и SRAP-маркеров. И.А. Клименко, В.Т. Воловик, А.А. Антонов, В.А. Душкин, А.О. Шамустакимова, Ю.М. Мавлютов

- 359 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Идентификация гена, кодирующего альбумин семян SCA, в геноме гороха (*Pisum* L.). А.В. Мглинец, В.С. Богданова, О.Э. Костерин (на англ. языке)

Генетика животных

- 365 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Плотность нейронов в коре головного мозга и гиппокампе мышей линии C1snt2-KO – модели расстройств аутистического спектра. И.Н. Рожкова, С.В. Окотруб, Е.Ю. Брусенцев, Е.Е. Ульданова, Э.А. Чуйко, Т.В. Липина, Т.Г. Амстиславская, С.Я. Амстиславский

- 371 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Наследственная предрасположенность водяных полевок (*Arvicola amphibius* L.) к судорожным припадкам в ответ на хэндлинг и ее связь с продолжительностью жизни. Г.Г. Назарова, Л.П. Проскурняк

378

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Платформа GWAS-MAPlovis для хранения и анализа результатов полногеномных ассоциативных исследований овец. А.В. Кириченко, А.С. Злобин, Т.И. Шашкова, Н.А. Волкова, Б.С. Иолчиев, В.А. Багиров, П.М. Бородин, Л.С. Карссен, Я.А. Цепилов, Ю.С. Аульченко

Биотехнология микроорганизмов

- 385 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Таксономическая структура бактериальных сообществ в хлебных заквасках спонтанного брожения. В.К. Хлесткин, М.Н. Локачук, О.А. Савкина, Л.И. Кузнецова, Е.Н. Павловская, О.И. Парахина

Тест-системы и вакцинопрофилактика

- 394 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Стабильность генома вакцинного штамма VACΔ6. Р.А. Максютков, С.Н. Якубицкий, И.В. Колосова, Т.В. Трегубчак, А.Н. Швалов, Е.В. Гаврилова, С.Н. Щелкунов

402

ОБЗОР

Создание трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусам: платформа изучения вирусного патогенеза и тестирования вакцин. Н.Р. Баттулин, О.Л. Серов

Molecular biology

- 341 ORIGINAL ARTICLE
Characterization of demethylating DNA glycosylase ROS1 from *Nicotiana tabacum* L. D.V. Petrova, N.V. Permyakova, I.R. Grin, D.O. Zharkov

Plant genetics and breeding

- 349 ORIGINAL ARTICLE
Investigation of genetic polymorphism of Russian rape and turnip rape varieties using SSR and SRAP markers. I.A. Klimenko, V.T. Volovik, A.A. Antonov, V.A. Dushkin, A.O. Shamustakimova, Yu.M. Mavlyutov
- 359 ORIGINAL ARTICLE
Identification of the gene coding for seed cotyledon albumin SCA in the pea (*Pisum* L.) genome. A.V. Mglinets, V.S. Bogdanova, O.E. Kosterin

Animal genetics

- 365 ORIGINAL ARTICLE
Neuronal density in the brain cortex and hippocampus in Clsnt2-KO mouse strain modeling autistic spectrum disorder. I.N. Rozhkova, S.V. Okotrub, E.Yu. Brusentsev, E.E. Uldanova, E.A. Chuyko, T.V. Lipina, T.G. Amstislavskaya, S.Ya. Amstislavsky
- 371 ORIGINAL ARTICLE
Hereditary predisposition of water voles (*Arvicola amphibius* L.) to seizures in response to handling. G.G. Nazarova, L.P. Proskurnyak

- 378 ORIGINAL ARTICLE
The GWAS-MAP|ovis platform for aggregation and analysis of genome-wide association study results in sheep. A.V. Kirichenko, A.S. Zlobin, T.I. Shashkova, N.A. Volkova, B.S. Iolchiev, V.A. Bagirov, P.M. Borodin, L.C. Karssen, Y.A. Tsepilov, Y.S. Aulchenko

Microbial biotechnology

- 385 ORIGINAL ARTICLE
Taxonomic structure of bacterial communities in sourdoughs of spontaneous fermentation. V.K. Khlestkin, M.N. Lockachuk, O.A. Savkina, L.I. Kuznetsova, E.N. Pavlovskaya, O.I. Parakhina

Test kits and preventive vaccination

- 394 ORIGINAL ARTICLE
Genome stability of the vaccine strain VACΔ6. R.A. Maksyutov, S.N. Yakubitskiy, I.V. Kolosova, T.V. Tregubchak, A.N. Shvalov, E.V. Gavrilova, S.N. Shchelkunov
- 402 REVIEW
Creation of transgenic mice susceptible to coronaviruses: a platform for studying viral pathogenesis and testing vaccines. N.R. Battulin, O.L. Serov

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

Характеристика деметилирующей ДНК-гликозилазы ROS1 из *Nicotiana tabacum* L.

Д.В. Петрова¹, Н.В. Пермякова², И.Р. Грин¹, Д.О. Жарков^{1, 3} 

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

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 dzharkov@niboch.nsc.ru

Аннотация. Один из главных механизмов эпигенетической регуляции у высших эукариот основан на метилировании цитозина по положению C5 с образованием 5-метилцитозина (mC), который далее узнается регуляторными белками. У млекопитающих метилирование преимущественно протекает в динуклеотидах CG, тогда как у растений его мишенью служат последовательности CG, CHG и CHH (H – любое основание, кроме G). Корректное поддержание статуса метилирования ДНК требует баланса процессов метилирования, пассивного и активного деметилирования. В то время как у млекопитающих активное деметилирование происходит за счет направленного регулируемого повреждения mC в ДНК с последующим действием ферментов репарации, у растений функции деметилирования выполняют специализированные ДНК-гликозилазы, гидролизующие N-гликозидную связь mC-нуклеотидов. Геном модельного растения *Arabidopsis thaliana* кодирует четыре паралогичных белка, два из которых – DEMETER (DME) и REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) – обладают 5-метилцитозин-ДНК-гликозилазной активностью и необходимы для регуляции развития, ответа на инфекции и абиотический стресс и сайленсинга трансгенов и мобильных элементов. Гомологи DME и ROS1 присутствуют во всех группах растений, однако за пределами *A. thaliana* исследованы крайне слабо. В статье приведены результаты изучения свойств рекомбинантного фрагмента белка ROS1 из *Nicotiana tabacum* (NtROS1), содержащего основные структурные домены, необходимые для каталитической активности. Методами гомологичного моделирования была построена структурная модель NtROS1, в которой выявлена укладка, характерная для ДНК-гликозилаз структурного суперсемейства «спираль–шпилька–спираль». Рекомбинантный белок NtROS1 был способен удалять из ДНК основания mC, причем активность фермента слабо зависела от статуса метилирования CG-динуклеотидов в противоположной цепи. С меньшей эффективностью фермент удалял из ДНК 5-гидроксиметилцитозин (hmC), проявляя минимальную активность при наличии mC в противоположной цепи. При экспрессии гена *NtROS1* в клетках человека в культуре происходило глобальное снижение уровня метилирования геномной ДНК. В целом можно сказать, что белок NtROS1 и другие гомологи DME и ROS1 представляют собой многообещающую основу для инженерии ферментов с целью анализа статуса эпигенетического метилирования и управления активностью генов.

Ключевые слова: эпигенетическое деметилирование; 5-метилцитозин; 5-гидроксиметилцитозин; ДНК-гликозилазы; REPRESSOR OF SILENCING 1; *Nicotiana tabacum*.

Для цитирования: Петрова Д.В., Пермякова Н.В., Грин И.Р., Жарков Д.О. Характеристика деметилирующей ДНК-гликозилазы ROS1 из *Nicotiana tabacum* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):341-348. DOI 10.18699/VJGB-22-41

Characterization of demethylating DNA glycosylase ROS1 from *Nicotiana tabacum* L.

D.V. Petrova¹, N.V. Permyakova², I.R. Grin¹, D.O. Zharkov^{1, 3} 

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

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 dzharkov@niboch.nsc.ru

Abstract. One of the main mechanisms of epigenetic regulation in higher eukaryotes is based on the methylation of cytosine at the C5 position with the formation of 5-methylcytosine (mC), which is further recognized by regulatory proteins. In mammals, methylation mainly occurs in CG dinucleotides, while in plants it targets CG, CHG, and CHH sequences (H is any base but G). Correct maintenance of the DNA methylation status is based on the balance of methylation, passive demethylation, and active demethylation. While in mammals active demethylation is based on targeted regulated damage to mC in DNA followed by the action of repair enzymes, demethylation in plants is performed by specialized DNA glycosylases that hydrolyze the N-glycosidic bond of mC nucleotides. The genome of the model plant *Arabidopsis thaliana* encodes four paralogous proteins, two of which, DEMETER (DME) and REPRESSOR

OF SILENCING 1 (ROS1), possess 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity and are necessary for the regulation of development, response to infections and abiotic stress and silencing of transgenes and mobile elements. Homologues of DME and ROS1 are present in all plant groups; however, outside *A. thaliana*, they are poorly studied. Here we report the properties of a recombinant fragment of the ROS1 protein from *Nicotiana tabacum* (NtROS1), which contains all main structural domains required for catalytic activity. Using homologous modeling, we have constructed a structural model of NtROS1, which revealed folding characteristic of DNA glycosylases of the helix-hairpin-helix structural superfamily. The recombinant NtROS1 protein was able to remove mC bases from DNA, and the enzyme activity was barely affected by the methylation status of CG dinucleotides in the opposite strand. The enzyme removed 5-hydroxymethylcytosine (hmC) from DNA with a lower efficiency, showing minimal activity in the presence of mC in the opposite strand. Expression of the NtROS1 gene in cultured human cells resulted in a global decrease in the level of genomic DNA methylation. In general, it can be said that the NtROS1 protein and other homologues of DME and ROS1 represent a promising scaffold for engineering enzymes to analyze the status of epigenetic methylation and to control gene activity.

Key words: epigenetic demethylation; 5-methylcytosine; 5-hydroxymethylcytosine; DNA glycosylases; REPRESSOR OF SILENCING 1; *Nicotiana tabacum*.

For citation: Petrova D.V., Permyakova N.V., Grin I.R., Zharkov D.O. Characterization of demethylating DNA glycosylase ROS1 from *Nicotiana tabacum* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):341-348. DOI 10.18699/VJGB-22-41

Введение

Метилирование ДНК представляет собой особый механизм контроля активности генов, который получил максимальное развитие у высших эукариот. Азотистое основание 5-метилцитозин (mC), образующееся в результате метилирования цитозина по положению C5, служит обратимой эпигенетической меткой, которая играет важную роль в регуляции транскрипции генов и защите генома от мобильных элементов. Метилирование ДНК характерно для широкого круга многоклеточных эукариот, однако значение и функции метилирования у этих организмов сильно различаются (Lee et al., 2010; Zemach, Zilberman, 2010). Например, у млекопитающих метилирование чаще всего происходит в CpG-динуклеотидах, в то время как у растений значительная доля mC приходится на тринуклеотиды CHG и CHN (где H – любое основание, кроме G). Влияние mC на активность генов главным образом опосредовано белками, содержащими метилсвязывающие домены, которые образуют комплексы с гистондеацетилазами или же сами обладают активностью гистон-специфичных метилтрансфераз, факторов ремоделирования хроматина и т. п., что ведет к конденсации хроматина и подавлению транскрипции (Ballestar, Wolffe, 2001; Baubec et al., 2013). Недавние исследования показали, что эпигенетическую роль в геноме млекопитающих играет также окисленное производное 5-метилцитозина – 5-гидроксиметилцитозин (hmC) (Branco et al., 2011). В отличие от mC, hmC обогащен в области промоторов и активно экспрессируемых генов и рассматривается как активирующий эпигенетический маркер (Pastor et al., 2011; Yu et al., 2012).

Корректное метилирование различных локусов ДНК в клетке крайне важно, поскольку от него зависит транскрипционная активность генов. Ошибки в процессе метилирования ДНК могут приводить к тяжелым последствиям. В частности, у человека глобальное деметилирование ДНК или гиперметилирование генов-онкосупрессоров служат маркерами онкозаболеваний. Поддержание статуса метилирования ДНК в клетках основано на балансе процессов метилирования и активного и пассивного деметилирования. Механизмы активного деметилирования геномной ДНК высших эукариот были выяснены лишь в

последнее десятилетие. У млекопитающих активное деметилирование инициируется регулируемым повреждением mC, которое может происходить двумя способами: либо с дезаминированием mC до T ферментами AID/APOBEC, либо с окислением mC до hmC и дальнейших производных (5-формилцитозина и 5-карбокситозина) диоксигеназами семейства TET (Pastor et al., 2013; Bochtler et al., 2017; Wu, Zhang, 2017). Модифицированные основания далее воспринимаются клеточными системами репарации как повреждения и удаляются по пути эксцизионной репарации оснований ДНК.

В отличие от млекопитающих, у растений обнаружены уникальные ферменты, гидролизующие N-гликозидные связи mC-нуклеотидов. Эти ДНК-гликозилазы – DEMETER (DME) и REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1, также известный как DEMETER-LIKE 1 или DML1) (Choi Y. et al., 2002; Gong et al., 2002; Agius et al., 2006; Morales-Ruiz et al., 2006) – принимают участие в регуляции статуса метилирования отдельных районов ДНК растений, от которого зависит импринтинг генов при наследовании по отцовской или материнской линии и сайленсинг или активация промоторов отдельных генов в жизненном цикле растений (Li Y. et al., 2018; Parrilla-Doblas et al., 2019; Roldán-Arjona et al., 2019). После удаления основания mC образовавшийся апури-апиримидиновый сайт (АП-сайт) расщепляется или собственной АП-лиазной активностью фермента, или АП-эндонуклеазой APE1L; далее одной из ДНК-полимераз включается нормальный нуклеотид, и разрыв лигируется ДНК-лигазой LIG1. Интересно, что DME и ROS1 могут также удалять основания hmC, который, как считается, не участвует в эпигенетической регуляции у растений (Jang et al., 2014). Локализация деметилирования ферментами DME/ROS1 регулируется малыми РНК, которые связываются с самим ферментом или с белковым комплексом, в состав которого он входит (Penterman et al., 2007; Li X. et al., 2012).

Помимо DME и ROS1, в геноме модельного растительного организма *Arabidopsis thaliana* присутствуют еще три гена, гомологичных DME и ROS1, – DEMETER-LIKE 2 (DML2), DEMETER-LIKE 3 (DML3) и AT3G47830, о функциях которых практически ничего не известно, кро-

ме участия DML2 и DML3 в поддержании корректного метилирования ДНК (Ortega-Galisteo et al., 2008; Le et al., 2014). Все эти белки относятся к структурному суперсемейству ДНК-гликозилаз «спираль–шпилька–спираль» (Helix–hairpin–Helix, HhH). Другие члены этого суперсемейства участвуют в репарации ДНК, удаляя из генома окисленные, алкилированные и дезаминированные азотистые основания (Zharkov, 2008; Федорова и др., 2010). Ферменты DME/ROS1 привлекают внимание как потенциальные инструменты для направленной регуляции активности генов. Так, показана принципиальная возможность направленного деметилирования ДНК в клетках человека ферментом ROS1 *A. thaliana* (AtROS1), слитого с РНК-направляемым белком Cas9 (Devesa-Guerra et al., 2020), а фермент DME *A. thaliana* (AtDME) применялся для анализа уровня mC в геномной ДНК (Choi W.L. et al., 2021).

В других растениях, кроме *A. thaliana*, роль DME-подобных белков в активном эпигенетическом деметилировании исследовалась очень ограниченно: имеются отдельные данные на примерах риса, пшеницы, ячменя и томата (Ono et al., 2012; Wen et al., 2012; Kapazoglou et al., 2013; Liu et al., 2015). В 2007 г. был клонирован гомолог ROS1 из *Nicotiana tabacum* (NtROS1) и показано, что рекомбинантный белок, наработанный в культуре клеток насекомых, способен расщеплять метилированную геномную ДНК табака (Choi C.-S., Sano, 2007). Ни в одном из этих случаев подробной биохимической характеристики белка не проводилось. Ранее нами было показано, что фрагмент NtROS1, соответствующий минимальному каталитически активному фрагменту AtROS1, обладает активностью 5-метилцитозин-ДНК-гликозилазы (Gruber et al., 2018).

В связи с потенциальной ценностью ферментов системы активного деметилирования растений как инструментов для генетических технологий в настоящей работе охарактеризована субстратная специфичность рекомбинантного каталитического фрагмента NtROS1 по отношению к основаниям mC и hmC в разном контексте метили-

рованных CpG-динуклеотидов и показано, что экспрессия NtROS1 в клетках человека вызывает глобальное снижение уровня метилирования ДНК.

Материалы и методы

В работе использовали обратную транскриптазу ProtoScript II, ДНК-полимеразу Q5 Hot Start High-Fidelity, урацил-ДНК-гликозилазу *Escherichia coli*, эндонуклеазы рестрикции *ClaI* и *SacI* (все – New England BioLabs, США) и полинуклеотидкиназу бактериофага T4 («Биосан», Россия). Олигонуклеотиды, перечисленные в таблице, были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН из коммерчески доступных амидофосфитов (Glen Research, США). При необходимости олигонуклеотиды метили по 5'-концу ³²P с использованием γ [³²P]АТФ (лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН) и полинуклеотидкиназы фага T4.

При построении модели каталитического фрагмента NtROS1 в программе Swiss-Model (Waterhouse et al., 2018) применяли шаблоны AtDME (AF-Q8LK56-F1-model_v1) и AtROS1 (AF-Q9SJQ6-F1-model_v1) из базы данных AlphaFold (Jumper et al., 2021).

Для получения каталитически неактивного варианта NtROS1 с заменой Asp1359Asn использовали плазмиду pLATE31 со вставкой, кодирующей каталитически активный фрагмент NtROS1 (аминокислотные остатки 754–1796) (Gruber et al., 2018), праймеры D1359Nfwd и D1359Nrev (см. таблицу) и набор для сайт-направленного мутагенеза Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England BioLabs). Полученные плазмиды анализировали секвенированием по Сэнгеру. Белок дикого типа и мутантный вариант D1359N нарабатывали и выделяли, как описано ранее (Gruber et al., 2018).

Активность NtROS1 исследовали с помощью двуцепочечных субстратов, полученных отжигом олигонуклеотидов C1, C2, M1, M2, H1 и H2 (см. таблицу). Смесь для реакции содержала 50 нМ субстрата, 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0.1 % бычий сыворо-

Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность (5'→3')
ПЦР с обратной транскрипцией	
RTPCRfwd	AGAAGGAGATATAAАСТАТGTCАТTCАТТАGAAACCGGAAACCG
RTPCRrev	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCGTTTTCATCTGGCTTTCCTTTAGTCC
Сайт-направленный мутагенез	
D1359Nfwd	CCTGTCAACACAAACGTTGGC
D1359Nrev	GAAAGCAAGGTGGTGAAGTGT
Исследование активности и специфичности фермента	
C1	GCTTGTACTTTAGCGCATTTGATTCTCACCACG
C2	CGTGGTGAGAАТСААТGCGCTAAAGTACAAGC
M1	GCTTGTACTTTAGMGCATTTGATTCTCACCACG (M = mC)
M2	CGTGGTGAGAАТСААТGMGCTAAAGTACAAGC (M = mC)
H1	GCTTGTACTTTAGHGCATTTGATTCTCACCACG (H = hmC)
H2	CGTGGTGAGAАТСААТGHGCTAAAGTACAAGC (H = hmC)

точный альбумин и 100 нМ NtROS1. Смесь инкубировали при 37 °С, через определенное время (2–300 мин) отбирали аликвоты и смешивали их с равным объемом стоп-раствора (80 % формамид, 20 мМ ЭДТА, 0.1 % ксиленцианол, 0.1 % бромфеноловый синий). При необходимости аликвоты предварительно прогревали в течение 2 мин при 95 °С в присутствии 0.1 М NaOH и нейтрализовали эквимольным количеством HCl. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20 % полиакриламидном геле, содержащем 7.2 М мочевины, и визуализировали радиолюминесцентным сканированием с использованием системы Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Результаты обсчитывали в программе Quantity One v4.6.3 (Bio-Rad Laboratories, США). Определение кажущихся констант скорости проводили в программе SigmaPlot v11.0 (Systat Software, США) путем нелинейной регрессии зависимости концентрации продукта от времени реакции к уравнению $[P] = [P]_{\max}(1 - e^{-kt})$, где $[P]$ – концентрация продукта, $[P]_{\max}$ – максимальная концентрация продукта, k – константа скорости реакции, t – время.

Чтобы оценить статус глобального метилирования ДНК при экспрессии в клетках человека, кодирующие последовательности NtROS1 дикого типа и D1359N были переклонированы в плазмиду pIRES-eGFP-puro (Clontech, США) по сайтам рестрикции *SacI* и *ClaI*. Клетки HEK293 Phoenix ($1.2 \cdot 10^6$) трансфицировали 5 мкг плазмиды кальций-фосфатным методом и выращивали в монослое в среде DMEM с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone, США), через 24 и 48 ч обновляя среду с добавлением в нее пуromидина до концентрации 3 мкг/мл. Эффективность трансфекции оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии (NovoCyte 3000, ACEA Biosciences, США) с детекцией флуоресценции белка eGFP, кодируемого той же плазмидой. Наличие экспрессии *NtROS1* в трансфицированных клетках подтверждали ПЦР с обратной транскрипцией с мРНК β-актина в качестве контроля. Из собранных клеток ($5 \cdot 10^6$)

выделяли геномную ДНК набором QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) и определяли относительное содержание mC с использованием антител к 5-метилцитозину (набор MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit, EpiGenetek, США). Результаты измерений сравнивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

ДНК-гликозилазы растений, специфичные по отношению к mC, отличаются значительными размерами. Так, белки AtDME и AtROS1 из *A. thaliana*, как и их паралоги DML2 и DML3, имеют в длину более 1000 аминокислотных остатков (рис. 1). Протяженные N-концевые участки этих полипептидов не структурированы, хотя некоторые их части необходимы для активности фермента. С-концевые участки содержат консервативный каталитический домен HhH и железно-серный кластер (FeS-кластер), который характерен для многих ДНК-гликозил, узнающих окислительные повреждения ДНК, а также РНК-связывающий мотив (RNA Recognition Motif, RRM) и пермутированный цинковый палец типа CXXC, уникальные для семейства DME/ROS1 (см. рис. 1, а). В отличие от всех других ДНК-гликозил суперсемейства HhH, каталитический домен у белков семейства DME/ROS1 разорван длинной неконсервативной вставкой (Ponferrada-Marín et al., 2011). Исходя из литературных данных о белке ROS1 из *A. thaliana*, ранее нами был клонирован фрагмент кДНК *NtROS1*, кодирующий аминокислотные остатки 754–1796 (Gruber et al., 2018). Этот участок содержит все элементы, необходимые для проявления каталитической активности у AtROS1 (Hong et al., 2014).

Поскольку структуры белков семейства DME/ROS1 на сегодня неизвестны, для более детального понимания организации каталитического фрагмента NtROS1 было проведено его гомологичное моделирование на основе моделей AtDME и AtROS1 из коллекции шаблонов AlphaFold (Jumper et al., 2021). Две получившиеся модели были

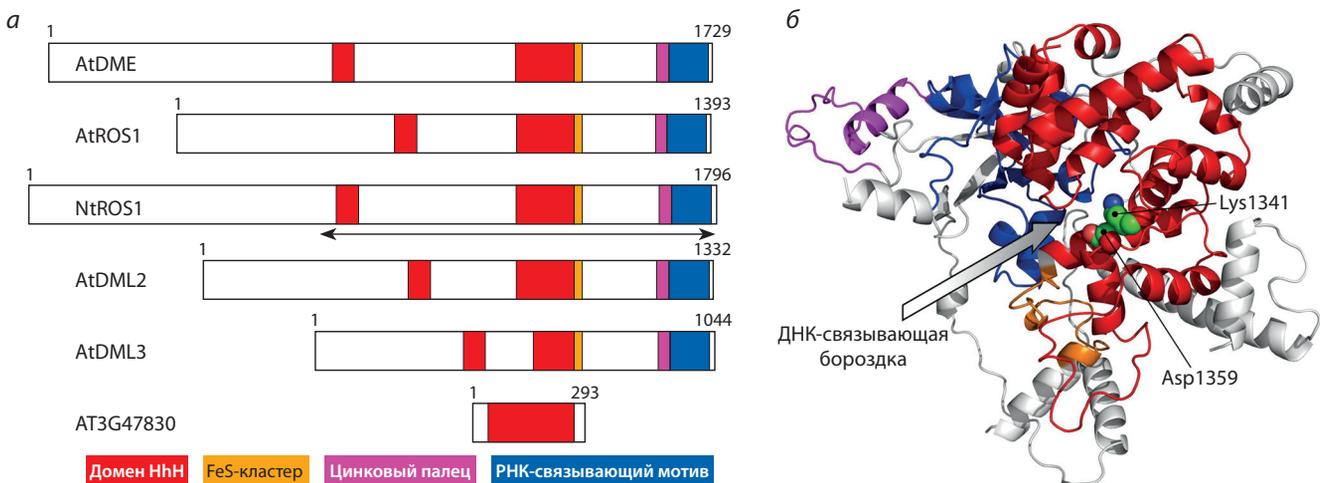


Рис. 1. Структура NtROS1: а – схема организации белков семейства DME/ROS1, стрелки обозначают каталитический фрагмент NtROS1; б – модель каталитического фрагмента NtROS1 (длинные неупорядоченные участки не показаны).

Красным цветом на обоих рисунках обозначен домен HhH, оранжевым – FeS-кластер, фиолетовым – цинковый палец типа CXXC, синим – РНК-связывающий мотив RRM.

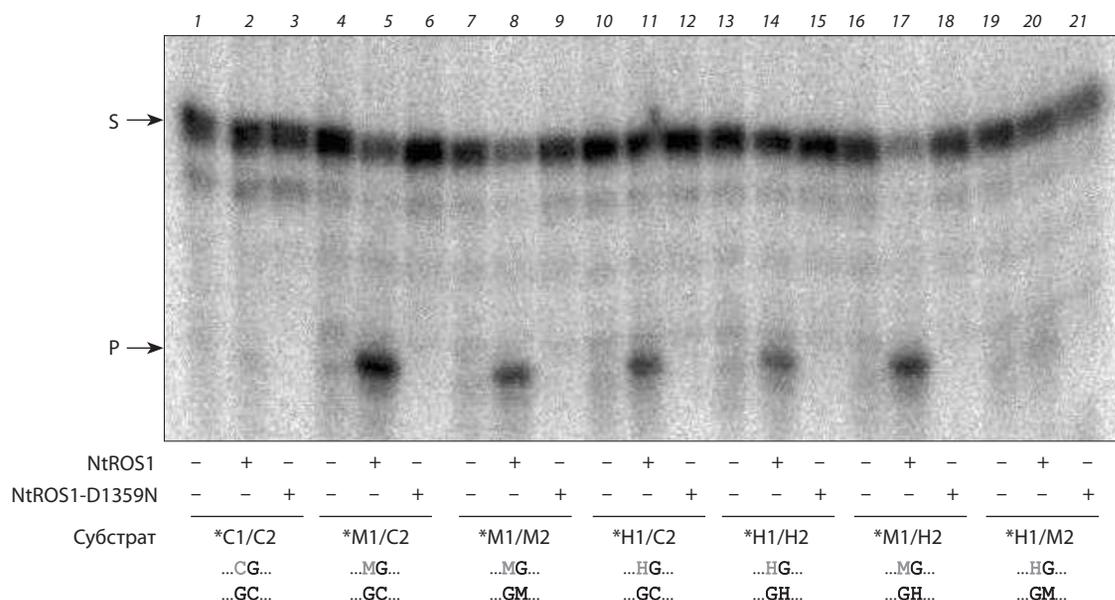


Рис. 2. Радиоавтограф геля после разделения продуктов реакции расщепления субстратов (50 нМ) ферментами NtROS1 дикого типа и D1359N (100 нМ) в течение 60 мин.

В подписи под гелем указан контекст метилирования CpG-сайта в каждом субстрате. Дорожки 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 – субстраты без фермента; дорожки 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 – обработка ферментом NtROS1 дикого типа; дорожки 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 – обработка ферментом NtROS1-D1359N. S – субстрат, P – продукт расщепления. На схематических представлениях субстратов серым цветом выделено удаляемое основание.

практически идентичны, за исключением структуры длинных негомологичных участков. Разорванный домен HhH укладывается в α -спиральную структуру, характерную для ДНК-гликозилаз этого суперсемейства, в которой выделяется ДНК-связывающая бороздка с каталитическими остатками Lys1341 и Asp1359 (см. рис. 1, б). Помимо этого, несколько периферических α -спиралей плотно прилегают к домену HhH и FeS-кластеру и, очевидно, важны для поддержания их структуры. FeS-кластер, цинковый палец и мотив RRM образуют отдельные структурные элементы, не перекрывающие доступ к ДНК-связывающей бороздке (см. рис. 1, б). Все неупорядоченные участки структуры также располагаются со стороны белковой молекулы, противоположной ДНК-связывающей бороздке.

Для анализа каталитической активности и субстратной специфичности белка NtROS1 проводили реакцию расщепления двуцепочечных олигонуклеотидных субстратов, содержащих CpG-динуклеотид, в котором цитозин был не метилирован, метилирован или гидроксиметилирован в одной или обеих цепях (рис. 2). Расщепляемая цепь была помечена ^{32}P по 5'-концу. NtROS1 практически не проявлял активности по отношению к субстрату, содержащему неметилированный CpG-сайт, что согласуется с литературными данными о необходимости заместителей при C5 цитозина для активности фермента AtROS1 из *A. thaliana* (Morales-Ruiz et al., 2006). Активность по отношению к основаниям mC и hmC наблюдалась, однако ее уровень заметно различался для субстратов обоих типов. Сравнительная эффективность расщепления субстратов M1/C2 и M1/M2 (дорожки 5 и 8) с расщеплением субстратов H1/C2 и H1/H2 (дорожки 11 и 14), можно заметить, что фермент предпочтительно удаляет mC по сравнению с hmC как в

CpG-сайтах, модифицированных по одной цепи, так и в полностью модифицированных. Незначительные различия в расщеплении субстратов M1/C2, M1/M2 и M1/H2 (дорожки 5, 8 и 17) говорят о том, что модификации в комплементарной цепи слабо влияют на удаление mC, а в случае присутствия hmC в комплементарной цепи, возможно, даже повышают процент расщепления. Фермент не показал активности в отношении ДНК-субстратов, содержащих урацил или 8-оксогуанин. Мутантный вариант NtROS1-D1359N, как и ожидалось, не проявлял гликозилазной активности в отношении всех исследованных субстратов с различными комбинациями mC и hmC, что подтверждает важность наличия остатка Asp в каталитическом центре белка ROS1 для удаления модифицированных оснований из ДНК.

По литературным данным, фермент AtROS1 отличается очень низким числом оборотов (Ponferrada-Marín et al., 2009), поэтому использовать стационарную кинетику для количественной характеристики активности NtROS1 не представлялось возможным. Для определения кажущейся константы скорости реакции были проведены эксперименты в условиях, приближенных к условиям кинетики одного оборота ($[E]_0 > [S]_0$). В этих условиях весь ДНК-субстрат быстро связывается с ферментом, и скорость реакции лимитирована не связыванием субстрата или высвобождением продукта, а химической стадией реакции псевдопервого порядка – гидролизом N-гликозидной связи модифицированного нуклеотида (Porello et al., 1998). Таким образом, следя за накоплением продукта со временем (рис. 3, а), можно оценить константу скорости реакции. Графики зависимости концентрации продукта от времени для всех субстратов представлены на рис. 3, б. Из приве-

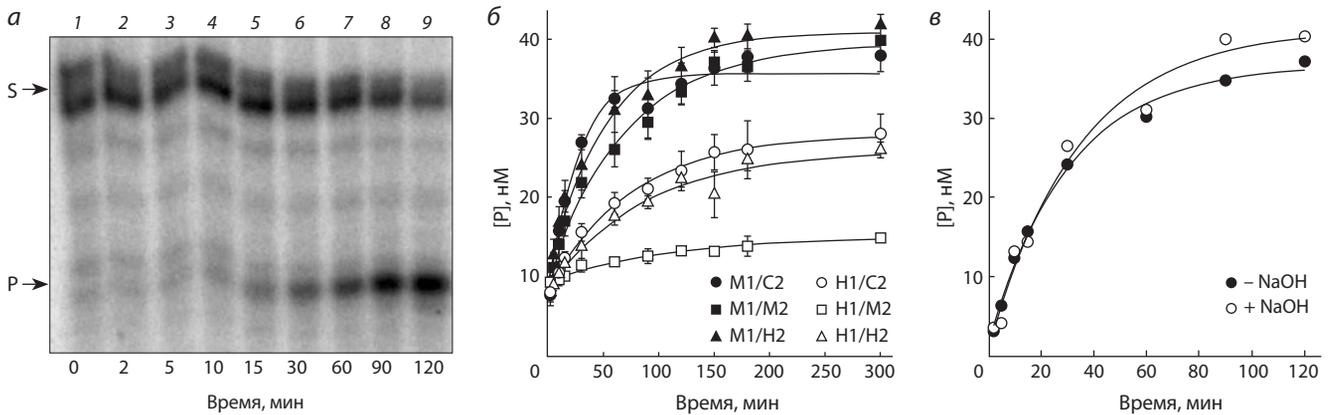


Рис. 3. Зависимость накопления продукта реакции от времени при гидролизе разных субстратов ферментом NtROS1.

а – репрезентативный радиоавтограф продуктов реакции после расщепления субстрата M1/M2 в течение 0–120 мин; *б* – субстраты M1/C2, M1/M2, M1/H2, H1/C2, H1/M2, H1/H2 (показаны средние значения и стандартное отклонение по трем-четырем экспериментам); *в* – субстрат M1/M2 с обработкой и без обработки NaOH для полного расщепления АП-сайта.

денных данных были рассчитаны значения констант скорости реакции для субстратов с разным статусом метилирования и гидроксиметилирования CpG-динуклеотидов:

Субстрат	$k \cdot 10^4, c^{-1}$
*M1/C2	6.5 ± 1.1
*M1/M2	2.4 ± 0.5
*M1/H2	3.0 ± 0.7
*H1/C2	1.9 ± 0.3
*H1/M2	1.6 ± 0.6
*H1/H2	2.0 ± 0.3
*C1/C2	Нет расщепления

* Цепь, меченная ^{32}P .

Во всех случаях hmC был худшим субстратом для NtROS1 по сравнению с mC. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что фермент NtROS1 эффективнее всего катализирует расщепление полуметилированного CpG-сайта, а hmC в контексте HG/GM, напротив, представляет собой наихудший субстрат для этого фермента. Эти результаты согласуются с качественными данными об относительной эффективности расщепления разных субстратов (см. рис. 2).

Многие ДНК-гликозилазы с низким числом оборотов характеризуются более низкой АП-лиазной активностью по сравнению с ДНК-гликозилазной активностью. В этом случае после удаления модифицированного основания часть продукта реакции долго существует в виде АП-сайта, и истинное количество продукта можно выявить только при обработке щелочью либо нуклеофильными аминами (Porello et al., 1998). Однако в случае NtROS1 дополнительная обработка NaOH не приводила к заметному увеличению накопления продукта реакции (см. рис. 3, в). Повидимому, скорость реакции, катализируемой NtROS1, лимитируется гидролизом *N*-гликозидной связи, что предполагалось и для фермента из *A. thaliana* (Hong et al., 2014).

Для оценки способности белка NtROS1 функционировать в качестве деметилазы при экспрессии в клетках млекопитающих были сконструированы плазмиды на основе вектора pIRES-eGFP-puro, кодирующие белок дикого типа NtROS1 и каталитически неактивный вариант NtROS1-D1359N. С использованием антител к mC была

проведена оценка уровня этого эпигенетического основания в клетках HEK293 после трансфекции плазмидами. При наблюдении за клетками в период после трансфекции выяснилось, что пролиферация клеток с плазмидой pIRES-eGFP-puro-NtROS1 снижалась примерно на 30 % по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными плазмидой без вставки, и клетками, трансфицированными плазмидой, кодирующей каталитически неактивный белок. При этом доля живых клеток во всех случаях была одинакова, что говорит о возможном замедлении клеточного цикла в присутствии активного фермента NtROS1 из-за необходимости репарировать большое число внесенных в ДНК разрывов по остаткам mC. Анализ уровня mC выявил его падение примерно в два раза относительно контрольных образцов при экспрессии NtROS1 дикого типа и отсутствие статистически значимых изменений при экспрессии NtROS1-D1359N (рис. 4). В целом можно считать, что временная экспрессия каталитического домена 5-метилцитозин-ДНК-гликозилазы NtROS1 в клетках человека действительно приводит к глобальному удалению эпигенетической метки mC. Количество hmC в клетках не удалось измерить при помощи иммуноанализа, вероятно потому, что оно примерно на порядок ниже, чем количество mC (Yu et al., 2012; Zahid et al., 2016).

Таким образом, можно заключить, что белок NtROS1 представляет собой ДНК-гликозилазу, специфичную по отношению к 5-метилцитозину и в меньшей степени к 5-гидроксиметилцитозину. По всей видимости, его биологические функции, как и в случае AtROS1, состоят в регуляции статуса метилирования и экспрессии генов в ходе эмбрионального развития (Yamamoto et al., 2014) или в ответ на инфекции и абиотический стресс (Gong et al., 2002; Le et al., 2014) и в регуляции сайленсинга трансгенов и мобильных элементов (Gong et al., 2002; Kapoor et al., 2005; Zhu et al., 2007). Крайне интересен не выясненный до сих пор механизм РНК-зависимой адресации белков семейства DME/ROS1 к сайтам деметилирования. Мотив RRM в составе этих полипептидов гомологичен мотивам, отвечающим за неспецифические взаимодействия с РНК во многих других белках (Cléry et al., 2008), и по своему положению в структуре (см. рис. 1, б) мог бы связывать

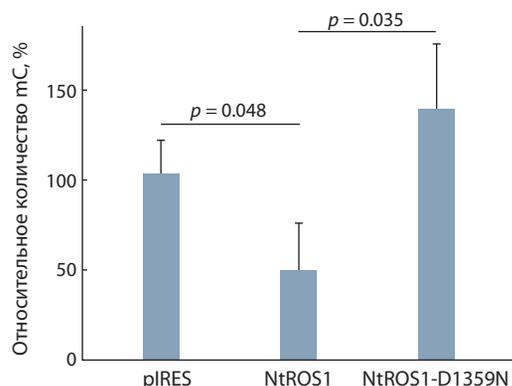


Рис. 4. Относительное количество 5mC в ДНК клеток HEK293 Phoenix, трансфицированных плазмидой pIRES-eGFP-puro, не несущей вставки либо несущей вставку, кодирующую каталитический фрагмент NtROS1 или его неактивный вариант NtROS1-D1359N.

Приведено среднее и стандартное отклонение по результатам трех экспериментов.

малые РНК, комплементарные последовательности ДНК с 5'-стороны от удаляемого остатка 5mC. Цинковые пальцы типа СХХС используются многими белками, узнающими 5mC, но они преимущественно связывают именно неметилированную ДНК и предположительно необходимы для точного позиционирования фермента при наличии нескольких расположенных на небольшом расстоянии сайтов метилирования (Iyer et al., 2011).

Перспективы использования NtROS1 и других белков семейства DME/ROS1 как инструментов для генетических технологий во многом зависят от возможности уменьшения размера каталитического фрагмента. Известно, что при удалении длинной вставки между двумя частями домена HhN каталитического фрагмента AtROS1 активность фермента сохраняется в полном объеме, однако делеция С-концевого участка после FeS-кластера вызывает потерю активности (Hong et al., 2014). Судя по структурным моделям AtROS1 и NtROS1, домены HhN и RRM взаимодействуют друг с другом, и, вероятно, уменьшение размера белка в этой части возможно лишь за счет сокращения длины вставки между ними. В любом случае белки DME/ROS1, в том числе NtROS1, представляют собой многообещающую основу для инженерии ферментов с целью анализа статуса эпигенетического метилирования и управления активностью генов.

Заключение

В работе исследована деметилирующая ДНК-гликозилаза ROS1 из *Nicotiana tabacum*, что делает этот фермент вторым изученным на биохимическом уровне белком ROS1 после его гомолога из *Arabidopsis thaliana*. Помимо 5-метилцитозина, NtROS1 показал способность удалять из ДНК 5-гидроксиметилцитозин, однако эффективность этой реакции была ниже, чем для 5-метилцитозина. Очевидно, это связано с тем, что растения практически не используют 5-гидроксиметилцитозин в качестве эпигенетической метки. Наблюдаемое снижение глобального метилирования при продукции NtROS1 в клетках человека дает основание надеяться, что этот белок или его оптимизированные варианты можно будет применять как ин-

струмент для эпигенетической регуляции либо самостоятельно, либо в качестве активного модуля в конструкциях, адресуемых к определенным участкам генома.

Список литературы / References

- Федорова О.С., Кузнецов Н.А., Коваль В.В., Кнорре Д.Г. Конформационная динамика и предстационарная кинетика ДНК-гликозилазы. *Биохимия*. 2010;75(10):1377-1394.
- [Fedorova O.S., Kuznetsov N.A., Koval V.V., Knorre D.G. Conformational dynamics and pre-steady-state kinetics of DNA glycosylases. *Biochemistry (Moscow)*. 2010;75(10):1225-1239. DOI 10.1134/S0006297910100044.]
- Agius F., Kapoor A., Zhu J.-K. Role of the *Arabidopsis* DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(31):11796-11801. DOI 10.1073/pnas.0603563103.
- Ballestar E., Wolffe A.P. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur. J. Biochem*. 2001;268(1):1-6. DOI 10.1046/j.1432-1327.2001.01869.x.
- Baubec T., Ivánek R., Lienert F., Schübeler D. Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell*. 2013;153(2):480-492. DOI 10.1016/j.cell.2013.03.011.
- Bochtler M., Kolano A., Xu G.-L. DNA demethylation pathways: additional players and regulators. *Bioessays*. 2017;39(1):1-13. DOI 10.1002/bies.201600178.
- Branco M.R., Ficiz G., Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet*. 2011;13(1):7-13. DOI 10.1038/nrg3080.
- Choi C.-S., Sano H. Identification of tobacco genes encoding proteins possessing removal activity of 5-methylcytosines from intact tobacco DNA. *Plant Biotechnol*. 2007;24(3):339-344. DOI 10.5511/plantbiotechnology.24.339.
- Choi W.L., Mok Y.G., Huh J.H. Application of 5-methylcytosine DNA glycosylase to the quantitative analysis of DNA methylation. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(3):1072. DOI 10.3390/ijms22031072.
- Choi Y., Gehring M., Johnson L., Hannon M., Harada J.J., Goldberg R.B., Jacobsen S.E., Fischer R.L. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. *Cell*. 2002;110(1):33-42. DOI 10.1016/s0092-8674(02)00807-3.
- Cléry A., Blatter M., Allain F.H.-T. RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2008;18(3):290-298. DOI 10.1016/j.sbi.2008.04.002.
- Devesa-Guerra I., Morales-Ruiz T., Pérez-Roldán J., Parrilla-Doblas J.T., Dorado-León M., García-Ortiz M.V., Ariza R.R., Roldán-Arjona T. DNA methylation editing by CRISPR-guided excision of 5-methylcytosine. *J. Mol. Biol*. 2020;432(7):2204-2216. DOI 10.1016/j.jmb.2020.02.007.
- Gong Z., Morales-Ruiz T., Ariza R.R., Roldán-Arjona T., David L., Zhu J.-K. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*. 2002;111(6):803-814. DOI 10.1016/s0092-8674(02)01133-9.
- Gruber D.R., Toner J.J., Miears H.L., Shernyukov A.V., Kiryutin A.S., Lomzov A.A., Endutkin A.V., Grin I.R., Petrova D.V., Kupryushkin M.S., Yurkovskaya A.V., Johnson E., Okon M., Bagryan-skaya E.G., Zharkov D.O., Smirnov S.L. Oxidative damage to epigenetically methylated sites affects DNA stability, dynamics, and enzymatic demethylation. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(20):10827-10839. DOI 10.1093/nar/gky893.
- Hong S., Hashimoto H., Kow Y.W., Zhang X., Cheng X. The carboxy-terminal domain of ROS1 is essential for 5-methylcytosine DNA glycosylase activity. *J. Mol. Biol*. 2014;426(22):3703-3712. DOI 10.1016/j.jmb.2014.09.010.
- Iyer L.M., Abhimani S., Aravind L. Natural history of eukaryotic DNA methylation systems. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 2011;101:25-104. DOI 10.1016/B978-0-12-387685-0.00002-0.
- Jang H., Shin H., Eichman B.F., Huh J.H. Excision of 5-hydroxymethylcytosine by DEMETER family DNA glycosylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2014;446(4):1067-1072. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.03.060.

- Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-589. DOI 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Kapazoglou A., Drosou V., Argiriou A., Tsaftaris A.S. The study of a barley epigenetic regulator, *HvDME*, in seed development and under drought. *BMC Plant Biol.* 2013;13:172. DOI 10.1186/1471-2229-13-172.
- Kapoor A., Agarwal M., Andreucci A., Zheng X., Gong Z., Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K. Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA-methylation-independent manner in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 2005; 15(21):1912-1918. DOI 10.1016/j.cub.2005.09.013.
- Le T.-N., Schumann U., Smith N.A., Tiwari S., Au P.C.K., Zhu Q.-H., Taylor J.M., Kazan K., Llewellyn D.J., Zhang R., Dennis E.S., Wang M.-B. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 2014;15(9):458. DOI 10.1186/s13059-014-0458-3.
- Lee T.-F., Zhai J., Meyers B.C. Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(20): 9027-9028. DOI 10.1073/pnas.1005440107.
- Li X., Qian W., Zhao Y., Wang C., Shen J., Zhu J.-K., Gong Z. Antisilencing role of the RNA-directed DNA methylation pathway and a histone acetyltransferase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(28):11425-11430. DOI 10.1073/pnas.1208557109.
- Li Y., Kumar S., Qian W. Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development. *Plant Cell Rep.* 2018;37(1):77-85. DOI 10.1007/s00299-017-2215-z.
- Liu R., How-Kit A., Stammiti L., Teyssier E., Rolin D., Mortain-Bertrand A., Halle S., Liu M., Kong J., Wu C., Degraeve-Guibault C., Chapman N.H., Maucourt M., Hodgman T.C., Tost J., Bouzayen M., Hong Y., Seymour G.B., Giovannoni J.J., Gallusci P. A DEMETER-like DNA demethylase governs tomato fruit ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(34):10804-10809. DOI 10.1073/pnas.1503362112.
- Morales-Ruiz T., Ortega-Galisteo A.P., Ponferrada-Marín M.I., Martínez-Macías M.I., Ariza R.R., Roldán-Arjona T. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103(18):6853-6858. DOI 10.1073/pnas.0601109103.
- Ono A., Yamaguchi K., Fukada-Tanaka S., Terada R., Mitsui T., Iida S. A null mutation of *ROS1a* for DNA demethylation in rice is not transmissible to progeny. *Plant J.* 2012;71(4):564-574. DOI 10.1111/j.1365-3113X.2012.05009.x.
- Ortega-Galisteo A.P., Morales-Ruiz T., Ariza R.R., Roldán-Arjona T. Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol. Biol.* 2008;67(6):671-681. DOI 10.1007/s11103-008-9346-0.
- Parrilla-Doblas J.T., Roldán-Arjona T., Ariza R.R., Córdoba-Cañero D. Active DNA demethylation in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(19):4683. DOI 10.3390/ijms20194683.
- Pastor W.A., Aravind L., Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(6):341-356. DOI 10.1038/nrm3589.
- Pastor W.A., Pape U.J., Huang Y., Henderson H.R., Lister R., Ko M., McLoughlin E.M., Brudno Y., Mahapatra S., Kapranov P., Tahiliani M., Daley G.Q., Liu X.S., Ecker J.R., Milos P.M., Agarwal S., Rao A. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*. 2011;473(7347):394-397. DOI 10.1038/nature10102.
- Penterman J., Uzawa R., Fischer R.L. Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2007;145(4):1549-1557. DOI 10.1104/pp.107.107730.
- Ponferrada-Marín M.I., Parrilla-Doblas J.T., Roldán-Arjona T., Ariza R.R. A discontinuous DNA glycosylase domain in a family of enzymes that excise 5-methylcytosine. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(4): 1473-1484. DOI 10.1093/nar/gkq982.
- Ponferrada-Marín M.I., Roldán-Arjona T., Ariza R.R. ROS1 5-methylcytosine DNA glycosylase is a slow-turnover catalyst that initiates DNA demethylation in a distributive fashion. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(13):4264-4274. DOI 10.1093/nar/gkp390.
- Porello S.L., Leyes A.E., David S.S. Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates. *Biochemistry*. 1998;37(42): 14756-14764. DOI 10.1021/bi981594+.
- Roldán-Arjona T., Ariza R.R., Córdoba-Cañero D. DNA base excision repair in plants: an unfolding story with familiar and novel characters. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1055. DOI 10.3389/fpls.2019.01055.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303. DOI 10.1093/nar/gky427.
- Wen S., Wen N., Pang J., Langen G., Brew-Appiah R.A.T., Mejias J.H., Osorio C., Yang M., Gemini R., Moehs C.P., Zemetra R.S., Kogel K.-H., Liu B., Wang X., von Wettstein D., Rustgi S. Structural genes of wheat and barley 5-methylcytosine DNA glycosylases and their potential applications for human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012;109(50):20543-20548. DOI 10.1073/pnas.1217927109.
- Wu X., Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2017;18(9):517-534. DOI 10.1038/nrg.2017.33.
- Yamamuro C., Miki D., Zheng Z., Ma J., Wang J., Yang Z., Dong J., Zhu J.-K. Overproduction of stomatal lineage cells in *Arabidopsis* mutants defective in active DNA demethylation. *Nat. Commun.* 2014;5:4062. DOI 10.1038/ncomms5062.
- Yu M., Hon G.C., Szulwach K.E., Song C.-X., Zhang L., Kim A., Li X., Dai Q., Shen Y., Park B., Min J.-H., Jin P., Ren B., He C. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell*. 2012;149(6):1368-1380. DOI 10.1016/j.cell.2012.04.027.
- Zahid O.K., Zhao B.S., He C., Hall A.R. Quantifying mammalian genomic DNA hydroxymethylcytosine content using solid-state nanopores. *Sci. Rep.* 2016;6:29565. DOI 10.1038/srep29565.
- Zemach A., Zilberman D. Evolution of eukaryotic DNA methylation and the pursuit of safer sex. *Curr. Biol.* 2010;20(17):R780-R785. DOI 10.1016/j.cub.2010.07.007.
- Zharkov D.O. Base excision DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65(10):1544-1565. DOI 10.1007/s00018-008-7543-2.
- Zhu J., Kapoor A., Sridhar V.V., Agius F., Zhu J.-K. The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 2007;17(1):54-59. DOI 10.1016/j.cub.2006.10.059.

ORCID ID

N.V. Permyakova orcid.org/0000-0001-9291-1343
I.R. Grin orcid.org/0000-0002-5685-1248
D.O. Zharkov orcid.org/0000-0001-5013-0194

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках проекта № 20-44-540007. Часть работы, посвященная моделированию структуры NtROS1, поддержана государственным заданием 121031300056-8. Секвенирование ДНК выполнялось сотрудниками ЦКП «Геномика» СО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.11.2021. После доработки 24.02.2022. Принята к публикации 06.04.2022.

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

Изучение генетического полиморфизма российских сортов рапса и сурепицы с использованием SSR- и SRAP-маркеров

И.А. Клименко , В.Т. Воловик, А.А. Антонов, В.А. Душкин, А.О. Шамустакимова, Ю.М. Мавлютов

Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса, г. Лобня, Московская область, Россия
 iaklimenko@mail.ru

Аннотация. Рапс (*Brassica napus* L.) и сурепица (*B. rapa* L. subsp. *campestris* (L.)) – важные сельскохозяйственные культуры, широко используются для продовольственных, кормовых и технических целей, а также в качестве сидератов. За последние десятилетия создано большое количество перспективных сортов, культивируемых практически во всех регионах России. Для повышения эффективности селекционного процесса и успешного развития семеноводства необходимо внедрять современные молекулярно-генетические методы оценки видового и сортового разнообразия. Цель настоящей работы заключалась в изучении ДНК-полиморфизма сортов рапса и сурепицы селекции Федерального научного центра кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса и выявлении информативных маркеров для сортовой идентификации и генетической паспортизации. Для генотипирования 18 образцов геномной ДНК использовали 42 и 25 комбинаций SSR- и SRAP-праймеров соответственно. Результаты показали, что маркеры SRAP более эффективны для анализа полиморфизма изучаемого материала: 36 % от общего числа испытанных маркеров демонстрировали генетический полиморфизм, тогда как для микросателлитных локусов этот показатель равнялся 16.7 %. Определены молекулярные маркеры для выявления различий на межвидовом и межсортовом уровнях. Информативными для исследуемой выборки сортов оказались микросателлитные локусы Na12A02, Ni2C12, Ni02-D08a, Ra02-E01, Ni03H07a и комбинации SRAP-маркеров F13-R9, Me4-R7, F11-Em2, F10-R7, F9-Em2 и F9-R8. Анализ сортового материала по двум системам маркирования показал более высокий уровень ДНК-полиморфизма у образцов растений разного типа развития (яровой/озимый) в сравнении с различиями между сортами в пределах вида или группы. Согласно индексам генетического разнообразия Нея, в кластере сортов озимого рапса наибольшей генетической удаленностью выделялись ВИК 2 и Горизонт, среди яровых – Новосёл и Велес. Высокий уровень сходства обнаружен между яровыми сортами рапса Викрос и Бизон. Полученная информация имеет практическое значение для контроля сортовой принадлежности и генетической паспортизации семенного материала сортов рапса и сурепицы. Ключевые слова: кормовые культуры; *Brassica napus* L.; *B. rapa* L. *campestris*; «балк-образцы», генетический полиморфизм; SSR-маркеры; SRAP-маркеры.

Для цитирования: Клименко И.А., Воловик В.Т., Антонов А.А., Душкин В.А., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Изучение генетического полиморфизма российских сортов рапса и сурепицы с использованием SSR- и SRAP-маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):349-358. DOI 10.18699/VJGB-22-42

Investigation of genetic polymorphism of Russian rape and turnip rape varieties using SSR and SRAP markers

I.A. Klimenko , V.T. Volovik, A.A. Antonov, V.A. Dushkin, A.O. Shamustakimova, Yu.M. Mavlyutov

Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology, Lobnya, Moscow region, Russia
 iaklimenko@mail.ru

Abstract. Rapeseed (*Brassica napus* L.) and turnip rape (*B. rapa* L. subsp. *campestris* (L.)) are important agricultural plants widely used for food, fodder and technical purposes and as green manure. Over the past decades, a large number of perspective varieties that are being currently cultivated in every region of Russia have been developed. To increase the breeding efficiency and facilitate the seed production, modern molecular-genetic techniques should be introduced as means to estimate species and varietal diversity. The objective of the presented research study was to investigate DNA polymorphism of the rapeseed and turnip rape varieties developed at Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology and detect informative markers for varietal identification and genetic certification. To genotype 18 gDNA samples, 42 and 25 combinations of respective SSR and SRAP primers were used. The results obtained demonstrate that SRAP markers were more effective for polymorphism analysis: 36 % of the tested markers revealed genetic polymorphism compared with only 16.7 % of microsatellite loci. Molecular markers to detect differences at interspecific and intervarietal levels have also been found. For the investigated set, such microsatellite loci as Na12A02, Ni2C12, Ni02-D08a, Ra02-E01, Ni03H07a and SRAP-marker combinations as F13-R9, Me4-R7, F11-Em2, F10-R7, F9-Em2 and F9-R8 proved to be informative. Application of the two marker techniques made it possible to detect a higher level of DNA polymorphism in plants of different types (spring and winter varieties) if compared against

the intervarietal differences within a species or a group. According to Nei's genetic diversity index, in the cluster of winter rapeseed, VIK 2 and Horizont varieties had the longest genetic distance, and in the spring cluster, these were Novosel and Veles. A high level of similarity was found between Vikros and Bizon winter rapeseed varieties. The results obtained have a high practical value for varietal specification of seed material and genetic certification of rapeseed and turnip rape varieties.

Key words: forage crops; *Brassica napus* L.; *B. rapa* L. *campestris*; bulk samples; genetic polymorphism; SSR markers; SRAP markers.

For citation: Klimenko I.A., Volovik V.T., Antonov A.A., Dushkin V.A., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Investigation of genetic polymorphism of Russian rape and turnip rape varieties using SSR and SRAP markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):349-358. DOI 10.18699/VJGB-22-42

Введение

Капустные масличные культуры, и прежде всего рапс (*Brassica napus* L.) и сурепица (*B. rapa* L.), возделываются практически во всех регионах России и в ближайшей перспективе являются основным резервом увеличения производства растительного масла и кормового белка. Используются для продовольственных, кормовых и технических целей, а также в качестве сидератов, повышают плодородие почв за счет поступления корневых остатков, содержащих до 6 т/га органического вещества, 80 кг азота, 60 кг фосфора и 90 кг калия. По пищевым и кормовым достоинствам рапс и сурепица превосходят многие сельскохозяйственные культуры, так как в биохимическом составе семян обнаружено 40–48 % жира и 21–33 % белка с высоким содержанием незаменимых аминокислот (Воловик, 2015). Посевы рапса могут обеспечить животных зелеными кормами с ранней весны до поздней осени благодаря высокой холодостойкости и хорошему отращиванию после скашивания; служат сырьем для приготовления силоса, а из семян и отходов их переработки получают жмых и шрот. За последние годы с появлением сортов рапса и сурепицы, не содержащих эруковую кислоту или с низким содержанием, производство семян этих культур увеличилось более чем в 7 раз и по объемам занимает третье место в мире после сои и хлопчатника. В России планируется в кратчайшие сроки увеличение площади посевов рапса до 2.5 млн га.

Ведущими отечественными научными учреждениями, где проводится интенсивная работа по селекции масличных культур семейства Крестоцветные, являются ВНИИ рапса, ВНИИ масличных культур и ВНИИ кормов. Селекционерами созданы перспективные сорта рапса, сурепицы, горчицы белой и редьки масличной, рекомендованные для получения маслосемян, использования в рационах животных и птицы в качестве зеленого корма, в составе комбикормов, жмыха и шротов. По состоянию на 2021 г. в «Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию», зарегистрировано 13 сортов рапса и 3 сорта сурепицы – разработки Федерального центра кормопроизводства и агроэкологии (ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса») (Косолапов и др., 2019; Государственный реестр..., 2021).

Для сохранения и рационального использования имеющихся и создаваемых ресурсов, повышения интенсивности селекционного процесса и защиты авторских прав необходимы современные и эффективные методы оценки видового и сортового разнообразия на генетическом уровне. С этой целью в последние годы успешно применяются

молекулярные ДНК-маркеры. В сравнении с традиционными морфологическими признаками они имеют ряд преимуществ: высокий уровень полиморфизма, равномерное распределение по геному, надежность, возможность автоматизации процесса анализа, результаты которого не зависят от условий окружающей среды и фазы развития растения (Agarwal et al., 2008; Хлесткина, 2011; Чесноков, 2018). При условии выбора наиболее информативных и удобных ДНК-маркеров их возможности для оценки генетического разнообразия селекционного материала неограниченны.

В лаборатории молекулярно-генетических исследований ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса» разрабатывается система ДНК-идентификации и генетической паспортизации сортов кормовых культур отечественной селекции. В настоящее время методы определения сортовой принадлежности адаптированы для многолетних бобовых трав – клевера лугового и разных видов люцерны (Клименко и др., 2020а, б). Анализ проводят с использованием образцов суммарной ДНК, выделенной модифицированным способом из случайной выборки проростков каждого сорта, и молекулярных маркеров двух типов: SSR (simple sequence repeats), выявляющих вариативность микросателлитных последовательностей генома, и SRAP (sequence related amplified polymorphism), основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с парой праймеров для амплификации интрон-экзонных участков генов или открытых рамок считывания. Эти методы прошли апробацию на разных видах кормовых культур, оптимизацию условий амплификации, детекции и анализа полученных результатов.

Проблема надежной сортовой идентификации представляется особенно актуальной для селекционного материала рапса вследствие ограниченной генетической изменчивости, обусловленной интенсивной селекцией на признаки, определяющие качество семян и получаемого из них масла. Известно множество исследовательских работ по использованию разных типов ДНК-маркеров в изучении рапса: это оценка генетического разнообразия сортов и гибридов (Plieske, Struss, 2001; Snowdon, Friedt, 2004; Klyachenko et al., 2018; Мозгова и др., 2019), создание генетических карт (Piquemal et al., 2005; Gao et al., 2007; Geng et al., 2012) и маркирование генов хозяйственно ценных признаков (Chen et al., 2010; Ananga et al., 2012). Однако информации о таких исследованиях на сортах российского происхождения в доступных литературных источниках мало. Так, четыре сорта рапса озимого и ярового типа (Подмосковный, Викрос, ВИК 2 и Северянин) были объектом изучения белорусских исследователей при

идентификации аллелей генов, контролирующих уровень содержания олеиновой и линолевой кислот в масле семян (Лемеш и др., 2015). Эти же сорта использовали при выявлении ДНК-маркеров генов, контролирующих синтез эруковой кислоты (Amosova et al., 2014). С помощью микросателлитных маркеров изучали генетический полиморфизм российских сортов Ратник и СНК-198 (Сатина, 2010), а также степень генетической однородности яровых сортов рапса Булат и Форвард (Рогожина и др., 2015). У сортов озимого типа Столичный, Лауреат, Горизонт, Норд, Северянин проведен поиск QTLs (quantitative trait loci) – локусов количественных признаков, ассоциированных с повышенной зимостойкостью (Мозгова и др., 2019).

Цель исследований заключалась в изучении полиморфизма ДНК сортов рапса и сурепицы, разработанных селекционерами ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», и выявлении информативных маркеров для сортовой дифференциации и последующей генетической паспортизации.

Материалы и методы

Растительный материал. Объектом исследований служили 15 сортов рапса озимого (Северянин, Столичный, ВИК 2, Норд, Лауреат, Горизонт, Гарант) и ярового (Викрос, Новик, Новосёл, Велес, Грант, Подмосковный, Луговской, Бизон), а также 3 сорта сурепицы (Заря (озимый тип), Надежда и Светлана (яровой тип)).

Экстракция ДНК и ПЦР-анализ. Геномную ДНК выделяли из 30 проростков растений от каждого сорта («балк-образцы»). Применяли базовый SDS-метод (Kirby, Cook, 1967; Dellaporta et al., 1983) с внесением некоторых модификаций (Клименко и др., 2020а). Качество и концентрацию полученных фракций ДНК проверяли путем электрофореза в 1.5 % агарозном геле и на спектрофотометре Nabi (MicroDigital, Корея).

Для SSR-анализа использовали 42 маркера, информация о которых получена из международной базы данных Brassica.info (<https://www.brassica.info>) и литературных источников. Эффективность праймеров, разработанных к этим маркерам, показана в исследованиях по созданию технологии генотипирования рапса (Сатина, 2010) и отбору образцов с низким содержанием эруковой кислоты и глюкозинолатов (Hasan et al., 2008). Часть маркеров, включенных в анализ, использовали для контроля гибридизации и выявления устойчивых к альтернариозу генотипов индийской горчицы (*B. juncea* L.) (Chandra et al., 2013; Sharma et al., 2018).

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала: 3 мкл 10× ПЦР-буфера (Taq Turbo Buffer), 0.5 мкл 50x dNTPs mix, 0.4 мкл Taq-полимеразы (5U), по 0.1 мкл прямого и обратного праймера (100 мкМ) и 1 мкл образца ДНК (20 нг/мкл). Амплификацию осуществляли на приборе Bio-Rad T-1000 (США) при двух разных температурных режимах. Одна программа предусматривала начальную денатурацию в течение 3 мин при 95 °С; затем 30 циклов по 30 с при 94 °С, 30 с при 55–57 °С, 30 с при 72 °С и финальную элонгацию при 72 °С в течение 5 мин (Сатина, 2010). Второй режим амплификации включал начальную денатурацию – 5 мин при 95 °С; следующие 39 циклов – 1 мин при 94 °С, 2 мин при 46–51 °С в зависимости от пары праймеров, 2 мин при 72 °С и финальную элонгацию при 72 °С в течение 10 мин

(Chandra et al., 2013). Воспроизводимость результатов анализа проверяли постановкой реакций в трехкратной повторности.

SRAP-анализ провели с использованием 25 комбинаций праймеров, составленных на основе 10 одиночных олигонуклеотидов: F9, F13, Me4, F10, F11, R9, R7, Em2, R14, R8 (Li, Quiros, 2001; Rhouma et al., 2017). Программа амплификации включала: начальную денатурацию – 4 мин при 94 °С, затем 10 циклов с чередованием температурных и временных параметров (1 мин при 94 °С, 1 мин при 35 °С, 1 мин при 72 °С); следующие 30 циклов (1 мин при 94 °С, 1 мин при 50 °С, 1 мин при 72 °С) и финальную элонгацию при 72 °С в течение 5 мин. Состав компонентов смеси для ПЦР был аналогичным используемому при микросателлитном анализе.

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в агарозном геле в течение 90 мин при 50 В (4 % MetaPhorR Agarose, Rockland, или 1.6 % LE, Lonza, США). В качестве маркеров-стандартов применяли 20 bp DNA Ruler Bio-Rad, 100 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США) и 100 bp + 1.5 kb («СибЭнзим», Россия).

Анализ результатов. Детекцию ПЦР-продуктов и определение их размера осуществляли на приборе GelDoc™ XR+ (Bio-Rad) с помощью пакета программ ImageLab (Bio-Rad Lab., Inc.) относительно маркеров молекулярной массы. На основании полученных результатов составляли бинарную матрицу и с применением программы PopGene v. 1.32 (Yeh et al., 2000) определяли показатели генетического разнообразия: эффективное число аллелей на локус, индекс Шеннона, ожидаемую гетерозиготность, генетические дистанции по Нею (Nei, Li, 1979). Для каждой пары праймеров рассчитывали индекс информативности, PIC (polymorphism information content), согласно формуле, представленной в статье (Chesnokov, Artemyeva, 2015). Для построения дендрограммы генетического сходства методом попарно-невзвешенных группировок с усреднением (UPGMA) использовали программу NTSYSpc v 2.10 (Rohlf, 2000).

Результаты

Для выделения геномной ДНК из проростков рапса и сурепицы применяли SDS-метод с модификациями. Протокол оказался более эффективным и малозатратным в сравнении с другими известными протоколами и коммерческими наборами реактивов. Результаты электрофореза и спектрофотометрии показали достаточно высокую концентрацию ДНК и степень очистки от примесей белковых соединений и полисахаридов у всех экспериментальных образцов (рис. 1, 2).

SSR-анализ

Для генотипирования полной коллекции сортов было выбрано 7 из 42 SSR-праймеров, обеспечивающих стабильную и воспроизводимую амплификацию (табл. 1).

Анализ фрагментов амплификации, полученных с этими праймерами, выявил 42 аллеля. В среднем число аллелей на локус составляло 6 и варьировало от 3 (маркеры Ni2C12 и Vna.M.010) до 10 (Ra02-E01a). Размер фрагментов амплификации находился в диапазоне от 110 п. н. – с использованием маркера Ni2C12 до 1200 п. н. – с мар-

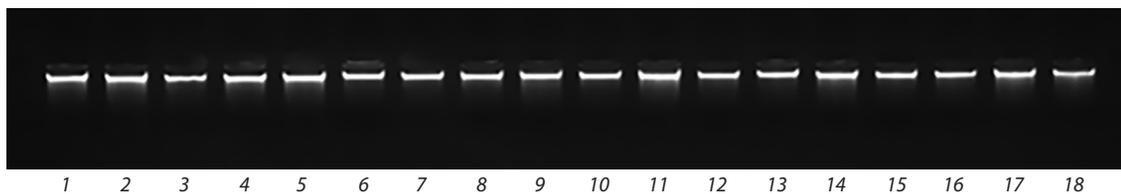


Рис. 1. Электрофореграмма геномной ДНК, выделенной из проростков растений рапса и сурепицы.

Дорожки: 1–15 – сорта рапса: Северянин, Столичный, ВИК 2, Норд, Лауреат, Горизонт, Гарант, Викрос, Новик, Новосёл, Велес, Грант, Подмосковский, Луговской, Бизон; 16–18 – сорта сурепицы: Заря, Надежда, Светлана.



Рис. 2. Концентрация геномной ДНК (OP, ОС – сорта рапса и сурепицы озимого типа, ЯР – сорта рапса ярового типа).

Таблица 1. SSR-праймеры, использованные для анализа полиморфизма ДНК сортов рапса и сурепицы

Праймер	Последовательность нуклеотидов (5'→3')	Размер ПЦР-фрагментов, согласно литературным данным, п. н.	Литературный источник
Ni-F02a	TGCAACGAAAAAGGATCAGC/ TGCTAATTGAGCAATAGTGATTCC	250	Chandra et al., 2013
Ni03H07a	GCTGTGATTTTAGTGACCG/ AGCCGTTGATGGAATTTTGT	250–280	
Ni02-D08a	ACAACAACCCATGTCTTCCG/ ACAACAACCCATGTCTTCCG	< 100–300	
Ra02-E01a	GCACACACACTCAAACCC/ TCTATATTAACGCGGACGG	< 100- > 1000	
Ni2C12 (Bna.M.002)	AAAGGTCAAGTCTTCTTCCG/ ACATTCTGGATCTTGATTCC	112–150	Сатина, 2010
Na12A02 (Bna.M.001)	AGTGAATCGATGATCTCGCC/ AGCCTTGTGCTTTTCAACG	160–218	
Bna.M.010	CATTGTTGTCTTGGGAGAGC/ AGGACACCAGGCACCATATA	100–150	

кером Ni02-D08a. Максимальная частота встречаемости аллелей показана для Bna.M.010 (0.83), минимальная – для Ni03H07a (0.27); среднее значение показателя было 0.42. Праймеры, разработанные к маркерам Ni03H07a, Ni02-D08a и Ra02-E01a, позволяли обнаружить 8–10 аллелей на локус и отличались наиболее высоким индексом информативности – 0.82.

SRAP-анализ

По результатам предварительного тестирования из 25 комбинаций SRAP-праймеров было выбрано 10 пар, амплифицирующих полиморфные ДНК-фрагменты с воспроизводимостью в повторных экспериментах (табл. 2). Получено 53 фрагмента ПЦР размером от 132 до 1674 п. н. На одну комбинацию приходилось от 4 (F9-R9) до 7 (F10-R8,

F11-Em2, F10-R7) ампликонов. Часть маркеров оказалась информативной для выявления фрагментов амплификации, характерных для типа развития (озимый/яровой). С помощью шести комбинаций удалось получить специфичные ампликоны для сортовой идентификации (в табл. 2 помечены звездочкой).

Электрофореграмма результатов ПЦР с комбинацией праймеров F9-R8 представлена на рис. 3. Существенные различия по ДНК-профилю обнаружены между озимыми (I) и яровыми сортами рапса (II) (объединены фигурными скобками). Стрелками обозначены сортоспецифичные ПЦР-продукты для озимого рапса Столичный (508 п. н.) и яровой сурепицы Надежда (700 п. н.), а также отсутствие у сорта Подмосковный ампликона размером 460 п. н., характерного для других образцов рапса из группы яровых.

Анализ показал, что по трем маркерным комбинациям (F11-Em2, F10-R7 и Me4-R7) в общей коллекции выделялись сорта рапса Грант и Новосёл, по двум (F13-R9 и Me4-R7) – Горизонт и Луговской. Сорт ВИК 2 можно идентифицировать с помощью маркеров в сочетании F9-Em2, а яровой рапс Велес – F10-R7. Специфичные ДНК-спектры получены для сортов рапса Столичный, Подмосковный и сурепицы Надежда с применением комбинации F9-R8.

Данные генотипирования были преобразованы в форму бинарной матрицы и послужили основанием для расчета индексов генетических расстояний по Нею (табл. 3). Наибольший коэффициент генетического сходства обнаружен между сортами рапса ярового типа Викрос и Бизон (1.0), а также Велес и Бизон (0.9655). Наименьшим значением этого показателя (0.7069) характеризовались сорта Горизонт, Новосёл и Грант. Одинаково высокий индекс генетических дистанций (0.3228) свидетельствовал о существенных различиях между двумя парами сортов – Грант и ВИК 2, Луговской и Столичный. Низкий коэффициент, а, следовательно, высокое генетическое сходство обнаружено между яровыми сортами Бизон и Викрос (нулевая

Таблица 2. Характеристика SRAP-праймеров для анализа ДНК-полиморфизма сортов рапса и сурепицы

Комбинация праймеров	Последовательность нуклеотидов	Размер ПЦР-продукта, п. н.
F13-R7	CGAATCTTAGCCGGCAC/ GACTGCGTACGAATTGAG	266–624
F10-R8	GTAGCACAAGCCGGAAG/ GACACCGTACGAATTGAC	248–1140
*F13-R9	CGAATCTTAGCCGGCAC/ GACTGCGTACGAATTCCA	353–1674
F9-R9	GTAGCACAAGCCGGACC/ GACTGCGTACGAATTCCA	145–849
*Me4-R7	CGAATCTTAGCCGGAAT/ GACTGCGTACGAATTGAG	300–806
*F11-Em2	CGAATCTTAGCCGGATA/ GACTGCGTACGAATTCGG	175–712
*F10-R7	GTAGCACAAGCCGGAAG/ GACTGCGTACGAATTGAG	132–628
*F9-Em2	GTAGCACAAGCCGGACC/ GACTGCGTACGAATTCGG	209–1025
F13-R8	CGAATCTTAGCCGGCAC/ GACACCGTACGAATTGAC	107–688
*F9-R8	GTAGCACAAGCCGGACC/ GACACCGTACGAATTGAC	205–700

Примечание. Для синтеза праймеров использована информация о последовательности нуклеотидов из (Li, Quiros, 2001).

дистанция) и образцами озимого типа Гарант, Северянин, Столичный, Норд, Лауреат (0.0174).

По результатам ПЦР-анализа с применением двух типов маркеров (SSR и SRAP) были определены показатели генетической изменчивости и построена итоговая дендрограмма филогенетических взаимосвязей мето-

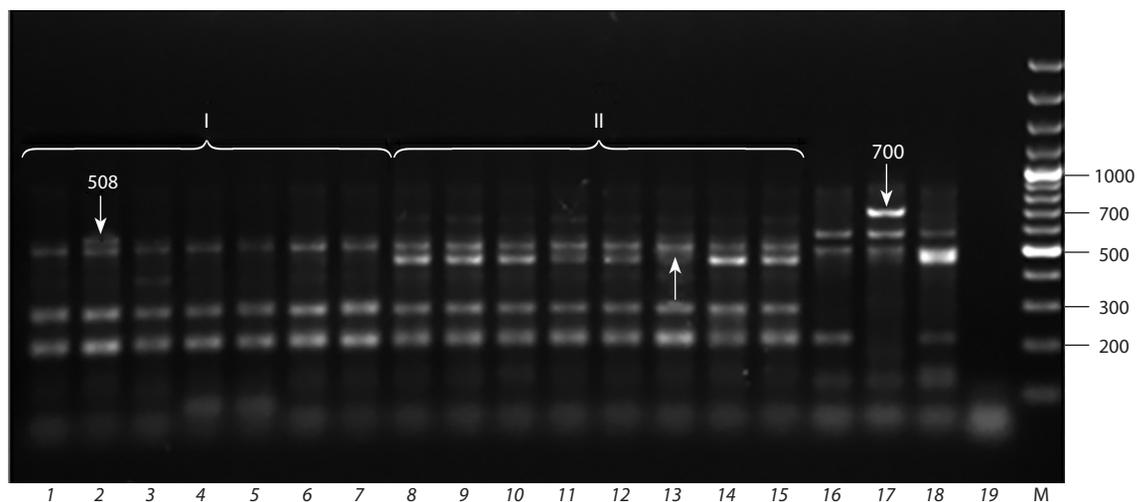


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при амплификации сортов рапса и сурепицы с комбинацией SRAP-праймеров F9-R8.

Сорта рапса: озимого типа Северянин (1), Столичный (2), ВИК 2 (3), Норд (4), Лауреат (5), Горизонт (6), Гарант (7); ярового типа Викрос (8), Новик (9), Новосёл (10), Велес (11), Грант (12), Подмосковный (13), Луговской (14), Бизон (15). Сорта сурепицы: озимого типа Заря (16); ярового типа Надежда (17), Светлана (18). 19 – контроль (H₂O); М – маркер молекулярной массы (100 kb DNA Ladder).

Таблица 3. Индексы генетического сходства (над диагональю) и дистанции Нея (под диагональю), рассчитанные на основе результатов SRAP-анализа

№ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	****	0.9655	0.8966	0.9655	0.9655	0.9138	0.9828	0.8103	0.7931	0.7586	0.8448	0.7586	0.7931	0.7586	0.8103
2	0.0351	****	0.8966	0.9655	0.9655	0.9138	0.9828	0.7759	0.7586	0.7241	0.8103	0.7241	0.7586	0.7241	0.7759
3	0.1092	0.1092	****	0.931	0.8966	0.9138	0.9138	0.7414	0.7586	0.7586	0.7759	0.7241	0.7586	0.7586	0.7414
4	0.0351	0.0351	0.0715	****	0.9655	0.9483	0.9828	0.8103	0.7931	0.7586	0.8448	0.7586	0.7931	0.7586	0.8103
5	0.0351	0.0351	0.1092	0.0351	****	0.9138	0.9828	0.8103	0.7931	0.7586	0.8448	0.7586	0.7931	0.7586	0.8103
6	0.0902	0.0902	0.0902	0.0531	0.0902	****	0.931	0.7586	0.7414	0.7069	0.7931	0.7069	0.7759	0.7414	0.7586
7	0.0174	0.0174	0.0902	0.0174	0.0174	0.0715	****	0.7931	0.7759	0.7414	0.8276	0.7414	0.7759	0.7414	0.7931
8	0.2103	0.2538	0.2992	0.2103	0.2103	0.2763	0.2318	****	0.9483	0.9138	0.9655	0.9138	0.9483	0.8793	1
9	0.2318	0.2763	0.2763	0.2318	0.2318	0.2992	0.2538	0.0531	****	0.8966	0.9483	0.8966	0.9655	0.8621	0.9483
10	0.2763	0.3228	0.2763	0.2763	0.2763	0.3469	0.2992	0.0902	0.1092	****	0.9138	0.8966	0.8966	0.8621	0.9138
11	0.1686	0.2103	0.2538	0.1686	0.1686	0.2318	0.1892	0.0351	0.0531	0.0902	****	0.9138	0.9483	0.8793	0.9655
12	0.2763	0.3228	0.3228	0.2763	0.2763	0.3469	0.2992	0.0902	0.1092	0.1092	0.0902	****	0.8966	0.931	0.9138
13	0.2318	0.2763	0.2763	0.2318	0.2318	0.2538	0.2538	0.0531	0.0351	0.1092	0.0531	0.1092	****	0.8966	0.9483
14	0.2763	0.3228	0.2763	0.2763	0.2763	0.2992	0.2992	0.1286	0.1484	0.1484	0.1286	0.0715	0.1092	****	0.8793
15	0.2103	0.2538	0.2992	0.2103	0.2103	0.2763	0.2318	0	0.0531	0.0902	0.0351	0.0902	0.0531	0.1286	****

Примечание. № 1–15 – сорта рапса Северянин, Столичный, ВИК 2, Норд, Лауреат, Горизонт, Гарант, Викрос, Новик, Новосёл, Велес, Грант, Подмосковский, Луговой, Бизон.

Таблица 4. Показатели генетической изменчивости сортов рапса по результатам анализа с использованием SRAP- и SSR-маркеров

Маркер	Размер ПЦП-продукта, п. н.	Общее количество ПЦП-продуктов	Эффективное число аллелей (ne)	Гетерозиготность (He)	Индекс Шеннона (I)
SRAP-маркеры					
¹ F13-R7	266–624	6	1.20	0.12	0.18
¹ F10-R8	248–1140	7	1.33	0.18	0.25
¹ F13-R9	353–1674	6	1.18	0.12	0.20
¹ F9-R9	145–849	4	1.25	0.12	0.17
¹ Me4-R7	300–806	6	1.02	0.02	0.04
¹ F11-Em2	175–712	7	1.23	0.14	0.22
¹ F10-R7	132–628	7	1.51	0.27	0.38
¹ F9-Em2	209–1025	10	1.27	0.17	0.28
¹ F13-R8	107–688	5	1.20	0.10	0.14
Среднее	–	6.44	1.24	0.14	0.21
SSR-маркеры					
² Na12A02	159–209	5	1.54	0.32	0.49
² Ni2C12	110–140	3	1.67	0.13	0.22
² Bna.M.010	145–173	3	1.25	0.19	0.34
³ Ni03H07a	132–1000	8	1.88	0.47	0.66
³ NiF02a	175–736	5	1.20	0.15	0.27
³ Ni02-D08a	135–1200	8	1.41	0.23	0.35
³ Ra02E01a	191–928	10	1.37	0.23	0.36
Среднее	–	6.00	1.47	0.25	0.38

Примечание. По данным ¹ (Rhouma et al., 2017); ² (Сатина, 2010); ³ (Chandra et al., 2013).

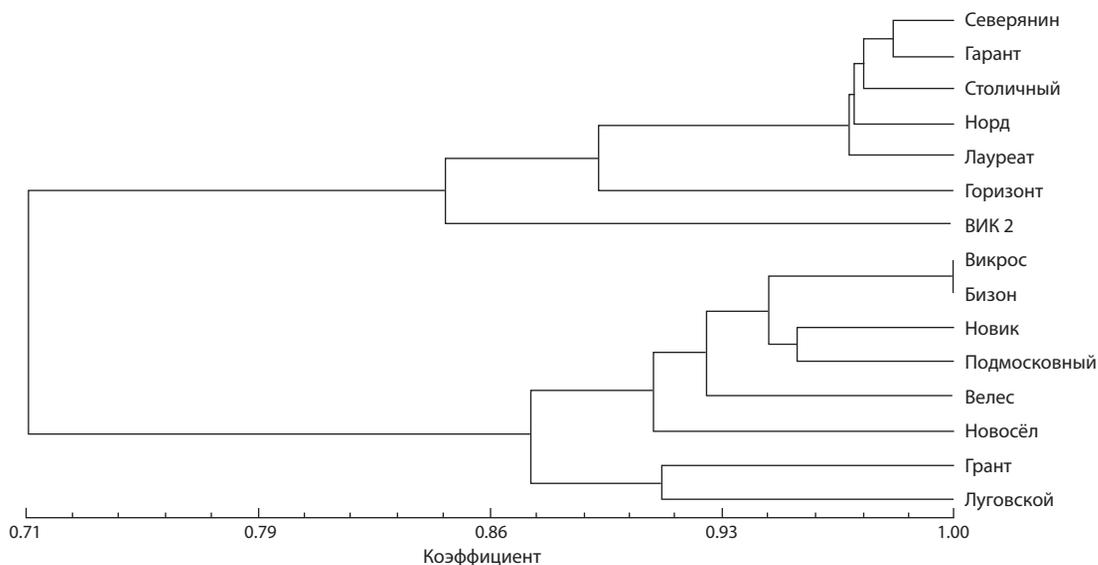


Рис. 4. Дендрограмма генетического сходства сортов рапса селекции ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса».

дом UPGMA. Для изучаемого сортового материала показана невысокая степень генетической гетерогенности. Причем большие значения таких показателей, как ожидаемая гетерозиготность (H_e) и число эффективных аллелей (n_e), выявлены при использовании SSR-маркеров, в среднем 0.25 против 0.14 и 1.47 на локус в сравнении с 1.24 соответственно. Однако SRAP-метод позволил получить больше ПЦР-продуктов, в том числе пригодных для сортовой дифференциации (табл. 4).

Из анализа общей UPGM-дендрограммы следует, что сорта рапса ярового и озимого типа разделились на два четко различимых кластера (рис. 4). В первой группе объединились озимые сорта Северянин, Гарант, Столичный, Норд, Лауреат, Горизонт, ВИК 2. Сорта ярового типа оказались во втором кластере. В группе озимого рапса выделялись ВИК 2 и Горизонт, находящиеся на значительных генетических дистанциях от других образцов. Напротив, близко расположились на ветвях генеалогического дерева сорта Столичный, Норд и Лауреат, а также Гарант и Северянин, что подтверждается высокими значениями индексов генетического сходства между ними, 0.9655 и 0.9828 соответственно (см. табл. 3). В кластере яровых наиболее удаленными на дендрограмме оказались двунулевые сорта Новосёл, Грант и Луговской. Для них определены максимальные показатели генетических дистанций в своей группе (0.3469 и 0.3228). Бизон и Викрос разместились в одной подгруппе на общей ветви дендрограммы.

Обсуждение

«Балк-стратегия» формирования суммарной навески из 30 проростков растений на сорт позволила нам значительно сократить усилия и затраты на проведение исследования в сравнении с традиционным способом анализа индивидуальных генотипов. Эффективность метода показана для разных культур, особенно при масштабных исследованиях больших популяций (Liu et al., 2018). Однако такой подход является оправданным лишь при условии использования репрезентативной выборки для

анализа. Для перекрестноопыляющихся видов с высоким уровнем внутривидовой изменчивости общий образец должен включать не менее 30–50 растений от сорта. В этом случае существенно выше вероятность учета редких аллелей, встречающихся в популяции с частотой ниже 10 % (Crossa, 1989; Semerikov et al., 2002). Растения рапса озимого типа обладают высокой способностью к самоопылению – до 70 % цветков (Шпаар, 2012), многие сорта относятся к линейным, тогда как у ярового рапса, по данным некоторых исследователей (Осипова, 1998), доля перекрестного опыления доходит до 40 %. Сурепица – перекрестноопыляемая культура. В связи с этим в наших исследованиях по оценке генетического полиморфизма использовали достаточно большую выборку – 30 проростков на «балк-образец».

Значительная часть SSR-праймеров, испытанных в нашей работе, генерировала мономорфные фрагменты амплификации, не позволяющие оценить уровень генетического разнообразия материала, или характеризовалась низкой воспроизводимостью результата в повторных экспериментах. Доля маркеров, эффективных для выявления межсортового полиморфизма ДНК, составила 16.7 %, что существенно ниже, чем определялось для SSR-локусов в работах других исследователей (Plieske, Struss, 2001; Hasan et al., 2008; Tian et al., 2017). Вероятно, это обусловлено составом анализируемой коллекции, имеющей узкую генетическую основу с учетом происхождения сортов. При этом величина ряда показателей генетической изменчивости (количество обнаруженных аллельных вариантов, частота встречаемости отдельных аллелей, PIC и H_e) оказалась сопоставимой с результатами, известными из доступных источников литературы (Сатина, 2010; Клуаченко et al., 2018).

В основном используемые маркеры показывали полиморфизм ДНК между рапсом и сурепицей, а также между образцами озимого и ярового типа внутри каждого вида. Однако маркер Na12A02 оказался сортоспецифичным для ярового рапса Бизон и озимой сурепицы

Заря, а Ra02-E01a – для озимого рапса ВИК 2 и яровой сурепицы Светлана. Уникальными аллелями по микросателлитному локусу Ni02-D08a выделялись сорта рапса Подмосковный и Луговской. Указанные маркеры могут служить для сортовой ДНК-идентификации и генетической паспортизации.

Наибольшей эффективностью характеризовались SSR-праймеры к маркерам генов устойчивости к *Alternaria bligh* генотипов индийской горчицы (Chandra et al., 2013). Это, в частности, праймеры Ni02-D08a, Ni03H07a и RA02-E01a. С ними обнаружены специфичные фрагменты амплификации для линейного сорта ВИК 2 и озимого рапса Горизонт, который получен на его основе путем промораживания семян и отборов на низкотемпературном фоне. Общие свойства этих сортов – высокая зимостойкость и устойчивость к поражению альтернариозом. В связи с этим результаты настоящего исследования могут быть полезны при отборе перспективного селекционного материала и для дальнейшего QTL-анализа на устойчивость к болезням.

Среди сортов рапса ярового типа существенно отличался от других Велес, тогда как Луговской и Грант обладали значительным сходством в исследуемых микросателлитных участках генома. Велес – новый перспективный сорт, допущенный к использованию с 2021 г., разработан на основе сорта Викрос методом химического мутагенеза, который приводит к высокой частоте нуклеотидных замен. Возможно, с этим связано появление уникальных аллелей у сорта Велес сразу по трем локусам, Ni2C12, Ra02-E01a и Na12A02. При этом с маркером Ni2C12 специфичный ДНК-профиль получен и для сорта Викрос.

В основе создания сорта Грант лежит метод межвидовой и межсортовой гибридизации скороспелых образцов иностранной селекции и высокопродуктивных сортов Луговской и Викрос селекции ФНЦ «ВИК им. В.П. Вильямса». Общность происхождения, очевидно, служит причиной сходства, выявленного на генетическом уровне, между сортами Грант и Луговской.

В целом SSR-анализ оказался недостаточно эффективным способом для идентификации сортов в изучаемой коллекции: из общего набора праймеров к микросателлитным локусам генома лишь четыре (10.5 %) определены как сортоспецифичные при оценке рапса, и один (2.3 %) – яровой сурепицы Надежда (маркер Ni03H07a).

Для изучения полиморфизма ДНК дополнительно применяли SRAP-анализ. SRAP относятся к третьему поколению молекулярных маркеров, изначально разрабатывались для генов *B. oleracea* L. (Li, Quiros, 2001), но в настоящее время успешно используются для оценки генетического разнообразия и создания генетических карт многих видов растений (Aneja et al., 2012; Rhouma et al., 2017; Liu et al., 2018). Метод простой, недорогой и эффективный, отличается высокой воспроизводимостью результатов.

В нашей работе с помощью данной техники маркирования удалось выделить шесть комбинаций праймеров, пригодных для идентификации восьми сортов рапса и одного сорта сурепицы. Две комбинации SRAP-праймеров из числа информативных – F10-R7 и F9-Em2 – можно с одинаковой эффективностью использовать для межвидовой

и межсортовой дифференциации в рамках тестируемой выборки.

Итоговая дендрограмма филогенетических отношений позволила визуально оценить степень сходства или генетической удаленности изучаемого сортового материала. К примеру, близкое расположение на ветвях генеалогического дерева сортов рапса Столичный, Норд и Лауреат, видимо, обусловлено особенностями их происхождения: отборы на зимостойкость из комбинаций, где одним из родителей был районированный сорт озимого рапса Проминь.

В общей подгруппе на малой генетической дистанции друг от друга (0.0174) расположились сорта рапса Гарант, созданный путем отборов на зимостойкость, и Северянин, полученный в результате промораживания исходного материала в климокамере с последующим индивидуально-семейным отбором. Наряду с высокой зимостойкостью, эти сорта обладают устойчивостью к полеганию и грибным патогенам.

Обособленным положением в группе яровых выделялся двулулевой сорт Новосёл (генетическая дистанция по Нею 0.3469). Он разработан на основе образцов иностранной селекции и отечественных сортов Луговской и Викрос, характеризующихся скороспелостью и высокой продуктивностью. По срокам созревания Новосёл превышает сорта-стандарты, отличается повышенной устойчивостью к альтернариозу.

Яровые сорта рапса Бизон и Викрос расположились на одной ветви дендрограммы. Оба сорта созданы методом внутривидовой гибридизации, но имеют разных родителей, характеризуются стабильной продуктивностью, раннеспелостью и низким содержанием глюкозинолатов.

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют об эффективности SSR- и SRAP-маркеров для оценки ДНК-полиморфизма сортов рапса и сурепицы селекции ФНЦ «ВИК им. В.П. Вильямса». При этом более высокой степенью информативности отличался SRAP-метод: 36 % от общего числа испытанных маркеров оказались полиморфными, тогда как для микросателлитных локусов этот показатель равнялся 16.7 %.

С применением двух техник молекулярного анализа определены ДНК-идентификационные маркеры для 10 из 15 сортов рапса и 2 сортов сурепицы. По микросателлитным локусам Na12A02, Ni2C12, Ra02-E01 и Ni02-D08a уникальные ПЦР-продукты получены для сортов рапса Бизон, Велес, Викрос, ВИК 2, Подмосковный и Луговской. С маркером Ni03H07a выделялась яровая сурепица Надежда. В наборе SRAP-праймеров эффективными для выявления межсортовых различий оказались комбинации: F13-R9, Me4-R7, F11-Em2, F10-R7, F9-Em2, F9-R8. С помощью этих маркеров удалось обнаружить сортоспецифичные ампликоны или получить уникальные ДНК-профили для сортов ярового и озимого рапса Грант, Новосёл, Горизонт, Столичный, Луговской, Подмосковный и яровой сурепицы Светлана.

Результаты данного исследования могут быть использованы при создании перспективных форм и гибридов, для генетической паспортизации, контроля сортовой чистоты семенного материала.

Список литературы / References

- Воловик В.Т. Капустные культуры. Народно-хозяйственное значение. В: Основные виды и сорта кормовых культур: Итоги научной деятельности Центрального селекционного центра. М.: Наука, 2015;249-253.
[Volovik V.T. Brassicas: the Economic Importance. In: The Basic Species and Varieties of Fodder Crops: Results of the Research Activity of the Central Breeding Center. Moscow: Nauka Publ., 2015; 249-253. (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорта растений (официальное издание). М.: Росинформагротех, 2021.
[State Register of Selection Achievements Admitted for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2021. (in Russian)]
- Клименко И.А., Козлов Н.Н., Костенко С.И., Шамустакимова А.О., Мавлютов Ю.М. Идентификация и паспортизация сортов кормовых трав (клевера лугового, люцерны изменчивой, посевной и хмелевидной) на основе ДНК-маркеров (методические рекомендации). М.: ООО «Угреша Т», 2020а. DOI 10.33814/978-5-6043194-9-9.
[Klimenko I.A., Kozlov N.N., Kostenko S.I., Shamustakimova A.O., Mavlyutov Yu.M. Identification and Certification of Forage Grass Varieties (Red Clover, Sand Alfalfa, Common Alfalfa, and Black Medick Alfalfa) on the Base of DNA Markers: Methodological Recommendations. Moscow: Ugresha T Publ., 2020a. DOI 10.33814/978-5-6043194-9-9. (in Russian)]
- Клименко И.А., Костенко С.И., Мавлютов Ю.М., Шамустакимова А.О. Эффективность SSR- и Paws-маркеров для оценки генетического полиморфизма сортов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции. 2020б;181(3):100-109. DOI 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109.
[Klimenko I.A., Kostenko S.I., Mavlyutov Yu.M., Shamustakimova A.O. The efficiency of SSR-and Paws markers for genetic polymorphism evaluation of red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2020b;181(3):100-109. DOI 10.30901/2227-8834-2020-3-100-109. (in Russian)]
- Косолапов В.М., Шамсутдинов З.Ш., Костенко С.И., Пилипко С.В., Тюрин Ю.С., ... Иванов И.С., Сапрыкина Н.В., Трузина Л.А., Чуйков В.А., Георгиади Н.И. Сорта кормовых культур селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В.Р. Вильямса». М.: ООО «Угрешская типография», 2019.
[Kosolapov V.M., Shamsutdinov Z.Sh., Kostenko S.I., Pilipko S.V., Tyurin Yu.S., ..., Ivanov I.S., Saprykina N.V., Truzina L.A., Chuykov V.A., Georgiadi N.I. Varieties of Forage Crops Bred at Williams Federal Scientific Center for Fodder Production and Agroecology. Moscow: Ugreshskaya Tipografiya Publ., 2019. (in Russian)]
- Лемеш В.А., Мозгова Г.В., Грушецкая З.Е., Сидоренко Е.В., Пиллюк Я.Э., Бакановская А.В. Использование специфических ДНК-маркеров для идентификации аллелей генов *FAD3* у рапса (*Brassica napus* L.). Генетика. 2015;51(8):895-904. DOI 10.7868/S0016675815080044.
[Lemesh V.A., Mozgova G.V., Grushetskaya Z.E., Sidorenko E.V., Pilyuk Ya.E., Bakanovskaya A.V. The use of specific DNA markers for the identification of alleles of the *FAD3* genes in rape (*Brassica napus* L.). *Russ. J. Genet.* 2015;51(8):765-773. DOI 10.1134/S1022795415080044.]
- Мозгова Г.В., Хоружий Н.Е., Амосова А.В., Пиллюк Я.Э., Белявский В.М., Храмченко С.Ю., Муравенко О.В., Лемеш В.А. Генетический полиморфизм рапса (*Brassica napus*) в связи с морозостойкостью. Молекуляр. и прикл. генетика. 2019;26:34-44.
[Mozgova G.V., Khoruzhy N.E., Amosova A.V., Pilyuk Ya.E., Belyavskiy V.M., Khranchenko S.Yu., Muravenko O.V., Lemesh V.A. Genetic polymorphism of *Brassica napus* related to cold tolerance. *Molekulyarnaya i Prikladnaya Genetika = Molecular and Applied Genetic*. 2019;26:34-44. (in Russian)]
- Осипова Г.М. Рапс в Сибири (морфологические, генетические и селекционные аспекты). Рос. акад. с.-х. наук. Сиб. отд-ние. Сиб. НИИ кормов. Новосибирск, 1998.
[Osipova G.M. Rapeseed in Siberia: Morphological, Genetic, and Breeding Aspects. Novosibirsk: Siberian Branch of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 1998. (in Russian)]
- Рогожина Т.Г., Анискина Ю.В., Карпачев В.В., Шилов И.А. Использование микросателлитного анализа для выявления биотипов у сортов ярового рапса (*Brassica napus* L.). Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2015;2(162):27-33.
[Rogozhina T.G., Aniskina Yu.V., Karpachev V.V., Shilov I.A. An application of microsatellite analysis for detection of biotypes from spring rapeseed cultivars (*Brassica napus* L.). *Maslichnye Kultury. Nauchno-Tekhnicheskij Byulleten Vserossiyskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Maslichnykh Kultur = Oil Crops. Scientific and Technical Bulletin of the All-Russian Research Institute of Oil Crops*. 2015;2(162):27-33. (in Russian)]
- Сатина Т.Г. Технология генотипирования на основе микросателлитного анализа в селекции рапса (*Brassica napus* L.): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010.
[Satina T.G. A protocol for genotyping based on microsatellite analysis in rapeseed (*Brassica napus* L.) breeding: Cand. Sci. (Biol.) Dissertation. Moscow, 2010. (in Russian)]
- Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011;15(4):757-768.
[Khlestkina E.K. Molecular methods of analysis of structural and functional organization of genes and genomes in higher plants. *Vavilovskij Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2011;15(4):757-768. (in Russian)]
- Чесноков Ю.В. Генетические маркеры: сравнительная классификация молекулярных маркеров. Овощи России. 2018;3:11-15. DOI 10.18619/2072-9146-2018-3-11-15.
[Chesnokov Yu.V. Genetic markers: comparative classification of molecular markers. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*. 2018; 3:11-15. DOI 10.18619/2072-9146-2018-3-11-15. (in Russian)]
- Шпаар Д. Рапс и сурепица: выращивание, уборка, хранение и использование. Киев: Издательский дом «Зерно», 2012.
[Shpaar D. Rapeseed and Wild Cabbage: Cultivation, Harvesting, Storage, and Utilization. Kiev: Zerno Publ., 2012. (in Russian)]
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 2008;27(4):617-631. DOI 10.1007/s00299-008-0507-z.
- Amosova A.V., Zemtsova L.V., Grushetskaya Z.E., Samatadze T.E., Mozgova G.V., Pilyuk Y.E., Volovik V.T., Melnikova N.V., Zelenin A.V., Lemesh V.A., Muravenko O.V. Intraspecific chromosomal and genetic polymorphism in *Brassica napus* L. detected by cytogenetic and molecular markers. *J. Genet.* 2014;93:133-143. DOI 10.1007/s12041-014-0351-6.
- Ananga A.O., Ceibert E., Ochieng J.W., Kumar S., Kambiranda D., Vasanthaiah H., Tsolova V., Senwo Z., Konan K., Anike F.N. Prospects for transgenic and molecular breeding for cold tolerance in canola (*Brassica napus* L.). In: Akpan U.G. (Ed.). Oilseeds. London: IntechOpen, 2012;108-129. DOI 10.5772/32721.
- Aneja B., Yadav N.R., Chawla V., Yadav R.C. Sequence related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Mol. Breeding*. 2012;30:1635-1648. DOI 10.1007/s11032-012-9747-2.
- Chandra V., Pant U., Bhalan R., Singh A.K. Studies on genetic diversity among *Alternaria* blight tolerant Indian mustard genotypes using SSR markers. *Bioscan*. 2013;8(4):1431-1435.

- Chen G., Geng J., Rahman M., Liu X., Tu J., Fu T., Li G., McVetty P.B.E., Tahir M. Identification of QTL for oil content, seed yield, and flowering time in oilseed rape (*Brassica napus*). *Euphytica*. 2010;175:161-174. DOI 10.1007/s10681-010-0144-9.
- Chesnokov Y.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agric. Biol.* 2015;50(5): 571-578. DOI 10.15389/agrobiol.2015.5.571eng.
- Crossa J. Methodologies for estimating the sample-size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theor. Appl. Genet.* 1989;77:153-161.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1983;1(4):19-21. DOI 10.1007/BF02712670.
- Gao M., Li G., Yang B., Qiu D., Farnham M., Quiros C.F. High-density *Brassica oleracea* map: Identification of useful new linkages. *Theor. Appl. Genet.* 2007;115(2):277-287. DOI 10.1007/s00122-007-0568-3.
- Geng J., Javed N., McVetty P.B.E., Li G., Tahir M. An integrated genetic map for *Brassica napus* derived from double haploid and recombinant inbred populations. *Hered. Genet.* 2012;1(1):103. DOI 10.4172/2161-1041.1000103.
- Hasan M., Friedt W., Pons-Kühnemann J., Freitag N.M., Link K., Snowden R.J. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theor. Appl. Genet.* 2008;116(8):1035-1049. DOI 10.1007/s00122-008-0733-3.
- Kirby K.S., Cook E.A. Isolation of deoxyribonucleic acid from mammalian tissues. *Biochem. J.* 1967;104(1):254-257. DOI 10.1042/bj1040254.
- Klyachenko O.L., Prysiazniuk L.M., Shofolova N.V., Piskova O.V. Polymorphism in spring and winter rapeseed varieties (*Brassica napus* L.) identified by SSR markers. *Plant Var. Stud. Prot.* 2018; 14(4):366-374. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151898.
- Li G., Quiros C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103(2):455-461. DOI 10.1007/s001220100570.
- Liu S., Feuerstein U., Luesink W., Schulze S., Asp T., Studer B., Becker H.C., Dehmer K.J. DaRT, SNP, and SSR analyses of genetic diversity in *Lolium perenne* L. using bulk sampling. *BMC Genetics*. 2018;19(1):10. DOI 10.1186/s12863-017-0589-0.
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76(10):5269-5273. DOI 10.1073/pnas.76.10.5269.
- Piquemal J., Cinquin E., Couton F., Rondeau C., Seignoret E., Doucet I., Perret D., Villeger M.-J., Vincourt P., Blanchard P. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(8):1514-1523. DOI 10.1007/s00122-005-0080-6.
- Plieske J., Struss D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theor. Appl. Genet.* 2001;102(5):689-694. DOI 10.1007/s001220051698.
- Rhouma H.B., Taski-Ajdukovic K., Zitouna N., Sdouga D., Milic D., Trifi-Farah N. Assessment of the genetic variation in alfalfa genotypes using SRAP markers for breeding purposes. *Chil. J. Agric. Res.* 2017;77(4):332-339. DOI 10.4067/S0718-58392017000400332.
- Rohlf F.J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.10 manual. Applied Biostatistics. Inc. New York: Exeter Software, 2000.
- Semerikov V.L., Belyaev A.Y., Lascoux M. The origin of Russian cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) and their genetic relationships to wild populations in the Urals. *Theor. Appl. Genet.* 2002; 106:127-132.
- Sharma M., Dolkar D., Salgotra R., Sharma D., Singh P.A., Gupta S.K. Molecular marker assisted confirmation of hybridity in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2018; 7(9):894-900. DOI 10.20546/ijcmas.2018.709.107.
- Snowden R.J., Friedt W. Molecular markers in *Brassica* oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding*. 2004; 123(1):1-8. DOI 10.1111/j.1439-0523.2003.00968.x.
- Tian H.Yu., Channa S.A., Hu Sh. Relationships between genetic distance, combining ability and heterosis in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica*. 2017;213(1):1-11. DOI 10.1007/s10681-016-1788-x.
- Yeh F.C., Yang R., Boyle T.J., Ye Z., Xiyan J.M. PopGene 32, Microsoft window-based freeware for population genetic analysis, version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.

ORCID ID

I.A. Klimenko orcid.org/0000-0002-1850-3859
A.A. Antonov orcid.org/0000-0002-7684-0503
A.O. Shamustakimova orcid.org/0000-0003-3535-3108
Y.M. Mavlyutov orcid.org/0000-0002-5695-6242

Благодарности. Финансирование исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (проект № 0442-2019-0001AAAA-A19-119122590053-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.08.2021. После доработки 09.03.2022. Принята к публикации 09.03.2022.

Identification of the gene coding for seed cotyledon albumin SCA in the pea (*Pisum L.*) genome

A.V. Mglinets, V.S. Bogdanova, O.E. Kosterin

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

Abstract. Albumins SCA and SAA are short, highly hydrophilic proteins accumulated in large quantities in the cotyledons and seed axes, respectively, of a dry pea (*Pisum sativum L.*) seed. SCA was earlier shown to have two allelic variants differing in mobility in polyacrylamide gel electrophoresis in acid medium. Using them, the corresponding gene SCA was mapped on Linkage Group V. This protein was used as a useful genetic and phylogeographical marker, which still required electrophoretic analysis of the protein while the DNA sequence of the corresponding SCA gene remained unknown. Based on the length, the positive charge under acidic conditions and the number of lysine residues of SCA and SAA albumins, estimated earlier electrophoretically, the data available in public databases were searched for candidates for the SCA gene among coding sequences residing in the region of the pea genome which, taking into account the synteny of the pea and *Medicago truncatula* genomes, corresponds to the map position of SCA. Then we sequenced them in a number of pea accessions. Concordance of the earlier electrophoretic data and sequence variation indicated the sequence *Psat0s797g0160* of the reference pea genome to be the SCA gene. The sequence *Psat0s797g0240* could encode a minor related albumin SA-a2, while a candidate gene for albumin SAA is still missing (as well as electrophoretic variation of both latter albumins). DNA amplification using original primers SCA1_3f and SCA1_3r from genomic DNA and restriction by endonuclease *HindIII* made it possible to distinguish the SCA alleles coding for protein products with different charges without sequencing the gene. Thus, the gene encoding the highly hydrophilic albumin SCA accumulated in pea seeds, the alleles of which are useful for classification of pea wild relatives, has now been identified in the pea genome and a convenient CAPS marker has been developed on its basis.

Key words: late embryogenesis proteins; seed cotyledon albumin; peas; *Pisum sativum L.*; CAPS marker.

For citation: Mglinets A.V., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. Identification of the gene coding for seed cotyledon albumin SCA in the pea (*Pisum L.*) genome. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):359-364. DOI 10.18699/VJGB-22-43

Идентификация гена, кодирующего альбумин семядолей SCA, в геноме гороха (*Pisum L.*)

А.В. Мглинец, В.С. Богданова, О.Э. Костерин

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

Аннотация. Альбумины SCA и SAA – короткие гидрофильные белки, содержащиеся в высокой концентрации в семядолях и оси семени сухих семян гороха (*Pisum sativum L.*). Ранее показано, что альбумин SCA имеет два аллельных варианта, различающихся подвижностью в электрофорезе в полиакриламидном геле в кислой среде. С их помощью соответствующий ген SCA картирован в группе сцепления V. Белок SCA был использован как генетический и филогеографический маркер, что до сих пор предполагало проведение электрофореза белков, тогда как последовательность кодирующего гена SCA оставалась неизвестной. На основе данных, доступных в публичных репозиториях, в районе генома гороха, соответствующего позиции гена SCA на генетической карте с учетом синтении геномов гороха и люцерны, осуществлен поиск кандидатов на роль этого гена в зависимости от длины его белкового продукта, положительного заряда в кислых условиях и количества остатков лизина, ранее оцененного электрофоретическими методами. Выявленные гены просеквенированы у ряда образцов гороха. Соответствие полученных электрофоретических данных и нуклеотидной изменчивости позволило идентифицировать последовательность *Psat0s797g0160* из референсного генома гороха в качестве гена SCA. Последовательность *Psat0s797g0240*, возможно, кодирует родственный минорный альбумин SA-a2, тогда как ген-кандидат альбумина SAA остается неидентифицированным (как и электрофоретическая изменчивость двух белков, упомянутых последними). Амплификация ДНК с использованием оригинальных праймеров SCA1_3f и SCA1_3r и ге-

номной ДНК в качестве матрицы, а также расщепление ее эндонуклеазой рестрикции *HindIII* позволяющая различать аллели гена *SCA*, белковые продукты которых имеют разный заряд, без секвенирования. Таким образом, ген, кодирующий высокогидрофильный альбумин *SCA*, накапливающийся в семядолях гороха, аллели которого полезны для классификации диких родственников культурного гороха, идентифицирован в геноме гороха, и на его основе разработан удобный CAPS-маркер.

Ключевые слова: белки позднего эмбриогенеза; альбумины семядолей; горох; *Pisum sativum L.*; CAPS-маркер.

Introduction

Mature pea (*Pisum sativum L.*) seeds contain a large amount of protein families, which are generally classified as globulins (soluble in salt solutions) and albumins (soluble in water), the former being mostly storage proteins, the latter having a number of functions, including substitution of water in dry tissues (Smirnova et al., 1990). A number of albumins are extractable from seed flour with 5 % perchloric acid, which were characterised in detail by O.G. Smirnova et al. (1990, 1992). Special attention was drawn to the two most abundant of these albumins, which are biochemically and immunologically related and quite short (about 100 amino acid residues) highly hydrophilic peptides. One of them predominates in the cotyledons and the other in the seed axis, both accumulating during seed formation and depleting during germination. They were respectively named SCA (seed cotyledon albumin) and SAA (seed axis albumin). Their amino acid content and the accumulation pattern in seeds left no doubt as to their participation in substitution of water in dry seed cells, that is in a dehydrin-like function, although they differ in many respects from the known dehydrins and are much smaller proteins (Smirnova et al., 1992). While the SAA protein was electrophoretically monomorphic in peas, two allelic variants of SCA were revealed to differ in electrophoretic mobility in 15 % polyacrylamide gels containing acetic acid and urea according to S. Panyim and R. Chalkley (1969), which allowed to genetically map the relevant gene *SCA* (Smirnova et al., 1992; Rozov et al., 1993; Gorel et al., 1998) on linkage group V (corresponding to chromosome 3; Smýkal et al., 2012; Kreplak et al., 2019).

O.G. Smirnova et al. (1992) found out that the fast electromorph SCA^f was frequent in the wild subspecies of the common pea (*P. sativum* subsp. *elatius* Aschers. et Graebn.) but was extremely rare in the cultivated subspecies *P. sativum L.* subsp. *sativum*. (Here, the inclusive taxonomic system of peas according to N. Maxted and M. Ambrose (2001) is followed.) O.E. Kosterin and V.S. Bogdanova (2008) and O.E. Kosterin et al. (2010) noticed a strong concordance of the occurrence of SCA^f with that of the plastid *rbcL* allele containing a recognition site for the *Hsp* AI restriction endonuclease, and a less strong concordance with that of the mitochondrial *cox1* allele containing the recognition site for the *Psi* I restriction endonuclease. This concordance was interpreted in terms of the common phyletic origin and as evidence of the existence of two different wild pea lineages. Based on this, different combinations (A, B and C) of alleles of the three mentioned dimorphic marker genes *SCA*, *rbcL* and *cox1* from different cellular genomes, respectively nuclear, plastid and mitochondrial, were proposed for a simple classification of evolutionary lineages of the wild pea subspecies *P. sativum* subsp. *elatius* (Kosterin, Bogdanova, 2008; Kosterin et al., 2010), which

was then used repeatedly (Zaytseva et al., 2012, 2015, 2017; Kosterin, Bogdanova, 2021; Bogdanova et al., 2021). So, the electromorphs of SCA appeared to be useful in the studies of genetic diversity of the pea crop wild relatives, which are important for the involvement of their potentially useful genetic resources into breeding (Ali et al., 1994; Maxted, Kell, 2009; Coyne et al., 2011; Ford-Lloyd et al., 2011; Maxted et al., 2012). However, while the plastidic and mitochondrial markers were scored by the CAPS approach involving DNA amplification and restriction, the *SCA* gene sequence remained unknown and analysis of this marker required more laborious protein electrophoresis. Molecular identification of this gene would be desirable to facilitate the analysis. This became possible when the pea nuclear genome was published by K. Kreplak et al. (2019). This communication is devoted to identification of the *SCA* gene in the pea genome, its brief characterisation and working out a convenient CAPS marker based on this gene.

Materials and methods

The gene *SCA* was sequenced from samples of DNA extracted in the course of our previous work (Kosterin, Bogdanova, 2008), from the following pea germplasm accessions: 721 (Israel), CE1 (Crimea), CE11 (= JI3557, Portugal), JI1794 (Golan Heights), L100 (Israel), PI344538, Pse001, Pe013, P015, P017 (Turkey), VIR320' (Palestine) (*P. sativum* subsp. *elatius*), VIR3429 (Egypt), VIR4911 (Tibet), VIR5414 (Ethiopia), VIR7335 (Tajikistan), WL1238 (a testerline), cultivar Cameor (*P. sativum* subsp. *sativum*), VIR4871 (*Pisum sativum* subsp. *transcaucasicum* Govorov), VIR2759 (Ethiopia) (*Pisum abyssinicum* A. Br.), and WL2140 (Israel) (*P. fulvum* Sibth. et Smith). VIR accessions were received from N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, accessions 721, Pse001, Pe013, P15, P17, JI1794, L100 and Cameor were kindly provided by Dr. Norman Weeden, Cornell University, New York, accession PI344538 was kindly provided by Dr. Petr Smýkal, Olomouc University, the progenitors of accessions CE1 and CE11 were collected in nature by the third author. Polymerase chain reaction to amplify the fragment corresponding to *Psat0s797g0160* was carried out using BIS 208 cycler in 20 µl of the PCR reaction mixture under a mineral oil layer with the following cycling parameters: 95 °C for 3 min; 45 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 25 s and elongation at 72 °C for 40 s; final elongation at 72 °C for 5 min; for amplification of the fragment corresponding to *Psat0s797g0240* the same parameters were used but annealing was at 59 °C. For restriction analysis, 5 µl of the resulting reaction mixture were digested with 1 unit of *HindIII* endonuclease according to manufacturer's instructions and the products analysed on 1.5 % agarose gel in TAE buffer. The 100-bp ladder (SibEn-

zyme, Novosibirsk) was used as a molecular mass marker. For sequencing, PCR products were purified by 20 % polyethylene glycol 800 in 2.5 M NaCl. Sanger reaction was carried out using BrightDye Terminator version 3-100 (Nimagen, Netherlands) with the conditions recommended by the manufacturer for 50 cycles. The Sanger reaction products were purified using Sephadex G-75. Sequencing was carried out in Genomic Core Facility SB RAS, Novosibirsk. The sequences obtained in this study were submitted to European Nucleotide Archive with the following entry numbers OU953856- OU953865, OU953869- OU953881 for SCA and OU953866- OU953868, OU953882- OU953894 for alleles of *Psat0s797g0240*.

Results and discussion

Candidate gene for SCA seed albumin in public databases

The SCA gene is mapped on linkage group V (LGV) between the loci *His1* (coding for histone H1 subtype 1) and *coch* (*cochleata*) (Gorel et al., 1998) (its earlier published position behind *coch* (Rozov et al., 1993) was tentative as based on non-additive data with respect to these three loci). The potential candidates were searched in the annotated genome of *Medicago truncatula* Gaertn. making use of its synteny with the genome of *Pisum* (Kalo et al., 2004). The bordering markers *coch* and *His1* of pea correspond to the loci with Gene IDs 11417633 and 25499208, respectively, therefore suitable candidates found in *Medicago truncatula* should map to chromosome 7, syntenic to LGV of *P. sativum* (Kalo et al., 2004; Kreplak et al., 2019) at physical position between 42,203,622 (GeneID: 11417633) and 45,488,994 (GeneID: 25499208) on NC_053048.1 (*M. truncatula* strain A17 chromosome 7). This region contained 421 coding sequences, of which three neighbouring loci were annotated as “18 kDa seed maturation protein”. Two of them, *LOC11421661* and *LOC11437338*, encoded polypeptides of 105 and 101 amino acids, respectively. The third locus, *LOC11437936* encoded polypeptide of 177 amino acids. These polypeptides were used as a query to search the *P. sativum* genome assembly at <https://urgi.versailles.inra.fr/blast>. All three searches retrieved the same hits, *Psat0s797g0240* and *Psat0s797g0160*, separated by about 25 Kb on the scaffold 00797 not attributed to any chromosome and *Psat3g068920* on chr3LG5 with physical position between the loci *coch* and *His1*. *Psat3g068920* encoded polypeptide of 190 amino acids and probably corresponded to the *LOC11437936* of *M. truncatula* while *Psat0s797g0240* and *Psat0s797g0160* probably corresponded to *LOC11421661* and *LOC11437338*. Both encoded polypeptides of 101 amino acids and were concluded to be ideal candidates to represent the SCA locus.

Psat0s797g0160 with position 57,488–57,939 on scaffold00797, annotated as “Late embryogenesis abundant (LEA) group 1”, encoded a polypeptide of 101 amino acid residues including 18 positively charged residues, of which 10 were lysines. *Psat0s797g0240* with position 83,885–84,190 on scaffold00797, also annotated as “Late embryogenesis abundant (LEA) group 1”, encoded a polypeptide of 101 residues including 18 positively charged residues, of which 11 were lysines. The earlier obtained data on amino acid composition of the SCA protein were as follows. The slow electromorph SCA^s, common in cultivated peas, was estimated by the incomplete

succinylation method to possess 17 positively charged residues, including 9 lysines, and, together with data on the amino acid content, as being ca 107 residues long (Smirnova et al., 1992). This was a rather good correspondence of data from protein chemistry and sequencing. The estimate of 9 rather than 10 lysine residues in SCA^s with the incomplete succinylation method (Smirnova et al., 1992) may be explained by a tandem of two lysine residues in positions 47–48 of the deduced protein product, which could not both bind to succinic acid residues for steric reasons.

Hence the size and amino acid content of the protein products and genome location, as concluded from the synteny with *M. truncatula*, of both *Psat0s797g0160* and *Psat0s797g0240* corresponded to SCA (Smirnova et al., 1992; Gorel et al., 1998). To choose between them for a candidate for SCA we made use of the genetic data. SCA was shown to be dimorphic with allelic variants differing with respect to the number of positively charged amino acid residues while SAA was monomorphic in this respect (Smirnova et al., 1992). Sequences available in sequence read archives (SRA) at NCBI containing data of high throughput resequencing of pea accessions were used to assemble alleles of *Psat0s797g0160* and *Psat0s797g0240* from pea accessions W6_2107 (BioProject PRJNA431567), JI1794, WL2140 (*Pisum fulvum* Sibth. et Smith) (BioProject PRJNA431567), JI2202 (*Pisum abyssinicum* A.Br.) (BioProject PRJNA285605), 711 (BioProject PRJEB30482), 721 (BioProject PRJNA431567, PRJEB30482). Five of these accessions were involved in our previous electrophoretic studies of SCA (Kosterin, Bogdanova, 2008); Cameor and JI1794 were shown to have the slow electromorph SCA^s while WL2140, 711 and 721 had the fast electromorph SCA^f. There was some sequence variability among alleles of *Psat0s797g0160*. Two nucleotide substitutions differed in the alleles of Cameor, W6_2107 and JI1794 from those of WL2140, JI2202, 711, 721, namely T/G in the position 215 (from start codon) and A/C in the position 238. The T/G substitution changed valine for glycine, and the A/C substitution changed asparagine to histidine, which is positively charged under conditions of acetic acid-urea PAGE used for SCA analysis. Thus, the latter amino acid replacement affects electrophoretic mobility of the encoded protein and is associated with the fast electromorph. Allelic variants of *Psat0s797g0240* did not carry amino acid substitutions associated with the change of electrophoretic mobility. This allowed us to nominate *Psat0s797g0160* as a candidate for the SCA gene.

Concordance of the sequence variation of the candidate gene for SCA with SCA electrophoretic pattern

To confirm *Psat0s797g0160* to be the SCA gene we resequenced it in 20 pea accessions in which SCA was previously studied electrophoretically (Smirnova et al., 1992; Kosterin, Bogdanova, 2008; Kosterin et al., 2010). To design primers matching 3' and 5' non-coding regions we searched public databases for pea sequences coding for the same protein as *Psat0s797g0160*. The search retrieved the sequence *PUCA013656022.1* (*Pisum sativum*, cultivar Gradus No 2 flattened_line_3009, whole genome shotgun sequence) containing the coding sequence as well as 5' and 3' non-coding regions. The primers Ps_SCA1_3f (5' GCAT

Variants of the deduced amino acid sequences encoded by SCA alleles sequenced from pea accessions
(polymorphic positions boldfaced and highlighted)

Accession	Amino acid sequence
Cameor ¹	MEKTKETAANVGAAAKSGMEKTKANVQEKTERLTTRDPLEKELATQKKEERVAQAE ^{LDKQAARNHNAAATAVNTLGGQNHHTTGTGGNPNATGYGTGGTHR}
VIR4871 ²	MEKTKETAANVGASAKSGMEKTKANVQEKTERLTTRDPLEKELATQKKEERVAQAE ^{LDKQAARNHNAAATAVNTLGGQNHHTTGTGGNPNATGYGTGGTHR}
L100 ³	MEKTKETAANVGASAKSGMEKTKANVQEKTERLTTRDPLEKELATQKKEERVAQAE ^{LDKQAARNHNAAATAGNTLVGGQNHHTTGTGGNPNATGYGTGGTHR}
721 ⁴	MEKTKETAANVGAAAKSGMEKTKANVQEKTERLTTRDPLEKELATQKKEERVAQAE ^{LDKQAARNHNAAATAGNTLVGGQNHHTTGTGGNPNATGYGTGGTHR}
Pse001	MEKTKETAANVGASAKSGMEKTKANVQEKTERLTTRDPLEKELATQKKEERVAQAE ^{LDKQAARNHNAAATAGNTLVGGQNHHTTGTGGNPNATGYGTGGTHR}
WL2140	MEKTKETAANVGAAAKSGMEKTKANVQEKTERLTTRDPLEKELATQKKEERVAQAE ^{LDKQAARNHNAAATAGNTLVGGQNHHTTGTGGNPNATGYGTGGTHR}
Amino acid type	hnp ^h pn ^a aaahahaha ^a ph ^h hnp ^a pahah ⁿ ph ⁿ ph ⁿ ra ⁿ pn ^a ah ^h pp ⁿ np ^a ah ^a nan ⁿ pha ^a ph ^h ph ^a aaah ^a ah ^h hh ^h h ^h ph ^h hh ^h hh ^h rh ^a hh ^h hh ^h hh ^h pp ^p

Note. The lowest line shows amino acid types encoded as follows: a – aliphatic, h – hydrophilic, n – negatively charged in neutral conditions, p – positively charged in neutral conditions, r – proline, y – aromatic (tyrosine) (charged types boldfaced). ¹ the same in WL1238, VIR4911, VIR_5414, JI1794, CE1, P017, W6_10925; ² the same in P015; ³ the same in VIR320, VIR2759, VIR3429, VIR7335; ⁴ the same in W6_26109, Pe013, CE11, PI344009, PI344538.

CATACTCTTCAACACAT) and Ps_SCA1_3r (5' GTAG GAACATTCACAACATCA) were designed to match those non-coding regions. We sequenced the coding region of the SCA gene in two groups of 10 pea accessions each, including: (i) 711, 721, VIR320³, CE11, PI344538, Pe013 (*P. sativum* subsp. *elatius*), VIR2759 (*Pisum abyssinicum* A.B.), VIR3429, VIR7335 (*P. sativum* subsp. *sativum*) and WL2140 (*P. fulvum*) which were shown (Kosterin and Bogdanova, 2008) to have the fast SCA electromorph (SCA^f), frequent in wild peas, and (ii) accessions CE1, JI1794, Pse001, P015, P017 (*P. sativum* subsp. *elatius*), VIR4871 (*Pisum sativum* subsp. *transcaucasicum*), VIR4911, VIR5414, WL1238 and Cameor (*P. sativum* subsp. *sativum*) which were shown to have the slow SCA electromorph (SCA^s), predominating overwhelmingly in the cultivated pea but occurring in wild peas as well. The derived amino acid sequences had 19 and 18 positively charged amino acid residues in the first and second group, respectively. Full correspondence of the electrophoretic and sequence data, together with the genomic position and the size and content of the protein product, indicate that *Psat0s797g0160* is the SCA gene (the latter designation will be used in the text below).

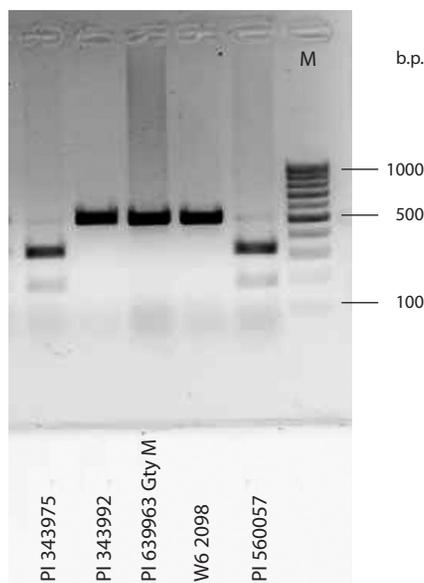
The related gene *Psat0s797g0240*

The gene *Psat0s797g0240* resides in the pea genome (cultivar Cameor) in about 25 Kb from *Psat0s797g0160*, the two loci have very similar sequence, and the difference in their coding sequences is 25 nucleotides (8.2 %). Obviously, these genes are paralogs originated by tandem duplication of a genome region. The inferred amino acid sequence of the *Psat0s797g0240* polypeptide product has the same length of 101 amino acid sequences and differs (in cv. Cameor) by eight amino acid substitutions from that of *Psat0s797g0160* (their positions are given in parenthesis): ala→ser (14), arg→lys (32), tre→ala (35), arg→his (36), tre→ser (70), val→gln (72), gln→arg (79), asn→his (80). Due to the two latter substitutions this polypeptide has two positively charged residues more than SCA. The mobility of polypeptides of equal length in the involved electrophoretic procedure in acid denaturing conditions is proportional to the number of positively charged residues, so we can expect the *Psat0s797g0240* product mobi-

lity to be 11 % greater than that of SCA^s. However, the SAA mobility is only 7 % greater than that of SCA^s (Smirnova et al., 1992). This is close with the mobility of SCA^f, which is 5 % greater than that of SCA^s (Smirnova et al., 1992), as expected from their difference of one positively charged residue. Most probably, *Psat0s797g0240* is not the gene coding for SAA but may encode an immunologically related minor protein SA-a2 with electrophoretic mobility 9 % greater than in SCA^s. Electrophoretic monomorphism of both SAA and SA-a2 so far observed (Smirnova et al., 1992) does not allow us to check these options genetically. We attempted resequencing the *Psat0s797g0240* alleles in the same set of accessions as for SCA (see above) using primers Ps_SCA2_1F (5' CACGTGTTCAATAATCTAACGC) and Ps_SCA2_1R (5' AAGAAAAAGAAACGAGCCATCA) matching the 5'- and 3' non-coding regions of PUCA011001169.1 (*Pisum sativum* cultivar Gradus No 2 flattened_line_64181, the whole genome shotgun sequence). Possibly, due to the abundance of poly-A and poly-T in the 5'- and 3' non-coding regions, respectively, amplification was not successful for 7 of 20 accessions involved (JI1794, 721, Pe013, P014, P017, VIR5414, WL1238, Cameor), so only 13 accessions were sequenced. The variation of protein products inferred from the obtained sequences was confined to 5 variable amino acid positions and did not affect electrophoretic mobility.

Protein product of SCA and its variation

The SCA gene has no introns. Its SCA protein product is remarkable for its extreme hydrophily and high content of charged (at neutral pH conditions) residues (Table). Among its 101 amino acid residues in Cameor, 70 are hydrophilic, of which 30 are charged, including 18 positively charged (lysine – 10, arginine – 5, histidine – 3), and 12 negatively charged (glutamate – 10, aspartate – 2) residues (the numbers of residues almost coinciding with their percentages) (see Table). Interestingly, 11 of 12 negatively charged residues have positively charged nearest neighbour(s) and 4 of 18 positively charged residues have negatively charged neighbour(s). There are tracts of three (glu-lys-glu) and five (lys-lys-glu-glu-arg) charged residues in a row. There are only two proline residues



An example of agarose gel electrophoresis of the PCR products obtained from genomic DNA of the indicated pea accessions with primers Ps_SCA1_3 and Ps_SCA1_3r, matching the SCA gene adjacent non-coding regions, digested with *Hind*III restriction endonuclease.

M stands for the molecular mass marker.

and only one aromatic residue (tyrosine). Such a content and structure, with alternating residues of opposite charge, suggest that in water solution, the SCA molecule has a rigid expanded (linear) structure.

Five variable amino acid positions were revealed in the SCA product: 14 (ala/ser), 72 (gly/val), 75 (leu/val), 80 (his/asn) and 95 (gly/val) (see Table), the fourth changing the molecule positive charge as discussed above. The SCA gene sequences obtained had 11 (3.6 %) variable nucleotide positions.

SCA gene and a CAPS marker based on it

The A→C substitution in position 238 of the SCA gene creates the recognition site GTCAAC for *Hind*III restriction endonuclease, missing in the rest of the gene. PCR amplification of genomic DNA with Ps_SCA1_3f and Ps_SCA1_3r primers resulted in a product of 512 bp, which was subsequently digested with *Hind*III endonuclease. The allele coding for SCA^f was cleaved into two fragments, 326 and 186 bp in size, while amplicon from the SCA^s allele remained 512 bp, the difference clearly seen on agarose gel (Figure). This makes the SCA gene the source of a convenient CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) marker, which permits scoring SCA allelic state without invoking protein electrophoresis. It should be noted that in spite of great similarity of the coding sequences of SCA and Psat0s797g0240, their adjacent non-coding regions appeared diverged enough to avoid cross-amplification.

References

Ali S.M., Sharma B., Ambrose M.J. Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*. 1994;73:115-126. DOI 10.1007/BF00027188.
Bogdanova V.S., Shatskaya N.V., Mglinets A.V., Kosterin O.E., Vasiliev G.V. Discordant evolution of organellar genomes in peas (*Pisum L.*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2021;160:107136. DOI 10.1016/j.ympcv.2021.10713.6.

Coyne C.J., McGee R.J., Redden R.J., Ambrose M.J., Furman B.J., Miles C.A. Genetic adjustment to changing climates: pea. In: Yadav S.S., Redden R.J., Hatfield J.L., Lotze-Campen H., Hall A.E. (Eds.). *Crop Adaptation to Climate Change*. Oxford: John Wiley & Sons, Inc., 2011;238-250. DOI 10.1002/9780470960929.ch17.
Ford-Lloyd B.V., Schmidt M., Armstrong S.J., Barazani O., Engels J., Hadas R., Hammer K., Kell S.P., Kang D., Khoshbakht K., Li Y., Long C., Lu B.-R., Ma K., Nguyen V.T., Qiu L., Ge S., Wei W., Zhang Z., Maxted N. Crop wild relatives – undervalued, underutilized and under threat? *BioScience*. 2011;61(7):559-565. DOI 10.1525/bio.2011.61.7.10.
Gorel F.L., Rozov S.M., Berdnikov V.A. Mapping the locus *coch*. *Pisum Genet.* 1998;30:9-11.
Kalo P., Seres A., Taylor S.A., Jakab J., Kevei Z., Kereszt A., Endre G., Ellis T.H.N., Kiss G.B. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol. Genet. Genomics*. 2004;272(3):235-246. DOI 10.1007/s00438-004-1055-z.
Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum L.* as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2008;55(5):735-755. DOI 10.1007/s10722-007-9281-y.
Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Reciprocal compatibility within the genus *Pisum L.* as studied in F₁ hybrids: 1. Crosses involving *P. sativum L.* subsp. *sativum*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2015;62(5):691-709. DOI 10.1007/s10722-014-0189-z.
Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Reciprocal compatibility within the genus *Pisum L.* as studied in F₁ hybrids: 3. Crosses involving *P. sativum L.* subs. *elatius* (Bieb.) Aschers. et Graebn. *Br. Genet. Res. Crop Evol.* 2021;68(6):2565-2590. DOI 10.1007/s10722-021-01151-2.
Kosterin O.E., Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Ambrose M. New data on three molecular markers from different cellular genomes in Mediterranean accessions reveal new insights into phylogeography of *Pisum sativum L.* subsp. *elatius* (Beib.) Schmalh. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2010;57(5):733-739. DOI 10.1007/s10722-009-9511-6.
Kreplak K., Madoui M.A., Cápál P., Novák P., Labadie K., Aubert G., Bayer P.E., Gali K.K., Syme R.A., Main D., Klein A., Bérard A., Vrbová I., Fournier C., d'Agata L., Belser C., Berrabah W., Toegelová H., Milec Z., Vrána J., Lee H., Kougbadjo A., Térézold M., Huneau C., Turo C.J., Mohellibi N., Neumann P., Falque M., Gallardo K., McGee R., Tar'an B., Bendahmane A., Aury J.M., Batley J., Le Paslier M.C., Ellis N., Warkentin T.D., Coyne C.J., Salse J., Edwards D., Lichtenzweig J., Macas J., Doležel J., Wincker P., Burstin J. A reference genome for pea provides insight into legume genome evolution. *Nat. Genet.* 2019;51(9):1411-1422. DOI 10.1038/s41588-019-0480-1.
Maxted N., Ambrose M. Peas (*Pisum L.*). In: Maxted N., Bennett S.J. (Eds.). *Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, vol. 39. Dordrecht: Springer, 2001;181-190. DOI 10.1007/978-94-015-9823-1_10.
Maxted N., Kell S.P. Establishment of a global network for the *in situ* conservation of crop wild relatives: status and needs. *FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rome, 2009.
Maxted N., Kell S., Ford-Lloyd B., Dulloo E., Toledo Á. Toward the systematic conservation of global crop wild relative diversity. *Crop Sci.* 2012;52(2):774-785. DOI 10.2135/cropsci2011.08.0415.
Panyim S., Chalkley R. High resolution in acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* 1969;130(1):337-346. DOI 10.1016/0003-9861(69)90042-3.
Rozov S.M., Temnykh S.V., Gorel' F.L., Berdnikov V.A. A new version of pea linkage group 5. *Pisum Genet.* 1993;25:46-51.
Smirnova O.G., Rozov S.M., Kosterin O.E., Berdnikov V.A. Perchloric acid extractable low-M_r albumins SCA and SAA from cotyledons and seed axes of pea (*Pisum sativum L.*). *Plant Sci.* 1992;82(1):1-13. DOI 10.1016/0168-9452(92)90002-4.

- Smirnova O.G., Rozov S.M., Kosterin O.E. Perchloric acid extraction of pea seed proteins: characterisation and inheritance of electrophoretic variants. In: Shchapova A.I., Kolosova L.D. (Eds.). *Genetics of Economically Valuable Characteristics of Higher Plants*. Novosibirsk, 1990;158-179. (in Russian)
- Smýkal P., Aubert G., Burstin J., Coyne C.J., Ellis N.T., Flavell A.J., Ford R., Hýbl M., Macas I., Neumann P., McPhee K.E., Redden R.J., Rubiales D., Weller J.L., Warkentin T.D. Pea (*Pisum sativum L.*) in the genomic era. *Agronomy*. 2012;2(2):74-115. DOI 10.3390/agronomy2020074.
- Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Kosterin O.E. Phylogenetic reconstruction at the species and intraspecies levels in the genus *Pisum L.* (peas) using a histone H1 gene. *Gene*. 2012;504(2):192-202. DOI 10.1016/j.gene.2012.05.026.
- Zaytseva O.O., Bogdanova V.S., Mglinets A.V., Kosterin O.E. Refinement of the collection of wild peas (*Pisum L.*) and search for the area of pea domestication with a deletion in the plastidic *psbA-trnH* spacer. *Genet. Res. Crop Evol.* 2017;64:1417-1430. DOI 10.1007/s10722-016-0446-4.
- Zaytseva O.O., Gunbin K.V., Mglinets A.V., Kosterin O.E. Divergence and population traits in evolution of the genus *Pisum L.* as reconstructed using genes of two histone H1 subtypes showing different phylogenetic resolution. *Gene*. 2015;556(2):235-244. DOI 10.1016/j.gene.2014.

ORCID ID

O.E. Kosterin orcid.org/0000-0001-5955-4057

Acknowledgements. The work was supported by the Russian State Scientific Program No. FWNR-2022-0017. Sequencing was carried out in Genomic Core Facility SB RAS, Novosibirsk. Assembly of coding sequences from SRA archives was performed at Siberian Supercomputer Center Core Facility and Computational Facility of Novosibirsk State University. Plants were grown in the greenhouse at the SB RAS Artificial Plant Growing Facility.

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

Received February 3, 2022. Revised April 14, 2022. Accepted April 18, 2022.

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

Плотность нейронов в коре головного мозга и гиппокампе мышей линии *Clstn2*-КО – модели расстройств аутистического спектра

И.Н. Рожкова¹, С.В. Окотруб^{1, 2}, Е.Ю. Брусенцев¹, Е.Е. Ульданова¹, Э.А. Чуйко^{1, 2}, Т.В. Липина³, Т.Г. Амстиславская⁴, С.Я. Амстиславский¹ 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Университет Торонто, Торонто, Канада

⁴ Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

 amstis@yandex.ru

Аннотация. Расстройства аутистического спектра (РАС) – это группа состояний, возникающих в детском возрасте, для которых характерны трудности с социальным взаимодействием и общением, а также нетипичные модели поведения и склонность к стереотипии. Механизмы возникновения этой группы расстройств до сих пор не вполне понятны, и, следовательно, отсутствуют соответствующие методы профилактики. Целью исследования была оценка плотности нейронов в медиальной префронтальной коре и четырех областях гиппокампа, а именно СА1, СА2, СА3 и зубчатой извилины (DG) у мышей линии *Clstn2*-КО, которая может выступать в качестве генетической модели РАС. Кроме того, охарактеризовали уровень нейрогенеза в области DG гиппокампа. Данная линия получена путем нокаута гена кальсинтенина-2 (*Clstn2*) на основе мышей линии C57BL/6J; последняя была использована в настоящем исследовании в качестве контроля. Для определения плотности нейронов изготавливали серийные срезы соответствующих областей мозга на криотоме с последующим иммуногистохимическим окрашиванием и конфокальной микроскопией, для чего использовали нейрональный маркер (anti-NeuN) в качестве первичного антитела. Наряду с этим в области DG гиппокампа оценивали нейрогенез, для чего проводили иммуногистохимическое окрашивание с применением антитела против даблкортина (anti-DCX). В обоих случаях в качестве вторичного антитела был Goat anti-rabbit IgG. Плотность нейронов в области гиппокампа СА1 была снижена как у самцов, так и самок мышей *Clstn2*-КО по сравнению с контролем; у самцов обеих линий плотность нейронов была ниже в этой области по сравнению с самками. Помимо этого, были обнаружены различия между самцами и самками в двух других областях гиппокампа: в области СА2 – у мышей обеих исследованных линий, а в области СА3 лишь у мышей C57BL/6J плотность нейронов была меньше у самцов по сравнению с самками. Различий между исследованными группами в уровне нейрогенеза, а также в плотности нейронов в префронтальной коре и области DG гиппокампа не обнаружено. Полученные результаты показывают, что нокаут по гену *Clstn2* приводит к избирательному снижению плотности нейронов в СА1-области гиппокампа, что может представлять собой клеточную мишень для ранней профилактики и возможной терапии РАС.

Ключевые слова: мыши; кальсинтенин-2; мозг; плотность нейронов; префронтальная кора; гиппокамп; расстройства аутистического спектра.

Для цитирования: Рожкова И.Н., Окотруб С.В., Брусенцев Е.Ю., Ульданова Е.Е., Чуйко Э.А., Липина Т.В., Амстиславская Т.Г., Амстиславский С.Я. Плотность нейронов в коре головного мозга и гиппокампе мышей линии *Clstn2*-КО – модели расстройств аутистического спектра. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):365-370. DOI 10.18699/VJGB-22-44

Neuronal density in the brain cortex and hippocampus in *Clstn2*-KO mouse strain modeling autistic spectrum disorder

I.N. Rozhkova¹, S.V. Okotrub^{1, 2}, E.Yu. Brusentsev¹, E.E. Uldanova¹, E.A. Chuyko^{1, 2}, T.V. Lipina³, T.G. Amstislavskaya⁴, S.Ya. Amstislavsky¹ 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ University of Toronto, Toronto, Canada

⁴ Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia

 amstis@yandex.ru

Abstract. Autistic spectrum disorders (ASD) represent conditions starting in childhood, which are characterized by difficulties with social interaction and communication, as well as non-typical and stereotyping models of behavior. The mechanisms and the origin of these disorders are not yet understood and thus far there is a lack of prophylactic measures for these disorders. The current study aims to estimate neuronal density in the prefrontal cortex and four hip-

pocampal subfields, i.e. CA1, CA2, CA3, and DG in *Clstn2*-KO mice as a genetic model of ASD. In addition, the level of neurogenesis was measured in the DG area of the hippocampus. This mouse strain was obtained by a knockout of the calyntenin-2 gene (*Clstn2*) in C57BL/6J mice; the latter (wild type) was used as controls. To estimate neuronal density, serial sections were prepared on a cryotome for the above-mentioned brain structures with the subsequent immunohistochemical labeling and confocal microscopy; the neuronal marker (anti-NeuN) was used as the primary antibody. In addition, neurogenesis was estimated in the DG region of the hippocampus; for this purpose, a primary antibody against doublecortin (anti-DCX) was used. In all cases Goat anti-rabbit IgG was used as the secondary antibody. The density of neurons in the CA1 region of the hippocampus was lower in *Clstn2*-KO mice of both sexes as compared with controls. Moreover, in males of both strains, neuronal density in this region was lower as compared to females. Besides, the differences between males and females were revealed in two other hippocampal regions. In the CA2 region, a lower density of neurons was observed in males of both strains, and in the CA3 region, a lower density of neurons was also observed in males as compared to females but only in C57BL/6J mice. No difference between the studied groups was revealed in neurogenesis, nor was it in neuronal density in the prefrontal cortex or DG hippocampal region. Our new findings indicate that calyntenin-2 regulates neuronal hippocampal density in subfield-specific manner, suggesting that the CA1 neuronal subpopulation may represent a cellular target for early-life preventive therapy of ASD.

Key words: mice; calyntenin-2; brain; neuronal density; prefrontal cortex; hippocampus; autism spectrum disorder.

For citation: Rozhkova I.N., Okotrub S.V., Brusentsev E.Yu., Uldanova E.E., Chuyko E.A., Lipina T.V., Amstislavskaya T.G., Amstislavsky S.Ya. Neuronal density in the brain cortex and hippocampus in *Clstn2*-KO mouse strain modeling autistic spectrum disorder. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):365-370. DOI 10.18699/VJGB-22-44

Введение

Диагностика и профилактика расстройств аутистического спектра (РАС) в раннем возрасте очень важны и требуют идентификации конкретной молекулярно-клеточной мишени. Несмотря на некоторый прогресс в этой области, например установление генов *Fragile X*, *SHANK3*, *CASPR2* как факторов риска РАС, до сих пор механизмы возникновения этой группы расстройств не вполне понятны и, следовательно, отсутствуют соответствующие методы профилактики. Основная причина этого заключается в том, что в патогенез аутизма вовлечены как генетические факторы, так и факторы окружающей среды, в том числе, например, эпигенетические модификации генома, ремоделирование хромосом, окислительный стресс и многие другие (Waye, Cheng, 2017).

Области гиппокампа (CA1, CA2, CA3 и зубчатая извилина – dentate gyrus, DG) участвуют, в частности, в процессах, связанных с памятью: CA1 важна для рабочей (Newmark et al., 2013), тогда как CA3, CA4 и DG – для декларативной (Coras et al., 2014), а CA2 – эпизодической (Navratilova, Battaglia, 2015) и социальной (Hitti, Siegelbaum, 2014) памяти.

Структурные аномалии гиппокампа обнаружены при многих сложных психических расстройствах, включая сосудистую деменцию (Kim et al., 2015), болезнь Альцгеймера (Thomson et al., 2004) и РАС (Bauman, Kemper, 2005; Varghese et al., 2017). Есть указания на то, что у людей, страдающих РАС, имеются нарушения и в префронтальной коре, в частности изменено число нейронов в этой области мозга (Courchesne et al., 2011; Varghese et al., 2017). Обсуждается также, что у людей с РАС могут быть нарушения нейрогенеза (Gilbert, Man, 2017).

Некоторые исследования выявили у пациентов с РАС мутации в генах, кодирующих синаптические белки, в том числе участвующие в регуляции клеточной адгезии (Bakkaloglu et al., 2008; Morrow et al., 2008; Bourgeron, 2015). Кальсинтенины (*Clstns*) представляют собой трансмембранные синаптические белки, которые принадлежат к суперсемейству кадгериновых молекул клеточной адгезии. Существует три типа *Clstn* (*Clstn*-1, -2 и -3), которые

экспрессируются постсинаптически (Hintsch et al., 2002) и по-разному вносят вклад в сбалансированную активность возбуждающих и тормозных нейронов, при этом нарушение их соотношения характерно для некоторых пациентов с РАС (Yip et al., 2009).

Отсутствие *Clstn2* специфически снижает плотность тормозных парвалбуминовых интернейронов в некоторых структурах мозга, что проявляется в виде недостаточной функциональности тормозной, но не возбуждающей синаптической передачи в пирамидных нейронах CA1 области гиппокампа (Lipina et al., 2016). Кроме того, обнаружено изменение архитектоники синапсов у мышей *Clstn2*-KO в медиальной префронтальной коре и гиппокампе (Ranneva et al., 2020). Более того, мыши с нокаутом кальсинтенина-2 (*Clstn2*-KO) демонстрируют признаки, характерные для РАС: гиперактивность, стереотипию, недостаточные пространственное обучение и память, измененное социальное поведение с нарушением ультразвуковой вокализации (Lipina et al., 2016; Ranneva et al., 2017; Klenova et al., 2021).

Плотность нейронов в префронтальной коре и гиппокампе, а также уровень нейрогенеза в мозге на такой генетической модели РАС, как мыши линии *Clstn2*-KO, до сих пор не изучали. Таким образом, основная цель настоящего исследования состояла в том, чтобы охарактеризовать плотность нейронов в медиальной префронтальной коре, областях гиппокампа CA1, CA2, CA3 и DG, а также уровень нейрогенеза у мышей *Clstn2*-KO.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В исследовании использовали 12 гомозиготных самцов и 14 самок линии *Clstn2*-KO нокаутов по гену *Clstn2*, а также 15 самцов и 15 самок C57BL/6J (контроль) в возрасте 3 мес. Животные находились в клетках размером 36 × 25 × 14 см (длина × ширина × высота) с древесным подстилом. Самцов и самок содержали индивидуально в конвенциональном виварии НИИ нейронаук и медицины (Новосибирск, Россия), при режиме 12Д:12Н, 20–22 °С, свободном доступе к сухому гранулированному корму для лабораторных

грызунов «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», Россия) и очищенной воде. Все исследования соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

Интракардиальная перфузия. В возрасте 3 мес. животных перфузировали фосфатно-солевым буфером (PBS) и 10 % раствором параформальдегида, после чего мозг удаляли и фиксировали в фосфатном буфере, содержащем 30 % сахарозы и 5 % формалина при +4 °С. Впоследствии мозг погружали в среду Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, США), замораживали и хранили при температуре –70 °С.

Приготовление срезов мозга. Криосрезы были приготовлены для следующих областей головного мозга: 1) медиальной префронтальной коры (МПК) на расстоянии 2.46–2.22 мм от брегмы; 2) гиппокампа (области CA1, CA2, CA3 и зубчатая извилина DG) на расстоянии –1.46...–1.82 мм от брегмы. Срезы толщиной 10 мкм были получены на криотоме HM550 OP (Thermo Fisher Scientific, США) при –25 °С и помещены на предметные стекла Superfrost Plus, Menzel-Glaser (Thermo Fisher Scientific).

Иммуногистохимическое окрашивание образцов проводили согласно протоколам производителей наборов с небольшими модификациями. Перед процедурой окрашивания срезы обезвоживали с последующей регидратацией в течение 5 мин в PBS. Затем после регидратации в 10 мМ цитратном буфере (pH = 9) при 95 °С на водяной бане TW-2.02 (Elmi, Латвия) выполняли индуцированную нагреванием демаскировку эпитопов. После этого срезы удаляли из буфера и охлаждали до комнатной температуры. Затем образцы трижды промывали в буфере PBS-Tween: PBS с добавлением 0.1 % Tween-20 P9416-100ML (Merck, Германия). Среда Protein Block ab64226 (Abcam, Великобритания) была добавлена в каждую секцию на 5 мин в соответствии с рекомендациями производителя, избыток жидкости удаляли.

После процедур промывания и выдерживания со средой Protein Block добавляли первичное антитело и оставляли на ночь при +4 °С во влажной темной камере. Используемые концентрации антител составляли 1:750 и 1:750

для сред anti-NeuN ab177487 (Abcam) и anti-DCX ab18723 (Abcam) соответственно. Далее срезы промывали буфером PBS-Tween, избыток жидкости удаляли, добавляли 50 мкл вторичного антитела Goat anti-rabbit IgG H&L AF488 ab150077 (Abcam) в концентрации 1:600 и оставляли во влажной темной камере в течение 2 ч при +4 °С. Затем образцы промывали буфером PBS-Tween, избыток жидкости удаляли и помещали образцы в среду ProLong, Glass AntifadeMountant, Thermo P36982 (Thermo Fisher Scientific).

Анализ плотности нейронов. С помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия), EC Plan-Neofluar 20×/0.50 (Carl Zeiss) были получены цифровые фотографии, по которым оценивали плотность нейронов, меченных антителами (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo>). Число меченых нейронов подсчитывали с помощью программы ImageJ. Число нейронов определяли как минимум в трех срезах на животное, затем вычисляли среднее по этим срезам и рассчитывали среднюю плотность в объеме (мм³).

Статистический анализ. Анализ полученных результатов проводили с использованием программного пакета Statistica v. 10.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные были проверены на нормальность с помощью *W*-критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (M ± SEM) и проанализированы посредством двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим множественным сравнением по Фишеру. Различия при *p* < 0.05 считали статистически значимыми.

Результаты

Данные по плотности нейронов в МПК и гиппокампе (областях CA1, CA2, CA3 и DG) представлены в таблице. Выявлено статистически значимое влияние на плотность нейронов в области CA1 гиппокампа фактора «пол» ($F_{1,35} = 29.53, p < 0.001$) и фактора «группа» ($F_{2,35} = 16.68, p < 0.001$), в то же время взаимодействия этих факторов ($F_{1,35} < 1$) не обнаружено. Сравнение post-hoc показало, что как у самцов ($p < 0.001$), так и у самок ($p < 0.05$) мышей линии C1stn2-KO меньше пирамидных нейронов

Плотность нейронов в гиппокампе и префронтальной коре, нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа у мышей C57BL/6J и C1stn2-KO

Области мозга	Самцы		Самки		
	C57BL/6J ($N^*/\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)*10 ³ (n)	C1stn2-KO ($N^*/\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)*10 ³ (n)	C57BL/6J ($N^*/\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)*10 ³ (n)	C1stn2-KO ($N^*/\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)*10 ³ (n)	
МПК	150.84 ± 3.09 (5)	154.23 ± 5.21 (4)	143.41 ± 8.82 (4)	151.90 ± 9.47 (5)	
Гиппокамп	CA1	109.54 ± 3.93 (5)	85.94 ± 4.84 (5)***	133.71 ± 4.71 (5)+++	116.31 ± 4.41 (5)**,+
	CA2	102.89 ± 17.22 (5)	111.68 ± 9.68 (4)	162.61 ± 9.13 (3) ⁺	147.85 ± 7.09 (5) ⁺
	CA3	138.11 ± 20.67 (5)	192.65 ± 28.39 (4)	217.95 ± 41.63 (3) ⁺	173.76 ± 9.72 (5)
	DG	400.72 ± 121.08 (5)	383.32 ± 87.66 (4)	504.41 ± 75.18 (3)	502.15 ± 30.73 (5)
Нейрогенез	19.96 ± 1.32 (6)	22.93 ± 1.98 (6)	20.29 ± 3.08 (5)	20.16 ± 2.83 (5)	

Примечание. N^* – число нейронов в интересующей области; SEM – стандартная ошибка среднего; *n* – число животных; ** $p < 0.05$ по сравнению с C57BL/6J того же пола; *** $p < 0.001$ по сравнению с C57BL/6J того же пола; ⁺ $p < 0.05$ по сравнению с самцами той же линии; +++ $p < 0.001$ по сравнению с самцами той же линии.

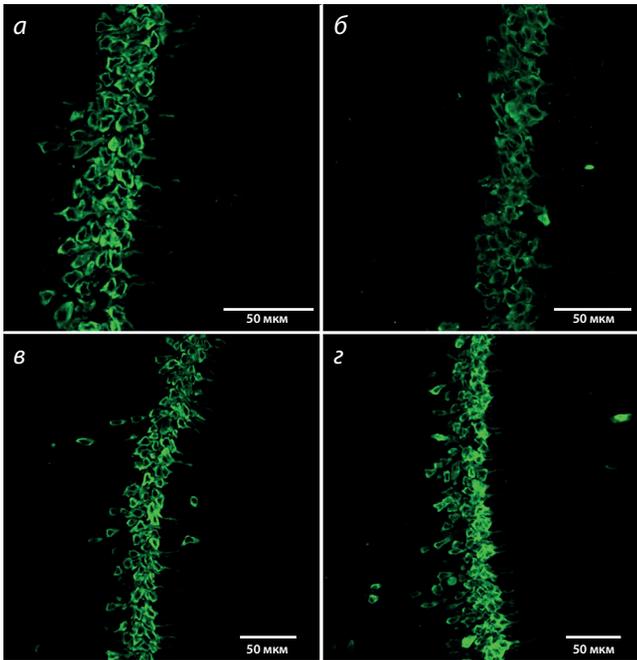


Рис. 1. Микрофотографии области CA1 гиппокампа, нейроны мечены антителами против NeuN.

а, б – самки; в, з – самцы линий C57BL/6J (а, в) и *Clstn2*-KO (б, з).

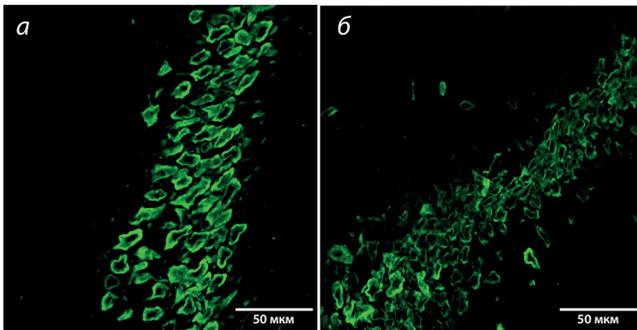


Рис. 2. Микрофотографии области CA2 гиппокампа.

Нейроны мечены антителами против NeuN у самок (а) и самцов (б) линии *Clstn2*-KO.

в области CA1 гиппокампа по сравнению с контролем C57BL/6J (рис. 1). Более того, имелись межполовые различия: у самок обеих линий было больше пирамидных нейронов ($p < 0.001$) в области гиппокампа CA1 по сравнению с самцами (см. рис. 1).

Обнаружено влияние фактора «пол» на плотность нейронов в области CA2 гиппокампа ($F_{1,31} = 12.03$, $p < 0.05$). В то же время не было влияния фактора «группа» ($F_{1,31} < 1$) и взаимодействия этих факторов ($F_{1,31} < 1$). Сравнение post-hoc продемонстрировало, что самки обеих линий имели больше пирамидных нейронов ($p < 0.05$) в области CA2 гиппокампа по сравнению с самцами (рис. 2). Однако межлинейных различий плотности нейронов в этом отделе не было.

Не выявлено влияния факторов «пол» ($F_{1,35} = 1.66$, $p > 0.05$) и «группа» ($F_{1,35} < 1$) на плотность нейронов в области CA3 гиппокампа, но обнаружено взаимодействие

этих факторов ($F_{1,35} = 4.36$, $p < 0.05$). Сравнение post-hoc показало, что самки линии C57BL/6J имели больше пирамидных нейронов, чем самцы этой линии ($p < 0.05$).

Чтобы исключить возможность снижения нейрогенеза как одной из причин уменьшения плотности нейронов в области CA1 у мышей *Clstn2*-KO, была проведена его оценка в регионе DG гиппокампа. На этот показатель не выявлено влияния факторов «пол» ($F_{1,35} = 1.27$, $p > 0.05$), «группа» ($F_{1,35} < 1$), а также взаимодействия этих факторов ($F_{1,35} < 1$). При сравнении post-hoc установлено, что межлинейные и половые различия по уровню нейрогенеза в области DG отсутствуют (см. таблицу).

Обсуждение

В настоящем исследовании не было обнаружено изменений плотности нейронов в префронтальной коре ни у самцов, ни у самок мышей линии *Clstn2*-KO, несмотря на то, что у людей с РАС в этой области мозга имеются отличия по этому параметру (Courchesne et al., 2011). Однако к этим данным, полученным путем изучения биоптатов мозга, взятых *post mortem*, следует относиться с осторожностью, поскольку число изученных образцов мозга невелико. На мышах линии VTBR – модели идиопатического аутизма – не было найдено существенных отличий по числу нейронов в префронтальной коре (Stephenson et al., 2011), что согласуется с результатами наших исследований на мышах *Clstn2*-KO. Однако в других работах у мышей этой линии показан более низкий уровень внеклеточного ацетилхолина и больше кинуреновой кислоты, но не серотонина в этой области головного мозга (McTighe et al., 2013; Guo, Commons, 2017). Можно предположить, что развитие РАС связано с нарушением баланса нейромедиаторных систем в префронтальной коре, а плотность нейронов в этой структуре не является универсальным маркером этих расстройств.

В нашем исследовании обнаружено, что как у самцов, так и у самок мышей линии *Clstn2*-KO снижена плотность нейронов в области CA1 гиппокампа. В более ранней работе (Lipina et al., 2016) показан дефицит тормозных ГАМКергических нейронов в областях CA1 и CA3 гиппокампа у мышей данной линии. Можно предположить, что установленное нами снижение плотности нейронов в области CA1 гиппокампа у мышей *Clstn2*-KO связано в том числе и с этим снижением ГАМКергических нейронов.

Структурные исследования с помощью МРТ выявили уменьшение относительного объема гиппокампа у пациентов с РАС в возрасте от 4 до 18 лет (Sussman et al., 2015). Более того, изменение размеров гиппокампа обнаружено также у взрослых пациентов с РАС (Braden et al., 2017). По результатам биопсии и последующего анализа плотности нейронов в отдельных областях гиппокампа, у людей с симптомами РАС выявлено изменение плотности нейронов в отдельных областях гиппокампа, наиболее выраженные изменения наблюдали в области CA1 (Lawrence et al., 2010; Greco et al., 2011).

Исследования на различных лабораторных моделях также свидетельствуют, что нарушения в области CA1 гиппокампа ассоциированы с развитием РАС. В частности, гетерозиготные мыши, имеющие недостаточность фактора транскрипции *Tcf4* и проявляющие некоторые признаки

аутизма, показали усиление синаптической передачи в области CA1 гиппокампа (Kennedy et al., 2016). Мыши BTBR T+tf/J демонстрируют поведение, характерное для РАС, сопровождающееся потерей нейронов в области CA1 гиппокампа (Zhang et al., 2019). Гетерозиготные мыши SHANK-3, которые считаются известной моделью РАС, имели больше перфорированных синапсов в радиальном слое области CA1 гиппокампа (Urral et al., 2015), что подтверждает нарушенную синаптическую пластичность в этом регионе мозга (Moessner et al., 2007). При синдроме ломкой X-хромосомы, одной из форм РАС, связанной с нарушением гена *Fmr1*, также обнаружены специфические изменения в пирамидных нейронах области CA1 гиппокампа (Sawicka et al., 2019). Таким образом, как наши результаты, так и данные приведенных выше работ на других моделях, созданных на мышах, свидетельствуют о том, что нарушения в области CA1 гиппокампа могут рассматриваться как своего рода универсальный маркер РАС.

В данном исследовании плотность нейронов у самок мышей Clstn2-KO в областях CA1 и CA2 гиппокампа была больше, чем у самцов. Более того, у самок мышей контрольной линии C57BL/6J число нейронов в данных областях и в зоне CA3 гиппокампа также было больше, чем у самцов, что может быть физиологической особенностью и свидетельствовать об отсутствии взаимосвязи с РАС, несмотря на то что у людей РАС проявляется у мальчиков чаще, чем у девочек, в соотношении 4.3:1 (Fombonne, 2003).

Нарушение процесса образования новых нейронов во взрослом возрасте играет значительную роль при возникновении психических расстройств (Schoenfeld, Cameron, 2015). Более того, показано, что у мышей линии BTBR обнаружено существенное снижение нейрогенеза у взрослых животных (Stephenson et al., 2011). Однако, по нашим данным, нейрогенез у взрослых мышей Clstn2-KO не нарушен. Возможно, снижение плотности нейронов в области CA1, установленное у мышей Clstn2-KO, обусловлено усилением нейродегенеративных процессов, что может, в частности, приводить к нарушению баланса тормозных и возбуждающих нейронов.

Заключение

Выявлено снижение плотности нейронов в области CA1 гиппокампа как у самцов, так и у самок мышей линии Clstn2-KO по сравнению с контрольными мышами C57BL/6J. Между тем у мышей Clstn2-KO не обнаружено отличий плотности нейронов в других областях гиппокампа, в префронтальной коре, а также уровня нейрогенеза. Снижение плотности нейронов в области CA1 гиппокампа у мышей Clstn2-KO можно рассматривать как специфическую характеристику этой линии, моделирующей расстройства аутистического спектра.

Список литературы / References

Bakkaloglu B., O'Roak B.J., Louvi A., Gupta A.R., Abelson J.F., Morgan T.M., Chawarska K., Klin A., Ercan-Sencicek A.G., Stillman A.A., Tanriver G., Abrahams B.S., Duvall J.A., Robbins E.M., Geschwind D.H., Biederer T., Gunel M., Lifton R.P., State M.W. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 2008;82:165-173. DOI 10.1016/j.ajhg.2007.09.017.

- Bauman M.L., Kemper T.L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2005; 23:183-187. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2004.09.006.
- Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16:551-563. DOI 10.1038/nrn3992.
- Braden B.B., Smith C.J., Thompson A., Glaspy T.K., Wood E., Vatsa D., Abbott A.E., McGee S.C., Baxter L.C. Executive function and functional and structural brain differences in middle-age adults with autism spectrum disorder. *Autism Res.* 2017;10:1945-1959. DOI 10.1002/aur.1842.
- Coras R., Pauli E., Li J., Schwarz M., Rossler K., Buchfelder M., Hamer H., Stefan H., Blumcke I. Differential influence of hippocampal subfields to memory formation: insights from patients with temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2014;137:1945-1957. DOI 10.1093/brain/awu100.
- Courchesne E., Mouton P.R., Calhoun M.E., Semendeferi K., Ahrens-Barbeau C., Hallet M.J., Barnes C.C., Pierce K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA.* 2011; 306(18):2001-2010. DOI 10.1001/jama.2011.1638.
- Fombonne E. Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J. Autism Dev. Disord.* 2003; 33(4):365-382. DOI 10.1023/a:1025054610557.
- Gilbert J., Man H.-Y. Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* 2017;11:359. DOI 10.3389/fncel.2017.00359.
- Greco C.M., Navarro C.S., Hunsaker M.R., Maezawa I., Shuler J.F., Tassone F., Delany M., Au J.W., Berman R.F., Jin L.W., Schumann C., Hagerman P.J., Hagerman R.J. Neuropathologic features in the hippocampus and cerebellum of three older men with fragile X syndrome. *Mol. Autism.* 2011;2(1):2. DOI 10.1186/2040-2392-2-2.
- Guo Y.P., Commons K.G. Serotonin neuron abnormalities in the BTBR mouse model of autism. *Autism Res.* 2017;10(1):66-77. DOI 10.1002/aur.1665.
- Hintsch G., Zurlinden A., Meskenaite V., Steuble M., Fink-Widmer K., Kinter J., Sonderegger P. The calysntenins – a family of postsynaptic membrane proteins with distinct neuronal expression patterns. *Mol. Cell. Neurosci.* 2002;21:393-409. DOI 10.1006/mcne.2002.1181.
- Hitti F.L., Siegelbaum S.A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature.* 2014;508:88-92. DOI 10.1038/nature13028.
- Kennedy A.J., Rahn E.J., Paulukaitis B.S., Savell K.S., Kordasiewicz H.B., Wang J., Lewis J.W., Posey J., Strange S.K., Guzman-Karlsson M.C., Phillips S.E., Decker K., Motley S.T., Swayze E.E., Ecker D.J., Michael T.P., Day J.J., Sweatt J.D. Tcf4 regulates synaptic plasticity, DNA methylation, and memory function. *Cell Rep.* 2016;16:2666-2685. DOI 10.1016/j.celrep.2016.08.004.
- Kim G.H., Lee J.H., Seo S.W., Kim J.H., Seong J.K., Ye B.S., Cho H., Noh Y., Kim H.J., Yoon C.W., Oh S.J., Kim J.S., Choe Y.S., Lee K.H., Kim S.T., Hwang J.W., Jeong J.H., Na D.L. Hippocampal volume and shape in pure subcortical vascular dementia. *Neurobiol. Aging.* 2015;36:485-491. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2014.08.009.
- Klenova A.V., Volodin I.A., Volodina E.V., Ranneva S.V., Amstislavskaya T.G., Lipina T.V. Vocal and physical phenotypes of calysntenin2 knockout mouse pups model early-life symptoms of the autism spectrum disorder. *Behav. Brain Res.* 2021;412:113430. DOI 10.1016/j.bbr.2021.113430.
- Lawrence Y.A., Kemper T.L., Bauman M.L., Blatt G.J. Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive hippocampal interneuron density in autism. *Acta Neurol. Scand.* 2010;121(2):99-108. DOI 10.1111/j.1600-0404.2009.01234.x.
- Lipina T.V., Prasad T., Yokomaku D., Luo L., Connor S.A., Kawabe H., Wang Y.T., Brose N., Roder J.C., Craig A.M. Cognitive deficits in calysntenin-2-deficient mice associated with reduced GABAergic transmission. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41:802-810. DOI 10.1038/npp.2015.206.

- McTighe S.M., Neal S.J., Lin Q., Hughes Z.A., Smith D.G. The BTBR mouse model of autism spectrum disorders has learning and attentional impairments and alterations in acetylcholine and kynurenic acid in prefrontal cortex. *PLoS One*. 2013;8(4):e62189. DOI 10.1371/journal.pone.0062189.
- Moessner R., Marshall C.R., Sutcliffe J.S., Skaug J., Pinto D., Vincent J., Zwaigenbaum L., Fernandez B., Roberts W., Szatmari P., Scherer S.W. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81:1289-1297. DOI 10.1086/522590.
- Morrow E.M., Yoo S.Y., Flavell S.W., Kim T.K., Lin Y., Hill R.S., Mukaddes N.M., Balkhy S., Gascon G., Hashmi A., Al-Saad S., Ware J., Joseph R.M., Greenblatt R., Gleason D., Ertelt J.A., Apse K.A., Bodell A., Partlow J.N., Barry B., Yao H., Markianos K., Ferland R.J., Greenberg M.E., Walsh C.A. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*. 2008;321:218-223. DOI 10.1126/science.1157657.
- Navratilova Z., Battaglia F.P. CA2: it's about time – and episodes. *Neuron*. 2015;85:8-10. DOI 10.1016/j.neuron.2014.12.044.
- Newmark R.E., Schon K., Ross R.S., Stern C.E. Contributions of the hippocampal subfields and entorhinal cortex to disambiguation during working memory. *Hippocampus*. 2013;23:467-475. DOI 10.1002/hipo.22106.
- Ranneva S.V., Maksimov V.F., Korostyshevskaja I.M., Lipina T.V. Lack of synaptic protein, calyntenin-2, impairs morphology of synaptic complexes in mice. *Synapse*. 2020;74:e22132. DOI 10.1002/syn.22132.
- Ranneva S.V., Pavlov K.S., Gromova A.V., Amstislavskaya T.G., Lipina T.V. Features of emotional and social behavioral phenotypes of calyntenin2 knockout mice. *Behav. Brain Res.* 2017;332:343-354. DOI 10.1016/j.bbr.2017.06.029.
- Sawicka K., Hale C.R., Park C.Y., Fak J.J., Gresack J.E. FMRP has a cell-type-specific role in CA1 pyramidal neurons to regulate autism-related transcripts and circadian memory. *Elife*. 2019;8:e46919. DOI 10.7554/eLife.46919.
- Schoenfeld T.J., Cameron H.A. Adult neurogenesis and mental illness. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40:113-128. DOI 10.1038/npp.2014.230.
- Stephenson D.T., O'Neill S.M., Narayan S., Tiwari A., Arnold E., Samaroo H.D., Du F., Ring R.H., Campbell B., Pletcher M., Vaidya V.A., Morton D. Histopathologic characterization of the BTBR mouse model of autistic-like behavior reveals selective changes in neurodevelopmental proteins and adult hippocampal neurogenesis. *Mol. Autism*. 2011;2(1):7. DOI 10.1186/2040-2392-2-7.
- Sussman D., Leung R.C., Vogan V.M., Lee W., Trelle S., Lin S., Casse D.B., Chakravarty M.M., Lerch J.P., Anagnostou E., Taylor M.J. The autism puzzle: Diffuse but not pervasive neuroanatomical abnormalities in children with ASD. *Neuroimage Clin.* 2015;8:170-179. DOI 10.1016/j.nicl.2015.04.008.
- Thompson P.M., Hayashi K.M., De Zubicaray G.I., Janke A.L., Rose S.E., Semple J., Hong M.S., Herman D.H., Gravano D., Doddrell D.M., Toga A.W. Mapping hippocampal and ventricular change in Alzheimer disease. *Neuroimage*. 2004;22(4):1754-1766. DOI 10.1016/j.neuroimage.2004.03.040.
- Uppal N., Puri R., Yuk F., Janssen W.G.M., Bozdagi-Gunal O., Harony-Nicolas H., Dickstein D.L., Buxbaum J.D., Hof P.R. Ultrastructural analyses in the hippocampus CA1 field in Shank3-deficient mice. *Mol. Autism*. 2015;6:41. DOI 10.1186/s13229-015-0036-x.
- Varghese M., Keshav N., Jacot-Descombes S., Warda T., Wicinski B., Dickstein D.L., Harony-Nicolas H., De Rubeis S., Drapeau E., Buxbaum J.D., Hof P.R. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* 2017;134(4):537-566. DOI 10.1007/s00401-017-1736-4.
- Waye M.M.Y., Cheng H.Y. Genetics and epigenetics of autism: a review. *Psych. Clin. Neurosci.* 2017;72:228-244. DOI 10.1111/pcn.12606.
- Yip J., Soghomonian J.J., Blatt G.J. Decreased GAD65 mRNA levels in select subpopulations of neurons in the cerebellar dentate nuclei in autism: an *in situ* hybridization study. *Autism Res.* 2009;2:50-59. DOI 10.1002/aur.62.
- Zhang Q., Wu H., Zou M., Li L., Li Q., Sun C., Xia W., Cao Y., Wu L. Folic acid improves abnormal behavior via mitigation of oxidative stress, inflammation, and ferroptosis in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism. *J. Nutr. Biochem.* 2019;71:98-109. DOI 10.1016/j.jnutbio.2019.05.002.

Благодарности. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-015-00162) и бюджетным проектом № FWNR-2022-0023 Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Микроскопический анализ биологических объектов» ФИЦ ИЦИГ СО РАН, а также ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦИГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.11.2021. После доработки 11.01.2022. Принята к публикации 01.03.2022.

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

Наследственная предрасположенность водяных полевок (*Arvicola amphibius* L.) к судорожным припадкам в ответ на хэндлинг и ее связь с продолжительностью жизни

Г.Г. Назарова , Л.П. Проскурняк 

Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 galinanazarova@mail.ru; luda_proskurnjak@mail.ru

Аннотация. Выяснение наследственной предрасположенности к судорогам в ответ на специфические внешние стимулы важно для понимания причин эпилептиформных состояний, нахождения новых методов их предупреждения и лечения. Особи водяной полевки с судорожными припадками встречаются как в природных, так и лабораторных условиях. Проанализированы данные многолетнего содержания и разведения водяных полевок в условиях вивария с целью установления наследственной предрасположенности к судорожным припадкам и влияния пола и возраста на их развитие. В условиях вивария припадки были спровоцированы взятием в руки и отмечены у 2.4 % полевок, отловленных в природной популяции с циклическими колебаниями численности. Судорожные припадки чаще встречали у особей, отловленных в фазы спада и депрессии численности, чем у особей с фаз подъема или пика. Судорожные состояния, вероятно, служат элементом адаптивного поведения, сформировавшегося в системе «хищник–жертва». В природных условиях особи, предрасположенные к судорожным припадкам, могут иметь селективное преимущество при усилении пресса хищников. Судорожные припадки в ответ на хэндлинг отмечены у 29.8 % потомков водяных полевок виварно-го разведения. Доля таких особей существенно увеличивалась, если у одного или обоих родителей регистрировали судорожные состояния, что свидетельствует о наследственной предрасположенности к припадкам. В парах «родители–потомки» обнаружена достоверная корреляция среднего возраста наступления первых припадков ($r = 0.42$, $p < 0.01$). Минимальный возраст регистрации припадков у водяной полевки составляет 39 дней, максимальный – 1105, медианный – 274 дня. Предрасположенность к припадкам не связана с полом. Гены, контролирующие возникновение судорожных состояний, оказывают плейотропное действие на продолжительность жизни: особи с судорожными припадками в условиях вивария живут дольше, чем особи с нормальным фенотипом. Водяная полевка может служить подходящим модельным объектом для изучения природы судорожных состояний и эволюции долголетия.

Ключевые слова: водяная полевка; судорожные припадки; возраст; наследственная предрасположенность; циклы численности; продолжительность жизни.

Для цитирования: Назарова Г.Г., Проскурняк Л.П. Наследственная предрасположенность водяных полевок (*Arvicola amphibius* L.) к судорожным припадкам в ответ на хэндлинг и ее связь с продолжительностью жизни. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):371-377. DOI 10.18699/VJGB-22-45

Hereditary predisposition of water voles (*Arvicola amphibius* L.) to seizures in response to handling

G.G. Nazarova , L.P. Proskurnyak 

Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 galinanazarova@mail.ru; luda_proskurnjak@mail.ru

Abstract. Finding out the hereditary predisposition to seizures in response to specific external stimuli is important for understanding the causes of epileptiform conditions, developing new methods for their prevention and therapies. In the water vole, individuals with convulsive seizures are found both in natural and laboratory conditions. The data of long-lasting maintenance and breeding of water voles in vivarium conditions were analyzed in order to establish a hereditary predisposition to convulsive seizures, and the influence of sex and age on their development. In the vivarium, seizures are provoked by handling and are observed in 2.4 % of voles caught in the natural population with cyclic fluctuations in abundance. Seizures are observed more often in individuals caught in the phases of decline and depression of abundance than in individuals caught in the phases of rise or peak. Convulsive states are probably an element of adaptive behavior formed in the predator-prey system. In natural conditions, individuals predisposed to convulsive seizures may have a selective advantage when under increasing pressure from predators. Convulsive seizures in response to handling were noted in 29.8 % of descendants of captive-bred water voles. The proportion of such individuals increased significantly if one or both parents had convulsive states, which indicates the presence of a hereditary predisposition to seizures. In parent–offspring pairs, a significant correlation was found between the

average age of onset of the first seizures in parents and their offspring, $r = 0.42$, $p < 0.01$. The minimum age of registration of seizures in the water vole is 39 days, the maximum is 1105 days, and the median is 274 days. Predisposition to seizures is not related to sex. Genes that control the occurrence of seizures have a pleiotropic effect on life span, since individuals with seizures live longer in vivarium conditions than individuals with a normal phenotype. The water vole can serve as a suitable model object for studying the nature of convulsive states and the evolution of longevity. Key words: water vole; seizures; age; hereditary predisposition; population cycle; life span.

For citation: Nazarova G.G., Proskurnyak L.P. Hereditary predisposition of water voles (*Arvicola amphibius* L.) to seizures in response to handling. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4): 371-377. DOI 10.18699/VJGB-22-45

Введение

Тонико-клонические судороги – неконтролируемое напряжение или сокращение мышц, наблюдаемое у людей и других млекопитающих: серых крыс *Rattus norvegicus* (Полетаева и др., 2017), домашних мышей *Mus musculus* (Skradski et al., 1998), монгольских песчанок *Meriones unguiculatus* (Buchhalter, 1993), оленьих хомячков *Peromyscus maniculatus* (Jackson, 1997), сирийского хомячка *Mesocricetus auratus* (Muñoz et al., 2017), луговой полевки *Microtus pennsylvanicus* (Bronson, De La Rosa, 1994), собак *Canis familiaris* (Catala et al., 2018), кошек *Felis catus* (Pakozdy et al., 2014), кроликов (Gülersoy et al., 2021). Наиболее распространенная причина припадков – нарушение баланса возбуждающих и тормозящих нейромедиаторных механизмов в мозге (Полетаева и др., 2017). Судороги дифференцируют на спонтанные, провоцируемые неустановленными факторами и рефлекторные, вызываемые специфическими внешними стимулами, например электрическими, звуковыми, зрительными и тактильными (Okudan, Özkara, 2018).

В ответ на тактильную стимуляцию во время хэндлинга длительные тонико-клонические судороги развиваются у рыжих полевок *Myodes glareolus* (Schönecker, 2009), луговых полевок *M. pennsylvanicus* (Bronson, De La Rosa, 1994) и монгольских песчанок *M. unguiculatus* (Ludvig et al., 1991; Buckmaster, 2006). Другие раздражители – аудиогенные, ольфакторные – не эффективны в индукции припадков у этих видов. Серая крыса служит распространенным модельным объектом в исследованиях аудиогенной эпилепсии (Полетаева и др., 2017). Важно отметить, что генетические факторы предрасположенности к различным видам рефлекторной эпилепсии изучены крайне слабо, а гены, контролирующие соматосенсорную эпилепсию, совсем неизвестны (Okudan, Özkara, 2018). Выяснение наследственной предрасположенности к судорогам в ответ на хэндлинг важно для понимания причин возникновения судорожных состояний и совершенствования способов их предупреждения и лечения.

В последние десятилетия грызунов широко используют в нейрофизиологических исследованиях эпилепсии, что объясняется их небольшими размерами, миролюбивостью и быстрым размножением в неволе (Jackson, 1997). Сравнительные исследования на млекопитающих необходимы для более глубокого понимания эволюционных и генетических факторов, объясняющих судорожные состояния, поскольку они способствуют нахождению общих звеньев данной невропатологии, что имеет клиническое значение для человека (Grone, Varaban, 2015). Для понимания эволюционных механизмов возникновения судорожных состояний значительный интерес представляют виды, у

которых особи с припадками встречаются в природных условиях. Л.Г. Кротова (1962), изучавшая функцию надпочечников и углеводный обмен у водяных полевок, обитающих в пойме р. Чусовой Свердловской области, отметила, что у некоторых из отловленных зверьков наблюдались судороги, сопровождавшиеся коматозным состоянием. В связи с подробной изученностью различных аспектов популяционной экологии, генетики, физиологии водяной полевки и разработанностью методов ее разведения в неволе (Водяная полевка..., 2001) водяная полевка может стать перспективной моделью для исследования факторов предрасположенности к судорогам на популяционном, генетическом и неврологическом уровнях.

В данной статье проанализированы сведения, полученные в ходе многолетнего разведения водяных полевок в условиях вивария, для решения следующих задач: 1) описать картину судорог; 2) оценить долю особей с судорожными припадками среди животных, отловленных в природе и родившихся в виварии; 3) определить минимальный, максимальный и средний возраст появления припадков; 4) установить, связано ли проявление судорожной активности с полом животных, наличием данной неврологической патологии у родителей; 5) выяснить связь между предрасположенностью к припадкам и продолжительностью жизни.

Материалы и методы

Исследование выполнено на двух группах водяных полевок, содержащихся в лаборатории ИСиЭЖ СО РАН в условиях естественного светового режима при свободном доступе к воде и корму (морковь, распаренные зерновые смеси, свежая зелень):

- 1) животные, отловленные в 1983–2017 гг. в Убинском районе Новосибирской области, где проведены комплексные эколого-физиологические исследования популяции с выраженными высокоамплитудными 6–7-летними колебаниями численности (Водяная полевка..., 2001; Евсиков и др., 2017), прожившие в виварии после отлова не менее 3 мес. (290 самок и 299 самцов). Всего изучены 94 полевки с фазы пика, 32 с фазы спада, 155 с фазы депрессии и 308 с фазы подъема;
- 2) животные (родители и потомки), родившиеся в виварии ($n = 1776$). Виварная группа основана особями, отловленными в той же природной популяции. Для сохранения генетической гетерогенности она регулярно, не реже одного раза в три года, пополнялась дикими особями.

Такой подход позволяет, с одной стороны, выявить популяционные факторы, влияющие на распространенность судорожных состояний в природе, с другой – установить

генетические и онтогенетические факторы предрасположенности к припадкам в стандартных условиях содержания родителей и потомства.

Работа с животными двух групп на протяжении всего периода проведена по стандартной схеме: 1) всех животных индивидуально метили, определяли пол, регистрировали дату рождения (отлова) и смерти; 2) полевок, родившихся в виварии, еженедельно, до достижения 70-дневного возраста, взвешивали и измеряли длину тела. Измерения массы и длины тела виварных животных старше 70 дней, как и особей, отловленных в природной популяции, проводили один раз в месяц; 3) в период размножения перед формированием брачных пар (исключали близкородственных партнеров) у самок брали вагинальные мазки, у самцов измеряли аногенитальное расстояние; 4) на протяжении всей жизни животных использовали в экспериментах, целью которых было изучение связи этолого-физиологических характеристик водяных полевок с функцией воспроизводства. Проводили тесты на социальные взаимодействия, ольфакторный выбор брачного партнера, родительское поведение, забор крови из ретроорбитального синуса и хвоста, сбор мочи. При выполнении экспериментов полевок приходилось брать в руки (не менее одного раза в месяц), и во время хэндлинга у части животных развивались судорожные приступы. Основным диагностическим признаком судорожного состояния – выраженные тонические или клонические сокращения мускулатуры туловища, конечностей. Такие случаи регистрировали в рабочем журнале. Животных с судорожными припадками не выбраковывали, допускали к размножению. Спонтанные судороги у животных, находившихся в собственных клетках и не подвергавшихся хэндлингу, не наблюдали.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программ SPSS Statistics 15.0 (IBM Corp., США) и Statistica 6.1. (StatSoft Inc., США). Доли в выборках сравнивали методом хи-квадрат Пирсона. Влияние фиксированных и случайных факторов на возраст регистрации первых припадков или продолжительность жизни оценивали с использованием смешанной линейной модели, при этом зависимые переменные подвергали логарифмическому (\ln) преобразованию, чтобы их распределение соответствовало нормальному. Для построения кривых выживания применяли метод Каплана–Майера. Различия между кривыми оценивали по критерию Гехана–Уилкоксона. В тексте и таблицах приведены средние значения признаков (X), стандартная ошибка ($\pm SE$) и объем выборок (n). Уровень статистической значимости принят $p < 0.05$.

Результаты

Описание припадков

Судорожный приступ развивался в первую минуту после взятия животного в руки. Начинался с подергивания вибрисс, тонического напряжения мышц передней части туловища с их последующим ритмичным сокращением, при этом животное могло выгибать спину, откидывать голову назад. Таких особей при первых признаках наступления припадков выпускали в арену и наблюдали за их состоянием. Судороги распространились на все тело,

в некоторых случаях приступ сопровождался скрежетом зубов, крайне редко – потерей сознания. После прекращения судорог у животных возникало двигательное возбуждение – стремительный бег.

Доля особей с судорожными припадками среди полевок, изъятых из природной популяции на разных фазах динамики численности

У 2.4 % полевок из 589 изъятых из природной популяции и проживших в виварии не менее трех месяцев отмечены тонико-клонические судорожные припадки, вызванные взятием в руки для прижизненной оценки морфофизиологических и поведенческих показателей. Половые отличия предрасположенности к припадкам не обнаружены ($\chi^2 = 0.004$, $p = 0.950$).

Доля особей с припадками зависела от фазы динамики численности при изъятии животных из популяции ($\chi^2 = 14.58$, $df = 3$, $p = 0.002$), рис. 1. У полевок с фаз спада–депрессии численности доля предрасположенных к припадкам была достоверно выше, чем у полевок с фаз подъема–пика численности (5.88 ± 1.72 % и 0.97 ± 0.56 % соответственно; $\chi^2 = 10.25$, $df = 1$, $p = 0.014$).

Судорожные состояния у полевок, родившихся в виварии

Судорожные припадки наблюдали у 29.8 % ($n = 1776$) потомков водяных полевок виварного разведения, проживших не менее 22 дней после рождения. Предрасположенность к припадкам не зависела от пола (самцы – 29.4 %, самки – 30.1 %; $\chi^2 = 0.116$, $df = 1$, $p = 0.734$). В период молочного вскармливания, который завершался в возрасте трех недель, припадков не отмечали.

Возраст наступления первых припадков

Дата наступления первого припадков зафиксирована только для 480 животных. Минимальный возраст животных при наступлении припадков составил 39 дней, максимальный – 1105 дней. Модальный возраст – 189 дней, медианный – 274, средний – 324.6 ± 7.8 дня. Гистограмма распределения возраста наступления первых припадков представлена на рис. 2.

Анализ данных с использованием смешанной линейной модели с учетом года рождения и идентификацион-

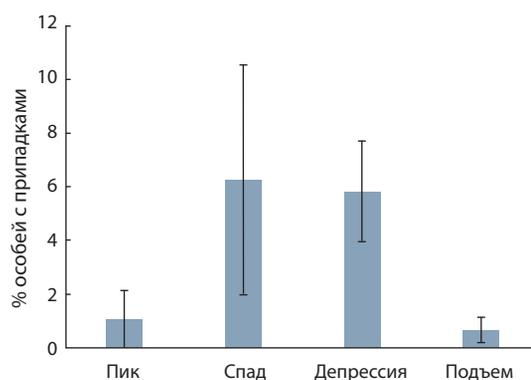


Рис. 1. Доля особей (%) с припадками на разных фазах популяционного цикла.

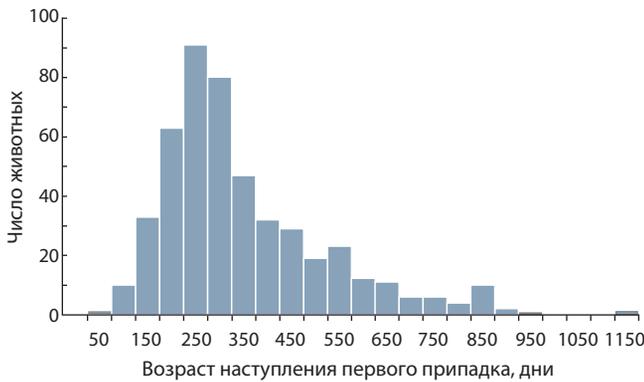


Рис. 2. Гистограмма распределения возраста наступления первого судорожного припадка.

Таблица 1. Доля потомства с припадками в зависимости от судорожного статуса родителей

Припадки у родителей		Припадки у потомства	
Мать	Отец	N	% ± SE
Нет	Нет	627	15.00 ± 1.42
	Да	316	39.56 ± 2.75
Да	Нет	441	37.87 ± 2.31
	Да	272	52.57 ± 3.02

ного номера sibсово́й группы как случайных факторов показал отсутствие влияния пола как фиксированного фактора ($F_{1,416.5} = 0.312, p = 0.577$) на возраст наступления первого припадка (самцы – 351.5 ± 25.3 дня, самки – 344.4 ± 25.1 дня). Влияние года рождения и принадлежности к sibсово́й группе было достоверным ($Z = 2.877, p = 0.004$ и $Z = 3.841, p < 0.001$ соответственно).

Наследственная предрасположенность к развитию судорожных состояний

Для выяснения вопроса о наследственной предрасположенности водяных полевок к припадкам в ответ на хэндлинг использованы животные, прожившие в виварии не менее 39 дней, что соответствует минимальному возрасту наступления припадка. Всего изучены 1656 полевок из 445 пометов. Результаты показали, что предрасположенность потомства к припадкам зависит от судорожного статуса их родителей (табл. 1). Доля потомства с припадками достоверно увеличивалась, если у одного или обоих родителей регистрировали судорожные состояния ($\chi^2 = 151.67, df = 3, p < 0.001$).

В парах «родители–потомки» с известным возрастом наступления первых припадков у обоих родителей и потомства (39 родительских пар, 90 детенышей) обнаружена достоверная корреляция среднего возраста наступления первых припадков, рассчитанного для родителей и потомков ($r = 0.42, p < 0.01$; рис. 3), свидетельствующая о существенном вкладе генов аддитивного действия в этот признак и возможности отбора по возрасту появления припадков.

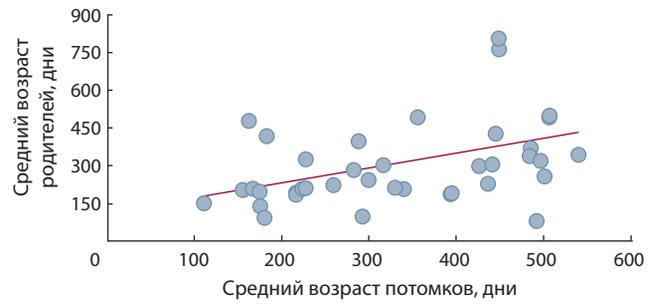


Рис. 3. Корреляция возраста наступления первых припадков в парах «средний родитель–средний потомок».

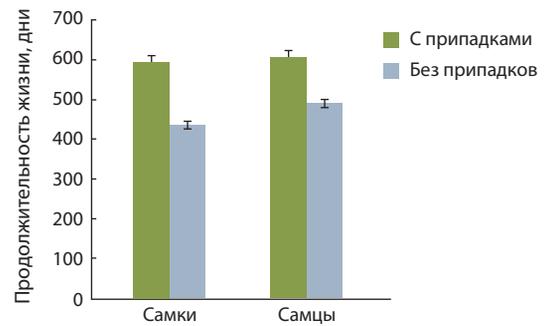


Рис. 4. Связь продолжительности жизни с припадками у самцов и самок водяной полевки.

Связь между судорожными припадками и продолжительностью жизни

Для выяснения связи между предрасположенностью к судорогам и продолжительностью жизни использовали смешанную линейную модель, включавшую фиксированные (наличие/отсутствие приступов и пол) и случайные (год рождения, идентификационный номер sibсово́й группы) факторы. Установлено достоверное влияние на продолжительность жизни пола ($F_{1,1410.3} = 5.342, p = 0.021$) и судорожного статуса особи ($F_{1,1392.2} = 132.926, p < 0.001$). Самцы живут дольше, чем самки ($\beta = 24.041 \pm 10.402, t = 2.311, p = 0.021$). Продолжительность жизни животных без припадков достоверно ниже, чем проявляющих судорожную активность в ответ на хэндлинг ($\beta = -134.458 \pm 10.402, t = -11.529, p < 0.001$), рис. 4. Определена достоверная зависимость продолжительности жизни от года рождения (Wald-Z = 3.295, $p = 0.001$), а влияние принадлежности к sibсово́й группе было статистически незначимым (Wald-Z = 1.419, $p = 0.156$).

На рис. 5 приведены кривые выживания сравниваемых групп полевок. Между ними обнаружены достоверные различия по критерию Гехана–Вилкоксона ($GW = -11.452, p < 0.001$).

Зависимость продолжительности жизни потомства от судорожного статуса родителей

Для выяснения зависимости продолжительности жизни потомства от судорожного статуса родителей с использованием смешанной линейной модели оценили влияние фиксированных факторов: пола, предрасположенности к

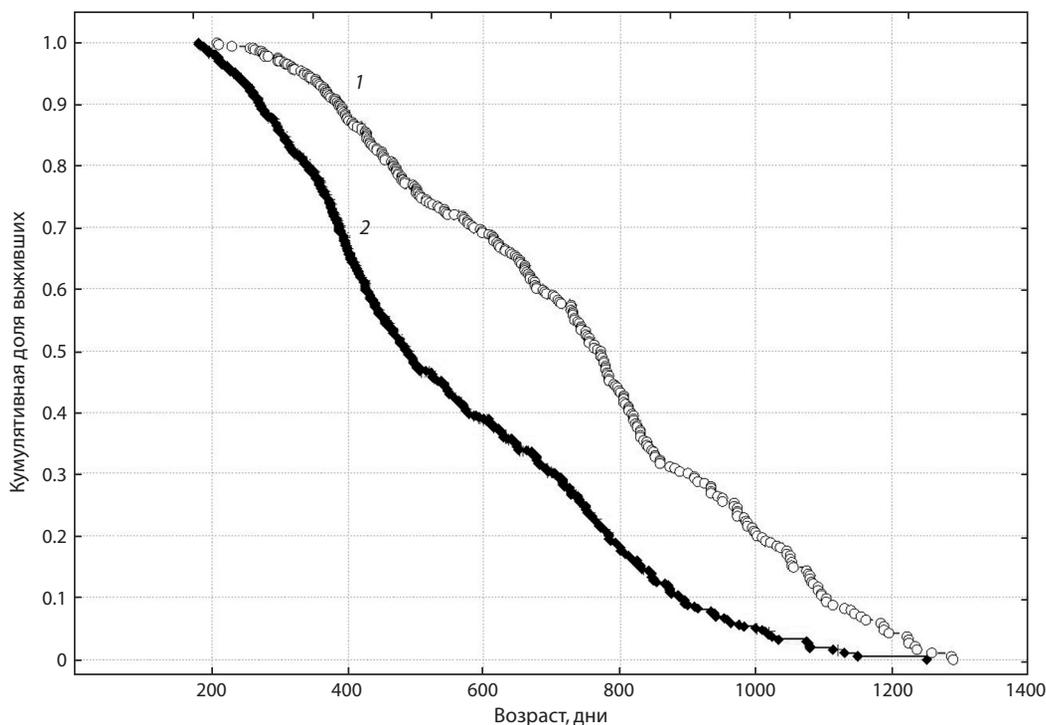


Рис. 5. Кривые выживания двух групп полевок: предрасположенных к судорожным припадкам (1) и без припадков (2).

Таблица 2. Продолжительность жизни потомства в зависимости от судорожного статуса родителей

Припадки у родителей		Всего потомков	Продолжительность жизни, дни ± SE
Мать	Отец		
Нет	Нет	540	482.0 ± 19.2
	Да	282	513.8 ± 21.5
Да	Нет	386	541.9 ± 20.4
	Да	241	523.2 ± 22.6

судорогам матери, отца и взаимодействия фенотипов родителей. Год рождения и идентификационный номер sibсовской группы включили в модель как случайные факторы. Продолжительность жизни зависела от пола ($F_{1,1413.6} = 4.580, p = 0.033$), судорожного статуса матери ($F_{1,366.2} = 7.280, p = 0.007$) и взаимодействия фенотипов матери и отца ($F_{1,376.4} = 4.024, p = 0.046$). Потомство пар, у которых либо мать, либо оба родителя не имели припадков, демонстрировало достоверно меньшую продолжительность жизни ($\beta = -39.442 \pm 12.664, t = -3.115, p = 0.002$ и $\beta = -50.504 \pm 25.176, t = -2.006, p = 0.046$ соответственно). Влияние судорожного статуса отца на продолжительность жизни потомства было статистически незначимым ($F_{1,393.5} = 0.253, p = 0.615$), как и влияние принадлежности к sibсовской группе (Wald-Z = 1.760, $p = 0.078$). Сведения о средней продолжительности жизни в зависимости от судорожного статуса родителей приведены в табл. 2.

Обсуждение

У водяных полевок при взятии в руки могут развиваться судорожные припадки, с одинаковой частотой у самцов и самок. Длительные тонико-клонические судороги в от-

вет на хэндинг отмечены у рыжей полевки (Schönecker, 2009), луговой полевки (Bronson, De La Rosa, 1994) и монгольской песчанки (Ludvig et al., 1991; Buckmaster, 2006). Развитие судорожного припадка у водяной полевки сходно с картиной припадка у рыжей и луговой полевок, крыс линии Крушинского–Молодкиной, только у рыжей и луговой полевок отсутствует фаза стремительного, или клонического, бега, характерная для припадков крыс указанной линии (Bronson, De La Rosa, 1994; Schönecker, 2009; Полетаева и др., 2017) и водяной полевки.

По данным литературы, рефлекторные эпилептиформные приступы, вызванные тактильными или акустическими стимулами, характерны только для мелких грызунов, что связано со структурно-функциональными особенностями их ЦНС, благодаря которым осуществляются патологические, с точки зрения человека, поведенческие реакции на стимулы, информирующие об опасности (Полетаева и др., 2017; Fedotova et al., 2021). Судорожные состояния, вероятно, выступают элементом адаптивного поведения, сформировавшегося в системе «хищник–жертва». Кратковременные клонические судороги в ответ на тактильную или акустическую стимуляцию могут оказы-

вать устрашающее воздействие на пернатых хищников, захватывающих добычу когтистыми лапами, а стремительный бег, как следующая фаза судорожного приступа, дает возможность жертвам быстро укрыться в безопасном месте.

Особь, предрасположенная к судорожным припадкам, могут иметь селективное преимущество при усилении пресса хищников. Известно, что численность специализированных пернатых хищников, обладающих высокой мобильностью, меняется синхронно с динамикой численности водяных полевок (Weber et al., 2002). Результаты скрещиваний водяных полевок, различающихся по предрасположенности к судорожным состояниям, указывают на генетическую детерминированность данного признака: доля потомства с припадками достоверно повышается, если у одного или особенно обоих родителей были припадки. Поскольку предрасположенность к судорожным состояниям у водяных полевок наследуется, то повышение частоты встречаемости особей с припадками в фазы спада и депрессии численности может быть связано с положительным отбором по склонности к припадкам в фазу пика численности при возрастании пресса пернатых хищников, увеличением инбридинга при низкой численности, случайными процессами.

Минимальный возраст регистрации припадков у водяной полевки составляет 39 дней, максимальный – 1105, медианный – 274 дня. У рыжей полевки медиана возраста первого наблюдения приступа – 157 дней (Schönecker, 2009). У полевок и песчанок судороги появляются в более позднем возрасте, чем у склонных к судорогам лабораторных крыс и мышей.

У водяной полевки возраст появления первых припадков – наследуемый признак, по которому возможен успешный отбор. Выявление основной мутации, запускающей припадок, и механизмов, контролирующих возрастную динамику судорожных состояний, может дать представление об особенностях развития судорожных состояний у других млекопитающих. В настоящее время известно, что 70–80 % случаев эпилепсии связаны с одним или несколькими генетическими факторами, остальным сопутствуют приобретенные состояния, такие как инсульт, опухоль или травма головы (Myers, Mefford, 2015).

Сохранению в популяции генов, контролирующих предрасположенность к судорожным состояниям в ответ на хэндлинг, способствует их положительный плейотропный эффект в отношении продолжительности жизни. Нами показано, что особи с припадками в условиях вивария живут дольше, чем особи с нормальным поведенческим фенотипом. Результаты противоречат данным, полученным в исследованиях на мышах, в которых изучали влияние отдельных генов на эпилептогенез и продолжительность жизни (Marshall et al., 2021), что указывает на многообразие генетических механизмов, опосредующих связь подобного поведенческого фенотипа с жизнеспособностью.

Наличие общих звеньев в эффектах генов, контролирующих наступление судорожных приступов в ответ на хэндлинг и продолжительность жизни у водяной полевки, подтверждает данные о положительном влиянии судорожного статуса матери на продолжительность жизни потомства. Потомство матерей с припадками живет дол-

ше, чем потомство матерей с нормальным фенотипом, а от судорожного статуса отца продолжительность жизни потомства не зависит. Возможно, с генетической предрасположенностью самок к припадкам скоррелированы физиологические показатели в период беременности, лактационная способность или материнское поведение, от которых, в свою очередь, зависит жизнеспособность потомства, что мы планируем выяснить в будущем.

Таким образом, водяная полевка может служить подходящим модельным объектом для изучения не только природы судорожных состояний, но и эволюции долголетия. Требуются дальнейшие исследования физиологических и генетических механизмов контроля судорожных припадков у водяной полевки, вызванных хэндлингом, а также связи предрасположенности к припадкам с характеристиками жизненного цикла.

Заключение

Впервые установлено, что у водяной полевки в ответ на хэндлинг развиваются судорожные припадки. При содержании в условиях вивария доля животных, предрасположенных к судорожным припадкам, среди отловленных в фазы спада–депрессии численности природной популяции выше, чем среди отловленных в фазы подъема–пика численности. Предрасположенность к развитию судорог у водяной полевки – наследуемый признак, скоррелированный с продолжительностью жизни, что указывает на возможность естественного и искусственного отбора по этому признаку. Полученные данные открывают возможность выведения линий, различающихся по склонности к развитию эпилептиформных припадков в ответ на хэндлинг, для исследования механизмов эпилептогенеза и долголетия.

Список литературы / References

- Водяная полевка: Образ вида. М.: Наука, 2001;527.
[The Water vole: an image of the species. Moscow: Nauka, 2001;527. (in Russian)]
- Евсиков В.И., Музыка В.Ю., Назарова Г.Г., Потапова О.Ф., Потапов М.А. Влияние гидрологических условий на интенсивность воспроизводства и структуру популяции водяной полевки *Arvicola amphibius*. *Экология*. 2017;3:226-229. DOI 10.7868/S0367059717030052.
- [Evsikov V.I., Muzyka V.Y., Nazarova G.G., Potapova O.F., Potapov M.A. Effect of hydrological conditions on reproduction rate and population structure of the European water vole, *Arvicola amphibius*. *Ekologia = Russian Journal of Ecology*. 2017;48(3):290-293. DOI 10.1134/S1067413617030055]
- Кротова Л.Г. Изменения надпочечников и углеводного обмена у водяной полевки (*Arvicola terrestris*) в весенне-летний период. В: Вопросы внутривидовой изменчивости млекопитающих. Труды института биологии. Свердловск, 1962;29:129-140.
- [Krotova L.G. Changes in the adrenal glands and carbohydrate metabolism in the water vole (*Arvicola terrestris*) in the spring-summer period. In: Issues of the intraspecific variability of mammals. Proceedings of the Institute of Biology. Sverdlovsk, 1962;29:129-140. (in Russian)]
- Полетаева И.И., Костына З.А., Сурина Н.М., Федотова И.Б., Зорина З.А. Генетическая линия крыс Крушинского–Молодкиной как уникальная экспериментальная модель судорожных состояний. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(4):427-434. DOI 10.18699/VJ17.261.

- [Poletaeva I.I., Kostyna Z.A., Surina N.M., Fedotova I.B., Zorina Z.A. The Krushinsky–Molodkina genetic rat strain as a unique experimental model of seizure states. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(4): 427-434. DOI 10.18699/VJ17.261. (in Russian)]
- Bronson F.H., De La Rosa J. Tonic-clonic convulsions in meadow voles. *Physiol. Behav.* 1994;56(4):683-685. DOI 10.1016/0031-9384(94)90227-5.
- Buchhalter J.R. Animal models of inherited epilepsy. *Epilepsia*. 1993; 34(Suppl. 3): S31-S41. DOI 10.1111/j.1528-1157.1993.tb05921.
- Buckmaster P.S. Inherited epilepsy in Mongolian gerbils. In: Pitkänen A., Schwartzkroin P.A., Moshé S.L. (Eds.). *Models of seizures and epilepsy*. Ch. 21. Burlington: Academic Press, 2006;273-294. DOI 10.1016/b978-012088554-1/50023-2.
- Catala A., Cousillas H., Hausberger M., Grandgeorge M. Dog alerting and/or responding to epileptic seizures: A scoping review. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208280. DOI 10.1371/journal.pone.020828.
- Fedotova I.B., Surina N.M., Nikolaev G.M., Revishchin A.V., Poletaeva I.I. Rodent brain pathology, audiogenic epilepsy. *Biomedicines*. 2021;9(11):1641. DOI 10.3390/biomedicines9111641.
- Groner B.P., Baraban S.C. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nat. Neurosci.* 2015;18(3):339-343. DOI 10.1038/nn.3934.
- Gülersoy E., İyigün S.S., Erol B.B. An overview of seizures and epilepsy in rabbits: etiological differences and clinical management. *Nauk. Visn. Vet. Med.* 2021;1(165):159-164. DOI: 10.33245/2310-4902-2021-165-1-159-164.
- Jackson R.K. Unusual laboratory rodent species: research uses, care, and associated biohazards. *ILAR J.* 1997;38(1):13-21. DOI 10.1093/ilar.38.1.13.
- Ludvig N., Farias P.A., Ribak C.E. An analysis of various environmental and specific sensory stimuli on the seizure activity of the Mongolian gerbil. *Epilepsy Res.* 1991;8(1):30-35. DOI 10.1016/0920-1211(91)90033-c.
- Marshall G.F., Gonzalez-Sulser A., Abbott C.M. Modelling epilepsy in the mouse: challenges and solutions. *Dis. Model. Mech.* 2021;14(3): dmm047449. DOI 10.1242/dmm.047449.
- Muñoz L.J., Carballosa-Gautam M.M., Yanowsky K., García-Atarés N., López D.E. The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: The GASH:Sal. *Epilepsy Behav.* 2017;71(Pt. B):181-192. DOI 10.1016/j.yebeh.2016.03.002.
- Myers C.T., Mefford H.C. Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med.* 2015;7(1):91. DOI 10.1186/s13073-015-0214-7.
- Okudan Z.V., Özkara Ç. Reflex epilepsy: triggers and management strategies. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2018;14:327-337. DOI 10.2147/NDT.S107669.
- Pakozdy A., Halasz P., Klang A. Epilepsy in cats: theory and practice. *J. Vet. Intern. Med.* 2014;28(2):255-263. DOI 10.1111/jvim.12297.
- Schönecker B. Handling-induced tonic/clonic seizures in captive born bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2009; 118(1-2):84-90. DOI 10.1016/j.applanim.2009.02.02.
- Skradski S.L., White H.S., Ptáček L.J. Genetic mapping of a locus (mass1) causing audiogenic seizures in mice. *Genomics*. 1998;49(2): 188-192. DOI 10.1006/geno.1998.5229.
- Weber J.-M., Aubry S., Ferrari N., Fischer C., Lachat Feller N., Meia J.-S., Meyer S. Population changes of different predators during a water vole cycle in a central European mountainous habitat. *Ecography*. 2002;25(1):95-101. DOI 10.1034/j.1600-0587.2002.250111.

ORCID ID

G.G. Nazarova orcid.org/0000-0001-8067-7596
L.P. Proskurnyak orcid.org/0000-0001-6138-2696

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке бюджетного проекта № 122011800268-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.02.2022. После доработки 18.04.2022. Принята к публикации 19.04.2022.

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

Платформа GWAS-MAP|ovis для хранения и анализа результатов полногеномных ассоциативных исследований овец

А.В. Кириченко¹✉, А.С. Злобин¹✉, Т.И. Шашкова², Н.А. Волкова³, Б.С. Иолчиев³, В.А. Багиров³, П.М. Бородин²,
Л.С. Карссен⁴, Я.А. Цепилов^{1, 5}, Ю.С. Аульченко¹

¹ Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, пос. Дубровицы, Московская область, Россия

⁴ PolyKnomics BV, Хертогенбос, Нидерланды

⁵ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ kianvl@bionet.nsc.ru; zlobin@bionet.nsc.ru

Аннотация. В последние годы увеличивается количество полногеномных исследований ассоциаций (ПГИА, GWAS), проведенных для различных экономически важных признаков животных. Результаты этих исследований представлены в виде суммарных статистик, которые можно использовать для изучения генетического контроля экономически важных признаков сельскохозяйственных животных, в том числе и при разработке методик маркер-ориентированной селекции. В большинстве случаев ПГИА сельскохозяйственных животных не соответствуют общепринятым в области исследований генетики человека стандартам формата публикаций результатов ПГИА в виде суммарных статистик (наличие информации об эффекторном и референсном аллелях, значение и направление эффекта и др.). Это существенно затрудняет использование суммарных статистик для нужд селекции. В области исследований генетики человека имеется несколько технологических решений для анализа результатов ПГИА, в том числе одно из самых крупных – платформа GWAS-MAP. Для других видов живых организмов, включающих и экономически важных сельскохозяйственных животных, подобных решений нет. В настоящей работе мы сфокусировались на создании схожей платформы для работы с суммарными статистиками ПГИА различных признаков овец, так как овцеводство в последнее время становится все более актуальной областью сельского хозяйства. По аналогии с платформой GWAS-MAP для хранения, унификации и анализа GWAS человека мы создали платформу GWAS-MAP|ovis. На сегодняшний день платформа содержит информацию о более чем 34 млн ассоциаций между вариантами геномной последовательности и признаками мясной продуктивности. Платформа может быть использована и для проведения анализа колокализации – метода, который позволяет установить, является ли ассоциация определенного локуса с двумя разными признаками результатом плейотропии или же данные признаки ассоциированы с разными вариантами, которые находятся в неравновесии по сцеплению. Эта платформа будет полезна как селекционерам для выбора перспективных маркеров для селекции (эффекты и аллели различных маркеров, влияющих на изучаемые признаки), так и для ученых, ведущих исследования в области генетики овец.

Ключевые слова: полногеномное исследование ассоциаций; маркер-ориентированная селекция; овцы; база данных; веб-интерфейс.

Для цитирования: Кириченко А.В., Злобин А.С., Шашкова Т.И., Волкова Н.А., Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Бородин П.М., Карссен Л.С., Цепилов Я.А., Аульченко Ю.С. Платформа GWAS-MAP|ovis для хранения и анализа результатов полногеномных ассоциативных исследований овец. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022; 26(4):378-384. DOI 10.18699/VJGB-22-46

The GWAS-MAP|ovis platform for aggregation and analysis of genome-wide association study results in sheep

A.V. Kirichenko¹✉, A.S. Zlobin¹✉, T.I. Shashkova², N.A. Volkova³, B.S. Iolchiev³, V.A. Bagirov³, P.M. Borodin²,
L.C. Karssen⁴, Y.A. Tsepilov^{1, 5}, Y.S. Aulchenko¹

¹ Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Dubrovitsy, Moscow region, Russia

⁴ PolyKnomics BV, 's-Hertogenbosch, The Netherlands

⁵ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ kianvl@bionet.nsc.ru; zlobin@bionet.nsc.ru

Abstract. In recent years, the number of genome-wide association studies (GWAS) carried out for various economically important animal traits has been increasing. GWAS discoveries provide summary statistics that can be used both for targeted marker-oriented selection and for studying the genetic control of economically important traits of farm

animals. In contrast to research in human genetics, GWAS on farm animals often does not meet generally accepted standards (availability of information about effect and reference alleles, the size and direction of the effect, etc.). This greatly complicates the use of GWAS results for breeding needs. Within the framework of human genetics, there are several technological solutions for researching the harmonized results of GWAS, including one of the largest, the GWAS-MAP platform. For other types of living organisms, including economically important agricultural animals, there are no similar solutions. To our knowledge, no similar solution has been proposed to date for any of the species of economically important animals. As part of this work, we focused on creating a platform similar to GWAS-MAP for working with the results of GWAS of sheep, since sheep breeding is one of the most important branches of agriculture. By analogy with the GWAS-MAP platform for storing, unifying and analyzing human GWAS, we have created the GWAS-MAP|ovis platform. The platform currently contains information on more than 34 million associations between genomic sequence variants and traits of meat production in sheep. The platform can also be used to conduct colocalization analysis, a method that allows one to determine whether the association of a particular locus with two different traits is the result of pleiotropy or whether these traits are associated with different variants that are in linkage disequilibrium. This platform will be useful for breeders to select promising markers for breeding, as well as to obtain information for the introduction of genomic breeding and for scientists to replicate the results obtained.

Key words: genome-wide association study; marker-based breeding; sheep; database; web interface.

For citation: Kirichenko A.V., Zlobin A.S., Shashkova T.I., Volkova N.A., Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Borodin P.M., Karssen L.C., Tsepilov Y.A., Aulchenko Y.S. The GWAS-MAP|ovis platform for aggregation and analysis of genome-wide association study results in sheep. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4): 378-384. DOI 10.18699/VJGB-22-46

Введение

Полногеномные исследования ассоциации (ПГИА, GWAS) – современный метод определения геномных локусов, ассоциированных с различными признаками, как количественными, так и бинарными. Этот метод нашел широкое применение в генетике человека и животных (Visscher et al., 2017). С 2007 г. наблюдается ежегодное увеличение работ, использующих ПГИА для поиска локусов, ассоциированных с разнообразными признаками. Результатом проведения ПГИА являются так называемые суммарные статистики – текстовые таблицы, где каждая строка – это результаты анализа ассоциации между изучаемым признаком и одним однонуклеотидным полиморфизмом (ОНП). В селекции суммарные статистики могут быть использованы для построения моделей маркерного и геномного отбора и идентификации кандидатов-мишеней для редактирования генома. Благодаря развитию технологий полногеномного генотипирования и секвенирования нового поколения в ходе современных ПГИА исследуются ассоциации сотен тысяч, а зачастую и миллионов ОНП с десятками признаков, на огромных выборках (до десятков тысяч у животных). Таким образом, суммарные статистики ПГИА – это большие массивы данных (Visscher et al., 2017).

Извлечение новых знаний из больших массивов данных является нетривиальной задачей, требует их сбора и построения системы для контроля качества, хранения, доступа и обработки. В области исследований генетики человека создана платформа GWAS-MAP (Shashkova et al., 2020) для унификации, хранения и анализа миллионов ассоциаций для тысяч различных признаков человека. Однако на сегодняшний день, насколько нам известно, ни для одного вида сельскохозяйственных животных технологического решения для работы с большими массивами данных суммарных статистик не предложено. Существует несколько баз данных для работы с локусами количественных признаков, значимо ассоциированными с изучаемыми признаками. Самая крупная и известная база данных – AnimalQTLdb, в ней собрана информация

о локусах количественных признаков для различных видов сельскохозяйственных животных (Hu et al., 2013). Существуют также подобные решения для конкретных видов животных, например база данных iSheep для овец, которая, помимо доступа к известным локусам количественных признаков, предоставляет доступ к данным генотипирования и секвенирования животных (Wang et al., 2021). Но ни одно из них не решает задач хранения, унификации и анализа суммарных статистик ПГИА. В этой работе мы сфокусировались на создании платформы для хранения, унификации и анализа суммарных статистик ПГИА овец.

Овцеводство – одна из важнейших отраслей сельского хозяйства. В настоящее время самым популярным продуктом овцеводства является баранина. Суммарно с 2013 г. проведено более 20 ПГИА различных экономически важных признаков овец. Отдельно нужно отметить работу (Bolormaa et al., 2016), которая на данный момент является крупнейшим ПГИА признаков мясной продуктивности овец. S. Bolormaa с коллегами исследовали выборку из более чем 10000 животных, для которой была доступна информация о 56 различных признаках, связанных с мясной продуктивностью, и обнаружено более 70 значимо ассоциированных ОНП, входящих в состав 23 локусов.

В нашей работе по аналогии с платформой из области исследований генетики человека GWAS-MAP мы создали платформу GWAS-MAP|ovis для сбора, унификации, хранения и анализа суммарных статистик ПГИА экономически важных признаков овец. На сегодняшний день платформа содержит более 34 млн ассоциаций для 80 различных признаков, связанных с мясной продуктивностью у овец. Платформа может быть полезна селекционерам для выбора на основе эффектов аллелей, ассоциированных с изучаемыми признаками, перспективных маркеров для селекции, а также ученым, ведущим исследования в области генетики овец. В частности, платформа позволяет проводить контроль качества ПГИА, производить поиск значимо ассоциированных ОНП, визуализировать результаты ПГИА, осуществлять анализ колокализации.

Материалы и методы

Создание платформы GWAS-MAP|ovis. Результаты ПГИА представляются в виде суммарных статистик, оформленных, как правило, в виде больших текстовых таблиц, где каждая строка – это результаты анализа ассоциации между изучаемым признаком и одним ОНП. Суммарные статистики могут включать следующие колонки: идентификатор ОНП (если существует), информация о положении ОНП на физической карте генома (хромосома и позиция), метрики контроля качества генотипирования или импутации ОНП, эффекторный и референсный аллели, частота эффекторного аллеля, оценка эффекта ОНП на признак, ее стандартная ошибка и *p*-value ассоциации, размер выборки и другие технические переменные, зачастую специфичные для исследования. Минимально необходимый набор переменных, необходимых для обработки суммарных статистик, – идентификатор ОНП, эффекторный и референсный аллели, оценка эффекта и ее стандартная ошибка. Стандартная ошибка может быть без потери информации заменена *p*-value или такой статистикой, как *t*-test или *z*-статистика. Так как количество ОНП велико, объем файла, содержащего таблицу суммарных статистик, может достигать нескольких гигабайт в случае, если количество характеризованных в ходе ПГИА ОНП больше 20 млн.

В качестве основы для создания платформы для сбора и хранения суммарных статистик полногеномных исследований признаков овец нами была использована платформа для хранения результатов ПГИА человека GWAS-MAP (Shashkova et al., 2020; Шашкова, Аульченко, 2020). Кроме того, для представления и визуализации генетических данных был использован веб-интерфейс PheLiGe (Shashkova et al., 2021). Принцип устройства платформы GWAS-MAP|ovis представлен на рис. 1.

Для хранения данных и манипуляций с ними GWAS-MAP использует две системы управления базами данных (СУБД) – ClickHouse и PostgreSQL. СУБД ClickHouse используется для хранения согласованных суммарных статистик. СУБД PostgreSQL применяется для хранения метаданных. Метаданные описывают источники получения суммарных статистик, исследованную в рамках ПГИА выборку, а также методы и особенности анализа данных.



Рис. 1. Схема устройства платформы GWAS-MAP|ovis.

Они содержат, например, ссылку на публикацию, послужившую источником данных; название признака; описание использованной при анализе модели наследования; число исследованных особей и т. д. Полный список полей метаданных доступен в Приложении 1¹. Обе базы данных были развернуты в едином контейнере LXC на базе образа операционной системы Ubuntu 18.04.

Один из ключевых шагов при создании базы данных – разработка каталога неравновесия по сцеплению и так называемой референтной таблицы (описаны ниже). Для обеспечения удобного доступа к базе данных и визуализации данных в виде интерактивных графиков был развернут веб-интерфейс PheLiGe-ovis в другом LXC-контейнере на базе образа операционной системы Ubuntu 18.04. Веб-интерфейс доступен по адресу <https://pheligeovis.icgbio.ru/>.

Полученная нами платформа, состоящая из двух баз данных, хранящих суммарные статистики и метаданные, и веб-интерфейса для доступа к данным, была названа GWAS-MAP|ovis и доступна через открытый (веб) и частный (на основе ssh) интерфейсы. Общие принципы работы веб-интерфейса и основных инструментов отражены в онлайн-помощнике при нажатии на красную кнопку под меню “Associations” в верхнем левом углу экрана на главной странице платформы.

Создание каталога неравновесия по сцеплению. Каталог неравновесия по сцеплению представляет собой список ОНП, для каждого из которых есть информация о его идентификаторе (*rs_id*), хромосоме и позиции (на основе сборки генома OAR_V3.1), эффекторном и референсном аллелях, а также частоте эффекторного аллеля в референтной популяции. Для создания каталога неравновесия по сцеплению мы использовали геномные данные референтной популяции (*N* = 96), содержащей 18 овец романовской породы, 6 – породы катадин, 10 архаров, 48 гибридов от скрещивания F₁ (романовской овцы и архара) и романовской овцы и 14 гибридов F₁ от скрещивания романовской овцы и катадинов. Все животные были генотипированы с помощью чипа высокой плотности Infinium® HD SNP Bead-Chip (606 060 ОНП, Illumina Inc., Сан-Диего, США) и использовались ранее в качестве репликационной выборки (Zlobin et al., 2021). В ходе подготовки референтной таблицы были удалены все дублицированные и мономорфные ОНП, аллели были поставлены в лексикографический порядок, удалены данные о половых хромосомах. На сегодняшний день каталог неравновесия по сцеплению содержит информацию о 523.578 ОНП. Распределение ОНП по аутосомам представлено в Приложении 2. Распределение частот минорных аллелей в референтной таблице приведено в Приложении 3.

Каталог неравновесия по сцеплению представляет собой файлы, содержащие генотипы животных референтной популяции по всем ОНП, входящим в референтную таблицу. Файлы представлены в бинарном формате PLINK (.bed, .bim и .fam). Каталог используется для подсчета неравновесия по сцеплению между ОНП для поиска прокси ОНП в веб-интерфейсе PheLiGe-ovis.

¹ Приложения 1–4 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx8.pdf>

Модуль унификации и контроля качества результатов ПГИА. Этот модуль используется для загрузки суммарных статистик в базу данных. Так как файлы суммарных статистик, полученные из разных источников, имеют различные форматы, то на этапе загрузки в базу необходимо привести их к общему универсальному формату (унифицировать). На этом этапе проверяются соответствие между rs_id и положением на хромосоме, а также согласованность между эффекторным и референсным аллелями.

На следующем этапе суммарные статистики проходят контроль качества. Контроль качества состоит из трех этапов: (1) сравнение частоты аллелей между ПГИА и данными каталога неравновесия по сцеплению, (2) проверка распределения размера эффекта и (3) проверка того, что *p*-value соответствуют *z*-статистике (оценка эффекта, поделенная на стандартную ошибку оценки). Модуль генерирует html-отчет, с помощью которого можно выявить ошибки унификации и контроля качества. Если данные проходят контроль, суммарные статистики далее сохраняются в базе данных.

Результаты и обсуждение

Наполнение платформы результатами ПГИА

Для наполнения платформы нами был проведен поиск суммарных статистик ПГИА в открытом доступе из работ, вошедших в ранее опубликованную базу QTL, и генов, ассоциированных с признаками мясной продуктивности у овец (Zlobin et al., 2019). Из 46 проанализированных публикаций только исследование S. Bolormaa с коллегами (2016) предоставило доступ к полногеномным суммарным статистикам. Все остальные работы не содержали полногеномных результатов. Перед загрузкой в GWAS-MAP|ovis все данные прошли унификацию и контроль качества. В результате было загружено по 488 074 ассоциаций для каждого из 56 признаков, представленных в данной статье.

В дополнение к данным S. Bolormaa с коллегами (2016) в GWAS-MAP|ovis нами были загружены суммарные статистики, полученные на российской популяции овец (*N* = 50–108), которые использовались ранее в качестве репликационной выборки (Zlobin et al., 2021). Эти статистики касались генетических ассоциаций семи композитных индексов, связанных с мясной продуктивностью, измеренных в трех различных временных промежутках (6, 42 и 90 дней после рождения), и массы животного, также измеренной в трех временных промежутках (Приложение 4). В результате на данный момент платформа включает информацию о более чем 34 млн ассоциаций

ОНП–признак для 80 различных признаков, связанных с мясной продуктивностью у овец. Коллекции, содержащиеся в платформе, и их краткая аннотация представлены в таблице.

Использование платформы для проведения анализа плейотропии

Одним из преимуществ созданной нами платформы является возможность проведения так называемого анализа колокализации (SMR- θ) (Momozawa et al., 2018). Он позволяет сравнивать паттерны ассоциации конкретного геномного локуса с разными признаками и делать выводы о наличии или отсутствии плейотропного эффекта данного локуса на те или иные признаки. При справедливости гипотезы о плейотропном эффекте локуса ожидается, что отношения оценок эффектов ОНП на два признака в изучаемом локусе должны отличаться между различными ОНП незначительно. Если паттерны ассоциаций в регионе разные, т. е. отношение эффектов значительно варьирует от ОНП к ОНП, скорее всего, в локусе присутствуют разные для каждого признака функциональные полиморфизмы, находящиеся в неравновесии по сцеплению.

Статистика θ – это взвешенная корреляция, при подсчете которой используется информация о значениях *p*-value и направлении эффекта. Высокое абсолютное значение (например, $|\theta| > 0.7$) говорит в пользу плейотропного эффекта локуса на изучаемые признаки. Знак θ указывает, имеют ли ОНП в изучаемом локусе одинаковое направление эффектов на исследуемые признаки (положительное значение величины θ) или разные направления эффектов (отрицательное значение величины θ). Пример анализа колокализации приведен на рис. 2.

Мы провели анализ колокализации для самого значимо ассоциированного ОНП из данных (Bolormaa et al., 2016) в гене *LCORLI*. Для ОНП rs401834107 было выбрано 12 признаков, которые были ассоциированы с этим локусом с полногеномным уровнем значимости (*p*-value < 5E-07). Далее мы применили метод SMR- θ для сравнения паттернов ассоциаций между всеми 12 признаками (рис. 3.) Как видно из тепловой карты, характеризующей значения величины θ , признаки образуют два кластера, отличающихся направлением корреляции эффектов. Можно сделать вывод о наличии плейотропного эффекта изучаемого локуса внутри каждого кластера. При этом наблюдается наличие сильного плейотропного эффекта и между признаками из разных кластеров, но с противоположным направлением эффектов ОНП на признаки (отрицательное значение величины θ). Отдельно следует от-

Краткая аннотация коллекций, содержащихся в GWAS-MAP|ovis

Коллекция	Источник	Количество животных	Количество признаков	Количество ОНП для каждого признака	Представленные породы
Bolormaa et al., 2016	Публикация	10613	56	4 880 774	Мериносы, Полл Дорсет, Бордер, Лестер, Суффолк, Белый Суффолк, Тексель, Корридейл, Купворт и различные гибриды
MARH	Оригинальные данные	50–108	24	453 024	Смешанные гибриды романовской породы с катадинами, архарами и муффонами

PheLiGe|ovis Associations GWAS/cis-QTL Descriptors Analysis **Analysis** Service Info

Results

Primary SNP rs417860991 (Leg bone weight)
Secondary SNP rs417860991 (Leg + aitch bone weight)
Theta 0.9961

Filter parameters Analysis parameters

MAF 0.03 **p** 1
p-value 0.05 **k** 30
N factor 0.9 **T** 0.3

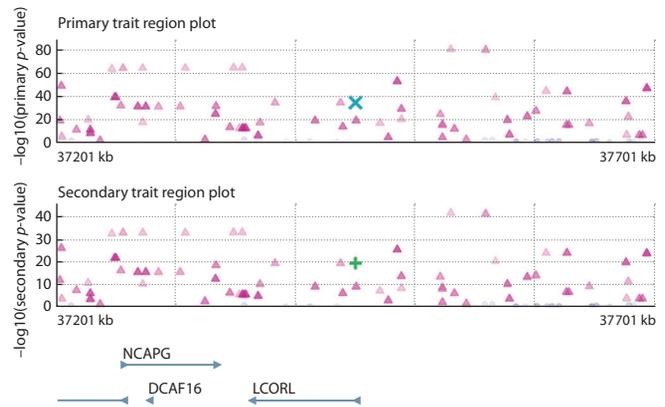
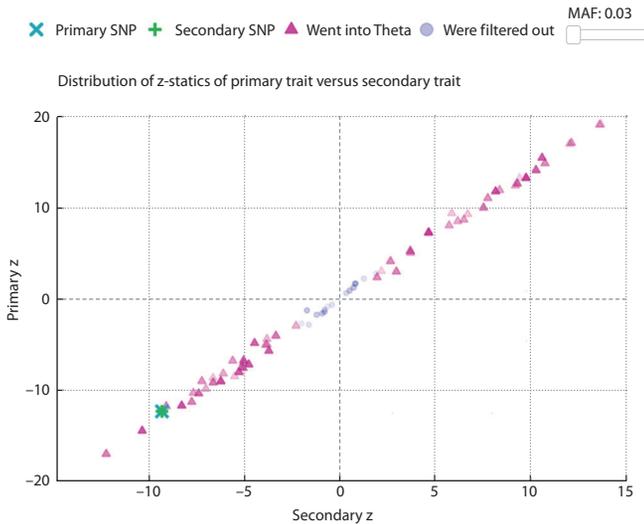


Рис. 2. Пример выдачи результатов анализа колокализации, выполненного с использованием платформы GWAS-MAP|ovis.

В левой части представлено совместное распределение z-статистик для основного признака, вес костей голени (leg bone weight, LEGBONE) (ось абсцисс) и вторичного признака, вес костей ноги с пяточной костью (leg + aitch bone weight, BONE) (ось ординат). В правой части приведены региональные графики ассоциаций для каждого из признаков (LEGBONE и BONE соответственно). Значение θ показано в верхнем левом углу рисунка над графиком.

метить выпадающий признак: убойный вес туши (slaughter weight), для которого некоторые значения θ оказались низкими (возможное отсутствие плейотропии). Однако ввиду того, что нами был выявлен плейотропный эффект локуса на другие признаки, исследуемые в анализе, мы считаем, что низкие значения θ в данном случае – это либо статистический артефакт, либо следствие недостаточной мощности анализа.

Таким образом, установлено, что локус rs401834107 имеет плейотропный эффект как минимум на 12 различных признаков, связанных с мясной продуктивностью у овец. Этот анализ является примером первого в мире анализа колокализации, проведенного на результатах ПГИА овец. Показано, что локус rs401834107 имеет плейотропный эффект и влияет на 12 различных признаков, связанных с мясной продуктивностью у овец.

Использование платформы для выбора кандидатных ДНК-маркеров для маркер-ориентированной селекции

Еще одним из преимуществ разработанной нами базы является возможность использования уже загруженных суммарных статистик для поиска маркеров для проведения маркер-ориентированной селекции. Мы осуществили поиск маркеров для одного из признаков (НСWT, вес туши после забоя) и оценили их предиктивный потенциал на российской выборке овец. Была выполнена процедура поиска независимых локусов (клампинг). Для этого с помощью частного (на основе ssh) интерфейса мы выбрали интересующие нас суммарные статистики (признак НСWT), а также установили порог значимости p -value < 1E-07. Най-

дено 4 независимых локуса (rs406365427, rs423487570, rs161042491, rs427891980). Полученная таблица, содержащая информацию об ОНП с наибольшей ассоциацией для каждого локуса (rs406365427, rs423487570, rs161042491, rs427891980), их хромосомах, позиции, эффекторном и референсном аллелях, эффекте и p -value, была применена для дальнейшего анализа.

С помощью найденных локусов мы оценили племенную ценность (ПЦ) животных на выборке российской популяции овец (Zlobin et al., 2021), использованы данные о 94 животных (гибриды от возвратного скрещивания романовской породы овец и архара). Племенная ценность была оценена по следующей формуле:

$$ПЦ = \sum(b \cdot g),$$

где b – вклад эффекторного аллеля самого ассоциированного ОНП каждого локуса, g – генотипы 94 животных для данного ОНП в формате 0, 1, 2 (закодированные по количеству эффекторного аллеля).

Далее с применением линейной регрессии мы установили, насколько значимо оцененная ПЦ может предсказывать фенотип особи. В качестве признака была выбрана масса животного через шесть дней после рождения. Модель выглядела следующим образом: $p \sim ПЦ + cov$, где p – значение фенотипа, ПЦ – племенная ценность выбранных локусов, cov – ковариаты, которые включали в себя информацию о поле, количестве ягнят в приплоде, а также две первые главные компоненты матрицы родства. В результате оцененная ПЦ была значимо ассоциирована с признаком (p -value = 0.03), что говорит о том, что отобранные нами локусы значимо влияют на показатель массы животного через шесть дней после рождения.

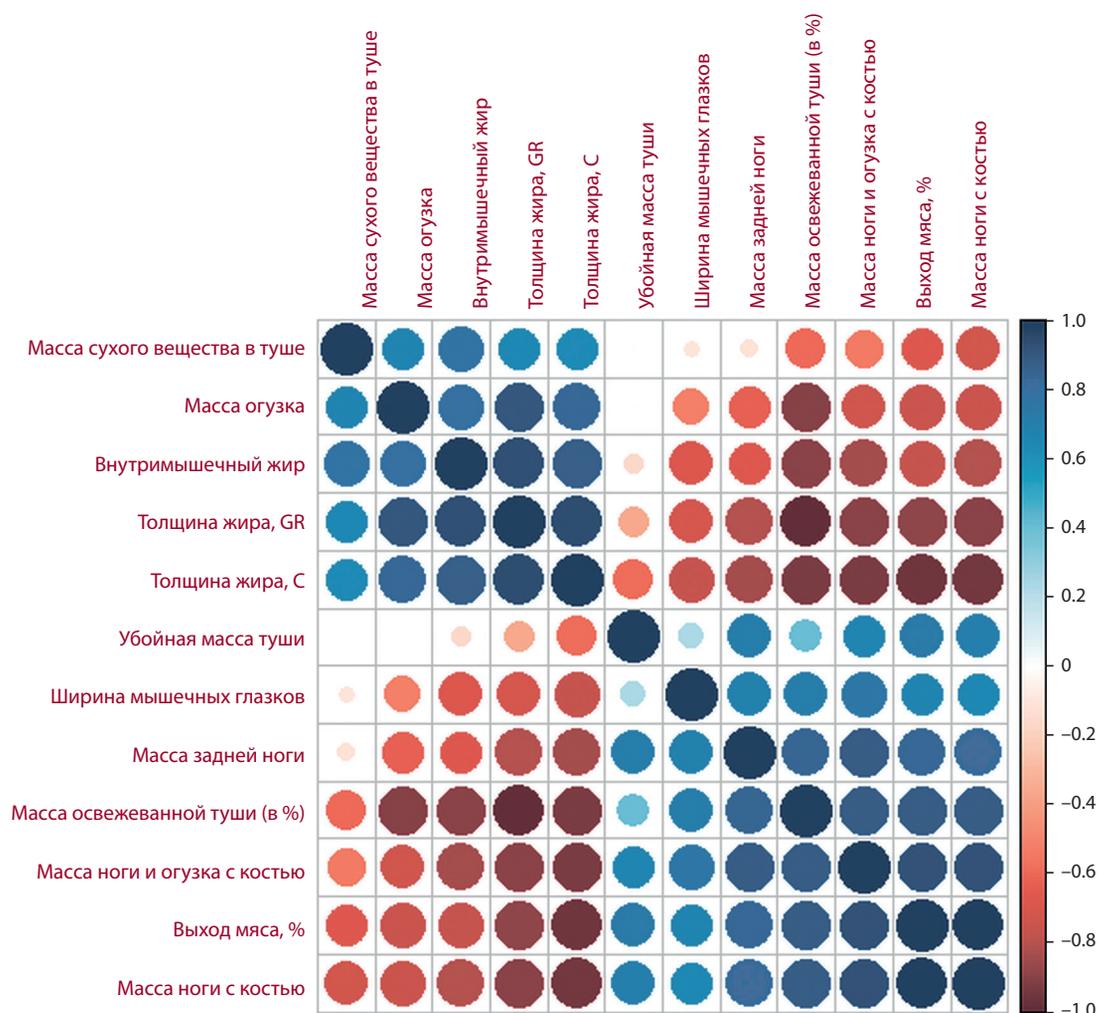


Рис. 3. Результаты анализа колокализации для ОНП rs401834107 на 12 оригинальных признаках из статьи (Bolormaa et al., 2016).

Красным цветом показан отрицательный знак значения θ , голубым – положительный знак значения θ . Чем ярче цвет и больше кружок, тем ближе абсолютное значение к единице.

Дополнительно к проведенному анализу мы оценили, какой прирост в массе ожидается при использовании животных со значением ПЦ, которое входит в четвертый верхний квартиль ($> 75\%$). С помощью t -критерия Стьюдента мы сравнили средние фенотипа, поправленного на вышеотмеченные ковариаты, во всей выборке и выборке животных, попавших в верхний квартиль по ПЦ. Установлено, что в среднем в выборке животных из верхнего квартиля масса была больше на 1.8 % (или ~55 г, p -value = 0.67), чем в среднем по всей популяции. Таким образом, маркеры, отобранные с использованием разработанной платформы, потенциально могут быть применимы для разработки тест-систем для ведения маркер-ориентированной селекции у овец.

Заключение

Создана платформа GWAS-MAP|ovis для сбора, унификации, хранения и анализа суммарных статистик полногеномных исследований ассоциаций признаков овец. Платформа содержит информацию о более чем 34 млн

ассоциаций ОНП–признак для 80 различных признаков, связанных с мясной продуктивностью у овец. Платформа позволяет осуществлять поиск информации об ассоциациях конкретного ОНП, построение Манхеттен-графиков и проводить анализ колокализации. Такая платформа может быть полезна как научным работникам, заинтересованным в генетике овец, так и селекционерам при выборе потенциальных локусов для проведения маркер-ориентированной селекции.

Список литературы / References

- Шашкова Т.И., Аульченко Ю.С. База данных для хранения и быстрого доступа к результатам полногеномных и региональных исследований ассоциаций. Патент РФ № 2020620869. 2020. [Shashkova T.I., Aulchenko Y.S. Database for storing and quickly accessing the results of genome-wide and regional association studies. Patent RF No. 2020620869. 2020. (in Russian)]
- Bolormaa S., Hayes B.J., van der Werf J.H.J., Pethick D., Goddard M.E., Daetwyler H.D. Detailed phenotyping identifies genes with pleiotropic effects on body composition. *BMC Genomics*. 2016;17:224. DOI 10.1186/s12864-016-2538-0.

- Hu Z.-L., Park C.A., Wu X.-L., Reecy J.M. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(D1): D871-D879. DOI 10.1093/nar/gks1150.
- Momozawa Y., Dmitrieva J., Théâtre E., Deffontaine V., Rahmouni S., Charlotteaux B., Crins F., Docampo E., Elansary M., Gori A.-S., Lecut C., Mariman R., Mni M., Oury C., Altukhov I., Alexeev D., Aulchenko Y., Amininejad L., Bouma G., Hoentjen F., Löwenberg M., Oldenburg B., Pierik M.J., van der Meulen-de Jong A.E., van der Woude C.J., Visschedijk M.C., International IBD Genetics Consortium, Lathrop M., Hugot J.-P., Weersma R.K., De Vos M., Franchimont D., Vermeire S., Kubo M., Louis E., Georges M. IBD risk loci are enriched in multigenic regulatory modules encompassing putative causative genes. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2427. DOI 10.1038/s41467-018-04365-8.
- Shashkova T.I., Gorev D.D., Pakhomov E.D., Shadrina A.S., Sharapov S.Z., Tsepilov Y.A., Karssen L.C., Aulchenko Y.S. The GWAS-MAP platform for aggregation of results of genome-wide association studies and the GWAS-MAP|homo database of 70 billion genetic associations of human traits. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2020;24(8): 876-884. DOI 10.18699/VJ20.686.
- Shashkova T.I., Pakhomov E.D., Gorev D.D., Karssen L.C., Joshi P.K., Aulchenko Y.S. PheLiGe: an interactive database of billions of human genotype-phenotype associations. *Nucl. Acids Res.* 2021; 49(D1):D1347-D1350.
- Visscher P.M., Wray N.R., Zhang Q., Sklar P., McCarthy M.I., Brown M.A., Yang J. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am. J. Hum. Genet.* 2017;101(1):5-22. DOI 10.1016/j.ajhg.2017.06.005.
- Wang Z.-H., Zhu Q.-H., Li X., Zhu J.-W., Tian D.-M., Zhang S.-S., Kang H.-L., Li C.-P., Dong L.-L., Zhao W.-M., Li M.-H. iSheep: an integrated resource for sheep genome, variant and phenotype. *Front. Genet.* 2021;12:714852. DOI 10.3389/fgene.2021.714852.
- Zlobin A.S., Nikulin P.S., Volkova N.A., Zinovieva N.A., Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Borodin P.M., Aksenovich T.I., Tsepilov Y.A. Multivariate analysis identifies eight novel loci associated with meat productivity traits in sheep. *Genes.* 2021;12(3):367. DOI 10.3390/genes12030367.
- Zlobin A.S., Volkova N.A., Borodin P.M., Aksenovich T.I., Tsepilov Y.A. Recent advances in understanding genetic variants associated with growth, carcass and meat productivity traits in sheep (*Ovis aries*): an update. *Arch. Anim. Breed.* 2019;62(2):579-583. DOI 10.5194/aab-62-579-2019.

ORCID ID

A.V. Kirichenko orcid.org/0000-0002-9972-9517
A.S. Zlobin orcid.org/0000-0001-9473-2410
N.A. Volkova orcid.org/0000-0002-7784-2201
P.M. Borodin orcid.org/0000-0002-6717-844X
Y.A. Tsepilov orcid.org/0000-0002-4931-6052

Благодарности. Работа выполнена при поддержке ЦГИМУ «Курчатовский геномный центр» ИЦиГ СО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.10.2021. После доработки 04.04.2022. Принята к публикации 11.04.2022

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

Таксономическая структура бактериальных сообществ в хлебных заквасках спонтанного брожения

В.К. Хлесткин¹ , М.Н. Локачук², О.А. Савкина², Л.И. Кузнецова², Е.Н. Павловская², О.И. Парахина²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных –

филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский филиал Научно-исследовательского института хлебопекарной промышленности, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

 dir2645@yandex.ru

Аннотация. Статья посвящена исследованию микробиома хлебных заквасок спонтанного брожения. Цель работы – изучение влияния технологических параметров ведения заквасок на таксономическую структуру микробиома хлебных заквасок спонтанного брожения. Объектами исследования являлись две закваски спонтанного брожения – густая ржаная и жидкая ржаная без заварки, приготовленные с использованием одной партии муки ржаной обдирной. Для изучения таксономической структуры заквасочного микробиома в динамике применяли метод высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК микроорганизмов. Показано, что технологические параметры ведения заквасок (влажность, температура) не оказывают влияния на таксономический состав микробиома густой ржаной и жидкой ржаной заквасок на уровне филумов/классов/родов (но не видов). Установлено, что в течение первых трех суток ведения в микробном сообществе доминировали бактерии из филумов Proteobacteria и Firmicutes. В филуме Proteobacteria большую долю занимали микроорганизмы из порядка Enterobacterales, которые сохранялись в течение трех суток ведения заквасок. Филум Firmicutes был представлен молочнокислыми бактериями родов *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactosoccus*. Классическими микробиологическими методами установлено, что через одни сутки брожения количество клеток молочнокислых бактерий было значительно выше в жидкой ржаной закваске по сравнению с густой, однако при дальнейшем ведении заквасок количество клеток было сопоставимым, при этом происходили существенные изменения на уровне родов и видов. Выявлено, что по мере увеличения относительной численности молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* происходило постепенное вытеснение кокковых форм *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*. При дальнейшем ведении заквасок через 10 суток положение доминирующих групп бактерий занимали представители филума Firmicutes – молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*. Показано влияние режима и параметров ведения заквасок на видовой состав лактобацилл, который демонстрировал низкое бактериальное разнообразие. В первые трое суток ведения в обеих заквасках доминировали лактобациллы *L. curvatus*, *L. brevis* и *Lactiplantibacillus* sp. Через месяц ведения в густой ржаной закваске доминировали *Fructilactobacillus sanfranciscensis* и *Companilactobacillus* sp., а в жидкой ржаной – *L. pontis*. Ключевые слова: ржаная закваска; микробиом; микробное сообщество; лактобактерии; высокопроизводительное секвенирование; ферментация; хлебобулочные изделия.

Для цитирования: Хлесткин В.К., Локачук М.Н., Савкина О.А., Кузнецова Л.И., Павловская Е.Н., Парахина О.И. Таксономическая структура бактериальных сообществ в хлебных заквасках спонтанного брожения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):385-393. DOI 10.18699/VJGB-22-47

Taxonomic structure of bacterial communities in sourdoughs of spontaneous fermentation

V.K. Khlestkin¹ , M.N. Lockachuk², O.A. Savkina², L.I. Kuznetsova², E.N. Pavlovskaya², O.I. Parakhina²

¹ All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg Branch of the Scientific Research Institute for the Baking Industry, Pushkin, St. Petersburg, Russia

 dir2645@yandex.ru

Abstract. The article is devoted to the study of the microbiome of spontaneously fermented sourdoughs. The aim of the work was to study the influence of the technological parameters of sourdough propagations on the taxonomic structure of the microbiome of spontaneously fermented sourdoughs. Two spontaneously fermented sourdoughs were studied: dense rye sourdough and liquid rye sourdough, both prepared using the same batch of peeled rye flour. To study the taxonomic structure of the sourdough microbiome in dynamics, the method of high-throughput sequencing of 16S rRNA gene fragments of microorganisms was used. It was shown that the technological parameters of sourdough (humidity, temperature) do not affect the taxonomic composition of the microbiome of dense rye or liquid rye sourdough at the phylum/class/genus level. It was found that during the first three days of propagations, bacteria from the phyla Proteobacteria and Firmicutes dominated in the microbial community. In the phylum Proteobacteria, microorganisms from the order Enterobacterales took a large share, which persisted for three days of

backslopping. The phylum Firmicutes was represented by lactic acid bacteria of the genera *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*. It was established by classical microbiological methods that after a day of fermentation, the number of lactic acid bacteria cells was significantly higher in liquid rye sourdough compared to dense one. However, with further propagation of sourdoughs, the number of cells was comparable, while significant changes occurred at the level of genera and species. It was shown that as the relative number of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* increased, a gradual displacement of the coccal forms of *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* happened. With further propagation of sourdough after 10 days, the position of the dominant groups of bacteria was occupied by representatives of the phylum Firmicutes, lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus*. The influence of the mode and parameters of the sourdough on the species composition of lactobacilli, which demonstrated a low bacterial diversity, is shown. In the first three days of propagations, lactobacilli *L. curvatus*, *L. brevis*, and *Lactiplantibacillus* sp. dominated in both sourdoughs. After a month of backslopping, *Fructilactobacillus sanfranciscensis* and *Companilactobacillus* sp. dominated in dense rye sourdough, and *L. pontis* dominated in liquid rye sourdough.

Key words: rye sourdough; microbiome; microbial community; lactobacillus; high-throughput sequencing; fermentation; bakery products.

For citation: Khlestkin V.K., Lockachuk M.N., Savkina O.A., Kuznetsova L.I., Pavlovskaya E.N., Parakhina O.I. Taxonomic structure of bacterial communities in sourdoughs of spontaneous fermentation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):385-393. DOI 10.18699/VJGB-22-47

Введение

В последние годы отмечается повышенный интерес к выработке хлебобулочных изделий на заквасках, в том числе в ремесленных и домашних условиях. Это связано с тем, что хлебобулочные изделия на заквасках характеризуются высокими показателями качества – вкусом, ароматом, питательной ценностью и устойчивостью к микробной порче. Закваска представляет собой полуфабрикат хлебопекарного производства, получаемый сбраживанием питательной смеси из муки и воды молочнокислыми бактериями или молочнокислыми бактериями и хлебопекарными дрожжами, которые могут попадать в закваску из исходного сырья или из промышленных стартовых микробных композиций (Ауэрман, 2009; De Vuyst et al., 2017).

Ведение закваски – это технологический процесс, предусматривающий регулярное освежение закваски порцией муки и воды с последующим выбраживанием до готовности. После брожения часть спелой закваски идет на замес теста, а другая часть используется для нового освежения. Тем самым создается непрерывный процесс ведения закваски. Это позволяет поддерживать заквасочную микробиоту в активном состоянии и производить закваску с заданными биотехнологическими и физико-химическими показателями, что обеспечивает выработку хлебобулочных изделий с требуемыми потребительскими свойствами (Сборник современных технологий..., 2008; Ауэрман, 2009).

Нами ранее было впервые показано (Локачук и др., 2020), что в ходе длительного ведения отечественных заквасок, полученных с использованием стартовых микробных композиций, происходят значительные изменения видового разнообразия лактобацилл, приводящие к преобладанию видов, отличных от вносимых в фазу I разводочного цикла, и тем не менее позволяющие получить хлебобулочные изделия, соответствующие ГОСТ 2077-84. Так, нами установлена одна из причин, по которой потребители могут заметить разницу физико-химических и органолептических показателей продукции одного вида, поскольку изменения микробиома в процессе длительного ведения густой ржаной закваски приводят к существенно изменению в содержании молочной и уксусной кислот,

титруемой кислотности, подъемной силы, содержании спирта в закваске и тесте и, следовательно, готовой продукции. Образцы ржаного хлеба, приготовленные на закваске длительного ведения, отличались большей кислотностью, меньшим содержанием спирта и большим количеством летучих кислот (в основном уксусной).

Вместе с тем значительное внимание во всем мире уделяется изучению микробиома заквасок спонтанного брожения, в которых развивается исходная микрофлора сырья. При этом микробиом отечественных заквасок спонтанного брожения и его изменения в ходе технологических процессов остаются неизученными, несмотря на его важнейшую роль в формировании качества и безопасности хлебобулочных изделий.

В настоящее время применение высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК позволяет расширить знания о таксономической структуре микробиома заквасок. Это имеет большое значение, поскольку на разнообразие и структуру заквасочных микробных сообществ оказывает влияние множество факторов.

Несмотря на нестабильность качества и нестерильность сырья, закваски являются стабильными экосистемами, что может быть связано с метаболическими адаптациями в экосистеме закваски (Müller et al., 2001; Minervini et al., 2012; Viiard et al., 2016).

В процессе ферментации заквасок температура выступает в качестве основного фактора, воздействующего на динамику микробного сообщества и кинетику продукции метаболитов. Температура брожения влияет на коэффициент ферментации, который представляет собой отношение концентраций молочной и уксусной кислот. Более высокие температуры вызывают сдвиг в сторону роста содержания молочной кислоты, тем самым увеличивая кислотность закваски. Гомоферментативные и факультативно гетероферментативные виды молочнокислых бактерий (МКБ), принадлежащие, например, к группе *Lactobacillus delbrueckii* и часто преобладающие в заквасках, ведущихся при повышенных температурах, вызывают быстрое снижение рН водно-мучной питательной смеси в основном за счет образования молочной кислоты. Гетероферментативные виды МКБ, как правило, преобладают в заквасках, которые ведутся при более низких температурах и в те-

чение длительных периодов ферментации, продуцируют смесь молочной, уксусной кислот и/или этанола (De Vuyst et al., 2017).

Существует положительная корреляция между температурой брожения (< 30 °С) и частотой обнаружения *L. sanfranciscensis* в заквасках. Напротив, такие температуры отрицательно коррелируют с присутствием в закваске МКБ видов *L. fermentum* и *L. plantarum*. Например, показано, что *L. sanfranciscensis* преобладает в традиционных возобновляемых густых заквасках, которые ведутся при температурах ниже 30 °С и имеют рН около 4, – закваски типа I по зарубежной классификации (Böcker et al., 1995; Hammes et al., 2005), – оптимально ассоциируясь с дрожжами *S. humilis* при температуре 25–30 °С (Van Kerrebroeck et al., 2017). Поскольку *S. humilis* имеет температурный оптимум 27–28 °С и не может расти при температурах выше 35 °С, повышенная температура отрицательно влияет на этот мутуалистический симбиоз. *L. sanfranciscensis* также неконкурентоспособна при повышенных температурах (Gänzle et al., 1998; Vogelmann, Hertel, 2011) по сравнению с другими видами МКБ.

Существенное влияние на микробное разнообразие в заквасках оказывают влажность и рН. Низкие значения рН стимулируют развитие кислотоустойчивых лактобацилл, тогда как более высокие значения благоприятны для видов *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Weissella* (De Vuyst et al., 2017). Например, относительно высокие значения рН, обычно превышающие 4.0, во французских заквасках типа I могут объяснить обнаружение чувствительных к кислоте видов *P. pentosaceus*, *Leuconostoc* и *Weissella* (Robert et al., 2009).

Известно, что кислотность закваски влияет на содержание вида *L. sanfranciscensis*, оптимальное значение рН для роста которого составляет 5.0, тем не менее данный вид МКБ демонстрирует адаптацию к кислотному стрессу, как и многие другие штаммы МКБ, выделенные из заквасок.

Вид *L. sanfranciscensis* в основном встречается в заквасках типа I с низкой влажностью и вытесняется в заквасках со слишком низким значением рН, который сохраняется в течение значительного периода в процессе ведения закваски, поскольку этот вид лактобацилл не растет при рН ниже 3.8. Напротив, установлено, что кислотоустойчивые виды МКБ, такие как *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rossiae* и/или *L. pontis*, преобладают в жидких невозобновляемых заквасках, которые выводятся с использованием стартовых микробных композиций и отличаются более высокой температурой ведения (выше 30 °С) и длительным брожением, от 15 ч до 3 сут, – заквасках типа II (Meroth et al., 2003; Vogelmann, Hertel, 2011; De Vuyst et al., 2017).

В высушенных или стабилизированных жидких заквасках (тип III) содержатся МКБ, устойчивые к процессу сушки и способные сохранять жизнеспособность в такой форме: например, облигатно гетероферментативные *L. brevis*, факультативно гетероферментативные *L. plantarum*, *P. pentosaceus* (De Vuyst, Neysens, 2005; Hammes et al., 2005; Settanni et al., 2013).

Приведенные выше данные позволяют предположить, что в отечественных заквасках с разной влажностью и температурой ведения также могут быть выявлены су-

щественные различия в микробиоме и, в частности, в видовом составе лактобацилл.

На хлебопекарных предприятиях России для выработки ржаного и ржано-пшеничного хлеба уже много десятилетий широко используются пять видов ржаных заквасок: густая, жидкая без заварки, жидкая с заваркой, концентрированная молочнокислая и термофильная. По данным Научно-исследовательского института хлебопекарной промышленности (Кузнецова и др., 2021), наиболее часто используются густая ржаная закваска и жидкая без заварки. Обе закваски применяют при выработке хлебобучных изделий из смеси ржаной и пшеничной муки при полной или частичной замене прессованных дрожжей, они позволяют получить качественный хлеб.

Выбор той или иной закваски на предприятии обуславливается технологическими возможностями (оборудованием, режимом работы). Жидкие закваски используются на предприятиях, спроектированных так, что необходимо транспортирование закваски по трубам из заквасочного цеха к месту замеса теста, и имеющих емкости с «рубашкой» для обеспечения нужной температуры. Для приготовления такой закваски задействуется питательная смесь из муки и воды влажностью 70–75 %, температура брожения составляет 30–32 °С. Густая ржаная закваска существенно отличается по технологическим параметрам: она имеет влажность 48–50 % и температуру брожения 26–28 °С. Ее проще консервировать при перерывах в работе, и она не требует применения для брожения емкостей с рубашкой, достаточно температуры в условиях цеха (Сборник современных технологий..., 2008). Высокая температура брожения жидкой закваски позволяет достигать необходимых технологических показателей (кислотности и подъемной силы) за более короткое время, что ускоряет технологический процесс. Учитывая существенную разницу в параметрах заквасок, значительный интерес представляет изучение различий в формировании их микробиома.

Целью работы было изучение влияния технологических параметров ведения заквасок на таксономическую структуру микробиома хлебных заквасок спонтанного брожения.

Материалы и методы

Приготовление и ведение заквасок. Исследовали две закваски спонтанного брожения: густую ржаную и жидкую ржаную без заварки, выведенные с использованием одной партии муки ржаной обдирной (ОАО «ЛКХП Кирова», Россия). Показатели качества муки: число падения – 193 с, влажность 12.4 %. Влажность муки определяли по ГОСТ 9404-88, число падения – по ГОСТ 27676-88. Эксперимент проводили в двух повторностях.

В муке ржаной обдирной, исследованной в виде водно-мучной питательной смеси для закваски, выявлены молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*. Доминирующее положение занимал род *Lactobacillus*. Обнаружены лактобациллы видов *F. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Companilactobacillus* sp., *L. curvatus*.

Закваски вели в лабораторных условиях в течение месяца. Из партии муки ржаной обдирной готовили питательные смеси влажностью 50 и 70 %, массой 1000 г. Для

этого смешивали до однородной консистенции муку с водой в соотношении 1:0.76 и 1:1.9 соответственно. Полученные водно-мучные питательные смеси влажностью 50 и 70 % оставляли для брожения в термостатах на двое суток при температурах 26 ± 1 и 32 ± 1 °C соответственно.

Выброженные закваски обновляли соответствующими питательными смесями в соотношении закваска : питание 1:1 и оставляли еще на сутки брожения при температурах 26 ± 1 и 32 ± 1 °C в зависимости от влажности (50 или 70 %) закваски.

В течение следующих суток закваски обновляли в соотношении 1:1 через 6.5–7 ч и 16 ч и выбраживали при соответствующих температурах. После 16-часового брожения закваски обновляли в соотношении 1:1, выбраживали каждую закваску в течение 3.5–4 ч при заданной температуре, контролировали качество (подъемную силу, титруемую кислотность, увеличение объема в % к первоначальному) и направляли на хранение в холодильник при температуре 5 ± 1 °C на 2.5 сут. Кислотность определяли титрованием 0.1 н раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина и выражали в градусах. Подъемную силу определяли по «шарику» и выражали в минутах (Пучкова, 2004).

В продолжение следующих 4 недель, с понедельника по четверг, закваски влажностью 50 % освежали в соотношении закваска : питательная смесь 1:3 и выбраживали при температуре 26 °C в течение 7 ч, а затем освежали в соотношении 1:5 при температуре 20 °C и оставляли на 16 ч при температуре 17–18 °C. В этот же период закваски влажностью 70 % освежали в соотношении 1:2 с температурой 32 °C и выбраживали в течение 7 ч. Затем их освежали в таком же соотношении, но с температурой около 20 °C и оставляли на брожение в течение 16 ч при температуре 17–18 °C. В пятницу закваски обновляли по установленному для каждой закваски режиму, выбраживали в течение 3.5–4 ч при заданной температуре и после контроля качества убирали в холодильник и хранили при температуре 4–5 °C в течение 2.5 сут.

Данные два температурных и влажностных режима фактически используются на предприятиях страны, в том числе и по техническим причинам. Так, для густой ржаной закваски технически невыполнимо обеспечить более высокую температуру брожения, поскольку из емкости с рубашкой невозможно разгрузить с помощью дежепрокидывателя, а транспортировка закваски по трубопроводу невозможна. Вести такую закваску можно только при тех режимах, которые установлены на предприятиях.

Задачей настоящего исследования было выявление влияния этих характерных для нашей промышленности режимов и параметров на микробиом заквасок.

Микробиологический анализ заквасок. В процессе ведения заквасок контролировали количество жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий. Для этого 10 г образца закваски гомогенизировали вручную в ступке в 90 мл 0.9 % раствора натрия хлорида. Готовили серию десятикратных последовательных разведений и производили посев на Sanfrancisco agar (Picozzi et al., 2005). Для создания анаэробных условий культивирования использовали газ-пакеты AnaeroGen, обеспечивающие уровень

углекислого газа от 9 до 13 % и содержание кислорода менее 1 %. Посевы инкубировали при 30 °C.

Определение состава микробных сообществ методом высокопроизводительного секвенирования фрагмента гена 16S рРНК. В каждом образце была определена таксономическая структура микробиома методом высокопроизводительного секвенирования на базе ЦКП «Генные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Для выделения ДНК из образцов применяли набор реактивов (MACHEREY-NAGEL NucleoSpin Soil) компании MACHEREY-NAGEL (Германия) согласно инструкции производителя. В каждом образце был определен таксономический состав бактериального сообщества на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов. Таксономический анализ бактериального сообщества выполняли с универсальными праймерами F515/R806 на вариабельный участок гена 16SpРНК-v4 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/GGACTACVSGGGTATCTAAT), специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи (Bates et al., 2010). Все праймеры имели служебные последовательности, содержащие линкеры и баркоды (необходимые для секвенирования по технологии Illumina).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была осуществлена в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5–1 единицу активности полимеразы Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 2 нМ каждого dNTP (Life Technologies, США). Смесь денатурировали при 94 °C 1 мин, после чего следовало 35 циклов: 94 °C – 30 с; 50 °C – 30 с; 72 °C – 30 с. Финальную элонгацию проводили при 72 °C 3 мин. ПЦР-продукты очищали по рекомендованной Illumina методике с использованием AMPureXP (BeckmanCoulter, США). Дальнейшую подготовку библиотек осуществляли в соответствии с инструкцией производителя MiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina, США). Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina MiSeq (Illumina) с использованием набора реактивов MiSeq[®] ReagentKit v3 (600 cycle) с двусторонним чтением (2*300 н).

Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывали с использованием пакетов программного обеспечения Trimmomatic (Bolger et al., 2014) и QIIME (Caporaso et al., 2010). На первом этапе проводили первичный анализ качества прочтения, отбор последовательностей на основе качества чтения отдельных оснований (base pair quality), объединение парно-концевых последовательностей с участком перекрытия не менее 35 оснований, а также удаление последовательностей, длина которых составляет менее 180 п. н. На втором этапе осуществляли удаление из библиотек всех служебных участков (праймеров), а также последовательностей, содержащих протяженные гомополимерные повторы. При анализе бактериальных сообществ использовали *de novo* ОТЕ-пикинг. Таксономическую идентификацию ОТЕ проводили с помощью базы данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>).

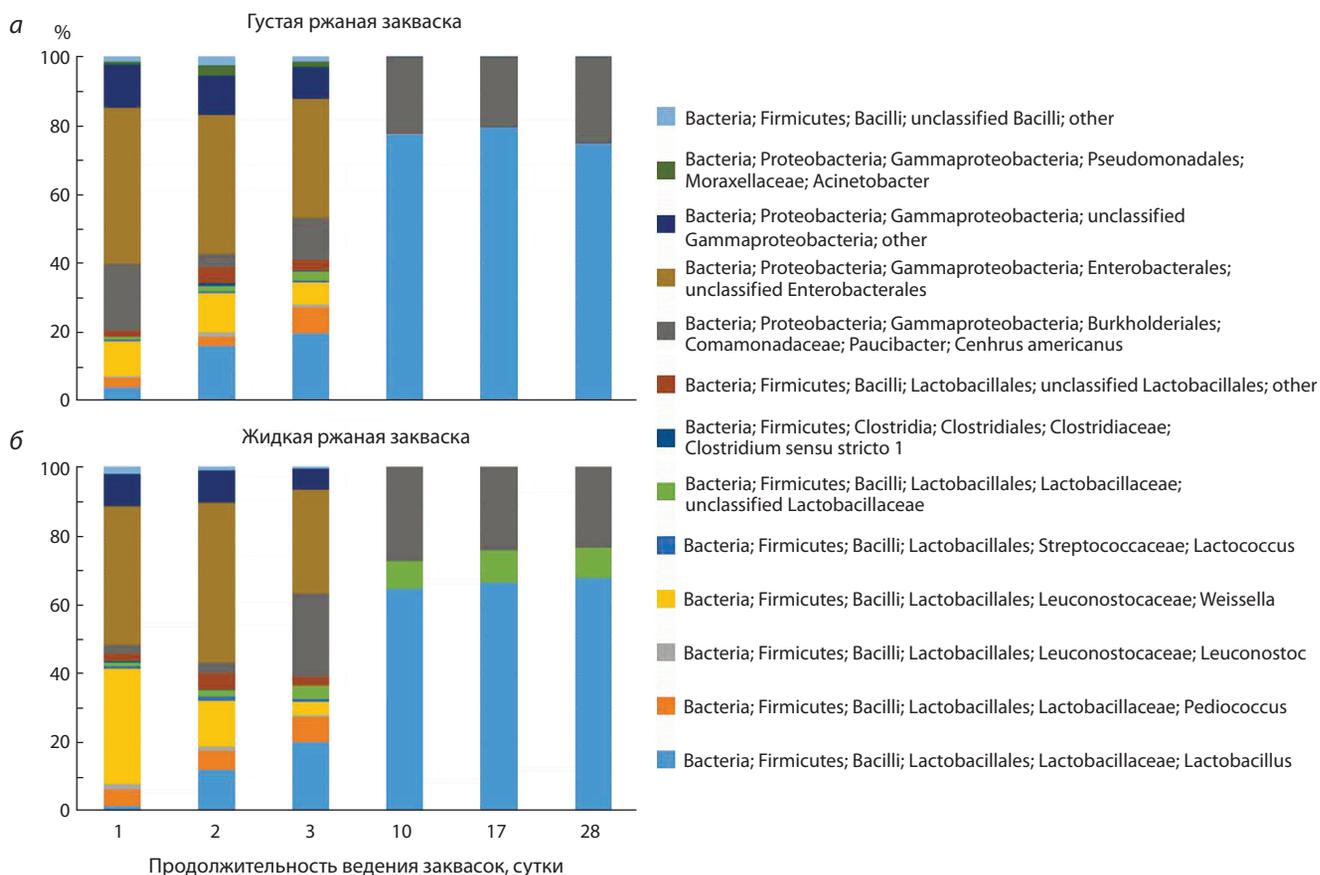


Рис. 1. Состав микробных сообществ, по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК, в спонтанных заквасках: густой ржаной (а) и жидкой ржаной без заварки (б).

Результаты

В муке ржаной обдирной, исследованной в виде водно-мучной питательной смеси для закваски, выявлены молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* и *Leuconostoc*, характерные для естественного природного обсеменения зерна и муки. Доминирующее положение занимал род *Lactobacillus*. Обнаружены лактобациллы видов *F. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Companilactobacillus* sp., *L. curvatus*.

В течение первых трех суток ведения заквасок бактериальный комплекс исследованных заквасочных микробиомов, по полученным данным, был сформирован представителями двух филумов: Proteobacteria (доминировал класс Gammaproteobacteria) и Firmicutes (молочнокислые бактерии родов *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*). Филум Protobacteria был представлен бактериями порядка Enterobacteriales (около 40%), которые через 48 ч брожения также были выявлены в значительном количестве (рис. 1). На третьи сутки ведения заквасок количество бактерий порядка Enterobacteriales незначительно снизилось до 30%. Следует отметить, что на протяжении этого периода закваски имели неприятный гнилостный запах. При дальнейшем ведении заквасок через 10 сут доминировали представители филума Firmicutes молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, посторонние бактерии порядка Enterobacteriales не обнаруживались. Обе закваски приобрели характерный заквасочный запах.

Контроль количества жизнеспособных клеток МКБ классическими микробиологическими методами показал, что через одни сутки брожения количество клеток МКБ было значительно выше в жидкой ржаной закваске. Это может объясняться более высокой температурой ведения, 32 °С, по сравнению с густой закваской, которую вели при температуре 26 °С. При дальнейшем ведении заквасок количество клеток МКБ было сопоставимым, однако происходили существенные изменения на уровне родов и видов (рис. 2).

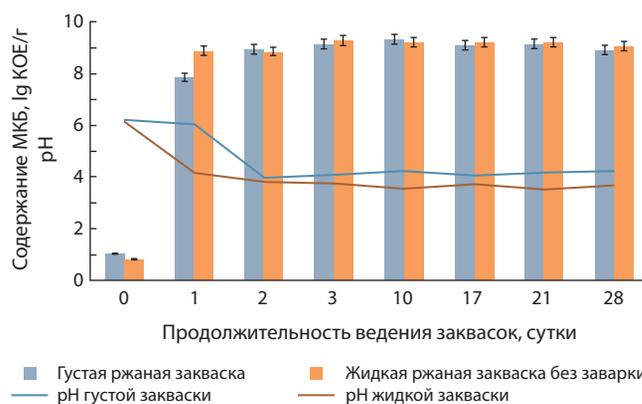


Рис. 2. Изменение количества клеток МКБ и pH заквасок в процессе ведения закваски в течение 28 сут.

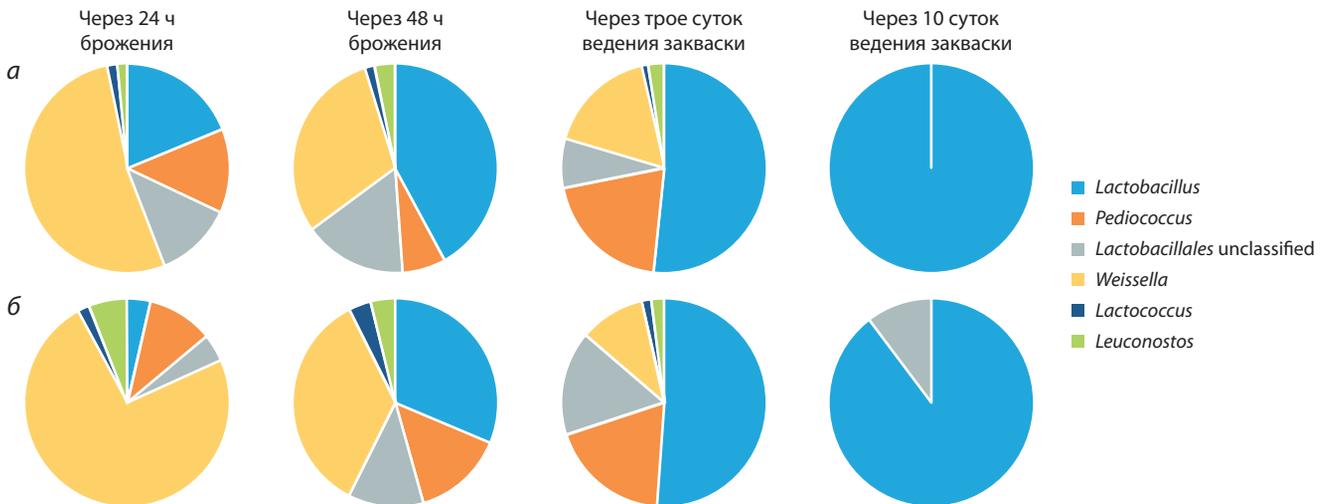


Рис. 3. Представленность родов МКБ от их общего количества (%), по данным анализа метагенома 16S рРНК, в: густой ржаной закваске (а); жидкой ржаной закваске без заварки (б).

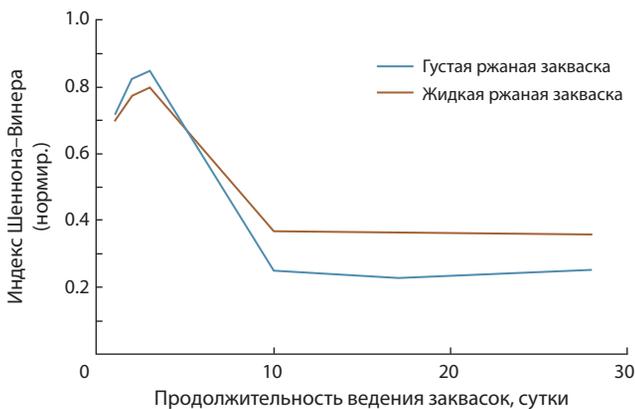


Рис. 4. Изменение биоразнообразия в процессе ведения заквасок.

В обеих заквасках через одни сутки брожения доминировали молочнокислые бактерии рода *Weissella* (53 % от общего количества МКБ в густой и 74 % в жидкой закваске), также были обнаружены МКБ родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* (рис. 3). При этом в жидкой закваске отмечалось крайне низкое содержание наиболее значимого для заквасок рода *Lactobacillus* (3 %). При дальнейшем ведении заквасок по мере увеличения количества МКБ рода *Lactobacillus* происходило постепенное вытеснение кокковых форм *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*. Через трое суток количество лактобацилл увеличилось в обеих заквасках до 50 %. На 10-е сутки ведения обнаруживались только МКБ рода *Lactobacillus*.

Установлено, что в процессе ведения закваски происходили существенные изменения на уровне не только родов МКБ, но и видов лактобацилл.

Через 24 ч брожения в обеих заквасках доминировали лактобациллы *Lactobacillus curvatus*. Микробиота через 48 ч брожения в обеих заквасках была представлена лактобациллами *L. curvatus*, *Levilactobacillus brevis* и *Lactiplantibacillus plantarum/paraplantarum/pentosus/*

fabifermentans (не удалось точно идентифицировать из-за низкого различия в нуклеотидных последовательностях гена 16S рРНК у данных видов), которые были выявлены в исходной водно-мучной питательной смеси до брожения. При дальнейшем ведении заквасок содержание этих родов уменьшалось.

Через 10 сут ведения и на протяжении всего оставшегося периода в густой ржаной закваске доминировали облигатно гетероферментативные лактобациллы вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, которые были также обнаружены в муке ржаной обдирной. Через один месяц ведения закваски был выявлен вид, принадлежащий к *Companilactobacillus* sp., который не удалось однозначно идентифицировать с помощью базы данных RDP. Источником этого вида МКБ также была мука ржаная обдирная, однако в течение первых двух недель ведения закваски этот вид присутствовал в закваске в незначительном количестве.

В жидкой ржаной закваске без заварки преобладали облигатно гетероферментативные МКБ вида *Limosilactobacillus pontis*, которые также были обнаружены в пробе муки.

Проведена оценка альфа-разнообразия (рис. 4). Индекс Шеннона-Винера был рассчитан по формуле

$$H = -\sum p_i \cdot \lg(p_i),$$

где i – число обнаруженных в закваске видов лактобактерий, p_i – доля, занимаемая конкретным видом в общей совокупности видов лактобактерий.

Полученные результаты полностью подтверждают факт, что параметры ведения заквасок (температура, влажность) существенно влияют на видовое разнообразие лактобацилл, которое в обеих заквасках было низким.

Обсуждение

В настоящей работе впервые изучено влияние технологических параметров ведения заквасок на таксономическую структуру микробиома отечественных хлебных заквасок спонтанного брожения. С помощью культурально-незави-

симого метода высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК показано, что в заквасках в течение первых трех суток были обнаружены бактерии, принадлежащие к двум филумам, Firmicutes и Proteobacteria. Относительное количество протеобактерий уменьшалось в процессе ферментации и через 10 сут ведения они не выявлялись. Это полностью согласуется с предыдущими результатами зарубежных исследователей, показывающими, что несколько филумов бактерий в дополнение к Firmicutes (например, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria и Proteobacteria) могут присутствовать в закваске до начала ферментации. Большинство из них представляют собой неактивные популяции и полностью вытесняются Firmicutes (Ercolini et al., 2013; Rizzello et al., 2015; Menezes et al., 2020). При этом источником посторонней микробиоты является сырье.

Обычно бактериальную популяцию ржаной и пшеничной муки, не относящуюся к филуму Firmicutes, составляют представители филумов Proteobacteria (например, рода *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Enterobacter* и *Sphingomonas*) и *Bacteroidetes* (например, *Chryseobacterium*). Эта популяция, как правило, почти полностью подавляется в первые сутки ведения заквасок. Исключение составляют представители семейства Enterobacteriaceae, которые обнаруживаются до 5 сут ведения заквасок, вероятно, благодаря способности к синтезу органических кислот и определенной устойчивости к кислотному стрессу (Ercolini et al., 2013). Таким образом, в процессе ферментации происходит изменение микробного разнообразия с увеличением доли филума Firmicutes и вытеснением представителей филума Proteobacteria.

Филум Firmicutes был представлен молочнокислыми бактериями. Установлено, что в первые сутки в обеих заквасках через 24 ч брожения доминировали представители рода *Weissella*. Бактерии родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* содержались в меньшем количестве, а уже через трое суток количество МКБ рода *Lactobacillus* увеличилось в обеих заквасках до 50 % от общего количества МКБ, а кокковые формы *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* вытеснялись. На 10-е сутки ведения обнаруживались только МКБ рода *Lactobacillus*. При исследовании польских ржаных заквасок отмечена похожая динамика (Boreczek et al., 2020): через 24 ч брожения в закваске содержание бактерий рода *Weissella* составляло 36 %, а через 72 ч – всего 5 %, при этом содержание рода *Lactobacillus* к третьему дню ведения закваски увеличилось с 30 до 67 %.

Полученные результаты несколько расходятся с данными, полученными для итальянских заквасок, в которых через 10 дней содержание представителей рода *Weissella* было почти в 2 раза больше, чем рода *Lactobacillus* (Ercolini et al., 2013). Авторы предполагают, что это связано с тем, что род *Weissella* доминировал в итальянской ржаной муке. Действительно, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* и *Weissella* обычно содержатся в зерне и муке соответственно, но не способны выдерживать длительный процесс подкисления, так как для их развития нужны более высокие значения pH по сравнению с лактобациллами (Van Kerrebroeck et al., 2017). В ряде исследований показано, что рост представителей рода *Weissella* ингибируется

при pH 4.5, однако они способны к росту при pH 6.5–6.8. Кислая среда закваски стимулирует смену сообществ МКБ в заквасках и создает нишу, благоприятную для развития кислотоустойчивых лактобацилл, таких как *L. brevis* и *L. sanfranciscensis* (Oshiro et al., 2020).

Обобщая известные и полученные данные, можно отметить, что стабилизация микробиома с преобладанием рода *Lactobacillus* происходит к 10-м суткам (Van der Meulen et al., 2007; Weckx et al., 2010). Это коррелирует с нашими данными об изменении альфа-разнообразия (см. рис. 4) густой и жидкой ржаных заквасок.

Показано, что в течение этого же периода происходят значительные изменения в видовом составе лактобацилл. Доминирующий через 24 ч брожения вид *Latilactobacillus curvatus* был обнаружен через 48 ч совместно с видами *Levilactobacillus brevis* и *Lactiplantibacillus plantarum/paraplantarum/pentosus/fabifermentans*, которые обнаруживались в незначительном количестве и в исходной водно-мучной питательной смеси до брожения.

Снижение содержания *Latilactobacillus curvatus* в процессе ведения заквасок было отмечено и зарубежными исследователями. Установлено, что на первых этапах ведения корейских заквасок содержание отдельных видов МКБ составляло: *L. curvatus* (9.5 log КОЕ/г), *F. sanfranciscensis* (< 5 log КОЕ/г), *L. brevis* (6.5 log КОЕ/г), в то время как после 11-го освежения значительно увеличилось количество *F. sanfranciscensis* (> 9.0 log КОЕ/г), тогда как содержание *L. curvatus* и *L. brevis* снизилось, что, по мнению авторов (Baek et al., 2021), связано с отрицательным влиянием повышенного содержания молочной кислоты в среде на развитие *L. curvatus*. В исследованиях (Landis et al., 2021) показано, что *L. plantarum* и *L. brevis* были наиболее часто обнаруживаемой парой одновременно встречающихся таксонов (в 177 из 500 заквасок), в то время как вид *L. sanfranciscensis* доминировал в большинстве заквасок длительного ведения, и его содержание отрицательно коррелировало с содержанием видов *L. plantarum* и *L. brevis*, которые преобладали в молодых заквасках.

При дальнейшем ведении заквасок отмечались значительные отличия в формировании микробиоты в жидких и густых ржаных заквасках. В густой ржаной закваске наблюдалось увеличение содержания бактерий вида *Fructilactobacillus sanfranciscensis*. Согласно литературным данным, этот вид считается наиболее адаптированным и является автохтонным микроорганизмом микробиоты заквасок типа I (Siragusa et al., 2009; Vogel et al., 2011; Rogalski et al., 2020). Доминирование данного вида в густой ржаной закваске объясняется созданием оптимальных условий для его развития (температура менее 30 °C, pH в пределах 4.1–4.3, влажность 50 %). Однако через месяц ведения в закваске, помимо *F. sanfranciscensis*, были обнаружены молочнокислые бактерии *Companilactobacillus* sp., источником которых была мука.

Выявленные в жидкой ржаной закваске без заварки облигатно гетероферментативные МКБ вида *Limosilactobacillus pontis* развивались при более высоких значениях температуры (32 °C) и влажности (70 %) и более низком pH (3.6–4.0). Очевидно, что такие условия благоприятны для развития этого вида, что подтверждается литературными данными (De Vuyst et al., 2017).

Заключение

В результате проведенных исследований впервые методом высокопроизводительного секвенирования изучено разнообразие прокариот в отечественных заквасках спонтанного брожения. Установлено, что в течение первых трех суток ведения бактериальный комплекс исследованных заквасок был представлен филумами Proteobacteria (класс Gammaproteobacteria) и Firmicutes (молочнокислые бактерии родов *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*). При дальнейшем ведении заквасок через 10 сут доминировали представители филума Firmicutes молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*.

Сравнительный анализ таксономического состава микробиома густой и жидкой ржаной закваски без заварки не продемонстрировал глубоких различий на протяжении всего периода ведения заквасок как на уровне филумов/классов, так и на родовом уровне. Однако отмечено различие на уровне видов лактобацилл, что связано с влиянием на формирование заквасочного микробиома экзогенных факторов, таких как температура и влажность заквасок.

Дальнейшие исследования промышленных и лабораторных заквасок длительного ведения позволят установить, имеет ли место стабилизация микробиома с доминированием одного-двух видов, происходят ли периодические колебания состава микробиома или же реализуются другие сценарии.

Список литературы / References

Ауэрман Л.Я. Технология хлебопекарного производства. СПб.: Профессия, 2009.
[Auerman L.Ya. Technology of Bakery Production. Saint-Petersburg, Profesiya Publ., 2009. (in Russian)]
Кузнецова Л.И., Парахина О.А., Савкина О.А., Буркина М.С. Стартовые композиции микроорганизмов для хлебных заквасок. *Хлебопекарный и кондитерский форум*. 2021;49:54-57.
[Kuznetsova L.I., Parakhina O.A., Savkina O.A., Burykina M.S. Starting compositions of microorganisms for sourdoughs. *Khlebopekarnyy i Konditerskiy Forum = Bakery and Confectionery Forum*. 2021;49:54-57. (in Russian)]
Локачук М.Н., Хлесткин В.К., Савкина О.А., Кузнецова Л.И., Павловская Е.Н. Изменение микробиоты густой ржаной закваски в процессе длительного ведения. *Хлебопродукты*. 2020;11:33-37. DOI 10.32462/0235-2508-2020-29-11-33-37.
[Lokachuk M.N., Khlestkin V.K., Savkina O.A., Kuznetsova L.I., Pavlovskaya E.N. Changes in the microbiota of dense rye sourdough during long-term propagation. *Khleboprodukty = Bread Products*. 2020;11:33-37. DOI 10.32462/0235-2508-2020-29-11-33-37. (in Russian)]
Пучкова Л.И. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства: учеб. пособ. для вузов. СПб.: ГИОРД, 2004.
[Puchkova L.I. Laboratory Workshop on the Technology of Bakery Production. Saint-Petersburg: GIORД Publ., 2004. (in Russian)]
Сборник современных технологий хлебобулочных изделий. Под общ. ред. А.П. Косована. М.: ГНУ ГОСНИИ хлебопекарной промышленности, 2008.
[Kosovan A.P. (Ed.). Collection of Modern Bakery Technologies. Moscow, 2008. (in Russian)]
Baek H.W., Bae J.H., Lee Y.G., Kim S.A., Min W., Shim S., Han N.S., Seo J.H. Dynamic interactions of lactic acid bacteria in Korean sourdough during back-slopping process. *J. Appl. Microbiol.* 2021; 131(5):2325-2335. DOI 10.1111/jam.15097.

Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.* 2010;5:908-917. DOI 10.1038/ismej.2010.171.
Böcker G., Stolz P., Hammes W.P. Neue Erkenntnisse zum Ökosystem sauerartig und zur Physiologie der sauerartigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl. und Brot.* 1995;49:370-374.
Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. DOI 10.1093/bioinformatics/btu170.
Boreczek J., Litwinek D., Żylińska-Urban J., Izak D., Buksa K., Gawor J., Gromadka R., Bardowski J.K., Kowalczyk M. Bacterial community dynamics in spontaneous sourdoughs made from wheat, spelt, and rye wholemeal flour. *MicrobiologyOpen.* 2020;9(4):1-13. DOI 10.1002/mbo3.1009.
Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 2010; 7(5):335-336. DOI 10.1038/nmeth.f.303.
De Vuyst L., Neysens P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 2005;16(1-3): 43-56. DOI 10.1016/j.tifs.2004.02.012.
De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Leroy F. Microbial ecology and process technology of sourdough fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 2017;100:49-160. DOI 10.1016/bs.aambs.2017.02.003.
Ercolini D., Pontonio E., De Filippis F., Minervini F., La Stora A., Gobetti M., Di Cagno R. Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(24):7827-7836. DOI 10.1128/AEM.02955-13.
Gänzle M., Ehmann M.R., Hammes W. Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64(7):2616-2623. DOI 10.1128/AEM.64.7.2616-2623.1998.
Hammes W.P., Brandt M.J., Francis K.L., Rosenheim J. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci. Technol.* 2005; 16(1-3):4-11. DOI 10.1016/j.tifs.2004.02.010.
Landis E.A., Oliverio A.M., McKenney E.A., Nichols L.M., Kfoury N., Biango-Daniels M., Shell L.K., Madden A.A., Shapiro L., Sakunala S., Drake K., Robbat A., Booker M., Dunn R.R., Fierer N., Wolfe B.E. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *Elife.* 2021;10:e61644. DOI 10.7554/eLife.61644.
Menezes L.A.A., Sardaro M.L.S., Duarte R.T.D., Mazzon R.R., Neviani E., Gatti M., De Dea Lindner J. Sourdough bacterial dynamics revealed by metagenomic analysis in Brazil. *Food Microbiol.* 2020;85:103302. DOI 10.1016/j.fm.2019.103302.
Meroth C.B., Hammes W.P., Hertel C. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69(1):475-482. DOI 10.1128/AEM.69.1.475-482.2003.
Minervini F., Lattanzi A., De Angelis M., Di Cagno R., Gobetti M. Influence of artisan bakery- or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78(15):5328-5340. DOI 10.1128/AEM.00572-12.
Müller M., Wolfrum G., Stolz P., Ehrmann M., Vogel R. Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during rye flour fermentation. *Food Microbiol.* 2001;18:217-227. DOI 10.1006/fmic.2000.0394.
Oshiro M., Tanaka M., Zendo T., Nakayama J. Impact of pH on succession of sourdough lactic acid bacteria communities and their fermentation properties. *Biosci. Microbiota Food Health.* 2020;39(3): 152-159. DOI 10.12938/bmfh.2019-038.

- Picozzi C., Gallina S., Dell Fera T., Foschino R. Comparison of cultural media for the enumeration of sourdough lactic acid bacteria. *Ann. Microbiol.* 2005;55(4):317-320.
- Rizzello C.G., Cavoski I., Turk J., Ercolini D., Nionelli L., Pontonio E., De Angelis M., De Filippis F., Gobbetti M., Di Cagno R. Organic cultivation of *Triticum turgidum* subsp. *durum* is reflected in the flour-sourdough fermentation-bread axis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015;81(9):3192-3204. DOI 10.1128/AEM.04161-14.
- Robert H., Gabriel V., Fontagné-Faucher C. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific. *Int. J. Food Microbiol.* 2009; 135(1):53-59. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.006.
- Rogalski E., Ehrmann M.A., Vogel R.F. Role of *Kazachstania humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the strain-specific assertiveness of *Fructilactobacillus sanfranciscensis* strains in rye sourdough. *Eur. Food Res. Technol.* 2020;9:1817-1827. DOI 10.1007/s00217-020-03535-7.
- Settanni L., Ventimiglia G., Alfonzo A., Corona O. An integrated technological approach to the selection of lactic acid bacteria of flour origin for sourdough production. *Food Res. Int.* 2013;54(2):1569-1578. DOI 10.1016/j.foodres.2013.10.017.
- Siragusa S., Di Cagno R., Ercolini D., Minervini F., Gobbetti M., De Angelis M. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(4):1099-1109. DOI 10.1128/AEM.01524-08.
- Van der Meulen R., Scheirlinck I., Van Schoor A., Huys G., Vancanneyt M., Vandamme P., De Vuyst L. Population dynamics and metabolite target analysis during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(15):4741-4750. DOI 10.1128/AEM.00315-07.
- Van Kerrebroeck S., Maes D., De Vuyst L. Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 2017;68:152-159. DOI 10.1016/j.tifs.2017.08.016.
- Viiard E., Bessmeltseva M., Simm J., Talve T., Aaspõllu A., Paalme T. Diversity and stability of lactic acid bacteria in rye sourdoughs of four bakeries with different propagation parameters. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148325. DOI 10.1371/journal.pone.0148325.
- Vogel R.F., Pavlovic M., Ehrmann M.A., Wiezer A., Liesegang H., Offschanka S., Voget S., Angelov A., Böcker G., Lieb W. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microb. Cell Factories.* 2011;10(Suppl. 1): 1-11. DOI 10.1186/1475-2859-10-S1-S6.
- Vogelmann S.A., Hertel C. Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol.* 2011;28(3):583-589. DOI 10.1016/j.fm.2010.11.010.
- Weckx S., Van der Meulen R., Maes D., Scheirlinck I., Huys G., Vandamme P. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiol.* 2010; 27(8):1000-1008. DOI 10.1016/j.fm.2010.06.005.

ORCID ID

V.K. Khlestkin orcid.org/0000-0001-9605-8028
M.N. Lockachuk orcid.org/0000-0001-5074-2457
O.A. Savkina orcid.org/0000-0002-2372-4277
O.I. Parakhina orcid.org/0000-0002-0508-2813
L.I. Kuznetsova orcid.org/0000-0002-1149-6043

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 19-016-00085 «Исследование видового разнообразия и симбиотических взаимодействий в микробиомах крахмало-белковых гидроколлоидных систем (хлебных заквасок)». Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.11.2021. После доработки 27.03.2022. Принята к публикации 28.03.2022.

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

Стабильность генома вакцинного штамма VACΔ6

Р.А. Максюттов, С.Н. Якубицкий, И.В. Колосова, Т.В. Трегубчак, А.Н. Швалов, Е.В. Гаврилова, С.Н. Щелкунов 

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия
 snshchel@rambler.ru

Аннотация. В связи с прекращением после 1980 г. массовой противооспенной вакцинации в настоящее время практически полностью утрачен коллективный иммунитет человеческой популяции к ортопоксвирусным инфекциям. Вследствие этого увеличилась опасность распространения в мире зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека, обусловленных вирусами оспы обезьян или оспы коров. Противооспенные вакцины первого поколения на основе вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, VAC) являются реактогенными и поэтому в современных условиях не пригодны для массовой вакцинации. Это обуславливает необходимость разработки современных безопасных живых вакцин на основе VAC с применением методов генетической инженерии. С использованием метода временной доминантной селекции нами создан штамм VACΔ6, в геноме которого пять генов вирулентности направленно делетированы, а один ген инактивирован встройкой синтетического фрагмента ДНК. В процессе получения штамма VACΔ6 из клонированного варианта VAC L1VP вирус прошел 71 пассаж в культуре клеток CV-1. Такая длинная пассажная история могла привести к дополнительным нецелевым изменениям в геноме штамма VACΔ6 относительно исходного L1VP. Поэтому для оценки возможных нецелевых изменений провели полногеномное секвенирование VAC L1VP, VACΔ6 и пяти промежуточных штаммов вируса. Сравнительный анализ полных вирусных геномов показал, что, помимо целевых нарушений, спонтанно произошли только две нуклеотидные замены при получении VACΔ4 из штамма VACΔ3 и сохранившиеся в геноме VACΔ5 и VACΔ6. При этом обе эти замены находятся в межгенных участках (позиции 1431 и 189738 относительно штамма L1VP), что указывает на крайне редкое возникновение нецелевых изменений при использовании методики временной доминантной селекции для получения рекомбинантных VAC со множественными встройками/делециями. Для выяснения стабильности генома полученного аттенуированного вакцинного штамма и в соответствии с «Руководством по проведению клинических исследований лекарственных средств...» выполнено 15 последовательных циклов культивирования производственного штамма вируса VACΔ6 в культуре клеток 4647, аттестованной для производства вакцины. ПЦП-анализ и секвенирование шести фрагментов ДНК, соответствующих районам нарушаемых генов VACΔ6, показали, что после 15 пассажей в культуре клеток 4647 все последовательности вирусной ДНК остались неизменными.

Ключевые слова: вирус осповакцины; временная доминантная селекция; направленная инактивация генов; стабильность генома.

Для цитирования: Максюттов Р.А., Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Трегубчак Т.В., Швалов А.Н., Гаврилова Е.В., Щелкунов С.Н. Стабильность генома вакцинного штамма VACΔ6. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):394-401. DOI 10.18699/VJGB-22-48

Genome stability of the vaccine strain VACΔ6

R.A. Maksyutov, S.N. Yakubitskiy, I.V. Kolosova, T.V. Tregubchak, A.N. Shvalov, E.V. Gavrilova, S.N. Shchelkunov 

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia
 snshchel@rambler.ru

Abstract. Due to cessation of mass smallpox vaccination in 1980, the collective immunity of humans against orthopoxvirus infections has virtually been lost. Therefore, the risk of spreading zoonotic human orthopoxvirus infections caused by monkeypox and cowpox viruses has increased in the world. First-generation smallpox vaccines based on *Vaccinia virus* (VAC) are reactogenic and therefore not suitable for mass vaccination under current conditions. This necessitates the development of modern safe live vaccines based on VAC using genetic engineering. We created the VACΔ6 strain by transient dominant selection. In the VACΔ6 genome, five virulence genes were intentionally deleted, and one gene was inactivated by inserting a synthetic DNA fragment. The virus was passaged 71 times in CV-1 cells to obtain the VACΔ6 strain from the VAC L1VP clonal variant. Such a long passage history might have led to additional off-target mutations in VACΔ6 compared to the original L1VP variant. To prevent this, we performed a genome-wide sequencing of VAC L1VP, VACΔ6, and five intermediate viral strains to assess possible off-target mutations. A comparative analysis of complete viral genomes showed that, in addition to target mutations, only two nucleotide substitutions occurred spontaneously when obtaining VACΔ4 from the VACΔ3 strain; the mutations persisting in the VACΔ5 and VACΔ6 genomes. Both nucleotide substitutions are located in intergenic regions (positions 1431 and 189738 relative to L1VP), which indicates an extremely rare occurrence of off-target mutations when using transient dominant selection to obtain recombinant VAC variants with multiple insertions/deletions. To assess the genome

stability of the resulting attenuated vaccine strain, 15 consecutive cycles of cultivation of the industrial VACΔ6 strain were performed in 4647 cells certified for vaccine production in accordance with the "Guidelines for Clinical Trials of Medicinal Products". PCR and sequencing analysis of six DNA fragments corresponding to the regions of disrupted genes in VACΔ6 showed that all viral DNA sequences remained unchanged after 15 passages in 4647 cells.

Key words: vaccinia virus; transient dominant selection; targeted gene inactivation; genome stability.

For citation: Maksyutov R.A., Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Tregubchak T.V., Shvalov A.N., Gavrilova E.V., Shchelkunov S.N. Genome stability of the vaccine strain VACΔ6. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):394-401. DOI 10.18699/VJGB-22-48

Введение

В 1980 г., после объявления о ликвидации натуральной оспы, Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) было рекомендовано прекратить вакцинацию людей против этого особо опасного заболевания. Такое решение было обусловлено тем, что прививки вируса осповакцины (VAC) могли в ряде случаев приводить к тяжелым поствакцинальным осложнениям, иногда со смертельным исходом (Smallpox and its Eradication, 1988; Kretzschmar et al., 2006).

В результате отказа от вакцинации против натуральной оспы в человеческой популяции с каждым годом становится все меньше людей со специфическим иммунитетом против данного заболевания. Это делает человечество беззащитнее перед возможным инфицированием не только вирусом натуральной оспы, но и другими близкородственными ортопоксвирусами, природным резервуаром которых служат различные животные, в первую очередь грызуны. К таким вирусам относятся вирусы оспы обезьян и оспы коров, вызывающие оспоподобные заболевания животных и человека. Распространение этих вирусов в человеческой популяции потенциально может привести к их адаптации к защитным системам организма человека и появлению вирусных вариантов, эпидемически опасных для людей (Shchelkunov, 2013). В последние годы в различных регионах мира стали регистрировать необычно массовые вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей (Singh et al., 2012; Nolen et al., 2016; Reynolds et al., 2019).

Единственный эффективный метод борьбы с возрастающей угрозой ортопоксвирусных инфекций человека – вакцинопрофилактика (Moss, 2011; Shchelkunov, 2011). Накопление в последние десятилетия в человеческой популяции иммунодефицитных состояний привело к тому, что использование классических живых вакцин на основе VAC для массовой вакцинации населения сейчас противопоказано, так как может привести ко множеству побочных реакций и более тяжелым их проявлениям, чем во время кампании по ликвидации натуральной оспы (Albarnaz et al., 2018; Shchelkunov, Shchelkunova, 2020). Поэтому существует настоятельная потребность в создании современных противортопоксвирусных вакцин, которые должны быть значительно безопаснее по сравнению с предыдущими поколениями противосспенных вакцин и при этом высокоиммуногенны, обеспечивая надежную защиту от вирусной инфекции.

Первые аттенуированные штаммы VAC были получены в результате множественного пассажей вируса в культуре клеток гетерологичного хозяина: штамм MVA выделили после 572 пассажей VAC Ankara в первичной культуре

фибробластов куриных эмбрионов (Volz, Sutter, 2017), штамм LC16m8 – после 45 пассажей VAC Lister в первичной культуре клеток эпителия почки кролика (Kidokoro, Shida, 2014; Eto et al., 2015).

Аттенуация VAC MVA была обусловлена спонтанными протяженными делециями и мутациями в вирусном геноме, затрагивающими не только гены вирулентности, но и гены, функции которых определяют репликативные свойства вируса и круг чувствительных к нему хозяев (Blanchard et al., 1998; Drexler et al., 1998). Штамм MVA утратил способность формировать инфекционное потомство на большинстве культур клеток млекопитающих, включая клетки человека. В этих культурах клеток наблюдается экспрессия многих генов MVA, но образуются только незрелые вирионы. Данный штамм сохранил свои иммуногенные свойства как противооспенная вакцина, но для достижения достаточного иммунного ответа необходимо вводить вирус в более высоких дозах, по сравнению с классической вакциной, и многократно (Sanchez-Sampedro et al., 2015).

В клоновом варианте VAC LC16m8 аттенуация обусловлена однонуклеотидной делецией в гене *B5R*, кодирующем белок оболочки внеклеточных вирионов, приводящей к сбою рамки трансляции этого белка. Штамм LC16m8 продуцирует в клетках млекопитающих инфекционные вирусные частицы, но со сниженной способностью к распространению как в культурах клеток, так и в инфицированном/вакцинированном организме. Этот штамм является менее аттенуированной по сравнению с MVA, но репликативно компетентной вакциной (Sanchez-Sampedro et al., 2015; Albarnaz et al., 2018).

С развитием методов генетической инженерии стало возможным создавать модифицированные варианты VAC путем введения нужных нуклеотидных последовательностей в вирусный геном, удаления или нарушения генов самого вируса. Одно из наиболее перспективных направлений таких работ – создание методами генетической инженерии высокоаттенуированных вариантов VAC, обладающих иммуногенностью и протективностью на уровне классической противооспенной вакцины, но при этом с меньшей патогенностью (Shchelkunov, Shchelkunova, 2020).

Секвенирование полных геномов различных штаммов и разных видов патогенных для человека ортопоксвирусов, накопление данных о функциях многочисленных генов этих вирусов, а также разработка методов введения направленных изменений в вирусный геном позволили сформулировать и реализовать новый подход к созданию высокоаттенуированных вариантов VAC. Этот подход состоит в строго локализованном последовательном уда-

лении или инактивации индивидуальных генов вирулентности, не затрагивающем функции репликации вируса в культуре клеток и не влияющем на круг хозяев, чувствительных к вирусу (Yakubitskiy et al., 2015).

Ранее нами в результате последовательной направленной инактивации отдельных вирусных генов был получен штамм VACΔ6 живой аттенуированной вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека (Yakubitskiy et al., 2015, 2016). При создании этого штамма использовали методику временной доминантной селекции (Falkner, Moss, 1990), на каждой стадии которой осуществляются множественные циклы размножения (пассажи) вируса в культуре клеток. При этом отсутствовала информация о том, как такие процедуры могут сказываться на сохранении нуклеотидной последовательности крупного ДНК-гена VAC.

Цель настоящей работы – с применением технологии полногеномного секвенирования изучить, насколько сохранился геном VAC в процессе получения штамма VACΔ6 из родительского штамма LIVP. Другой, не менее важный вопрос касался анализа геномной стабильности производственного вакцинного штамма VACΔ6 в процессе 15 пассажей в культуре клеток 4647, используемой для производства данной противооспенной вакцины.

Материалы и методы

Вирусы, культуры клеток. В работе использовали клон 14 штамма VAC LIVP (LIVP), полученный нами ранее методом предельного разведения трехкратным пересевом через чашку под агарозным покрытием (Yakubitskiy et al., 2015), а также созданные на его основе мутантные VAC с инактивацией целевых генов (Yakubitskiy et al., 2015, 2016). Вирусы выращивали и титровали на культурах клеток почки африканской зеленой маргитки линий CV-1 и 4647 из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Линия 4647 аттестована Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов (ГИСК) им. Л.А. Тарасевича в соответствии с требованиями РД 42-28-10-89 и рекомендована для производства профилактических медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) (протокол № 14 от 28.10.2003 заседания Ученого совета ГИСК им. Л.А. Тарасевича; протокол № 9 от 20.11.2003 комитета МИБП).

Олигонуклеотидные праймеры. Олигонуклеотиды для проведения аналитической полимеразной цепной реакции (ПЦР) в районах инактивируемых вирусных генов (табл. 1) были синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Расчет этих олигонуклеотидных праймеров производили с помощью программы “Oligo” (версия 3.3) фирмы Borland International (США).

Клонирование вируса. Перед клонированием вирусную суспензию обрабатывали ультразвуком и определяли титр методом бляшек на культуре клеток CV-1. Клонирование вируса осуществляли в 6-луночных культуральных планшетах методом бляшек под агарозным покрытием. Для этого монослой клеток CV-1 заражали вирусной суспензией в разведении 10–20 БОЕ/лунку и проводили адсорбцию вируса в течение 60 мин при 37 °С в атмосфере

Таблица 1. Перечень олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-анализа модифицированных областей генома VAC при создании вакцины VACΔ6

Ген	Олигонуклеотидные праймеры
A56R	5' TTTTGAGACTCATCAACGATGAAACTTT 3'
	5' GTGGTATGGGACACCACAAATCCAA 3'
B8R	5' TCACAAATATGATGGTGATGAGCGA 3'
	5' CGTGATATACCCTAGCCATAGGCAT 3'
J2R	5' CGGACATATTCAGTTGATAATCG 3'
	5' AACACTTTCTACACACCGATTGA 3'
C3L	5' TCGCGCTTTACATTCTCGAATCT 3'
	5' TGTTCTGTGTCTTCTGCGGTGA 3'
N1L	5' CTAGAATGGCAAATCTAAGT 3'
	5' ATGGCTGTTGAAGTGGGATCC 3'
A35R	5' ACGACGGATGCTGAAGCGTGTATA 3'
	5' AAACGATGTTACCAATCGTTGCTAGGT 3'

5 % CO₂. Среду с несорбированным вирусом удаляли и заливали 2 мл/лунку среды ДМЕМ (ООО «БиолоТ», Россия) с 2 % эмбриональной сывороткой коров (ЭСК) (HyClone, США), содержащей 1 % легкоплавкой агарозы. После застывания агарозы планшеты инкубировали в термостате при 37 °С в течение 48 ч в атмосфере 5 % CO₂. Затем добавляли по 1.5 мл/лунку 0.05 % раствора нейтрального красного в среде ДМЕМ и выдерживали при 37 °С в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO₂. После этого раствор нейтрального красного удаляли, а индивидуальные бляшки отбирали при помощи автоматической пипетки и переносили в 100 мкл среды ДМЕМ с 2 % ЭСК. Полученный вирусный материал после однократного замораживания-оттаивания наносили на сформированный монослой клеток CV-1 в 6-луночных планшетах в отдельные лунки с 1 мл/лунку среды ДМЕМ с 2 % ЭСК. Растили 48–72 ч при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Дважды замораживали-оттаивали и использовали полученную вирусную суспензию для дальнейшей наработки клона до рабочего титра 10⁶–10⁷ БОЕ/мл.

Получение вариантов вируса с направленно deletированными генами. Рекомбинантные VAC были получены в культуре клеток CV-1 с помощью катионоактивной липид-опосредованной трансфекции, при использовании Lipofectin Reagent (Invitrogen, США) и селективной среды, содержащей микофеноловую кислоту (МФК), ксантин и гипоксантин (Sigma, США). Для этого 80–90 % монослой клеток CV-1 в 6-луночных культуральных планшетах заражали VAC со множественностью заражения 1 БОЕ/клетку с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37 °С и 5 % CO₂. Затем монослой клеток отмывали селективной средой без сыворотки и проводили трансфекцию рекомбинантной плазмидой интеграции следующим образом: 3 мкл плазмиды в концентрации 1 мкг/мл смешивали с 15 мкл липофектина в концентрации 1 мг/мл, добавляли 1 мл среды ДМЕМ, содержащей 25 мкг/мл МФК, 250 мкг/мл ксантина и 15 мкг/мл гипоксантина, и оставляли на 15 мин при комнатной температуре, затем

Таблица 2. Длины ПЦР-продуктов для исходного штамма LIVP и вариантов VAC с инактивированными генами

Ген	Исходный VAC LIVP, п. н.	Варианты VAC с инактивированными генами, п. н.
A56R	2354	1537
B8R	1535	716
C3L	1543	743
N1L	1785	1549
J2R	512	616
A35R	1888	1372

наносили по каплям на монослой клеток с последующей инкубацией при 37 °С и 5 % CO₂. Через 24 ч среду заменяли на селективную поддерживающую (с 2 % ЭСК) и инкубировали при тех же условиях еще 1 сутки.

Для обогащения вирусного потомства рекомбинантным вариантом VAC выполняли несколько пассажей (последовательных размножений на культуре клеток) в 6-луночных планшетах под селективной средой. На пассаже, при котором достигалось 90–100 % цитопатического действия (ЦПД) вируса, культуру дважды замораживали-оттаивали для разрушения клеток и выхода вируса в культуральную среду. Полученную вирусную суспензию обрабатывали ультразвуком и использовали для клонирования через чашку под агарозным покрытием в неселективных условиях (без добавления к питательной среде ДМЕМ кантаина, гипоксантина и МФК). Отбирали несколько вирусных клонов, которые затем подвергали пассажам в неселективных условиях на культуре клеток CV-1 до появления 100 % ЦПД. Титр полученных препаратов вирусных клонов определяли на культуре клеток CV-1, как описано в (Yakubitskiy et al., 2015).

Выделение вирусной ДНК независимых клонов проводили с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия), согласно инструкции производителя, с последующим ПЦР-анализом с применением специфических олигонуклеотидных праймеров (см. табл. 1) для скрининга клонов по району вирусного генома, в котором произведена целевая делеция или вставка нуклеотидной последовательности (табл. 2).

По результатам ПЦР-анализа отбирали клоны с нарушенным целевым геном (первое клонирование) и повторно их клонировали методом бляшек под агарозным покрытием для предотвращения возможного загрязнения исходным вариантом вируса. После проведенных дополнительных пассажей полученных субклонов в неселективных условиях и достижения 100 % ЦПД монослоя клеток проводили ПЦР-анализ и отбирали вирусные клоны с инактивированным целевым геном (второе клонирование), определяли инфекционные титры вирусных препаратов, расфасовывали их на отдельные аликвоты, замораживали и использовали для дальнейшей работы.

Секвенирование полных геномов VAC. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США). Для

этого на первом этапе работы осуществляли выделение вирусной ДНК из культур клеток, зараженных соответствующими вирусами. Выделение проводили с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ полногеномных последовательностей ДНК VAC выполняли при помощи пакета MIRA (v. 4.9.6), BWA (v. 0.7.15) (Li, Durbin, 2009), IGV (v. 2.3.78) (Robinson et al., 2011), Samtools (v. 1.3.1) (Li et al., 2009), Tabix (v. 0.2.5) (Li et al., 2009), GenomeAnalysisTK (v. 3.6) (McKenna et al., 2010). Выравнивание полногеномных последовательностей проводили при помощи Ugene (v. 1.24.1) (Okonechnikov et al., 2012) с применением алгоритма MAFFT (Katoh et al., 2002).

Результаты

Введение направленных делеций/инсерций в геном VAC

Для получения VAC с направленной модификацией генетического материала в данной работе использовали методику временной доминантной селекции (Falkner, Moss, 1990). Плаزمиды интеграции-делеции (рис. 1, а) несут доминантный селективный маркер (ген *gpt* *Escherichia coli*, кодирующий ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу, под контролем промотора белка 7.5K VAC), расположенный вне протяженных областей гомологии с ДНК вируса, фланкирующей нарушаемый/делегируемый ген (R – правая и L – левая область).

Бактериальный фермент ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза, синтезируемый в клетках млекопитающих, способен восстанавливать метаболизм пуриновых нуклеотидов, блокируемый микофеноловой кислотой. В результате единичного кроссинговера плазмиды интеграции и вирусной ДНК образуется рекомбинантный вирусный геном, содержащий полностью интегрированную рекомбинантную плазмиду (см. рис. 1, б). В таком вирусном геноме находятся как ген *gpt*, так и протяженные повторяющиеся последовательности R, R' и L, L'. Генетическая конструкция с протяженными повторами нестабильна и может существовать лишь под селективным давлением по гену *gpt*. При снятии селективных условий (культивирование на обычной питательной среде) в вирусном геноме происходит внутримолекулярная рекомбинация по областям гомологии (R-R' или L-L'), в результате которой образуются два варианта вирусов – с нарушенным и исходным геном (рис. 1, в). Следует отметить, что в результате внутримолекулярной рекомбинации удаляются из генома вируса все чужеродные последовательности, что является важным при создании иммунобиологических препаратов на основе VAC. Кроме того, выщепление всей плазмидной последовательности из вирусного генома позволяет получать в дальнейшем двойные, тройные и т. д. рекомбинантные вирусы с нарушенными локусами в различных участках генома при использовании этой же методики и того же селективного маркера (рис. 2).

Схема получения рекомбинантных VAC с шестью инактивированными генами вирулентности представлена на рис. 2. В плазмиде интеграции rΔJ2R ген тимидинкиназы нарушен встройкой синтетического фрагмента ДНК,

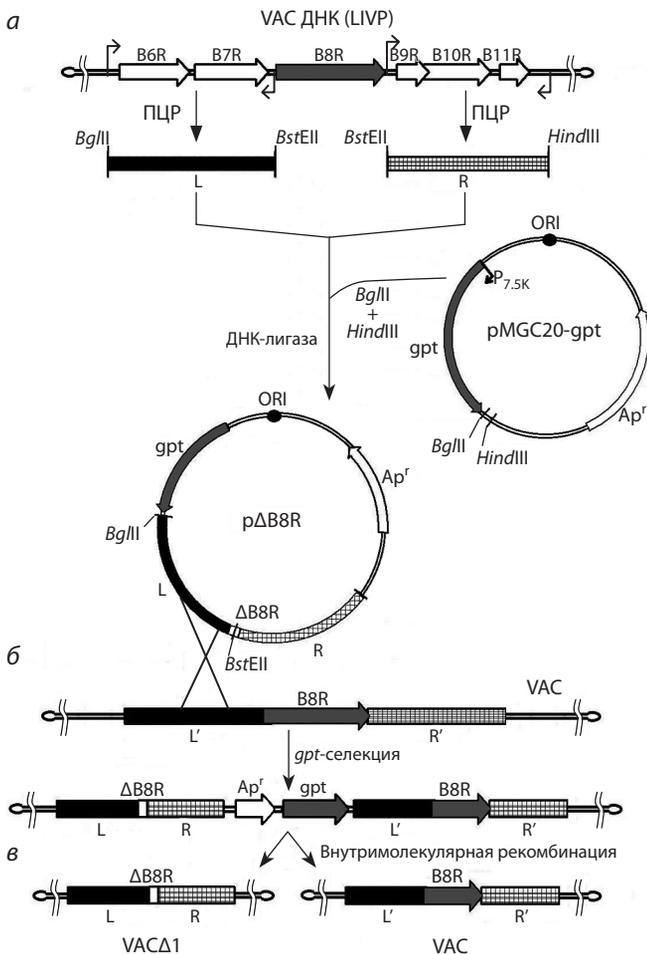


Рис. 1. Общая схема получения вируса VACΔ1 с направленной делецией гена B8R.

а – схема конструирования гибридной плазмиды pΔB8R; б – рекомбинационная встройка гибридной плазмиды в вирусный геном; в – расщепление потомства рекомбинантного вируса на два варианта после снятия селективного давления по гену *gpt* (см. пояснения в тексте).

в остальных рекомбинантных плаزمидах целевые гены делетированы (Yakubitskiy et al., 2015, 2016).

В процессе получения рекомбинантного VACΔ6 из штамма LIVP было проведено 18 последовательных серий пассажей на культуре клеток CV-1: 6 серий пассажей под селективным давлением (от 3 до 7 пассажей), 6 серий пассажей без селективного давления после первого кло-

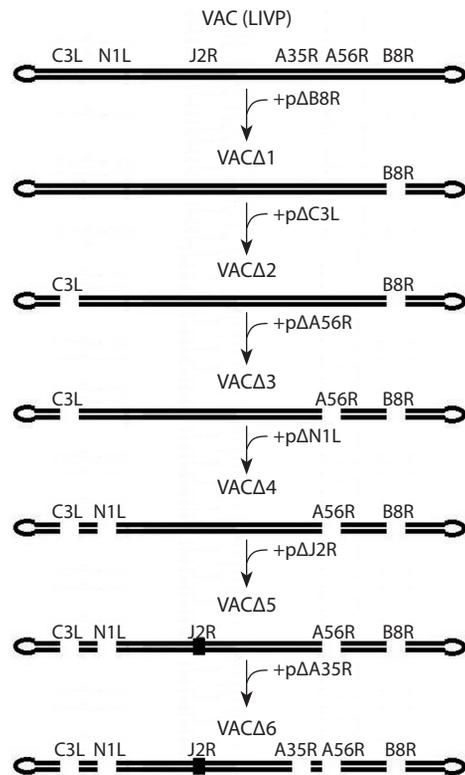


Рис. 2. Схема получения рекомбинантного VACΔ6.

нирования (3–4 пассажа) и 6 серий пассажей без селективного давления после второго клонирования (2–4 пассажа) (табл. 3).

Полногеномное секвенирование вариантов VAC

При получении VACΔ6 вирус подвергся 71 пассажу на культуре клеток, из которых 31 был проведен под селективным давлением по гену *gpt* и 40 – без селективного давления. Такая длинная пассажная история могла привести к дополнительным нецелевым изменениям в геноме штамма VACΔ6 относительно штамма LIVP. Поэтому с целью оценки возможных нецелевых изменений при использовании методики временной доминантной селекции, стабильности исходного штамма LIVP и его рекомбинантных вариантов выполнено полногеномное секвенирование семи штаммов VAC: LIVP кл. 14, VACΔ1, VACΔ2, VACΔ3, VACΔ4, VACΔ5, VACΔ6.

Таблица 3. Пассажная история получения штамма VACΔ6 из штамма LIVP на культуре клеток CV-1

Исходный штамм VAC	Количество пассажей под селективным давлением*	Количество пассажей без селективного давления		Итоговый штамм VAC
		Первое клонирование	Второе клонирование	
LIVP кл. 14	6	3	4	VACΔ1
VACΔ1	7	4	3	VACΔ2
VACΔ2	4	3	4	VACΔ3
VACΔ3	3	3	3	VACΔ4
VACΔ4	6	4	3	VACΔ5
VACΔ5	5	4	2	VACΔ6

* Без учета этапа трансфекции под селективным давлением.

В результате проделанной работы получено семь нуклеотидных последовательностей геномов исследуемых VAC. Нуклеотидную последовательность исходного клонового варианта VAC LIVP депонировали в GenBank под номером доступа KX781953.

Сравнительный анализ полных вирусных геномов показал, что помимо целевых нарушений спонтанно произошли только две нуклеотидные замены при получении VACΔ4 из штамма VACΔ3 и сохранившиеся в геноме VACΔ5 и VACΔ6. При этом обе нуклеотидные замены находятся в межгенных участках (позиции 1431 и 189738 относительно штамма LIVP), что с учетом общей длины вирусного генома (более 190 т. п. н.) и длительной пассажной истории указывает на отсутствие нецелевых изменений вирусной ДНК при использовании методики временной доминантной селекции для получения рекомбинантных VAC.

Изучение генетической стабильности производственного штамма VACΔ6

Обнаруженная стабильность генома VAC на протяжении 71 пассажа в культуре клеток CV-1 указала на целесообразность в дальнейшем при массовом производстве вакцины на основе VACΔ6 проводить подтверждение подлинности штамма более доступным методом – при помощи ПЦР с использованием праймеров, комплементарных шести районам вирусного генома, по которым были произведены модификации родительского VAC LIVP (см. табл. 1). В связи с этим в процессе доклинических исследований оценку генетической стабильности производственного штамма VACΔ6 при множественном пассировании в культуре клеток 4647 (аттестована для культивирования вакцинного штамма) выполняли с помощью ПЦР.

В соответствии с «Руководством по проведению клинических исследований лекарственных средств...» (2012) проводили 15 последовательных циклов заражения монослоя культуры клеток 4647 производственным штаммом вируса VACΔ6 и получения вирусного потомства. Далее осуществляли выделение вирусной ДНК из исходного материала и из криолизата культуры клеток 4647, зараженной вирусом VACΔ6, полученным после 14-го пассажа. ПЦР-анализ выполняли с использованием олигонуклеотидных праймеров, указанных в табл. 1.

При проведении ПЦР-анализа в качестве отрицательного контроля брали ДНК,

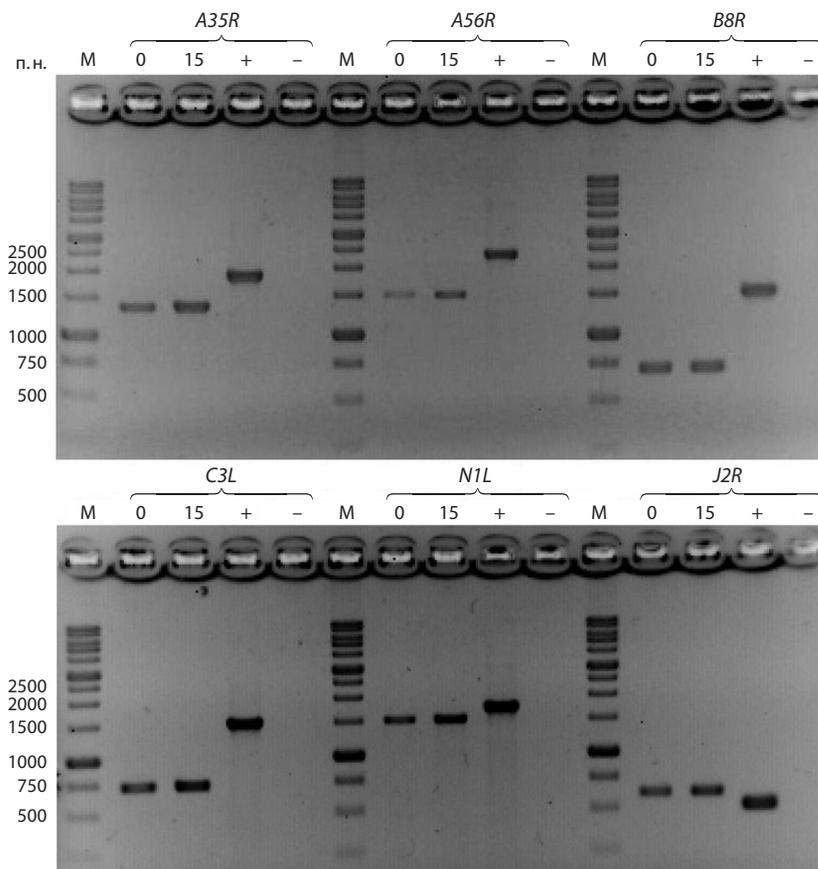


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов ДНК, полученных в результате ПЦР-анализа в районах вирусных генов A35R, A56R, B8R, C3L, N1L и J2R.

0 – ПЦР-продукт, полученный при использовании геномной ДНК исходного штамма VACΔ6; 15 – ПЦР-продукт, полученный при использовании геномной ДНК штамма VACΔ6 после 15 пассажей на культуре клеток 4647; М – ДНК-маркер; «+» – ПЦР-продукт, полученный при использовании ДНК VAC LIVP; «-» – отрицательный контроль.

выделенную из чистой культуры 4647, в качестве положительного контроля использовали ДНК VAC LIVP. Теоретически рассчитанные длины фрагментов ДНК, получаемых в результате ПЦР с применением специфичных пар праймеров, приведены в табл. 2. Результаты электрофоретического анализа полученных ампликонов (рис. 3) свидетельствуют о том, что после 15 пассажей производственного штамма вируса VACΔ6 на культуре клеток 4647 длины ПЦР-продуктов соответствуют теоретически рассчитанным величинам и не отличаются по этому параметру от ПЦР-продуктов, полученных с ДНК производственного штамма VACΔ6 до пассирования.

Секвенирование шести фрагментов ДНК, соответствующих районам нарушаемых генов VACΔ6, показало, что после 15 пассажей в культуре клеток 4647 все последовательности вирусной ДНК остались неизменными.

Обсуждение

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VAC) входит в состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Представители данного рода являются крупнейшими вирусами млекопитающих, их ДНК-геном содержит около 200 генов. Поксвирусы размножаются в цитоплазме клеток, и продукты многочисленных вирусных генов осуществляют контроль репликации вирусной ДНК, транскрипции и трансляции вирусных генов. Кроме того, множество генов участвует в регулировании противовирусного иммунного ответа, круга чувствительных хозяев, патогенности и других свойств этих вирусов. Наиболее изучен ортопоксвирус VAC, он сыграл решающую роль

в качестве живой вакцины при глобальной ликвидации натуральной оспы (Shchelkunov, Shchelkunova, 2020).

Противооспенные вакцины на основе разных штаммов VAC умеренно реактогенны, но при массовой вакцинации вызывают у людей в небольшом проценте случаев тяжелые побочные реакции, иногда завершающиеся летальным исходом. Поэтому после подтверждения ликвидации натуральной оспы в 1980 г. ВОЗ настоятельно рекомендовала прекратить противооспенную вакцинацию (Smallpox and its Eradication, 1988).

Остановка этой вакцинации привела к тому, что в настоящее время практически все человечество утратило иммунную защиту не только от натуральной оспы, но и от других зоонозных ортопоксвирусных инфекций человека, таких как оспа обезьян и оспа коров. Особые опасения вызывает оспа обезьян, клинические проявления которой у людей напоминают натуральную оспу. Все это выдвинуло на повестку дня вопрос о необходимости создания современными методами новых безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций.

Нами реализован подход по введению методами генетической инженерии направленных делеций (инактивации) по индивидуальным генам вирулентности VAC без нарушения функций репликации вируса в клетках млекопитающих (Yakubitskiy et al., 2015). Используемая процедура временной доминантной селекции при инактивации каждого избранного вирусного гена осуществляется в процессе множественных пересевов и клонирований вируса в культуре клеток. Отбор создаваемых вариантов VAC проводится на основе данных ПЦР в целевом районе вирусного генома. При этом до появления современных методов полногеномного секвенирования вся последовательность нуклеотидов крупной ДНК VAC не контролировалась. Соответственно не было ответа на вопрос, как такие множественные пассажи VAC в культуре клеток могут сказаться на стабильности вирусного генома в целом.

Впервые на примере получения штамма VACΔ6, у которого было инактивировано шесть генов в разных районах вирусного генома, нами проведено полногеномное секвенирование исходного клонового варианта VAC LIVP, вакцинного штамма VACΔ6 и пяти промежуточных вариантов вируса с последовательно нарушенными целевыми генами (см. рис. 2). Сравнительный анализ полных вирусных геномов показал, что помимо целевых нарушений спонтанно произошли только две нуклеотидные замены при получении VACΔ4 из штамма VACΔ3 и сохранившиеся в геноме VACΔ5 и VACΔ6. При этом обе нуклеотидные замены находятся в межгенных участках (позиции 1431 и 189738 относительно исходного штамма LIVP). Эти результаты демонстрируют, что использованная процедура временной доминантной селекции не вносит существенных незапланированных изменений в вирусный геном. По-видимому, это указывает также на то, что исходный VAC LIVP адаптирован к размножению в культуре клеток CV-1 и поэтому стабильно сохраняет целостность своего генома в условиях выполненного эксперимента.

Культивирование VAC, являющегося вирусом млекопитающих, в гетерологичной первичной культуре клеток птиц (фибробластах куриных эмбрионов), по-видимому, оказывает большое селективное давление на данный вирус

и приводит при множественных пассажах к значительным изменениям в вирусном геноме, что установлено для варианта MVA (Volz, Sutter, 2017).

При использовании VACΔ6 в качестве безопасной живой вакцины для массовой вакцинации необходимо полученный штамм подвергать многим циклам размножения в аттестованной для этих целей культуре клеток. При этом важнейшим критерием является сохранение аттенуированного фенотипа/генотипа вакцинного штамма при такой масштабной наработке вируса. В связи с этим в соответствии с «Руководством по проведению клинических исследований лекарственных средств...» (2012) осуществлено 15 последовательных циклов заражения монослоя культуры клеток 4647 производственным штаммом вируса VACΔ6. ПЦР-анализ и секвенирование шести фрагментов ДНК, соответствующих районам нарушаемых генов VACΔ6, показали, что после 15 пассажей в культуре клеток 4647 последовательности вирусной ДНК в этих районах остались неизменными.

Заключение

Таким образом, полученные результаты демонстрируют высокую генетическую стабильность исследованных рекомбинантных штаммов при длительной пассажной истории на культурах клеток CV-1 и 4647. Это важная положительная характеристика рекомбинантного штамма VACΔ6 как стабильного вакцинного штамма для получения живой противооспенной вакцины четвертого поколения.

Список литературы / References

- Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К, 2012.
[Guidelines for Clinical Trials of Medicinal Products (Immunobiological Medicinal Products). Part 2. Moscow: Grif and K Publ., 2012. (in Russian)]
- Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. Modulating vaccinia virus immunomodulators to improve immunological memory. *Viruses*. 2018; 10(3):101. DOI 10.3390/v10030101.
- Blanchard T.J., Alcamí A., Andrea P., Smith G.L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* 1998;79(Pt. 5):1159-1167. DOI 10.1099/0022-1317-79-5-1159.
- Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V., Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 1998;79(Pt. 2): 347-352. DOI 10.1099/0022-1317-79-2-347.
- Eto A., Saito T., Yokote H., Kurane I., Kanatani Y. Recent advances in the study of live attenuated cell-cultured smallpox vaccine LC16m8. *Vaccine*. 2015;33(45):6106-6111. DOI 10.1016/j.vaccine.2015.07.111.
- Falkner F.G., Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 1990;64(6):3108-3111. DOI 10.1128/JVI.64.6.3108-3111.1990.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(14):3059-3066. DOI 10.1093/nar/gkf436.
- Kidokoro M., Shida H. Vaccinia virus LC16m8Δ as a vaccine vector for clinical applications. *Vaccines*. 2014;2(4):755-771. DOI 10.3390/vaccines2040755.

- Kretzschmar M., Wallinga J., Teunis P., Xing S., Mikolajczyk R. Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Med.* 2006;3(8):e272. DOI 10.1371/journal.pmed.0030272.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-2079. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
- McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. The genome analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. DOI 10.1101/gr.107524.110.
- Moss B. Smallpox vaccines: Targets of protective immunity. *Immunol. Rev.* 2011;239(1):8-26. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x.
- Nolen L.D., Osadebe L., Katomba J., Likofata J., Mukadi D., Monroe B., Doty J., Hughes C.M., Kabamba J., Malekani J., Bomponda P.L., Lokota J.I., Balilo M.P., Likafi T., Lushima R.S., Ilunga B.K., Nkawa F., Pukuta E., Karhemere S., Tamfum J.J., Nguete B., Wema-koy E.O., McCollum A.M., Reynolds M.G. Extended human-to-human transmission during a monkeypox outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerg. Infect. Dis.* 2016;22(6):1014-1021. DOI 10.3201/eid2206.150579.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012; 28(8):1166-1167. DOI 10.1093/bioinformatics/bts091.
- Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. Monkeypox re-emergence in Africa: a call to expand the concept and practice of One Health. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2019;17(2): 129-139. DOI 10.1080/14787210.2019.1567330.
- Robinson J.T., Thorvaldsdottir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(1):24-26. DOI 10.1038/nbt.1754.
- Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses.* 2015;7(4):1726-1803. DOI 10.3390/v7041726.
- Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine.* 2011;29(Suppl. 4):D49-D53. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.05.037.
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):e1003756. DOI 10.1371/journal.ppat.1003756.
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. Genes that control vaccinia virus immunogenicity. *Acta Naturae.* 2020;12(1):33-41. DOI 10.32607/actanaturae.10935.
- Singh R.K., Balamurugan V., Bhanuprakash V., Venkatesan G., Hosamani M. Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: global scenario and perspectives. *Indian J. Virol.* 2012;23(1):1-11. DOI 10.1007/s13337-012-0068-1.
- Smallpox and its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988.
- Volz A., Sutter G. Modified vaccinia virus Ankara. History, value in basic research, and current perspectives for vaccine development. *Adv. Virus Res.* 2017;97:187-243. DOI 10.1016/bs.aivir.2016.07.001.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of vaccinia virus. *Acta Naturae.* 2015;7(4):113-121. DOI 10.32607/20758251-2015-7-4-113-121.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Highly immunogenic variant of attenuated vaccinia virus. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016;466:35-38. DOI 10.1134/S1607672916010105.

ORCID ID

S.N. Yakubitskiy orcid.org/0000-0002-0496-390X
S.N. Shchelkunov orcid.org/0000-0002-6255-9745

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.12.2021. После доработки 09.03.2022. Принята к публикации 14.03.2022.

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

Создание трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусам: платформа изучения вирусного патогенеза и тестирования вакцин

Н.Р. Баттулин^{1, 2}, О.Л. Серов^{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

 serov@bionet.nsc.ru

Аннотация. За последние 20 лет коронавирусы вызвали три эпидемии, SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV2, причем летальность первых двух была очень высокой: около 10 и 26 % соответственно. Последняя вспышка коронавирусной инфекции, вызванная SARS-CoV2 в 2019 г. в Китае, охватила всю планету, и она все еще продолжает распространяться. Источником этих вирусов у человека были животные: летучие мыши, гималайские циветы и верблюды. Геномы MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV2 имеют высокое сходство между собой. Установлено, что заражение коронавирусной инфекцией (SARS-CoV и SARS-CoV2) происходит посредством контакта вирусного белка S с рецептором легочного эпителия – ангиотензин-конвертирующим ферментом 2 (ACE2), благодаря чему вирус попадает в клетки. Наиболее привлекательной моделью для исследования особенностей развития этих заболеваний является лабораторная мышь, которая, однако, резистентна к коронавирусной инфекции. Резистентность объясняется различием аминокислотного состава белков Ace2 мыши и ACE2 человека. Поэтому при получении мышей, восприимчивых к коронавирусам SARS-CoV и SARS-CoV2, в их геном переносят ген ACE2 человека. Экзогенная ДНК конструкций встраивается в реципиентный геном случайным образом и с варьирующим числом копий. На основе этой технологии были получены линии трансгенных мышей, восприимчивых к интраназальной коронавирусной инфекции. Применение технологии адресной модификации геномов с помощью CRISPR/Cas9 позволило получить линии трансгенных животных с инсерцией гена ACE2 человека под контроль промотора эндогенного гена Ace2 мыши. Такая «гуманизация» гена Ace2 дает возможность получить животных, наиболее близко имитирующих коронавирусную инфекцию человека. Таким образом, к настоящему времени создана серия линий трансгенных мышей – животных, моделирующих коронавирусные инфекции человека и потенциально способных служить платформами для тестирования вакцин.
Ключевые слова: коронавирусы CoVs; SARS-CoV; MERS-CoV; COVID-19; трансгенез; «гуманизация» генома мышей; технология CRISPR/Cas9.

Для цитирования: Баттулин Н.Р., Серов О.Л. Создание трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусам: платформа изучения вирусного патогенеза и тестирования вакцин. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):402-408. DOI 10.18699/VJGB-22-49

Creation of transgenic mice susceptible to coronaviruses: a platform for studying viral pathogenesis and testing vaccines

N.R. Battulin^{1, 2}, O.L. Serov^{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

 serov@bionet.nsc.ru

Abstract. Over the past 20 years, coronaviruses have caused three epidemics: SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV2, with the first two having a very high lethality of about 10 and 26 %, respectively. The last outbreak of coronavirus infection caused by SARS-CoV2 in 2019 in China has swept the entire planet and is still spreading. The source of these viruses in humans are animals: bats, Himalayan civets, and camels. The genomes of MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV2 are highly similar. It has been established that coronavirus infection (SARS-CoV and SARS-CoV2) occurs through the viral protein S interaction with the lung epithelium – angiotensin-converting enzyme receptor 2 (ACE2) – due to which the virus enters the cells. The most attractive model for studying the development of these diseases is a laboratory mouse, which, however, is resistant to coronavirus infection. The resistance is explained by the difference in the amino acid composition of mouse Ace2 and human ACE2 proteins. Therefore, to create mice susceptible to SARS-CoV and SARS-CoV2 coronaviruses, the human ACE2 gene is transferred into their genome. The exogenous DNA of the constructs is inserted into the recipient genome randomly and with a varying number of copies. Based on this technology, lines of transgenic mice susceptible to intranasal coronavirus infection have been created. In addition, the use of the technology of targeted genome modification using CRISPR/Cas9 made it possible to create lines of

transgenic animals with the insertion of the human *ACE2* gene under the control of the endogenous murine *Ace2* gene promoter. This "humanization" of the *Ace2* gene makes it possible to obtain animals susceptible to infection with coronaviruses. Thus, transgenic animals that simulate coronavirus infections and are potential platforms for testing vaccines have now been created.

Key words: coronaviruses CoVs; SARS-CoV; MERS-CoV; COVID-19; transgenesis; "humanization" of the mouse genome; CRISPR/Cas9 technology.

For citation: Battulin N.R., Serov O.L. Creation of transgenic mice susceptible to coronaviruses: a platform for studying viral pathogenesis and testing vaccines. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):402-408. DOI 10.18699/VJGB-22-49

Введение

Вирусная инфекция, вызывавшая атипичную пневмонию (severe acute respiratory syndrome, SARS), впервые зафиксирована в декабре 2019 г. в Китае в городе Ухань, быстро распространилась по всему миру в масштабе пандемии (Li et al., 2020; Zhou P. et al., 2020; Zhu et al., 2020). Вскоре, в конце января 2020 г., были опубликованы данные о том, что возбудителем заболевания является новый тип коронавируса, выделенный из бронхоальвеолярных выделений шести пациентов и получивший название 2019-nCov (Zhu et al., 2020). Позднее по рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) заболевание, вызванное новым вирусом SARS-CoV2, стали называть COVID-19. Почти одновременно (в начале февраля 2020 г.) были опубликованы дополнительные данные о природе новой коронавирусной инфекции, полученные от семи пациентов, шесть из которых были продавцы и поставщики морепродуктов на Уханьском рынке (Zhou F. et al., 2020). Согласно данным P. Zhou с коллегами (2020), геном вируса SARS-CoV2 имеет сходство на 85 % с коронавирусом, распространенным среди летучих мышей, и 79.6 % сходства с ранее описанным SARS-CoV у человека.

Модельные животные – важный инструмент в исследовании многих патологий человека. Однако создание адекватных животных моделей инфекционных болезней имеет свою специфику, связанную с высокой скоростью коэволюции системы «паразит–хозяин», в процессе которой оба участника приобретают множество специфических приспособлений. Примером этому может служить тропизм инфекционных вирусов человека, основанный на специфическом взаимодействии вирусных белков с клеточными рецепторными белками, что дает старт инфекции. Отсутствие этого звена – специфического связывания белков вируса и белков клеток-мишеней – обуславливает резистентность или, наоборот, восприимчивость к конкретной вирусной инфекции у разных видов.

С другой стороны, различие в реакции иммунной системы на тот или иной вирусный агент у человека и животных может также стать непреодолимым препятствием для использования животных в качестве модельных объектов. Несмотря на эти сложности, на сегодняшний день создано немало мышиных моделей вирусных заболеваний человека (полиомиелита, кори, гепатитов В и С), что позволяет исследовать фундаментальные аспекты развития конкретного заболевания, такие как процессы инфицирования, течение вирусного заболевания и взаимодействие вируса и иммунной системы. Подобные модели оказались крайне востребованными для проведения доклинических испытаний новых вакцин и противовирусных препаратов (Takaki et al., 2017).

Настоящий обзор посвящен созданию лабораторных мышей, восприимчивых к коронавирусам SARS-CoV2 и SARS-CoV, с целью разработки экспериментальной платформы для исследования как самого вирусного патогенеза, так и тестирования фармакологических противовирусных препаратов и вакцин.

Коронавирусные инфекции человека и животных

Группа коронавирусов (CoVs) представлена крупными оболочечными вирусами, геном которых состоит из одонитовой РНК (Lai et al., 2007). Коронавирусы входят в субсемейство Coronavirinae, семейства Coronaviridae, отряда Nidovirales. Коронавирусы состоят из четырех родов: альфа-, бета-, гамма- и дельта-коронавирусы (Woo et al., 2009a, b), и все они вызывают зоонозные инфекции у животных. В последние два десятилетия из всей когорты коронавирусов два оказались патогенными для человека, вызывая атипичную пневмонию (severe acute respiratory syndrome, SARS) и ближневосточный респираторный синдром (Middle East respiratory syndrome; MERS-CoV). В первом случае эпидемия вспыхнула в провинции Гуанджоу в Китае в декабре 2002 г., а затем охватила пять континентов (Peiris et al., 2003). Согласно данным ВОЗ, эпидемия SARS-CoV затронула 8437 человек, из которых 813 скончались. Коронавирусная инфекция MERS-CoV вспыхнула на Аравийском полуострове в 2012 г. (Zaki et al., 2012) и распространилась в странах Ближнего Востока, Англии и Южной Кореи. По данным ВОЗ, эпидемия затронула 1728 человек, причем в 624 случаях инфицирование MERS-CoV закончилось летальным исходом. Установлено, что источником инфицирования человека SARS-CoV и MERS-CoV являются животные (см. подробнее ниже).

Процесс инфицирования коронавирусами человека и животных

Проникая в клетки-мишени человека, SARS-CoV и MERS-CoV используют свою «корону», которая представлена многочисленными шиповидными (S) белками. Установлено, что S-белок вируса SARS-CoV взаимодействует с ангиотензин-конвертирующим ферментом 2 (ACE2; кодируется геном *ACE2*) в качестве входного рецептора (Li et al., 2003; Ge et al., 2013). В процессе вирусной инфекции тримерный белок S расщепляется на субъединицы S1 и S2, после чего они узнаются рецепторами клеток человека (Belouzard et al., 2009). Далее субъединица S1, содержащая рецептор-связывающий домен, напрямую связывается с пептидазным доменом белка ACE2, тогда как S2 отвечает за слияние мембран (Li et al., 2005).

Основываясь на этих данных, несколько независимых групп исследователей предположили, что новый коронавирус SARS-CoV2 использует такой же способ проникновения в клетки человека, что и ранее описанные SARS-подобные вирусы. Для подтверждения этой гипотезы были осуществлены сравнения между последовательностями белков SARS-подобных вирусов и нового коронавируса SARS-CoV2 и показан высокий уровень их сходства. Затем для установления сайтов связывания был проведен кристаллографический анализ комплекса между S1-субъединицей коронавируса и белка ACE2 человека. Установлено, что белок ACE2 имеет пять ключевых аминокислотных последовательностей, которые участвуют в связывании S1-субъединицы вируса (Lan et al., 2020; Wan et al., 2020; Wang et al., 2020).

Ген *ACE2* у человека экспрессируется в легких, артериях, сердце, головном мозге и тонком кишечнике и является важным компонентом ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (Bader, 2013). Экспрессия *ACE2* в легких ограничена главным образом альвеолярными эпителиальными клетками второго типа. При коронавирусной инфекции происходит взаимодействие белка ACE2 с рецептор-связывающим доменом белка шипа вируса, что приводит к эндоцитозу вирусных частиц и их интернализации (Kuba et al., 2010). В результате этих событий развиваются тяжелый острый респираторный синдром, повреждение ткани легкого и обширный воспалительный процесс (Imai et al., 2005).

Важно заметить, что первые стадии коронавирусных инфекций, вызванных SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV2, имеют значительное сходство между собой.

Создание трансгенных мышей, восприимчивых к заражению коронавирусом

Как отмечалось выше, источником коронавирусных заболеваний человека были животные. В 2003 г. китайские исследователи установили, что переносчиками коронавируса SARS-CoV человеку были летучие мыши через посредника – гималайских цивет, чье мясо считается деликатесом в китайской кухне (Guan et al., 2003; Peiris et al., 2003). Основанием для такого вывода стало 99.8 % сходство генома SARS-CoV с выделенным вирусом у летучих мышей и гималайских цивет. Естественным носителем в природе коронавируса MERS-CoV являются также летучие мыши, а промежуточным переносчиком вируса к человеку – верблюды (van Boheemen et al., 2012; Reusken et al., 2013).

Следует отметить, что существует несколько видов животных, восприимчивых к инфекции SARS-CoV: хорьки, сирийские хомячки, кошки и ряд приматов – макаки, африканская зеленая обезьяна и мармозетки (Glass et al., 2004; Martina et al., 2003; Roberts et al., 2005; Subbarao, Roberts, 2006). Предполагается, что к новому коронавирусу, SARS-CoV2, могут быть восприимчивы и другие животные (Wan et al., 2020). Однако у этих инфицированных животных проявляются минимальные признаки нарушения и, как правило, отсутствуют клинические симптомы, характерные для коронавирусной инфекции у человека.

В связи с описанным выше, в основу стратегии создания модельных животных заложена технология введения в

их геном гена *ACE2* человека, т. е. основного рецептора коронавируса. Действительно, в одной из первых работ по созданию трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусной инфекции, была разработана конструкция рекомбинантной ДНК *pK18-hACE2*, включающая 5'-промотор и 1-й интрон (с мутацией в 3'-сплайс акцептора) гена *CK18* человека (кодирует цитокератин-18), а также трансляционный энхансер α -вируса мозаики люцерны (общий размер 2.5 т. п. н.), кДНК *ACE2* человека и 3'-последовательность, включающая экзон 6, интрон 6, экзон 7 и полиА-сигнальный элемент гена *CK18* человека (McCray et al., 2007). По замыслу авторов, в конструкции присутствовали все элементы для обеспечения высокого уровня ее экспрессии в эпителиальных клетках. Очищенный фрагмент ДНК размером 6.8 т. п. о., вырезанный из *pK18-hACE2*, был инъецирован в пронуклеусы гибридных (C57BL/6Jx SJL/J) зигот для получения трансгенных животных.

В эксперименте (McCray et al., 2007) получено три линии трансгенных мышей от разных основателей. Нужно отметить, что выбранная технология предусматривает случайную встройку трансгена в реципиентный геном, причем с разным числом копий. По данным авторов, количество копий трансгена в линиях варьировало от 4 до 10. Экспрессия трансгена наблюдалась в разных тканях полученных мышей: легких, тонком кишечнике, печени и почке и на низком уровне была обнаружена в головном мозге.

После интраназального заражения коронавирусом SARS-CoV трансгенных *CK18-hACE2* животных всех трех линий все они погибали позже 7-го дня после инокуляции вируса. Причем мыши, несущие большее число копий трансгена, погибали уже на 4-й день после заражения. Необходимо добавить, что потеря веса наблюдалась у всех трансгенных линий мышей в первые дни после заражения. Высокий титр вируса определялся в легких, по сравнению с контролем, и достигал наивысшего уровня на 2-й день после заражения. Эти данные предполагают повышенную репликацию вируса как ключевой элемент развития тяжелой формы заболевания у трансгенных животных. Интересно, что, несмотря на экспрессию *ACE2* человека в тонком кишечнике, печени и почке, присутствие вируса в них не обнаружено. Среди тестируемых трех линий трансгенных мышей только в одной вирус был выявлен в головном мозге, хотя экспрессия трансгена была на уровне фона.

Гистологический анализ легких на 2-й день заражения показал признаки васкуляризации и перибронхиолярного воспаления, а затем наблюдали расширение зоны воспалительного процесса, инфильтрацию клеток и слущивание клеточного эпителия у двух линий трансгенных мышей. В целом картина интраназального заражения трансгенных *CK18-hACE2* линий продемонстрировала сходство с развитием острого респираторного синдрома у человека, вызванного инфекцией SARS-CoV, т. е. эти животные могут быть использованы как модельные объекты для исследования патогенеза коронавирусной инфекции (McCray et al., 2007; Netland et al., 2008). Позднее инфицирование *CK18-hACE2* мышшей SARS-CoV2 показало сходство с клиническими проявлениями инфекции COVID-19 человека (Yinda et al., 2020).

Практически одновременно другая группа исследователей создала трансгенных мышей, экспрессирующих *ACE2* человека под контролем конститутивного CAG-промотора (Tseng et al., 2007). Последовательность кДНК гена *ACE2* человека была вставлена в экспрессирующий вектор pCAGGS/MCS, который содержал в 5'-последовательности энхансера раннего промотора цитомегаловируса «слитого» с промотором гена актина курицы, а в 3'-области – сайты сплайсинга гена глобина кролика. Общий размер экспрессирующего вектора pCAGGS-*ACE2* был 7750 п.о. Фрагмент ДНК этой кассеты был инъецирован в пронуклеусы гибридных зигот C57BL/6J × C3H/HeJ. Среди родившихся F0 потомков из экспериментальных зигот было идентифицировано пять трансгенных животных, из которых два основателя, AC70 и AC63, дали начало двум линиям. ОТ-ПЦР анализ показал присутствие транскриптов трансгена *ACE2* человека в желудке, сердце, мышцах, головном мозге, почках, легких и тонком кишечнике.

Инфицирование трансгенных мышей SARS-CoV выявило следующую симптоматику: перманентную потерю веса, одышку, неконтролируемую двигательную активность. Гибель животных наблюдалась после 3-го дня инфицирования и заканчивалась тотальной летальностью к 8-му дню. Размножение вируса происходило преимущественно в легочной ткани, тогда как в других образцах (мазках из ротовой полости, крови, сердце, селезенке, почках, моче или кале) вирус не обнаруживался. С.Т. Tseng с коллегами (2007) сделали заключение, что полученные трансгенные линии мышей восприимчивы к инфекции SARS-CoV, проявляя внешние признаки, сходные с таковыми у человека, включая летальный исход инфицированных животных. По мнению авторов, такие мыши могут быть полезны для исследования патогенеза SARS-CoV инфекции.

В 2007 г. появилась третья статья по созданию трансгенных мышей, восприимчивых к инфекции SARS-CoV (Yang et al., 2007). Эта группа исследователей использовала конструкцию, включающую промотор гена *Ace2* мыши, «слитый» с геном *ACE2* человека. ДНК этой конструкции инъецировали в зиготы ICR мышей и наблюдали рождение трансгенных животных. Экспрессия *ACE2* человека детектировалась в легких, сердце, почках и тонком кишечнике. На 3-й и 7-й дни после заражения SARS-CoV наблюдались репликация вируса в легких и признаки поражения легких: интерстициальная гиперемия и геморрагия, моноцитарная и лимфоцитарная инфильтрация, пролиферация альвеолярного эпителия и его слущивание. Интересно, что много позднее после интраназального заражения SARS-CoV2 этих трансгенных мышей была умеренная потеря веса в первые пять дней, но не зарегистрировано летальных исходов ни в одном случае (Bao et al., 2020). Мишенью и местом репликации COVID-19 была ткань легкого, что приводило к развитию признаков пневмонии. Таким образом, трансгенная линия мышей, созданная в 2007 г. (Yang et al., 2007), стала удобной платформой для исследования патогенеза двух коронавирусов, SARS-CoV и SARS-CoV2.

При использовании классической технологии трансгенеза – микроинъекций ДНК экспрессирующих векторов в пронуклеусы зигот – следует иметь в виду, что они встраиваются в реципиентный геном случайным образом

и с разным числом копий (Smirnov et al., 2020), вследствие чего экспрессия трансгена варьирует у разных основателей. Заслуживает внимания одно из таких исследований – получение трансгенных C3B6 мышей, несущих *ACE2* человека под контролем промотора HFH4, специфичного для реснитчатых эпителиальных клеток легкого (Ostrowski et al., 2003; Menachery et al., 2016). Экспрессия *ACE2* человека обнаружена в легких, головном мозге, печени, почках трансгенных HFH4-hACE2 мышей. Интраназальное заражение SARS-CoV или одного из его штаммов, WIV1-CoV, вызывало потерю веса в первые дни заражения и гибель животных после 6-го дня от момента инфекции (Menachery et al., 2016). Важно, что на этих мышках были испытаны вакцины и наблюдался их позитивный эффект против обоих типов коронавируса. Позднее эти трансгенные мыши были успешно использованы для тестирования противовирусной терапии против SARS-CoV2 (Jiang et al., 2020).

Имеет смысл остановиться на исследовании российской группы А.В. Дейкина, в котором впервые предусмотрены защитные меры самих исследователей от инфицированных коронавирусами трансгенных мышей (Bruter et al., 2021). Эти исследователи создали кассету, состоящую из двух основных элементов: вектора рКВ1 и открытой рамки считывания *hACE2*. Ампициллин-резистентный вектор рКВ1 сконструирован для клонирования генов, экспрессия которых зависит от Cre-рекомбинации (Cre-рекомбиназа присутствует в геноме прокариот, но отсутствует у эукариота), и содержит инсульторы и терминаторы («защитающие» трансген от влияния близлежащих последовательностей), CAG-промотор и СТОП-кассету. Кроме того, вектор содержит IRES – элемент вируса энцефаломиокардита, репортерный ген *GFP* и полиА-сигнал вируса SV40. Важно, что экспрессия трансгена *ACE2* человека активируется только после удаления СТОП-кассеты Cre-рекомбиназой.

Рекомбинантная ДНК кассеты была микроинъецирована в зиготы гибридных F₁ CBA × C57BL/6 мышей. Полученные трансгенные животные не экспрессировали ни *ACE2* человека, ни ген-репортер. Для активации трансгена проводили скрещивание трансгенных мышей с мышками B6. Cg-Ndor1Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb/1J (сокращенно Ubi-Cre), несущих ген Cre-рекомбиназы под контролем промотора UBC. У дигетерозиготных мышей ACE2-GFP и Cre- активацию трансгена проводили тамоксифеном, который активирует Cre-UBC, которая, в свою очередь, «вырезает» СТОП-кассету, и происходит активация экспрессии *ACE2* и гена-репортера (Bruter et al., 2021). Таким образом, дигетерозиготные мыши становятся восприимчивыми к коронавирусной инфекции (Dolskiy et al., 2022).

Действительно, в прямых экспериментах показано, что вирус при интраназальном заражении трансгенных мышей SARS-CoV2 вызывает утолщение перегородок альвеолярных ходов, обусловленных диффузной гиперплазией альвеолярного эпителия II типа. Кроме того, легочная ткань была подвержена лимфоцитарной инфильтрации. Важно отметить, что в легочной ткани наблюдались множественные скопления эритроцитов в сосудах (признак тромбоза). В отличие от образцов легких, при гистологическом анализе головного мозга не выявлено ка-

Основные трансгенные линии мышей с кДНК гена *ACE2* человека, восприимчивых к коронавирусной инфекции SARS-CoV и SARS-CoV2

Год создания	Название линии	Промотор	Использованная технология	Литературный источник
2007	СК18- <i>hACE2</i>	Ген <i>СК18</i> человека	Случайная инсерция трансгена	McCray et al., 2007
2007	AC70 Tg ⁺ AC63 Tg ⁺	CAG – «слитый» промотор гена актина курицы + энхансер мегаловируса	Случайная инсерция трансгена	Tseng et al., 2007
2007	<i>hACE2</i>	Ген <i>Ace2</i> мыши	Случайная инсерция трансгена	Yang et al., 2007
2003, 2016	HFH4- <i>hACE2</i>	Специфический HFH4/FOXJ1-промотор, активный в клетках реснитчатого эпителия	Случайная инсерция трансгена	Ostrowski et al., 2003 Menachery et al., 2016
2021	<i>hACE2</i> (LoxP-Stop)	CAG-промотор	Случайная инсерция трансгена	Bruter et al., 2021
2020	<i>hACE2</i>	Промотор гена <i>Ace2</i> мыши	Адресная инсерция трансгена с помощью CRISPR/Cas9	Sun et al., 2020
2021	C57BL/6N- <i>Ace2</i> ^{em2} (<i>hACE2</i> -WPRE, pgk-puro)/CCLA BALB/c- <i>Ace2</i> ^{em1} (<i>hACE2</i> -WPRE, pgk-puro)/CCLA	Промотор гена <i>Ace2</i> мыши	Адресная инсерция трансгена с помощью CRISPR/Cas9	Liu et al., 2021

ких-либо нарушений, за исключением присутствия множественных скоплений эритроцитов (признаки тромбоза) в сосудах головного мозга (Dolskiy et al., 2022). Следует заметить, что все экспериментальные трансгенные мыши погибали с 5-го до 10-го дня после интраназального вирусного заражения.

Пандемия COVID-19 стимулировала поиски новых технологий создания модельных животных – лабораторных мышей. Разработка адресной модификации геномов человека и животных с помощью технологии CRISPR/Cas9 открыла перспективу получения «гуманизированных» животных, в геноме которых целевые эндогенные гены можно заменить на гомологичные гены человека. В качестве примера можно привести эксперименты по «инсерции» кДНК гена *ACE2* человека в кодирующую последовательность эндогенного гена *Ace2* у мышей линии C57BL/6 с помощью технологии CRISPR/Cas9 (Sun et al., 2020). кДНК гена *ACE2* человека была вставлена во 2-й экзон мышинового гена *Ace2* в зиготах мыши. Такая вставка инактивировала эндогенный ген *Ace2*, а для визуализации экспрессии *ACE2* человека в его 3'-конце был вставлен ген-репортер флуоресцентного белка tdTomato (красное свечение) вместе с сайтом IRES и полиА-последовательностью. Среди родившихся мышей из экспериментальных зигот были идентифицированы трансгенные животные с целевой вставкой гена *ACE2* человека.

Такие мыши были восприимчивы к интраназальной инфекции SARS-CoV2 в молодом и зрелом возрасте; вирус поражал легкие, трахеи и головной мозг. При интраназальном инфицировании развивалась интерстициальная пневмония, сходная по проявлениям с таковой человека, инфицированного SARS-CoV2, но без летального эффекта. Вполне понятно, что такие ген-модифицированные мыши рассматриваются как привлекательная модель ко-

ронавирусной инфекции человека и потенциально могут служить платформой для испытания вакцин и тестирования фармакологических препаратов.

Сходный подход «гуманизации» гена *Ace2* мыши посредством целевой инсерции кДНК гена *ACE2* человека был использован на линиях эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мышей C57BL/6 и BALB/c с применением технологии CRISPR/Cas9 (Liu et al., 2021). Уместно напомнить, что использованные линии ЭСК способны после инъекции в полость тетраплоидных бластоцист замещать эндогенные клетки внутренней массы, в результате чего рождаются трансгенные потомки, развившиеся из донорских ЭСК. Полученные таким способом трансгенные линии мышей, названные C57BL/6N*Ace2*^{em2}(*hACE2*-WPRE, pgk-puro)/CCLA и BALB/c-*Ace2*^{em1}(*hACE2*-WPRE, pgk-puro)/CCLA, были восприимчивы к интраназальной инфекции SARS-CoV2, хотя и отличались от трансгенных мышей, полученных S.-H. Sun с коллегами (2020) по ряду признаков. Таким образом, к настоящему времени получена серия линий «гуманизированных» мышей, несущих трансген *ACE2* человека и восприимчивых к коронавирусной инфекции и потенциально способных моделировать коронавирусную патологию человека.

Заключение

Суммируя данные по получению трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусной инфекции, следует отметить, что, несмотря на разнообразие созданных трансгенных линий мышей (см. таблицу), наибольшей популярностью у исследователей пользуются мыши СК18-*hACE2*, полученные Р.В. McCray с коллегами (2007). По данным PubMed, в период с 2020 по 2022 г. опубликована 101 статья, где использована эта линия как модельный объект для исследования патогенеза коронавирусной ин-

фекции SARS-CoV2. Тем не менее разработка новых моделей продолжается, поскольку источником поставки мышей линии SK18-hACE2 является Джексонская лаборатория (США), которая поставляет их только на эксперимент без права разведения их в национальных вивариях других стран.

Список литературы / References

- Bader M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch.* 2013;465(1):79-85. DOI 10.1007/s00424-012-1120-0.
- Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., Wei Q., Yu P., Xu Y., Qi F., Qu Y., Li F., Lv Q., Wang W., Xue J., Gong S., Liu M., Wang G., Wang S., Song Z., Zhao L., Liu P., Zhao L., Ye F., Wang H., Zhou W., Zhu N., Zhen W., Yu H., Zhang X., Guo L., Chen L., Wang C., Wang Y., Wang X., Xiao Y., Sun Q., Liu H., Zhu F., Ma C., Yan L., Yang M., Han J., Xu W., Tan W., Peng X., Jin Q., Wu G., Qin C. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020;583(7818):830-833. DOI 10.1038/s41586-020-2312-y.
- Belouzard S., Chu V.C., Whittaker G.R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(14):5871-5876. DOI 10.1073/pnas.0809524106.
- Bruter A.V., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Sergiev P.S., Kalinina A.A., Ilchuk K.A., Yuliya Yu., Silaeva Y.Y., Korshunov E.K., Soldatov V.O., Deykin A.V. Novel transgenic mice with Cre-dependent co-expression of GFP and human ACE2: a safe tool for study of COVID-19 pathogenesis. *Transgenic Res.* 2021;30(3):289-301. DOI 10.1007/s11248-021-00249-8.
- Dolskiy A.A., Gudymo A.S., Taranov O.S., Grishchenko I.V., Shitik E.M., Prokopov D.Y., Soldatov V.O., Sobolevskaya E.V., Bodnev S.A., Danilchenko N.V., Moiseeva A.A., Torzhkova P.Y., Bulanovich Y.A., Onhonova G.S., Ivleva E.K., Kubekina M.V., Belykh A.E., Tregubchak T.V., Ryzhikov A.B., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Deykin A.V., Yudkin D.V. The tissue distribution of SARS-CoV-2 in transgenic mice with inducible ubiquitous expression of hACE2. *Front. Mol. Biosci.* 2022;8:821506. DOI 10.3389/fmolb.2021.821506.
- Ge X.-Y., Li J.-L., Yang X.-L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., Mazet J.K., Hu B., Zhang W.L., Peng C., Zhang Y.-J., Luo C.-M., Tan B., Wang N., Zhu Y., Cramer G., Zhang S.-Y., Wang L.-F., Daszak P., Shi Z.-L. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 2013;503(7477):535-538. DOI 10.1038/nature12711.
- Glass W.G., Subbarao K., Murphy B., Murphy P.M. Mechanisms of host defense following severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) pulmonary infection of mice. *J. Immunol.* 2004;173(6):4030-4039. DOI 10.4049/jimmunol.173.6.4030.
- Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., Luo S.W., Li P.H., Zhang L.J., Guan Y.J., Butt K.M., Wong K.L., Chan K.W., Lim W., Shortridge K.F., Yuen K.Y., Peiris J.S., Poon L.L. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science.* 2003;302(5643):276-278. DOI 10.1126/science.1087139.
- Imai Y., Kuba K., Rao S., Huan Y., Guo F., Guan B., Yang P., Sarao R., Wada T., Leong-Poi H., Crackower M.A., Fukamizu A., Hui C.-C., Hein L., Uhlig S., Slutsky A.S., Jiang C., Penninger J.M. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* 2005;436(7047):112-116. DOI 10.1038/nature03712.
- Jiang R.-D., Liu M.-Q., Chen Y., Shan C., Zhou Y.-W., Shen X.-R., Li Q., Zhang L., Zhu Y., Si H.-R., Wang Q., Min J., Wang X., Zhang W., Li B., Zhang H.-J., Baric R.S., Zhou P., Yang X.-L., Shi Z.-L. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell.* 2020;182(1):50-58.e8. DOI 10.1016/j.cell.2020.05.027.
- Kuba K., Imai Y., Ohto-Nakanishi T., Penninger J.M. Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol. Ther.* 2010;128(1):119-128. DOI 10.1016/j.pharmthera.2010.06.003.
- Lai M.M.C., Perlman S., Anderson J. Coronaviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007;1305-1335.
- Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 2020;581(7807):215-220. DOI 10.1038/s41586-020-2180-5.
- Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor binding domain complexed with receptor. *Science.* 2005;309(5742):1864-1868. DOI 10.1126/science.1116480.
- Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., Ren R., Leung K.S.M., Lau E.H.Y., Wong J.Y., Xing X., Xiang N., Wu Y., Li C., Chen Q., Li D., Liu T., Zhao J., Liu M., Tu W., Chen C., Jin L., Yang R., Wang Q., Zhou S., Wang R., Liu H., Luo Y., Liu Y., Shao G., Li H., Tao Z., Yang Y., Deng Z., Liu B., Ma Z., Zhang Y., Shi G., Lam T.T.Y., Wu J.T., Gao G.F., Cowling B.J., Yang B., Leung G.M., Feng Z. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel Coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(13):1199-1207. DOI 10.1056/NEJMoa2001316.
- Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426(6965):450-454. DOI 10.1038/nature02145.
- Liu F.-L., Wu K., Sun J., Duan Z., Quan X., Kuang J., Chu S., Pang W., Gao H., Xu L., Li Y.-C., Zhang H.-L., Wang X.-H., Luo R.-H., Feng X.-L., Schöler H.R., Chen X., Pei D., Wu G., Zheng Y.-T., Chen J. Rapid generation of ACE2 humanized inbred mouse model for COVID-19 with tetraploid complementation. *Natl. Sci. Rev.* 2021;8(2):nwaa285. DOI 10.1093/nsr/nwaa285.
- Martina B.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., Van Amerongen G., Peiris J.S.M., Lim W., Osterhaus A.D.M.E. Virology: SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature.* 2003;425(6961):915. DOI 10.1038/425915a.
- McCray P.B. Jr., Pewe L., Wohlford-Lenane C., Hickey M., Manzel L., Shi L., Netland J., Jia H.P., Halabi C., Sigmund C.D., Meyerholz D.K., Kirby P., Look D.C., Perlman S. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2007;81(2):813-821. DOI 10.1128/JVI.02012-06.
- Menachery V.D., Yount B.L. Jr., Sims A.C., Debbink K., Agnihothram S.S., Gralinski L.E., Graham R.L., Scobey T., Plante J.A., Royal S.R., Swanstrom J., Sheahan T.P., Pickles R.J., Corti D., Randell S.H., Lanzavecchia A., Marasco W.A., Baric R.S. ARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113(11):3048-3053. DOI 10.1073/pnas.1517719113.
- Netland J., Meyerholz D.K., Moore S., Cassell M., Perlman S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J. Virol.* 2008;82(15):7264-7275. DOI 10.1128/JVI.00737-08.
- Ostrowski L.E., Hutchins J.R., Zakel K., O'Neal W.K. Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Mol. Ther.* 2003;8(4):637-645. DOI 10.1016/S1525-0016(03)00221-1.
- Peiris J.S., Lai S.T., Poon L.L., Guan Y., Yam L.Y.C., Lim W., Nicholls J., Yee W.K.S., Yan W.W., Cheung M.T., Cheng V.C.C., Chan K.H., Tsang D.N.C., Yung R.W.H., Ng T.K., Yuen K.Y., SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003;361(9366):1319-1325. DOI 10.1016/S0140-6736(03)13077-2.
- Reusken C.B., Haagmans B.L., Müller M.A., Gutierrez C., Godeke G.J., Meyer B., Muth D., Raj V.S., Smits-De Vries L., Corman V.M., Drexler J.-F., Smits S.L., El Tahir Y.E., De Sousa R., van Beek J., Nowotny N., van Maanen K., Hidalgo-Hermoso E., Bosch B.-J.,

- Rottier P., Osterhaus A., Gortázar-Schmidt C., Drosten C., Koopmans M.P. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet. Infect. Dis.* 2013;13(10):859-866. DOI 10.1016/S1473-3099(13)70164-6.
- Roberts A., Vogel L., Guarner J., Hayes N., Murphy B., Zaki S., Subbarao K. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters. *J. Virol.* 2005;79(1):503-511. DOI 10.1128/JVI.79.1.503-511.2005.
- Smirnov A., Fishman V., Yunusova A., Korablev A., Serova I., Skryabin B.V., Rozhdestvensky T.S., Battulin N. DNA barcoding reveals that injected transgenes are predominantly processed by homologous recombination in mouse zygote. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(2):719-735. DOI 10.1093/nar/gkz1085.
- Subbarao K., Roberts A. Is there an ideal animal model for SARS? *Trends Microbiol.* 2006;14(7):299-303. DOI 10.1016/j.tim.2006.05.007.
- Sun S.-H., Chen Q., Gu H.-J., Yang G., Wang Y.-X., Huang X.-Y., Liu S.-S., Zhang N.-N., Li X.-F., Xiong R., Guo Y., Deng Y.-Q., Huang W.-J., Liu Q., Liu Q.-M., Shen Y.-L., Zhou Y., Yang X., Zhao T.-Y., Fan C.-F., Zhou Y.-S., Qin C.-F., Wang Y.-C. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020;28(1):124-133.e4. DOI 10.1016/j.chom.2020.05.020.
- Takaki H., Oshiumi H., Shingai M., Matsumoto M., Seya T. Development of mouse models for analysis of human virus infections. *Microbiol. Immunol.* 2017;61(3-4):107-113. DOI 10.1111/1348-0421.12477.
- Tseng C.T., Huang C., Newman P., Wang N., Narayanan K., Watts D.M., Makino S., Packard M.M., Zaki S.R., Chan T.-S., Peters C.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *J. Virol.* 2007;81(3):1162-1173. DOI 10.1128/JVI.01702-06.
- van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio.* 2012;3(6):e00473-12. DOI 10.1128/mBio.00473-12.
- Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020;94(7):e00127-20. DOI 10.1128/jvi.00127-20.
- Wang Q., Zhang Y., Wu L., Niu S., Song C., Zhang Z., Lu G., Qiao C., Hu Y., Yuen K.-Y., Wang Q., Zhou H., Yan J., Qi J. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell.* 2020;181(4):894-904. DOI 10.1016/j.cell.2020.03.045.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Huang Y., Yuen K.-Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2009a;234(10):1117-1127. DOI 10.3181/0903-MR-94.
- Woo P.C., Lau S.K., Lam C.S., Lai K.K., Huang Y., Lee P., Luk G.S., Dyrting K.C., Chan K.H., Yuen K.Y. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J. Virol.* 2009b;83(2):908-917. DOI 10.1128/JVI.01977-08.
- Yang X.H., Deng W., Tong Z., Liu Y.X., Zhang L.F., Zhu H., Gao H., Huang L., Liu Y.L., Ma C.M., Xu Y.F., Ding M.X., Deng H.K., Qin C. Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection. *Comp. Med.* 2007;57(5):450-459. PMID: 17974127.
- Yinda C.K., Port J.R., Bushmaker T., Owusu I.O., Avanzato V.A., Fischer R.J., Schulz J.E., Holbrook M.G., Hebner M.J., Rosenke R., Thomas T., Marzi A., Best S.M., de Wit E., Shaia C., van Doremalen N., Munster V.J. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. *bioRxiv.* 2020;Aug 11; 2020.08.11.246314. DOI 10.1101/2020.08.11.246314.
- Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 2012;367(19):1814-1820. DOI 10.1056/NEJMoa1211721.
- Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395(10229):1054-1062. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
- Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y., Li B., Huang C.-L., Chen H.-D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.-D., Liu M.-Q., Chen Y., Shen X.-R., Wang X., Zheng X.-S., Zhao K., Chen Q.-J., Deng F., Liu L.-L., Yan B., Zhan F.-X., Wang Y.-Y., Xiao G.-F., Shi Z.-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-273. DOI 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(8):727-733. DOI 10.1056/NEJMoa2001017.

ORCID ID

O.L. Serov orcid.org/0000-0003-1056-2966

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60094. Доступ к полнотекстовым версиям публикаций осуществлялся при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0019.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.02.2022. После доработки 25.03.2022. Принята к публикации 25.03.2022.

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 22.06.2022. Выход в свет 30.06.2022. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 8.37.

Уч.-изд. л. 9.5. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–42 экз.) Заказ № 224. Цена свободная.

Отпечатано в Сибирском отделении РАН, Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

