

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJ21.027

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционный совет

Л.И. Афтanas – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
В.С. Баранов – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук (Россия)
Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)
А. Бёрнер – д-р наук (Германия)
М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)
Г.Л. Дианов – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Ю.Е. Дуброва – д-р биол. наук, проф. (Великобритания)
Н.Н. Дыгало – чл.-кор. РАН, 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)
И.Е. Керкис – д-р наук (Бразилия)
А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Кочетов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)
Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)
В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)
В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)
А.Ю. Ржецкий – канд. биол. наук, проф. (США)
И.Б. Rogozin – канд. биол. наук (США)
А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)
Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)
К.В. Славин – д-р наук, проф. (США)
В.А. Степанов – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)
И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, профессор (Россия)
Л.В. Хотылева – академик НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)
Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
М.Ф. Чернов – д-р мед. наук (Япония)
С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)
Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Т.Г. Амстиславская – д-р биол. наук (Россия)
Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)
Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)
Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)
Е.В. Березиков – канд. биол. наук, проф. (Нидерланды)
Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)
С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)
П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)
В.Н. Даниленко – д-р биол. наук, проф. (Россия)
С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)
Е.А. Долгих – д-р биол. наук (Россия)
Ю.М. Константинов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
О. Кребс – д-р биол. наук, проф. (Германия)
И.Н. Лаврик – канд. хим. наук (Германия)
Д. Ларкин – д-р биол. наук (Великобритания)
И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)
В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)
М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Л.Ю. Новикова – канд. техн. наук (Россия)
Е. Песцова – д-р биол. наук (Германия)
Н.А. Проворов – д-р биол. наук, проф. (Россия)
Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)
А.В. Ратушный – канд. биол. наук (США)
М.Г. Самсонова – д-р биол. наук (Россия)
Е. Турусбеков – канд. биол. наук (Казахстан)
М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)
Ю. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

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/VJ21.027

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*V.K. Shumny*, 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**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial council**

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
V.S. Baranov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
L.A. Beshpalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agric.), Russia
A. Börner, Dr. Sci., Germany
M.F. Chernov, Dr. Sci. (Medicine), Japan
G.L. Dianov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
Yu.E. Dubrova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
N.N. Dygalo, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
J. Le Gouis, Dr. Sci., France
I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany
S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.E. Kerkis, Dr. Sci., Brazil
E.K. Khlestkina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.V. Khotyleva, Full Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology), Belarus
A.V. Kochetov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands
V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia
V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States
A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia
A.Yu. Rzhetsky, Professor, Cand. Sci. (Biology), United States
E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
K.V. Slavin, Professor, Dr. Sci., United States
V.A. Stepanov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia
N.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia
T.G. Amstislavskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia
Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.V. Berezikov, Professor, Cand. Sci. (Biology), Netherlands
N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia
S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia
P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China
V.N. Danilenko, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia
E.A. Dolgikh, Dr. Sci. (Biology), Russia
T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia
Yu.M. Konstantinov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
O. Krebs, Professor, Dr. Sci. (Biology), Germany
D. Larkin, Dr. Sci. (Biology), Great Britain
I.N. Lavrik, Cand. Sci. (Chemistry), Germany
I.N. Lebedev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.), Russia
M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
E. Pestsova, Dr. Sci. (Biology), Germany
L.Yu. Novikova, Cand. Sci. (Engineering), Russia
N.A. Provorov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia
D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia
A.V. Ratushny, Cand. Sci. (Biology), United States
M.G. Samsonova, Dr. Sci. (Biology), Russia
Y. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia
E. Turuspekov, Cand. Sci. (Biology), Kazakhstan

Молекулярная генетика и таксономия растений

- 251 **ОБЗОР**
Рибосомное профилирование как инструмент исследования трансляции у растений: основные итоги, проблемы и перспективы. Д.А. Афонников, О.И. Сеницына, Т.С. Голубева, Н.А. Шмаков, А.В. Кочетов

- 260 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Внутривидовое разнообразие твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): унифицированная классификация. О.А. Ляпунова

Селекция растений на иммунитет и продуктивность

- 269 **ОБЗОР**
Вироид веретеновидности клубней картофеля. А.В. Кочетов, А.Ю. Пронозин, Н.В. Шацкая, Д.А. Афонников, О.С. Афанасенко

- 276 **ОБЗОР**
Методические подходы создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). Т.Р. Григолова, А.В. Вишнякова, А.А. Сеницына, А.В. Воронина, О.Н. Зубко, О.В. Зудова, С.Г. Монахов

Генетика животных

- 284 **ОБЗОР**
Проблемы селекции лабораторных мини-свиней. К.С. Шатохин

- 292 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Недостаток белка GAGA у мутантов *Trl* вызывает массовую клеточную гибель в спермато- и оогенезе дрозофилы. Н.В. Дорогова, А.Е. Зубкова, Е.В. Федорова, Е.У. Болоболова, Е.М. Баричева

Генетика человека

- 301 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Полиморфизм генов, ассоциированных с инфекционными заболеваниями легких, в популяциях Северной Азии и среди пациентов с внебольничными пневмониями. С.В. Михайлова, Л.В. Щербакова, Н.И. Логвиненко, И.И. Логвиненко, М.И. Воевода (на англ. языке)

Системная и компьютерная биология

- 310 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Экспрессия белков-регуляторов апоптоза Bcl-2 и Bad в клетках печени мышей C57Bl/6 в условиях светоиндуцированной функциональной эпиפיэктомии и после коррекции мелатонином. С.В. Мичурина, И.Ю. Ищенко, С.А. Архипов, А.Ю. Летягин, М.А. Королев, Е.Л. Завьялов (на англ. языке)

- 318 **ОБЗОР**
Технологии поиска и исследования потенциально осциллирующих ферментативных систем. Т.Н. Лахова, Ф.В. Казанцев, С.А. Лашин, Ю.Г. Матушкин

Актуальные технологии

- 331 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Гипоморфная мутация гена *Csn1s1* мышцы, полученная пронуклеарной микроинъекцией CRISPR/Cas9. А.В. Смирнов, Т.А. Шнайдер, А.Н. Кораблев, А.М. Юнусова, И.А. Серова, Н.Р. Баттулин (на англ. языке)

- 337 **ОБЗОР**
Новые генетические технологии защиты растений от паразитических нематод. А.В. Кочетов, Т.А. Гавриленко, О.С. Афанасенко

- 344 **ОБЗОР**
Методы высокопроизводительного репортерного анализа энхансеров. С.Е. Романов, Д.А. Калашникова, П.П. Лактионов

Molecular genetics and plant taxonomy

- 251 **REVIEW**
Ribosomal profiling as a tool for studying translation in plants: main results, problems and future prospects. *D.A. Afonnikov, O.I. Sinitsyna, T.S. Golubeva, N.A. Shmakov, A.V. Kochetov*
- 260 **ORIGINAL ARTICLE**
Intraspecific diversity of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): a unified classification. *O.A. Lyapunova*

Plant breeding for immunity and performance

- 269 **REVIEW**
Potato spindle tuber viroid. *A.V. Kochetov, A.Y. Pronozin, N.V. Shatskaya, D.A. Afonnikov, O.S. Afanasenko*
- 276 **REVIEW**
Methodological approaches for producing doubled haploids in sugar beet and red beet (*Beta vulgaris* L.). *T.R. Grigolava, A.V. Vishnyakova, A.A. Sinitsyna, A.V. Voronina, O.N. Zubko, O.V. Zudova, S.G. Monakhos*

Animal genetics

- 284 **REVIEW**
Problems of mini-pig breeding. *K.S. Shatokhin*
- 292 **ORIGINAL ARTICLE**
Lack of GAGA protein in *Trl* mutants causes massive cell death in *Drosophila* spermatogenesis and oogenesis. *N.V. Dorogova, A.E. Zubkova, E.V. Fedorova, E.U. Bolobolova, E.M. Baricheva*

Human genetics

- 301 **ORIGINAL ARTICLE**
Polymorphism of genes associated with infectious lung diseases in Northern Asian populations and in patients with community-acquired pneumonia. *S.V. Mikhailova, L.V. Shcherbakova, N.I. Logvinenko, I.I. Logvinenko, M.I. Voevoda*

Systems and computational biology

- 310 **ORIGINAL ARTICLE**
The expression of apoptosis-regulating proteins Bcl-2 and Bad in liver cells of C57Bl/6 mice under light-induced functional pinealectomy and after correction with melatonin. *S.V. Michurina, I.Yu. Ishchenko, S.A. Arkhipov, A.Yu. Letyagin, M.A. Korolev, E.L. Zavjalov*
- 318 **REVIEW**
The finding and researching algorithm for potentially oscillating enzymatic systems. *T.N. Lakhova, F.V. Kazantsev, S.A. Lashin, Yu.G. Matushkin*

Mainstream technologies

- 331 **ORIGINAL ARTICLE**
A hypomorphic mutation in the mouse *Csn1s1* gene generated by CRISPR/Cas9 pronuclear microinjection. *A.V. Smirnov, T.A. Shnaider, A.N. Korablev, A.M. Yunusova, I.A. Serova, N.R. Battulin*
- 337 **REVIEW**
New genetic tools for plant defense against parasitic nematodes. *A.V. Kochetov, T.A. Gavrilenko, O.S. Afanasenko*
- 344 **REVIEW**
Methods of massive parallel reporter assays for investigation of enhancers. *S.E. Romanov, D.A. Kalashnikova, P.P. Laktionov*

Рибосомное профилирование как инструмент исследования трансляции у растений: основные итоги, проблемы и перспективы

Д.А. Афонников^{1,2}✉, О.И. Сеницына^{1,2}, Т.С. Голубева^{1,2}, Н.А. Шмаков^{1,2}, А.В. Кочетов^{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

✉ ada@bionet.nsc.ru

Аннотация. Экспрессию эукариотических генов можно регулировать на нескольких этапах, включая трансляцию мРНК. Известно, что структура мРНК способна влиять как на эффективность взаимодействия с аппаратом трансляции в целом, так и на выбор сайтов инициации трансляции. Для исследования транслируемой фракции транскриптома были разработаны экспериментальные методы анализа, наиболее информативным из которых является рибосомное профилирование (РП, Ribo-seq). Первоначально созданный для использования в дрожжевых системах, этот метод был адаптирован для трансляционных исследований на многих видах растений. Технология включает выделение полисомной фракции и высокопроизводительное секвенирование пула сегментов мРНК, связанных с рибосомами. Сравнение результатов покрытия транскриптома прочтениями, полученными по протоколу рибосомного профилирования, с аналогичными результатами по секвенированию транскриптома дает возможность оценить эффективность трансляции для каждого транскрипта. Точные положения рибосом, определенные на последовательностях мРНК, позволяют определять трансляцию открытых рамок считывания и переключение между трансляцией нескольких рамок считывания – феномен, при котором с одной матрицы РНК происходят считывание двух или более перекрывающихся рамок и биосинтез разных белков. Преимущество метода заключается в том, что он дает возможность получить количественные оценки покрытия рибосомами мРНК и может выявлять относительно редкие события трансляции. Использование этой технологии позволило классифицировать гены растений по типу регуляции их экспрессии на уровне транскрипции, трансляции или на обоих уровнях. Обнаружены особенности структуры мРНК, которые влияют на уровни трансляции: формирование квадруплексов G2 и наличие специфических мотивов в области 5'-UTR, GC-состав, наличие альтернативных стартов трансляции, влияние uORF на трансляцию нижестоящих mORF. Показано, что изменения регуляции экспрессии генов на уровне трансляции возникают в ответ на биотический и абиотический стрессы, а также в процессе развития растений. В обзоре кратко рассмотрены методология РП и перспективы ее применения для исследования структурно-функциональной организации и регуляции экспрессии генов растений. Ключевые слова: рибосомное профилирование; Ribo-seq; RNA-seq; трансляция; растения; абиотический стресс; биотический стресс.

Для цитирования: Афонников Д.А., Сеницына О.И., Голубева Т.С., Шмаков Н.А., Кочетов А.В. Рибосомное профилирование как инструмент исследования трансляции у растений: основные итоги, проблемы и перспективы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):251-259. DOI 10.18699/VJ21.028

Ribosomal profiling as a tool for studying translation in plants: main results, problems and future prospects

D.A. Afonnikov^{1,2}✉, O.I. Sinitsyna^{1,2}, T.S. Golubeva^{1,2}, N.A. Shmakov^{1,2}, A.V. Kochetov^{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

✉ ada@bionet.nsc.ru

Abstract. The expression of eukaryotic genes can be regulated at several stages, including the translation of mRNA. It is known that the structure of mRNA can affect both the efficiency of interaction with the translation apparatus in general and the choice of translation initiation sites. To study the translated fraction of the transcriptome, experimental methods of analysis were developed, the most informative of which is ribosomal profiling (RP, Ribo-seq). Originally developed for use in yeast systems, this method has been adapted for research in translation mechanisms in many plant species. This technology includes the isolation of the polysomal fraction and high-performance sequencing of a pool of mRNA fragments associated with ribosomes. Comparing the results of transcript coverage with reads obtained using the ribosome profiling with the transcriptional efficiency of genes allows the translation efficiency to be evaluated for each transcript. The exact positions of ribosomes determined on mRNA sequences allow determining the translation of open reading frames and switching between the translation of several reading frames – a pheno-

menon in which two or more overlapping frames are read from one mRNA and different proteins are synthesized. The advantage of this method is that it provides quantitative estimates of ribosome coverage of mRNA and can detect relatively rare translation events. Using this technology, it was possible to identify and classify plant genes by the type of regulation of their expression at the transcription, translation, or both levels. Features of the mRNA structure that affect translation levels have been revealed: the formation of G2 quadruplexes and the presence of specific motifs in the 5'-UTR region, GC content, the presence of alternative translation starts, and the influence of uORFs on the translation of downstream mORFs. In this review, we briefly reviewed the RP methodology and the prospects for its application to study the structural and functional organization and regulation of plant gene expression.

Key words: ribosome profiling; Ribo-seq; RNA-seq; translation; plants; abiotic stress; biotic stress.

For citation: Afonnikov D.A., Sinitsyna O.I., Golubeva T.S., Shmakov N.A., Kochetov A.V. Ribosomal profiling as a tool for studying translation in plants: main results, problems and future prospects. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):251-259. DOI 10.18699/VJ21.028 (in Russian)

Введение

Разработка и использование современных масштабных и высокопроизводительных геномных технологий привели к радикальному изменению инструментария проведения молекулярно-биологических экспериментов за последние несколько десятилетий. Так, исследование транскриптомного профиля в масштабах генома (RNA-seq) использовано для идентификации генов, экспрессия которых изменяется в ответ на сигналы окружающей среды и развития у большинства, если не у всех, сельскохозяйственных растений, а также у патогенных микробов (Kazan, Gardiner, 2018; Lanver et al., 2018; Baek et al., 2019; Zumaquero et al., 2019; Kang et al., 2020). Такие исследования обычно выявляют тысячи генов, которые при определенных условиях экспрессируются по-разному. Группировка дифференциально экспрессирующихся генов по ключевым функциональным категориям или онтологиям генов (GO) обеспечивает идентификацию главных клеточных процессов, лежащих в основе развития растений и их ответа на стресс. Однако становится все более очевидным, что мРНК разных генов не одинаковы по эффективности и специфичности трансляции и связь между количеством транскрипта и количеством синтезируемого с него белка может носить сложный характер, поскольку на экспрессию продукта гена оказывает влияние множество факторов, существенная доля которых связана с процессами трансляции мРНК (Lei et al., 2015; Merchante et al., 2015). Таким образом, хотя анализ транскриптома представляет собой необходимый этап при изучении паттернов экспрессии генов и механизмов генетического контроля различных процессов, он не является достаточным. Поэтому первостепенное значение для понимания того, какие продукты гена и в каком количестве образуются в результате его экспрессии, имеет исследование других процессов, включающих стабильность мРНК, особенности ее трансляции, стабильность полипептида, возможность посттрансляционных модификаций и т. д.

Для экспериментального изучения этого процесса в последние годы было разработано несколько высокопроизводительных подходов, например профилирование рибосом или рибо-секвенирование (далее РП, в литературе – Ribo-seq). Они дают возможность в масштабе всего транскриптома определять различные особенности процесса трансляции и оценивать их интенсивность на количественном уровне. В этой статье мы привели краткий обзор технологии РП, несколько примеров применения

метода для исследования генов растений, которые позволили расширить представления о процессах, влияющих на развитие растений, а также на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам.

Рибосомное профилирование как инструмент исследования трансляции

Точный мониторинг процесса трансляции был технически невозможен до тех пор, когда о методологии Ribo-seq впервые сообщили в 2009 г. (Ingolia et al., 2009). Этот метод позволяет получить «отпечаток» всех транслируемых мРНК (транслатом) с помощью транскриптомной идентификации коротких (~30 нт) фрагментов мРНК, физически связанных с рибосомами (см. рисунок, а). Метод достаточно прост и основан на выделении полисом (т. е. транслируемой фракции мРНК), обработке РНКазой 80S рибосом с находящимся внутри сегментом мРНК, выделении пула этих сегментов и их секвенировании. Далее биоинформатический анализ позволяет определить количество таких сегментов для различных мРНК в транскриптоме, что дает важную информацию об эффективности трансляции матриц – если таких сегментов мало, то уровень синтеза белка будет низким даже при большом количестве мРНК. Не менее важно то, что позиционирование защищенных рибосомами сегментов при их выравнивании на нуклеотидную последовательность мРНК дает возможность определить сайты инициации трансляции, т. е. транслируемые открытые рамки считывания.

Первоначально разработанный для использования в дрожжевых системах (Ingolia et al., 2009), этот метод был адаптирован для трансляционных исследований на многих видах растений (Liu et al., 2013; Zoschke et al., 2013; Juntawong et al., 2014; Lei et al., 2015; Merchante et al., 2015; Hsu et al., 2016; Lukoszek et al., 2016). Протоколы Ribo-seq также были расширены для изучения процессов функционирования хлоропластных (Zoschke et al., 2013; Gawroński et al., 2018) и митохондриальных (Rooijers et al., 2013) рибосом.

В методе рибосомального профилирования ткани растений экстрагируют в буфере и обрабатывают РНКазой I. При гидролитическом расщеплении одноцепочечной мРНК остаются ее фрагменты, связанные с рибосомами. Фрагменты мРНК с рибосомами далее выделяют с помощью хроматографии или методом центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы («сахарозная подушка»). Получается набор олигонуклеотидов характерной длины,

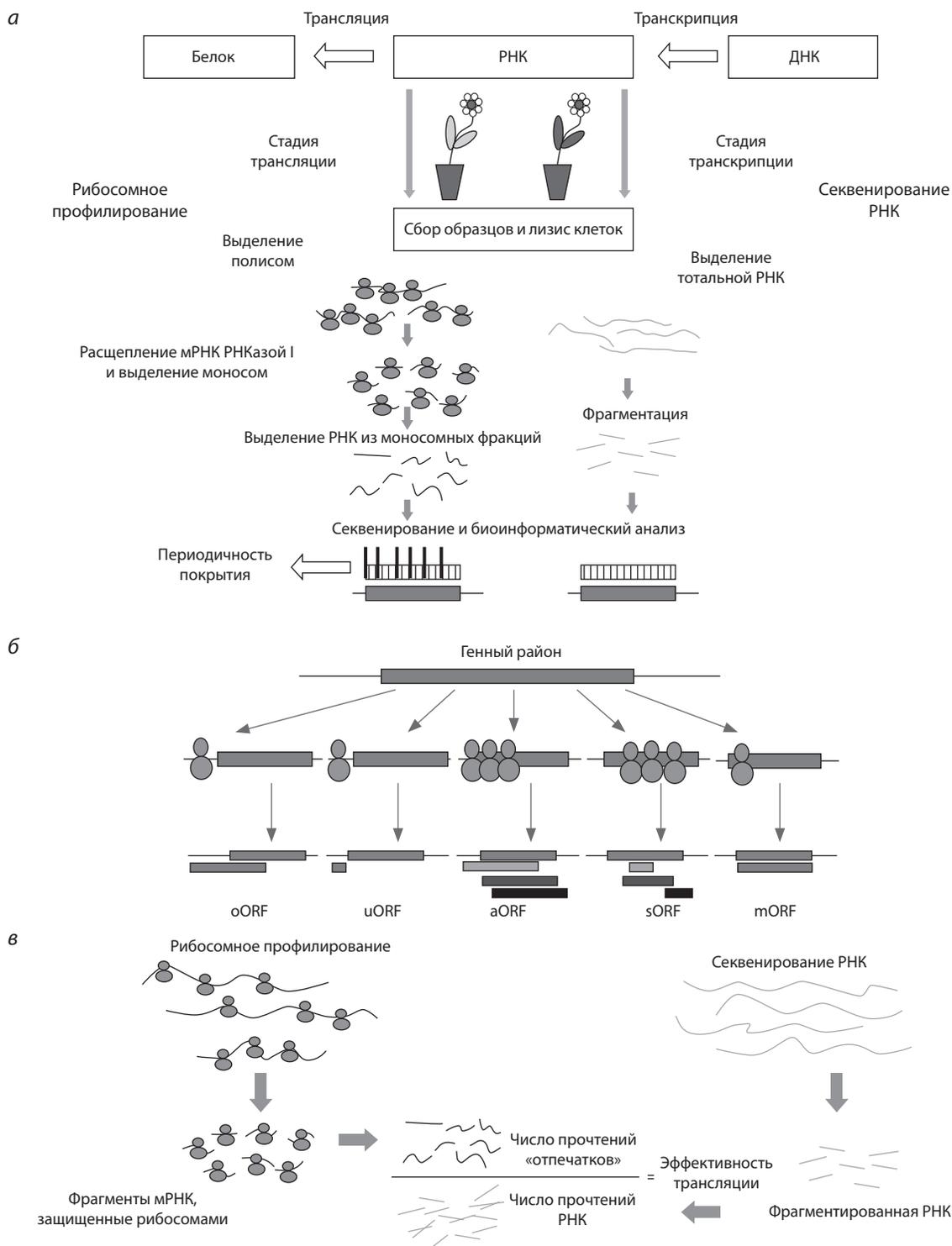


Схема технологии рибосомного профилирования у растений.

а – исследуемую ткань растения гомогенизируют, клетки лизируют, образцы разделяют на две части. Из первой части образца экстрагируют полисомную фракцию, РНК в ней расщепляют с помощью РНКазы I с образованием фрагментов мРНК, связанных с отдельными рибосомами (моносомами), для дальнейшей обработки методом отпечатка рибосомы («рибосомный футпринт»). РНК выделяют из моносомных фракций и используют для подготовки библиотеки и последующего секвенирования с высоким покрытием фрагментов мРНК, связанных с рибосомой, для определения моментального уровня синтеза белка. Другую часть образца используют для выделения общей РНК для получения транскрипционного профиля параллельно с рибосомным профилированием; **б** – рибосомное профилирование обеспечивает экспериментальное определение активно транслируемых областей транскриптов и идентификацию новых транслируемых ORF (open reading frame, открытые рамки считывания), таких как uORF (upstream ORFs, вышерасположенные ORF), oORF (overlapping ORFs, перекрывающиеся ORF), aORF (alternative ORFs, альтернативные ORF), sORF (small ORFs, малые ORF), в дополнение к mORFs (main ORFs, основные ORF); **в** – данные рибосомного профилирования не только предоставляют информацию о моментальном уровне синтеза белка, но также позволяют определить относительную эффективность трансляции отдельных генов путем сравнения плотности прочтения при секвенировании фрагментов мРНК «рибосомного футпринта» с количеством конкретных транскриптов.

~30 нт, которая приблизительно соответствует размеру сайта посадки рибосомы. Последовательности произведенных таким образом олигонуклеотидов определяют на секвенаторах нового поколения с высоким покрытием.

При сравнении результатов покрытия транскриптома прочтениями, полученными по протоколу рибосомного профилирования, с аналогичными данными, полученными для секвенирования транскриптома, можно оценить эффективность трансляции для каждого транскрипта. Такой анализ в масштабе всего транскриптома позволяет установить, как трансляция отдельных транскриптов соотносится между образцами. В основе этого метода лежит предположение, что все мРНК, связанные с рибосомой, подвергаются трансляции и, если скорость удлинения эквивалентна по всему транслату, то средняя занятость рибосом является хорошим показателем скорости трансляции.

Рибосомное профилирование имеет много преимуществ перед некоторыми другими методами профилирования трансляции (Jackson, Standart, 2015). Одно из них заключается в том, что локализация рибосом вдоль последовательности мРНК позволяет производить дополнительный контроль собранных данных. Например, участки, связанные с рибосомами, должны быть сконцентрированы в кодирующей части мРНК, отсутствовать в области 3'-UTR и располагаться с периодичностью трех нуклеотидов, как следствие, кодонной структуры мРНК. Если в результате покрытия прочтениями библиотек Ribo-seq транскриптома такие особенности отсутствуют, то это может свидетельствовать о низком качестве полученных библиотек.

Возможность получить расположение пиков покрытия рибосомами последовательностей мРНК на основе выравнивания прочтений Ribo-seq с разрешением на уровне кодонов сделала этот метод полезным для изучения механизмов и динамики трансляции. Точные положения рибосом, определенные на последовательностях мРНК, отображают периодичность кодонов. Это свойство позволяет точно определять трансляцию открытых рамок считывания (ORF) и переключение между трансляцией нескольких рамок считывания – феномен, при котором с одной матрицы РНК происходят считывание двух или более перекрывающихся ORF и биосинтез разных белков. Это, в свою очередь, помогает идентифицировать новые механизмы контроля трансляции, такие как события инициации трансляции в кодонах, отличных от кодона AUG, трансляции uORF, трансляции малых (sORF) и альтернативных ORF (aORF), которые ранее считались некодирующими или псевдогенами (Ingolia et al., 2009, 2011; Brar et al., 2012; Stern-Ginossar et al., 2012; Hsu et al., 2016).

Другие примеры полезного использования точного позиционирования рибосом на мРНК – картирование сайтов начала трансляции с ингибиторами элонгации, наличие вышележащих открытых рамок считывания (uORF) и неканонических стартовых кодонов (Ingolia et al., 2011), более точное определение механизмов сканирования и инициации путем картирования малых рибосомных субъединиц 40S (Archer et al., 2016), а также действие специфических стрессоров или динамика рибосом после терминации (Andreev et al., 2017).

Дополнительная особенность метода – он позволяет получить количественные оценки покрытия рибосомами мРНК и может определять относительно редкие события трансляции (см. рисунок, б). Среднее нормализованное (для длины ORF и глубины секвенирования) количество защищенных фрагментов рибосом (ribosome protected fragments, RPF), обнаруженное с помощью профилирования, обеспечивает оценку интенсивности синтеза белка (Ingolia et al., 2009). Кроме того, профилирование рибосом в сочетании с секвенированием РНК тех же образцов дает информацию об эффективности трансляции *in vivo* (см. рисунок, в), определяемой как скорость трансляции мРНК. Ее можно рассчитать, разделив среднюю плотность участков рибосомы данного гена на уровень экспрессии его мРНК, оцененный на основе анализа RNA-seq (Ingolia et al., 2009).

Важной особенностью рибосомного профилирования также является то, что этот метод может быть адаптирован для изучения самых разных типов клеток или тканей любых организмов с очень небольшими модификациями из-за консервативности молекулярных и биофизических свойств рибосом, хотя для применения этой технологии у различных организмов может потребоваться техническая оптимизация (Brar, Weissman, 2015).

Основные итоги применения технологии рибосомного профилирования у растений

Экспрессию генов во время адаптации к биотическим и абиотическим факторам стресса, а также в процессе развития интенсивно изучали на уровне транскриптомом растений и различных генов-кандидатов, которыми можно манипулировать для повышения устойчивости к стрессу. С появлением технологий рибосомного профилирования эти данные могут быть сопоставлены с результатами анализа профилей трансляции для оценки вклада различных молекулярных механизмов трансляции в регуляцию экспрессии генов.

Трансляционная регуляция экспрессии генов в условиях абиотического стресса

Абиотический стресс, такой как повышенные или пониженные температуры, или повышенная или пониженная интенсивность освещения, засуха, засоление или избыточное увлажнение почвы, оказывает значительное влияние на физиологическое состояние растений и, следовательно, на экспрессию их генов. Поэтому среди первых приложений метода РП были эксперименты по анализу реакции растений на абиотические стрессы. Метод РП был особенно полезен для понимания потенциальной роли, которую играют uORF в регуляции трансляции во время быстрых реакций на внешние стимулы, такие как кислородное голодание (гипоксия), тепловой стресс и водная депривация.

Ранее предполагалось, что uORF участвуют в регуляции генов в ответ на различные изменения окружающей среды (Hanfrey et al., 2002; Imai et al., 2006; Alatorre-Cobos et al., 2012). Однако из-за отсутствия экспериментальных данных оставалось неясным, транслируются ли uORF в белки. Профилирование рибосом позволяет идентифицировать uORF и другие регуляторные области, такие как

квадруплексы G2 (третичные структуры ДНК, состоящие из тетрад гуанина). Анализ адаптивных ответов на тепловой стресс у *Arabidopsis thaliana* с помощью метода РП в сочетании с секвенированием РНК выявил, что экспрессия генов перепрограммируется во время длительного теплового стресса за счет преимущественной трансляции генов, содержащих квадруплексы G2 в их 5'-UTR. Это было очевидно из корреляции между плотностью считывания RPF по структурам квадруплексов G2 и повышенными уровнями экспрессии нижележащих основных ORF (mORF) (Lukoszek et al., 2016).

Показано, что гипоксия оказывает крайне негативное влияние на эффективность трансляции у *A. thaliana* с примерно 100-кратным ее снижением для некоторых мРНК (Juntawong et al., 2014). Это в основном объясняется снижением инициации трансляции из-за уменьшения занятости рибосом в стартовых кодонах транскриптов генов, не чувствительных к гипоксии (Juntawong et al., 2014). Эти данные расширили понимание механизмов трансляции, подтвердив, что в нормальных условиях роста uORF снижают трансляцию многих mORF. Напротив, для небольшого числа проанализированных генов uORF не влияют на трансляцию mORF в условиях низкого содержания кислорода. P. Juntawong с коллегами (2014) установили, что «отпечатки рибосом» на мРНК после ее расщепления нуклеазой можно использовать для профилирования рибосом у растений.

Ограничение количества влаги также приводит к глобальному изменению уровней экспрессии генов, регулируемых как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне. L. Lei с коллегами (2015) использовали профилирование рибосом для выяснения регуляции трансляции экспрессии генов в ответ на засуху у кукурузы. Они установили, что кратные изменения транскрипции, вызванные засухой, умеренно коррелировали с трансляционными изменениями. В их работе показано, что 41 % всех генов, чувствительных к засухе (т.е. генов, экспрессия которых регулируется на уровне транскрипции, трансляции или на обоих уровнях), регулируется на уровне транскрипции/трансляции несогласованно. Это указывает на то, что в условиях засухи регуляция экспрессии происходит независимыми путями: для одних – на уровне транскрипции, для других – на уровне трансляции. Авторы также сообщили, что на эффективность трансляции влияют такие характеристики последовательности, как содержание нуклеотидов G, C, длина кодирующих последовательностей и нормализованная минимальная свободная энергия, определяющая стабильность последовательности вторичных структур (Lei et al., 2015).

Один из ключевых гормонов стрессового ответа растений – этилен. Путь передачи его сигналов пересекается с путями передачи сигналов других фитогормонов в процессе опосредованного ответа как на биотические (Schenk et al., 2000), так и на абиотические стрессы (Abeles et al., 2012). Исследование, в котором проведено сравнение этилен-индуцированных состояний транскриптома и транслятома у *A. thaliana* с использованием комбинированных подходов РНК-seq и Ribo-seq, показало, что зависимость между оценками количества транскриптов и количества их фрагментов, связанных с рибосомами, является сла-

бой (коэффициент детерминации $R^2 = 0.22$) (Merchant et al., 2015). В этой работе также продемонстрировано, что после воздействия этилена изменяются активация транскрипции и эффективность трансляции регуляторов передачи сигналов этилена, таких как EBF1 и EBF2, что указывает на ключевую роль транскрипционной и трансляционной регуляции экспрессии генов ответа на этилен. Изменение эффективности трансляции EBF1 в ответ на обработку этиленом опосредуется 3'-UTR-областью гена *EBF1* в присутствии функционального *EIN2*, что не требует присутствия комплекса EIN3/EIL1 или других ключевых транскрипционных факторов ответа на этилен, как при регуляции на уровне транскрипции (Merchant et al., 2015). В данном случае профилирование рибосом выявило ключевой компонент в регуляции передачи сигналов этилена, который был упущен из виду при использовании только транскриптомных подходов.

Трансляционная регуляция экспрессии генов в условиях биотического стресса

В процессе ответа растений на биотический стресс происходит транскрипционное репрограммирование большого количества генов (Schenk et al., 2000). Однако о трансляционном репрограммировании во время иммунного ответа растений было известно очень мало. G. Xu с коллегами (2017) выполнили глобальное рибосомное профилирование растений *A. thaliana*, обработанных полипептидом elf18, который содержит первые 18 аминокислот белка бактериального фактора элонгации Tu. Пептид elf18 – молекулярный паттерн, ассоциированный с патогенами (pathogen associated molecular pattern, PAMP), он идентифицируется при помощи паттерн-распознающих рецепторов растений. В результате этого запускается PAMP-активируемый иммунитет (pattern triggered immunity, PTI). Показано, что при таком ответе экспрессия ряда генов регулируется на трансляционном уровне. При этом для мРНК этих генов uORF могут оказывать как положительный, так и отрицательный эффект на трансляцию нижестоящих mORF. Эти исследователи обнаружили также богатый пуринами вышестоящий элемент, называемый R-мотивом, в 5'-UTR-области генов с повышенной эффективностью трансляции после обработки растений elf18. Устранение репрессирующего эффекта R-мотива позволяет активировать гены иммунного ответа, поэтому R-мотив, по-видимому, важен для репрессии экспрессии генов в пути PTI у арабидопсиса (Xu et al., 2017). Эта работа подтвердила, что репрограммирование трансляции происходит на ранней стадии во время защитного ответа, скорее всего, до основных транскрипционных событий, и что в процессе активации PAMP-активируемого иммунитета транскрипционные и трансляционные изменения слабо коррелируют.

Регуляция трансляции в процессе иммунного ответа, активируемого эффектором (effector triggered immunity, ETI), пока еще плохо изучена. Поэтому, чтобы прояснить детали этого механизма и сравнить особенности трансляционной регуляции растений в процессе иммунитета, активируемого эффектором и паттернами, H. Yoo с коллегами (2019) выполнили полногеномное профилирование рибосом в ответ на бактериальный патоген *Pseudomonas syringae*

pv. maculicola, несущий эффекторный ген *AvrRpt2*, который кодирует белок, распознаваемый рецептором RPS2 у *A. thaliana*. Полученные данные демонстрируют, что в процессе паттерн-активируемого иммунного ответа регуляция трансляции четко скоординирована с ответом транскрипции. Отсутствие потенциальных мотивов консенсусной последовательности в нетранслируемых областях генов, меняющих свой экспрессию в ответ на стресс, предполагает, что скоординированное трансляционное изменение в процессе ЕТІ происходит посредством модификаций трансляционного аппарата, а не через консенсусные последовательности в РНК. В исследовании также продемонстрировано, что регуляция трансляции в процессе ЕТІ аналогична для различных иммунных рецепторов и что скоординированная регуляция генов, участвующих в нескольких метаболических путях, обеспечивает координацию метаболических изменений с иммунным ответом у растений (Yoo et al., 2019). Авторы показали, что, в распознавании *AvrRpt2* и *AvrRpm1* участвуют разные рецепторы хозяина (RPS2 и RPM1 соответственно), однако наборы дифференциально экспрессирующихся генов сигнальных путей, которые запускают эти рецепторы, существенно перекрываются. Так, общими для этих путей являются 50 % генов с повышенным уровнем транскрипции и 5 % – с пониженным. Что касается генов, у которых значительно меняется трансляционная активность, то их общая доля составляет выше 75 %.

Трансляционная регуляция экспрессии в процессе развития растений

Трансляционный контроль регуляции генов также важен для растений во время их развития для обеспечения синтеза онтогенетических и тканеспецифичных генных продуктов (Jiao, Meyerowitz, 2010; Mustroph, Bailey-Serres, 2010). Например, чтобы оценить трансляционную регуляцию экспрессии генов во время развития, опосредованного светом (фотоморфогенез) у *A. thaliana*, M.-J. Liu с коллегами (2013) использовали метод профилирования рибосом и картировали их положение в процессе трансляции на мРНК по всему геному в условиях света и темноты. Результаты показали, что трансляционная эффективность основных ORF была ниже в генах, содержащих транслируемые uORF, чем в генах без таковых. Авторы также сообщили, что у генов, являющихся мишенями мРНК, уровень трансляции существенно понижен в силу равномерного понижения покрытия рибосомами кодирующих последовательностей. Это исследование показало важную роль uORF и мРНК в регуляции трансляции в процессе фотоморфогенеза.

Основываясь на этом исследовании, Y. Kurihara с коллегами (2018) применили подход к рибосомному профилированию у *A. thaliana* и продемонстрировали, что после воздействия синего света растения используют альтернативные стартовые сайты транскрипции, чтобы обойти опосредованное uORF ингибирование экспрессии генов. Это позволяет поддерживать экспрессию генов, регулируруемую светом, на высоком уровне.

Метод рибосомного профилирования был применен недавно для сравнения эффективности трансляции в связи с изменениями уровней транскрипции у сои на разных

стадиях развития семян (Shamimuzzaman, Vodkin, 2018). Авторы выявили, что эффективность трансляции у многих генов в процессе развития семян изменяется. Повышенная эффективность трансляции на отдельных стадиях развития семян была обнаружена для генов, связанных с развитием семян (например, генов протеаз, пептидаз и 2S альбуминов), что представляет уникальные особенности изменения регуляции трансляции в процессе развития (Shamimuzzaman, Vodkin, 2018). Эти результаты подчеркивают важность изучения регуляции экспрессии генов на уровне трансляции, для того чтобы установить, как развитие органов растений контролируется на молекулярном уровне.

Обнаружение трансляционных событий из неаннотированных генов растений

Несмотря на значительные усилия по расшифровке и анализу геномов растений, их последовательности содержат множество ORF, которые остаются неаннотированными. Для таких ORF неизвестно, являются ли они псевдогенами, продуцируют ли некодирующие РНК (нкРНК) или функциональные белки. Оказалось, что технологии рибосомального профилирования можно применять и для улучшения аннотации генома. В экспериментах по профилированию рибосом у *A. thaliana* модификация буферов, используемых для выделения фрагментов мРНК, связанных с рибосомами, позволила определить новые sORF, которые ранее считались нкРНК. Интересно, что многие из этих sORF эволюционно консервативны и содержат неканонические кодоны инициации трансляции, такие как CUG или ACG (Hsu et al., 2016).

В исследовании (Wu et al., 2019) сборка транскриптомов на основе референсного генома и профилирование рибосом были использованы для улучшения аннотации генома томата (*Solanum lycopersicum*). Этот метод дал возможность идентифицировать сотни новых sORF из неаннотированных транскриптов, которые эволюционно консервативны. В данном исследовании также были сформированы транслированные последовательности для sORF, uORF из 5'-UTR-областей генов, кодирующих белки. Верификация результатов, полученных с помощью рибосомального профилирования методами протеомики, показала, что некоторые из этих sORF продуцируют стабильные пептиды. Анализ обогащения аннотации этих транскриптов терминами генной онтологии выявил, что их функция связана с фосфорилированием/дефосфорилированием белков, сигнальными путями. Все это демонстрирует, что регуляция трансляции выполняет высокоуровневую регуляторную функцию в процессе жизнедеятельности клетки. Интересно, что H.-Y.L. Wu с коллегами (2019) обнаружили, что у томата экспрессия генов также регулируется глобально как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне за счет микроРНК. Таким образом, применение метода профилирования рибосом оказывается ценным для подтверждения предсказания новых открытых рамок считывания и сайтов инициации транскриптов в масштабе всего генома (Willem et al., 2017).

Указанные выше исследования установили неканонические трансляционные события и позволили идентифи-

цировать ранее не аннотированные малые белки, которые, вероятно, выполняют важные функции в растениях. Все это демонстрирует полезность экспериментов по рибосомному профилированию для более глубокой аннотации генов в геномах растений.

Проблемы и ограничения для применения методологии рибосомного профилирования у растений

Несмотря на множество преимуществ, технология Ribo-seq в настоящее время сталкивается с некоторыми серьезными техническими трудностями. Среди них – необходимость устранения потенциальных загрязнителей и надежное выравнивание коротких прочтений с эталонным геномом или транскриптомами. В этом разделе мы кратко обсудим эти проблемы и предложим возможные пути их решения.

Один из источников шума в результатах рибосомального профилирования – контаминация рибосомной РНК (рРНК) на стадии нуклеазной обработки. Она существенно затрудняет извлечение данных об информативных последовательностях, полученных в экспериментах по профилированию рибосом (Ingolia et al., 2009). Такая контаминация фрагментов мРНК фрагментами рРНК может быть устранена на основе специфической гибридизации или при помощи коммерческих наборов обеднения библиотек специфическими последовательностями РНК, а также и сочетанием обоих методов (McGlinchy, Ingolia, 2017). С другой стороны, для предотвращения лигирования линкера с избытком 5.8S рРНК можно использовать маскирующие олигонуклеотиды (Faridani et al., 2016). Загрязнения рРНК можно устранить на этапе биоинформатической обработки, но этот подход требует получения большего покрытия при секвенировании.

Современные методы анализа транскриптомов, основанные на массовом секвенировании, обычно базируются на коротких прочтениях размером 100–150 п. н. для фрагментов с одиночным или парными концами (Wang et al., 2009), в то время как в более ранних подходах RNA-seq применяли прочтения длиной 25 и 32 п. н. (Marioni et al., 2008; Mortazavi et al., 2008). Так как секвенирование фрагментов, связанных с рибосомами, осуществляется короткими прочтениями, то это значительно увеличивает вероятность их выравнивания на множественные участки генома, что может приводить к возможным ошибкам в анализе результатов профилирования (Chhangawala et al., 2015). Кроме того, на уникальность выравнивания коротких прочтений более существенное влияние оказывают ошибки секвенирования.

Проблема множественного выравнивания прочтений в случае анализа транскриптомов растений усугубляется еще и тем, что большая часть существующих видов растений – полиплоиды (Wood et al., 2009). Например, у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*), аллогексаплоида, геном включает три субгенома, А, В и D, в которых всего ~100000 генов. Около 85 % генома пшеницы – повторы, представленные многочисленными мобильными элементами (Ramírez-González et al., 2018). Во многих случаях последовательности генов гомеологов очень похожи, и чтобы получить выравнивание прочтений до совпадения,

специфичного для гомеолога, требуется их большая длина (Pfeifer et al., 2014). Таким образом, изучение дифференциальной трансляции гомеологических генов затруднено, но может быть улучшено с помощью недавно разработанного подхода классификации субгеномов, при котором считывания сопоставляются с каждым субгеномом отдельно (Kuo et al., 2018). С другой стороны, проблема множественного картирования коротких прочтений может быть решена с помощью специальных инструментов, таких как алгоритм разрешения множественного картирования для фильтрации выравнивания (Kahles et al., 2016).

Эксперименты по профилированию рибосом генерируют огромное количество данных, что создает значительную проблему для их анализа (Calviello et al., 2016). В дополнение к существующим инструментам для обработки последовательностей и выравнивания были созданы пакеты последующего анализа для идентификации трехнуклеотидной периодичности, дифференциальной трансляции и занятости кодонов: riboSeqR (Chung et al., 2015), riboWaltz (Lauria et al., 2018). На сегодняшний день разработаны два веб-сервера, RiboGalaxy (Michel et al., 2016) и riboviz (Carja et al., 2017), объединяющие набор инструментов, необходимых для анализа данных рибосомального профилирования, начиная с контроля качества исходной последовательности до финальной визуализации данных (Wang et al., 2017).

Дальнейшее изучение методов анализа данных рибосомального профилирования и подбор параметров выравнивания и покрытия для улучшения точности определения дифференциальной трансляции в значительной степени помогут при анализе и интерпретации результатов этих экспериментов.

Заключение

Возможные перспективы методологии рибосомного профилирования у растений

Большая часть современной информации о профилировании рибосом получена из нерастительных видов. Следовательно, проведение подобных исследований на растениях в различных условиях необходимо для обнаружения генов, экспрессия которых регулируется только трансляционно и до сих пор не выявлялась при анализе транскриптомов. Хотя профилирование рибосом – относительно новый метод, улучшения в этой технологии уже появляются. Так, этот метод можно использовать для изучения специфической трансляции органелл, кодируемой ядерными генами (Jan et al., 2014). В настоящее время все большее внимание привлекают методы анализа транскриптомов единичных клеток (Saliba et al., 2014). Они широко применяются в исследованиях на животных и имеют большой потенциал для понимания функции генов для единичных клеток в растениях (Efroni, Birnbaum, 2016). Сочетание этой новой методики с профилированием рибосом и такими подходами, как аффинная очистка транслирующих рибосом (Heiman et al., 2014), может иметь огромное значение при изучении регуляции трансляции, специфичной для определенного типа клеток (Mironova, Xu, 2019).

Дальнейшее улучшение определенных технических этапов экспериментов по профилированию рибосом

могло бы способствовать более широкому внедрению этой техники. Например, в настоящее время подготовка библиотеки для глубокого секвенирования включает в себя несколько этапов лигирования и занимает много времени (обычно несколько дней). Кроме того, требование относительно больших количеств начальной РНК для подготовки библиотек может создавать проблемы.

Таким образом, новый подход, называемый профилированием рибосом без лигирования, разработанный на мышцах, может быть исследован на растениях, поскольку этот метод не требует лигирования, а создание библиотеки производится в течение дня с использованием всего лишь 1 нг РНК (Hornstein et al., 2016). Профилирование рибосом перспективно для идентификации *qQTL* по всему геному (рибосомный *QTL*), подобно тому как проводится анализ *eQTL* (экспрессионные *QTL*).

Список литературы / References

- Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit Jr. M.E. Ethylene in Plant Biology. San Diego, CA: Academic Press, 2012.
- Alatorre-Cobos F., Cruz-Ramírez A., Hayden C.A., Pérez-Torres C.-A., Chauvin A.-L., Ibarra-Laclette E., Alva-Cortés E., Jorgensen R.A., Herrera-Estrella L. Translational regulation of *Arabidopsis XIPOTLI* is modulated by phosphocholine levels via the phylogenetically conserved upstream open reading frame. *J. Exp. Bot.* 2012;63(14): 5203-5221. DOI 10.1093/jxb/ers180.
- Andreev D.E., O'Connor P.B., Loughran G., Dmitriev S.E., Baranov P.V., Shatsky I.N. Insights into the mechanisms of eukaryotic translation gained with ribosome profiling. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(2):513-526. DOI 10.1093/nar/gkw1190.
- Archer S.K., Shirokikh N.E., Beilharz T.H., Preiss T. Dynamics of ribosome scanning and recycling revealed by translation complex profiling. *Nature.* 2016;535(7613):570-574. DOI 10.1038/nature18647.
- Baek Y.S., Goodrich L.V., Brown P.J., James B.T., Moose S.P., Lambert K.N., Riechers D.E. Transcriptome profiling and genome-wide association studies reveal GSTs and other defense genes involved in multiple signaling pathways induced by herbicides Safener in grain sorghum. *Front. Plant Sci.* 2019;10:192. DOI 10.3389/fpls.2019.00192.
- Brar G.A., Weissman J.S. Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015; 16:651-664. DOI 10.1038/nrm4069.
- Brar G.A., Yassour M., Friedman N., Regev A., Ingolia N.T., Weissman J.S. High-resolution view of the yeast meiotic program revealed by ribosome profiling. *Science.* 2012;335(6068):552-557. DOI 10.1126/science.1215110.
- Calviello L., Mukherjee N., Wyler E., Zauber H., Hirsekorn A., Selbach M., Landthaler M., Obermayer B., Ohler U. Detecting actively translated open reading frames in ribosome profiling data. *Nat. Methods.* 2016;13:165-170. DOI 10.1038/nmeth.3688.
- Carja O., Xing T., Wallace E.W.J., Plotkin J.B., Shah P. Riboviz: analysis and visualization of ribosome profiling datasets. *BMC Bioinformatics.* 2017;18:461. DOI 10.1186/s12859-017-1873-8.
- Chhangawala S., Rudy G., Mason C.E., Rosenfeld J.A. The impact of read length on quantification of differentially expressed genes and splice junction detection. *Genome Biol.* 2015;16:131. DOI 10.1186/s13059-015-0697-y.
- Chung B.Y., Hardcastle T.J., Jones J.D., Irigoyen N., Firth A.E., Baulcombe D.C., Brierley I. The use of duplex-specific nuclease in ribosome profiling and a user-friendly software package for Ribo-seq data analysis. *RNA.* 2015;21:1731-1745. DOI 10.1261/rna.052548.115.
- Efroni I., Birnbaum K.D. The potential of single-cell profiling in plants. *Genome Biol.* 2016;17(1):65. DOI 10.1186/s13059-016-0931-2.
- Faridani O.R., Abdullayev I., Hagemann-Jensen M., Schell J.P., Laner F., Sandberg R. Single-cell sequencing of the small-RNA transcriptome. *Nat. Biotechnol.* 2016;34:1264-1266. DOI 10.1038/nbt.3701.
- Gawroński P., Jensen P.E., Karpiński S., Leister D., Scharff L.B. Pausing of chloroplast ribosomes is induced by multiple features and is linked to the assembly of photosynthetic complexes. *Plant Physiol.* 2018;176:2557-2569. DOI 10.1104/pp.17.01564.
- Hanfrey C., Franceschetti M., Mayer M.J., Illingworth C., Michael A.J. Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(46):44131-44139. DOI 10.1074/jbc.M206161200.
- Heiman M., Kulicke R., Fenster R.J., Greengard P., Heintz N. Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nat. Protoc.* 2014;9(6):1282-1291. DOI 10.1038/nprot.2014.085.
- Hornstein N., Torres D., Das Sharma S., Tang G., Canoll P., Sims P.A. Ligation-free ribosome profiling of cell type-specific translation in the brain. *Genome Biol.* 2016;17:149. DOI 10.1186/s13059-016-1005-1.
- Hsu P.Y., Calviello L., Wu H.-Y.L., Li F.-W., Rothfels C.J., Ohler U., Benfey P.N. Super-resolution ribosome profiling reveals unannotated translation events in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113(45):E7126-E7135. DOI 10.1073/pnas.1614788113.
- Imai A., Hanzawa Y., Komura M., Yamamoto K.T., Komeda Y., Takahashi T. The dwarf phenotype of the *Arabidopsis acl5* mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene. *Development.* 2006;133:3575-3585. DOI 10.1242/dev.02535.
- Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R., Weissman J.S. Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science.* 2009;324(5924):218-223. DOI 10.1126/science.1168978.
- Ingolia N.T., Lareau L.F., Weissman J.S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell.* 2011;147:789-802. DOI 10.1016/j.cell.2011.10.002.
- Jackson R., Standart N. The awesome power of ribosome profiling. *RNA.* 2015;21:652-654. DOI 10.1261/rna.049908.115.
- Jan C.H., Williams C.C., Weissman J.S. Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science.* 2014;346(6210):1257521. DOI 10.1126/science.1257521.
- Jiao Y., Meyerowitz E.M. Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control. *Mol. Syst. Biol.* 2010;6:419. DOI 10.1038/msb.2010.76.
- Juntawong P., Girke T., Bazin J., Bailey-Serres J. Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(1):E203-E212. DOI 10.1073/pnas.1317811111.
- Kahles A., Behr J., Rättsch G. MMR: a tool for read multi-mapper resolution. *Bioinformatics.* 2016;32(5):770-772. DOI 10.1093/bioinformatics/btv624.
- Kang W.-H., Sim Y.M., Koo N., Nam J.-Y., Lee J., Kim N., Jang H., Kim Y.-M., Yeom S.-I. Transcriptome profiling of abiotic responses to heat, cold, salt, and osmotic stress of *Capsicum annuum* L. *Sci. Data.* 2020;7:1-7. DOI 10.1038/s41597-020-0352-7.
- Kazan K., Gardiner D.M. Transcriptomics of cereal - *Fusarium graminearum* interactions: what we have learned so far. *Mol. Plant Pathol.* 2018;19(3):764-778. DOI 10.1111/mpp.12561.
- Kuo T.C.Y., Hatakeyama M., Tameshige T., Shimizu K.K., Sese J. Homeolog expression quantification methods for allopolyploids. *Brief. Bioinform.* 2018;21(2):395-407. DOI 10.1093/bib/bby121.
- Kurihara Y., Makita Y., Kawashima M., Fujita T., Iwasaki S., Matsui M. Transcripts from downstream alternative transcription start sites evade uORF-mediated inhibition of gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(30):7831-7836. DOI 10.1073/pnas.1804971115.
- Lanver D., Müller A.N., Happel P., Schweizer G., Haas F.B., Franitz M., Pellegrin C., Reissmann S., Altmüller J., Rensing S.A. The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-

- seq analysis. *Plant Cell*. 2018;30(2):300-323. DOI 10.1105/tpc.17.00764.
- Lauria F., Tebaldi T., Bernabò P., Groen E.J.N., Gillingwater T.H., Viero G. riboWaltz: Optimization of ribosome P-site positioning in ribosome profiling data. *PLoS Comput. Biol.* 2018;14. e1006169-e1006169.
- Lei L., Shi J., Chen J., Zhang M., Sun S., Xie S., Li X., Zeng B., Peng L., Hauck A. Ribosome profiling reveals dynamic translational landscape in maize seedlings under drought stress. *Plant J.* 2015; 84(6):1206-1218. DOI 10.1111/tpj.13073.
- Liu M.-J., Wu S.-H., Wu J.-F., Lin W.-D., Wu Y.-C., Tsai T.-Y., Tsai H.-L., Wu S.-H. Translational landscape of photomorphogenic *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2013;25(10):3699-3710. DOI 10.1105/tpc.113.114769.
- Lukoszek R., Feist P., Ignatova Z. Insights into the adaptive response of *Arabidopsis thaliana* to prolonged thermal stress by ribosomal profiling and RNA-Seq. *BMC Plant Biol.* 2016;16:221. DOI 10.1186/s12870-016-0915-0.
- Marioni J.C., Mason C.E., Mane S.M., Stephens M., Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 2008;18:1509-1517. DOI 10.1101/gr.079558.108.
- McGlinchy N.J., Ingolia N.T. Transcriptome-wide measurement of translation by ribosome profiling. *Methods*. 2017;126:112-129. DOI 10.1016/j.ymeth.2017.05.028.
- Merchante C., Brumos J., Yun J., Hu Q., Spencer K.R., Enriquez P., Binder B.M., Heber S., Stepanova A.N., Alonso J.M. Gene-specific translation regulation mediated by the hormone-signaling molecule EIN2. *Cell*. 2015;163(3):684-697. DOI 10.1016/j.cell.2015.09.036.
- Michel A.M., Mullan J.P.A., Velayudhan V., O'Connor P.B.F., Donohue C.A., Baranov P.V. RiboGalaxy: A browser based platform for the alignment, analysis and visualization of ribosome profiling data. *RNA Biol.* 2016;13(3):316-319. DOI 10.1080/15476286.2016.1141862.
- Mironova V., Xu J. A single-cell view of tissue regeneration in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2019;52:149-154. DOI 10.1016/j.pbi.2019.09.003.
- Mortazavi A., Williams B.A., McCue K., Schaeffer L., Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*. 2008;5:621-628. DOI 10.1038/nmeth.1226.
- Mustroph A., Bailey-Serres J. The *Arabidopsis* translational cell-specific mRNA atlas: Mining suberin and cutin lipid monomer biosynthesis genes as an example for data application. *Plant Signal. Behav.* 2010;5(3):320-324. DOI 10.4161/psb.5.3.11187.
- Pfeifer M., Kugler K.G., Sandve S.R., Zhan B., Rudi H., Hvidsten T.R., Mayer K.F.X., Olsen O.-A. Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat. *Science*. 2014;345(6194):1250091. DOI 10.1126/science.1250091.
- Ramírez-González R.H., Borrill P., Lang D., Harrington S.A., Brinton J., Venturini L., Davey M., Jacobs J., van Ex F., Pasha A., Khedikar Y., Robinson S.J., Cory A.T., Florio T., Concia L., Juery C., Schoonbeek H., Steuernagel B., Xiang D., Ridout C.J., Chalhoub B., Mayer K.F.X., Benhamed M., Latrasse D., Bendahmane A., International Wheat Genome Sequencing Consortium; Wulff B.B.H., Appels R., Tiwari V., Datla R., Choulet F., Pozniak C.J., Provar N.J., Sharpe A.G., Paux E., Spannagl M., Brütigam A., Uauy C. The transcriptional landscape of polyploid wheat. *Science*. 2018;361(6403): eaar6089. DOI 10.1126/science.aar6089.
- Rooijers K., Loayza-Puch F., Nijtmans L.G., Agami R. Ribosome profiling reveals features of normal and disease-associated mitochondrial translation. *Nat. Commun.* 2013;4:2886. DOI 10.1038/ncomms3886.
- Saliba A.E., Westermann A.J., Gorski S.A., Vogel J. Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(14):8845-8860. DOI 10.1093/nar/gku555.
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C., Manners J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97(21):11655-11660. DOI 10.1073/pnas.97.21.11655.
- Shamimuzzaman M., Vodkin L. Ribosome profiling reveals changes in translational status of soybean transcripts during immature cotyledon development. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194596. DOI 10.1371/journal.pone.0194596.
- Stern-Ginossar N., Weisburd B., Michalski A., Le V.T.K., Hein M.Y., Huang S.-X., Ma M., Shen B., Qian S.-B., Hengel H. Decoding human cytomegalovirus. *Science*. 2012;338(6110):1088-1093. DOI 10.1126/science.1227919.
- Wang H., Wang Y., Xie Z. Computational resources for ribosome profiling: from database to Web server and software. *Brief. Bioinform.* 2017;20(1):144-155. DOI 10.1093/bib/bbx093.
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10:57-63. DOI 10.1038/nrg2484.
- Willems P., Ndah E., Jonckheere V., Stael S., Sticker A., Martens L., van Breusegem F., Gevaert K., van Damme P. N-terminal proteomics assisted profiling of the unexplored translation initiation landscape in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics*. 2017;16(6):1064-1080. DOI 10.1074/mcp.M116.066662.
- Wood T.E., Takebayashi N., Barker M.S., Mayrose I., Greenspoon P.B., Rieseberg L.H. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009;106(33):13875-13879. DOI 10.1073/pnas.0811575106.
- Wu H.-Y.L., Song G., Walley J.W., Hsu P.Y. The tomato translational landscape revealed by transcriptome assembly and ribosome profiling. *Plant Physiol.* 2019;181(1):367-380. DOI 10.1104/pp.19.00541.
- Xu G., Greene G.H., Yoo H., Liu L., Marqués J., Motley J., Dong X. Global translational reprogramming is a fundamental layer of immune regulation in plants. *Nature*. 2017;545:487.
- Yoo H., Greene G.H., Yuan M., Xu G., Burton D., Liu L., Marqués J., Dong X. Translational regulation of metabolic dynamics during effector-triggered immunity. *Mol. Plant*. 2019;13(1):88-98. DOI 10.1016/j.molp.2019.09.009.
- Zoschke R., Watkins K.P., Barkan A. A rapid ribosome profiling method elucidates chloroplast ribosome behavior *in vivo*. *Plant Cell*. 2013;25(6):2265-2275. DOI 10.1105/tpc.113.111567.
- Zumaquero A., Kanematsu S., Nakayashiki H., Matas A., Martínez-Ferri E., Barceló-Muñoz A., Pliego-Alfaro F., López-Herrera C., Cazorla F., Pliego C. Transcriptome analysis of the fungal pathogen *Rosellinia necatrix* during infection of a susceptible avocado rootstock identifies potential mechanisms of pathogenesis. *BMC Genomics*. 2019;20:1016. DOI 10.1186/s12864-019-6387-5.

ORCID ID

D.A. Afonnikov orcid.org/0000-0001-9738-1409
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181

Благодарности. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 18-14-00293.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.12.2020. После доработки 08.12.2020. Принята к публикации 08.12.2020.

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

Внутривидовое разнообразие твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): унифицированная классификация

О.А. Ляпунова

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

Аннотация. В отделе генетических ресурсов пшеницы ВНИИ генетических ресурсов растений (ВИР) разработана и в 1979 г. опубликована система рода *Triticum* L., базирующаяся на учете геномного состава видов и наличии или отсутствии у них ряда главных генов, контролирующих «классификационные» признаки. Она основана на исследованиях F. Körnicke и J. Percival, дополненных Н.И. Вавиловым и К.А. Фляксбергером. Эту систему, известную как “Classification of *Triticum* by Dorofeev et al.”, относят к ряду основных современных классификаций рода. Это первая в мире стандартизированная система, содержащая все известные внутривидовые (инfraspecificкие) таксоны диких и культурных видов пшеницы. Она дает возможность идентификации большого разнообразия форм при работе с родом *Triticum* L. и отдельными его видами, что особенно важно для коллекций, сохраняемых в генетических банках семян. Применение внутривидовой классификации рода *Triticum* L. для идентификации образцов коллекции ВИР, интродуцированных из различных источников или поступивших после полевого размножения для пополнения репродукции образцов, значительно упрощает этот процесс. Однако прямое использование такой объемной классификации связано с рядом трудностей. Поэтому нами предлагается унифицированная внутривидовая классификация твердой пшеницы лишь 16 из 131 разновидности, описанной к настоящему времени, которые обладают наиболее часто встречающимися в коллекциях твердой пшеницы комплексами морфологических признаков колоса и зерновки. Остальные 115 разновидностей, имеющих дополнительные признаки, получают свое название путем добавления к основному названию сокращенного латинского названия того или иного дополнительного признака. Владение таким способом описания морфологических признаков образцов может помочь любому пользователю легко ориентироваться в систематизированном внутривидовом разнообразии коллекций. Цель данной статьи – познакомить читателя с внутривидовой классификацией твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.), разработанной в ВИР, и предложить ее упрощенный вариант, построенный на выделении главных и дополнительных морфологических признаков колоса и зерновки.

Ключевые слова: твердая пшеница (*Triticum durum*); внутривидовая классификация; комплексы морфологических признаков; наследование признаков; ботаническая разновидность.

Для цитирования: Ляпунова О.А. Внутривидовое разнообразие твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.): унифицированная классификация. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):260-268. DOI 10.18699/VJ21.029

Intraspecific diversity of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): a unified classification

О.А. Lyapunova

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

Abstract. The Department of Wheat Genetic Resources of the All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources (VIR) had developed and published in 1979 a classification of the genus *Triticum* L., which is based on the genomic composition of species and the presence or absence of a number of main genes that govern the “classification” traits. The grounds have been laid by F. Körnicke and J. Percival, and supplemented by N.I. Vavilov and K.A. Flaksberger. The classification, which is most often referred to as the “Classification of *Triticum* by Dorofeev et al.”, belongs to a number of the main modern classifications of the genus. This is the world’s first standardized system that contains all known intraspecific (infraspecific) taxa of wild and cultivated wheat species. A detailed classification makes it possible to identify a wide variety of forms in the genus *Triticum* L. and its individual species, which is especially important for collections preserved in genetic seed banks. The use of the intraspecific classification of the genus *Triticum* L. greatly simplifies the identification of the VIR collection accessions introduced from various sources or checking accession identity after regeneration in the field. However, the direct use of such a voluminous classification meets several difficulties. Therefore, we propose a unified intraspecific classification of durum wheat, based on the description of only 16 main botanical varieties out of 131 described so far, which have complexes of morphological traits of the spike and kernel that occur most frequently in durum wheat collections. The remaining 115 botanical varieties, which have additional

traits, get their name by the addition of the abbreviated Latin name of one or another additional trait to the main name. Having mastered this way of describing the morphological traits of accessions, any user can easily navigate oneself in the systematized intraspecific diversity of collections. The purpose of this work is to acquaint the reader with the intraspecific classification of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) developed at VIR and to offer its simplified version, which is based on the identification of the main and additional morphological traits of the spike and kernel. Key words: durum wheat (*Triticum durum*); intraspecific classification; complexes of morphological traits; inheritance of traits; botanical variety.

For citation: Lyapunova O.A. Intraspecific diversity of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): a unified classification. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):260-268. DOI 10.18699/VJ21.029

Введение

Твердая пшеница (*Triticum durum* Desf.) характеризуется большим разнообразием разновидностей и форм. Как любое множество, данное разнообразие должно быть систематизировано для лучшего понимания взаимосвязей между составляющими его единицами. Классификация (от лат. *classis* – класс и *facio* – раскладываю) – метод, направленный на организацию системы соподчиненных групп, в которые объединены эти единицы, сходные по определенным существенным свойствам (Субботин, 2001). Продуктом классификации является система. Систематика растений – раздел ботаники, занимающийся классификацией растений. Термин «систематика» (systematic botany) был введен в употребление шведским естествоиспытателем К. Линнеем (Carl von Linné) в 1751 г. в работе «Философия ботаники» (Линней, 1989). Термин «таксономия» ввел впервые швейцарский ботаник О.П. Декандоль (Augustin Pyrame de Candolle), создатель естественной системы классификации растений – «Декандольевой системы». Он предложил теорию классификации растений, на основании правил которой таксоны располагаются в системе (de Candolle, 1813). Английский натуралист Ч. Дарвин (Charles Robert Darwin) в своем труде «О происхождении видов...» рассматривал термины «таксономия» и «систематика» как синонимы (Darwin, 1859). Но систематика изучает не только разнообразие организмов, но и причины и пути его возникновения, и включает в себя таксономию и номенклатуру.

История классификации рода *Triticum* L. начинается с К. Линнея (Linnaeus, 1737), которого большинство триитологов рассматривает как автора рода Пшеница. Классификация Линнея за 300 лет претерпела многочисленные интерпретации. Они связаны с включением либо с последующим исключением из него тех или иных культурных и дикорастущих видов.

Система рода *Triticum*, разработанная в отделе генетических ресурсов пшеницы Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (Дорофеев и др., 1979), основывается на исследованиях таких триитологов, как Ф. Кёрнике (1885) и J. Percival (1921), переработанных и дополненных Н.И. Вавиловым (1935) и К.А. Фляксбергером (Фляксбергер, 1935; Фляксбергер и др., 1939). Она базируется на учете геномного состава видов и наличии или отсутствии ряда главных генов, контролирующих важные в систематическом отношении признаки.

В соответствии с этой системой рода, пшеница твердая (*T. durum* Desf.) рассматривается в ранге вида, который впервые описал французский ботаник R.L. Desfontaines

(1798). Вид включает в себя два подвида: subsp. *durum* и subsp. *horanicum* Vav. Subsp. *horanicum* Vav. – подвид наиболее плотноколосых пшениц с комплексом специфических морфологических признаков; subsp. *durum* – подвид собственно твердых пшениц, внутри которого выделяют шесть групп разновидностей: convar. *durum*, *durocompactum* Flaksb., *aglossicon* Dorof. et A. Filat., *villosum* (Jakubz.) Dorof. et A. Filat., *falcatum* (Jakubz.) Dorof. et A. Filat., *caucasicum* (Dorof.) Dorof. В свою очередь, convar. *durum* имеет в своем составе три подгруппы разновидностей: subconvar. *durum*, *muticum* (Orlov) Dorof. et A. Filat., *duroramosum* Dorof. (табл. 1). На время создания классификации В.Ф. Дорофеева с коллегами (1979) в роде *T. durum* Desf. насчитывалось 120 ботанических разновидностей и 29 форм у 20 разновидностей. В результате последующих исследований было выявлено еще 11 разновидностей и 12 форм (Lyapunova, 2017; Ляпунова, 2019).

Классификацию, которую часто называют системой рода Пшеницы Dorofeev et al., относят к ряду основных современных классификаций рода *Triticum* L. Это была первая стандартизированная система, содержащая все известные внутривидовые (интраспецифические) таксоны диких и культурных видов пшеницы. Подобная классификация, построенная на использовании сравнительно-генетического подхода и являющаяся развитием предшествующих, была предложена Н.П. Гончаровым (Гончаров, 2002, 2009; Goncharov, 2005; Гончаров и др., 2007). В отличие от гексаплоидных пшениц, видовая классификация которых может быть построена с использованием всего пяти главных генов (Goncharov, 2011), у тетраплоидных видов только польские пшеницы и исфаханская полба могут отличаться олигогенно (Watanabe et al., 1996; Watanabe, 1999). У всех остальных видов лишь часть таксономически важных признаков имеет несложный генетический контроль. Например, персикоидность у большинства разновидностей *T. carthlicum* Nevski (Haque et al., 2011)¹, фиолетовая окраска зерна *T. aethiopicum* Jakubz. (Lachman et al., 2017), ветвистоколосость у *T. turgidum* L. (Haque et al., 2012). Радикал вида – в понятиях Вавилова. В то же время выделяемые нами разновидности имеют простой контроль признаков, например безлигульности (Барулина, 1937; Watanabe et al., 2004) или безостости (Гончаров и др., 2003).

Такая подробная классификация дает возможность идентификации большого разнообразия при работе с родом *Triticum* L. в целом и/или с отдельными его видами,

¹ Ген недавно был интрогрессирован в гексаплоидную пшеницу и картирован (Добровольская и др., 2020).

Таблица 1. Внутривидовая дифференциация вида *Triticum durum* Desf.

Группы разновидностей (convar.) и подгруппы разновидностей (subconvar.)	Число разновид- ностей (var.)	Географическое распространение
Subsp. <i>durum</i>		
<i>durum</i> – группа разновидностей собственно твердых пшениц, включает три подгруппы:	65	По всему ареалу пшеницы твердой
<i>durum</i> – пшеница собственно твердая	42	По всему ареалу пшеницы твердой
<i>muticum</i> – пшеница твердая безостая	17	Селекционные организации Австралии, Туниса, Турции, Казахстана, России
<i>duroramosum</i> – пшеница твердая ветвистоколосая	6	Предгорные районы Азербайджана и Грузии, Казахстан (редко)
<i>durocompactum</i> – группа разновидностей плотноколосых твердых пшениц	21	Алжир, Тунис, Марокко, Египет, Сирия, Иордания, Малая Азия, Азербайджан
<i>aglossicon</i> – группа разновидностей безлигульных твердых пшениц	10	Кипр
<i>villosum</i> – группа разновидностей грубоколосых палестинских твердых пшениц	8	Прибрежные равнины и предгорья Сирии, Иордании, Ливана
<i>falcatum</i> – группа разновидностей фалькатных твердых пшениц	13	Греция, Сардиния, Сицилия, Мальта, Кипр, Турция, Иран, Афганистан, Китай, Азербайджан, Кыргызстан, Таджикистан
<i>caucasicum</i> – кавказская группа разновидностей твердых пшениц	6	Закавказье (предгорные районы и низменности: 100–600 м над ур. м.)
Subsp. <i>horanicum</i> Vav.		
–	8	Сирия, Иордания, редко в Египте и на островах Средиземного моря, Малая Азия
Всего разновидностей	131	

что особенно важно для больших по объему коллекций, сохраняемых в генетических банках семян.

Использование внутривидовой классификации для идентификации образцов коллекции ВИР, интродуцированных из различных источников и/или поступивших после полевого размножения для пополнения репродукции образцов, значительно упрощает этот процесс. Однако, кроме сотрудников отдела генетических ресурсов пшеницы ВИР, мало кто использует такой подход при их идентификации в своей практической работе. На то есть несколько причин. Во-первых, монография «Культурная флора СССР» (Дорофеев и др., 1979) и сопутствующий ей «Определитель пшениц» (Дорофеев и др., 1980) не переиздавались уже более 40 лет и являются библиографической редкостью, что затрудняет применение этой системы внутри страны среди селекционеров и других исследователей пшеницы (Чикида, 2020). После развала СССР генетические банки стран СЭВ перестали работать по единой схеме, хотя многие из них продолжают пользоваться системой В.Ф. Дорофеева с коллегами (1979). Во-вторых, до сих пор нет перевода этих работ на английский язык, хотя существовал международный проект по переводу этой монографии (Knüpffer et al., 2003), что делает невозможным знакомство с данной классификацией в зарубежных генетических банках семян. В-третьих, только многолетняя практика идентификации образцов по названию разновидности позволяет быстро и без затруднений провести эту трудоемкую работу. Так, только по

твердой пшенице необходимо помнить названия 131 разновидности и что они обозначают. Одним из способов сократить число трудно запоминаемых наименований может быть унификация как метод стандартизации, направленный на сокращение числа объектов путем комбинирования нескольких характеристик. Она предполагает выбор оптимального числа объектов (в нашем случае – разновидностей) с целесообразным минимумом и приводит к определенному единообразию. Это значительно упрощает использование классификации.

Цель настоящей статьи – познакомить читателя с внутривидовой классификацией твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.), разработанной в ВИР, и предложить ее упрощенный аналог, основанный на выделении главных и дополнительных морфологических признаков колоса и зерновки.

Материалы и методы

Разработана унифицированная внутривидовая классификация вида Пшеница твердая, основанная на описании 16 основных разновидностей, обладающих наиболее часто встречающимися комплексами морфологических признаков колоса и зерновки и сохранивших авторское название (табл. 2). Остальные разновидности, имеющие дополнительные признаки, получают свое название путем добавления к основному сокращенному латинского названия того или иного дополнительного признака (табл. 3). Такой способ описания и быстрого запоминания внутривидового

Таблица 2. Основные признаки колоса и зерновки, используемые для описания внутривидового разнообразия твердой пшеницы

Признак	Градации признака	Сокращенное латинское обозначение признака
Цвет колосковой чешуи	Белый или соломенно-желтый (рис. 1)	–
	Красный (рис. 2)	–
	Белый или красный в комбинации с черным (черно-синим)*, который проявляется в разной степени (рис. 3)	<i>nigro-</i>
	Белый или красный в комбинации с серо-дымчатым (сизым), который проявляется в центральной части колосковой чешуи (рис. 4, 5)	<i>glauco-</i>
	Белый или красный в комбинации с черным по краю колосковой чешуи (форма) (рис. 6)	<i>triste-</i>
Опушение колосковой чешуи	Колосковая чешуя неопушенная (голая) (рис. 7)	–
	Колосковая чешуя опушенная (рис. 8)	–
Цвет зерновки** (рис. 9)	Белый	–
	Красный	–
	Фиолетовый	<i>violaceo-</i>
Наличие остей	Нормальные ости (ости длиной от 7 см и более) (рис. 10)	–
	Ости отсутствуют или имеются остевидные заострения менее 2 см (колос безостый) (рис. 11)	<i>mutico-</i>
Цвет остей (см. рис. 10, 11)	Цвета колосковой чешуи	–
	Черные	–

* Синий оттенок обусловлен наличием воскового налета на чешуях колоса.

** К белозерным относят зерновки со светло-желтой, желтой и янтарно-желтой окраской; к краснозерным – со светло-коричневой, коричневой и янтарно-коричневой окраской (Международный классификатор СЭВ..., 1984). Зерновки твердой пшеницы в большинстве случаев стекловидные, поэтому цвет, который идентифицирован как белый, является янтарно-желтым.

Таблица 3. Наиболее часто встречающиеся комплексы признаков колоса и зерновки у твердой пшеницы и их латинское название

Название комплекса признаков	Цвет		
	зерновки	колосковой чешуи	остей
Колосковая чешуя неопушенная			
<i>leucurum</i> (Alef.) Koern.	Белый	Белый	Белый
<i>leucomelan</i> (Alef.) Koern.			Черный
<i>hordeiforme</i> (Host.) Koern.		Красный	Красный
<i>erythromelan</i> Koern.			Черный
<i>affine</i> Koern.	Красный	Белый	Белый
<i>reichenbachii</i> Koern.			Черный
<i>turciense</i> Koern.		Красный	Красный
<i>pseudoalexandrinum</i> Flaksb.			Черный
Колосковая чешуя опушенная			
<i>valenciae</i> Koern.	Белый	Белый	Белый
<i>melanopus</i> (Alef.) Koern.			Черный
<i>italicum</i> (Alef.) Koern.		Красный	Красный
<i>apulicum</i> Koern.			Черный
<i>durum</i>	Красный	Белый	Белый
<i>africanum</i> Koern.			Черный
<i>aegyptiacum</i> Koern.		Красный	Красный
<i>niloticum</i> Koern.			Черный

разнообразия был предложен для мягкой пшеницы (Зуев и др., 2019). Эта работа успешно выдержала два издания и пользуется большим спросом как внутри страны, так и у сотрудников зарубежных генетических банков семян.

Результаты

Основные и дополнительные морфологические признаки твердой пшеницы

Базой внутривидовой системы описания являются разновидности, название которых определяет комплекс морфологических признаков колоса и зерновки. Эти комплексы были выделены по сочетанию таких признаков, как наличие или отсутствие опушения колосковых чешуй, цвет чешуй (белые, красные, серо-дымчатые или черные на белом или красном фоне), наличие или отсутствие остей, цвет остей (совпадающий с цветом колосковой и цветковой чешуй или черный), форме и цвету зерновок (белые, красные или фиолетовые) (см. табл. 2).

Все разновидности обязательно должны включать комплекс основных признаков: наличие/отсутствие опушения колосковой чешуи, окраска колосковой чешуи и зерновки, наличие/отсутствие остей на цветковой чешуе, окраска остей. Выявленный у образца комплекс признаков обозначается соответствующим латинским названием, данным автором (см. табл. 3).

Для описания образца, обладающего одним из таких комплексов признаков, но в комбинации с дополнительно проявляющейся окраской колосковой чешуи, иной длиной остей, их окраской или другими признаками исполь-



Рис. 1. Белый цвет колосковой чешуи.



Рис. 2. Красный цвет колосковой чешуи.

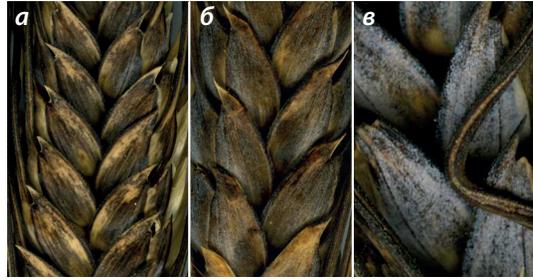


Рис. 3. Белый (а) или красный (б) цвет колосковой чешуи в комбинации с черным или черно-синим (в).



Рис. 4. Белый цвет колосковой чешуи в комбинации с серо-дымчатым (*glauco*-).



Рис. 5. Красный цвет колосковой чешуи в комбинации с серо-дымчатым (*glauco*-).



Рис. 6. Белый (а) или красный (б) цвет колосковой чешуи в комбинации с черным по краю (*triste*-).



Рис. 7. Неопушенная колосковая чешуя.



Рис. 8. Опушенная колосковая чешуя: а – колос белый; б – колос черный.



Рис. 9. Цвет зерновки твердой пшеницы: белый (а), красный (б), фиолетовый (в).

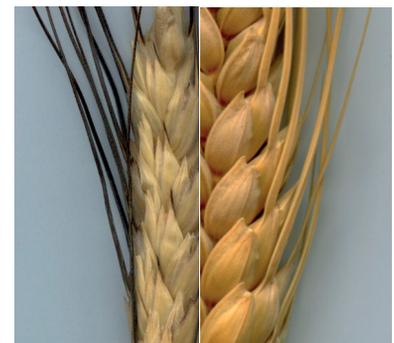


Рис. 10. Остистые твердые пшеницы.



Рис. 11. Безостые твердые пшеницы.

зуют сокращенные латинские названия этих признаков (табл. 4). Для твердой пшеницы их добавляют к названию основного комплекса в случае опушения колосоножки (*piloso*-)

и гладких остей (*levi*-) либо они определяют названия групп или подгрупп разновидностей: плотноколосые (*-compactus*), серповидная форма зерновки (*falcato*-), ветвистый колос (*ramoso*-), безлигульные (*quasi*-), густоопушенные листовая пластинка и влагалище листа и жесткая колосковая чешуя (*villosa*-). В табл. 4 наряду с признаками колоса и зерновки указан также признак «отсутствие лигулы» – единственный признак листа, учтенный при описании разновидностей.

Унифицированная внутривидовая классификация твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.)

Предлагаемая унифицированная внутривидовая классификация является упрощенным аналогом определителя твердой пшеницы (Дорофеев и др., 1980). Все разнообразие представлено в виде таблиц, где для сравнения приведены названия разновидностей по К.А. Фляксбергеру (1935) и В.Ф. Дорофееву с коллегами (1979). Сравнение позволяет установить пользователю соответ-

Таблица 4. Дополнительные признаки колоса и зерновки, используемые для описания внутривидового разнообразия твердой пшеницы

Признак	Градации признака	Сокращенное латинское обозначение признака
Плотность колоса	Колос рыхлый или средней плотности (рис. 12)	–
	Колос плотный ($d \geq 40$) (рис. 13)	<i>-compactus</i>
Форма зерновки	Округлая или удлиненная (см. рис. 9)	–
	Серповидная (удлиненная с поперечной вдавленностью посередине) (рис. 14)	<i>falcato-</i>
Вторичные оси колоса	Наличие вторичных осей с колосками или двойных и тройных колосков на уступах члеников оси колоса (ветвистый колос) (рис. 15)	<i>ramoso-</i>
Колосоножка	Неопушенная	–
	Опушенная (рис. 16)	<i>piloso-</i>
Наличие лигулы (рис. 17)	Есть (лигульные)	–
	Отсутствует (безлигульные)	<i>quasi-</i>
Шероховатость остей (рис. 18)	Сильно шероховатые	–
	Слабо шероховатые	<i>fere-</i>
	Гладкие	<i>levi-</i>
Опушение листовой пластинки и структура колосковой чешуи	Густоопушенные пластинка и влагалище листа, ригидная (жесткая) колосковая чешуя	<i>viloso-</i>



Рис. 12. Рыхлый колос твердой пшеницы.



Рис. 13. Плотный колос твердой пшеницы.



Рис. 14. Серповидная форма зерновки.



Рис. 15. Ветвистый колос твердой пшеницы.



Рис. 16. Соломина под колосом опушенная.

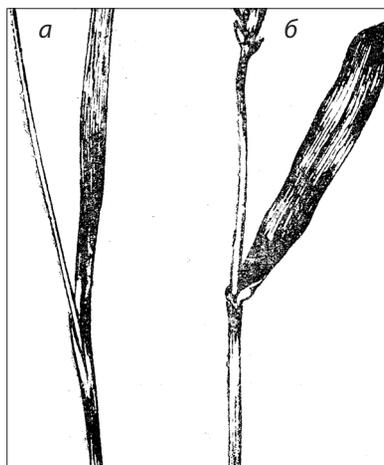


Рис. 17. Безлигульная (а) и лигульная (б) формы твердой пшеницы (из: Фляксбергер, 1935).

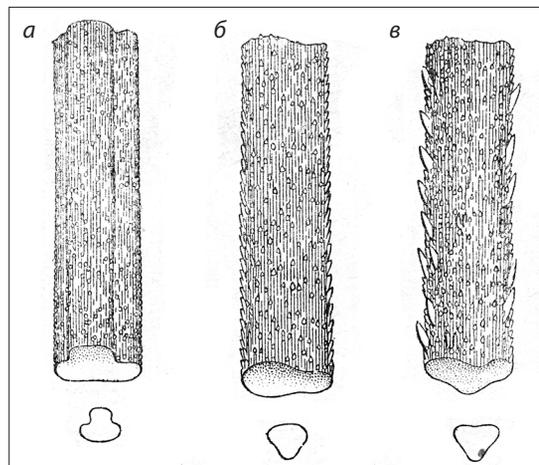


Рис. 18. Ость гладкая (а), слабо шероховатая (б), сильно шероховатая (в) (из: Фляксбергер, 1935).

Таблица 5. Комплексы признаков, выявленные у безостых образцов твердой пшеницы

Названия комплексов признаков (лат.)	Цвет колосковой чешуи	Цвет остевидных заострений	Название ботанической разновидности	
			по К.А. Фляксберггеру (1935)	по В.Ф. Дорофееву и др. (1979)
Колосковые чешуи неопушенные				
1. Колос белый, зерновки белые				
<i>mutico-leuicurum</i>	Белый	Белый	var. <i>candicans</i> Meist.	<i>candicans</i> Meist.
<i>mutico-leucomelan</i>		Черный	–	<i>muticoleucomelan</i> Lyapun.
<i>mutico-nigro-leucomelan</i>	Черный на белом фоне	–	f. <i>quatuor-unum</i> Flaksb.	<i>muticalbiprovinciale</i> Flaksb.
2. Колос красный, зерновки белые				
<i>mutico-hordeiforme</i>	Красный	Красный	var. <i>sub-australe</i> Perciv.	<i>subaustrale</i> Perciv.
<i>mutico-hordeiforme-compactus</i>		–	–	<i>yesilkoense</i> Gökg.
<i>mutico-erythromelan</i>		Черный	–	<i>muticerythromelan</i> Lyapun.
<i>mutico-nigro-erythromelan</i>			var. <i>australe</i> Perciv.	<i>australe</i> Perciv.
3. Колос белый, зерновки красные				
<i>mutico-affine</i>	Белый	Белый	var. <i>schechurdini</i> Meist.	<i>schechurdinii</i> Meist.
<i>mutico-nigro-reichenbachii</i>		–	f. <i>quatuordecim-unum</i> Flaksb.	<i>muticalbobscurum</i> Flaksb.
4. Колос красный, зерновки красные				
<i>mutico-murciense</i>	Красный	Красный	var. <i>Stebuti</i> Flaksb.	<i>stebutii</i> Meist.
<i>mutico-nigro-alexandrinum</i>	Черный на красном фоне	Черный	f. <i>quindecim-unum</i> Flaksb.	<i>muticobscurum</i> Dorof. et A. Filat.
Колосковые чешуи опушенные				
5. Колос белый, зерновки белые				
<i>mutico-valenciae</i>	Белый	–	f. <i>unum-quindecim</i> Flaksb.	<i>muticovalenciae</i> Dorof. et A. Filat.
<i>mutico-melanopus</i>		Черный	–	<i>muticomelanopus</i> (A. Filat. et Schaid.) Lyapun.
<i>mutico-nigro-melanopus</i>	Черный на белом фоне	–	f. <i>quatuor-quinque</i> Flaksb.	<i>muticoboefii</i> Flaksb.
6. Колос красный, зерновки белые				
<i>mutico-italicum</i>	Красный	–	f. <i>duo-quinque</i> Flaksb.	<i>muticitalicum</i> Dorof. et A. Filat.
<i>mutico-apulicum</i>		Черный	–	<i>muticapulicum</i> Lyapun.
<i>mutico-nigro-apulicum</i>	Черный на красном фоне	–	f. <i>sex-quinque</i> Flaksb.	<i>muticocaerulescens</i> Flaksb.
7. Колос белый, зерновки красные				
<i>mutico-nigro-africanum</i>	Черный на белом фоне	–	–	<i>muticonazillense</i> Gökg.

ствие между описываемой им формой и разновидностью. Разновидности в соотношении с основными признаками представлены в табл. 5 (безостые формы) и в Приложении² (остистые формы).

В этих таблицах приведены разновидности с неопушенными колосковыми чешуями и разным сочетанием цвета колосковой чешуи и зерновки, а затем с опушенными колосковыми чешуями в том же порядке.

Колосковые чешуи неопушенные:

1. Колос белый, зерновки белые.
2. Колос красный, зерновки белые.
3. Колос белый, зерновки красные.
4. Колос красный, зерновки красные.
5. Колос белый, зерновки фиолетовые.
6. Колос красный, зерновки фиолетовые.

Колосковые чешуи опушенные:

7. Колос белый, зерновки белые.
8. Колос красный, зерновки белые.
9. Колос белый, зерновки красные.
10. Колос красный, зерновки красные.

Все указанные выше основные признаки имеют простой генетический контроль (McIntosh et al., 2020).

Заключение

Знакомство с внутривидовой классификацией твердой пшеницы, разработанной в ВИР, содержащей на то время все известные инфраспецифические таксоны, а также их последующее пополнение, позволяют проанализировать внутривидовое разнообразие основного возделываемого тетраплоидного вида *Triticum durum* Desf. Предлагаемый упрощенный аналог этой классификации, построенный на выделении основных и дополнительных морфоло-

² Приложение см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx7.pdf>

гических признаков колоса и зерновки, может помочь пользователю упростить систематизацию внутривидового разнообразия любой коллекции и легко ориентироваться в нем.

Список литературы / References

- Барулина Е.Н. Сравнительно-генетическое изучение видов *Triticum*. I. Генетика признака *ligula* у разнохромосомных видов пшениц: *T. vulgare* Vill., *T. compactum* Host, *T. durum* Desf. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 1937;1(5):127-166. [Barulina E.N. Comparative genetic study of *Triticum* species: I. Genetics of the *ligula* trait in different chromosomal wheat species: *T. vulgare* Vill., *T. compactum* Host, *T. durum* Desf. *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 1937;1(5):127-166. (in Russian)]
- Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции. В: Теоретические основы селекции растений. Т. 1. Общая селекция растений. М.: Сельхозгиз, 1935;17-75. [Vavilov N.I. Botanical and geographical bases of breeding. In: Theoretical Foundations of Plant Breeding. Vol. 1: General Plant Genetics. Moscow: Sel'khozgiz Publ., 1935;17-75. (in Russian)]
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2002. [Goncharov N.P. Comparative Genetics of Wheat and their Related Species. Novosibirsk: Siberian University Press, 2002. (in Russian)]
- Гончаров Н.П. Определитель разновидностей мягкой и твердой пшеницы. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009. [Goncharov N.P. Manual Book of Common and Durum Wheat Varieties. Novosibirsk: Publishing House SB RAS, 2009. (in Russian)]
- Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я., Банникова С.В., Коновалов А.А., Головнина К.А. Сравнительно-генетический анализ голозерной диплоидной пшеницы *Triticum sinskajae* и ее исходной формы *T. monococcum*. *Генетика*. 2007;43(11):1491-1500. [Goncharov N.P., Kondratenko E.Ja., Bannikova S.V., Kononov A.A., Golovnina K.A. Comparative genetic analysis of diploid naked wheat *Triticum sinskajae* and the progenitor *T. monococcum* accession. *Russ. J. Genet.* 2007;43(11):1248-1256. DOI 10.1134/S1022795407110075.]
- Гончаров Н.П., Митина Р.Л., Анфилова Н.А. Наследование безостости у тетраплоидных видов пшениц. *Генетика*. 2003;39(4):565-569. [Goncharov N.P., Mitina R.L., Anfilova N.A. Inheritance of awlessness in tetraploid wheat species. *Russ. J. Genet.* 2003;39:463-466].
- Добровольская О.Б., Дресвянникова А.Е., Бадаева Е.Д., Попова К.И., Травничкова М., Мартинек П. Изучение генетических факторов, определяющих признак «тетраостость» мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):568-574. DOI 10.18699/VJ20.650. [Dobrovolskaya O.B., Dresvyannikova A.E., Badaeva E.D., Popova K.I., Trávníčková M., Martinek P. The study of genetic factors that determine the awned glume trait in bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):568-574. DOI 10.18699/VJ20.650. (in Russian)]
- Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушева Э.Ф. Определитель пшеницы (Методические указания). Л.: ВИР, 1980. [Dorofeev V.F., Filatenko A.A., Migushova E.F. Identification Keys to Wheats. Leningrad: VIR, 1980. (in Russian)]
- Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушева Э.Ф., Удачин Р.А., Якубцинер М.М. Культурная флора СССР. Пшеница. Л.: Колос, 1979. [Dorofeev V.F., Filatenko A.A., Migushova E.F., Udachin R.A., Jakubziner M.M. Cultivated Flora of the USSR. Wheat. Leningrad: Kolos Publ., 1979. (in Russian)]
- Зуев Е.В., Амри А., Брыкова А.Н., Пюккенен В.П., Митрофанова О.П. Атлас разнообразия мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по признакам колоса и зерновки. 2-е изд. СПб.: Копи-Р, 2019. [Zuev E.V., Amri A., Brykova A.N., Pyukkenen V.P., Mitrofanova O.P. Atlas of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genetic Diversity Based on Spike and Kernel Characters. 2nd ed. St. Petersburg: Kopi-R Publ., 2019. (in Russian)]
- Линней К. Философия ботаники. М.: Наука, 1989. [Linnaeus C. Philosophy of Botany. Moscow: Nauka Publ., 1989. (in Russian)]
- Ляпунова О.А. Типы внутривидовых таксонов *T. durum* Desf., хранящиеся в гербарии ВИР (WIR). *Vavilovia*. 2019;2(3):23-38. DOI 10.30901/2658-3860-2019-3-23-38. [Lyapunova O.A. Types of *Triticum durum* Desf. intraspecific taxa preserved in the VIR herbarium (WIR). *Vavilovia*. 2019;2(3):23-38. DOI 10.30901/2658-3860-2019-3-23-38. (in Russian)]
- Международный классификатор СЭВ рода *Triticum* L. Л.: ВИР, 1984. [The International Comecon List of Descriptors for the Genus *Triticum* L. Leningrad: VIR, 1984. (in Russian)]
- Субботин А.Л. Классификация. Новая философская энциклопедия. М.: Мысль, 2001. [Subbotin A.L. Classification: New Philosophical Encyclopedia. M.: Mysl' Publ., 2001. (in Russian)] Available at: <https://iphlib.ru/library/collection/newphilenc/document/HASH01b0ea7a433b0feb3ff681b0>.
- Флаксбергер К.А. Культурная флора СССР. Хлебные злаки. Т. 1. Пшеница. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935;150-223. [Flaksberger K.A. Cultural Flora of the USSR: Cereals. Vol. 1. Wheat. Moscow-Leningrad: Sel'khozgiz Publ., 1935;150-223. (in Russian)]
- Флаксбергер К.А., Антроповы В.И. и В.Ф., Бахтеев Ф.Х. Определитель настоящих хлебов. Пшеница, рожь, ячмень, овес. М.; Л.: Сельхозгиз, 1939;63-92. [Flaksberger K.A., Antropov V.I., Antropov V.F., Bakhteev F.Kh. Manual Book to True Cereals: Wheat, Rye, Barley, Oat. Moscow-Leningrad: Sel'khozgiz Publ., 1939;63-92. (in Russian)]
- Чикида Н.Н. Вклад академика Владимира Филимоновича Дорофеева в развитие сельскохозяйственной и биологической наук. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;6(1):18-36. DOI 10.18699/Letters2020-6-04. [Chikida N.N. Contribution of academician Vladimir Filimonovich Dorofeev to the development of agricultural and biological sciences. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;6(1):18-36. DOI 10.18699/Letters2020-6-04. (in Russian)]
- Darwin Ch. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. London: John Murray, 1859.
- De Candolle A.P. Théorie Élémentaire de Botanique. Paris, 1813.
- Desfontaines R.L. Flora Atlantica: Sive Historia Plantarum Quae in Atlante, Agro Tunetano et Algeriensi Crescent. Parisii: L.G. Desgranges, 1798; Vol. 1;114.
- Goncharov N.P. Comparative-genetic analysis – a base for wheat taxonomy revision. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2005;41;52-55.
- Goncharov N.P. Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. *Plant Syst. Evol.* 2011;295:1-11. DOI 10.1007/s00606-011-0480-9.
- Haque M.A., Martinek P., Kobayashi S., Kita I., Ohwaku K., Watanabe N., Kuboyama T. Microsatellite mapping of genes for semi-dwarfism and branched spike in *Triticum durum* Desf. var. *ramoso-*

- obscurum* Jakubz. “Vetvistokoloskaya”. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012;59:831-837. DOI 10.1007/s10722-011-9722-5.
- Haque M.A., Takayama A., Watanabe N., Kuboyama T. Cytological and genetic mapping of the gene for four-awned phenotype in *Triticum carthlicum* Nevski. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2011;58(7):1087-1093. DOI 10.1007/s10722-010-9644-7.
- Knüpfner H., Morrison L.A., Filatenko A.A., Hammer K., Morgounov A., Faberová I. English translation of the 1979 Russian taxonomic monograph of *Triticum* L. by Dorofeev et al.: project progress report. 2003. Available at: https://wheat.pw.usda.gov/ggpages/GrainTax/anuscrypt_Dorofeev_extended.html
- Körnicker F. Der Weizen. In: Körnicke F., Werner H. (Eds.). *Hundbuch des Getreidebaus*. Bd. 1. Berlin: Verlag von Paul Parey, 1885;22-114.
- Lachman J., Martinek P., Kotikova Z., Šulc's M. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain – A review. *J. Cereal Sci.* 2017;74: 145-154. DOI 10.1016/j.jcs.2017.02.007.
- Linnaeus C. *Critica Botanica*. Leiden. 1737. Available at: <http://ru.knowledgr.com/09901965/CriticaBotanica>
- Lyapunova O.A. Intraspecific classification of durum wheat: New botanical varieties and forms. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(7): 757-762. DOI 10.1134/S2079059717070048.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. Available at: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>
- Percival J. *The Wheat Plants*. London: Duckworth and Co., 1921.
- Watanabe N. Genetic control of the long glume phenotype in tetraploid wheat by homoeologous chromosomes. *Euphytica*. 1999;106:39-43. DOI 10.1023/A:1003589117853.
- Watanabe N., Nakayama A., Ban T. Cytological and microsatellite mapping of the genes determining liguleless phenotype in durum wheat. *Euphytica*. 2004;140:163-170. DOI 10.1007/s10681-004-2425-7.
- Watanabe N., Yotani Y., Furuta Y. The inheritance and chromosomal location of a gene for long glume in durum wheat. *Euphytica*. 1996; 91:235-239. DOI 10.1007/BF00021076.

ORCID IDO.A. Lyapunova orcid.org/0000-0003-2164-4510

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0006 «Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.10.2020. После доработки 10.12.2020. Принята к публикации 10.12.2020.

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

Вироид веретеновидности клубней картофеля

А.В. Кочетов^{1, 2} , А.Ю. Пронозин¹, Н.В. Шацкая¹, Д.А. Афонников^{1, 2, 3}, О.С. Афанасенко^{1, 3}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

 ak@bionet.nsc.ru

Аннотация. Вироиды, небольшие кольцевые молекулы РНК, которые вызывают патогенез у растений, остаются одним из самых необычных биологических объектов, привлекающих внимание не только фитопатологов, но и специалистов в области молекулярной эволюции. В статье приведен обзор последних литературных данных о генетике вириода веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) и генетических механизмах формирования патологических состояний у растений-хозяев. ВВКК способен передаваться вертикально (через генеративные клетки зараженного растения), но, в отличие от некоторых других виридов, не передается через пыльцу от зараженного растения. Большой интерес у исследователей вызывает структура геномной РНК вириода размером 359 нуклеотидов: хорошо известно, что особенности 3D конформации определяют основные параметры взаимодействия с клеточными факторами на стадии репликации, транспорта между различными тканями в процессе системной инфекции, а также степень выраженности симптомов заболевания. При репликации геномной РНК виридов часто происходят ошибки, приводящие к появлению гетерогенной популяции молекул РНК в тканях зараженного растения. Примечательно, что через 7 дней после инокуляции только 25 % молекул геномной РНК ВВКК соответствовали исходной матрице, использованной для инокуляции, однако эта доля увеличилась до 70 % через 14 дней и далее оставалась на том же уровне. По-видимому, при сохранении у мутантных вариантов геномной РНК способности к репликации вириод обладает высоким потенциалом к отбору эффективных инфекционных форм. ВВКК вызывает у пораженных растений развитие иммунного ответа, механизмы индукции которого недостаточно изучены. Известны сильно- и слабопатогенные штаммы ВВКК, вызывающие разные проявления болезни, фенотипические проявления от которых у пораженных растений в значительной мере различны. Сама по себе репликация вириода не обязательно приводит к выраженным фенотипическим проявлениям, в случае ВВКК они могут быть связаны с участками гомологии между геномной РНК и мРНК некоторых регуляторных генов, например транскрипционного фактора StTCP23 картофеля, участвующего в регуляторном контуре гиббереллиновой кислоты и в контроле морфогенеза клубня. Другой пример – индукция РНК-интерференции против мРНК гена FRIGIDA-like protein 3 у томата, что приводит к раннему цветению. В связи с этим обсуждаются потенциальные способы борьбы с вириодом, основанные на удалении из генома растений таких участков гомологии, расположенных в нетранслируемых областях мРНК и не выполняющих каких-либо функций. В целом вириоды представляют собой уникальную модель для исследования основ организации живых систем, многие из которых возникли на ранних этапах эволюции и остаются до сих пор не выявленными.
Ключевые слова: генетика вириода; патогенез растений.

Для цитирования: Кочетов А.В., Пронозин А.Ю., Шацкая Н.В., Афонников Д.А., Афанасенко О.С. Вироид веретеновидности клубней картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):269-275. DOI 10.18699/VJ21.030

Potato spindle tuber viroid

A.V. Kochetov^{1, 2} , A.Y. Pronozin¹, N.V. Shatskaya¹, D.A. Afonnikov^{1, 2, 3}, O.S. Afanasenko^{1, 3}

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 All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

 ak@bionet.nsc.ru

Abstract. Viroids belong to a very interesting class of molecules attracting researchers in phytopathology and molecular evolution. Here we review recent literature data concerning the genetics of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) and the mechanisms related to its pathological effect on the host plants. PSTVd can be transmitted vertically through microspores and macrospores, but not with pollen from another infected plant. The 359 nucleotide-long genomic RNA of PSTVd is highly structured and its 3D-conformation is responsible for interaction with host cellular factors to mediate replication, transport between tissues during systemic infection and the severity of pathological symptoms. RNA replication is prone to errors and infected plants contain a population of mutated forms of the PSTVd genome. Interestingly, at 7 DAI, only 25 % of the newly synthesized RNAs were identical to the master copy, but this proportion increased to up to 70 % at 14 DAI and remained the same afterwards. PSTVd infection induces the immune response in host plants. There are PSTVd strains with a severe, a moderate or a mild pathological effect. Interestingly, viroid replication itself does not necessarily induce strong morphological or physiological symptoms. In the case of PSTVd, disease symptoms

may occur due to RNA-interference, which decreases the expression levels of some important cellular regulatory factors, such as, for example, potato StTCP23 from the gibberellic acid pathway with a role in tuber morphogenesis or tomato FRIGIDA-like protein 3 with an early flowering phenotype. This association between the small segments of viroid genomic RNAs complementary to the untranslated regions of cellular mRNAs and disease symptoms provides a way for new resistant cultivars to be developed by genetic editing. To conclude, viroids provide a unique model to reveal the fundamental features of living systems, which appeared early in evolution and still remain undiscovered.

Key words: viroids; plants; pathogenesis.

For citation: Kochetov A.V., Pronozin A.Y., Shatskaya N.V., Afonnikov D.A., Afanasenko O.S. Potato spindle tuber viroid. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):269-275. DOI 10.18699/VJ21.030

Введение

Вироиды – высококомплементарные кольцевые одноцепочечные РНК, автономно реплицирующиеся в зараженном растении и вызывающие симптомы от легких до летальных. Геном вириода состоит из кольцевой РНК длиной 250–400 нуклеотидов, в зависимости от вида вириода. Так, для вириодов Avocado sunblotch (ASBVd) и Cocosnut-cadang размер генома составляет 246 нуклеотидов, а для вириода Chrysanthemum chlorotic mottle (CchMVd) – 401 нуклеотид (Srivastava, Prasad, 2020). Вироиды имеют наименьший размер геномной РНК и при этом не кодируют белковых продуктов. Механизмы репликации вириодов и их взаимодействие с растением-хозяином привлекают внимание не только фитопатологов, но и специалистов в области молекулярной биологии и молекулярной эволюции.

Один из наиболее изученных вириодов – это вириод веретеновидности клубней картофеля (ВВКК; *англ.* Potato spindle tuber viroid, PSTVd). Он представляет значительную угрозу для этой сельскохозяйственной культуры, поскольку вегетативное размножение сортового картофеля обуславливает его слабую вирусостойчивость. При заражении ВВКК неустойчивых сортов картофеля, особенно в сочетании с другой вирусной инфекцией, их продуктивность может снижаться на 40–70 % (Анненков, 2000). Для заболевания характерны появление деформированных листьев (морщинистость, скручивание), отставание в росте, вплоть до карликовости, появление клубней веретеновидной формы с выпуклыми глазками и трещинами. В статье представлен обзор литературных данных за последние пять лет о молекулярной генетике ВВКК и механизмах формирования патологических состояний у растений-реципиентов.

Структура генома ВВКК, популяции молекул и квазивиды

Описаны штаммы ВВКК, вызывающие различные по степени тяжести симптомы у пораженных растений. Например, вариант PSTVd-Dahlia у томата вызывает слабо выраженные симптомы заболевания, а штамм PSTVd-Intermediate – сильное поражение. Эти два штамма различаются мутациями в девяти позициях, шесть из которых расположены в определенных элементах структуры геномной РНК (left terminal domain, pathogenicity domain). Структурно-функциональный анализ показал, что мутация в позиции 42 снижает проявление симптомов и накопление вириода, мутация в позиции 64 уменьшает ингибирование роста. В целом мутационные эксперименты позволили определить позиции, значимо влияющие на репликацию

геномной РНК и проявление симптомов поражения у растений-хозяев (Kitabayashi et al., 2020). В настоящее время имеются данные о воздействии тех или иных мутаций на структуру РНК вириода и ее функциональные особенности, что в перспективе позволит выявить регуляторные сайты и их мишени в клетках растений-хозяев. Так, в работе (Wu J. et al., 2019) показана связь между петлей 27 (позиции 177–182 в геномной РНК), сходной со структурным элементом в 3'-НТП мРНК гистонов животных, и способностью реплицироваться в клетках растений и транспортироваться между разными типами клеток.

Вироиды являются перспективной моделью для исследования физико-химической организации регуляторных и каталитических РНК и малоизученного мира РНК-зависимой регуляции клеточных процессов. В частности, во вторичной структуре ВВКК расположены 17 пар G/U, многие из которых консервативны и важны для репликации и системного распространения по растению (Wu J. et al., 2020). Интересно, что механизмы процессинга РНК вириода достаточно эволюционно консервативны; например, искусственные конструкции на основе ВВКК способны формировать кольцевые формы РНК в *Saccharomyces cerevisiae* (Friday et al., 2017).

При репликации геномной РНК вириодов часто происходят ошибки, приводящие к появлению популяции молекул РНК с различной структурой (квазивиды). В работе (Adkar-Purushothama et al., 2020) были определены 10 наиболее часто встречающихся вариантов нуклеотидной последовательности геномной РНК ВВКК в различных временных точках после инокуляции растений томата. Важно отметить, что через 7 дней после инокуляции только 25 % молекул геномной РНК ВВКК соответствовали исходной матрице, однако эта доля увеличилась до 70 % через 14 дней и оставалась на том же уровне спустя 28 дней. По-видимому, в ходе репликации возникает большое разнообразие структурных вариантов, некоторые из которых способны вносить вклад как в развитие симптомов поражения, так и в ингибирование экспрессии генов растения-хозяина, контролирующих защитный ответ (Adkar-Purushothama et al., 2020). Сравнительный анализ уровня накопления мутаций в геномной РНК показал, что у вириодов, реплицирующихся в пластидах, он значительно выше (1/800–1/1000 нуклеотидов), чем у вириодов, реплицирующихся в ядре (например, для ВВКК – 1/3800–1/7000) (López-Carrasco et al., 2017).

Исследования по оценке устойчивости РНК вириода к мутациям важны для понимания молекулярных механизмов его репликации и контроля жизненного цикла. В ра-

боте (Więsyk et al., 2017) при внесении 3–4 нуклеотидных делеций или инсерций в три позиции в составе геномной РНК ВВКК в двух случаях нарушалась способность к репликации, тогда как в одном случае она сохранялась, но молекула теряла стабильность. Анализ популяции молекул РНК этого варианта вироида в растениях томата показал не только реверсию к исходной форме, но и появление десяти новых генетически стабильных форм, отличающихся от исходной мастер-копии. По-видимому, при сохранении способности к репликации вироид обладает высоким потенциалом к отбору эффективных инфекционных форм (Więsyk et al., 2017).

Вироиды способны передаваться как вертикально (через генеративные клетки зараженного растения), так и горизонтально (с пылью зараженного растения). ВВКК может передаваться вертикально при формировании макроспор, некоторые другие вироиды, такие как вироид болезни «планта махо» у томатов (tomato planta macho viroid, TPMVd), передаются с пылью, вызывая системную инфекцию растения-реципиента (Matsushita et al., 2018). Исследование структуры геномной РНК этого вироида показало, что домены terminal left (TL) и pathogenicity (P) отвечают, в частности, за горизонтальный перенос (Yanagisawa et al., 2019). Характерно, что вироид переносился в растения томата с пылью инфицированных растений петунии, т. е. оплодотворение для горизонтального переноса патогена не является необходимым (Yanagisawa, Matsushita, 2018).

Механизмы патогенеза, иммунный ответ и РНК-интерференция

Исследование растений картофеля на разных стадиях после инокуляции ВВКК показало, что содержание жасмоновой кислоты значительно увеличено в листьях, кастастерона – в листьях и корнях. Количество индол-3-уксусной кислоты увеличено только в клубнях, различий в содержании салициловой и абсцизовой кислот не зафиксировано. В дополнение вироид индуцировал продукцию активных форм кислорода, что сопровождалось увеличением активности антиоксидантов (Milanović et al., 2019). При анализе метаболома растений томата в ответ на инфицирование ВВКК были обнаружены существенные изменения в содержании 79 метаболитов, относящихся к 23 метаболическим путям, в том числе путям синтеза защитных веществ (Bagherian et al., 2016).

Молекулярные механизмы, определяющие степень тяжести симптомов поражения растений разными штаммами ВВКК, остаются малоизученными. Известно, что выраженность симптомов зависит также от генотипа растений и условий окружающей среды. Сравнительный анализ транскриптома листьев томата при инокуляции сильно- и слабопатогенными штаммами ВВКК выявил в совокупности наличие более 3000 дифференциально-экспрессирующихся генов, большая часть которых была выявлена только при инокуляции сильнопатогенным штаммом. В обоих случаях у растений активировался системный иммунный ответ, но при инфекции сильнопатогенным штаммом степень выраженности была существенно выше. Аналогичным образом, проявление симптомов в последнем случае может быть связано с

изменениями в экспрессии генов транскрипционного фактора C2C2-GATA и фактора-регулятора роста (GRF) (Więsyk et al., 2020). Сходные результаты были получены при сравнительном анализе транскриптомов корней томата, инокулированных сильно- и слабопатогенными штаммами вироида ВВКК: помимо индукции иммунного ответа, значительные изменения наблюдались в экспрессии генов, контролирующих синтез лигнина, формирование клеточной стенки, участников сигнальных путей ауксина и цитокинина (Góra-Sochacka et al., 2019). В целом механизмы индукции иммунного ответа у растений на вироид требуют дополнительного исследования, так как отсутствуют чужеродные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) (Zheng et al., 2017; Nath et al., 2020).

Сама по себе репликация вироида не обязательно приводит к выраженным фенотипическим проявлениям, и разные штаммы ВВКК могут сильно различаться по этому параметру. Вероятно, изменения фенотипа растений при репликации вироида могут быть связаны с индукцией РНК-интерференции и супрессией генов растения-хозяина, в структуре мРНК которых есть сегменты гомологии с РНК вироида. То есть собственно симптомы заболевания при инфицировании вироидом могут быть связаны с супрессией отдельных генов растения, участвующих в контроле морфогенеза, физиологических и биохимических функций. Ниже перечислены несколько работ, в которых приведены данные в пользу этой гипотезы.

У картофеля ВВКК вызывает угнетение роста, морфологические aberrации листьев и клубней, потери урожая. В статье Bao et al. (2019) показано, что ВВКК-индуцированные малые РНК связаны с супрессией гена *StTCP23*, принадлежащего к семейству транскрипционных факторов TCP (teosinte branched1/Cycloidea/Proliferating cell factor). мРНК *StTCP23* содержит в составе 3'-НТП сегмент размером 21 нуклеотид, комплементарный региону VMR (virulence-modulating region) в геномной РНК штамма ВВКК RG1. При экспериментальном моделировании супрессии гена *StTCP23* с помощью искусственных микроРНК в трансгенных растениях (как и при применении других технологий экспериментальной РНК-интерференции) появлялся фенотип, близкий к симптомам поражения вироидом, причем степень выраженности симптомов была пропорциональна уровню снижения транскрипционной активности гена-мишени. Функции гена *StTCP23* связаны с регуляторным контуром гиббереллиновой кислоты, что имеет непосредственное отношение к росту растений и морфогенезу клубня (Bao et al., 2019).

В работе Flores et al. (2020) показано, что система РНК-интерференции в клетках растений генерирует vd-sRNAs (viroid-derived small RNAs), которые способны связываться с белками группы Argonaute и инактивировать мРНК-мишени. Репликация ВВКК происходит в ядре, в этом случае vd-sRNAs появляются на поздних стадиях развития инфекции, в рамках системного ответа в разных частях растения, в случае reach latent mosaic viroid (PLMVd), который реплицируется в пластидах, vd-sRNAs появляются на раннем этапе и локально в месте инокуляции (Flores et al., 2020).

В исследовании Adkar-Purushothama et al. (2018) одна из vd-sRNAs ВВКК была способна ингибировать экспрессию гена, кодирующего FRIGIDA-like protein 3 у томата, так как в этой мРНК есть гомологичный участок. К числу симптомов при инфицировании томата сильнопатогенными штаммами ВВКК относится индукция раннего цветения. Экспериментальное снижение экспрессии гена-мишени vd-sRNAs ВВКК подтвердило эту взаимосвязь (Adkar-Purushothama et al., 2018). По-видимому, участки гомологии в составе РНК вириода или промежуточных репликативных форм способны ингибировать экспрессию и других генов растений-хозяев (например, (Adkar-Purushothama, Perreault, 2018)).

Как и в случае РНК-содержащих вирусов, РНК-интерференция является способом контроля вириода. Супрессия генов, кодирующих белки Dicer 2 и Dicer 4 у растений томата, приводит к увеличению накопления РНК вириода и усиливает степень поражения. Интересно, что отсутствие этих белков снижает способность растений контролировать синтез активных форм кислорода, что сказывается также на иммунном ответе (Suzuki et al., 2019).

В структуре мРНК эукариот помимо белок-кодирующей части (открытой рамки считывания, CDS) выделяют 5'- и 3'-концевые нетранслируемые последовательности (НТП). 5'-НТП играет важную роль в контроле процесса инициации трансляции, в то время как функции 3'-НТП могут быть связаны с контролем цитоплазматической стабильности индивидуальных мРНК (Кочетов и др., 2002, 2004; Kochetov, Sarai, 2004; Kochetov et al., 2004; Volkova, Kochetov, 2010; Ventoso et al., 2012). В качестве адресной нуклеотидной последовательности для РНК-интерференции при конструировании двуцепочечных РНК можно использовать более протяженные 3'-НТП мРНК гена-мишени. В отличие от белок-кодирующих участков, они в большинстве случаев не являются эволюционно консервативными, что расширяет диапазон имеющихся возможностей для селективного видоспецифического «выключения» отдельных генов. Этот подход может использоваться как для предотвращения развития симптомов заболевания (при удалении сегмента гомологии между РНК ВВКК и 3'-НТП мРНК гена-мишени с помощью геномного редактирования), так и для индукции РНК-интерференции против РНК ВВКК (Кочетов и др., 2004).

Биоинформатические методы идентификации и анализа вириодов

Появление технологий массового секвенирования дало мощный толчок новым методам исследования вириодов, поскольку появилась возможность проводить массовый анализ их нуклеотидных последовательностей. Следует отметить, что биоинформатические методы идентификации и анализа вириодов на основе высокопроизводительного секвенирования во многом опираются на подходы, которые были разработаны ранее для анализа вирусных метагеномов (Burger, Magee, 2015; Resman et al., 2017). При этом необходимо принимать во внимание, что между различными группами вирусов растений существуют значительные различия в организации генетического материала, так же как и между вирусами и вириодами.

Например, группа В, к которой принадлежит ВВКК, отличается от другой группы вириодов, А, по первичной и вторичной структуре и механизму репликации. Однако между вирусами и вириодами существуют и общие черты.

В частности, изучение вирусных сообществ осложнено тем, что вирусные популяции в тканях зараженного организма неоднородны, что в основном связано с низкой точностью репликации. Это неизбежно приводит к высокому уровню мутаций и, как следствие, к высокой вариабельности даже в пределах одной и той же популяции, состоящей из так называемых квазивидов вируса. Аналогичные особенности характерны и для вириодов (Brass et al., 2017). Поэтому с точки зрения биоинформатического анализа идентификация и реконструкция последовательностей вирусов и вириодов в значительной степени зависят от подходов к предсказанию структуры последовательностей *de novo*, а не только базируются на сопоставлении с референсной нуклеотидной последовательностью из банка данных. Учитывая, что отделить вирусные матрицы от клеточных затруднительно, при секвенировании требуется высокий уровень покрытия. В качестве альтернативы рассматривается возможность обогащения выделенного транскрипта вирусными РНК (Roossinck, 2012). Иными словами, проекты, нацеленные на характеристику вирусных/вириодных метагеномов у растений, могут стать очень дорогостоящими, поскольку они основаны на секвенировании полных ДНК или РНК-библиотек, в которых вирусный материал может составлять небольшую часть.

Для обнаружения и анализа вириодных последовательностей применяют следующие направления их исследований (Wu Q. et al., 2015).

1. Анализ транскриптомов растений, в составе которых содержатся РНК вирусов и вириодов.
2. Анализ полиморфизмов нуклеотидной последовательности в популяции молекул вириода в транскриптоме одного организма.
3. Анализ полиморфизмов в структуре геномной РНК вириода в популяциях растений.

Для решения проблемы увеличения доли РНК вирусов в транскриптомных библиотеках предложены подходы, основанные на деплеции (обеднении) последовательностей полного транскриптома за счет некоторых его фракций, которые не содержат РНК вирусов/вириодов. К таким фракциям относят, как правило, малые РНК или рибосомальные РНК растений. В работе (Resman et al., 2017) исследовалась возможность использования методов высокопроизводительного секвенирования для идентификации широкого спектра вирусных и вириодных последовательностей у растений. Сравнивались два подхода к подготовке библиотек РНК растений: обедненных по содержанию малых РНК или по содержанию рибосомальных РНК. Анализировались девять образцов транскриптомов инфицированных вирусами растений (включая томат, табак, горох и др.). Авторы показали, что доля прочтений вирусной/вириодной фракции среди секвенированных последовательностей существенно зависит от вида растения-хозяина и от самого вируса. В одних случаях более продуктивным оказалось обеднение по содержанию малых РНК, в других – по рибосомным РНК. В случае

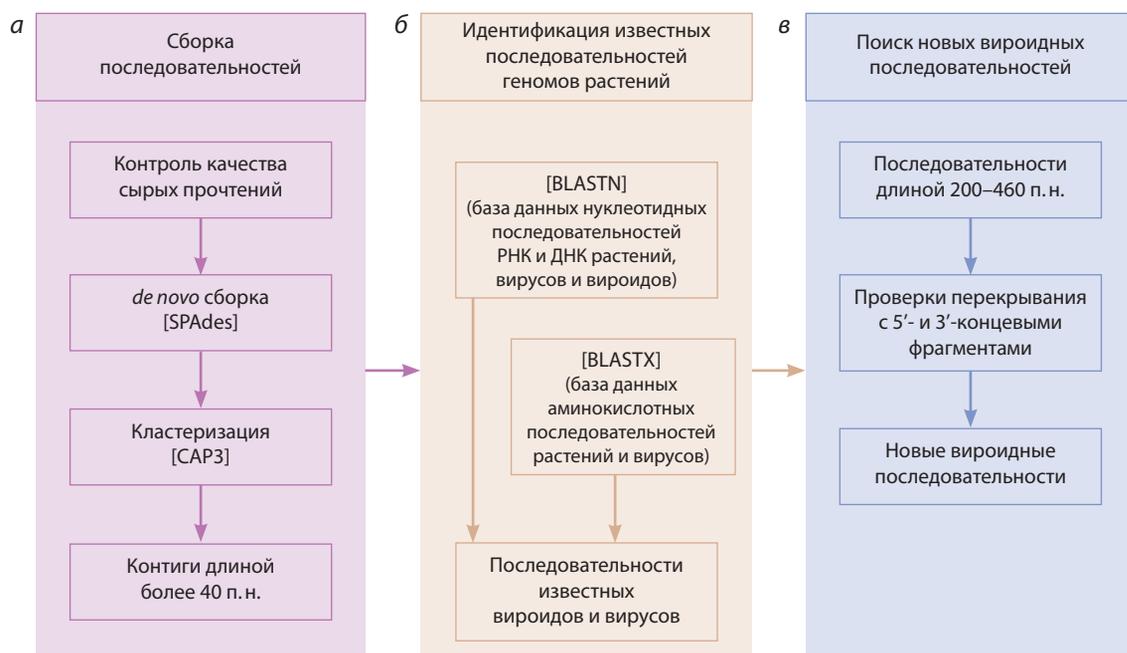


Схема вычислительного конвейера VSD для идентификации вирусных и вироидных последовательностей в транскриптах растений.

Конвейер делится на три этапа: а – сборка последовательностей *de novo*; б – идентификация известных последовательностей вироидов и вирусов растений; в – поиск новых вироидных последовательностей. Адаптировано с рис. 1 из работы (Barrero et al., 2017).

идентификации вирусных последовательностей методом картирования, для хорошей идентификации полных геномов вирусов было достаточно прочтений объемом в 10 млн нуклеотидов. При этом деплеция по малым РНК продуктивна для идентификации вирусов с геномом из одноцепочечной ДНК и вироидов, тогда как деплеция по содержанию рРНК более эффективна при идентификации вирусов с РНК-геномами, за исключением вируса *Y* картофеля. Считается, что стратегия сборки транскриптома *de novo* предпочтительна для обнаружения новых вирусов по сравнению с выравниванием прочтений на известные вирусные последовательности.

Для идентификации вироидов на основе анализа секвенированных фрагментов транскриптома Barrero с коллегами (Barrero et al., 2017) предложили вычислительный конвейер VSD (Viral Surveillance and Diagnosis). Этот пакет программ направлен на идентификацию последовательностей вирусов и вироидов в транскриптах растений, полученных с помощью секвенирования короткими прочтениями (21–24 нуклеотида). Он включает несколько функциональных блоков (см. рисунок). Первый блок направлен на сборку последовательностей транскриптома из коротких прочтений. На этом этапе прочтения подвергаются удалению адаптеров и отфильтровываются по качеству прочтения. Затем происходит сборка последовательностей *de novo* из коротких фрагментов с помощью программы SPAdes (Bankevich et al., 2012). После этого полученные контиги дополнительно кластеризуют и сливают с помощью программы CAP3 (Huang, Madan, 1999). На этом этапе сборки заканчивается. Для дальнейшего анализа отбирают контиги длиной более 40 нуклеотидов.

Следующим этапом анализа является идентификация в собранном пуле транскриптов нуклеотидных последовательностей, соответствующих геномам растений, вирусов и вироидов. Эту процедуру осуществляют с помощью программы BLASTN (Altschul et al., 1997) с применением специально подготовленных баз данных нуклеотидных последовательностей (включают последовательности РНК и ДНК растений, вирусов и вироидов). Дополнительно с помощью программы BLASTX (Altschul et al., 1997) производят поиск последовательностей, предположительно кодирующих белки растений и вирусов.

На третьем этапе анализа производится поиск новых вироидных последовательностей, отсутствующих в базах данных. Для этого последовательности длиной 200–460 п. н., которые не обнаружили сходства с уже известными последовательностями, проверяют на существование кольцевых форм, при наличии которых наблюдается перекрытие их 5'- и 3'-концевых фрагментов. Те из них, которые обнаруживают такое перекрытие, считаются кандидатами на новые вироидные последовательности.

Метод идентификации последовательностей вироидов в транскриптах растений с помощью картирования коротких прочтений на референсные последовательности вироидов предложен Brass с коллегами (Brass et al., 2017). Для этого использовался стандартный протокол биоинформатического анализа: удаление адаптерных последовательностей и поли-А трактов программами PrinSeq (Schmieder, Edwards, 2011) и TRIMMOMATIC (Bolger et al., 2014), фильтрация прочтений по качеству, выравнивание прочтений на геном вироида программой SEGEMehl (Otto et al., 2014). С помощью подобного подхода были выявлены полиморфизмы в последовательностях вироидов.

дов. Авторы разработали также метод реконструкции полиморфных вариантов последовательностей виридов на основе метода анализа графов (Brass et al., 2017). Это позволило идентифицировать уникальные последовательности квазивидов в пуле виридных последовательностей, алгоритм был применен для анализа трех наборов данных по транскриптоматомата: транскриптом сорта 'Heinz 1706', подверженному заражению ВВКК (варианты QFA, C3, AS1); транскриптом сорта Rutgers, также пораженный ВВКК (варианты М, I); транскриптомы четырех сортов, инфицированных ВВКК (вариант RG). Полученные данные позволили оценить динамику эволюции виридов с помощью модели Эйгена для квазивидов.

Список литературы / References

Анненков Б.Г. Проблемы и перспективы влияния оздоровительных мероприятий на продуктивность Дальневосточного картофелеводства. В: Актуальные проблемы иммунитета, оздоровления и защиты сельскохозяйственных растений в российском Приамурье. (Науч. тр. ДВНИИСХ). Хабаровск, 2000;26-42.

[Annenkov B.G. Problems and prospects of the influence of curative measures on the potato industry performance in the Russian Far East. In: Topical Issues of Crop Immunity, Sanitation, and Protection in the Russian Amur Region. Khabarovsk, 2000;26-42. (in Russian)]

Кочетов А.В., Сырник О.А., Рогозин И.Б., Глазко Г.В., Комарова М.Л., Шумный В.К. Контекстная организация 5'-нетранслируемых районов генов высших растений. *Молекуляр. биология.* 2002;36(4):649-656.

[Kochetov A.V., Sirmnik O.A., Rogozin I.B., Glazko G.V., Komarova M.L., Shumny V.K. Contextual features of higher plant mRNA 5'-untranslated regions. *Mol. Biol.* 2002;36(4):510-516. DOI 10.1023/A:1019852427093.]

Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифонова Е.А., Шумный В.К. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловый супрессор гена пролиндегидрогеназы. *Генетика.* 2004;40(2):282-285.

[Kochetov A.V., Titov S.E., Kolodiaznaia Ya.S., Komarova M.L., Koval V.S., Makarova N.N., Ily'inskyi Yu.Yu., Trifonova E.A., Shumny V.K. Tobacco transformants bearing antisense suppressor of proline dehydrogenase gene, are characterized by higher proline content and cytoplasm osmotic pressure. *Russ. J. Genet.* 2004; 40(2):216-218. DOI 10.1023/B:RUGE.0000016999.53466.e1.]

Adkar-Purushothama C.R., Bolduc F., Bru P., Perreault J.-P. Insights into potato spindle tuber viroid quasi-species from infection to disease. *Front. Microbiol.* 2020;11:1235. DOI 10.3389/fmicb.2020.01235.

Adkar-Purushothama C.R., Perreault J.-P. Alterations of the viroid regions that interact with the host defense genes attenuate viroid infection in host plant. *RNA Biol.* 2018;15(7):955-966. DOI 10.1080/15476286.2018.1462653.

Adkar-Purushothama C.R., Sano T., Perreault J.-P. Viroid-derived small RNA induces early flowering in tomato plants by RNA silencing. *Mol. Plant Pathol.* 2018;19(11):2446-2458. DOI 10.1111/mp.12721.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(17):3389-3402. DOI 10.1093/nar/25.17.3389.

Bagherian S.A.A., Hamzehzarghani H., Izadpanah K., Djavaheri M. Effects of potato spindle tuber viroid infection on tomato metabolic profile. *J. Plant Physiol.* 2016;201:42-53. DOI 10.1016/j.jplph.2016.06.014. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27393919.

Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D.,

Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012;19(5): 455-477. DOI 10.1089/cmb.2012.0021.

Bao S., Owens R.A., Sun Q., Song H., Liu Y., Eamens A.L., Feng H., Tian H., Wang M.-B., Zhang R. Silencing of transcription factor encoding gene *StTCP23* by small RNAs derived from the virulence modulating region of *potato spindle tuber viroid* is associated with symptom development in potato. *PLoS Pathog.* 2019;15(12): e1008110. DOI 10.1371/journal.ppat.1008110.

Barrero R.A., Napier K.R., Cunnington J., Liefing L., Keenan S., Frampton R.A., Szabo T., Bulman S., Hunter A., Ward L., Whattam M., Bellgard M.I. An internet-based bioinformatics toolkit for plant biosecurity diagnosis and surveillance of viruses and viroids. *BMC Bioinform.* 2017;18(1):26. DOI 10.1186/s12859-016-1428-4.

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.

Brass J.R., Owens R.A., Matoušek J., Steger G. Viroid quasispecies revealed by deep sequencing. *RNA Biol.* 2017;14(3):317-325. DOI 10.1080/15476286.2016.1272745.

Burger J.T., Maree H.J. Metagenomic next-generation sequencing of viruses infecting grapevines. *Methods Mol. Biol.* 2015;1302:315-330. DOI 10.1007/978-1-4939-2620-6_23. PMID: 25981264.

Flores R., Navarro B., Delgado S., Serra P., Di Serio F. Viroid pathogenesis: a critical appraisal of the role of RNA silencing in triggering the initial molecular lesion. *FEMS Microbiol. Rev.* 2020;44(3):386-398. DOI 10.1093/femsre/fuaa011.

Friday D., Mukkara P., Owens R.A., Baumstark T., Bruist M.F. Processing of potato spindle tuber viroid RNAs in yeast, a nonconventional host. *J. Virol.* 2017;91(24):e01078-17. DOI 10.1128/JVI.01078-17.

Góra-Sochacka A., Więsyk A., Fogtman A., Lirski M., Zagórski-Ostojka W. Root transcriptomic analysis reveals global changes induced by systemic infection of *Solanum lycopersicum* with mild and severe variants of potato spindle tuber viroid. *Viruses.* 2019;11(11):992. DOI 10.3390/v11110992.

Huang X., Madan A. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 1999;9:868-877. DOI 10.1101/gr.9.9.868.

Kitabayashi S., Tsushima D., Adkar-Purushothama C.R., Sano T. Identification and molecular mechanisms of key nucleotides causing attenuation in pathogenicity of dahlia isolate of potato spindle tuber viroid. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(19):7352. DOI 10.3390/ijms21197352.

Kochetov A.V., Kolchanov N.A., Sarai A. Interrelations between the efficiency of translation start sites and other sequence features of yeast mRNAs. *Mol. Genet. Genom.* 2004;270(5):442-447. DOI 10.1007/s00438-003-0941-0.

Kochetov A.V., Sarai A. Translational polymorphism as a potential source of plant proteins variety in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics.* 2004;20(4):445-447. DOI 10.1093/bioinformatics/btg443.

López-Carrasco A., Ballesteros C., Sentandreu V., Delgado S., Gago-Zachert S., Flores R., Sanjuán R. Different rates of spontaneous mutation of chloroplastic and nuclear viroids as determined by high-fidelity ultra-deep sequencing. *PLoS Pathog.* 2017;13(9):e1006547. DOI 10.1371/journal.ppat.1006547.

Matsushita Y., Yanagisawa H., Sano T. Vertical and horizontal transmission of Pospiviroids. *Viruses.* 2018;10(12):706. DOI 10.3390/v10120706.

Milanović J., Oklestkova J., Majdandžić A., Novák O., Mihaljević S. Organ-specific differences in endogenous phytohormone and antioxidative responses in potato upon PSTVd infection. *J. Plant Physiol.* 2019;232:107-114. DOI 10.1016/j.jplph.2018.10.027.

Nath V.S., Shrestha A., Awasthi P., Mishra A.K., Kocábek T., Matoušek J., Sečnik A., Jakše J., Radišek S., Hallan V. Mapping the gene expression spectrum of mediator subunits in response to viroid infection in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(7):2498. DOI 10.3390/ijms21072498.

- Otto C., Stadler P.F., Hoffmann S. Lacking alignments? The next-generation sequencing mapper segemehl revisited. *Bioinformatics*. 2014; 30(13):1837-1843. DOI 10.1093/bioinformatics/btu146.
- Pecman A., Kutnjak D., Gutiérrez-Aguirre I., Adams I., Fox A., Boonham N., Ravnikar M. Next generation sequencing for detection and discovery of plant viruses and viroids: comparison of two approaches. *Front. Microbiol.* 2017;8:1998. DOI 10.3389/fmicb.2017.01998.
- Roossinck M.J. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annu. Rev. Genet.* 2012;46:359-369. DOI 10.1146/annurev-genet-110711-155600.
- Schmieder R., Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011;27(6):863-864. DOI 10.1093/bioinformatics/btr026.
- Srivastava S., Prasad V. Viroids: small entities with a mean punch. In: Awasthi L.P. (Ed.) *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies*. Academic Press, 2020;209-226. DOI 10.1016/B978-0-12-818654-1.00016-5.
- Suzuki T., Ikeda S., Kasai A., Taneda A., Fujibayashi M., Sugawara K., Okuta M., Maeda H., Sano T. RNAi-mediated down-regulation of Dicer-like 2 and 4 changes the response of 'money-maker' tomato to potato spindle tuber viroid infection from tolerance to lethal systemic necrosis, accompanied by up-regulation of miR398, 398a-3p and production of excessive amount of reactive oxygen species. *Viruses*. 2019;11(4):344. DOI 10.3390/v11040344.
- Ventoso I., Kochetov A., Montaner D., Dopazo J., Santoyo J. Extensive translational remodeling during ER stress response in mammalian cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e35915.
- Volkova O.A., Kochetov A.V. Interrelations between the nucleotide context of human start AUG codon, N-end amino acids of the encoded protein and initiation of translation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2010;27(5):611-618. DOI 10.1080/07391102.2010.10508575.
- Więsyk A., Candresse T., Zagórski-Ostoja W., Góra-Sochacka A. Viability and genetic stability of potato spindle tuber viroid mutants with indels in specific loops of the rod-like secondary structure. *Virus Res.* 2017;240:94-100. DOI 10.1016/j.virusres.2017.07.024.
- Więsyk A., Lirski M., Fogtman A., Zagórski-Ostoja W., Góra-Sochacka A. Differences in gene expression profiles at the early stage of *Solanum lycopersicum* infection with mild and severe variants of potato spindle tuber viroid. *Virus Res.* 2020;286:198090. DOI 10.1016/j.virusres.2020.198090.
- Wu J., Leontis N.B., Zirbel C.L., Bisaro D.M., Ding B. A three-dimensional RNA motif mediates directional trafficking of *Potato spindle tuber viroid* from epidermal to palisade mesophyll cells in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS Pathog.* 2019;15(10):e1008147. DOI 10.1371/journal.ppat.1008147.
- Wu J., Zhou C., Li J., Li C., Tao X., Leontis N.B., Zirbel C.L., Bisaro D.M., Ding B. Functional analysis reveals G/U pairs critical for replication and trafficking of an infectious non-coding viroid RNA. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(6):3134-3155. DOI 10.1093/nar/gkaa100.
- Wu Q., Ding S.W., Zhang Y., Zhu S. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2015; 53:425-444. DOI 10.1146/annurev-phyto-080614-120030.
- Yanagisawa H., Matsushita Y. Differences in dynamics of horizontal transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Potato spindle tuber viroid* after pollination with viroid-infected pollen. *Virology*. 2018;516:258-264. DOI 10.1016/j.virol.2018.01.023.
- Yanagisawa H., Sano T., Hase S., Matsushita Y. Influence of the terminal left domain on horizontal and vertical transmissions of tomato planta macho viroid and potato spindle tuber viroid through pollen. *Virology*. 2019;526:22-31. DOI 10.1016/j.virol.2018.09.021.
- Zheng Y., Wang Y., Ding B., Fei Z. Comprehensive transcriptome analyses reveal that potato spindle tuber viroid triggers genome-wide changes in alternative splicing, inducible trans-acting activity of phased secondary small interfering RNAs, and immune responses. *J. Virol.* 2017;91(11):e00247-17. DOI 10.1128/JVI.00247-17.

ORCID ID

A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181
A.Y. Pronozin orcid.org/0000-0002-3011-6288
D.A. Afonnikov orcid.org/0000-0001-9738-1409
O.S. Afanasenko orcid.org/0000-0001-7368-0797

Благодарности. Обзор подготовлен в рамках гранта РФФ 20-46-07001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.11.2020. После доработки 25.01.2021. Принята к публикации 28.01.2021.

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

Методические подходы создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.)

Т.Р. Григолова , А.В. Вишнякова, А.А. Сеницына, А.В. Воронина, О.Н. Зубко, О.В. Зудова, С.Г. Монахос

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия
 grigolava1@gmail.com

Аннотация. Производство удвоенных гаплоидов *in vitro* – актуальный биотехнологический способ ускоренного создания родительских линий для селекции гибридов F1. В отличие от классического инбридинга время создания гомозиготных линий свеклы (*Beta vulgaris*) с помощью технологии удвоенных гаплоидов сокращается с пяти–шести до двух поколений. Гиногенез является наиболее распространенным биотехнологическим методом производства удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы. Протоколы производства удвоенных гаплоидов для видов *B. vulgaris* немногочисленны и разработаны в основном для сахарной свеклы (*B. vulgaris* convar. *saccharifera* Alef.). Наибольший успех достигнут в производстве удвоенных гаплоидов сахарной свеклы гиногенезом в культуре изолированных семязачатков. Для столовой свеклы (*B. vulgaris* convar. *esculenta* Salisb.) проведены единичные исследования с показанной низкой эффективностью производства гаплоидных растений андро- и гиногенезом. В итоге протоколы производства удвоенных гаплоидов столовой свеклы отсутствуют, а протоколы, разработанные для сахарной свеклы, неэффективны для столовой, несмотря на принадлежность к одному виду. Исследования производства удвоенных гаплоидов путем андрогенеза у представителей рода *Beta* активно проводились в 70–80-х гг. прошлого столетия и не закончились получением растений-регенерантов, однако в настоящее время среди ученых снова возник интерес к данному методу и в разных странах возобновлены работы по изучению андрогенеза у представителей рода *Beta*. Статья содержит обзор исследований, посвященных созданию удвоенных гаплоидов; обсуждение подходов решения основных проблем при получении удвоенных гаплоидов и методов, позволяющих повысить выход эмбрионидов и растений-регенерантов, а также удвоенных гаплоидов у растений вида *B. vulgaris*.
Ключевые слова: *Beta vulgaris*; гаплоидные технологии; гиногенез; культура микроспор; эмбриогенез; удвоенные гаплоиды.

Для цитирования: Григолова Т.Р., Вишнякова А.В., Сеницына А.А., Воронина А.В., Зубко О.Н., Зудова О.В., Монахос С.Г. Методические подходы создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):276–283. DOI 10.18699/VJ21.031

Methodological approaches for producing doubled haploids in sugar beet and red beet (*Beta vulgaris* L.)

T.R. Grigolava , A.V. Vishnyakova, A.A. Sinitsyna, A.V. Voronina, O.N. Zubko, O.V. Zudova, S.G. Monakhos

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia
 grigolava1@gmail.com

Abstract. The *in vitro* production of doubled haploids is a biotechnological path of an accelerated development of parental lines in F1-hybrid breeding programs. Unlike the traditional inbreeding method requiring 5 to 6 generations to reach a sufficient homozygosity of lines, the number of generations to produce pure lines of beet by haploid technologies is reduced to 2. The production of doubled haploids by gynogenesis is the most common biotechnological approach in sugar and red beets. Protocols for the production of doubled haploids for *B. vulgaris* species are few and have been developed mainly for sugar beets. There are no protocols for the production of doubled haploids for red beet (*B. vulgaris* convar. *esculenta* Salisb.), and the protocols developed for sugar beet (*B. vulgaris* convar. *saccharifera* Alef.) are ineffective for red beet, even though these two crops belong to the same species. The greatest success has been achieved in the production of doubled haploids by gynogenesis through isolated ovule culture, especially in sugar beet. Studies on the production of doubled haploids by androgenesis were actively carried out in the 1970s and 1980s and did not lead to the production of regenerated plants. However, at present, there is renewed interest among researchers in this approach, and scientists in different countries are conducting studies of *Beta vulgaris* androgenesis through isolated microspore culture. This article provides an overview of studies devoted to the production of doubled haploids, addressing the main problems of doubled haploid technologies, and methods to increase the frequency of embryogenesis and doubled haploid plant formation in *B. vulgaris* crops.
Key words: *Beta vulgaris*; haploid technology; gynogenesis; microspore culture; embryogenesis; doubled haploids.

For citation: Grigolava T.R., Vishnyakova A.V., Sinitsyna A.A., Voronina A.V., Zubko O.N., Zudova O.V., Monakhos S.G. Methodological approaches for producing doubled haploids in sugar beet and red beet (*Beta vulgaris* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):276–283. DOI 10.18699/VJ21.031

Введение

Представители вида *B. vulgaris* относятся к ценным овощным (свекла столовая), кормовым (свекла кормовая) и техническим (свекла сахарная) культурам. В настоящее время основным направлением селекции большинства сельскохозяйственных растений является создание гетерозисных гибридов F1 на основе подбора и скрещивания гомозиготных родительских линий. Традиционный метод создания гомозиготных линий для двулетней культуры свеклы – самоопыление и отбор на протяжении минимум 4–6 поколений, что требует 8–12 лет (De La Fuente et al., 2013). Длительное время получения родительских линий – один из существенных недостатков селекции гибридов F1. Технологии производства удвоенных гаплоидов позволяют сократить процесс создания чистых линий свеклы до 3–5 лет (Zhuzhzhhalova et al., 2020). Существенное преимущество технологии производства удвоенных гаплоидов – возможность добиться полной гомозиготности в одном поколении. Еще одно преимущество гаплоидных технологий – проявление рецессивных аллелей у гаплоидных растений, замаскированных в гетерозиготном состоянии у диплоидных растений, что облегчает выявление, оценку и отбор растений с полезными признаками (Doctrinal et al., 1989; Klimek-Chodacka, Baranski, 2013).

Удвоенные гаплоиды сельскохозяйственных растений производят *in vivo* путем партеногенеза или *in vitro* в культуре изолированных микроспор, пыльников, неоплодотворенных семязачатков и др. (Palmer, Keller, 2005). Среди способов производства удвоенных гаплоидов *B. vulgaris*, в частности свеклы сахарной, наиболее распространена технология культивирования неоплодотворенных семязачатков (гиногенез).

Гиногенез – достаточно простая, но трудоемкая технология с выходом эмбриоидов у наиболее отзывчивых генотипов до 15 штук на 100 культивируемых семязачатков сахарной свеклы (Wremmerth, Levall, 2003). Кроме того, не исключено появление клонов материнского растения из соматических клеток, окружающих зародышевый мешок, что делает необходимым разработку оперативных методов дифференциации гомо- и гетерозигот с отбором первых среди растений-регенерантов. Технология изолированных микроспор позволила бы избежать необходимость генетического анализа, т. к. андрогенные растения-регенеранты, полученные из изолированных микроспор, априори имеют гаплоидный статус.

Технология культивирования изолированных микроспор и микроспор в пыльниках свеклы долгое время считалась неэффективной, и исследователям удавалось получить лишь каллус или проэмбриоидные структуры без дальнейшей регенерации либо соматические клоны (Banba, Tanabe, 1972; Goska, Rogozinska, 1981; Van Geyt et al., 1985; Herrmann, Lux, 1988a). В 2017 г. польские исследователи получили эмбриониды свеклы столовой в культуре изолированных микроспор и пыльников, однако неукорененные розетки листьев погибли (Gorecka et al., 2017).

Цель обзора – обобщить данные о различных подходах производства удвоенных гаплоидов культур вида *B. vulgaris*, обозначить основные проблемы и пути их решения.

Развитие технологий производства удвоенных гаплоидов у рода *Beta*

Первые гаплоиды сахарной свеклы обнаружил в 1945 г. А. Levan (1945), позже об аналогичных открытиях сообщали К. Zimmermann (1953), Н.Е. Fischer (1956), Th. Butterfass (1959), А. Kruse (1961) и В.Л. Hammond (1966). Гаплоиды были выделены из четырех видов материала: 1) потомство растений, обработанных полиплоидизирующими агентами; 2) потомство, полученное из семян ди- или анизоплоидных сортов; 3) потомство, полученное вегетативным размножением диплоидных, цитоплазматически мужскистерильных растений; 4) из растений анизоплоидной сахарной свеклы.

Работа по экспериментальному получению гаплоидов сахарной свеклы начата Н. Bosermark (1971): при опылении стерильных диплоидных растений свеклы пыльцой тетраплоидных растений в потомстве ученый обнаружил около 0.2 % гаплоидов. К попыткам производства гаплоидов с помощью отдаленной гибридизации вернулись в 1983 г. в Чехословакии: I. Seman скрещивал мужскистерильные растения свеклы сахарной со свеклой салатной, выход гаплоидов составил 0.013 % (Seman, 1983). А. Buchter-Larsen (1986) предложил оригинальный способ производства гаплоидов: комбинировал опыление облученной пыльцой и последующее спасение зародышей, однако практически все растения оказывались гетерозиготными по одному или нескольким признакам. Спасение зародышей, полученных от опыления пыльцой других видов *Beta*, привело к относительно большому выходу негаплоидных растений (Buchter-Larsen, 1986). Так как данный метод обеспечивал низкий выход гаплоидов и был крайне трудоемким, исследователи оставили попытки производства удвоенных гаплоидов *in vivo*.

Андрогенез – простой и эффективный способ производства гаплоидов *in vitro* у многих культур, у рода *Beta* исследователи тоже попытались создать гаплоиды с применением культуры изолированных пыльников. Первые попытки производства гаплоидов сахарной свеклы *in vitro* предприняты Н. Banba и Н. Tanabe (1972): при культивировании изолированных пыльников они получили одно растение, происхождение (соматический клон или гаплоид) которого не указано. М. Goska и J.H. Rogozinska (1981) продолжили исследования по культивированию изолированных пыльников сахарной свеклы и получили растения, которые были неандрогенными.

D. Hoesmans и D. Bossoutrot (1983) занимались разработкой питательных сред для культивирования изолированных семязачатков и проводили цитологические исследования развивающихся на питательных средах семязачатков, которые показали, что наиболее склонны к развитию *in vitro* семязачатки, содержащие зрелый 7-ядерный зародышевый мешок. Исследователи получили 17 гаплоидных растений из 7237 изолированных семязачатков сахарной свеклы из мужскистерильных донорных растений.

Ученые неоднократно возвращались к попыткам создать гаплоидные растения свеклы, культивируя пыльники или изолированные микроспоры, однако получить полноценные растения-регенеранты либо не удавалось (Van

Geyt et al., 1985; Gorecka et al., 2017; Гонтаренко, Герасименко, 2018), либо они не были гаплоидами (Herrmann, Lux, 1988a). Поэтому главным методом производства гаплоидов сахарной и столовой свеклы стал гиногенез.

Основной объем исследований по изучению гиногенеза выполнен на сахарной свекле. Исследователи изучали влияние на выход эмбриоидов и регенерантов таких факторов, как тип и концентрация фитогормонов (D'Halluin, Keimer, 1986; Herrmann, Lux, 1988b; Ferrant, Bouharmont, 1994; Подвигина, 2003; Wremerth, Levall, 2003; Pazuki et al., 2018b), холодовая предобработка бутонов и семязачатков (Herrmann, Lux, 1988b; Svirshchevskaya, Dolezel, 2000; Подвигина, 2003; Pazuki et al., 2018b), шоковая стимуляция повышенными температурами изолированных семязачатков (Baranski, 1996; Wremerth, Levall, 2003), время введения семязачатков в культуру *in vitro* (Lux et al., 1990; Baranski, 1996), расположение бутонов на соцветии (D'Halluin, Keimer, 1986; Doctrinal et al., 1989; Подвигина, 2003) и др.

Гиногенез столовой свеклы менее исследован, изучением этой темы занимался R. Baranski (1996), который анализировал влияние гормонального состава питательных сред и температуры культивирования изолированных семязачатков на выход эмбриоидов и каллуса, а также влияние сезона года и места выращивания маточников (теплица/поле) на выход регенерантов. Ученый показал, что выход регенерантов выше из материала, отобранного с растений, выращенных в теплице, по сравнению с материалом, полученным от растений в открытом грунте, при этом различий между материалом, полученным с маточных растений весной и летом, не отмечено.

Факторы, влияющие на эффективность производства гаплоидов в культуре изолированных семязачатков

Процесс производства гаплоидов определяется на генетическом уровне, но реализуется в зависимости от физиологических условий и индуцирующих факторов, что прямо сказывается на проценте выхода регенерантов (Baranski, 1996; Подвигина, 2003). Основными факторами являются генотипические особенности растений-доноров, стадии развития женского гаметофита, расположение бутона на соцветии.

Высокую значимость имеют экзогенные факторы, оказывающие влияние на регенерационную способность культивируемых семязачатков. К таким факторам относят процентное соотношение регуляторов роста в питательных средах, сезон и продолжительность выращивания (возраст) растений-доноров, холодовую и рентгеновскую обработку бутонов, температуру и условия культивирования изолированных семязачатков (Van Geyt et al., 1987; Lux et al., 1990; Gurel et al., 2000).

Среди факторов, влияющих на успех эмбриогенеза, генотип считается наиболее значимым. Исследователи отмечают, что наиболее отзывчивы при введении в культуру изолированных семязачатков материалы гибридного и линейного происхождения – инцухт-линии, гибриды и сибсы, а самую низкую регенерационную способность имеют линии на основе ЦМС и сорта-популяции (Gurel et al., 2000; Подвигина, 2003).

У рода *Beta* исследования количества генов, контролирующей склонность генотипов к формированию эмбриоидов *in vitro*, не проводили, что, вероятно, связано с низкой отзывчивостью генотипов и трудоемкостью используемых методов производства гаплоидов. Выявить отзывчивые генотипы можно только экспериментальным путем. Маркерным признаком отзывчивого генотипа сахарной свеклы может выступать наличие аномальных структур в мужском гаметофите (аномальных пыльцевых зерен и микроспор), вызванных нарушением функции веретена деления, нерегулярным образованием каллозной перегородки, отсутствием цитокинеза в ходе мейоза (Подвигина, 2003).

Определенное значение при индуцировании гаплоидов сахарной свеклы имеют месторасположение отбираемых бутонов на соцветии и стадии развития зародышевых мешков. Наибольшей регенерационной активностью характеризуются неоплодотворенные семязачатки из бутонов с 1-го по 25-й снизу вверх от цветка в средней части соцветия, кроме того, максимальный выход гаплоидов отмечается с центрального побега и побегов первого порядка по сравнению с ветвями второго порядка (D'Halluin, Keimer, 1986; Doctrinal et al., 1989; Подвигина, 2003). Способность изолированных семязачатков к эмбриогенезу сохраняется на всех этапах развития женского гаметофита, однако 7- и 8-ядерные зародышевые мешки наиболее отзывчивы к эмбриогенезу и легче переходят с гаметофитного пути развития на спорофитный (Van Geyt et al., 1987; Подвигина, 2003). Маркерными признаками 7- и 8-ядерной стадий развития зародышевого мешка семязачатка для изолирования и введения в культуру *in vitro* являются наличие одноядерных микроспор и двух-, трехядерной пыльцы в пыльниках, находящихся с семязачатками в одном бутоне (Подвигина, 2003). Обнаружить бутоны с необходимой стадией развития женского гаметофита можно за 1–5 дней до цветения.

Подготовка донорных растений

Выращивание и подготовка донорных растений – один из важнейших этапов технологии производства удвоенных гаплоидов свеклы. Донорные растения должны быть достаточно мощными и здоровыми, чтобы давать экспланты высокого качества. W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) рекомендуют еженедельно вносить растворы макро- и микроэлементов под донорные растения для формирования мощных маточников. Выращивать растения-доноры большинство исследователей советуют в условиях теплиц или климатических камер, чтобы минимизировать воздействие неблагоприятных погодных факторов и поражение вредителями (Lux et al., 1990; Baranski, 1996; Gurel, 2000; Wremerth, Levall, 2003). Однако в исследованиях О.А. Подвигиной (2003) наибольшей регенерационной способностью обладали семязачатки, отобранные с растений, выращенных в поле.

Выращивать донорные растения рекомендуют летом, семязачатки с таких растений более отзывчивы на культивирование *in vitro* по сравнению с семязачатками растений, выращенных в осенне-зимний сезон (Lux et al., 1990; Baranski, 1996). О.А. Подвигина (2003) сделала интересное наблюдение о связи регенерационной способно-

сти семязачатков и погодных условий в период введения в культуру – при резких колебаниях дневных и ночных температур воздуха увеличивался выход гаплоидных проростков.

Индукция эмбриогенеза в культуре изолированных семязачатков

У *B. vulgaris* для стимуляции эмбриогенеза используют тепловую обработку бутонов и изолированных семязачатков: чаще всего проводят предобработку бутонов при пониженных температурах – 4–6 °С в течение 5 сут, с последующим культивированием изолированных семязачатков в термошкафу при температуре 28–32 °С (Lux et al., 1990; Baranski, 1996; Gurel et al., 2000; Подвигина, 2003; Wremerth, Levall, 2003). А. Pazuki и коллеги (2018b) показали, что обработка соцветий в течение 7 дней при 4 °С может стимулировать эмбриогенез у семязачатков, далее изолированные семязачатки культивировали при 27±2 °С в климатической камере с 18-часовым фотопериодом. О.А. Подвигина (2003) культивировала при 4 °С в течение 5 сут непосредственно изолированные семязачатки сахарной свеклы, что стимулировало их развитие даже на безгормональной среде В5, однако наибольший выход наблюдался при их культивировании на среде В5 с добавлением 2 мг/л гиббереллина.

О.А. Подвигина (2003) для стимуляции эмбриогенеза использовала предобработку семязачатков рентгеновскими лучами. Исследования показали, что выход гаплоидных регенерантов зависел от дозы рентгеновского облучения, максимальный выход составил 5.3 % при дозе обработки 3000 рентген, увеличение дозы облучения до 5000 рентген стимулирующего эффекта не оказало и привело к возникновению нежелательных мутаций.

Культивировать изолированные семязачатки при повышенных положительных температурах до появления эмбриоидов рекомендуют многие авторы (Lux et al., 1990; Baranski, 1996; Wremerth, Levall, 2003), однако встречаются исследования о культивировании изолированных семязачатков при более низких температурах (Baranski, 1996; Подвигина, 2003). О.А. Подвигина (2003) культивировала изолированные семязачатки свеклы сахарной при температуре 21–26 °С и показала, что оптимальной является температура 23–25 °С. W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) разработали протокол производства удвоенных гаплоидов сахарной свеклы – оптимальной для культивирования изолированных семязачатков, по мнению авторов, следует считать температуру 30±2 °С, максимальный выход эмбриоидов у самых отзывчивых генотипов составил 15 %. R. Baranski (1996) проводил исследования по влиянию температуры культивирования изолированных семязачатков столовой свеклы на выход эмбриоидов. Ученый установил, что температура 25 °С оказалась наименее благоприятной для развития и выход регенерантов из семязачатков составил 4 %; между температурой 27 и 32 °С значительных различий в выходе регенерантов не наблюдалось, выход составил 12.7 и 11.3 % соответственно.

Инкубирование изолированных семязачатков обычно проводят в темноте до появления эмбриоидов/каллуса, после чего их помещают в отдельные культуральные сосуды и культивируют на свету.

Состав питательной среды для индукции эмбриогенеза

Условия культивирования изолированных семязачатков влияют как на количество регенерантов (эмбриоидов и каллуса), так и их качество. Правильный подбор питательных сред является важным условием производства гаплоидных растений в культуре изолированных семязачатков.

Исследователи используют различные питательные среды для культивирования изолированных семязачатков: MS, N6, В5. Чаще всего применяют твердые питательные среды MS и В5 с добавлением различных регуляторов роста. На жидких средах культивировали семязачатки Н. Lux с коллегами (1990) и Е.Н. Васильченко и сотрудники (2017). Е.Н. Васильченко с коллегами при исследовании влияния консистенции питательных сред показали, что на жидкой питательной среде активизировался процесс пролиферации ядер и клеток женского гаметофита, что оказывало воздействие на инициацию новообразований, а при переносе полученных структур на твердые среды наблюдалась индукция гаплоидных регенерантов.

Для гелирования питательных сред для культуры изолированных семязачатков свеклы обычно используют агар, агарозу и фитагель. В основном для культуры изолированных семязачатков применяют среды с добавлением агара или агарозы (Baranski, 1996; Подвигина, 2003; Wremerth, Levall, 2003). W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) рекомендуют использовать агарозу в качестве гелеобразователя на эмбриоиндукционной питательной среде в протоколе по созданию удвоенных гаплоидов сахарной свеклы и агар – для гелирования побего- и корнеиндукционных сред. В исследованиях (Gurel et al., 2000; Васильченко и др., 2017; Pazuki et al., 2017) отмечается положительное влияние фитагеля в концентрации 2–3 г/л на эмбриогенез и регенерацию: его преимущество состоит в низких расходе и стоимости при эффекте, аналогичном агару.

Наиболее существенное влияние на развитие эксплантов оказывает гормональный состав питательных сред (Seman, Farago, 1990; Gurel et al., 2000; Подвигина, 2003). Различают пять направлений развития неоплодотворенных изолированных семязачатков:

1. Из семязачатка формируется один эмбриоид (прямая регенерация).
2. Клетки семязачатков неорганизованно делятся, в результате чего появляется каллусная ткань, из которой формируются вторичные эмбриоиды.
3. Перерождение первичного регенеранта в каллусоподобную структуру и дальнейшая вторичная регенерация через образование адвентивных побегов.
4. Формирование неморфогенного каллуса.
5. Развитие аморфных структур, перерождение первичного регенеранта в каллусоподобное образование без дальнейшей регенерации (Seman, Farago, 1990; Подвигина, 2003).

О.А. Подвигина (2003) и Е.Н. Васильченко с коллегами (2017) указывают, что добавление в питательную среду гиббереллина (2 мг/л) вызывает эмбриоидогенез, а присоединение к гиббереллину ауксинов (ИМК) и цитокининов (6-БАП и кинетина) стимулирует рост каллуса наряду с эмбриоидами и морфогенез через все возможные направления развития изолированных семязачатков.

W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) рекомендуют использование ступенчатого культивирования изолированных семязачатков на средах с различными комбинациями и концентрациями регуляторов роста. На первых этапах культивирования используют среды с добавлением 0.5 мг/л 2.4-Д и 0.3 мг/л 6-БАП с целью вызвать эмбрио- или каллусогенез.

В качестве источника углеводов в питательную среду добавляют сахарозу, однако нет единого мнения о необходимом количестве сахарозы в питательной среде – ее концентрация варьирует в пределах 30–100 г/л в зависимости от технологии. S. Gurel и коллеги предлагают добавлять сахарозу в питательную среду для эмбриогенеза сахарной свеклы в концентрации 100 г/л (Gurel et al., 2000; Pazuki et al., 2018a, b). R. Baranski (1996) использовал для индукции гиногенеза столовой свеклы питательные среды с добавлением сахарозы в концентрации 60 г/л. W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) для производства удвоенных гаплоидов сахарной свеклы добавляли 80 г/л сахарозы в эмбриоиндукционную среду и 20 г/л в побегоиндукционную. H. Lux с коллегами (1990) добавляли 100 г/л сахарозы в эмбриоиндукционную среду и 20 г/л в среду для регенерации. Выход эмбриоидов сильно варьирует в пределах каждого исследования, что затрудняет выбор оптимальной концентрации углеводов в питательной среде, однако во всех работах прослеживается общая тенденция: для индукции эмбриогенеза используют среды с повышенным содержанием углеводов, а для регенерации – с уменьшенным.

S. Gurel и сотрудники (2000) сообщают, что добавление в питательную среду 0.5 % активированного угля существенно увеличивает выход эмбриоидов (в среднем по генотипам с 3.3 до 12.8 %), а Е.Н. Васильченко с коллегами (2017) указывают, что добавление 3 г/л активированного угля негативно влияет на развитие растений-регенерантов сахарной свеклы, что может быть обусловлено адсорбцией гормональных веществ из сред. При этом Е.Н. Васильченко рекомендует использование активированного угля на этапе укоренения, что позволяет значительно увеличить выход укорененных растений благодаря адсорбции фенольных соединений, ингибирующих корнеобразование.

При изучении индуцированного эмбриогенеза столовой свеклы R. Baranski (1996) выявил, что наибольший выход регенерантов наблюдается на питательной среде N6 (by Chu), где при использовании сочетания 0.5 мг/л ИУК и 0.2 мг/л 6-БАП максимальный выход регенерантов составил 8.3 %.

Регенерация растений

Одним из наиболее значимых этапов создания удвоенных гаплоидов является регенерация растений из эмбриоидов и/или каллуса. Исследователи получают растения-регенеранты либо на той же питательной среде, на которой культивируют семязачатки (Baranski, 1996), либо используют среды с иными концентрациями и видами регуляторов роста (Подвигина, 2003; Wremerth, Levall, 2003; Васильченко и др., 2017).

О.А. Подвигина (2003) указывает, что гаплоидные растения на первых этапах развития характеризуются слабым ростом и жизнеспособностью, что обусловлено их

гаплоидным статусом. Гибель растений на этом этапе может достигать 45.5 % в зависимости от генотипа растения-донора. Для увеличения выхода растений-регенерантов предложено ввести этап стабилизации гаплоидов, включающий последовательное культивирование регенерантов на средах без добавления гормонов и ростовых веществ, содержащих гиббереллин, 6-БАП и ИМК. Несколько пассажей с чередованием культивирования на гормональных и безгормональных средах позволило снизить избыточную концентрацию гормонов в тканях гаплоидов и стимулировать их к дальнейшей регенерации. Также в ходе исследования отмечено, что способность гаплоидных регенерантов адаптироваться к смене сред зависела от генетических особенностей донорного растения.

W.E. Wremerth и M.W. Levall (2003) для решения проблемы жизнеспособности развивающихся растений-регенерантов разработали технологию ступенчатого культивирования регенерантов сахарной свеклы, полученных из изолированных семязачатков. Для регенерации побегов из эмбриоидов сахарной свеклы рекомендуют использовать питательные среды MS с содержанием кинетина (0.2 мг/л) и ИУК (0.1 мг/л), в состав предукореняющей среды MS входят кинетин в концентрации 0.5 мг/л и ИМК в концентрации 0.55 мг/л. Для укоренения розеток следует применять 1/2 среды MS с высокой концентрацией ИМК (5.5 мг/л). А. Pazuki и коллеги (2018a) изучили влияние добавления антистрессового агента – аминокислоты пролин – на побего- и корнеобразование у растений-регенерантов сахарной свеклы, полученных из изолированных семяпочек. Добавление в питательные среды 0.2 и 0.3 мМ пролина стимулировало активное побегообразование и более быстрое укоренение растений в сравнении с полным отсутствием пролина или его концентрацией в среде 0.1 и 0.4 мМ.

Полиплоидизация

Клетки регенерирующих из семязачатков растений могут быть гаплоидными, диплоидными, полиплоидными и встречаться в одном регенеранте в различных соотношениях. Уровень спонтанной диплоидизации у изученных образцов сахарной свеклы значительно варьирует: по данным S. Gurel и сотрудников (2000), в проведенных исследованиях только 5 % растений подверглись спонтанной диплоидизации; M. Goska (1997) получил от 2 до 10 % диплоидных растений сахарной свеклы, а в работах M. Tomaszewska-Sowa (2010) на средах с добавлением кинетина формировалось до 93.8 % диплоидных растений.

Достоверных данных о факторах, влияющих на степень спонтанной диплоидизации гаплоидов, нет, поэтому необходимо переводить полученные гаплоидные растения на диплоидный уровень. Для удвоения хромосомного набора гаплоидных растений-регенерантов, как правило, используют колхицин (Gurel et al., 2000; Подвигина, 2003). Обработку гаплоидных растений *in vivo* проводят раствором колхицина в точке роста корнеплода или цветения, погружением корней в раствор колхицина или в условиях *in vitro*, культивируя на питательных средах, содержащих мутаген (Подвигина, 2003). Время обработки и концентрация мутагена могут быть разными: S. Gurel и коллеги (2000) рекомендуют удваивать количество хро-

мосом, помещая гаплоидные растения на питательную среду с добавлением колхицина в концентрации 5 г/л на 5 мин. По данным О.А. Подвигиной (2003), при добавлении колхицина в питательную среду в концентрации 0.05 % с экспозицией двое суток уровень диплоидизации составил 83.3 %.

Миксоплоидность – характерное для меристем сахарной свеклы явление (Харечко-Савицкая, 1940; Yudanov et al., 2004; Lukaszewska, Sliwinska, 2007), усложняющее определение уровня плоидности полученных растений.

Уровень плоидности растений можно определить не только прямым подсчетом числа хромосом в клетках меристем, но и по косвенному показателю – числу хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (Yudanov et al., 2004). Однако число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц может зависеть не только от уровня плоидности, но и способа размножения (самоопыление или скрещивание). Например, у диплоидного гетерозисного гибрида сахарной свеклы среднее число хлоропластов может быть 12–15 шт. на клетку, тогда как у самоопыленных образцов среднее число хлоропластов на клетку составляет около 18 шт., что делает данный косвенный метод недостоверным (Малецкий и др., 2013).

Проблему определения уровня плоидности растений-регенерантов свеклы решают применением проточной цитометрии (Васильченко и др., 2017; Gorecka et al., 2017) или методом абсорбционной цитофотометрии (Yudanov et al., 2004).

Некоторые исследователи (Подвигина, 2003; Tomaszewska-Sowa, 2010) считают целесообразным выделять гаплоидные растения по фенотипу: гаплоидные растения сильно отличаются от диплоидных – имеют многочисленные мелкие узкие листья и меньший габитус по сравнению с диплоидами.

Технология культуры изолированных микроспор и пыльников: состояние и перспективы

Андрогенез, по сравнению с гиногенезом, является менее трудоемким способом, так как не требует изоляции мелких семязачатков вручную. Культура изолированных микроспор позволяет избежать формирования соматических клонов – как в случае гиногенеза (из тканей, окружающих зародышевый мешок). В связи с этим исследования в этой области являются перспективными, однако у рода *Beta* подобные работы проводились редко и были малоуспешны.

Производство гаплоидов в культуре изолированных пыльников и микроспор успешно применяют у многих видов растений, однако индукция гаплоидии в культуре изолированных пыльников или микроспор сахарной и столовой свеклы приводила только к появлению проэмбрионных структур, которые иногда формировали каллус и/или корни. Ранние попытки производства гаплоидов в культуре пыльников сахарной свеклы не привели к получению андрогенных растений (Banba, Tanabe, 1972; Goska, Rogozinska, 1981; Van Geyt et al., 1985; Herrmann, Lux, 1988a). Одной из вероятных причин неудачи всех исследователей может являться наличие амилопластов в пыльцевых зернах, что ингибирует андрогенез из-за повы-

шенного содержания крахмала в пластидах одноядерных микроспор (Sangwan, Sangwan-Norreel, 1987). Возможность элиминации крахмальных зерен в микроспорах столовой свеклы изучали К. Gorecka и сотрудники (2017), для чего исследовали два варианта обработки. В первом случае проводили полив растений-доноров раствором гиббереллина в концентрации 50 мг/л по 250 мл на одно растение дважды в неделю, что привело к увеличению выхода андрогенных регенерантов только у одного из образцов, в то время как у других образцов выход эмбриоидов не изменился, а у одного генотипа регенерация отсутствовала вовсе. Во втором случае изолированные пыльники выдерживали в растворе альфа-амилазы в концентрации 3 мг на 80 мл H₂O (из ячменного солода типа VIII-A, Sigma-Aldrich) в течение 2 мин, а затем переносили на среду для индукции андрогенеза, что привело к формированию двух эмбриоидов у двух генотипов. Получить растения исследователям не удалось, так как регенерировавшие розетки чернели и погибали. С аналогичной проблемой столкнулись М. Klimek-Chodacka и R. Baranski (2013) на некоторых генотипах столовой свеклы в культуре неоплодотворенных семязачатков, что связывают с генотип-специфичностью.

К. Gorecka и коллеги (2017) получили каллус в культуре изолированных микроспор и пыльников столовой свеклы. Авторы установили, что бутоны длиной 1.3–1.5 мм содержат около 80 % микроспор одноядерной стадии развития и около 15 % двуядерной стадии, что наиболее оптимально для культуры изолированных микроспор и пыльников у большинства культур. Лучшей питательной средой для культивирования пыльников и микроспор авторы указали В5 с добавлением 100 г/л сахарозы и 100 мг/л 2,4-Д. При цитологическом исследовании полученных образцов каллуса и розеток уровень плоидности составил 4х, что говорит о неоднократной эндоредупликации в каллусной ткани.

С.М. Гонтаренко и Г.М. Герасименко (2018) в культуре изолированных пыльников у сахарной свеклы смогли получить эмбриоиды, выход которых составил 0.15–0.92 %. Авторы определили, что оптимальной стадией развития микроспор для культуры пыльников следует считать одноядерную. Показали, что предобработка эксплантов с использованием низкотемпературного стресса (4–8 °С) в течение 3–15 сут служит фактором, инициирующим переход микроспор с гамето- на спорофитный путь развития, тогда как предобработка высокими температурами (30–32 °С) не дает положительных результатов. Наиболее подходящей питательной средой для культуры пыльников оказалась MS половинной концентрации с добавлением ряда витаминов (В1 – 10 мг/л, В6 – 1 мг/л, РР – 1 мг/л, С – 1 мг/л) и аминокислот (глутаминовой – 250–500 мг/л, аспарагиновой – 30–50 мг/л, тирозина – 1–10 мг/л, аргинина – 2–10 мг/л, гидроксипролина – 2–4 мг/л).

Заключение

Создание гомозиготных линий с помощью гаплоидных технологий востребовано селекционерами по всему миру. Главным преимуществом гаплоидных технологий по сравнению с методами традиционной селекции является сокращение времени производства чистых линий и затрат

на многолетнее культивирование и самоопыление растений. Наиболее разработанной технологией производства линий удвоенных гаплоидов свеклы на настоящий момент следует считать технологию изолированных семязачатков, которая протестирована преимущественно на сахарной свекле. Данная технология создания чистых линий более трудоемкая по сравнению с технологией культуры изолированных микроспор, однако последняя практически не применима при получении удвоенных гаплоидов свеклы в силу недостатка исследований на эту тему. В связи с этим можно рекомендовать проведение исследований и разработку технологии создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы в культуре изолированных микроспор.

Список литературы / References

- Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П., Ващенко Т.Г., Землянчукина О.А., Карпеченко Н.А., Подвигина О.А. Особенности формирования гаплоидных регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro*. *Вестник Воронежского государственного аграрного университета*. 2017;3(54):57-66. DOI 10.17238/issn2071-2243.2017.3.57.
- [Vasilchenko E.N., Zhuzhhalova T.P., Vashchenko T.G., Zemlyanukhina O.A., Karpechenko N.A., Podvigina O.A. Peculiarities of *in vitro* reproduction of sugar beet haploid regenerants. *Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Vestnik of Voronezh State Agrarian University*. 2017;3(54):57-66. DOI 10.17238/issn2071-2243.2017.3.57. (in Russian)]
- Гонтаренко С.М., Герасименко Г.М. Прямий індуцираний андрогенез у культурі *in vitro* буряків цукрових (*Beta vulgaris* L.). *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(4):375-381. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900.
- [Gontarenko S.M., Gerasimenko G.M. Direct induced androgenesis in culture *in vitro* in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018;14(4):375-381. DOI 10.21498/2518-1017.14.4.2018.151900. (in Ukrainian)]
- Малецкий С.И., Юданова С.С., Малецкая Е.И. Гармонические пропорции числа хлоропластов в популяциях замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(1):72-80.
- [Maletskii S.I., Yudanova S.S., Maletskaya E.I. Harmonic proportions of chloroplast number in stomata of guard cell populations in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(1):72-80. (in Russian)]
- Подвигина О.А. Теоретическое обоснование и приемы использования методов биотехнологии в селекции сахарной свеклы: автореф. дис. ... д-ра с/х наук. Воронеж. 2003.
- [Podvigina O.A. Theoretical substantiation and biotechnology methods in sugar beet breeding: Dr Sci. (Agric.) Dissertation. Voronezh, 2003. (in Russian)]
- Харечко-Савицкая Е.И. Цитология и эмбриология сахарной свеклы. Свекловодство. Киев, 1940.
- [Kharechko-Savitskaya E.I. Cytology and embryology of sugar beet. Beet growing. Kiev, 1940. (in Russian)]
- Banba H., Tanabe H. A study of anther culture in sugar beet. *Bull. Sugar Beet Res.* 1972;14:9-16.
- Baranski R. *In vitro* gynogenesis in red beet (*Beta vulgaris* L.): effects of ovule culture conditions. *Acta Soc. Bot. Pol. Tow. Bot.* 1996; 65(1-2):57-60. DOI 10.5586/asbp.1996.010.
- Bosemark N. Haploids and homozygous diploids, triploids and tetraploids in sugar beet. *Hereditas*. 1971;69:193-204.
- Buchter-Larsen A. *In situ* Induction af Haploide Embryoner pa Sukkerroer efterfulgt af *In vitro* Embryokultur. Thesis, Acad. Technical Sciences. Copenhagen, 1986.
- Butterfass Th. Ploidie und Chloroplastenzahlen. *Ber. Dtsch. bot. ges.* 1959;72:440-451.
- De La Fuente G.N., Frei U.K., Lübberstedt T. Accelerating plant breeding. *Trends Plant Sci.* 2013;18:667-672. DOI 10.1016/j.tplants.2013.09.001.
- Doctrinal M., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1989; 17:1-12. DOI 10.1007/BF00042276.
- D'Halluin K., Keimer B. Production of haploid sugar beets (*Beta vulgaris* L.) by ovule culture. In: Genetic Manipulation in Plant Breeding. Berlin, 1986. DOI 10.1515/9783110871944.
- Ferrant V., Bouharmont J. Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. *Sex. Plant Reprod.* 1994;7:12-16. DOI 10.1007/BF00241883.
- Fischer H.E. Untersuchungen an Zwillingen von *Beta vulgaris* L. *Der Züchter*. 1956;26:136-152. DOI 10.1007/BF00710616.
- Gorecka K., Kryzanowska D., Kowalska U., Kiszczak W., Podwyszynska M. Development of embryoids by microspore and anther cultures of red beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*). *J. Cent. Eur. Agric.* 2017;18(1):185-195. DOI 10.5513/JCEA01/18.1.1877.
- Goska M. Monografie i Rozprawy Naukowe. Haploidy i Podwojone Haploidy Buraka Cukrowego (*Beta vulgaris* L.) oraz Możliwości Ich Wykorzystania w Hodowli. Radzików: Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 1997.
- Goska M., Rogozinska J.H. Recent results on obtaining beet haploids through *in vitro* culture of anthers. *Biuletyn Inst. Hodowli i Aklimatyzacji Roslin*. 1981;145:141-143.
- Gurel S., Gurel E., Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep.* 2000;19:1155-1159. DOI 10.1007/s002990000248.
- Hammond B.L. Homozygous diploid sugar beets. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 1966;14:75-78.
- Herrmann L., Lux H. Antherenkultur bei Zuckerruben, *Beta vulgaris* L. var *altissima*. *Arch. Zuchtungsforsch. Berlin*. 1988a;18(6):375-383.
- Herrmann L., Wetzel C., Lux H. Haploiden-technik bei der zuckerrube. *Potsdam Forsch. B.* 1988b;57:95-99.
- Hosemans D., Bossoutrot D. Induction of haploid plant from *in vitro* culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzucht.* 1983;91(1):74-77.
- Klimek-Chodacka M., Baranski R. Comparison of haploid and doubled haploid sugar beet clones in their ability to micropropagate and regenerate. *Electron. J. Biotechnol.* 2013;16(2):1-1. DOI 10.2225/vol16-issue2-fulltext-3.
- Kruse A. Haploids in polyembryos of beet, *Beta vulgaris* L. *Roy. Vet. Agric. Coll. Copenhagen: Yearb.* 1961;87-98.
- Levan A. A haploid sugar beet after colchicine treatment. *Hereditas*. 1945;31(3-4):399-410. DOI 10.1111/j.1601-5223.1945.tb02760.x.
- Lukaszewska E., Sliwinska E. Most organs of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) plants at the vegetative and reproductive stages of development are polysomatic. *Sex. Plant Reprod.* 2007;20:99-107. DOI 10.1007/s00497-007-0047-7.
- Lux H., Herrmann L., Wetzel C. Production on haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant Breed.* 1990; 104:177-183. DOI 10.1111/j.1439-0523.1990.tb00420.x.
- Palmer C.D., Keller W.A. Overview of haploidy. In: Haploids in Crop Improvement II. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005;56:3-9. DOI 10.1007/3-540-26889-8_1.
- Pazuki A., Aflaki F., Gürel S., Ergül A., Ekrem G. The effects of proline on *in vitro* proliferation and propagation of doubled haploid sugar beet (*Beta vulgaris*). *Turkish J. Bot.* 2018a;42(3):280-288. DOI 10.3906/bot-1709-14.
- Pazuki A., Aflaki F., Gürel E., Ergül A., Gürel S. Gynogenesis Induction in Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Improved by 6-Benzylaminopurine (BAP) and Synergized with Cold Pretreatment. *Sugar Tech.* 2018b;20:69-77. DOI 10.1007/s12355-017-0522-x.

- Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. Ultrastructural cytology of plastids in pollen grains of certain androgenic and nonandrogenic plants. *Protoplasma*. 1987;138:11-22. DOI 10.1007/BF01281180.
- Seman I. Possibilities of detection and induction of haploids in *Beta vulgaris* L. II *Biologia (Bratislava)*. 1983;38:1113-1122.
- Seman I., Farago J. *In vitro* cultivation of unfertilized ovules of sugar beet. Embryology and seed reproduction: XI Int. Symp. Leningrad, USSR, July 3-4, 1990. Leningrad, 1990;146.
- Svirshchevskaya A., Dolezel J. Production and Performance of Gynogenetic Sugarbeet Lines. *J. Sugar Beet Res. USA*. 2000;4(37):117-133.
- Śliwińska E., Łukaszewska E. Polysomaty in growing *in vitro* sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. *Plant Sci*. 2005;168:1067-1074. DOI 10.1016/j.plantsci.2004.12.003.
- Tomaszewska-Sowa M. Cytometric analyses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants regenerated from unfertilized ovules cultured *in vitro*. *Plant Breed*. 2010;2:231-235.
- Van Geyt J., D'Halluin K., Jacobs M. Induction of nuclear and cell divisions in microspores of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzucht*. 1985;95:325-335.
- Van Geyt J., Speckmann G.J., D'Halluin K., Jacobs M. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet*. 1987;73:920-925. DOI 10.1007/BF00289399.
- Wremeth W.E., Levall M.W. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Published protocols for other crop plant species. *Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual*. Kluwer Academic Publishers, 2003. DOI 10.1007/978-94-017-1293-4_38.
- Yudanov S.S., Maletskaya E.I., Maletskii S.I. Epiplastome Variation of the Number of Chloroplasts in Stomata Guard Cells of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Russ. J. Genet*. 2004;40(7):930-939. DOI 10.1023/B:RUGE.0000036525.14205.3f.
- Zhuzhhalova T.P., Kolesnikova E.O., Vasilchenko E.N., Cherkasova N.N. Biotechnological methods as a tool for efficient sugar beet breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(1):40-47. DOI 10.18699/VJ20.593.
- Zimmermann K. Vermendung haploider Pflanzen in der Zucht. *Ber. Deut. Bot. Ges*. 1953;66:28-30. DOI 10.1007/BF00710616.

ORCID ID

T.R. Grigolava orcid.org/0000-0002-1594-8430
A.V. Vishnyakova orcid.org/0000-0002-9160-1164
A.A. Sinitsyna orcid.org/0000-0002-9470-3676
A.V. Voronina orcid.org/0000-0003-0249-246X
O.N. Zubko orcid.org/0000-0001-9701-6647
O.V. Zudova orcid.org/0000-0001-5405-9460
S.G. Monakhos orcid.org/0000-0001-9404-8862

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-905 от 16 ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.10.2020. После доработки 28.12.2020. Принята к публикации 03.01.2021.

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

Проблемы селекции лабораторных мини-свиней

К.С. Шатохин

Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

✉ true_genetic@mail.ru

Аннотация. В статье представлен обзор проблем разведения и селекции лабораторных мини-свиней. Наиболее очевидные из них – отсутствие централизованного учета селекционных групп, единых стандартов отбора для воспроизводства и оценки племенных животных, а также минимизация накопления снижающих приспособленность мутаций и поддержание генетического разнообразия. По последним данным, в мире насчитывают не менее 30 селекционных групп мини-свиней, систематически используемых в качестве лабораторных животных. Среди них существуют как породные образования, представленные несколькими колониями, так и селекционные группы, состоящие из одного стада. Показано, что основная стратегия отбора включает селекцию на живую массу взрослых особей 50–80 кг и приспособленность животных к конкретному типу биомедицинских экспериментов. Для ее реализации в разведении зарубежных мини-свиней практикуют отбор по живой массе в 140- и 154-дневном возрасте. Указано, что в стадах мини-свиней представлены разные селекционные методы противодействия инбредной депрессии и поддержания генетического разнообразия. Примерами служат максимизация фенотипов масти, циклическая система подбора родительских пар и структурирование стад на субпопуляции. Кроме того, в разведении зарубежных мини-свиней для мониторинга гетерозиготности используют молекулярно-генетические методы. Количество инбредных скрещиваний в разведении лабораторных мини-свиней стараются минимизировать, что не всегда возможно из-за их малочисленности. Подсчитано, что во избежание тесного инбридинга численность селекционной группы должна быть не менее 28 особей, включающих хряков как минимум четырех генеалогических линий и свиноматок из не менее четырех семейств. Накопление генетического груза в стадах мини-свиней возможно, но вредоносный эффект является скорее следствием ошибочных решений селекционеров. Несмотря на то что при выведении ряда мини-свиней стояла цель укомплектовать стада исключительно белыми животными, в большинстве селекционных групп наблюдается полиморфизм по фенотипу масти.

Ключевые слова: лабораторные мини-свиньи; инбридинг; генетическое разнообразие; рецессивные мутации; отбор; линии; семейства; сельское хозяйство.

Для цитирования: Шатохин К.С. Проблемы селекции лабораторных мини-свиней. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):284-291. DOI 10.18699/VJ21.032

Problems of mini-pig breeding

K.S. Shatokhin

Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

✉ true_genetic@mail.ru

Abstract. This article provides an overview of some problems of the breeding and reproduction of laboratory mini-pigs. The most obvious of these are the lack of centralized accounting of breeding groups, uniform selection standards for reproduction and evaluation of breeding animals, as well as minimizing the accumulation of fitness-reducing mutations and maintaining genetic diversity. According to the latest estimates, there are at least 30 breeding groups of mini-pigs systematically used as laboratory animals in the world. Among them, there are both breed formations represented by several colonies, and breeding groups consisting of a single herd. It was shown that the main selection strategy is selection for the live weight of adults of 50–80 kg and the adaptation of animals to a specific type of biomedical experiments. For its implementation in the breeding of foreign mini-pigs, selection by live weight is practiced at 140- and 154-day-old age. It was indicated that different herds of mini-pigs have their own breeding methods to counteract inbred depression and maintain genetic diversity. Examples are the maximization of coat color phenotypes, the cyclical system of matching parent pairs, and the structuring of herds into subpopulations. In addition, in the breeding of foreign mini-pigs, molecular genetic methods are used to monitor heterozygosity. Every effort is made to keep the number of inbred crosses in the breeding of laboratory mini-pigs to a minimum, which is not always possible due to their small number. It is estimated that to avoid close inbreeding, the number of breeding groups should be at least 28 individuals, including boars of at least 4 genealogical lines and at least 4 families of sows. The accumulation of genetic cargo in herds of mini-pigs takes place, but the harmful effect is rather the result of erroneous decisions of breeders. Despite the fact that when breeding a number of mini-pigs, the goal was to complete the herds with exclusively white animals, in most breeding groups there is a polymorphism in the phenotype of the coat color.

Key words: laboratory mini-pigs; inbreeding; genetic diversity; recessive mutations; selection; lines; families; agriculture.

For citation: Shatokhin K.S. Problems of mini-pig breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):284-291. DOI 10.18699/VJ21.032

Введение

Несмотря на практичность лабораторного использования в сравнении с приматами и ряд морфофизиологических преимуществ перед другими лабораторными животными (Тихонов, 2010; Шатохин и др., 2019), мини-свиньи являются не самой популярной биологической моделью, уступая не только грызунам, но собакам, кошкам и обезьянам (Heining, Ruyschaert, 2016). Тем не менее, по разным данным, в мире насчитывают от 25 до 40 селекционных групп мини-свиней (Smith, Swindle, 2006; Köhn, 2011), из них две разводят в России (Станкова и др., 2017; Шатохин и др., 2019). Однако, несмотря на важность понимания селекции любого вида животных вне зависимости от их использования, вопросы разведения лабораторных мини-свиней освещены в незначительном количестве научных работ. Следствием недостаточного внимания к разведению и селекции мини-свиней стали нерешенные проблемы, основные из которых:

- 1) отсутствие централизованного учета поголовья лабораторных мини-свиней и системы регистрации специализированных стад как селекционных достижений;
- 2) отсутствие общепринятых стандартов отбора животных для воспроизводства, общероссийских нормативных документов по оценке лабораторных мини-свиней как племенных особей;
- 3) максимизация генетического разнообразия стад в условиях обеднения генофонда (дрейф генов, эффект бутылочного горлышка), оптимизация методов мониторинга и селекционного управления;
- 4) минимизация накопления снижающих приспособленность мутаций;
- 5) создание стад лабораторных мини-свиней, укомплектованных исключительно из животных белой масти.

Целью данной работы является анализ перечисленных проблем и предложение способов их решения.

Мировой генофонд лабораторных мини-свиней

На сегодняшний день сложно оценить численность мирового поголовья лабораторных мини-свиней, а также точное количество их пород, стад и селекционных групп. Основная трудность заключается в отсутствии единого органа учета лабораторных мини-свиней как объекта разведения. Например, согласно российскому законодательству, регистрация лабораторных мини-свиней затруднительна из-за их формального несоответствия критериям оценки пород и породных групп свиней в качестве селекционных достижений, в частности по однородности племенного поголовья (Методика проведения испытаний..., 2007). Специальных стандартов для них не предусмотрено. Регистрация возможна на сайте Американской ассоциации мини-свиней (<https://americanminipigassociation.com>), однако из 14 зарегистрированных пород в качестве лабораторных животных достоверно использовали только четыре селекционные группы.

Единственным доступным инструментом учета служат научные публикации, однако оценки количества имеющихся селекционных групп лабораторных мини-свиней разнятся, составляя от 21 до 45 (Smith, Swindle, 2006; Тихонов, 2010). Собственный подсчет лабораторных мини-

свиней указал на существование в мире 31 селекционной группы (табл. 1). Среди них как породные образования, представленные несколькими колониями (Hormel, Hanford, Göttingen, NIH, Yucatan), так и селекционные группы, состоящие из одного единственного стада (NIBS, мини-свиньи ИЦиГ СО РАН, светлогорские). При этом учитывали представителей вида *Sus scrofa* L. с живой массой взрослых особей не более 150 кг и указанием на систематическое использование в качестве модельного объекта за последние 10 лет (по состоянию на 2020 г.).

Принципы отбора племенных животных

Разведение лабораторных мини-свиней включает два основных вектора отбора: на небольшие размеры и низкую живую массу, а также пригодность к лабораторному использованию. Однако в отличие от заводских пород в селекции мини-свиней отсутствуют единые специально разработанные стандарты оценки животных по живой массе в раннем возрасте, экстерьеру, масти и комплексу признаков, необходимых для использования в наиболее распространенных типах биомедицинских экспериментов (Helke et al., 2016). При этом практически в каждом стаде представлен систематический подход к разведению со специфичными приемами, в том числе отбор по приспособленности к конкретному типу экспериментов (Itoh et al., 2016; Никитин и др., 2018). Зачастую используют оценку животных в раннем возрасте, 140–154-го дня (Miniature Swine Book of Normals, 2019; Simon, 2019). В некоторых частных зарубежных фермах практикуют отбор наиболее мелких особей из каждого гнезда¹, что в селекционной группе минисиб привело к снижению сохранности молодняка, сексуальной активности хряков и разрушению комплекса материнских качеств свиноматок (Nikitin et al., 2014).

Единственным общим принципом является отбор наиболее крепких, здоровых и пропорционально развитых животных с живой массой взрослых особей от 50 до 80 кг (Nunoya et al., 2007; Тихонов, 2010; Miniature Swine Book of Normals, 2019). Экстерьерные признаки вьетнамских мини-свиней, такие как слабая спина или раннее осаливание, российскими, европейскими и американскими заводчиками не приветствуются. Отечественные мини-свиньи, а также ряд зарубежных селекционных групп принятым стандартам соответствуют, однако отмечены отклонения как в большую, так и меньшую стороны (табл. 2). В последнее время набирает популярность выведение стад особо мелких свиней массой 30–50 кг, например немецких мини-свиней Aachen, американских Panepinto и корейских Micro-Pig® (см. табл. 2).

Поддержание генетического разнообразия

Проблема поддержания генетического разнообразия в популяциях одна из наиболее обсуждаемых в области генетики животных (Peripolli et al., 2017; Mable, 2019) и по ряду причин особенно актуальна для лабораторных мини-свиней. Первая причина – низкая численность стад, в которых риск обеднения генофонда из-за стохастических процессов существенно выше, нежели в крупных струк-

¹ Erasmus D. Pigs as pets: Breeding teacup pigs. Farmer's Weekly. 2013. <https://www.farmersweekly.co.za/animals/pigs-as-pets-breeding-teacup-pigs/>

Таблица 1. Список селекционных групп лабораторных мини-свиней

№ п/п	Название	Происхождение	Время и место выведения	Литературный источник
1	Aachen	Mini-Lewe × Vietnamese potbelly pig × Schwäbisch Hällisch Landpig × Hormel	Рейнско-Вестфальский технический университет Ахена (RWTH Aachen University), Германия	Pawlowsky et al., 2017
2	Bama	Местная мелкая порода	Китай	Zhang et al., 2016
3	Banna	Местная мелкая порода	Китай	Xin et al., 2013
4	Br1	Hormel	1964 г., Университет Сан-Паулу (Universidade de Sao Paolo), Сан-Паулу, Бразилия	Scheffer et al., 2013
5	Clawn Miniature Swine	Göttingen × Ohminy × Large white (крупная белая) × Landrace	1978 г., CLAWN Institute, Университет Кагосимы (Kagoshima University), Япония	Köhn, 2011
6	Diannan	Местная мелкая порода	Юньнаньский сельскохозяйственный университет (Yunnan Agricultural University), Китай	Cheng et al., 2016
7	Fuji Micra Inc.	Другие мини-свиньи, не уточняется	2009 г., Мияхара, Фудзиномия, Сидзуока, Япония	Maeda et al., 2016
8	Göttingen	Vietnamese potbelly pigs (gray) × Hormel × Vietnamese native spotted × Landrace	1960–1964 гг., Гёттингенский университет (Göttingen University), Германия	Simon, 2019
9	Guizhou	Местная мелкая порода	Центр лабораторных животных Медицинского университета Чунцина (Laboratory Animal Center of Chongqing Medical University), Чунцин, Китай	Xia et al., 2014
10	Hanford	Palose × Pitman-Moore	1958 г., Hanford laboratory, Вашингтон, США	Köhn, 2011
11	Hormel (Sinclair, Minnesota)	Piney Wood × Ras-n-Lansa × Catalina × Guam	1949 г., Институт Хормела, Университет Миннесоты (Hormel Institute, Minnesota University), США	Köhn, 2011; Miniature Swine Book of Normals, 2019
12	KCG	Kogata Chinese × Clawn × Göttingen	1991 г., National Livestock Breeding Center, Ibaraki Station, Independent Administrative Institution of Japan, Япония	Kobayashi et al., 2012
13	Lanyu	Местная мелкая порода	Taitung Animal Propagation Station, Livestock Research Institute, Тайвань, Китай	Chu, 2010; Chien et al., 2017
14	Lee-Sung	Lanyu × Landrace	1975 г., факультет зоотехнии и технологий, Национальный университет Тайваня (Department of Animal Science and Technology, National Taiwan University), Тайвань, Китай	Ju et al., 2019
15	MeLiM	Hormel × Landrace, Large White (крупная белая) × Cornwall × Vietnamese pigs × Göttingen	1967–2000 гг., Институт физиологии и генетики животных Академии наук Чешской Республики (Institute of Animal Physiology and Genetics of the Academy of Sciences of the Czech Republic), Либехов, Чехия	Horak et al., 2019
16	Mexican hairless mini (мексиканские безволосые)	Одичавшие мексиканские свиньи	–	Kobayashi et al., 2012
17	Micro-Pig®	Местная мелкая порода × Yucatan × Vietnamese potbellied pig × Pygmy pig × Meishan	Medi Kinetics Co., Ltd., Пхэнтхэк, Южная Корея	Jo et al., 2017
18	Micro-Yucatan	Yucatan	1982 г., Charles River Laboratories, США	Köhn, 2011
19	Mini-Lewe	Vietnamese Pot Belly Pigs × Saddle Back Pigs × Landrace	1966 г., Außenstelle Lehnitz der Humboldt Universität, Германия	Schachler et al., 2020
20	Мини-свиньи ИЦиГ СО РАН (Mini-pigs of ICG SB RAS)	Large White (крупная белая) × светлогорские × Landrace × Vietnamese native breed	1990–1992 гг., ИЦиГ СО РАН, Новосибирская область, Россия	Nikitin et al., 2014
21	Mini-Pig®	Местная мелкая порода	Cronex Co., Ltd., Хвасон, Южная Корея	Jo et al., 2017
22	Munich miniature (Troll)	Hanford × Columbian Miniature Swine	1993 г., Мюнхен, Германия	Köhn, 2011; Bourneuf, 2017
23	NIBS	Pitman-Moore × тайваньские мелкие короткоухие свиньи × Göttingen	1993 г., Nippon Institute for Biological Science, Токио, Япония	Yoshimatsu et al., 2016

Окончание табл. 1

№ п/п	Название	Происхождение	Время и место выведения	Литературный источник
24	NIH	Одичавшие свиньи из Индианы × Hanford	1972 г., Национальный институт здоровья (National Institute of Health, NIH), Бетесда, Мэриленд, США	Sachs et al., 1976; Nicholls et al., 2012
25	Ossabaw	Одичавшие свиньи с острова Оссабау	2001–2002 гг., Университет Индианы (Indiana University), США	McKenney-Drake et al., 2016
26	Panepinto	Yucatan × Vietnamese	1990 г., Государственный университет Колорадо (Colorado State University), США	Köhn, 2011
27	Pitman-Moore	Одичавшие свиньи штата Флорида	1969 г., Pitman-Moore Pharmaceutical Company, Индианаполис, США	Val-Laillet et al., 2013
28	Светлогорские (Svetlogorsk)	Минисибс × Göttingen	1974 г., ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область, Россия	Станкова и др., 2017
29	Westran	Одичавшие свиньи с острова Кенгуру	1976 г., Австралийское государственное объединение научных и прикладных исследований (Commonwealth Scientific and Research Organization), Австралия	Köhn, 2011
30	Wuzhishan	Местная мелкая порода	1990 г., Wuzhishan pig breeding farm of Academy of Agricultural Sciences, Хайнань, Китай	Song et al., 2014
31	Yucatan	Одичавшие мексиканские свиньи	1960 г., Государственный университет Колорадо (Colorado State University), США	Miniature Swine Book of Normals, 2019

Таблица 2. Живая масса взрослых лабораторных мини-свиней из разных селекционных групп

Селекционная группа	Живая масса, кг	Литературный источник
Aachen	45–50	Pawlowsky et al., 2017
Bama	~50	Zhang et al., 2016
Br1	30–70	Mariano, 2003
Clawn	~40	Köhn, 2011
Göttingen	25–50	Simon, 2019
Hanford	80–95	Köhn, 2011
Hormel	55–70	Miniature Swine Book of Normals, 2019
Micro-Pig®	30–35	Jo et al., 2017
Micro-Yucatan	55–70	Köhn, 2011
Mini-Lewe	45–60	Schachler et al., 2020
Mini-Pig®	57–64	Jo et al., 2017
Мини-свиньи ИЦиГ СО РАН (Mini-pigs of ICG SB RAS)	60–70	Шатохин и др., 2019
Munich mini-ature (Troll)	60–100	Köhn, 2011; Bourneuf, 2017
Ossabaw	72–116	McKenney-Drake et al., 2016
Panepinto	25–30	Köhn, 2011
Pitman-Moore	40–69	Тихонов, 2010
Светлогорские (Svetlogorsk)	35–50	Станкова и др., 2017
Westran	80–93	Köhn, 2011
Wuzhishan	35–40	Song et al., 2014
Yucatan	70–80	Köhn, 2011

турированных на субпопуляции сообществах (Mariani et al., 2020). Вторая причина – существование ряда селекционных групп лабораторных мини-свиней в единственном числе, что лишает их такого мощного ресурса поддержания гетерозиготности, как периодический обмен генофонда между разными стадами (Mariani et al., 2020). Третья причина заключается в создании новых стад лабораторных мини-свиней из небольшого числа родоначальников (см. табл. 1), что создает риск обеднения генофонда из-за эффекта бутылочного горлышка (Ji et al., 2011). Любопытно, что по разным оценкам, генетическое разнообразие лабораторных свиней может быть как больше, так и меньше в сравнении с аналогичными параметрами свиней заводских пород и дикого кабана (Nikitin et al., 2010; Heckel et al., 2015).

В ряде публикаций упомянут факт наличия естественных «противоинбредных» механизмов в природных популяциях (Charlesworth, Willis, 2009; Cheptou, Donohue, 2011; Mable, 2019), что косвенно подтверждается существованием на небольших островах в течение столетий малочисленных популяций одичавших свиней без признаков инбредной депрессии (Köhn, 2011; McKenney-Drake et al., 2016). В условиях питомников лабораторных мини-свиней формирование состава репродуктивной группы и подбор родительских пар во время случной кампании осуществляет селекционер, а следовательно, возникает вопрос о полноценности функционирования подобных механизмов. Таким образом, существует необходимость анализа доступных человеку способов контроля гетерозиготности стад лабораторных мини-свиней. Первый способ, мониторинг генетического разнообразия при помощи молекулярно-генетических методов, широко используют в селекции зарубежных мини-свиней (Chang et al., 2009). Сдерживающим фактором дальнейшего внедрения данного метода следует считать отсутствие данных о его экономической целесообразности при рутинном использовании.

Таблица 3. Условная схема подбора хряков и свиноматок в течение одного цикла

Семейство	Линия				Минимальное число свиноматок в каждом цикле
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	
S ₁	I	II	III	IV	5
S ₂	II	I	IV	III	5
S ₃	III	IV	I	II	5
S ₄	IV	III	II	I	5
Минимальное число хряков в каждом цикле	2	2	2	2	–

Примечание. В ячейках на пересечении линий (столбцы) и семейств (строки) указаны поколения.

Второй способ управления гетерозиготностью заключается в применении селекционных приемов и методов, например в минимизации инбредных скрещиваний (Simianer, Köhn, 2010). В разведении мини-свиней ИЦиГ СО РАН в качестве инструмента сохранения генетического разнообразия используют поддержание максимально возможного числа фенотипов окраски и инбридинг преимущественно на родоначальников (Никитин и др., 2018). С учетом того что масть млекопитающих контролируют от 120 до 350 генов (Cieslak et al., 2011; Chandramohan et al., 2013), количество вероятных генотипов может исчисляться тысячами. Еще одним селекционным методом максимизации генетического разнообразия является подразделение массива животных на субпопуляции с ограниченным потоком генов между ними (Mariani et al., 2020). Однако из-за низкой численности породных образований частичное генеалогическое обособление линий, за редким исключением (Станкова и др., 2017), реализовать практически не удастся. Вместо этого практикуют циклическую систему подбора (Chu, 2010; Schachler et al., 2020), основанную на периодически повторяющихся скрещиваниях линий и семейств (табл. 3). Согласно расчетам, во избежание тесного инбридинга минимальная численность репродуктивной группы должна составлять не менее 28 особей, из которых хряки должны быть представлены не менее четырьмя линиями, а свиноматки – не менее четырьмя семействами. Каждая линия должна включать минимум одного основного и одного проверяемого хряков, а семейство – состоять не менее чем из пяти основных и проверяемых свиноматок.

Накопление генетического груза

В 70-х гг. прошлого века появилось сообщение о том, что в популяциях численностью менее 2000 особей велика вероятность накопления снижающих приспособленность мутаций (Nei, Roychoudhury, 1973). Еще раньше установлено, что рецессивные полулетальные мутации могут сохраняться в популяции до 99 поколений даже при целенаправленной выбраковке гомозигот (Дубинин, Глембоцкий, 1967), что в целом не опровергается более поздним математическим моделированием (Johnsson et al., 2019). Считается, что элиминация вредных рецессивных

мутаций является трудной задачей для селекционера даже при условии использования им современных методов генотипирования, хотя успехи в их совершенствовании очевидны (Derks et al., 2017). С учетом того что репродуктивная численность отдельных стад лабораторных мини-свиней не превышает 30–40 особей, уменьшающие приспособленность полулетальные и летальные рецессивные мутации, казалось бы, должны представлять серьезную опасность в разведении этих животных. В то же время за всю историю разведения лабораторных мини-свиней только у вымершей селекционной группы минисибс описано снижение жизнеспособности молодняка и репродуктивных качеств взрослых особей, предполагаемой причиной которого было накопление рецессивных мутаций вследствие одностороннего отбора (Nikitin et al., 2014). Таким образом, система разведения лабораторных мини-свиней должна включать меры очищения стада от вредных мутаций, прежде всего жесткий отбор в репродуктивную группу (Никитин и др., 2018; Nikitin et al., 2020).

Другой метод очистки стада от нежелательных мутаций заключается в оценке потомства при инбредных спариваниях. Данный способ предложен к использованию на разных видах сельскохозяйственных животных еще в 50–70-х гг. прошлого века (Robertson, Rendel, 1950; Серебровский, 1970) и был применен на мини-свиньях. Однако при простоте метод имеет серьезные недостатки – длительность оценки и, соответственно, высокие затраты на кормление и содержание проверяемого хряка и его потомков.

Однако имеются случаи, когда селекционеры смогли извлечь выгоду из возникновения снижающих жизнеспособность мутаций в стаде в виде создания модельных объектов для оптимизации конкретных медицинских методов или лечения строго определенных патологий. Примером служит создание мини-свиней MeLiM и NiH (Sachs et al., 1976; Horak et al., 2019). Таким образом, можно утверждать, что факт возникновения снижающих жизнеспособность мутаций, безусловно, представляет серьезную опасность. Но гораздо более значимым оказывается умение селекционеров расставлять приоритеты при отборе животных для воспроизводства и проводить мероприятия по очищению стада от генетического груза, а при необходимости – консолидировать носителей мутаций в виде новой селекционной группы, представляющей ценность в качестве модельного объекта.

Проблема белой масти в селекции лабораторных мини-свиней

Известно, что при выведении первых селекционных групп лабораторных мини-свиней стояла задача создания животных белой масти (Pond, Houpt, 1978), которых планировали использовать в качестве биологической модели при изучении воздействия радиоактивного излучения на кожу. Однако, несмотря на «прилитие крови» заводских пород белой масти, как правило крупной белой или ландрас, попытки консолидировать ее в стадах лабораторных мини-свиней зачастую не заканчивались успехом. Исключениями являются свиньи Mini-Lewe (Schachler et al., 2020) и линия Binlang (Lanyu 400) в селекционной группе мини-свиней Lanyu (Chu, 2010). Таким образом, возникает вопрос о факторах, препятствующих выведению стада, на

100 % укомплектованных белыми особями. Можно предположить, что причиной является доминантный контроль наиболее распространенного типа белой масти (Pielberg et al., 2002), из-за чего отмечено регулярное выщепление пигментированных поросят. Другим объяснением представляется то, что белые поросята рождаются более мелкими и, следовательно, менее жизнеспособными в сравнении с окрашенными (Никитин и др., 2019). Несмотря на это, белую масть с успехом удалось консолидировать в ряде заводских пород (Porter et al., 2016). Следует заметить, что заводские породы свиней белой масти получены методом более чем 70-летнего отбора белых особей в каждом поколении с предпочтением тех животных, в чьем потомстве не наблюдалось расщепления по фенотипу масти (Porter et al., 2016). Это, в свою очередь, сопоставимо с продолжительностью существования наиболее старых селекционных групп лабораторных мини-свиней (Тихонов, 2010). Таким образом, можно предположить, что заводчикам большинства селекционных групп мини-свиней элементарно не хватило времени на консолидацию белой масти.

Существенно ускорить процесс консолидации белой масти может молекулярно-генетическое типирование белых животных. Известно, что белая доминантная масть свиней контролируется аллелем *I* гена *KIT* (Pielberg et al., 2002; Wu et al., 2019). Таким образом, первым шагом создания селекционной группы, укомплектованной полностью белыми животными, должно стать скрещивание белых свиноматок с белыми хряками. Полностью белое потомство от таких скрещиваний необходимо генотипировать по гену *KIT* с постановкой *III* животных на дорасщипывание. Методика определения аллелей гена *KIT* при помощи ПЦР в режиме реального времени подробно описана в литературе (Pielberg et al., 2002).

Еще одним способом является консолидация фенотипа рецессивной белой масти, как это продемонстрировано на примере линии Lanyu 400 (Chu, 2010) и китайской породы Rongchang (Lai et al., 2007). Однако серьезным ограничением использования данного метода может стать низкая частота выщепления особей рецессивной белой масти, которая в стаде мини-свиней ИЦиГ СО РАН, по данным зоотехнического учета, составляет около 1 %.

Заключение

За последние 10 лет обнаружены факты, подтверждающие существование 31 селекционной группы мини-свиней. Несмотря на отсутствие единых стандартов отбора, в разведении лабораторных мини-свиней придерживаются таких общих критериев, как живая масса 50–80 кг, нормальная жизнеспособность, крепость конституции и экстерьера животных. Поддержание генетического разнообразия в стадах лабораторных мини-свиней возможно как с использованием молекулярно-генетического мониторинга, так и исключительно селекционных методов. Минимизация негативного эффекта от накопления генетического груза в стадах мини-свиней должна происходить главным образом посредством жесткого отбора по приспособленности в репродуктивную группу. При необходимости, обусловленной конкретным типом биомедицинских экспериментов, в стаде можно закрепить экстерьерные и физиологические

признаки, контролируемые рецессивными снижающими жизнеспособность мутациями. Консолидация особей белой масти возможна как при доминантном, так и рецессивном типах наследования, что доказывают примеры линии Binlang и селекционной группы мини-свиней Mini-Lewe.

Список литературы / References

- Дубинин Н.П., Глембоцкий Я.Л. Генетика популяций и селекция. М.: Наука, 1967.
[Dubinin N.P., Glembotskiy Ya.L. Population Genetics and Selection. Moscow: Nauka Publ., 1967. (in Russian)]
- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Свины (*Sus Scrofa* L.). ФГНУ ВНИИ племенного дела, 2007.
[Protocol of testing for distinctness, uniformity, and stability. Pigs (*Sus scrofa* L.). All-Russia Research Institute of Animal Breeding, 2007. (in Russian)]
- Никитин С.В., Князев С.П., Шатохин К.С., Запорожец В.И., Башур Д.С., Ермолаев В.И. Пренатальный рост живой массы и масть мини-свиней ИЦиГ СО РАН. *Сельскохозяйственные технологии*. 2019;1(3):21-34. DOI 10.35599/agritech/01.03.04.
[Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S., Zaporozhets V.I., Bashur D.S., Ermolaev V.I. Prenatal growth of live weight and coat color of the minipigs of ICG SB RAS. *Sel'skookhozyaystvennyye Tekhnologii = Agricultural Technologies*. 2019;1(3):21-34. DOI 10.35599/agritech/01.03.04. (in Russian)]
- Никитин С.В., Князев С.П., Шатохин К.С., Запорожец В.И., Ермолаев В.И. Разведение и селекция мини-свиней ИЦиГ СО РАН. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(8):922-930. DOI 10.18699/VJ18.434.
[Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S., Zaporozhets V.I., Ermolaev V.I. Breeding and selection of mini-pigs in the ICG SB RAS. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):922-930. DOI 10.18699/VJ18.434. (in Russian)]
- Серебровский А.С. Генетический анализ. М.: Наука, 1970.
[Serebrovskiy A.S. Genetic analysis. Moscow: Nauka Publ., 1970. (in Russian)]
- Станкова Н.В., Савина М.А., Капанадзе Г.Д. Формирование новых линий светлогорских мини-свиней. *Биомедицина*. 2017;3:95-101.
[Stankova N.V., Savina M.A., Kapanadze G.D. The formation of new lines of Svetlogorsk minipigs. *Biomeditsina = Biomedicine*. 2017;3:95-101. (in Russian)]
- Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свины: генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010.
[Tikhonov V.N. Laboratory Minipigs. Genetics and Biomedical Use. Novosibirsk: Publishing House SB RAS, 2010. (in Russian)]
- Шатохин К.С., Никитин С.В., Князев С.П., Гончаренко Г.М., Ермолаев В.И., Запорожец В.И. Зоотехнические, физиологические и генетические особенности мини-свиней ИЦиГ СО РАН. Новосибирск: Изд-во СФНЦА РАН, 2019.
[Shatokhin K.S., Nikitin S.V., Knyazev S.P., Goncharenko G.M., Ermolaev V.I., Zaporozhets V.I. Livestock, physiology, and genetics of the mini-pigs of the Institute of Cytology and Genetics. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics, 2019. (in Russian)]
- Bourneuf E. The MeLiM Minipig: An Original Spontaneous Model to Explore Cutaneous Melanoma Genetic Basis. *Front. Genet.* 2017;8:146. DOI 10.3389/fgene.2017.00146.
- Chandramohan B., Renieri C., La Manna V., La Terza A. The alpaca agouti gene: genomic locus, transcripts and causative mutations of eumelanin and pheomelanin coat color. *Gene*. 2013;521(2):303-310. DOI 10.1016/j.gene.2013.03.060.
- Chang W.H., Chu H.P., Jiang Y.N., Li S.H., Wang Y., Chen C.H., Chen K.J., Lin C.Y., Ju Y.T. Genetic variation and phylogenetics of Lanyu and exotic pig breeds in Taiwan analyzed by nineteen micro-

- satellite markers. *J. Anim. Sci.* 2009;87(1):1-8. DOI 10.2527/jas.2007-0562.
- Charlesworth D., Willis J.H. The genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10:783-796. DOI 10.1038/nrg2664.
- Cheng W., Zhao H., Yu H., Xin J., Wang J., Zeng L., Yuan Z., Qing Y., Li H., Jia B., Yang C., Shen Y., Zhao L., Pan W., Zhao H.Y., Wang W., Wei H.J. Efficient generation of GGTA1-null Diannan miniature pigs using TALENs combined with somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2016;14(1):77. DOI 10.1186/s12958-016-0212-7.
- Cheptou P.O., Donohue K. Environment-dependent inbreeding depression: its ecological and evolutionary significance. *New Phytol.* 2011; 189(2):395-407. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03541.x.
- Chien S., Hsue S., Lin C., Kuo T., Wang D.J., Yang J.C., Lee S. Influence of Thread Design on Dental Implant Osseointegration Assayed Using the Lan-Yu Mini-Pig Model. *J. Med. Biol. Eng.* 2017;37: 627-638. DOI 10.1007/s40846-017-0240-6.
- Chu H.-P. Selection and Utilization of Minipigs for Biomedical Research. Taitung Animal Propagation Station, Livestock Research Institute, 2010;50. Available at: <https://www.angrin.tlri.gov.tw/meeting/2010training/12.Mr.H.P.Chu.pdf>.
- Cieslak M., Reissmann M., Hofreiter M., Ludwig A. Colours of domestication. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2011;86(4):885-899. DOI 10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x.
- Derks M.F.L., Megens H.J., Bosse M., Lopes M.S., Harlizius B., Groenen M.A.M. A systematic survey to identify lethal recessive variation in highly managed pig populations. *BMC Genomics.* 2017; 18(1):858. DOI 10.1186/s12864-017-4278-1.
- Heckel T., Schmucki R., Berrera M., Ringshandl S., Badi L., Steiner G., Ravon M., Küng E., Kuhn B., Nicole A Kratochwil N.A, Schmitt G., Kiiälainen A., Nowaczyk C., Daff H., Khan A.P., Lekolool I., Pelle R., Okoth E., Bishop R., Daubenberger C., Ebeling M., Certa U. Functional analysis and transcriptional output of the Göttingen-minipig genome. *BMC Genomics.* 2015;16:932. DOI 10.1186/s12864-015-2119-7.
- Heining P., Ruysschaert T. The use of minipig in drug discovery and development: pros and cons of minipig selection and strategies to use as a preferred nonrodent species. *Toxicol. Pathol.* 2016;44(3): 467-473. DOI 10.1177/0192623315610823.
- Helke K.L., Nelson K.N., Sargeant A.M., Jacob B., McKeag S., Haruna J., Vemireddi V., Greeley M., Brocksmith D., Navratil N., Stricker-Krongrad A., Hollinger C. Background Pathological Changes in Minipigs: A Comparison of the Incidence and Nature among Different Breeds and Populations of Minipigs. *Toxicol. Pathol.* 2016; 44(3):325-337. DOI 10.1177/0192623315611762.
- Horak V., Palanova A., Cizkova J., Miltrova V., Vodicka P., Kupcova Skalnikova H. Melanoma-Bearing LibechovMinipig (MeLiM): The Unique Swine Model of Hereditary Metastatic Melanoma. *Genes (Basel).* 2019;10(11):915. DOI 10.3390/genes10110915.
- Itoh T., Kabawe M., Nagase T., Endo K., Miyoshi M., Miyahara M. Body surface area measurement in laboratory miniature pigs using a computer tomography scanner. *J. Toxicol. Sci.* 2016;41(5):637-644. DOI 10.2131/jts.41.637.
- Ji Y.Q., Wu D.D., Wu G.S., Wang G.D., Zhang Y.P. Multi-locus analysis reveals a different pattern of genetic diversity for mitochondrial and nuclear DNA between wild and domestic pigs in East Asia. *PLoS One.* 2011;6(10):e26416. DOI 10.1371/journal.pone.0026416.
- Jo H., Lee S.C., Kim D.C., Kim B.G. Estimation of Growth Model Parameters for Mini Pig Breeds. *The FASEB Journal.* 2017;31(S1): ib299. DOI 10.1096/fasebj.31.1_supplement.lb299.
- Johnsson M., Gaynor R.C., Jenko J., Gorjanc G., de Koning D.J., Hickey J.M. Removal of alleles by genome editing (RAGE) against deleterious load. *Genet. Sel. Evol.* 2019;51(1):14. DOI 10.1186/s12711-019-0456-8.
- Ju Y.T., Pan Y.T., Tu C.F., Hsiao J., Lin Y.H., Yu P.J., Yu P.H., Chi C.H., Liu I.L. Growth and Behavior of Congenitally Anophthalmic Lee-Sung Pigs. *Comp. Med.* 2019;69(3):212-220. DOI 10.30802/AALAS-CM-18-000095.
- Kobayashi E., Hishikawa S., Teratani T., Lefor A.T. The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant. Res.* 2012;1:8. DOI 10.1186/2047-1440-1-8.
- Köhn F. History and Development of Miniature, Micro- and Minipigs. The minipig in biomedical research. P.A. Meanulty, A.D. Dayan, N.C. Ganderup, K.L. Hastings (Eds.). Boca Raton, FL: CRC Press, 2011;3-16. DOI 10.1201/b11356-3.
- Lai F., Ren J., Ai H., Ding N., Ma J., Zeng D., Chen C., Guo Y., Huang L. Chinese white Rongchang pig does not have the dominant white allele of *KIT* but has the dominant black allele of *MC1R*. *J. Hered.* 2007;98(1):84-87. DOI 10.1093/jhered/esl053.
- Mable B.K. Conservation of adaptive potential and functional diversity: integrating old and new approaches. *Conservation Genetics.* 2019;20:89-100. DOI 10.1007/s10592-018-1129-9.
- Maeda M., Takashina S., Takasu M., Mori T., Goto N., Matsubara T., Almunia J., Imaeda N., Ando A., Kitagawa H. Magnetic Resonance Imaging of Ovarian Activity in Microminipigs Showing Normal Estrous Cycles. *In vivo.* 2016;30:35-40. Available at: <http://iv.iiarjournals.org/content/30/1/35.full>.
- Mariani E., Summer A., Ablondi M., Sabbioni A. Genetic Variability and Management in Nero di Parma Swine Breed to Preserve Local Diversity. *Animals (Basel).* 2020;10(3):538. DOI 10.3390/ani10030538.
- Mariano M. Minisuíno (minipig) na pesquisa abiomédica experimental. O Minipig br1. *Acta Cir. Bras.* 2003;18(5):387-391. DOI 10.1590/S0102-86502003000500003. (in Portuguese)
- McKenney-Drake M.L., Rodenbeck S.D., Owen M.K., Schultz K.A., Alloosh M., Tune J.D., Sturek M. Repeat cross-sectional data on the progression of the metabolic syndrome in Ossabaw miniature swine. *Data Brief.* 2016;7:1393-1395. DOI 10.1016/j.dib.2016.04.023.
- Miniature Swine Book of Normals. Sinclair Bio Resources, 2019. Available at: <https://sinclairresearch.com/bio-resources/>.
- Nei M., Roychoudhury A.K. Probability of Fixation of Nonfunctional Genes at Duplicate Loci. *Amer. Nat.* 1973;107(955):362-372. DOI 10.1086/282840.
- Nicholls S.M., Mitchard L.K., Laycock G.M., Harley R., Murrell J.C., Dick A.D., Bailey M. A Model of Corneal Graft Rejection in Semi-Inbred NIH Miniature Swine: Significant T-Cell Infiltration of Clinically Accepted Allografts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012; 53(6): 3183-3192. DOI 10.1167/iov.11-9106.
- Nikitin S.V., Knyazev S.P., Shatokhin K.S. Miniature pigs of ICG as a model object for morphogenetic research. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2014;4(6):511-522. DOI 10.1134/S207905971406015X.
- Nikitin S.V., Shatokhin K.S., Zaporozhets V.I., Kochnev N.N., Bashur D.S., Khodakova A.V., Ermolaev V.I. 'Genetic load' and changes in the chronology of early mortality in mini-pigs of ICG SB RAS. *Agronomy Research.* 2020;18(3):2156-2165. DOI 10.15159/AR.20.171.
- Nikitin S.V., Yudin N.S., Knyazev S.P., Aitnazarov R.B., Bekenev V.A., Deeva V.S., Goncharenko G.M., Kobzev V.F., Savina M.A., Ermolaev V.I. Differentiation of wild boar and domestic pig population based on the frequency of chromosomes carrying endogenous retroviruses. *Natural Science.* 2010;2(6):527-534. DOI 10.4236/ns.2010.26066.
- Nunoya T., Shibua K., Saitoh T., Yazawa H., Nakamura K., Baba Y., Hirai T. Use of miniature pig for biomedical research, with reference to toxicologic studies. *J. Toxicol. Pathol.* 2007;20:125-132. DOI 10.1293/TOX.20.125.
- Pawlowsky K., Ernst L., Steitz J., Stopinski T., Kögel B., Henger A., Kluge R., Tolba R. The Aachen Minipig: Phenotype, Genotype, Hematological and Biochemical Characterization, and Comparison to the GöttingenMinipig. *Eur. Surg. Res.* 2017;58(5-6):193-203. DOI 10.1159/000471483.
- Peripolli E., Munari D.P., Silva M.V.G.B., Lima A.L.F., Irgang R., Baldi F. Runs of homozygosity: current knowledge and applications in livestock. *Anim. Genet.* 2017;48(3):255-271. DOI 10.1111/age.12526.

- Pielberg G., Olsson C., Syvanen A.C., Andersson L. Unexpectedly high allelic diversity at the *KIT* locus causing dominant white color in the domestic pig. *Genetics*. 2002;160:305-311.
- Pond W.G., Houpt K.A. The Biology of the Pig. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1978.
- Porter V., Alderson L., Hall S.J.G., Sponenberg D.P. Mason's world encyclopedia of livestock breeds and breeding. Boston, MA: CABI, 2016.
- Robertson A., Rendel J.M. The use of progeny testing with artificial insemination in dairy cattle. *J. Genet.* 1950;50:1-31.
- Sachs D.H., Leight G., Cone J., Schwarz S., Stuart L., Rosenberg S. Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation*. 1976;22(6):559-567. DOI 10.1097/00007890-197612000-00004.
- Schachler K., Minx J.-O., Sürle C., Distl O., Metzger J. Genetic characterisation of Mini-LEWE as resource population for experimental research. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2020;133. DOI 10.2376/1439-0299-2020-15.
- Scheffer J.P., Oliveira A.L.A., Markoski M., Antunes F., Atallah F.A., Monteiro G.A.S., Carvalho C.B., Kalil R.A.K. Indução da miocardiopatia isquêmica em modelo experimental mini porco. *Rev. Bras. Med. Vet.* 2013;35(1):45-48. (in Portuguese)
- Simianer H., Köhn F. Genetic management of the Göttingen Minipig. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2010;62:221-226. DOI 10.1016/j.vascn.2010.05.004.
- Simon C. Fachinformation aus dem Ausschuss für Ernährung der Versuchstiere. Fütterungskonzepte und -methoden in der Versuchstierhaltung und im Tierversuch – MINIPIG. Basel Reinhard Kluge, Potsdam-Rehbrücke. 2019;11. (in Germany). Available at: <https://docplayer.org/170135602-Fachinformation-aus-dem-ausschuss-fuer-ernaehrung-der-versuchstiere.html>.
- Smith A.C., Swindle M.M. Preparation of swine for the laboratory. *ILAR J.* 2006;47(4):358-63. DOI 10.1093/ilar.47.4.358.
- Song T., Wu T., Wei F., Li A., Wang F., Xie Y., Liu D., Fan Z., Wang X., Cheng S., Zhang C., He J., Wang S. Construction of a cDNA library for miniature pig mandibular deciduous molars. *BMC Dev. Biol.* 2014;14:16. DOI 10.1186/1471-213X-14-16.
- Val-Laillet D., Céline Tallet C., Carole Guérin C., Meunier-Salaün M.-C. Behavioural reactivity, social and cognitive abilities of Vietnamese and Pitman-Moore weaned piglets. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2013; 148:108-119. DOI 10.1016/j.applanim.2013.06.003.
- Wu Z., Deng Z., Huang M., Hou Y., Zhang H., Chen H., Ren J. Whole-Genome Resequencing Identifies *KIT* New Alleles That Affect Coat Color Phenotypes in Pigs. *Front. Genet.* 2019;10:218. DOI 10.3389/fgene.2019.00218.
- Xia J., Liu Z., Xin L., Wang Z., Qian L., Wu S., Y. Shulin, Li K. Molecular characterization of swine leukocyte antigen class I genes by sequence-based and PCR-SSP method in Guizhou minipigs. *Mol. Biol. Rep.* 2014;41:7775-7782. DOI 10.1007/s11033-014-3670-z.
- Xin J., Yang H., Fan N., Zhao B., Ouyang Z., Liu Z., Zhao Y., Li X., Song J., Yang Y., Zou Q., Yan Q., Zeng Y., Lai L. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One*. 2013;8(12):e84250. DOI 10.1371/journal.pone.0084250.
- Yoshimatsu H., Konno Y., Ishii K., Satsukawa M., Yamashita S. Usefulness of minipigs for predicting human pharmacokinetics: Prediction of distribution volume and plasma clearance. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 2016;31(1):73-81. DOI 10.1016/j.dmpk.2015.11.001.
- Zhang S., Guo K., Kong D., Liu Y., Shang H., Wei H. Semen quality and fertility of Bama miniature pig (*Sus scrofa domestica*). *Indian J. Anim. Res.* 2016;50:434-437. DOI 10.18805/ijar.7494.

ORCID IDK.S. Shatokhin orcid.org/0000-0002-0885-2772**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет».**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.10.2020. После доработки 02.02.2021. Принята к публикации 10.02.2021.

Недостаток белка GAGA у мутантов *Trl* вызывает массовую клеточную гибель в спермато- и оогенезе дрозофилы

Н.В. Дорогова¹✉, А.Е. Зубкова^{1,2}, Е.В. Федорова¹, Е.У. Болоболова¹, Е.М. Баричева¹

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ dorogova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Белок дрозофилы GAGA (GAF) является фактором эпигенетической регуляции транскрипции большой группы генов с широким разнообразием клеточных функций. GAF кодируется геном *Trithorax-like* (*Trl*), который экспрессируется в различных органах и тканях на всех стадиях онтогенеза дрозофилы. Мутации этого гена вызывают множественные нарушения развития. В предыдущих работах мы показали, что этот белок необходим для развития половой системы как самцов, так и самок дрозофилы. Снижение экспрессии гена *Trl* приводило к множественным нарушениям спермато- и оогенеза. Одно из значительных нарушений было связано с массовой деградацией и потерей клеток зародышевого пути, что позволило предположить, что этот белок вовлечен в регуляцию клеточной гибели. В представленной работе мы провели более детальное цитологическое исследование, чтобы определить, какой тип гибели клеток зародышевого пути характерен для *Trl*-мутантов, и происходят ли нарушения или изменения этого процесса по сравнению с нормой. Полученные результаты показали, что недостаток белка GAF вызывает массовую гибель клеток зародышевого пути как у самок, так и самцов дрозофилы, но проявляется эта гибель в зависимости от пола по-разному. У самок, мутантных по гену *Trl*, фенотипически этот процесс не отличается от нормы и в гибнущих яйцевых камерах выявлены признаки апоптоза и аутофагии клеток зародышевого пути. У самцов, мутантных по гену *Trl*, в отличие от самок, не обнаружены признаки апоптоза. У самцов мутации *Trl* индуцируют массовую гибель клеток через аутофагию, что не характерно для сперматогенеза дрозофилы и не описано ранее ни в норме, ни у мутаций по другим генам. Таким образом, недостаток GAF у мутантов *Trl* приводит к усилению апоптотической и аутофагической гибели клеток зародышевого пути. Эктопическая клеточная гибель и атрофия зародышевой линии, вероятно, связаны с нарушением экспрессии генов-мишеней GAGA-фактора, среди которых есть гены, регулирующие как апоптоз, так и аутофагию.
Ключевые слова: дрозофила; GAGA-фактор; клетки зародышевого пути; апоптоз; аутофагия; сперматогенез; оогенез.

Для цитирования: Дорогова Н.В., Зубкова А.Е., Федорова Е.В., Болоболова Е.У., Баричева Е.М. Недостаток белка GAGA у мутантов *Trl* вызывает массовую клеточную гибель в спермато- и оогенезе дрозофилы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):292-300. DOI 10.18699/VJ21.033

Lack of GAGA protein in *Trl* mutants causes massive cell death in *Drosophila* spermatogenesis and oogenesis

N.V. Dorogova¹✉, A.E. Zubkova^{1,2}, E.V. Fedorova¹, E.U. Bolobolova¹, E.M. Baricheva¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ dorogova@bionet.nsc.ru

Abstract. *Drosophila* protein GAGA (GAF) is a factor of epigenetic transcription regulation of a large group of genes with a wide variety of cellular functions. GAF is encoded by the *Trithorax-like* (*Trl*) gene, which is important for the formation of various organs and tissues at all stages of ontogenesis. In our previous works, we showed that this protein is necessary for the development of the reproductive system, both in males and females of *Drosophila*. Decreased expression of the *Trl* gene led to multiple disorders of spermatogenesis and oogenesis. One of the significant disorders was associated with massive degradation and loss of cells in the germline. In this work, we carried out a more detailed cytological study to determine what type of germ cell death is characteristic of *Trl* mutants, and whether there are disturbances or changes in this process compared to the norm. The results obtained showed that the lack of GAF protein causes massive germ cell death in both females and males of *Drosophila*, but this death manifests itself in different ways, depending on the sex. In *Trl* females, this process does not differ

phenotypically from the norm. In the dying egg chambers, signs of apoptosis and autophagy were revealed, as well as morphological features that are characteristic of the wild type. In males, *Trl* mutations induce mass germ cell death through autophagy, which is not typical of *Drosophila* spermatogenesis, and has not been previously described, neither in the norm nor in other genes' mutations. Thus, GAF lack in *Trl* mutants leads to increased germ cell death through apoptosis and autophagy. Ectopic cell death and germ line atrophy are probably associated with impaired expression of the GAGA factor target genes, among which there are genes that regulate both apoptosis and autophagy.

Key words: *Drosophila*; GAGA factor; germ cells; apoptosis; autophagy; spermatogenesis; oogenesis.

For citation: Dorogova N.V., Zubkova A.E., Fedorova E.V., Bolobolova E.U., Baricheva E.M. Lack of GAGA protein in *Trl* mutants causes massive cell death in *Drosophila* spermatogenesis and oogenesis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):292-300. DOI 10.18699/VJ21.033 (in Russian)

Введение

Белок дрозофилы, GAGA-фактор (GAGA-factor, GAF), кодируется геном *Trithorax-like* (*Trl*), который экспрессируется в различных органах и тканях на всех стадиях онтогенеза дрозофилы (Soeller et al., 1993; Baricheva et al., 1997; Karagodin et al., 2013). GAF имеет важную биологическую функцию, связанную как с позитивной, так и негативной регуляцией экспрессии большой группы генов, контролирующей основные этапы развития дрозофилы (Granok et al., 1995; van Steensel et al., 2001, 2003). GAF является эволюционно-консервативным белком, имеющим гомологию с белками многих эукариот, в том числе высших позвоночных (Matharu et al., 2010; Berger, Dubreucq, 2012). Гомологи GAF, как и сам белок, могут связываться с GA-последовательностями в регуляторных районах эволюционно-консервативных генов (Matharu et al., 2010). Результаты полногеномного анализа (профилирование хроматина с использованием Dam) показали, что мишенями GAF у дрозофилы могут быть около 250 генов, участвующих как минимум в 28 сигнальных путях (van Steensel et al., 2003). Анализ профилей связывания GAF, полученных в рамках проекта modENCODE (<http://www.modencode.org/>) (Roy et al., 2010), позволяет предполагать, что GAF может участвовать в регуляции более 3700 генов дрозофилы (неопубликованные данные).

Анализ *Trl*-мутантов продемонстрировал, что GAF необходим для эмбриогенеза, развития глаза и крыла дрозофилы (Bhat et al., 1996; Dos-Santos et al., 2008; Omelina et al., 2011; Vayarmagnai et al., 2012).

В предыдущих работах мы показали, что GAF принимает участие в развитии половой системы как самцов, так и самок дрозофилы, поскольку снижение экспрессии гена у мутантов *Trl* приводит к множественным нарушениям спермато- и оогенеза (Ogienko et al., 2006, 2008; Dorogova et al., 2014; Fedorova et al., 2019). Одно из значительных нарушений как оогенеза, так и сперматогенеза связано с массовой гибелью и потерей клеток зародышевого пути (КЗП) (Dorogova et al., 2014; Fedorova et al., 2019). Это позволило прийти к заключению, что GAF может регулировать активность генов, отвечающих за клеточную гибель. Однако для дальнейшего исследования роли GAF и поиска его генов-мишеней в клеточной гибели необходимо получить более полную информацию о проявлениях этого процесса у *Trl*-мутантов и соотнести данные с определенным типом регулируемой клеточной смерти согласно существующей в настоящее время классификации. Чтобы

решить эту задачу, мы провели детальное цитологическое исследование характера гибели КЗП в яичниках и семенниках у *Trl*-мутантов дрозофилы.

В норме яичник дрозофилы состоит из 15–20 овариол, которые представляют собой цепочку прогрессивно развивающихся яйцевых камер (ЯК), состоящих из 16 КЗП, которые окружены монослоем соматических фолликулярных клеток. Одна из 16 клеток цисты становится яйцеклеткой, остальные – питающими клетками. По размеру и морфологии ЯК оогенез можно условно разделить на 14 стадий (King, 1957; Spradling, 1993; Ogienko et al., 2007). В норме онтогенетически запрограммированная смерть КЗП происходит на трех специфических стадиях: во вновь сформированных цистах (второй район гермария), во время среднего (стадии 7–9) и позднего (стадии 12, 13) оогенеза. При достаточном питании мух смерть клеток в гермарии и на стадиях 7–9 (называемых контрольными точками гибели клеток в оогенезе, англ. checkpoints) происходит в ответ на аномалии развития и резко увеличивается под влиянием различных стрессов (McCall, 2004; Jenkins et al., 2013). Гибель питающих клеток в позднем оогенезе происходит как часть нормального развития каждого яйца (Jenkins et al., 2013; Peterson et al., 2015; Bolobolova et al., 2020).

Для оогенеза дрозофилы характерны два основных типа клеточной гибели: апоптоз и аутофагия (McCall, 2004; Barth et al., 2011; Jenkins et al., 2013; Bolobolova et al., 2020). Апоптоз является универсальным консервативным механизмом, при котором запускается программа саморазрушения клеток с участием протеолитических ферментов, относящихся к семейству каспаз (Kumar, 2007). В гибнущих ЯК проявляются характерные признаки апоптоза: конденсация хроматина, разрывы ДНК, фрагментация ядерного материала и цитоплазмы (Kihlmark et al., 2001; Greenwood, Gautier, 2005; Sarkissian et al., 2014). У дрозофилы инициация апоптоза связана с активностью эффекторной каспазы Dcp-1, и окраска антителами к этому белку является основным маркером каспаза-зависимого апоптоза (Sarkissian et al., 2014). Клеточная гибель через аутофагию сопровождается избыточным образованием аутофаго- и лизосом, что приводит к перевариванию всех клеточных органелл и закислению цитоплазмы. Вследствие этой особенности для выявления аутофагии используют лизотрекер (LysoTracker), ацидофильный краситель, который маркирует лизо- и аутофагосомы (De Vorkin, Gorski, 2014).

В семенниках КЗП расположены вдоль органа в соответствии со стадиями сперматогенеза. На апикальном конце – стволовые клетки, которые делятся с образованием гониальных клеток. Гониальные клетки вступают в сперматогенез, который включает митотическое и мейотическое деления, в результате чего образуются 64 синцитиальные сперматиды, которые затем дифференцируются в сперматозоиды (Fuller, 1993; Fabian, Brill, 2012). Клеточная гибель в сперматогенезе дрозофилы происходит крайне редко, и примеры ее исследования – единичны. Показано, что в процессе сперматогенеза дефектные сперматозоиды элиминируются с помощью лизосомного механизма (без формирования аутофагосом) (Yacobi-Sharon et al., 2013), а также программируемого некроза, опосредованного белком p53 (Napoletano et al., 2017).

В данной работе мы показали, что снижение экспрессии GAF в яичниках у самок *Trl*-мутантов приводит к усилению гибели КЗП и деградации ЯК на 7–9-й стадиях оогенеза. При этом процесс клеточной гибели протекает так же, как в норме, и имеет признаки как аутофагии, так и апоптоза. В семенниках недостаток GAF индуцирует массовую гибель через аутофагию, что не характерно для сперматогенеза и не описано ранее ни в норме, ни у мутаций по другим генам.

Материал и методы

В экспериментах использовали следующие мутации *D. melanogaster*: мутация *Trl^{R85}* – нуль-аллель гена, любезно предоставлена Ф. Каршем (Женевский университет, Швейцария) (Farkas et al., 1994); гипоморфные мутации *Trl³⁶²* и *Trl^{(ex)15}*, нарушающие 5'-область гена, получены в ИЦиГ СО РАН (Ogienko et al., 2007; Dorogova et al., 2014); *Oregon R* – дикий тип, из фонда лаборатории ИЦиГ СО РАН, использована в качестве контроля. Все скрещивания проводили на стандартной среде при температуре 25 °С.

Выделение, фиксацию и окраску гонад для электронной и флуоресцентной микроскопии производили согласно описанной ранее методике (Dorogova et al., 2014). В работе использованы первичные антитела: rabbit anti-Vasa (разведение 1:300; SC30210, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Dcp-1 (разведение 1:100; Asp216, Cell Signaling Technology). Вторичные антитела – anti-rabbit, конъюгированные с AlexaFluor-488 (1:500; A-11001, Thermo Fisher Scientific) и AlexaFluor-568 (1:500; A-11369, Thermo Fisher Scientific). Анализ с помощью LysoTracker выполняли, как описано в предыдущей работе (Dorogova et al., 2014) (LysoTracker Red DND-99, Thermo Fisher Scientific). После окраски яичники и семенники помещали в реагент против выцветания ProLong Gold с DAPI (Thermo Fisher Scientific). Изображения получены с помощью микроскопа AxioImager Z1 с приставкой ApoTome (Zeiss), программным обеспечением AxioCam MR и AxioVision (Zeiss).

Результаты

В предыдущих работах мы представили данные, позволяющие сделать вывод, что снижение экспрессии гена *Trl* у мутантов приводит к значительному усилению клеточной гибели в спермато- и среднем оогенезе дрозофилы

(Dorogova et al., 2014; Fedorova et al., 2019). У самцов и самок дрозофилы, несущих мутантные аллели *Trl³⁶²* и *Trl^{(ex)15}* в сочетании с нуль-аллелем *Trl^{R85}* (*Trl^{R85}/Trl³⁶²* и *Trl^{R85}/Trl^{(ex)15}*), наблюдалась массовая гибель КЗП (Dorogova et al., 2014; Fedorova et al., 2019). В этой работе, проведя более детальное цитологическое исследование данных аллельных комбинаций, мы определили, какой тип гибели КЗП характерен для *Trl*-мутантов и как нарушается или меняется этот процесс по сравнению с нормой.

Мутации *Trl* приводят к усилению клеточной гибели в оогенезе, но не влияют на цитологические проявления этого процесса

Для выявления аутофагии мы использовали лизотрекер (LysoTracker), ацидофильный краситель, который маркирует лизо- и аутофагосомы. После окрашивания сигнал лизотрекера был обнаружен во всех деградирующих ЯК, но его появление совпадало с началом ядерной конденсации как в яичниках мух дикого типа, так и у *Trl*-мутантов (рис. 1, а, б). Таким образом, появление аутофаго- и лизосом сопутствовало уже начавшемуся апоптозу, но не предшествовало ему. Это означает, что клеточная гибель в среднем оогенезе у мутантов *Trl* не связана с процессами, которые приводят к избыточной аутофагии, несовместимой с жизнеспособностью клеток.

Для дополнительной верификации апоптоза и выявления активности каспаз мы использовали антитела к эффекторной каспазе Dcp-1. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к Dcp-1 показало, что этот белок выявляется в гибнущих яйцевых камерах *Trl*-мутантов и его паттерн не отличается от такового у самок дикого типа (см. рис. 1, в, г).

Поскольку при апоптозе разрушается и фрагментируется ядерная оболочка, с помощью антител к белку ядерной ламины дрозофилы, Lamin Dm0, мы проверили целостность ядерной оболочки в клетках гибнущих ЯК. Ядерная оболочка четко выявлялась антителами к белку ламины во всех клетках ЯК, не подверженных деградации (см. рис. 1, д). Однако с появлением признаков конденсации хроматина ядерная оболочка не визуализировалась в КЗП как у мутантов, так и в контроле. Эта структура оставалась видимой только в фолликулярных клетках, которые деградируют позже, после того как осуществляют фагоцитоз погибших питающих клеток (см. рис. 1, е–л).

Мы также провели анализ деградирующих ЯК методами электронной микроскопии, который выявил специфические изменения в ядре и цитоплазме, характерные для нормального проявления клеточной гибели в среднем оогенезе, описанного ранее в других работах (Giorgi, Deri, 1976) (данные не представлены). То есть у мутантов этот процесс морфологически не отличался от контроля (*Oregon R*).

Таким образом, эффект мутации *Trl* связан с усилением клеточной гибели в среднем оогенезе, что соответствует ранее полученным результатам (Dorogova et al., 2014; Fedorova et al., 2019). Этот процесс становится более массовым у мутантов *Trl^{R85}/Trl³⁶²* и *Trl^{R85}/Trl^{(ex)15}*, но основные критерии и морфологические характеристики соответствуют норме.

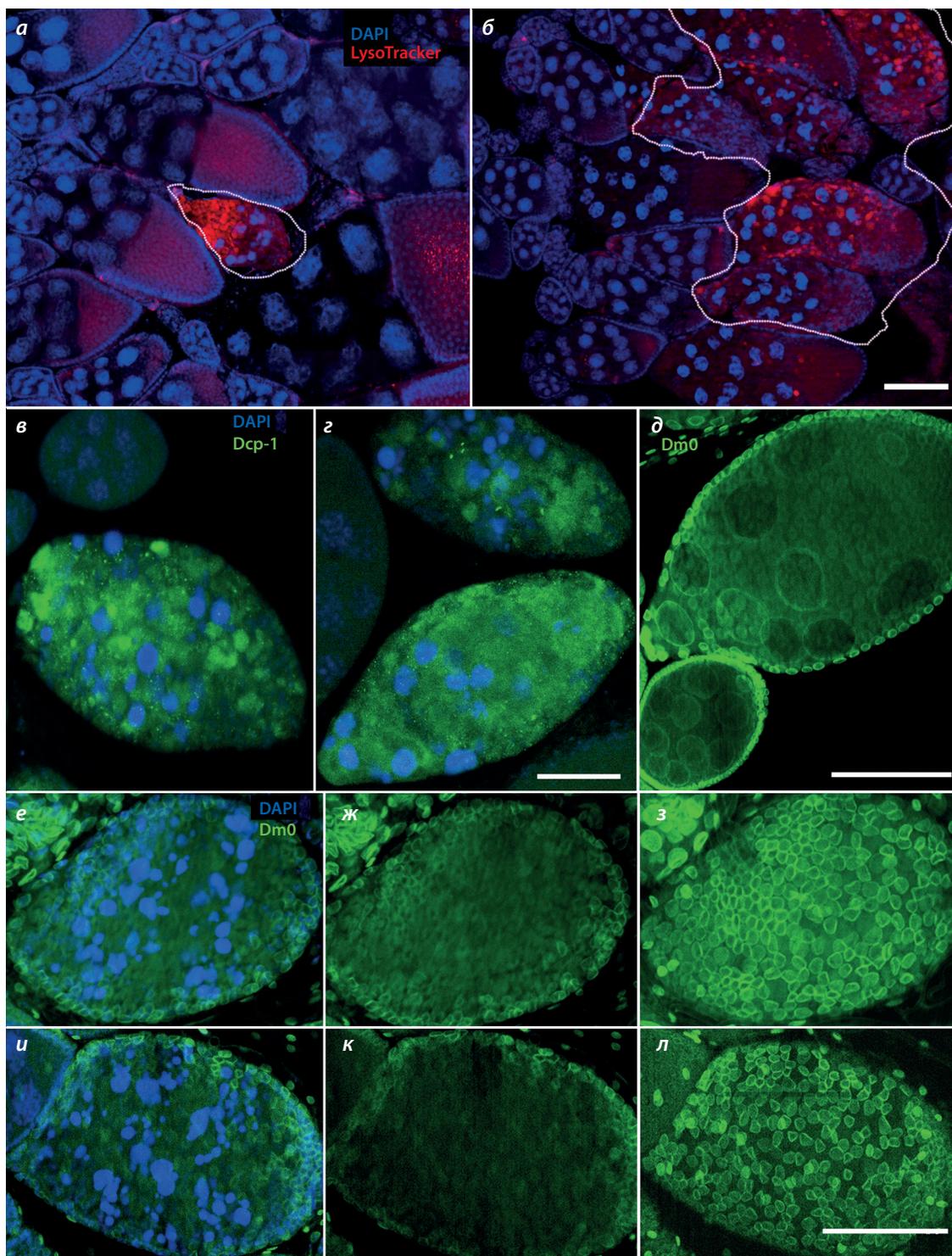


Рис. 1. Особенности фенотипического проявления клеточной гибели в оогенезе самок, мутантных по гену *Trl* (представлены яичники самок *Trl^{R85/Trl^{B62}}*).

a, б – выявление аутофаго- и лизосом с помощью LysoTracker red в гибнущих яйцевых камерах: в яичниках самок *Oregon R* только единичные яйцевые камеры подвергаются клеточной гибели (выделенная область), остальные развиваются нормально и вступают в вителлогенез (*a*); у самок *Trl* большинство яйцевых камер погибает на 7–9-й стадиях оогенеза (выделенная область), однако паттерн окраски LysoTracker у мутантов не отличается от такового у линии *Oregon R* (*б*). *в, з* – окраска антителами к эффекторной каспазе Dcp-1: в гибнущих яйцевых камерах самок *Oregon R* (*в*) и *Trl* (*з*) каспаза Dcp-1 выявляется одинаково. *д–л* – окраска антителами к белку Lamin Dm0, позволяющими оценить целостность ядерной оболочки в процессе клеточной гибели: ядерная оболочка четко выявляется во всех клетках яйцевых камер, не подверженных деградации (*д*); *е–з* – в деградирующих яйцевых камерах самок *Oregon R* ядерная оболочка питающих клеток разрушается (*ж*), но сохраняется и визуализируется в фолликулярных клетках (*з*); в яичниках самок, мутантных по гену *Trl*, наблюдается такой же паттерн окраски антителами к Lamin Dm0, как и у самок *Oregon R* (*и–л*). LysoTracker – красный, каспаза Dcp-1 – зеленый, Lamin Dm0 – зеленый. Масштаб: *a, б* – 15 мкм; *в–д* – 30 мкм; *е–л* – 40 мкм.

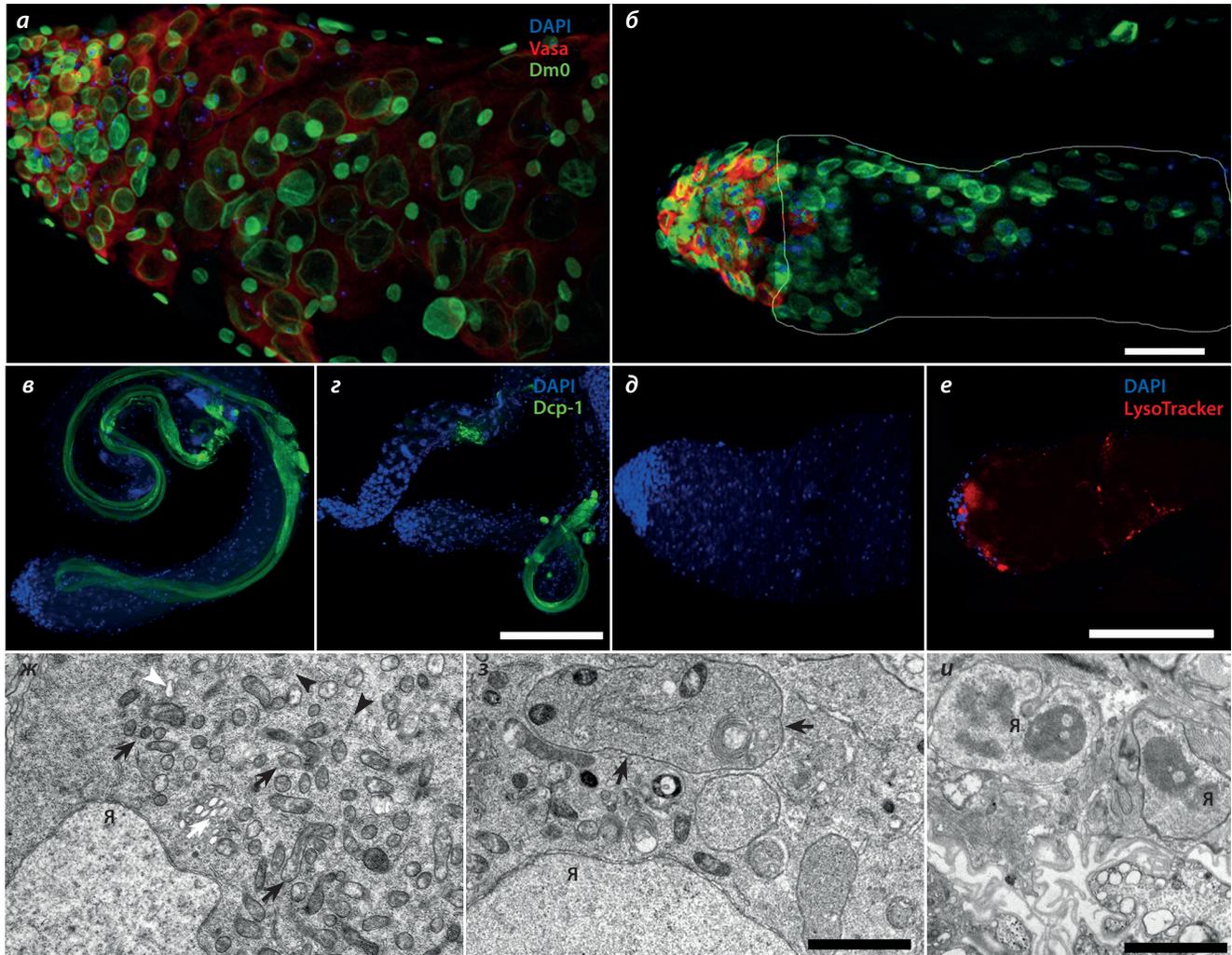


Рис. 2. Особенности клеточной гибели в сперматогенезе самцов, мутантных по гену *Trl* (представлены семенники самцов *Trl^{R85}/Trl³⁶²*).

a, б – иммуноокрашивание антителами к белкам Vasa и Lamin Dm0 отделов семенников, где расположены клетки зародышевого пути на ранних стадиях сперматогенеза: у самцов дикого типа весь базальный отдел семенника заполнен сперматоцитами на ранних стадиях сперматогенеза, которые окрашиваются антителами к белку Vasa (*a*); у мутантов выявляются КЗП только на апикальном конце, находящиеся в самом начале сперматогенеза (*б*); ядерная оболочка визуализируется антителами к Lamin Dm0 даже в сперматоцитах, которые уже не окрашиваются антителами к Vasa (на рисунке выделена область сперматоцитов, которые не чувствительны к антителам к белку Vasa). *в, з* – окрашивание антителами к белку Dcp-1 соответствует поздним стадиям сперматогенеза как у самцов *Oregon R* (*в*), так и у мутантов; в тех районах семенника, где у мутанта происходит массовая гибель сперматоцитов, белок Dcp-1 не определяется (*з*). *д, е* – выявление активности лизо- и аутофагосом с помощью LysoTracker: сигнал лизотрекера значительно интенсивней у самцов, мутантных по гену *Trl* (*е*), по сравнению с диким типом (*д*). *ж–и* – ультраструктура сперматоцитов на стадии интерфазы (перед мейозом) в диком типе и у *Trl*-мутанта (*з, и*): при нормальном сперматогенезе на этой стадии в клетках наблюдаются множество митохондрий (черная стрелка), мембран эндоплазматического ретикулума (головка черной стрелки), мультивезикулярные тельца (белая стрелка), единичные лизосомы (головка белой стрелки) (*ж*); у мутанта цитоплазма заполняется аутофагосомами (стрелка) (*з*); сперматоциты на стадии лизиса сохраняют внутреннюю структуру ядра и ядерную оболочку (*и*). Vasa и LysoTracker – красный, каспаза Dcp-1 и Lamin Dm0 – зеленый; Я – ядро. Масштаб: *a, б* – 20 мкм; *в, з* – 30 мкм; *д, е* – 20 мкм; *ж, з* – 1 мкм, *и* – 3 мкм.

Мутации *Trl* индуцируют массовую аутофагию в сперматогенезе

Используя такой же методологический подход, мы проанализировали, как происходит гибель КЗП у мутантов *Trl* в сперматогенезе. Предварительное иммуноокрашивание антителами к белку Vasa, специфичному для КЗП, показало, что у мутантов выявляются преимущественно ранние стадии сперматогенеза. Большинство цист на более поздних стадиях сперматогенеза элиминируются в процессе гибели (рис. 2, *a, б*). Однако особенностью гибнущих КЗП в сперматогенезе было сохранение целостности ядерной оболочки. Ядерная оболочка визуализируется антителами

к Lamin Dm0 даже в сперматоцитах, которые уже не окрашиваются антителами к Vasa (см. рис. 2, *a, б*).

У мутантных самцов, в отличие от самок, в генеративной ткани не обнаружены признаки апоптоза. Окрашивание антителами к белку Dcp-1 показало активность эффекторной каспазы только на самых поздних стадиях сперматогенеза, во время которых в процессе, называемом индивидуализацией, образуются зрелые сперматоиды. Такой же паттерн окрашивания наблюдался и в контроле (см. рис. 2, *в, з*). В районах семенника, где у мутантных самцов происходит гибель КЗП, каспаза Dcp-1 не выявлялась. Окрашивание DAPI также подтверждает, что хро-

матин в этих клетках не подвергается конденсации и фрагментации, характерных для апоптоза.

Окраска лизотрекером показала, что ацидофильные компартменты, соответствующие аутофаго- и лизосомам, в изобилии присутствуют во внутренней области семенников. Эти структуры располагаются преимущественно в зоне семенника, где находятся КЗП на ранних стадиях развития – сперматоциты первого порядка (см. рис. 2, *д, е*).

С помощью электронно-микроскопического анализа в цитоплазме гибнущих сперматоцитов выявлялись множественные аутофаго- и лизосомы, при этом ядерная оболочка не разрушалась и морфология ядер не отличалась от таковой в негибнущих КЗП (см. рис. 2, *ж-и*).

В результате сравнения проявлений клеточной гибели в сперматогенезе у самцов *Trl^{R85}/Trl³⁶²* и *Trl^{R85}/Trl^{(ex)15}* не обнаружено фенотипических отличий. Обе мутации вызывают массовую аутофагию и последующий лизис КЗП. Однако процесс гибели этих клеток не сопровождается апоптозом. В норме, у линии *Oregon R*, не выявлены ни признаки апоптоза, ни аутофагии.

Обсуждение

Полученные результаты показали, что недостаток белка GAF вызывает массовую гибель КЗП как у самок, так и самцов дрозофилы, но проявляется эта гибель в зависимости от пола по-разному.

В оогенезе у самок, мутантных по гену *Trl*, большинство ЯК имеют низкую жизнеспособность и не могут пройти через контрольную точку среднего оогенеза (mid oogenesis check point). Известно, что эта стадиоспецифичная контрольная точка активируется в ответ на неблагоприятные стимулы, физиологические нарушения или патологии развития. Яйцевые камеры, которые не пропускаются на следующий этап оогенеза (вителлогенез), подвергаются генетически регулируемой клеточной гибели (Pritchett et al., 2009; Jenkins et al., 2013; Peterson et al., 2015). Отличительной чертой мутантного фенотипа был только высокий показатель гибнущих ЯК, при этом деградируют они так же, как в диком типе. В гибнущих ЯК обнаружены признаки апоптоза и аутофагии, а также морфологические изменения, характерные для нормы.

Согласно данным литературы, подобный фенотип может возникать в ответ на недостаток питательных веществ или снижение активности компонентов инсулин/TOR-сигнального пути (Drummond-Barbosa, Spradling, 2001; Barth et al., 2011; Pritchett, McCall, 2012). Инсулин/TOR-сигнальный путь – консервативный механизм, ответственный за рост клеток и тканей. Он действует как сенсор доступности питательных веществ, способствуя метаболизму, росту и пролиферации клеток. В оогенезе *Drosophila* этот механизм является критически важным для развития КЗП и созревания ооцитов. При его нарушениях ЯК не могут вступать в энергоемкий вителлогенез и деградируют (LaFever et al., 2010; Laws, Drummond-Barbosa, 2017; Jeong et al., 2019). Массовая деградация ЯК в среднем оогенезе также наблюдалась при подавлении экспрессии генов, кодирующих белки, принадлежащие семейству ингибиторов апоптоза – Bcr1 и Diap, которые негативно регулируют активность каспаз. В таком слу-

чае происходило усиление клеточной гибели на фоне нарушения ее регуляции, при этом морфологические критерии этого процесса не менялись и не отличались от нормы (Rodriguez et al., 2002; Xu et al., 2005; Hou et al., 2008). У *Trl*-мутантов отмечен похожий фенотип в оогенезе, что позволяет предположить нарушение регуляторного механизма клеточной гибели.

В сперматогенезе у *Trl*-мутантов массовая гибель КЗП реализуется через механизм избыточной аутофагии. При нормальном развитии зародышевой линии дефектные сперматоциты периодически элиминируются накануне мейоза с помощью лизосом и катаболических ферментов без участия аутофагосом (Yacobi-Sharon et al., 2013). Этот механизм является одним из вариантов генетически регулируемой клеточной гибели и включен в последний каталог Комитета по номенклатуре клеточной смерти (Nomenclature Committee on Cell Death) (Galluzzi et al., 2018). У *Trl*-мутантов лизосомы также принимают участие в деградации сперматоцитов, однако появляются на заключительном этапе гибели, после того как цитоплазма клеток заполнится аутофагосомами.

Важно отметить, что основная функция аутофагии не убивать, а защищать клетки. С ее помощью происходит удаление из клеток поврежденных и состарившихся органелл, цитоплазматических фрагментов, неправильных или нефункциональных белков (Denton et al., 2013; Fitzwalter, Thorburn, 2015; Swart et al., 2016). Базальный (репаративный) уровень аутофагии необходим для поддержания нормальных физиологических условий функционирования клеток (Glick et al., 2010). При определенных условиях, связанных со спецификой развития или стрессовыми воздействиями, аутофагия становится массовой и вместо цитопротекторной функции индуцирует клеточную гибель (Fitzwalter, Thorburn, 2015; Swart et al., 2016). Поэтому аутофагия включена в каталог клеточной смерти как одна из основных форм (Galluzzi et al., 2012, 2018).

У дрозофилы клеточная гибель через аутофагию обнаружена при деградации слюнных желез и средней кишки на стадии метаморфоза «личинка–куколка». Атрофия этих органов является онтогенетически программируемой и регулируется одним и тем же стероидным гормоном – экдизоном (Berry, Baehrecke, 2007; Denton et al., 2012). Однако избыточная аутофагия в сперматогенезе у *Trl*-мутантов, вероятно, не связана с экдизоном, поскольку в сперматоцитах не были выявлены активные рецепторы к этому гормону (Schwedes et al., 2011). Аутофагии и лизису подвергались сперматоциты на стадии роста перед мейотическим делением. Для этой стадии характерен высокий уровень транскрипции генов и синтетической активности. В норме объем сперматоцитов возрастает в 25 раз, что требует значительного потребления энергии и ресурсов (Fuller, 1993). Можно предположить, что мутации *Trl* негативно влияют на клеточный метаболизм, не позволяя достичь необходимого уровня синтеза макромолекул и роста клеток. В результате активируется сигнальный путь, регулируемый TOR-киназой, который индуцирует клеточную гибель через аутофагию. Однако также можно предположить, что недостаток белка GAF приводит к нарушению экспрессии генов, кодирующих компоненты TOR-зависимого сигнального пути или/и

факторы, регулирующие аутофагию, что также может вызвать эктопическую гибель.

Известно, что GAGA-фактор участвует в регуляции транскрипции большой группы генов с различными клеточными функциями (van Steensel et al., 2003; Omelina et al., 2011). В базе данных Flybase аннотированы гены, участвующие в широком спектре процессов, связанных с клеточной гибелью (Gene Ontology terms: apoptotic process, autophagic cell death, salivary gland cell autophagic death). Всего в этой группе представлено около 400 генов, приблизительно 180 из них, согласно профилям связывания GAF из проекта modeNCODE, содержат в промоторных районах сайты связывания GAF и являются, таким образом, потенциальными мишенями этого белка. Наибольший интерес представляют присутствующие в этом списке консервативные гены аутофагии – *Atg2*, *Atg4*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg8*, *Atg9*, *Atg16*, *Atg17*, *Atg18*. Большинство этих генов кодируют белки, непосредственно участвующие в формировании и созревании аутофагосом, а *Atg17* – белок, контролирующий инициацию аутофагии (Noda, Inagaki, 2015). Также потенциальным геном-мишенью GAF является *Tor*, кодирующий киназу, вовлеченную в регуляцию аутофагии. Инактивация TOR-киназы в ответ на недостаток питательных веществ или ростовых факторов стимулирует аутофагию (Levine, Klionsky, 2004; Das et al., 2012). Если предположить, что GAF регулирует *Tor* и группу генов *Atg* в сперматогенезе, то его недостаток может вызвать нарушение экспрессии этих генов и привести к массовой и неуправляемой аутофагии. При этом по отношению к *Atg*-генам GAF должен выполнять функцию негативной регуляции, а по отношению к *Tor* – положительной.

В оогенезе у мутантов *Trl* массовая клеточная гибель происходит не только за счет аутофагии, но и апоптоза, поэтому очевидно, что в этом случае дополнительно может нарушаться активность генов, регулирующих апоптоз. Одним из вероятных кандидатов является ген *diap* (death-associated inhibitor of apoptosis), который, помимо того что является потенциальной мишенью GAF, в мутантной форме индуцирует такой же фенотип в оогенезе, как и *Trl* (Rodriguez et al., 2002; Xu et al., 2005).

Заключение

Фенотип массовой гибели КЗП у *Trl*-мутантов имеет определенную специфику проявления в спермато- и оогенезе. В яичниках аутофагия сопутствует апоптозу, что соответствует каноническому сценарию клеточной гибели в среднем оогенезе дрозофилы. В семенниках наблюдается не характерная для этого типа ткани гибель через аутофагию, которая становится экспансивной и является основной причиной атрофии зародышевой линии. Массовая потеря КЗП связана с недостатком GAGA-фактора, что, вероятно, приводит к нарушению экспрессии генов-мишеней этого белка, отвечающих за клеточную гибель. К его потенциальным мишеням относятся как гены аутофагии, так и апоптоза, и можно предположить, что обе эти группы зависят от активности GAF в оогенезе. Тогда как в сперматогенезе этот белок взаимодействует только с генами аутофагии. Чтобы установить, какие гены под контролем GAF вовлечены в разные механизмы клеточной

гибели, необходимо привлечь транскриптомные технологии и проанализировать изменения профилей экспрессии генов в спермато- и оогенезе на фоне недостатка GAF у *Trl*-мутантов.

Список литературы / References

- Baricheva E.M., Katokhin A.V., Perelygina L.M. Expression of *Drosophila melanogaster* gene encoding transcription factor GAGA is tissue-specific and temperature-dependent. *FEBS Lett.* 1997;414(2): 285-288. DOI 10.1016/s0014-5793(97)01010-7.
- Barth J.M., Szabad J., Hafen E., Köhler K. Autophagy in *Drosophila* ovaries is induced by starvation and is required for oogenesis. *Cell Death Differ.* 2011;18(6):915-924. DOI 10.1038/cdd.2010.157.
- Bayarmagnai B., Nicolay B.N., Islam A.B., Lopez-Bigas N., Frolov M.V. *Drosophila* GAGA factor is required for full activation of the dE2f1-Yki/Sd transcriptional program. *Cell Cycle.* 2012;11(22): 4191-4202. DOI 10.4161/cc.22486.
- Berger N., Dubreucq B. Evolution goes GAGA: GAGA binding proteins across kingdoms. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1819(8):863-868. DOI 10.1016/j.bbagr.2012.02.022.
- Berry D.L., Baehrecke E.H. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell.* 2007;131: 1137-1148. DOI 10.1016/j.cell.2007.10.048.
- Bhat K.M., Farkas G., Karch F., Gyurkovics H., Gausz J., Schedl P. The GAGA factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division. *Development.* 1996;122(4):1113-1124.
- Bolobolova E.U., Dorogova N.V., Fedorova S.A. Major scenarios of genetically regulated cell death during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Russ. J. Genet.* 2020;56:655-665. DOI 10.1134/S1022795420060034.
- Das G., Shrivage B.V., Baehrecke E.H. Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012;4(6):a008813. DOI 10.1101/cshperspect.a008813.
- Denton D., Aung-Htut M.T., Lorensuhewa N., Nicolson S., Zhu W., Mills K., Cakouros D., Bergmann A., Kumar S. UTX coordinates steroid hormone-mediated autophagy and cell death. *Nat. Commun.* 2013;4:2916. DOI 10.1038/ncomms3916.
- Denton D., Chang T.-K., Nicolson S., Shrivage B., Simin R., Baehrecke E.H., Kumar S. Relationship between growth arrest and autophagy in midgut programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* 2012;19:1299-1307. DOI 10.1038/cdd.2012.43.
- DeVorkin L., Gorski S.M. LysoTracker staining to aid in monitoring autophagy in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014;9:951-958. DOI 10.1101/pdb.prot080325.
- Dorogova N.V., Fedorova E.V., Bolobolova E.U., Ogienko A.A., Baricheva E.M. GAGA protein is essential for male germ cell development in *Drosophila*. *Genesis.* 2014;52(8):738-751. DOI 10.1002/dvg.22789.
- Dorogova N.V., Khrushcheva A.S., Fedorova E.V., Ogienko A.A., Baricheva E.M. Role of GAGA factor in *Drosophila* primordial germ cell migration and gonad development. *Ontogeny.* 2016;47(1):40-48.
- Dos-Santos N., Rubin T., Chalvet F., Gandille P., Cremazy F., Leroy J., Boissonneau E., Theodore L. *Drosophila* retinal pigment cell death is regulated in a position-dependent manner by a cell memory gene. *Int. J. Dev. Biol.* 2008;52(1):21-31. DOI 10.1387/ijdb.072406nd.
- Drummond-Barbosa D., Spradling A.C. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 2001;231:265-278. DOI 10.1006/dbio.2000.0135.
- Fabian L., Brill J.A. *Drosophila* spermiogenesis: Big things come from little packages. *Spermatogenesis.* 2012;2(3):197-212. DOI 10.4161/spmg.21798.
- Farkas G., Gausz J., Galloni M., Reuter G., Gyurkovics H., Karch F. The *Trithorax*-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature.* 1994;371:806-808. DOI 10.1038/371806a0.

- Fedorova E.V., Dorogova N.V., Bolobolova E.U., Fedorova S.A., Karagodin D.A., Ogienko A.A., Khruscheva A.S., Baricheva E.M. GAGA protein is required for multiple aspects of *Drosophila* oogenesis and female fertility. *Genesis*. 2019;57(2):e23269. DOI 10.1002/dvg.23269.
- Fitzwalter B., Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J*. 2015;282(22):4279-4288. DOI 10.1111/febs.13515.
- Fuller M.T. Spermatogenesis In: The development of *Drosophila melanogaster*. *NY Cold Spring Harbor. Press*, 1993;71-147.
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., ..., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018; 25(3):486-541. DOI 10.1038/s41418-017-0012-4.
- Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H.-U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19:107-120. DOI 10.1038/cdd.2011.96.
- Giorgi F., Deri P. Cell death in ovarian chambers of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol*. 1976;35:521-533.
- Glick D., Barth S., Macleod K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol*. 2010;221(1):3-12. DOI 10.1002/path.2697.
- Granok H., Leibovitch B.A., Shaffer C.D., Elgin S.C.R. GAGA over GAGA factor. *Curr. Biol*. 1995;5:238-241. DOI 10.1016/s0960-9822(95)00048-0.
- Greenwood J., Gautier J. From oogenesis through gastrulation: developmental regulation of apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2005;16:215-224. DOI 10.1016/j.semcdb.2004.12.002.
- Hay B.A., Guo M. Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2006;22:623-650. DOI 10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093845.
- Hou Y.C., Chittaranjan S., Barbosa S.G., McCall K., Gorski S.M. Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J. Cell Biol*. 2008;182:1127-1139. DOI 10.1083/jcb.200712091.
- Jenkins V.K., Timmons A.K., McCall K. Diversity of cell death pathways: insight from the fly ovary. *Trends Cell Biol*. 2013;23(11):567-574. DOI 10.1016/j.tcb.2013.07.005.
- Jeong E.B., Jeong S.S., Cho E., Kim E.Y. Makorin 1 is required for *Drosophila* oogenesis by regulating insulin/Tor signaling. *PLoS One*. 2019;14(4):e0215688. DOI 10.1371/journal.pone.0215688.
- Karagodin D.A., Omelina E.S., Fedorova E.V., Baricheva E.M. Identification of functionally significant elements in the second intron of the *Drosophila melanogaster Trithorax-like* gene. *Gene*. 2013;520: 178-184. DOI 10.1016/j.gene.2013.02.012.
- Kihlmark M., Imreh G., Hallberg E. Sequential degradation of proteins from the nuclear envelope during apoptosis. *J. Cell Sci*. 2001; 114(Pt 20):3643-3653.
- King R.C. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. New York: Academic Press Inc., 1970.
- Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2007;14(1):32-43. DOI 10.1038/sj.cdd.4402060.
- LaFever L., Feoktistov A., Hsu H.J., Drummond-Barbosa D. Specific roles of Target of rapamycin in the control of stem cells and their progeny in the *Drosophila* ovary. *Development*. 2010;137:2117-2126. DOI 10.1242/dev.050351.
- Laws K.M., Drummond-Barbosa D. Control of germline stem cell lineages by diet and physiology. *Results Probl. Cell Differ*. 2017;59: 67-99. DOI 10.1007/978-3-319-44820-6_3.
- Levine B., Klionsky D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*. 2004; 6:463-477. DOI 10.1016/s1534-5807(04)00099-1.
- Matharu N.K., Hussain T., Sankaranarayanan R., Mishra R.K. Vertebrate homologue of *Drosophila* GAGA factor. *J. Mol. Biol*. 2010; 400:434-447. DOI 10.1016/j.jmb.2010.05.010.
- McCall K. Eggs over easy: cell death in the *Drosophila* ovary. *Dev. Biol*. 2004;274(1):3-14. DOI 10.1016/j.ydbio.2004.07.017.
- Napoletano F., Gibert B., Yacobi-Sharon K., Vincent S., Favrot C., Mehlen P., Girard V., Teil M., Chatelain G., Walter L., Arama E., Mollereau B. p53-dependent programmed necrosis controls germ cell homeostasis during spermatogenesis. *PLoS Genet*. 2017;13(9): e1007024. DOI 10.1371/journal.pgen.1007024.
- Noda N.N., Inagaki F. Mechanisms of autophagy *Annu. Rev. Biophys.* 2015;44:101-122. DOI 10.1146/annurev-biophys-060414-034248.
- Ogienko A.A., Fedorova S.A., Baricheva E.M. Basic aspects of ovarian development in *Drosophila melanogaster*. *Russ. J. Genet*. 2007; 43(10):1120-1134.
- Ogienko A.A., Karagodin D.A., Fedorova S.A., Fedorova E.V., Lashina V.V., Baricheva E.M. Effect of hypomorphic mutation in *Trithorax-like* gene on *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Ontogenez*. 2006;37(3):211-220.
- Ogienko A.A., Karagodin D.A., Pavlova N.V., Fedorova S.A., Voloshina M.A., Baricheva E.M. Molecular and genetic description of a new hypomorphic mutation of *Trithorax-like* gene and analysis of its effect on *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Ontogenez*. 2008; 39(2):134-142.
- Omelina E.S., Baricheva E.M., Oshchepkov D.Y., Merkulova T.I. Analysis and recognition of the GAGA transcription factor binding sites in *Drosophila* genes. *Comput. Biol. Chem*. 2011;35(6):363-370. DOI 10.1016/j.compbiolchem.2011.10.008.
- Omichinski J.G., Pedone P.V., Felsenfeld G., Gronenborn A.M., Clore G.M. The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode. *Nat. Struct. Biol*. 1997;4: 122-132.
- Peterson J.S., Timmons A.K., Mondragon A.A., McCall K. The end of the beginning: cell death in the germline. *Curr. Top. Dev. Biol*. 2015; 114:93-119. DOI 10.1016/bs.ctdb.2015.07.025.
- Pritchett T.L., McCall K. Role of the insulin/Tor signaling network in starvation-induced programmed cell death in *Drosophila* oogenesis. *Cell Death Differ*. 2012;19:1069-1079. DOI 10.1038/cdd.2011.200.
- Pritchett T.L., Tanner E.A., McCall K. Cracking open cell death in the *Drosophila* ovary. *Apoptosis*. 2009;14:969-979. DOI 10.1007/s10495-009-0369-z.
- Rodriguez A., Chen P., Oliver H., Abrams J.M. Unrestrained caspase-dependent cell death caused by loss of *Diap1* function requires the *Drosophila* Apaf-1 homolog, *Dark*. *EMBO J*. 2002;21:2189-2197. DOI 10.1093/emboj/21.9.2189.
- Roy S., Ernst J., Kharchenko P.V., Kheradpour P., Negre N., Eaton M.L., Landolin J.M., Bristow C.A., Ma L.J., Lin M.F., Kellis M. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science*. 2010;330(6012):1787-1797. DOI 10.1126/science.1198374.
- Sarkissian T., Timmons A., Arya R., Abdelwahid E., White K. Detecting apoptosis in *Drosophila* tissues and cells. *Methods*. 2014;68: 89-96. DOI 10.1016/j.ymeth.2014.02.033.
- Schwedes C., Tulsiani S., Carney G.E. Ecdysone receptor expression and activity in adult *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol*. 2011;57(7):899-907. DOI 10.1016/j.jinsphys.2011.03.027.
- Soeller W.C., Oh C.E., Kornberg T.B. Isolation of cDNAs encoding the *Drosophila* GAGA transcription factor. *Mol. Cell. Biol*. 1993;13: 7961-7970. DOI 10.1128/mcb.13.12.7961.
- Spradling A.C. Developmental genetics of oogenesis. The development of *Drosophila melanogaster*. NY Cold Spring Harb. Lab. Press, 1993;1-70.

- Swart Ch., Du Toit A., Loos B. Autophagy and the invisible line between life and death. *Eur. J. Cell Biol.* 2016;95(12):598-610. DOI 10.1016/j.ejcb.2016.10.005.
- van Steensel B., Delrow J., Bussemaker H.J. Genomewide analysis of *Drosophila* GAGA factor target genes reveals context-dependent DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(5):2580-2580. DOI 10.1073/pnas.0438000100.
- van Steensel B., Delrow J., Henikoff S. Supplementary information: Chromatin profiling using targeted DNA adenine methyltransferase. *Nat. Genet.* 2001;27(3):304-308. DOI 10.1038/85871.
- Wilkins R.C., Lis J.T. Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(20):3963-3968. DOI 10.1093/nar/25.20.3963.
- Xu D., Li Y., Arcaro M., Lackey M., Bergmann A. The CARD-carrying caspase Dronc is essential for most, but not all, developmental cell death in *Drosophila*. *Development.* 2005;132:2125-2134. DOI 10.1242/dev.01790.
- Yacobi-Sharon K., Namdar Y., Arama E. Alternative germ cell death pathway in *Drosophila* involves HtrA2/Omi, lysosomes, and a caspase-9 counterpart. *Dev Cell.* 2013;25:29-42. DOI 10.1016/j.devcel.2013.02.002.

ORCID ID

N.V. Dorogova orcid.org/0000-0003-2119-541X

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00496-а и бюджетного проекта № 0259-2021-0011. Авторы выражают благодарность сотруднику ИЦиГ СО РАН Д.А. Карагодину за консультацию и помощь в интерпретации результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.11.2020. После доработки 24.12.2020. Принята к публикации 25.12.2020.

Polymorphism of genes associated with infectious lung diseases in Northern Asian populations and in patients with community-acquired pneumonia

S.V. Mikhailova¹✉, L.V. Shcherbakova², N.I. Logvinenko³, I.I. Logvinenko^{2,3}, M.I. Voevoda¹

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

² Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

✉ mikhail@bionet.nsc.ru

Abstract: The innate immune system is the first to respond to invading pathogens. It is responsible for invader recognition, immune-cell recruitment, adaptive-immunity activation, and regulation of inflammation intensity. Previously, two single-nucleotide polymorphisms of innate-immunity genes – rs5743708 (Arg753Gln) of the *TLR2* gene and rs8177374 (Ser180Leu) of the *TIRAP* gene – have been shown to be associated with both pneumonia and tuberculosis in humans, but the data are contradictory among different ethnic groups. It has also been reported that rs10902158 at the *PKP3-SIGGIR-TMEM16J* genetic locus belongs to a haplotype race-specifically associated with tuberculosis. Meanwhile, a gradient of its frequency is observed in Asia. The aim of this work was to assess the effect of selection for the genotypes of the above-mentioned SNPs on the gene pools of populations living in harsh climatic conditions that contribute to the development of infectious lung diseases. We estimated the prevalence of these variants in white and Asian (Chukchis and Yakuts) population samples from Northern Asia and among patients with community-acquired pneumonia (CAP). Carriage of the rs5743708 A allele was found to predispose to severe CAP (odds ratio 2.77, $p = 0.021$), whereas the GG/CT genotype of rs5743708/rs8177374 proved to be protective against it (odds ratio 0.478, $p = 0.022$) in white patients. No association of rs10902158 with CAP (total or severe) was found among whites. Stratification of CAP by causative pathogen may help eliminate the current discrepancies between different studies. No significant difference in rs5743708 or rs8177374 was found between adolescent and long-lived white samples. Carriage of the alleles studied is probably not associated with predisposition to longevity among whites in Siberia. Both white and Asian populations studied were different from Western European and East Asian populations in the variants' prevalence. The frequency of the rs8177374 T (Ser180Leu) variant was significantly higher in the Chukchi sample ($p = 0$, $\chi^2 = 63.22$) relative to the East Asian populations. This result may confirm the hypothesis about the selection of this allele in the course of human migration into areas with unfavorable climatic conditions. Key words: community-acquired pneumonia; pulmonary tuberculosis; genetic predisposition; genetic polymorphism; *TLR2*; *TIRAP*; *PKP3-SIGGIR-TMEM16J*; long-lived people.

For citation: Mikhailova S.V., Shcherbakova L.V., Logvinenko N.I., Logvinenko I.I., Voevoda M.I. Polymorphism of genes associated with infectious lung diseases in Northern Asian populations and in patients with community-acquired pneumonia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):301-309. DOI 10.18699/VJ21.51-o

Полиморфизм генов, ассоциированных с инфекционными заболеваниями легких, в популяциях Северной Азии и среди пациентов с внебольничными пневмониями

С.В. Михайлова¹✉, Л.В. Щербакова², Н.И. Логвиненко³, И.И. Логвиненко^{2,3}, М.И. Воевода¹

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

² Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

✉ mikhail@bionet.nsc.ru

Аннотация: Врожденный иммунитет первым отвечает на инфекцию. Он участвует в распознавании патогена, привлечении к месту заражения иммунных клеток, а также активирует адаптивный иммунитет и регулирует интенсивность воспалительного ответа. Для двух однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов врожденного иммунитета – rs5743708 (Arg753Gln) гена *TLR2* и rs8177374 (Ser180Leu) гена *TIRAP* – была показана ассоциация одновременно с пневмонией и туберкулезом, однако полученные данные различаются для разных этнических групп. Для rs10902158, расположенного в генетическом локусе *PKP3-SIGGIR-TMEM16J*, ранее было показано, что он входит в гаплотип, распецифически ассоциированный с туберкулезом. При этом на тер-

ритории Азии наблюдается градиент его частоты. Целью нашей работы была оценка влияния отбора по генотипам названных ОНП на генофонды популяций, живущих в климатических условиях, неблагоприятных по инфекционным заболеваниям легких. Мы оценили распространение этих ОНП в выборках европеоидного и монголоидного (чукчи и якуты) населения Северной Азии и среди пациентов с внебольничной пневмонией. Носительство аллеля А rs5743708 гена *TLR2* предрасполагало к развитию тяжелой внебольничной пневмонии ($OR = 2.77, p = 0.021$), а генотип GG/CT по rs5743708/rs8177374 оказался протективным против нее ($OR = 0.478, p = 0.022$) у европеоидов. Ассоциации rs10902158 с внебольничной пневмонией (как в целом, так и ее тяжелой формы) в европеоидной выборке обнаружено не было. Дифференцировка внебольничных пневмоний по их этиологии, возможно, позволит устранить наблюдаемые противоречия в данных разных исследователей об ассоциации исследованных ОНП с заболеванием. Не выявлено достоверных различий по частоте rs5743708 гена *TLR2* и rs8177374 гена *TIRAP* между европеоидными выборками подростков и долгожителей. Вероятно, эти ОНП не влияют на предрасположенность к долгожительству в европеоидных популяциях, проживающих на Севере Евразии. Исследованные нами европеоидные и монголоидные популяционные выборки отличались по частотам вышеперечисленных вариантов от западноевропейских и восточноазиатских популяций. Частота варианта rs8177374 T (Ser180Leu) гена *TIRAP* в выборке чукчей была достоверно выше ($p = 0, \chi^2 = 63.22$), чем в популяциях Восточной Азии, что может служить подтверждением нашего предположения об отборе этого варианта в ходе миграции человека в районы с неблагоприятными климатическими условиями. Ключевые слова: внебольничная пневмония; туберкулез легких; генетическая предрасположенность; генетический полиморфизм; ген *TLR2*; ген *TIRAP*; генетический район PKP3-SIGGIR-TMEM16J; долгожители.

Introduction

Innate immunity constitutes the first barrier against microorganisms and viruses by destroying infected cells and activating adaptive immunity. Nonetheless, an excessive nonspecific immune reaction (inflammation) may be life threatening because it can completely disrupt the functioning of vital organs. Community-acquired pneumonia (CAP) and pulmonary tuberculosis (PTB) are infectious diseases characterized by high mortality, and according to WHO, are ranked consistently among the top 10 leading causes of death in the world (<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>).

Pneumonia is an inflammatory lower-respiratory-tract disease caused by viruses, bacteria, fungi, and parasites. In addition, it may be due to noninfectious processes or have a combined cause. For a long time, *Streptococcus pneumoniae* infection has been considered the main cause of CAP; however, it was shown recently that CAP develops mainly as a result of viral infections (influenza A and B viruses, parainfluenza viruses, adenovirus, respiratory syncytial virus, or coronaviruses) (Choi et al., 2012; Hong et al., 2014; Self et al., 2017). *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and other microbes may be causative agents of bacterial pneumonia (Choi et al., 2012; Hong et al., 2014; Self et al., 2017). After invasion of the airway epithelium by pathogens, these cells start to produce reactive oxygen species, cytokines, and other mediators to recruit immune cells. Being most abundant in lungs, alveolar macrophages ingest bacteria and apoptotic cells and can present antigens on MHC II to other immune cells. Proinflammatory M1 macrophages produce cytokines TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-12, and IL-23 to enhance inflammation for elimination of the invaders. Anti-inflammatory M2 macrophages produce cytokines IL-4, IL-13, and TGF- β to induce completion of the inflammatory reaction and remodeling of damaged tissue (Moldoveanu et al., 2009; Arango Duque, Descoteaux, 2014; Kumar, 2019).

Depending on the set of present chemokines and cytokines, different cells responsible for humoral and cellular immunity are attracted to the site of infection (Kumar, 2019). Severe

pneumonias are more likely to develop in coinfections; it has been demonstrated that a viral infection (in particular influenza) facilitates the development of pneumococcal infection by damaging the epithelium and reducing the amount of a surfactant (McCullers, 2014; Aguilera, Lenz, 2020). Human respiratory syncytial virus, metapneumovirus, adenovirus, and influenza viruses A and B prefer a cold season (Price et al., 2019). The seasonal increase in the incidence of pneumococcal pneumonia coincides with seasonal outbreaks of influenza; *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, and *S. aureus* infections have been reported to be associated with significant influenza pandemics (McCullers, 2014; Bystritskaya, Bilichenko, 2017; Morris et al., 2017).

PTB is a pulmonary infectious disease caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). According to the WHO, approximately one-quarter of the world's population is estimated to be infected by *Mtb*, and 5–15 % of these people will fall ill with active tuberculosis. In Russia, most of these patients (95 %) have PTB (<https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskiy-sbornik-2018-god>). The pathogenesis of pulmonary tuberculosis is based on *Mtb* survival after phagocytosis by alveolar macrophages. These bacteria can modulate a host immune response to protect the infected cells, change their metabolism, induce IL-10, suppress IL-12 and TNF α synthesis, and to inhibit MHC II expression and antigen presentation. *Mtb* makes macrophages unresponsive to interferon (IFN) γ and inhibits autophagy. It allows the mycobacteria to establish a persistent or latent infection in macrophages. Mycobacteria are believed to use the general mechanism of negative feedback regulation that restricts excessive inflammation (Harding, Boom, 2010; Richardson et al., 2015; Gopalakrishnan, Salgame, 2016). With the loss of immunity-driven control over mycobacterial reproduction, foamy macrophages accumulate in granulomas, and lung tissue necrosis begins (Liu C.H. et al., 2017). Vitamin D deficiency is known to negatively affect the effectiveness of the immune response in tuberculosis (Wilkinson et al., 2000; Aibana et al., 2019).

These data suggest that in Northern Asia, a region with low temperature and reduced insolation during most of the year,

signs of purifying selection for genes associated with lung infections may be noticeable. For many genes of innate immunity, an association with viral, bacterial, and autoimmune diseases has been proven. Despite differences in the pathogenesis between CAP and PTB, it has been shown that minor alleles of rs5743708 (the *TLR2* gene) and of rs8177374 (the *TIRAP* gene) can have a pathogenic and protective effect, respectively, in both of these lung diseases in humans. Nevertheless, data obtained by different research groups are contradictory.

Toll-like receptors (TLRs) play a pivotal role in host defense. Being membrane-anchored (TLRs 1, 2, 4–6, and 10) or endosomal (TLRs 3 and 7–9) in human immune cells (e.g., macrophages, monocytes, dendritic cells, and some leukocytes), they are involved in the recognition of structurally conserved surface molecules of microorganisms and viruses as well as viral nucleic acids (Barbalat et al., 2009; Kawai, Akira, 2010; Kumar, 2019). TLR2 participates in the recognition of a large number of diverse lipoproteins and peptidoglycans of gram-positive and gram-negative bacteria, fungi, and virus-infected cells. After ligand binding to the receptor, TIR (Toll-interleukin 1 receptor) domains of TLR2 and TLR1 or TLR2 and TLR6 dimerize via the formation of an extensive hydrogen-bonding network and hydrophobic interactions (Jin et al., 2007; Takeda, Akira, 2015). Homodimerization of the cytoplasmic domains of TLR2 does not induce TNF α production *in vitro* in murine macrophages, and the formation of the TLR2–TLR2 dimer is not detectable even in the presence of an agonist (Ozinsky et al., 2000; Shukla et al., 2018). Therefore, the existence of TLR2–TLR2 homodimers *in vivo* is being questioned. After ligand binding, reorientation of the TIR domains and triggering of a cascade of intracellular reactions lead to the activation of proinflammatory NF- κ B and MAPK pathways, synthesis and a release of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-12, TNF- α , and IL-6) and various chemokines into extracellular space, and the development of an inflammatory response at the pathogen entry site (Liu C.H. et al., 2017; Tapader et al., 2018). In inflammatory monocytes, TLR2 induces type I IFN production in response to a viral ligand (Barbalat et al., 2009). It is reported that prolonged stimulation of TLR2 (more than 24 h) causes PI3K/Akt pathway activation in alveolar macrophages. It limits the production of NF- κ B, TNF- α , and IL-12 and activates the synthesis of anti-inflammatory IL-10. This mechanism is assumed to prevent excessive inflammation (Richardson et al., 2015; Liu Y. et al., 2016).

The *TLR2* gene is located in 4q31.3, has five exons, and expresses few splicing isoforms, but all of the coding sequences are contained within exon 3. The protein consists of 784 amino acid residues (aa) and includes extracellular leucine-rich repeat domains, which are primarily responsible for ligand recognition (aa 54–524), followed by the leucine-rich repeat C-terminal domain (aa 525–579) and intracellular TIR domain (aa 639–782), which mediates downstream signaling (<https://www.uniprot.org/uniprot/O60603>). It is expressed constitutively on macrophages and dendritic cells and can be induced in epithelial cells or B-cells. Its overexpression in patients with pneumococcal disease had been documented (Siebert et al., 2018).

Single-nucleotide polymorphism (SNP) rs5743708 (of the *TLR2* gene) causing the Arg753Gln substitution is located

in the TIR domain of the protein. This SNP is associated simultaneously with resistance to Lyme disease (Schröder et al., 2005) and with predisposition to tuberculosis (Guo, Xia, 2015; Patarčić et al., 2015), whereas the association with predisposition to PTB is race-specific (Caws et al., 2008; Guo, Xia, 2015; Hu et al., 2019). It is believed that TLR2 signaling may be nonessential to control acute tuberculosis but important during chronic tuberculosis (Gopalakrishnan, Salgame, 2016). A meta-analysis has shown the *TLR2* rs5743708 minor allele to be associated with CAP, Legionnaires' disease, and pneumococcal disease; however, the data obtained in different studies are contradictory (Moens et al., 2007; Patarčić et al., 2015; Smelaya et al., 2016).

The *TIRAP* (TIR domain-containing adaptor protein) gene also known as *Mal* (MyD88 adapter-like) encodes one of the five adapter proteins that are involved in signal transduction from activated TLRs to protein kinases at the plasma membrane (Bonham et al., 2014). It is located in 11q24.2, consists of six exons, and encodes a protein of 221 aa. The TIRAP protein includes an N-terminal PEST domain (aa 15–35) responsible for binding to special sites in the plasma membrane, followed by an AB-loop mediating MyD88 and TLR4 binding. A binding site for TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) is located within the region aa 188–193 (Bernard, O'Neill, 2013). TIRAP is expressed in many cell types (Narayanan, Park, 2015), and its isoforms resulting from alternative splicing have unknown functions. There are different opinions about whether TIRAP forms a complex with the TIR domain of TLR6 for signal transmission; however, it has been proven that TIRAP mediates TLR2 and TLR4 signaling by facilitating the recruitment of the MyD88 adaptor protein to the TLRs (Nagpal et al., 2009; Bernard, O'Neill, 2013).

Activation of NF- κ B, MAPK1, MAPK3, and JNK results in cytokine secretion and an inflammatory response. SNP rs8177374 (the *TIRAP* gene) is located in exon 5 and represents the Ser180Leu substitution in the encoded protein. It is located close to the TLR-binding site of TIRAP. In carriers of this substitution, modulation of TLR1, TLR2, TLR4, and TLR6 but not TLR9 signaling has been shown (Khor et al., 2007; Ferwerda et al., 2009; Siebert et al., 2018). Ser180Leu in a heterozygous state has a protective effect against PTB and invasive pneumococcal disease in white and African samples and against malaria in African and Asian samples (Khor et al., 2007; Panda et al., 2016). Carriage of heterozygous Ser180Leu protects children from pneumococcal lower-respiratory-tract infections, whereas carriers of the homozygous 180Leu polymorphism alone or in combination with some TLR1 and TLR6 polymorphisms may be susceptible to recurrent pneumococcal infections (Siebert et al., 2018). Simultaneous carriage of the TIRAP 180Leu variant and some SNPs in the *TLR4* gene as well as 180Leu homozygosity increases susceptibility to severe hospital-acquired infections (Kumpf et al., 2010).

The opposite results have been obtained as well. The rs8177374 T allele (180Leu) increases the risk of PTB in a sample of Iranian population (Naderi et al., 2014). A meta-analysis of nine published case-control studies did not reveal a significant association of 180L with tuberculosis risk (Miao et al., 2011). There are controversial opinions about the mechanism behind the observed protective effect of Ser180Leu heterozygosity. They are based on differences in observed

effects of the SNP at the level of proinflammatory cytokines. Depending on the model used, some research groups showed an increased level (Ferwerda et al., 2009; Panda et al., 2016) and others a decreased level (Khor et al., 2007; Kumpf et al., 2010; Siebert et al., 2018) of cytokines after their induction in 180 Leu/Leu carriers. Accordingly, homozygosity of the minor variant of rs8177374 is thought to cause either an excessive inflammatory reaction or the absence of an adequate immune response. It is supposed that selection pressure on the *TIRAP* gene provides a balance between protection against excessive inflammation and effective defense during infectious diseases (Khor et al., 2007; Ferwerda et al., 2009).

Besides the polymorphisms in genes *TLR2* and *TIRAP*, in this paper, we focused on the *PKP3-SIGGIR-TMEM16J* gene region. An association of its haplotypes with different types of tuberculosis has been shown among children in Vietnam and South Africa (Horne et al., 2012; Gupta et al., 2016). It is believed that the impact of the haplotypes on immunity is determined by SIGIRR (single immunoglobulin interleukin 1 receptor; synonym: IL-1R8), which is a negative regulator of TLR signaling (Molgora et al., 2016). Carriage of rs10902158 GG and rs7111432 AA in introns of *PKP3* and *TMEM16J*, respectively, acts additively with a vitamin D deficiency and “pathogenic” genotypes of rs5743708 (*TLR2*) and rs8177374 (*TIRAP*) on tuberculosis predisposition (Horne et al., 2012; Gupta et al., 2016). rs10902158 located in intron 2 of the *PKP3* gene has been analyzed. Encoded desmosomal plaque protein plakophilin 3 is involved in intracellular adhesion (Gurjar et al., 2018). Of note, rs10902158 has a frequency gradient in Asia; according to the Genome Aggregation Database (GnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), it is absent in South Asia and is found with a frequency of ~50 % in Southeast Asia. Nonetheless, functional significance of genetic variants in noncoding parts of the *PKP3-SIGGIR-TMEM16J* gene region, including rs10902158, is not clear.

In this work, we analyzed the frequencies of rs5743708, rs8177374, and rs10902158 (for which conflicting data on the association with respiratory infections have been reported previously) in white and Asian samples from Northern Asia and among CAP patients. According to the statistics of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk Oblast and Yakutia are characterized by an increased incidence of PTB, whereas Chukotka Autonomous Okrug is the leader in both pneumonia and PTB morbidity in Russia (<https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskii-i-informatsionnye-materialy/statisticheskii-sbornik-2017-god>; <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskii-i-informatsionnye-materialy/statisticheskii-sbornik-2018-god>). According to the WHO, the highest death rate from pneumonia is observed before the age of 5 and after 75–80 years (https://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/Ch6_22pneumo.pdf). Therefore, we assumed that long-lived people of the Siberian Federal District may differ from adolescents in the frequency of rs5743708 and rs8177374, and we assessed the prevalence of the pathogenic variants in the sample of long-lived people.

Materials and methods

The study protocol was approved by the local Ethics Committee of the Institute of Internal and Preventive Medicine (branch

of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia; approval No. 22.06.2008). Written informed consent to be examined and to participate in the study was obtained from each patient. For individuals younger than 18 years, the informed consent was signed by a parent or legal guardian.

The white sample consisted of 451 adolescents (95 % Russians, 197 males, 253 females, aged 14–17) from Oktiabr'skii district of Novosibirsk (55°01' N 82°55' E) and 289 Russian settlers (120 males, 169 females, aged 45–64, mean age 52.5) in towns Tommot (58°58'00" N 126°16'0" E), Neryungri (56°39'30" N 124°43'30" E), Ust-Nera (64°34'05" N 143°14'10" E), and Yakutsk (62°01'38" N 129°43'55" E), who lived in Yakutia for more than 16 years or were born there. The adolescent sample was described previously (Zavyalova et al., 2011). Asian samples (220 individuals) consisted of 130 Chukchis (66 males, 64 females, aged 18–73, mean age 40) from the Kanchalan village (65°10'41" N 176°44'52" E) of Chukotka Autonomous Okrug and 132 Yakuts (53 males, 79 females, aged 44–64, mean age 49) from the Kylay village (63°13'34" N 132°08'06" E) and towns Tommot, Neryungri, and Ust-Nera of Yakutia. The sample of long-lived people was collected in cities Novosibirsk, Tomsk, and Tumen and consisted of 188 individuals (180 females, 8 males) aged 90–105, mean age 92.

Ethnicity of individuals was identified using questionnaires and additional cross-examination with elucidation of the nationality of ancestors (at least in three generations). Persons of mixed origin were excluded from the analysis. The CAP patient sample (406 whites) was collected in offices of pulmonary hospitals of Novosibirsk and Yakutsk in 2003–2005 before the COVID-19 outbreak. The sample consists of 120 patients with severe CAP (aged 18–80, mean age 52) and 286 patients with nonsevere (mild to moderate severity) CAP (aged 16–92, mean age 39). The diagnosis of pneumonia was made on the basis of radiologically confirmed “fresh” lung tissue infiltration and clinical data (fever, cough, sputum production, chest pain, and shortness of breath) in the absence of an obvious diagnostic alternative. CAP of various etiologies was regarded as severe if the CURB65 rating scale index was 4–5 points (Lim et al., 2003).

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes by the standard phenol–chloroform method (Sambrook, Russell, 2006). Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR) with an analysis of restriction fragment length polymorphism by electrophoresis in a 5 % polyacrylamide gel after visualization with an ethidium bromide solution.

The rs5743708 SNP (*TLR2*) was identified by amplification of DNA with primers 5'-GCCATTCTCATTCTTCTGG*AGC-3' and 5'-GGGAACCTAGGACTTTATCGCA-3' (* denotes a nucleotide changed for restriction site creation). The 168-bp PCR product was digested with the Pst I restriction endonuclease (SibEnzyme, Novosibirsk) for 2 h at 37 °C. The rs5743708 A (753Q) allele was revealed by the presence of fragments of 20, 45, and 103 bp, whereas the rs5743708 G allele by fragments of 20 and 148 bp.

The detection of rs8177374 (*TIRAP*) was performed by amplification of genomic DNA with primers 5'-GGCTGC ACCATCCCCCA*GC-3' and 5'-CCGTTCCCCTTCTCCCT

CCTGTAG-3' (* denotes a nucleotide changed for restriction site creation). The 162-bp PCR product was digested with the AccB7 I restriction endonuclease (SibEnzyme, Novosibirsk) for 2 h at 37 °C. The rs8177374 T (180L) allele was identified by the presence of fragments of 21 and 141 bp, whereas in case of rs8177374 C, the PCR product was not cut.

Primers 5'-TGGCAAGGATTGGAGAAGCTC*C*TGTC-3' and 5'-CAGGGCCAGTGCCTCCCC-3' (* denotes nucleotides changed for restriction site creation) were used for the amplification of the PKP3 intron 2 sequence containing rs10902158. The resulting 192-bp amplicon was digested with the BstEN I restriction endonuclease (Sibenzyme, Novosibirsk) for 2 h at 65 °C. In the presence of the rs10902158 A allele, the PCR product was not cut, whereas in the case of the rs10902158 G allele, fragments of 24 and 168 bp were observed.

Statistical analysis was performed in the SPSS 16.0 software.

Results

Genotype distributions were consistent with the Hardy–Weinberg equilibrium among all the population samples (data not shown). Minor allele frequencies for rs5743708, rs8177374, and rs10902158 are represented in Table 1.

In the sample of Novosibirsk adolescents, allele frequencies of rs5743708, rs8177374, and rs10902158 differed from those of the non-Finnish European sample in GnomAD ($\chi^2 = 6.621$, $p = 0.013$; $\chi^2 = 19.541$, $p = 0$; $\chi^2 = 54.554$, $p = 0$, respectively).

For the frequency of the rs5743708 A (Arg753Gln) allele, there was a tendency for a decrease in Russian settlers in Yakutia and among long-lived people compared with the Novosibirsk sample.

The rs8177374 T (Ser180Leu) frequency did not differ among the studied white samples.

In the sample of Russian settlers of Yakutia, males and females differed in the frequency of rs10902158 ($p = 0.037$, $\chi^2 = 4.86$). Moreover, the frequency of this SNP among males was closer to that observed in non-Finnish Europeans according to GnomAD data, and the frequency among females was closer to that observed in the Novosibirsk sample. Perhaps there were sex differences during recent migration to Yakutia from different regions of Russia. Genetic analysis of a larger sample and estimation of this SNP's frequency in western regions of Russia are required for explaining the observed differences.

The two analyzed Asian samples differed from each other and from GnomAD East Asian cohorts. Among Yakuts, the rs5743708 A (Arg753Gln) variant, which is very rare in other Asian populations, was found at a frequency of 0.015 ± 0.007 (mean \pm SD). Chukchis differed significantly from GnomAD East Asians in rs10902158 allele frequency ($p = 0$, $\chi^2 = 63.22$) (see Table 1).

Frequencies of polymorphisms rs5743708, rs8177374, and rs10902158 were not different among adolescents and total white CAP patient samples. By contrast, after the sample was divided into patients with severe and nonsevere CAP, differences were found for rs5743708 ($p = 0.021$, $\chi^2 = 6.24$). Next, genotype frequencies were estimated for rs5743708, rs8177374, and rs10902158 in the examined samples (except for long-lived people regarding rs10902158). For the latter SNP (in the PKP3 gene), no difference in frequency was detectable within any group (data not shown). The observed distribution of rs5743708 and rs8177374 genotypes among the studied samples is presented in Table 2.

Table 1. Minor allele frequencies for rs5743708, rs8177374, and rs10902158 in the studied samples and in the Genome Aggregation Database (GnomAD)

Group, sample size	rs5743708 A (TLR2)		rs8177374 T (TIRAP)		rs10902158 A (PKP3)	
	Allele number	Allele frequency	Allele number	Allele frequency	Allele number	Allele frequency
Asians						
Chukchis, 130	0	0	17	0.065	116	0.446
Yakuts, 132	4	0.015	6	0.023	100	0.379
East Asia (GnomAD)		0.0002		0.012		0.562
Whites						
Adolescents (Novosibirsk), 451	39	0.043	93	0.103	198	0.220
Long-lived people, 188	11	0.029	29	0.077	–	–
Russians (Yakutia) total sample, 289	13	0.022	50	0.087	119	0.206
Russians (Yakutia), females, 169	7	0.020	29	0.086	80	0.237
Russians (Yakutia), males, 120	6	0.025	21	0.088	39	0.163
Total CAP, 406	25	0.031	80	0.100	200	0.246
Severe CAP, 120	13	0.054	17	0.071	62	0.258
Nonsevere CAP, 286	12	0.021	63	0.109	138	0.241
Non-Finnish European (GnomAD)		0.029		0.157		0.153

Note: CAP, community-acquired pneumonia.

Table 2. Combined genotype frequencies of rs5743708 and rs8177374 in the studied populations and patient groups

Samples/genotypes	Sample size	GG/CC		GG/CT		GG/TT		AG/CC		AG/CT		AA/CC		AA/CT	
		<i>n</i>	<i>q</i>												
Adolescents, Novosibirsk	451	335	0.742	75	0.166	4	0.009	27	0.060	8	0.018	1	0.002	1	0.002
Russians, Yakutia	289	230	0.796	44	0.152	2	0.007	10	0.035	3	0.010	0	0	0	0
Long-lived people	188	150	0.798	25	0.133	2	0.011	11	0.058	0	0	0	0	0	0
Total CAP	406	308	0.759	71	0.175	2	0.005	22	0.054	3	0.007	0	0	0	0
Severe CAP	120	93	0.775	13	0.108	1	0.008	11	0.092	2	0.017	0	0	0	0
Nonsevere CAP	286	215	0.752	58	0.203	1	0.003	11	0.038	1	0.003	0	0	0	0
Chukchis	130	113	0.869	17	0.131	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yakuts	132	122	0.924	6	0.045	0	0	4	0.030	0	0	0	0	0	0

Note: *n*, number of genotype carriers; *q*, genotype frequency.

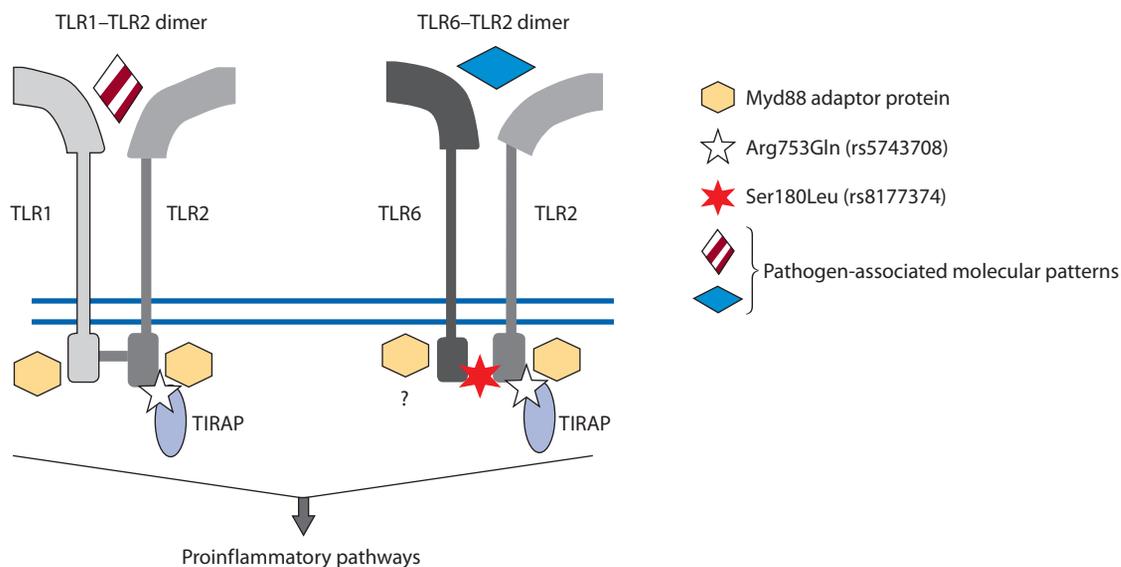
The frequencies of genotypes of rs5743708 and rs8177374 did not differ among the following samples: adolescents of Novosibirsk, long-lived people of Siberia, all patients with CAP, and all Russians in Yakutia. Possibly, the carriage of the studied alleles is not associated with predisposition to longevity in Siberia and does not significantly affect the probability of resettling of migrants in more unfavorable climatic conditions at present. This notion is consistent with WHO findings that in Eastern Europe, in contrast to Western and Central Europe, the pneumonia mortality rate does not increase significantly after age 80 (https://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/Ch6_22Pneumo.pdf). As for pneumonia, carriage of the rs5743708 A allele predisposed to severe CAP (AG/CC+AG/CT vs all: odds ratio 2.77, 95 % confidence interval 1.227–6.272, $p = 0.021$). The heterozygous genotype of rs8177374 in combination with the GG genotype of rs5743708 had a protective effect against severe CAP (GG/CT vs all: odds ratio 0.478, 95 % confidence interval 0.251–0.909, $p = 0.022$).

Discussion

It was shown here that carriage of none of the three studied SNPs, rs5743708, rs8177374, and rs10902158, is associated with the predisposition to CAP in total. By contrast, we found that the Arg753Gln variant of *TLR2* predisposes to severe CAP, and the heterozygous Ser180Leu variant of *TIRAP* in combination with the 753 Arg/Arg variant of *TLR2* has a protective effect against it in the white population. These data partially explain the contradictions in the data from different researchers. Most likely, the contribution of the alleles of genes *TLR2* and *TIRAP* to CAP predisposition is determined by pneumonia etiology. A substantial proportion of severe pneumonia cases are known to be caused by combined viral and bacterial infections (McCullers, 2014; Morris et al., 2017; Aguilera, Lenz, 2020). *TLR2* is responsible mainly for the recognition of bacteria-associated molecular patterns; Ser180Leu of the *TIRAP* gene modulates signal transduction only from *TLR2* and *TLR4* recognizing molecular patterns of bacteria as well (Nagpal et al., 2009). Most likely, combined and bacterial but not viral pneumonias are associated with *TLR2* and *TIRAP* gene variants.

The studied Asian ethno-geographical groups showed an increased frequency of the protective rs8177374 T (Ser180Leu) variant of *TIRAP* relative to neighboring East Asian populations. In the Chukchi sample, the difference was significant ($p = 0$, $\chi^2 = 63.22$). It may be a consequence of the natural selection that has promoted protection from excessive inflammation during pulmonary diseases. The hypothesis about the selection of the Ser180Leu variant along with the out-of-Africa migration to a harsh environment has been advanced earlier (Khor et al., 2007; Ferwerda et al., 2009). An increased frequency of the Arg753Gln variant of *TLR2* and a decreased frequency of Ser180Leu of *TIRAP* as compared to non-Finnish Europeans may indicate higher genetic predisposition of the Siberian white population to PTB and severe CAP. Nevertheless, there are a lot of genes associated with CAP and PTB independently. Apparently, during the settlement of peoples in Northern Eurasia, the formation of gene pools had been determined by the selection that facilitated adaptation to specific infections (Lime disease among them), parasites, and the climate. It would be interesting to determine why two mutations changing the same *TLR2* signaling have opposite effects on the predisposition to severe CAP. One possible explanation is the difference in the structure and functions of heterodimers *TLR2*–*TLR1* and *TLR2*–*TLR6* (see the Figure).

Existing data on the roles of *TLRs* 1, 2, and 6 in the activation of proinflammatory and anti-inflammatory signaling are conflicting. Overexpression of *TLR2* carrying the Arg753Gln variant has been demonstrated to cause a significantly stronger impairment of cytokine induction by *TLR2*/*TLR1* ligands as compared with *TLR2*/*TLR6* ligands in the HEK293 cell line (Schroder et al., 2005). In later papers, it has been shown that the Arg-to-Gln substitution at position 753 of *TLR2* changes the size, charge, and hydrophobic properties of this site and reduces the ability of *TLR2* to form a heterodimer with *TLR6* (Basith et al., 2011; Xiong et al., 2012). This SNP significantly alters agonist-inducible association of *TLR2* with adaptor proteins *TIRAP* and *MyD88* and impairs NF- κ B signaling and IL-8 mRNA expression in the HEK293 cell line (Xiong et al., 2012). Genes *TLR1* and *TLR2* have different expression activators (Lancioni et al., 2011). In the *TLR2*–*TLR1* dimer, *TLR1* and *TLR2* are responsible for NF- κ B and MAPK pathways



Locations of the Arg753Gln substitution in TLR2 and Ser180Leu in TIRAP on the protein complexes.

and for PI3K pathway activation, respectively; therefore, upregulation of proinflammatory cytokines is TLR1-dependent, whereas upregulation of type I IFN is TLR2-dependent (Raieli et al., 2019). TLR2–TLR6 binding disruption possibly causes an increase in the number of TLR2–TLR1 dimers in which TLR1 drives the activation of the NF- κ B inflammatory signaling cascade. On the contrary, the Ser180Leu variant of TIRAP weakens proinflammatory signal transmission. Besides, TIRAP acts as an adaptor protein for TLR4 homodimers. This receptor is primarily responsible for the recognition of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria and fungi (Takeda, Akira, 2015). It is believed that TLR4 takes part not only in MyD88-dependent proinflammatory signaling but also in MyD88-independent anti-inflammatory signaling. Weakening of TLR4 signaling through TIRAP probably enhances the signaling through adapter proteins TRIF and TRAM, causing the secretion of anti-inflammatory cytokines (Li et al., 2013).

It remains unclear why the SNPs in *TLR2* and *TIRAP* have similar effects on the predisposition to or protection against acute (CAP) and chronic (PTB) lung infections. Perhaps this phenomenon is due to an impact on inflammation in both diseases. The severity of CAP is determined by life-threatening acute inflammation; in PTB, the development of chronic inflammation masks the infection from the host immune system (Liu C.H. et al., 2017).

Conclusions

In Northern Asian populations, the observed difference in rs8177374 frequency may reflect consequences of natural selection during the settlement of peoples on territories with unfavorable climatic conditions. As for pneumonia, carriage of the rs5743708 A allele (the *TLR2* gene) predisposes to severe CAP; the heterozygous genotype of rs8177374 (the *TIRAP* gene) in combination with the GG genotype of rs5743708 (the *TLR2* gene) has a protective effect against it. Stratification of CAP by causative pathogen may help to eliminate the current discrepancies among research groups. Regional differences in a set of pathogens along with the genetic characteristics of

ethno-geographical groups can determine the associations of various genetic variants of innate immunity with the prevalence and severity of pneumonia.

References

- Aguilera E.R., Lenz L.L. Inflammation as a modulator of host susceptibility to pulmonary influenza, pneumococcal, and co-infections. *Front. Immunol.* 2020;11:105. DOI 10.3389/fimmu.2020.00105.
- Aibana O., Huang C.C., Aboud S., Arnedo-Pena A., Becerra M.C., Belido-Blasco J.B., Bhosale R., Calderon R., Chiang S., Contreras C., Davaasambuu G., Fawzi W.W., Franke M.F., Galea J.T., Garcia-Ferrer D., Gil-Fortuño M., Gomila-Sard B., Gupta A., Gupte N., Husain R., Iborra-Millet J., Iqbal N.T., Juan-Cerdán J.V., Kinikar A., Lecca L., Mave V., Meseguer-Ferrer N., Montepiedra G., Mugusi F.M., Owolabi O.A., Parsonnet J., Roach-Poblete F., Romeu-García M.A., Spector S.A., Sudfeld C.R., Tenforde M.W., Togun T.O., Yataco R., Zhang Z., Murray M.B. Vitamin D status and risk of incident tuberculosis disease: a nested case-control study, systematic review, and individual-participant data meta-analysis. *PLoS Med.* 2019;16(9):e1002907. DOI 10.1371/journal.pmed.1002907.
- Arango Duque G., Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 2014;5:491. DOI 10.3389/fimmu.2014.00491.
- Barbalat R., Lau L., Locksley R.M., Barton G.M. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat. Immunol.* 2009;10(11):1200-1207. DOI 10.1038/ni.1792.
- Basith S., Manavalan B., Govindaraj R.G., Choi S. *In silico* approach to inhibition of signaling pathways of Toll-like receptors 2 and 4 by ST2L. *PLoS One.* 2011;6(8):e23989. DOI 10.1371/journal.pone.0023989.
- Bernard N.J., O'Neill L.A. Mal, more than a bridge to MyD88. *IUBMB Life.* 2013;65(9):777-786. DOI 10.1002/iub.1201.
- Bonham K.S., Orzalli M.H., Hayashi K., Wolf A.I., Glanemann C., Wengner W., Iwasaki A., Knipe D.M., Kagan J.C. A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell.* 2014;156(4):705-716. DOI 10.1016/j.cell.2014.01.019.
- Bystritskaya E.V., Bilichenko T.N. An analysis of pneumonia morbidity in adults and children at Russian Federation, 2010–2014. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology.* 2017;27(2):173-178. DOI 10.18093/0869-0189-2017-27-2-173-178. (in Russian)

- Caws M., Thwaites G., Dunstan S., Hawn T.R., Lan N.T., Thuong N.T., Stepniewska K., Huyen M.N., Bang N.D., Loc T.H., Gagneux S., van Soolingen D., Kremer K., van der Sande M., Small P., Anh P.T., Chinh N.T., Quy H.T., Duyen N.T., Tho D.Q., Hieu N.T., Torok E., Hien T.T., Dung N.H., Nhu N.T., Duy P.M., van Vinh Chau N., Farrar J. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2008;4(3):e1000034. DOI 10.1371/journal.ppat.1000034.
- Choi S.H., Hong S.B., Ko G.B., Lee Y., Park H.J., Park S.Y., Moon S.M., Cho O.H., Park K.H., Chong Y.P., Kim S.H., Huh J.W., Sung H., Do K.H., Lee S.O., Kim M.N., Jeong J.Y., Lim C.M., Kim Y.S., Woo J.H., Koh Y. Viral infection in patients with severe pneumonia requiring intensive care unit admission. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012;186(4):325-332. DOI 10.1164/rccm.201112-2240OC.
- Ferwerda B., Alonso S., Banahan K., McCall M.B.B., Giamarellos-Bourboulis E.J., Ramakers B.P., Mouktaroudi M., Fain P.R., Izagirre N., Syafruddin D., Cristea T., Mockenhaupt F.P., Troye-Blomberg M., Kumpf O., Maiga B., Dolo A., Doumbo O., Sundaresan S., Bedu-Addo G., van Crevel R., Hamann L., Oh D.-Y., Schumann R.R., Joosten L.A.B., de la Rúa C., Sauerwein R., Drenth J.P.H., Kullberg B.-J., van der Ven A.J.A.M., Hill A.V., Pickkers P., van der Meer J.W.M., O'Neill L.A.J., Netea M.G. Functional and genetic evidence that the Mal/TIRAP allele variant 180L has been selected by providing protection against septic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(25):10272-10277. DOI 10.1073/pnas.0811273106.
- Gopalakrishnan A., Salgame P. Toll-like receptor 2 in host defense against *Mycobacterium tuberculosis*: to be or not to be – that is the question. *Curr. Opin. Immunol.* 2016;42:76-82. DOI 10.1016/j.coi.2016.06.003.
- Guo X.G., Xia Y. The rs5743708 gene polymorphism in the TLR2 gene contributes to the risk of tuberculosis disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8(9):11921-11928.
- Gupta A., Montepiedra G., Gupte A., Zeldow B., Jubulis J., Detrick B., Violari A., Madhi S., Bobat R., Cotton M., Mitchell C., Spector S., IMPAACT NWCS113 and P1041 Study Team. Low vitamin-D levels combined with *PKP3-SIGIRR-TMEM16J* host variants is associated with tuberculosis and death in HIV-infected and -exposed infants. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148649. DOI 10.1371/journal.pone.0148649.
- Gurjar M., Raychadhuri K., Mahadik S., Reddy D., Atak A., Shetty T., Rao K., Karkhanis M.S., Gosavi P., Sehgal L., Gupta S., Dalal S.N. Plakophilin3 increases desmosome assembly, size and stability by increasing expression of desmocollin2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;495(1):768-774. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.11.085.
- Harding C.V., Boom W.H. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8(4):296-307. DOI 10.1038/nrmicro2321.
- Hong H.L., Hong S.B., Ko G.B., Huh J.W., Sung H., Do K.H., Kim S.H., Lee S.O., Kim M.N., Jeong J.Y., Lim C.M., Kim Y.S., Woo J.H., Koh Y., Choi S.H. Viral infection is not uncommon in adult patients with severe hospital-acquired pneumonia. *PLoS One.* 2014;9(4):e95865. DOI 10.1371/journal.pone.0095865.
- Horne D.J., Randhawa A.K., Chau T.T., Bang N.D., Yen N.T., Farrar J.J., Dunstan S.J., Hawn T.R. Common polymorphisms in the *PKP3-SIGIRR-TMEM16J* gene region are associated with susceptibility to tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 2012;205(4):586-594. DOI 10.1093/infdis/jir785.
- Hu L., Tao H., Tao X., Tang X., Xu C. TLR2 Arg753Gln gene polymorphism associated with tuberculosis susceptibility: an updated meta-analysis. *Biomed. Res. Int.* 2019;2628101. DOI 10.1155/2019/2628101.
- Jin M.S., Kim S.E., Heo J.Y., Lee M.E., Kim H.M., Paik S.G., Lee H., Lee J.O. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell.* 2007;130(6):1071-1082. DOI 10.1016/j.cell.2007.09.008.
- Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010;11(5):373-384. DOI 10.1038/ni.1863.
- Khor C.C., Chapman S.J., Vannberg F.O., Dunne A., Murphy C., Ling E.Y., Frodsham A.J., Wally A.J., Kyrielleis O., Khan A., Aucan C., Segal S., Moore C.E., Knox K., Campbell S.J., Lienhardt C., Scott A., Aaby P., Sow O.Y., Grignani R.T., Sillah J., Sirugo G., Peshu N., Williams T.N., Maitland K., Davies R.J., Kwiatkowski D.P., Day N.P., Yala D., Crook D.W., Marsh K., Berkley J.A., O'Neill L.A., Hill A.V. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat. Genet.* 2007;39(4):523-528. DOI 10.1038/ng1976.
- Kumar V. Inflammation research sails through the sea of immunology to reach immunometabolism. *Int. Immunopharmacol.* 2019;73:128-145. DOI 10.1016/j.intimp.2019.05.002.
- Kumpf O., Giamarellos-Bourboulis E.J., Koch A., Hamann L., Mouktaroudi M., Oh D.Y., Latz E., Lorenz E., Schwartz D.A., Ferwerda B., Routsis C., Skalioti C., Kullberg B.J., van der Meer J.W., Schlag P.M., Netea M.G., Zacharowski K., Schumann R.R. Influence of genetic variations in *TLR4* and *TIRAP/Mal* on the course of sepsis and pneumonia and cytokine release: an observational study in three cohorts. *Crit. Care.* 2010;14(3):R103. DOI 10.1186/cc9047.
- Lancioni C.L., Li Q., Thomas J.J., Ding X., Thiel B., Drage M.G., Pecora N.D., Ziady A.G., Shank S., Harding C.V., Boom W.H., Rojas R.E. *Mycobacterium tuberculosis* lipoproteins directly regulate human memory CD4⁺ T cell activation via Toll-like receptors 1 and 2. *Infect. Immun.* 2011;79(2):663-673. DOI 10.1128/IAI.00806-10.
- Li J., Lee D.S., Madrenas J. Evolving bacterial envelopes and plasticity of TLR2-dependent responses: basic research and translational opportunities. *Front. Immunol.* 2013;4:347. DOI 10.3389/fimmu.2013.00347.
- Lim W.S., van der Eerden M.M., Laing R., Boersma W.G., Karalus N., Town G.I., Lewis S.A., Macfarlane J.T. Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax.* 2003;58:377-382. DOI 10.1136/thorax.58.5.377.
- Liu C.H., Liu H., Ge B. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cell Mol. Immunol.* 2017;14(12):963-975. DOI 10.1038/cmi.2017.88.
- Liu Y., Li J.Y., Chen S.T., Huang H.R., Cai H. The rLrp of *Mycobacterium tuberculosis* inhibits proinflammatory cytokine production and downregulates APC function in mouse macrophages via a TLR2-mediated PI3K/Akt pathway activation-dependent mechanism. *Cell Mol. Immunol.* 2016;13(6):729-746. DOI 10.1038/cmi.2015.58.
- McCullers J.A. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014;12(4):252-262. DOI 10.1038/nrmicro3231.
- Miao R., Li J., Sun Z., Xu F., Shen H. Meta-analysis on the association of TIRAP S180L variant and tuberculosis susceptibility. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2011;91(3):268-272. DOI 10.1016/j.tube.2011.01.006.
- Moens L., Verhaegen J., Pierik M., Vermeire S., De Boeck K., Peetermans W.E., Bossuyt X. Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphisms in invasive pneumococcal disease. *Microbes Infect.* 2007;9(1):15-20. DOI 10.1016/j.micinf.2006.10.002.
- Moldoveanu B., Otmishi P., Jani P., Walker J., Sarmiento X., Guardiola J., Saad M., Yu J. Inflammatory mechanisms in the lung. *J. Inflamm. Res.* 2009;2:1-11.
- Molgora M., Barajon I., Mantovani A., Garlanda C. Regulatory role of IL-1R8 in immunity and disease. *Front. Immunol.* 2016;7:149. DOI 10.3389/fimmu.2016.00149.
- Morris D.E., Cleary D.W., Clarke S.C. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics. *Front. Microbiol.* 2017;8:1041. DOI 10.3389/fmicb.2017.01041.
- Naderi M., Hashemi M., Pourmontaseri Z., Eskandari-Nasab E., Bahari G., Taheri M. TIRAP rs8177374 gene polymorphism increased the risk of pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeast Iran. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2014;7(6):451-455. DOI 10.1016/S1995-7645(14)60073-0.
- Nagpal K., Plantinga T.S., Wong J., Monks B.G., Gay N.J., Netea M.G., Fitzgerald K.A., Golenbock D.T. A TIR domain variant of MyD88

- adapter-like (Mal)/TIRAP results in loss of MyD88 binding and reduced TLR2/TLR4 signaling. *J. Biol. Chem.* 2009;284(38):25742-25748. DOI 10.1074/jbc.M109.014886.
- Narayanan K.B., Park H.H. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. *Apoptosis.* 2015;20(2):196-209. DOI 10.1007/s10495-014-1073-1.
- Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:13766-13771. DOI 10.1073/pnas.250476497.
- Panda A.K., Das B.K., Panda A., Tripathy R., Pattnaik S.S., Mahto H., Pied S., Pathak S., Sharma S., Ravindran B. Heterozygous mutants of TIRAP (S180L) polymorphism protect adult patients with *Plasmodium falciparum* infection against severe disease and mortality. *Infect. Genet. Evol.* 2016;43:146-150. DOI 10.1016/j.meegid.2016.04.035.
- Patarčić I., Gelemanović A., Kirin M., Kolčić I., Theodoratou E., Bailie K.J., de Jong M.D., Rudan I., Campbell H., Polašek O. The role of host genetic factors in respiratory tract infectious diseases: systematic review, meta-analyses and field synopsis. *Sci. Rep.* 2015; 5:16119. DOI 10.1038/srep16119.
- Price R.H.M., Graham C., Ramalingam S. Association between viral seasonality and meteorological factors. *Sci. Rep.* 2019;9(1):929. DOI 10.1038/s41598-018-37481-y.
- Raieli S., Trichot C., Korniotis S., Pattarini L., Soumelis V. TLR1/2 orchestrate human plasmacytoid dendritic cell response to gram + bacteria. *PLoS Biol.* 2019;17(4):e3000209. DOI 10.1371/journal.pbio.3000209.
- Richardson E.T., Shukla S., Sweet D.R., Wearsch P.A., Tschlis P.N., Boom W.H., Harding C.V. Toll-like receptor 2-dependent extracellular signal-regulated kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages drives anti-inflammatory responses and inhibits Th1 polarization of responding T cells. *Infect. Immun.* 2015; 83(6):2242-2254. DOI 10.1128/IAI.00135-15.
- Sambrook J., Russell D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *Cold Spring Harbor Protoc.* 2006;2006(1): 4455. DOI 10.1101/pdb.prot4455.
- Schröder N.W.J., Diterich I., Zinke A., Eckert J., Draing C., von Baehr V., Hassler D., Priem S., Hahn K., Michelsen K.S., Hartung T., Burmester G.R., Göbel U.B., Hermann C., Schumann R.R. Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease. *J. Immunol.* 2005;175(4):2534-2540. DOI 10.4049/jimmunol.175.4.2534.
- Self W.H., Balk R.A., Grijalva C.G., Williams D.J., Zhu Y., Anderson E.J., Waterer G.W., Courtney D.M., Bramley A.M., Trabue C., Fakhran S., Blaschke A.J., Jain S., Edwards K.M., Wunderink R.G. Procalcitonin as a marker of etiology in adults hospitalized with community-acquired pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 2017;65(2):183-190. DOI 10.1093/cid/cix317.
- Shukla S., Richardson E.T., Drage M.G., Boom W.H., Harding C.V. *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein and lipoglycan binding to Toll-like receptor 2 correlates with agonist activity and functional outcomes. *Infect. Immun.* 2018;86(10). pii: e00450-18. DOI 10.1128/IAI.00450-18.
- Siebert J.N., Hamann L., Verolet C.M., Gameiro C., Grillet S., Siegrist C.A., Posfay-Barbe K.M. Toll-interleukin 1 receptor domain-containing adaptor protein 180L single-nucleotide polymorphism is associated with susceptibility to recurrent pneumococcal lower respiratory tract infections in children. *Front. Immunol.* 2018; 9:1780. DOI 10.3389/fimmu.2018.01780.
- Smelaya T.V., Belopolskaya O.B., Smirnova S.V., Kuzovlev A.N., Moroz V.V., Golubev A.M., Pabalan N.A., Salnikova L.E. Genetic dissection of host immune response in pneumonia development and progression. *Sci. Rep.* 2016;6:35021. DOI 10.1038/srep35021.
- Takeda K., Akira S. Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015; 109:14.12.1-14.12.10. DOI 10.1002/0471142735.im1412s109.
- Tapader R., Bose D., Dutta P., Das S., Pal A. SsIE (YghJ), a cell-associated and secreted lipoprotein of neonatal septicemic *Escherichia coli*, induces Toll-like receptor 2-dependent macrophage activation and proinflammation through NF- κ B and MAP kinase signaling. *Infect. Immun.* 2018;86(9):e00399-18. DOI 10.1128/IAI.00399-18.
- Wilkinson R.J., Llewelyn M., Toossi Z., Patel P., Pasvol G., Lalvani A., Wright D., Latif M., Davidson R.N. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet.* 2000;355(9204):618-621. DOI 10.1016/S0140-6736(99)02301-6.
- Xiong Y., Song C., Snyder G.A., Sundberg E.J., Medvedev A.E. R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(45):38327-38337. DOI 10.1074/jbc.M112.375493.
- Zavyalova L.G., Denisova D.V., Simonova G.I., Orlov P.S., Voevoda M.I. Association of polymorphisms of genes *FTO* and *TCF7L2* with cardiometabolic parameters of the adolescents in Siberia. *Bulleten SO RAMN = Bulletin SB RAMS.* 2011;31(5):5-13. (in Russian).

ORCID ID

S.V. Mikhailova orcid.org/0000-0002-0897-5473
L.V. Shcherbakova orcid.org/0000-0001-9270-9188
I.I. Logvinenko orcid.org/0000-0003-1348-0253
M.I. Voevoda orcid.org/0000-0001-9425-413X

Acknowledgements. This study was supported by Russian State Budget program No. 0259-2021-0014. The authors are grateful to E.S. Merekina, L.A. Poni-karovskaya, and N.E. Egorova for the help with the collection of the clinical material. The English language was corrected and certified by shevchuk-editing.com.

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

Received June 5, 2020. Revised August 12, 2020. Accepted September 28, 2020. Published online March 29, 2021.

The expression of apoptosis-regulating proteins Bcl-2 and Bad in liver cells of C57Bl/6 mice under light-induced functional pinealectomy and after correction with melatonin

S.V. Michurina¹, I.Yu. Ishchenko¹✉, S.A. Arkhipov¹, A.Yu. Letyagin^{1,2}, M.A. Korolev¹, E.L. Zavjalov²

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics 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

✉ irenisch@mail.ru

Abstract. The presence of humans and animals under long-term continuous lighting leads to a suppression of melatonin synthesis, that is, to light-induced functional pinealectomy (LIFP), and the development of desynchronization. To create LIFP, C57Bl/6 mice were kept under 24-hour lighting (24hL) for 14 days. The animals in the control group were kept under standard lighting conditions. In the next series of experiments, mice with LIFP received daily intragastrically either melatonin (1 mg/kg body weight in 200 µl of distilled water) or 200 µl of water as a placebo. The comparison group consisted of intact animals that received placebo under standard lighting conditions. Immunohistochemical analysis (using an indirect avidin-biotin peroxidase method) revealed the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 and the proapoptotic protein Bad in sinusoid liver cells (a heterogeneous population consisting of the endotheliocytes, Kupffer cells, Ito cells, and Pit cells) and in individual hepatocytes. The Bad expression area in the liver of LIFP mice increased 4 times against a background of the unchanged Bcl-2 expression area. Changes in the brightness (a parameter inversely proportional to the marker concentration) of Bad and Bcl-2 areas did not reach significance. Our results indicate a weakening of the antiapoptotic protection of liver cells of LIFP animals, which creates conditions for activation of the “mitochondrial branch” of apoptosis. Melatonin treatment of LIFP mice resulted in a 3.3-fold increase in Bcl-2 expression area and a 2.7 % decrease in Bcl-2 region brightness compared with the experimental untreated group. Bad protein parameters were unreliable. Thus, melatonin treatment of animals cancels the effect of LIFP, restoring the Bcl-2 expression area and increasing this protein concentration, which indicates an increase in antiapoptotic protection and creates conditions for blocking the development of the “mitochondrial branch” of apoptosis in liver cells.

Key words: melatonin; 24-hour lighting; light-induced functional pinealectomy; liver; Bad; Bcl-2.

For citation: Michurina S.V., Ishchenko I.Yu., Arkhipov S.A., Letyagin A.Yu., Korolev M.A., Zavjalov E.L. The expression of apoptosis-regulating proteins Bcl-2 and Bad in liver cells of C57Bl/6 mice under light-induced functional pinealectomy and after correction with melatonin. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):310-317. DOI 10.18699/VJ21.034

Экспрессия белков-регуляторов апоптоза Bcl-2 и Bad в клетках печени мышей C57Bl/6 в условиях светоиндуцированной функциональной эпифизэктомии и после коррекции мелатонином

С.В. Мичурина¹, И.Ю. Ищенко¹✉, С.А. Архипов¹, А.Ю. Летыгин^{1,2}, М.А. Королев¹, Е.Л. Завьялов²

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

✉ irenisch@mail.ru

Аннотация. Пребывание человека и животных в условиях длительного непрерывного освещения приводит к подавлению синтеза мелатонина, т. е. к светоиндуцированной функциональной эпифизэктомии (СФЭ), и развитию десинхроноза. Для создания СФЭ мыши линии C57Bl/6 содержались в условиях круглосуточного освещения в течение 14 суток. Животные контрольной группы находились при стандартном режиме освещения. В следующей серии экспериментов мыши с СФЭ получали ежедневно внутривентрикулярно либо мелатонин (1 мг/кг массы тела в 200 мкл воды), либо в качестве плацебо 200 мкл дистиллированной воды. Группой сравнения служили интактные животные, получавшие плацебо при стандартном режиме освещения. В результате иммуногистохимического анализа (непрямым авидин-биотиновым пероксидазным методом) в си-

нусоидных клетках печени (гетерогенная популяция, состоящая из эндотелиоцитов, клеток Купфера, клеток Ито и pit-клеток) и в отдельных гепатоцитах была выявлена экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 и проапоптотического протеина Bad. В клетках печени мышей с моделью СФЭ обнаружено четырехкратное увеличение площади экспрессии Bad на фоне неизменившейся площади экспрессии Bcl-2. Достоверных изменений яркости (параметр, обратно пропорциональный концентрации маркера) участков, окрашенных на Bcl-2 и Bad, отмечено не было. Полученные данные свидетельствуют об ослаблении антиапоптотической защиты клеток печени животных, содержащихся при круглосуточном освещении, что создает условия для активации «митохондриальной ветви» апоптоза, наиболее выраженной в синусоидных клетках печени. Введение мелатонина мышам с моделью СФЭ привело к возрастанию в 3.3 раза площади экспрессии Bcl-2 и снижению на 2.7 % яркости (т.е. увеличению концентрации) участков, окрашенных на Bcl-2, по сравнению с опытной группой без лечения. Для Bad изменения исследуемых параметров имели характер тенденций. Таким образом, интрагастральное введение мелатонина животным аннулирует эффект светоиндуцированной функциональной пинеалэктомии, восстанавливая площадь экспрессии и увеличивая концентрацию антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках печени, что свидетельствует об усилении антиапоптотической защиты клеток органа и создает условия для блокирования развития «митохондриальной ветви» апоптоза.
Ключевые слова: мелатонин; круглосуточное освещение; светоиндуцированная функциональная эпифизэктомия; печень; Bad; Bcl-2.

Introduction

At present, human activities are often associated with a change in the natural rhythm of life and with working in artificial lighting conditions, which leads to an increase in the light day period. Lighting at night is considered by scientists as “light pollution”; it is attributed to non-chemical endocrine disruptors affecting both human and animal health, including violations of circadian regulation of melatonin (MT) synthesis, metabolism and other hormone-controlled systems, and the cancer risk (Michurina et al., 2005; Borodin et al., 2012; Rusart, Nelson, 2018). By now, scientists have concluded that melatonin is not “a sleep hormone, but a dark hormone” (Reiter et al., 2013; Arendt, 2019). It’s known that light suppresses melatonin production, and darkness weakens this suppression, stimulating the synthesis and release of this hormone into the bloodstream. Of particular importance is the fact that MT suppression in nocturnal rodents is initiated by light. A light pulse lasting only 15 min is sufficient to induce locomotor suppression that endures for more than an hour, and a 1-min light pulse also suppresses MT synthesis for about the same amount of time (Morin, 2013). As a result of long-term stay of humans and animals under 24-hour lighting (24hL) conditions, a decrease/cessation of hormone production leads to the development of light-induced functional pinealectomy (LIFP) (Delibas et al., 2002) and desynchronization (Reiter et al., 2017; Arendt, 2019). Under these conditions, a significant load falls on the homeostatic systems providing the body resistance (lymphatic, immune and endocrine systems), which are in an integral relationship with the liver, which is the main organ of homeostasis. The study of the structural and functional features of liver cells showed that exactly the cooperative interactions of highly specialized parenchymal liver cells (hepatocytes) and sinusoidal cells (a heterogeneous population of cells consisting of endotheliocytes, Kupffer cells, Ito cells and Pit cells), and their work in a strictly defined rhythm, help the organ to perform numerous functions.

Apoptosis is a fundamental biological mechanism, which causes a clean, non-inflammatory form of cell death and helps the body get rid of unnecessary and defective cells. The ratio of antiapoptotic (Bcl-2, Bcl-XL) and proapoptotic proteins (Bad, Bax, etc.) is considered to be a “molecular switch”, which determines whether tissue growth or atrophy will oc-

cur (Willis et al., 2003; Polčić, Mentel, 2020). The features of Bcl-2 family protein expression in liver cells under light-induced functional pinealectomy remain largely unexplored.

Based on the above, the aim of the study was to evaluate the expression of antiapoptotic Bcl-2 protein and proapoptotic Bad protein in the liver cells of C57Bl/6 mice under light-induced functional pinealectomy and after melatonin treatment.

Materials and methods

The experiments were carried out in the SPF Vivarium of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (RFMEFI61914 X0005 and RFMEFI62114X0010). C57Bl/6 mice (male, aged 10–12 weeks) were kept in controlled barrier rooms with free access to water and food (Ssniff, Germany).

Two series of experiments were carried out. In the first event, mice were kept under 24-hour lighting (24hL) for 14 days (light/dark photoperiod 24:0 h) to create light-induced functional pinealectomy (the “24hL” group, $n = 6$). The comparison group consisted of intact animals (the “Control” group, $n = 5$) kept under standard lighting conditions (14:10 h). At the same time a smooth increase in illumination to daytime values within 1 hour (dawn) and a smooth decrease in illumination values until complete shutdown within 1 hour (sunset) were assigned to the light phase of the day. In the second series of experiments mice were kept under 24hL for 14 days and received daily intragastrically either melatonin at a dose of 1 mg/kg of body weight in 200 μ l of distilled water (the “24hL+MT” group, $n = 5$) or 200 μ l of water (the “24hL+Placebo” group, $n = 6$). The comparison group consisted of animals (the “Placebo” group, $n = 6$) kept under standard lighting conditions (14:10 h) and received daily intragastrically 200 μ l of distilled water.

Animals were removed from the experiment by the cranio-cervical dislocation method and liver samples were taken for light-optical and immunohistochemical studies. All experiments were performed in accordance with humanity principles and were carried out in compliance with “Rules for working with experimental animals” (The Annex to the Order of the Ministry of Health of the USSR No. 755 of 12.08.1977) and Council Directive 86/609/EEC. Experiments were approved by the local ethical committee (The Protocol No. 128 of 15.03.2017).

Liver samples were fixed in 10 % buffered formalin (Bio-Vitrum, Russia) for 48 hours, dehydrated in a series of alcohols of increasing concentrations and embedded in Histomix (Bio-Vitrum, Russia). Tissue sections with a thickness of 3 μm were prepared on a microtome HM 340E (Thermo Fisher Scientific, USA). Immunohistochemical study of the expression of the antiapoptotic Bcl-2 protein and the proapoptotic Bad protein was performed on liver paraffin sections by means of indirect avidin-biotin peroxidase method (ABC-method) using the Vectastain Universal ABC-Peroxidase Kit (Vector Laboratories, Catalog Number PK-7200). At the last stage, immunohistochemical staining was carried out in a chromogenic substrate containing diaminobenzidine (the solution is prepared *ex tempore* from the components of the set “ImmPACT DAB”; Vector Laboratories, Catalog Number SK-4105).

For quantification of Bcl-2 and Bad expression in the mouse liver, a computer morphometric analysis of digital photographs obtained using a LEICA DM 2500 microscope with a LEICA DFC425C video camera (Germany, Switzerland) at $\times 400$ magnification was performed. The relative area and the brightness of intermediate zones of the hepatic lobules staining for Bcl-2 and Bad were determined in digital images using the program ImageJ. The significance of differences between the compared values was determined using the nonparametric Mann–Whitney test. Differences of compared values were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

The expression of Bcl-2 and Bad proteins in liver cells of mice under light-induced functional pinealectomy

A study of Bcl-2 family protein expression in the liver of mice kept under 24-hour lighting (light/dark photoperiod 24:0 h) revealed the pronounced immunohistochemical staining of the proapoptotic Bad protein in sinusoidal cells of blood sinusoid capillaries (Fig. 1). The Bad-positive signal was detected in the endothelium of interlobular veins and in the ductal epithelium of triad bile ducts, and it was also sometimes found in single hepatocytes. At the same time, weak immunohistochemical staining of the antiapoptotic Bcl-2 protein was revealed in sinusoidal liver cells and in single hepatocytes of “24hL” mice liver (see Fig. 1). Staining of Bcl-2 wasn’t determined in the ductal epithelium of triad bile ducts.

Morphometric analysis of liver preparations of the “24hL” animals confirmed the results of the light-optical study. An increase in the Bad expression area was found to be 4.1 times greater than in animals under natural light conditions (Fig. 2, *a*). At the same time, the brightness (a parameter inverse to the concentration) of the areas stained of that protein did not change significantly (see Fig. 2, *b*). Changes in the relative area and the brightness of zones stained for the antiapoptotic Bcl-2 protein were in the nature of a trend and reflected a slight decrease in the expression area and

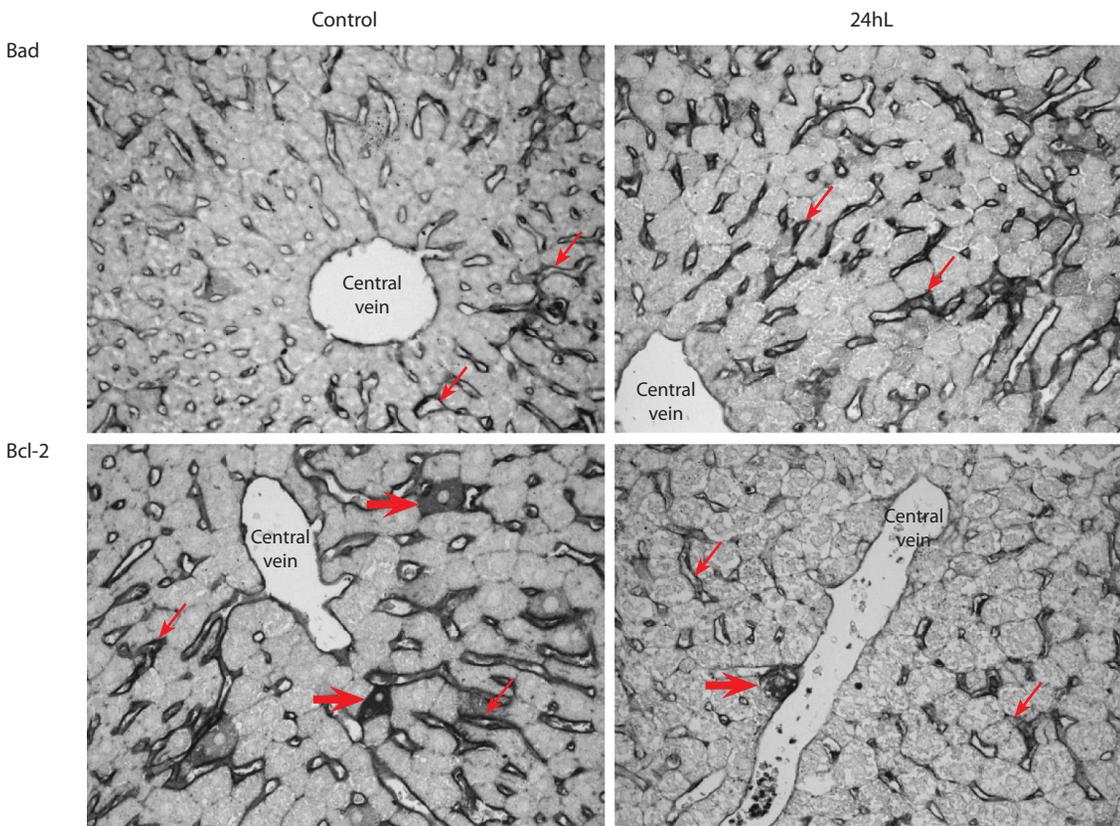


Fig. 1. The expression of the proapoptotic Bad protein and the antiapoptotic Bcl-2 protein in mouse liver cells in a light-induced functional pinealectomy model (the “24hL”).

Immunohistochemical staining by the indirect ABC method. There is a pronounced Bad coloration and a less pronounced Bcl-2 coloration in sinusoidal cells (thin arrows) of blood sinusoidal capillaries in 24hL mouse liver. Thick arrows indicate separately found stained hepatocytes. Magnification $\times 400$.

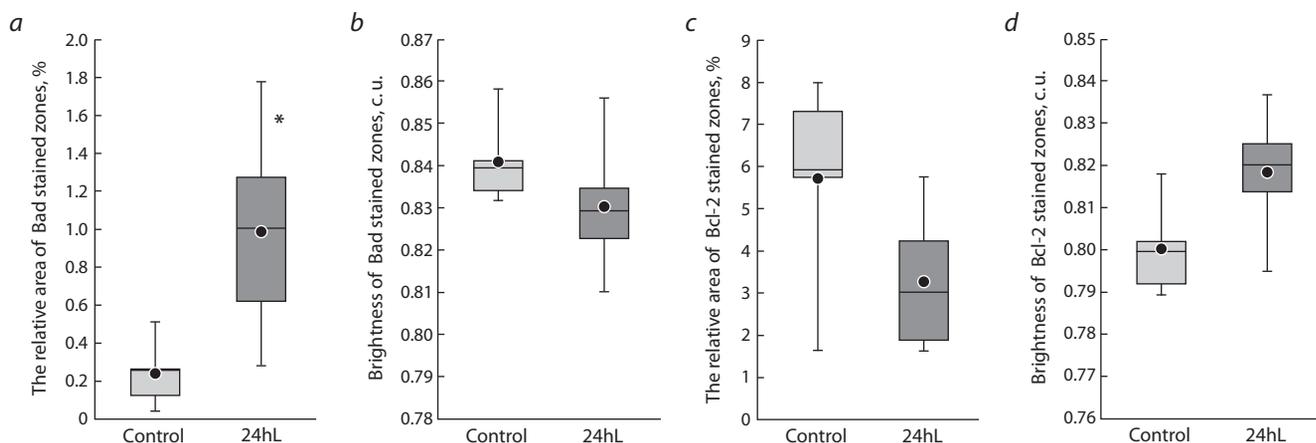


Fig. 2. Relative areas of Bad (a) and Bcl-2 (c) protein expressions and the brightnesses of zones stained with these proteins (b – Bad, d – Bcl-2) in the liver of “Control” and “24hL” mice.

Notations on the box diagrams: lines – median, boxes – 25–75 %, ● arithmetic mean, * differences are statistically significant between the “Control” and “24hL” groups; the Mann–Whitney U-test ($p < 0.05$).

concentration of this protein (see Fig. 2, c, d) in the liver of mice kept under 24-hour lighting.

Thus, it can be concluded that the antiapoptotic protection was weakened and the conditions for apoptosis mitochondrial pathway activation in liver cells of animals with light-induced functional pinealectomy were created.

Melatonin effect on the expression of Bad and Bcl-2 proteins in mouse liver cells under light-induced functional pinealectomy

MT treatment of the 24hL mice led to the pronounced Bcl-2 protein expression in a heterogeneous population of sinusoidal cells in intra-lobular blood liver capillaries and in single hepatocytes compared to the group without hormone treatment (the “24hL+Placebo” group) (Fig. 3). The immunohistochemical reaction to the Bad protein revealed in all three groups (“Placebo”, “24hL+Placebo”, “24hL+MT”) the staining of sinusoidal capillary lining in intermediate zones and portal tracts, portal vein endothelium and bile duct epithelium in portal tracts (Fig. 4). Bad-staining was more significant in the “24hL+Placebo” group compared to “Placebo”. Bad expression after MT administration wasn’t as pronounced as Bcl-2 expression (see Fig. 3) in the same animals.

Morphometric analysis found a 3.3-fold increase in Bcl-2 expression area in 24hL-animals treated with MT compared with the group without treatment “24hL+Placebo” (Fig. 5, a). At the same time, the studied parameter reached the initial level of the “Placebo” group. The use of MT also led to a significant decrease in brightness (see Fig. 5, b) of stained areas compared with the comparison groups (by 2.7 % – compared with the “24hL+Placebo”, by 2.1 % – compared with the “Placebo”), which reflects an increase in the Bcl-2 concentration in the “24hL+MT” animals. MT intragastric administration contributed to a tendency for an increase in the Bad relative area and a tendency for a decrease in the stained zone brightness compared to animals without hormone treatment. As a result, the use of MT led to a significant increase in the area and concentration of the studied protein compared to the “Placebo” group (see Fig. 5, c, d).

Thus, MT administration to mice under two-week 24-hour lighting led to a significant increase in the expression area and concentration of the Bcl-2 protein in liver cells against the background of unchanged expression area and concentration of the Bad protein compared to the “24hL+Placebo” group. The obtained results indicate that intragastric administration of MT physiological doses to C57Bl/6 mice cancels the effect of light-induced functional pinealectomy, restoring the expression area of the antiapoptotic Bcl-2 protein and increasing its concentration in liver cells, which indicates increased antiapoptotic protection of organ cells and creates conditions for blocking the apoptosis “mitochondrial branch” development.

Discussion

Violation of melatonin production is a starting point, leading at the initial stages to the appearance of desynchronization followed by the development of organic pathology. Our previous studies showed that 24-hour lighting for two weeks has a modulating effect on all elements of the lymphatic region of the liver. There is a migration of lymphocytes, macrophages into the expanded interstitial non-vascular pathways and lymphatic vessels, and a formation of lymphoid nodules, which are considered temporary accumulations of lymphoid tissue that form in response to injury. The unbalancing of the roots of the lymphatic system leads to the disconnection of contacts between the endothelial cells of the liver sinusoids, as well as to a violation of contacts between the parenchymal cells of the organ. The overflow of Disse spaces with fragments of necrotically altered cells, collagen fibers, lymphoid cells, erythrocytes contributes to the lymph stagnation, and as a result leads to the development of tissue hypoxia, which is an inducer of cell death. This adversely affects the structure and functions of mitochondria, the protein-synthesizing apparatus of cells, causes stress in the endoplasmic reticulum (Ishchenko, Michurina, 2014; Michurina et al., 2018). Under these conditions, a significant burden falls on the intracellular detoxification systems, in particular on the cytochrome P450 system (Woolbright, Jaeschke, 2015). The enzymes of this family can produce reactive oxygen species (ROS), leading to

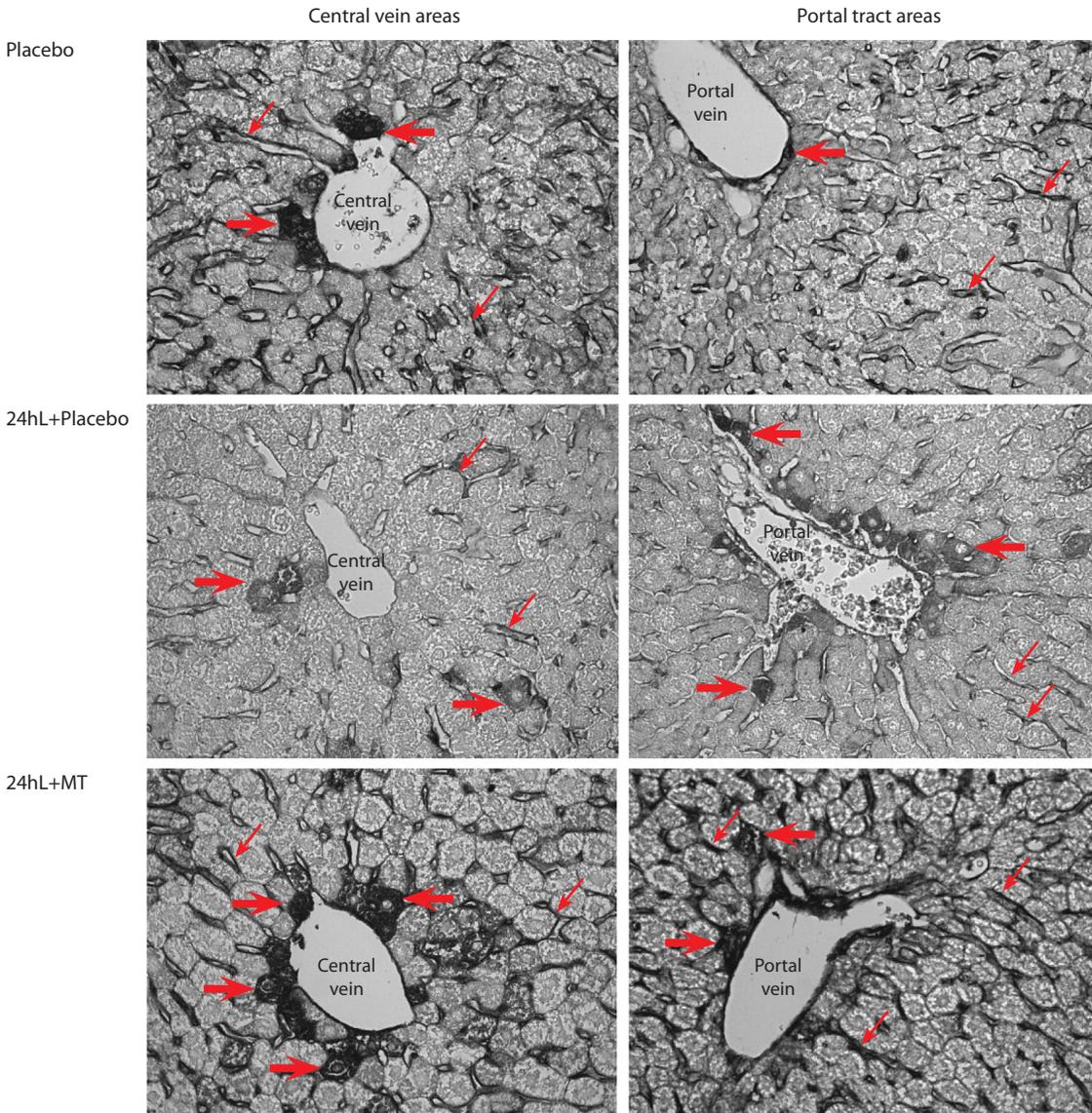


Fig. 3. The MT treatment influence on the Bcl-2 expression in liver cells of mice with the LIFP model.

Immunohistochemical staining by the indirect ABC method. There is weak Bcl-2-signal in the sinusoidal cells of the liver blood capillaries in "24hL+Placebo" mice compared with "Placebo" animals. MT treatment leads to a pronounced staining of the lining of the blood sinusoidal capillaries, endothelial cells of the portal tract veins, and individual hepatocytes. Thin arrows – the sinusoidal cells, thick arrows – single stained hepatocytes. Magnification $\times 400$.

the activation of apoptosis. Excessive and uncontrolled ROS production in mitochondria leads to damage to mitochondrial membranes, proteins, and mitochondrial DNA (mtDNA) and triggers the mitochondrial apoptosis pathway (Li et al., 2020).

In our study, the greatest changes were found in sinusoidal cells of hepatic lobule blood capillaries. This is consistent with the data of Motoyama S. et al. (2000, 2003), who showed the predominant apoptosis development in liver sinusoidal endothelial cells compared to hepatocytes in male Sprague-Dawley rats with a hypoxia model. Currently, it has been proven that these cells, dynamically regulating the expression of angiopoietin-2, govern their own regeneration, and not only control the proliferation of hepatocytes, but also support the restoration of connective tissue, regulate the maturation and resting state of blood vessels (Hu et al., 2014). Since apoptosis is triggered by the inactivation of Bcl-2 when binding to the

Bad protein, the fourfold increase revealed by us in the expression area of the proapoptotic protein Bad against the background of the unchanged expression area of the antiapoptotic protein Bcl-2 in mice with LIFP model indicates a decrease in antiapoptotic protection and the apoptosis development along the mitochondrial pathway in liver cells.

It's found that when melatonin synthesis is disrupted by night lighting, there is a decrease in the activity of its MT1 and MT2 membrane receptors, through which the hormone has its effect on cells (Gupta, Haldar, 2014; Jockers et al., 2016). Due to the non-receptor mechanism using the oligopeptide transporter-1/2 (PEPT-1/2) and organic anion transporter-3 (OAT-3) (Huo et al., 2017) MT penetrates cells and binds free oxygen radicals, protecting macromolecules (proteins, fats, nuclear and mitochondrial DNA) from oxidative damage in all subcellular structures. Currently, numerous data indicate

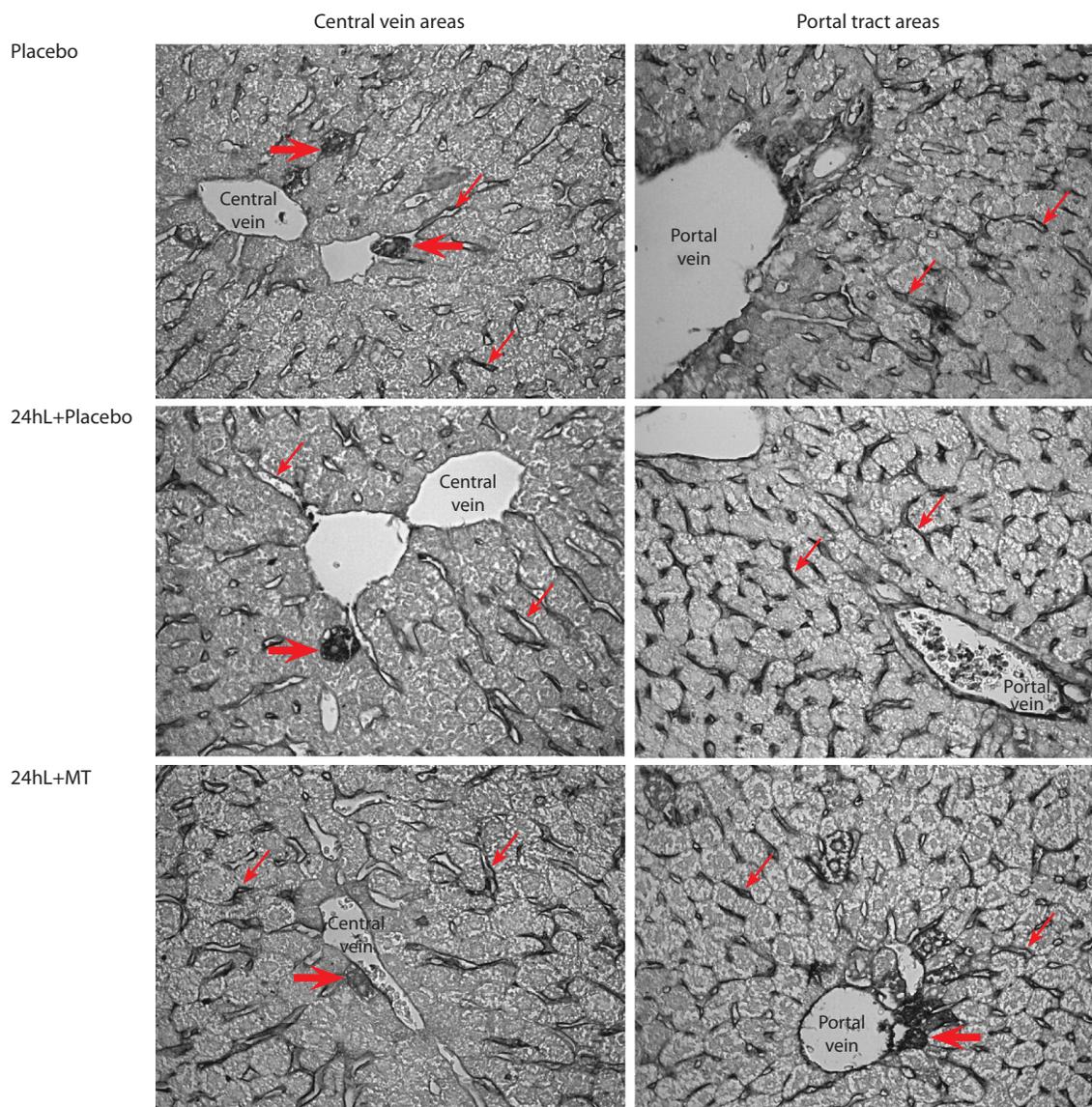


Fig. 4. The expression of the proapoptotic Bad protein in liver cells of mice with the LIFP model – in the sinusoidal cells of the liver blood capillaries, the vein endothelium and the ductal epithelium of the bile ducts of the liver portal tracts.

Immunohistochemical staining by the indirect ABC method. Bad-staining was more significant in the “24hL+Placebo” group compared to “Placebo”. The Bad expression after MT administration wasn’t as pronounced as Bcl-2 expression (see Fig. 3) in the same animals. Thin arrows – the sinusoidal cells, thick arrows – single stained hepatocytes. Magnification $\times 400$.

that mitochondria is the main target of MT action: enzymes N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase are present in mitochondria and these important subcellular organelles are the place of synthesis of melatonin itself (Hardeland, 2017; Reiter et al., 2018).

There are numerous ways in which MT destroys ROS: starting an antioxidant cascade with the formation of melatonin metabolites detoxifying free radicals; chelating metal ions involved in the Haber–Weiss and Fenton reactions to prevent the formation of a destructive $\bullet\text{OH}$; stimulating antioxidant and inhibition of pro-oxidant enzymes; increasing the efficiency of electron transfer between mitochondrial respiratory complexes and reducing electron leakage and free radical formation. Studies have shown that MT reduces the rate of apoptosis, prevents the opening of mitochondrial pores and the release of cytochrome *c*, and preserves mitochondrial

functions. In addition, mitochondrial biogenesis and dynamics are also regulated by MT (Hardeland, 2017; Reiter et al., 2018; Jou et al., 2019). The effectiveness of MT as a means of protection against oxidative stress and structural changes in the liver and pancreas tissue was revealed in rats with surgical pinealectomy (Sahna et al., 2004; Col et al., 2010). There is strong evidence that MT has the ability to prevent oxidative damage to liver cell mitochondria in rats with diabetes and obesity (Agil et al., 2015). The question of the effect of this unique hormone on apoptosis is extremely interesting. MT treatment of rats kept under 24-hour lighting during two weeks leads to an increase in the antiapoptotic Bcl-2 protein in the liver (Borodin et al., 2012).

Our use of the melatonin-containing complex in the treatment of animals with a model of obesity and type 2 diabetes mellitus showed its pronounced hepatotropic, lymphotropic

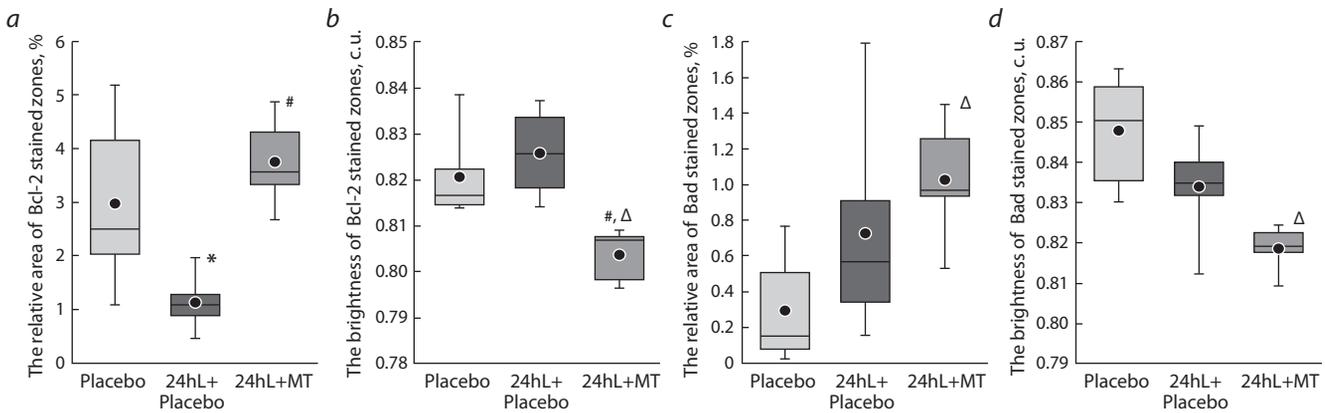


Fig. 5. Relative areas of Bcl-2 (a) and Bad (c) protein expressions and the brightnesses of zones stained for these proteins (b – Bcl-2, d – Bad) in the liver of the “Placebo”, “24hL+Placebo” and “24hL+MT” mice.

Notations on the box diagrams: lines – median, boxes – 25–75 %, ● arithmetic mean, * differences are statistically significant between the “24hL+Placebo” and “Placebo” groups, # differences are statistically significant between the “24hL+MT” and “24hL+Placebo” groups, Δ the differences are statistically significant between the “24hL+MT” and “Placebo” groups; the Mann–Whitney U-test ($p < 0.05$).

action and cytoprotective effect, which consists in stimulating the expression of the antiapoptotic Bcl-2 protein in liver cells against the background of a decrease in the proapoptotic Bad protein activity (Michurina et al., 2017, 2020). In the present study the revealed predominance of the antiapoptotic Bcl-2 protein over the proapoptotic Bad protein, induced by the use of MT, indicates an increase in the antiapoptotic protection of liver cells, which blocks the development of the apoptosis “mitochondrial branch”. This is facilitated by the previously established ability of MT to increase the expression of the lymphatic vascular endothelial LYVE-1 marker in the liver sinusoid endothelial cells of *db/db* mice, which creates conditions for improving lymph drainage and prevents the development of tissue hypoxia and apoptosis of organ cells (Michurina et al., 2016). The protective properties of MT, largely based on its antioxidant, antiapoptotic, and immunomodulatory activity, place this hormone among the most effective lympho- and angioprotectors (Jing et al., 2017; Chen et al., 2020), which is especially important in the prevention and treatment of new coronavirus infection (Darenskaya et al., 2020; El-Missiry et al., 2020). Thus, melatonin cytoprotective effect revealed by us in the liver cells of C57Bl/6 mice in the model of light-induced functional pinealectomy may be a consequence of reduced damage to mitochondria and other intracellular structures.

Conclusion

Thus our results indicate a weakening of the antiapoptotic protection of liver cells of LIFP animals that creates conditions for activation of the “mitochondrial branch” of apoptosis. Melatonin treatment of animals cancels the effect of LIFP, restoring the Bcl-2 expression area and increasing this protein concentration, which indicates an increase in antiapoptotic protection and creates conditions for blocking the development of the “mitochondrial branch” of apoptosis in liver cells.

References

Agil A., El-Hammadi M., Jiménez-Aranda A., Tassi M., Abdo W., Fernández-Vázquez G., Reiter R.J. Melatonin reduces hepatic mitochondrial dysfunction in diabetic obese rats. *J. Pineal. Res.* 2015; 59(1):70-79. DOI 10.1111/jpi.12241.

Arendt J. Melatonin: countering chaotic time cues. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2019;10:391. DOI 10.3389/fendo.2019.00391.

Borodin Yu.I., Trufakin V.A., Michurina S.V., Shurlygina A.V. Structural and Temporal Organization of the Liver, Lymphatic, Immune, and Endocrine Systems in Violation of the Light Regime and Melatonin Treatment. Novosibirsk: Manuscript Publ., 2012. (in Russian)

Chen W.R., Yang J.Q., Liu F., Shen X.Q., Zhou Y.J. Melatonin attenuates vascular calcification by activating autophagy via an AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway. *Exp. Cell. Res.* 2020;389(1):111883. DOI 10.1016/j.yexcr.2020.111883.

Col C., Dinler K., Hasdemir O., Buyukasik O., Bugdayci G. Oxidative stress and lipid peroxidation products: effect of pinealectomy or exogenous melatonin injections on biomarkers of tissue damage during acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2010; 9(1):78-82. PMID: 20133234.

Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I. COVID-19: oxidative stress and the relevance of antioxidant therapy. *Vestnik Rossijskoj Akademii Meditsynskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2020;75(4):318-325. DOI 10.15690/vramn1360. (in Russian)

Delibas N., Tuzmen N., Yonden Z., Altuntas I. Effect of functional pinealectomy on hippocampal lipid peroxidation, antioxidant enzymes and N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in young and old rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2002;23(4):345-350. PMID: 12195239.

El-Missiry M.A., El-Missiry Z.M.A., Othman A.I. Melatonin is a potential adjuvant to improve clinical outcomes in individuals with obesity and diabetes with coexistence of Covid-19. *Eur. J. Pharmacol.* 2020;882:173329. DOI 10.1016/j.ejphar.2020.173329.

Gupta S., Haldar C. Nycthemeral variation in melatonin receptor expression in the lymphoid organs of a tropical seasonal breeder *Funambulus pennanti*. *J. Comp. Physiol. A.* 2014;200(12):1045-1055. DOI 10.1007/s00359-014-0959-2.

Hardeland R. Melatonin and the electron transport chain. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;74(21):3883-3896. DOI 10.1007/s00018-017-2615-9.

Hu J., Srivastava K., Wieland M., Runge A., Mogler C., Besemfelder E., Terhardt D., Vogel M.J., Cao L., Korn C., Bartels S., Thomas M., Augustin H.G. Endothelial cell-derived angiopoietin-2 controls liver regeneration as a spatiotemporal rheostat. *Science*. 2014; 343(6169):416-419. DOI 10.1126/science.1244880.

Huo X., Wang C., Yu Z., Peng Y., Wang S., Feng S., Zhang S., Tian X., Sun C., Liu K., Deng S., Ma X. Human transporters, PEPT1/2, facilitate melatonin transportation into mitochondria of cancer cells: an

- implication of the therapeutic potential. *J. Pineal Res.* 2017;62(4): e12390. DOI 10.1111/jpi.12390.
- Ishchenko I.Y., Michurina S.V. Regional lymph nodes in the liver of rats in functional pinealectomy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014;157(5): 671-676. DOI 10.1007/s10517-014-2636-4.
- Jing Y., Bai F., Chen H., Dong H. Melatonin prevents blood vessel loss and neurological impairment induced by spinal cord injury in rats. *J. Spinal. Cord. Med.* 2017;40(2):222-229. DOI 10.1080/10790268.2016.1227912.
- Jockers R., Delagrangre P., Dubocovich M.L., Markus R.P., Renault N., Tosini G., Cecon E., Zlotos D.P. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *Br. J. Pharmacol.* 2016;173(18):2702-2725. DOI 10.1111/bph.13536.
- Jou M.J., Peng T.I., Reiter R.J. Protective stabilization of mitochondrial permeability transition and mitochondrial oxidation during mitochondrial Ca²⁺ stress by melatonin's cascade metabolites C3-OHM and AFMK in RBA1 astrocytes. *J. Pineal Res.* 2019;66(1):e12538. DOI 10.1111/jpi.12538.
- Li R., Toan S., Zhou H. Role of mitochondrial quality control in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(7):6467-6485. DOI 10.18632/aging.102972.
- Michurina S.V., Ishchenko I.Yu., Arkhipov S.A., Cherepanova M.A., Vasendin D.V., Zavjalov E.L. Apoptosis in the liver of male *db/db* mice during the development of obesity and type 2 diabetes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):435-440. DOI 10.18699/VJ20.43-o.
- Michurina S.V., Ishchenko I.Yu., Arkhipov S.A., Klimontov V.V., Cherepanova M.A., Korolev M.A., Rachkovskaya L.N., Zav'yalov E.L., Kononkov V.I. Melatonin-aluminum oxide-polymethylsiloxane complex on apoptosis of liver cells in a model of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017;164(2):165-169. DOI 10.1007/s10517-017-3949-x.
- Michurina S.V., Ishchenko I.Yu., Arkhipov S.A., Klimontov V.V., Rachkovskaya L.N., Kononkov V.I., Zavyalov E.L. Effects of melatonin, aluminum oxide, and polymethylsiloxane complex on the expression of LYVE-1 in the liver of mice with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016;162(2):269-272. DOI 10.1007/s10517-016-3592-y.
- Michurina S.V., Shurlygina A.V., Belkin A.D., Vakulin G.M., Verbitskaia L.V., Trufakin V.A. Changes in liver and in some organs of immune system of animals exposed to twenty-four-hour illumination. *Morfologiya*. 2005;128(4):65-68. PMID: 16400925. (in Russian)
- Michurina S.V., Vasendin D.V., Ishchenko I.Yu. Physiological and biological effects of melatonin: some results and prospects for the study. *Rossiyskiy Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova = I.M. Sechenov Physiological Journal*. 2018;104(3):257-271. (in Russian)
- Morin L.P. Nocturnal light and nocturnal rodents: similar regulation of disparate functions? *J. Biol. Rhythms*. 2013;28(2):95-106. DOI 10.1177/0748730413481921.
- Motoyama S., Saito S., Alojado M.E., Itoh H., Kitamura M., Suzuki H., Saito R., Momiyama H., Nakae H., Ogawa J., Inaba H. Hydrogen peroxide induces midzonal heat shock protein 72 and apoptosis in sinusoidal endothelial cells of hypoxic rat liver. *Crit. Care Med.* 2000; 28(5):1509-1514. DOI 10.1097/00003246-200005000-00042.
- Motoyama S., Saito S., Saito R., Minamiya Y., Nakamura M., Okuyama M., Imano H., Ogawa J. Hydrogen peroxide-dependent declines in Bcl-2 induces apoptosis in hypoxic liver. *J. Surg. Res.* 2003; 110(1):211-216. DOI 10.1016/s0022-4804(03)00006-4.
- Polčić P., Mentel M. Reconstituting the mammalian apoptotic switch in yeast. *Genes (Basel)*. 2020;11(2):145. DOI 10.3390/genes11020145.
- Reiter R.J., Rosales-Corral S.A., Tan D.X., Alatorre-Jimenez M., Lopez C. Circadian dysregulation and melatonin rhythm suppression in the context of aging. In: Jazwinski S., Belancio V., Hill S. (Eds). *Circadian Rhythms and Their Impact on Aging*. (Ser. Healthy Ageing and Longevity. Vol. 7). Springer, Cham, 2017;1-25. DOI 10.1007/978-3-319-64543-8_1.
- Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S., Galano A., Jou M.J., Acuna-Castroviejo D. Melatonin mitigates mitochondrial meltdown: interactions with SIRT3. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(8):2439. DOI 10.3390/ijms19082439.
- Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S., Manchester L.C. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2013;13(3):373-384. DOI 10.2174/1389557511313030006.
- Russart K.L.G., Nelson R.J. Light at night as an environmental endocrine disruptor. *Physiol. Behav.* 2018;190:82-89. DOI 10.1016/j.physbeh.2017.08.029.
- Sahna E., Parlakpinar H., Vardi N., Cigremis Y., Acet A. Efficacy of melatonin as protectant against oxidative stress and structural changes in liver tissue in pinealectomized rats. *Acta Histochem.* 2004;106(5):331-336. DOI 10.1016/j.acthis.2004.07.006.
- Willis S., Day C.L., Hinds M.G., Huang D.C. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J. Cell. Sci.* 2003;116(Pt.20):4053-4056. DOI 10.1242/jcs.00754.
- Woolbright B.L., Jaeschke H. Xenobiotic and endobiotic mediated interactions between the cytochrome P450 system and the inflammatory response in the liver. *Adv. Pharmacol.* 2015;74:131-161. DOI 10.1016/bs.apha.2015.04.001.

ORCID ID

I.Yu. Ishchenko orcid.org/0000-0001-6281-0402

S.A. Arkhipov orcid.org/0000-0002-1390-4426

A.Yu. Letyagin orcid.org/0000-0002-9293-4083

E.L. Zavjalov orcid.org/0000-0002-9412-3874

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the budget project No. 0324-2019-0046. The study was performed using the equipment of the Center for genetic resources of laboratory animals of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, supported by the Ministry of Education and Science of Russia (Unique identifier of the project RFMEFI62119X0023).

Conflict of interest. The authors have no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Received December 17, 2020. Revised March 29, 2021. Accepted March 30, 2021.

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

Технологии поиска и исследования потенциально осциллирующих ферментативных систем

Т.Н. Лахова¹✉, Ф.В. Казанцев¹, С.А. Лашин^{1, 3}, Ю.Г. Матушкин^{2, 3}

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 Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ tlakhova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Многие процессы в живых организмах подвержены периодическим колебаниям на различных иерархических уровнях их организации: от молекулярно-генетического до популяционного и экологического. Осциллирующие процессы отвечают за клеточные циклы как у прокариот, так и у эукариот, за циркадные ритмы, синхронную связь дыхания с сердечными сокращениями и др. Колебания численностей организмов в природных популяциях могут быть обусловлены собственными свойствами популяций, их возрастной структурой, а также экологическими взаимоотношениями с другими видами. Наряду с экспериментальными подходами, для исследования осциллирующих биологических систем широко применяется математическое и компьютерное моделирование. В данной статье представлены классические математические модели, которые описывают осциллирующее поведение в биологических системах. Приведены методы поиска осциллирующих молекулярно-генетических систем на примере их частного случая – осциллирующих ферментативных систем. Рассмотрены факторы, влияющие на циклическую динамику в живых системах, характерные не только для молекулярно-генетического уровня, но и для более высоких уровней организации. Обсуждается применение различных способов описания генных сетей для моделирования осциллирующих молекулярно-генетических систем, где важнейшим фактором возникновения циклического поведения является наличие обратных связей. Представлены технологии поиска потенциально осциллирующих ферментативных систем. С помощью метода, описанного в статье, проводится поэтапный процесс построения и анализа сначала структурных моделей (графов) генных сетей, а затем реконструкции математических моделей и вычислительных экспериментов с ними. Структурные модели идеально подходят для задач автоматического поиска потенциальных осциллирующих контуров (связных подграфов), структура которых может соответствовать математической модели молекулярно-генетической системы, демонстрирующей осциллирующее поведение в динамике. При этом именно численное исследование математических моделей для отобранных контуров позволяет подтвердить наличие в них устойчивых предельных циклов. В качестве примера применения технологии проанализирована сеть из 300 метаболических реакций бактерии *Escherichia coli* с использованием инструментов математического и компьютерного моделирования. В частности, показано осциллирующее поведение для контура, реакции которого входят в путь биосинтеза триптофана.

Ключевые слова: осцилляции; обратная связь; циклические процессы; моделирование биологических систем.

Для цитирования: Лахова Т.Н., Казанцев Ф.В., Лашин С.А., Матушкин Ю.Г. Технологии поиска и исследования потенциально осциллирующих ферментативных систем. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3): 318-330. DOI 10.18699/VJ21.035

The finding and researching algorithm for potentially oscillating enzymatic systems

T.N. Lakhova¹✉, F.V. Kazantsev¹, S.A. Lashin^{1, 3}, Yu.G. Matushkin^{2, 3}

¹ Kurchatov Genomics 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 Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ tlakhova@bionet.nsc.ru

Abstract. Many processes in living organisms are subject to periodic oscillations at different hierarchical levels of their organization: from molecular-genetic to population and ecological. Oscillatory processes are responsible for cell cycles in both prokaryotes and eukaryotes, for circadian rhythms, for synchronous coupling of respiration with cardiac contractions, etc. Fluctuations in the numbers of organisms in natural populations can be caused by the populations' own properties, their age structure, and ecological relationships with other species. Along with experimental approaches, mathematical and computer modeling is widely used to study oscillating biological systems. This paper presents classical mathematical models that describe oscillatory behavior in biological systems. Methods for the search for oscillatory molecular-genetic systems are presented by the example of their special case – oscillatory enzymatic systems.

Factors influencing the cyclic dynamics in living systems, typical not only of the molecular-genetic level, but of higher levels of organization as well, are considered. Application of different ways to describe gene networks for modeling oscillatory molecular-genetic systems is considered, where the most important factor for the emergence of cyclic behavior is the presence of feedback. Techniques for finding potentially oscillatory enzymatic systems are presented. Using the method described in the article, we present and analyze, in a step-by-step manner, first the structural models (graphs) of gene networks and then the reconstruction of the mathematical models and computational experiments with them. Structural models are ideally suited for the tasks of an automatic search for potential oscillating contours (linked subgraphs), whose structure can correspond to the mathematical model of the molecular-genetic system that demonstrates oscillatory behavior in dynamics. At the same time, it is the numerical study of mathematical models for the selected contours that makes it possible to confirm the presence of stable limit cycles in them. As an example of application of the technology, a network of 300 metabolic reactions of the bacterium *Escherichia coli* was analyzed using mathematical and computer modeling tools. In particular, oscillatory behavior was shown for a loop whose reactions are part of the tryptophan biosynthesis pathway.

Key words: oscillations; feedback; cyclic processes; modelling of biological systems.

For citation: Lakhova T.N., Kazantsev F.V., Lashin S.A., Matushkin Yu.G. The finding and researching algorithm for potentially oscillating enzymatic systems. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):318-330. DOI 10.18699/VJ21.035

Введение

Многие процессы в живых организмах подвержены периодическим колебаниям на различных иерархических уровнях их организации: от молекулярно-генетического и до популяционного и экологического. Так, например, на молекулярно-генетическом уровне происходят осцилляции концентраций белка p53, участвующего в апоптозе или задержке клеточного цикла при повреждении ДНК, и его ингибитора Mdm2 (Prives, 1998; Lahav et al., 2004), колебания концентраций гормонов в клетке, таких как мелатонин (Voccalandro et al., 2011), пролактин, общий холестерин (Garde et al., 2001) и другие; внутриклеточные и межклеточные колебания концентраций ионов кальция (Pasti et al., 1997; Allen et al., 2000).

Одним из хорошо известных примеров периодических процессов на уровне всего организма являются циркадные ритмы, за работы по исследованию которых в 2017 г. была вручена Нобелевская премия по физиологии и медицине (Young et al., 1984; Siwicki et al., 1988; Hardin et al., 1990; Price et al., 1998). Джеффри Холл, Майкл Росбаш и Майкл Янг обнаружили ген *period* у дрозофил, который регулируется посредством обратной связи продуктом этого гена – белком PER, что и составляет молекулярную основу циркадных ритмов.

В работе (Podkolodnyu et al., 2017) рассмотрены гены, находящиеся в клетках печени и почек, которые имеют повышенную экспрессию с определенной периодичностью в течение 24-часового цикла. В последующей публикации авторы представили обзор различных математических моделей, применяющихся для моделирования автономных циркадных часов в клетках млекопитающих (Podkolodnyu et al., 2017).

На клеточном уровне к циклическим процессам можно отнести клеточные циклы у прокариот и эукариот (Cooper, 1991). Такие важные циклические процессы, как сердцебиение (Ashkenazy et al., 2001), дыхание, а также синхронная связь дыхания с сердечными сокращениями (Yasuma, Hayano, 2004), фотосинтез (Holtum, Winter, 2003) и другие подобные процессы происходят на уровне отдельного органа или функциональных систем организма.

Популяционные волны (Четвериков, 2009) представляют классический пример циклических процессов на

популяционном уровне организации живой материи. Колебания численностей организмов в природных популяциях могут быть обусловлены как внешними средовыми факторами, так и собственными свойствами популяции, ее возрастной структурой и экологическими взаимоотношениями с другими видами. В циклических процессах популяционного уровня важную роль играет такой природный фактор, как сезонность, влияющий на миграцию птиц, впадение в анабиоз, появление и опадение листьев и т. д.

Например, в работе (Erdakov, Moroldoev, 2017) рассматривается циклическая динамика численности красной полевки, которая изменяется в зависимости от географического обитания и внешних условий в ареале. В другом исследовании с помощью стохастической модели авторы анализировали, как изменяется численность популяции при потреблении вредных пищевых ресурсов (Перцев, Логинов, 2011). Вообще говоря, изучение динамики популяций, нередко циклической, – один из самых исследуемых процессов, для которого привлекают и эмпирические, и математические методы, в том числе моделирование (Volterra, 1928; Базыкин, 2003; Ризниченко, 2017).

Наконец, на экологическом уровне к циклическим процессам можно отнести биогеохимические циклы, т. е. процессы динамического обмена химическими веществами между организмами (от прокариот до высших животных и растений) и элементами биосферы (почва, вода, воздух) (Заварзин, 2003, 2011; Van Cappellen, 2003; Struyf et al., 2009).

Циклические процессы в биологии исследуют с помощью экспериментальных и теоретических методов, и математическое моделирование служит одним из основных инструментов их изучения, в частности в вопросах нахождения областей стационарного, осциллирующего и, возможно, хаотического поведения (Романовский и др., 1975; Шноль, 1996; Becks, Arndt, 2013).

Первые работы, посвященные осциллирующим биохимическим процессам, принадлежат Альфреду Лотке (Lotka, 1910). Он описывал динамику биохимических процессов с помощью систем нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений. Примерно в это же время, независимо от Лотки, подобные модели, но в приложении к популяционно-экологическим задачам разработал

Вито Вольтерра. Впоследствии они получили название «модели Лотки–Вольтерры». Дальнейшее исследование осциллирующих химических процессов привело к открытию систем типа Белоусова–Жаботинского, колебания в которых происходят не только во времени, но и в пространстве и, стало быть, могут описываться не только обыкновенными дифференциальными уравнениями, но и дифференциальными уравнениями в частных производных (Жаботинский, 1974; Филд, Бургер, 1988; Муштакова, 1997; Шноль, 2009).

В данной статье представлен обзор классических математических моделей, которые описывают осциллирующее поведение в биологических системах, а также приведены примеры методов для поиска таких систем на примере ферментативных осциллирующих систем. Рассматриваются роль генных сетей при моделировании осциллирующих молекулярно-генетических систем и факторы, влияющие на наличие или отсутствие осциллирующего поведения в различных молекулярно-генетических системах.

Классические модели и методы моделирования осциллирующих процессов

К первым математическим подходам, описывающим осциллирующие процессы, можно отнести модели, уже ставшие классическими в области математической биологии (Ризниченко, 2002). В одной из работ, посвященных теории периодических реакций, Лотка исследовал химическую реакцию вида



где $X \rightarrow Y$ является автокаталитическим процессом. На основе закона действующих масс он описал эту реакцию следующими дифференциальными уравнениями (Lotka, 1910):

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= k_0 - k_1xy, \\ \frac{dy}{dt} &= k_1xy - k_2y, \end{aligned} \quad (2)$$

где k_0, k_1, k_2 – константы; x, y – концентрации веществ.

Следующая модель, которую представил Лотка (Lotka, 1920), а затем независимо сформулировал Вольтерра (Volterra, 1928), описывает две автокаталитические реакции ($A \rightarrow X$ и $X \rightarrow Y$). Модель Лотки–Вольтерры имеет следующий вид:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= ax - bxy, \\ \frac{dy}{dt} &= cxy - dy, \end{aligned} \quad (3)$$

где a, b, c, d – скорости превращения одних веществ в другие; x, y – концентрации веществ. Эта модель известна также под названием «система хищник–жертва» и применяется в популяционной динамике для объяснения периодических колебаний численности особей в популяциях.

В тот же период времени вышла в свет статья с моделью осциллятора ван дер Поля и ван дер Марка (van der Pol, van der Mark, 1928). Они смоделировали сердце как три связанные системы релаксации: синусный узел, предсердие и желудочек. При построении модели сердца авторы

выбрали экспериментальную установку, состоящую из неоновой лампы, конденсатора, резистора и батареи, которая способна производить релаксационные колебания. Однако эта система воспроизводит только некоторые режимы работы сердца, что объясняется сложностью исследуемого объекта. Модель описывается уравнением вида

$$\frac{d^2v}{dt^2} - \alpha(1 - v^2)\frac{dv}{dt} + \omega^2v = 0, \quad (4)$$

где α – положительная величина, являющаяся параметром осциллятора (отвечает за нелинейность и затухание колебаний); ω – частота колебаний; v – значение, соответствующее показанию сердечного ритма.

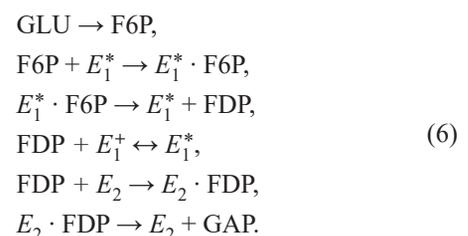
Примечательна эта модель тем, что нашла применение не только в задачах биологии, но и в физике и других науках. Например, в обзоре (Кузнецов и др., 2014) приведен ряд задач, в которых применялся данный осциллятор. В частности, авторы подробно останавливаются на моделировании процессов человеческого организма, таких как миоэлектрическая активность в толстой кишке, процессы возбуждения и торможения нейронов. В работе (Rompa et al., 2007) рассматриваются три осциллятора ван дер Поля для изучения синфазного режима, который соответствует синхронизированному периодическому поведению циркадных ритмов. Причем два из них соответствуют моделям глаз, а третий осциллятор является моделью мозга (главным образом представлен шишковидным телом), через который и осуществляется взаимосвязь первых двух. Авторы рассматривали периодическое изменение концентрации мелатонина под воздействием циркадных ритмов как возможную схему связи между глазами и шишковидной железой.

В 1965 г. вышла статья Брайана Гудвина (Goodwin, 1965), в которой поднимается вопрос о роли осциллирующего движения в организации клеточных процессов во времени. Для математического исследования осциллирующего поведения в модельных системах, включающих процессы регуляции ферментов, Гудвин вводит определенные концепции термодинамической природы и приводит модель процесса генетического контроля синтеза ферментов:

$$\begin{aligned} \frac{dX_i}{dt} &= \frac{a_i}{A_i + k_iY_i} - b_i, \\ \frac{dY_i}{dt} &= a_iX_i - b_i, \end{aligned} \quad (5)$$

где X_i – концентрация мРНК i -го вида; Y_i – концентрация белка (репрессора) i -го вида, а параметр k_i описывает взаимодействие между ДНК и репрессором.

Еще одним из классических примеров является модель Хиггинса (Higgins, 1964) колебательных реакций в системе гликолиза, схема которой представлена ниже:



Здесь GLU , $F6P$, FDP , GAP – обозначения биохимических веществ, вступающих в реакции; E_1^* – активная форма фермента (фосфофруктокиназа); E_1^+ – неактивная форма фермента; E_2 – фермент, представляющий комплекс из альдолазы и триозофосфат-изомеразы.

Хиггинс рассматривает общие типы путей протекания ферментативных реакций гликолиза, при которых химический механизм проявляет осциллирующее поведение. Поэтому в своей работе он учитывает следующие условия: 1) одно из участвующих в реакции веществ должно активировать выработку самого себя при условии, что концентрация второго вещества постоянна; 2) второе вещество должно инактивировать выработку собственной чистой продукции; 3) должна быть перекрестная связь взаимодействия веществ, т. е. если увеличение первого вещества активирует выработку второго, то увеличение второго вещества ингибирует выработку первого, и наоборот.

Сельков в своей классической статье (Sel'kov, 1968) в соответствии с законом действующих масс приводит математическую модель гликолитической системы, основанную на превращениях фосфофруктокиназы (ПФК):

$$\begin{aligned} \frac{ds_1}{dt} &= v_1 - k_{+1}s_1x_1 + k_{-1}x_2, \\ \frac{ds_2}{dt} &= k_{+2}x_2 - k_{+3}s_2^\gamma e + k_{-3}x_1 - k_2s_2, \\ \frac{dx_1}{dt} &= -k_{+1}s_1x_1 + (k_{-1} + k_{+2})x_2 + k_{+3}s_2^\gamma e - k_{-3}x_1, \\ \frac{dx_2}{dt} &= k_{+1}s_1x_1 - (k_{-1} + k_{+2})x_2, \\ \frac{de}{dt} &= -k_{+3}s_2^\gamma e - k_{-3}x_1, \end{aligned} \quad (7)$$

где s_1 – субстрат (АТФ); v_1 – скорость притока субстрата из некоторого источника; s_2 – продукт реакции (АДФ); $v_2 = k_2s_2$ – скорость оттока продукта из системы; e – свободный фермент (фосфофруктокиназа), который неактивен сам по себе, но становится активным, когда соединяется с молекулами продукта в виде комплекса – ES_2^γ ; x_1 – молекула комплекса (ES_2^γ); x_2 – молекула фермент-субстратного комплекса ($S_1ES_2^\gamma$); s_2^γ – молекулы продукта, вступающие в комплекс со свободным ферментом; $\gamma > 1$ – параметр, отвечающий за количество молекул продукта; k_{+1}, k_{+2}, k_{+3} – скорости протекания прямых реакций; k_{-1}, k_{-3} – скорости протекания обратных реакций; t – время.

В работе (Goldbeter, Lefever, 1972) представлена модель гликолитической системы, которая является обобщением моделей Хиггинса (Higgins, 1964, 1967) и Селькова (Sel'kov, 1968) и основана на механизме положительной обратной связи, а именно активации продукта ферментом ПФК.

В статье (Voiteux et al., 1975) авторы не только проанализировали аллостерическую модель колебательной реакции фосфофруктокиназы, но и экспериментально проверили теоретические предсказания. Полученные данные для модели хорошо согласовались с экспериментальными данными.

В 2000 г. была представлена модель популяции дрожжей, состоящих из небольшого ансамбля отдельных клеток, с целью описать феномен синхронизации гликолитических колебаний. При этом связь между клетками осуществлялась через обмен ацетальдегидом (Bier et al., 2000). Также гликолитические осцилляции изучались с помощью стохастических методов и теории хаоса: в работе (Bashkirtseva, Ryashko, 2017) за основу бралась минимальная модель Селькова, а в (Ryashko, 2018) – двумерная модель Хиггинса.

В биохимии активно изучаются процессы изменения концентрации ионов в клетках, которые могут повышать или снижать активность ферментов. Они также участвуют в обмене углеводов, липидов и белков, играют важную роль при передаче сигналов через сигнальные пути и отвечают за возбудимость клеток. Один из таких процессов – периодическое изменение концентраций ионов кальция. Для исследования этих периодических процессов был разработан ряд математических моделей. Впервые модель, описывающая колебания концентрации ионов кальция, была предложена Голдбетером и Дюпоном (Dupont, Goldbeter, 1989):

$$\begin{aligned} \frac{dZ}{dt} &= v_0 + v_1\beta - v_2 + v_3 - kZ, \\ \frac{dY}{dt} &= v_2 - v_3. \end{aligned} \quad (8)$$

Здесь Z – концентрация кальция в цитозоле; Y – концентрация кальция в IP_3 (инозитол-1,4,5-трифосфат) эндоплазматическом ретикулуме; v_i ($i = 0, \dots, 3$) – скорости протекания реакций.

Авторы анализировали условия возникновения устойчивых колебаний на основе механизма высвобождения кальция из внутриклеточных запасов (Calcium-induced calcium release, CICR). В последующих работах (Goldbeter et al., 1990; Dupont et al., 1991; Dupont, Goldbeter, 1993) они продолжили изучение колебаний концентраций кальция на основе той же минимальной модели.

В это же время Мейер и Страйер (Meyer, Stryer, 1988; Meyer, 1991) исследовали колебания концентраций кальция, рассматривая механизм перекрестной связи (inositol cross-coupling, ICC) IP_3 с внеклеточным, цитозольным и эндоплазматическим Ca^{2+} . В работе (Lavrentovich, Nemkin, 2008) предложена модель для спонтанных колебаний Ca^{2+} в астроцитах, учитывающая представленные выше механизмы, а также получение IP_3 независимым от рецептора способом.

Следом за Голдбетером и Дюпоном гипотезу о том, что в невозбудимых клетках амплитуды осциллирующих процессов могут быть специфичными в зависимости от типа клеток и варьироваться от диффузии Ca^{2+} , проверили Краус с коллегами (Kraus et al., 1996). Свое исследование они провели с помощью стохастического компьютерного моделирования на двумерной модели колебаний Ca^{2+} .

Анализ осциллирующих процессов в живых системах показывает, что важнейшим фактором возникновения циклического поведения являются обратные связи в системе (Колчанов и др., 2000). Различают положительную

Таблица 1. Краткая характеристика ряда классических моделей с осциллирующим поведением

Название модели	Моделируемый биологический процесс	Класс модели	Вид обратных связей и их количество
Модель Лотки (Lotka, 1910)	Биохимическая реакция	Нелинейная неоднородная СОДУ с постоянными коэффициентами	Положительная (1) и отрицательная (2)
Модель Лотки–Вольтерры («хищник–жертва») (Lotka, 1920; Volterra, 1928)	Биохимическая реакция; популяционная динамика	Нелинейная однородная СОДУ с постоянными коэффициентами	Положительная (2) и отрицательная (2)
Осциллятор ван дер Поля (van der Pol, van der Mark, 1928)	Работа сердца, возбуждение и торможение нейронов, миоэлектрическая активность в толстой кишке и др.	Нелинейное однородное ОДУ второго порядка – уравнение Лиенара, которое можно свести к ОДУ первого порядка	Отрицательная (2) и положительная (1)
Осциллятор Гудвина (Goodwin, 1965)	Генетический контроль синтеза ферментов	Нелинейная неоднородная СОДУ с постоянными коэффициентами	Отрицательная (1) и положительная (1)
Модель Селькова (Sel'kov, 1968)	Ферментативная реакция	Линейная неоднородная СОДУ с постоянными коэффициентами	Отрицательная (ингибирование субстратом), положительная (активирование продуктом). Отрицательная (9), положительная (7)
Модель Дюпона–Голдбетера (Dupont, Goldbeter, 1989)	Колебания концентрации кальция	Линейная неоднородная СОДУ с постоянными коэффициентами	Положительная (4) и отрицательная (3)

Примечание. ОДУ – обыкновенное дифференциальное уравнение; СОДУ – система ОДУ.

и отрицательную обратную связь, о которых в свое время говорили Гудвин, Волтер, Кардон, Иберал и другие исследователи (Goodwin, 1965; Walter, 1969, 1970; Cardon, Iberall, 1970). Оба типа этих связей могут влиять на возникновение циклической динамики в системе (Лихошвай и др., 2001; Goldbeter, 2002; Tyson et al., 2003).

На молекулярном уровне по принципу обратных связей регулируется огромное число ферментативных реакций, одновременно протекающих в живой клетке. На скорость их протекания могут влиять такие соединения, как ингибиторы, активаторы, кофакторы, аллостерические эффекторы и др. Еще в 1913 г. биохимики Михаэлис и Ментен вывели уравнение зависимости скорости реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата (Michaelis, Menten, 1913). Позже исследователями с помощью вычислительных методов было показано, что оптимизация параметров уравнения путем приближения модельных данных к экспериментальным соответствует результатам, полученным вручную Михаэлисом и Ментен для их константы.

Несколько лет назад был проведен обзор того, как в течение столетия появлялись, менялись и модифицировались методы количественного анализа ферментативной кинетики (Johnson, 2013). Тогда же вышла в свет статья (Goldbeter, 2013), в которой рассмотрено влияние кинетики Михаэлиса–Ментен на осциллирующее поведение в ферментативных системах, а именно: в гликолизе – в зависимости от активности фосфофруктокиназы, в клеточном цикле – от циклинзависимых киназ.

Примеры осциллирующих процессов рассмотрены Новаком и Тайсоном (Novák, Tyson, 2008). Ими сформулированы необходимые условия для осцилляций в системе: отрицательная обратная связь, запаздывание, достаточная «нелинейность» кинетических реакций и правильная ба-

лансировка временного масштаба обратимых химических реакций.

В своем недавнем обзоре Тайсон с коллегами собрали различные подходы к моделированию динамики поведения биохимических регуляторных сетей, которые были разработаны за последние 50 лет (Tyson et al., 2019). Обсуждаются такие модели, как булевы (логические), модели, состоящие из кусочно-линейных или полностью нелинейных систем обыкновенных дифференциальных уравнений, и стохастические модели, включающие комбинированные детерминированно-стохастические подходы. Основное внимание авторы уделили двум подходам: моделированию генетических регуляторных систем как сетей переключателей на основе булевой алгебры и моделированию метаболических и сигнальных сетей с помощью систем нелинейных дифференциальных уравнений. При этом они рассматривали только пространственно однородные системы. Показаны достоинства и недостатки каждого метода в зависимости от типа и количества доступной экспериментальной информации.

Модели, обсуждаемые в данном разделе обзора, представлены в табл. 1.

Применение генных сетей при моделировании осциллирующих систем

Моделирование метаболизма часто сопряжено с моделированием генетической регуляции (Smolen et al., 2000; Hecker et al., 2009). Интегрирующую роль в данном случае отводят концепции генных сетей (Колчанов и др., 2013; Osone et al., 2013).

Основная задача теории генных сетей – выявление причинно-следственных связей между структурно-функциональной организацией генных сетей (ГС) и их динамическими свойствами (Chen et al., 2010; Колчанов и

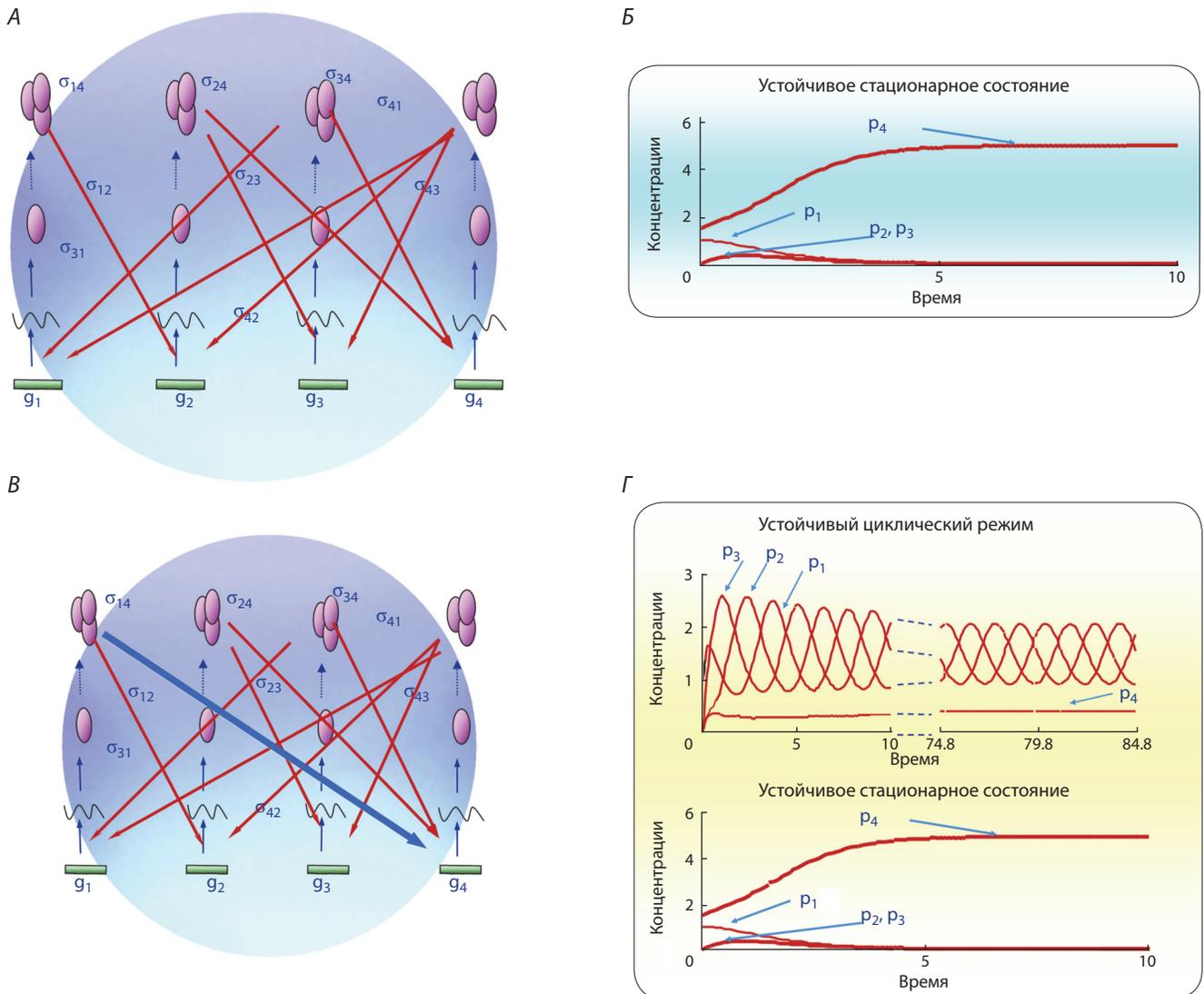


Рис. 1. Связь структурной модели (графа) гипотетической генной сети с ее динамикой: А – структура гипотетической генной сети из 4 генов и 8 отрицательных обратных связей; Б – динамика гипотетической генной сети А; В – структура модифицированной генной сети А, к которой добавлена дополнительная отрицательная регуляторная связь – ингибирование экспрессии гена g_4 продуктом гена g_1 (обозначено синей стрелкой); Г – динамика модифицированной генной сети В.

Зеленые прямоугольники (g_i) – гены; ломаная линия – РНК, соответствующая определенному гену; розовый эллипс – полипептидная цепь белка; несколько розовых эллипсов – комплекс белков, осуществляющий регуляцию генов (регуляция показана красной стрелкой). Модифицировано по (Колчанов и др., 2008).

др., 2013). При этом под структурно-функциональной организацией ГС понимается совокупность молекулярно-генетических и биохимических процессов, а под динамическими свойствами – кинетика изменений во времени концентраций конечных продуктов.

Для понимания фундаментальных особенностей динамики регуляторных ГС очень ценную информацию дают компьютерный анализ и моделирование генных сетей малой размерности, особенно гипотетических. В ИЦиГ СО РАН В.А. Лихошваем с коллегами разработана теория, связывающая структурно-функциональную организацию гипотетических ГС с их динамикой (Лихошвай и др., 2001, 2003; Фадеев, Лихошвай, 2003; Демиденко и др., 2004; Likhoshvai et al., 2004). А именно, определено понятие гипотетической генной сети (ГГС); приведены правила формализации описания и сборки из них математических

моделей; для ГГС сформулирован (n, k) -критерий для предсказания некоторых свойств моделей по структуре графа сети; введены четыре класса ГГС в соответствии с типами регуляторных связей в сети, а также представлены аналитические и численные исследования моделей для каждого класса ГГС.

В частности, сначала теоретически, а затем численно продемонстрировано, как появление новой регуляторной связи приводит к качественному изменению динамики генной сети (рис. 1). Так, добавление еще одной регуляторной связи в генную сеть кардинально меняет возможные режимы функционирования этой сети: если в исходной сети было возможно только одно стационарное состояние, то после добавления еще одной регуляторной связи возможных состояний уже два – стационар (как в прежнем случае) и циклический режим.

Связь структур генных сетей с наличием в них динамических циклов исследуется не первый год. В частности, теоретически показана связь между структурой сети и циклической динамикой (Лихошвай и др., 2003; Демиденко и др., 2004; Novák, Tyson, 2008). В работе (Elowitz, Leibler, 2000) была спроектирована и изучена генетическая сеть репрессилатора, в котором рассматриваемая сеть замыкается в цикл взаимодействия по принципу отрицательных обратных связей. Авторы экспериментально показали, что такой тип сети имеет осциллирующий режим поведения.

В Институте математики им. С.Л. Соболева СО РАН разрабатывается качественная теория динамических систем, описывающих различные генные сети, которые регулируются обратными связями. В.П. Голубятников с соавторами изучали в таких системах вопросы существования и единственности периодических решений, существования замкнутых траекторий, устойчивости циклов и др. (Гайдов, Голубятников, 2007; Golubyatnikov et al., 2010; Акиншин, Голубятников, 2012; Голубятников, Казанцев, 2016; Голубятников, Кириллова, 2018). Интерес в анализе поведения таких траекторий состоит в том, что они соответствуют режимам функционирования генных сетей. В статье (Likhoshvai et al., 2020) было показано, что в моделях простейших кольцевых генных сетей присутствуют колебательные траектории и они устойчивы.

Метод поиска осциллирующих молекулярно-генетических систем

Опишем алгоритм поиска осциллирующих молекулярно-генетических систем (рис. 2). В алгоритме используются следующие информационные ресурсы, как разработанные авторами (в частности, база данных MAMMOTH как источник структурных и математических моделей метаболических реакций *Escherichia coli* (Kazantsev et al., 2018)), так и широко известные в системной биологии – Cytoscape (cytoscape.org), инструмент работы со структурными моделями, и Copasi (Hoops et al., 2006), инструмент реконструкции и исследования математических моделей. Язык программирования Python (python.org) служит инструментарием обработки данных и связующим звеном между этапами.



Рис. 2. Схема алгоритма поиска осциллирующих ферментативных систем.

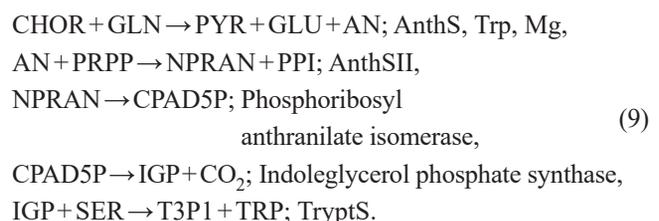
На вход алгоритма поступает структурная модель – граф генной сети с типизацией элементов модели и их отношений. В узлах графа лежат два типа вершин: биологические вещества (молекулы и их агломераты) и процессы (или реакции). Дуги задают следующие отношения между вершинами: вещество является субстратом в реакции, вещество является продуктом реакции, вещество является регулятором реакции. Эта информация может быть получена сразу из моделей в форматах SBML (Hucka et al., 2003), SBGN (Le Novère et al., 2009), из профильных инструментов работы со структурными моделями или задана пользователем в рамках пользовательских скриптов Python. На сегодняшний день источником данных может служить любая база данных, имеющая информацию о метаболических путях и моделях молекулярно-генетических систем. Наиболее известны такие базы данных, как KEGG (Kanohisa, Goto, 2000), GeneNet (Ananko, 2002), MetaCyc (Caspi et al., 2016), EcoCyc (Keseler et al., 2017), BioModels (Le Novère et al., 2006; Malik-Sheriff et al., 2019) и др.

В настоящей статье мы рассмотрели частный случай молекулярно-генетических систем – осциллирующие ферментативные системы. Анализ литературы (Лихошвай и др., 2001; Novák, Tyson, 2008; Tyson, Novák, 2010; Wong, Huck, 2017) позволяет выделить следующие ключевые характеристики потенциально осциллирующих контуров: 1) замкнутость контура (ориентированный путь из вершины A в нее же через N узлов, где $N > 3$); 2) ориентированность контура в одном направлении, при этом последний узел имеет дугу регуляторного ингибиторного воздействия на первый узел в контуре (как, например, в контуре на рис. 4, а).

В качестве исходной информации для иллюстрации подхода использовался граф из 300 подсистем (рис. 3), представляющих модели метаболических реакций *E. coli*, взятых из базы данных MAMMOTH.

Построение математической модели потенциально осциллирующего контура можно осуществлять как в инженерных средах моделирования общего назначения (Matlab, Mathematica или Scilab), так и в специализированных средах, предназначенных для моделирования молекулярно-генетических систем (Copasi, CellDesigner (Funahashi et al., 2003), VCELL (Schaff et al., 1997; Cowan et al., 2012) и др.). Преимущество последних – в готовой библиотеке инструментов реконструкции, проведения вычислительных экспериментов и анализа моделей.

В проанализированном графе было найдено шесть потенциально осциллирующих контуров, и только для одного из них в процессе численного анализа реконструированной математической модели было показано осциллирующее поведение (рис. 4). Математическая модель контура построена на основе реакций, относящихся к метаболическому пути биосинтеза триптофана:



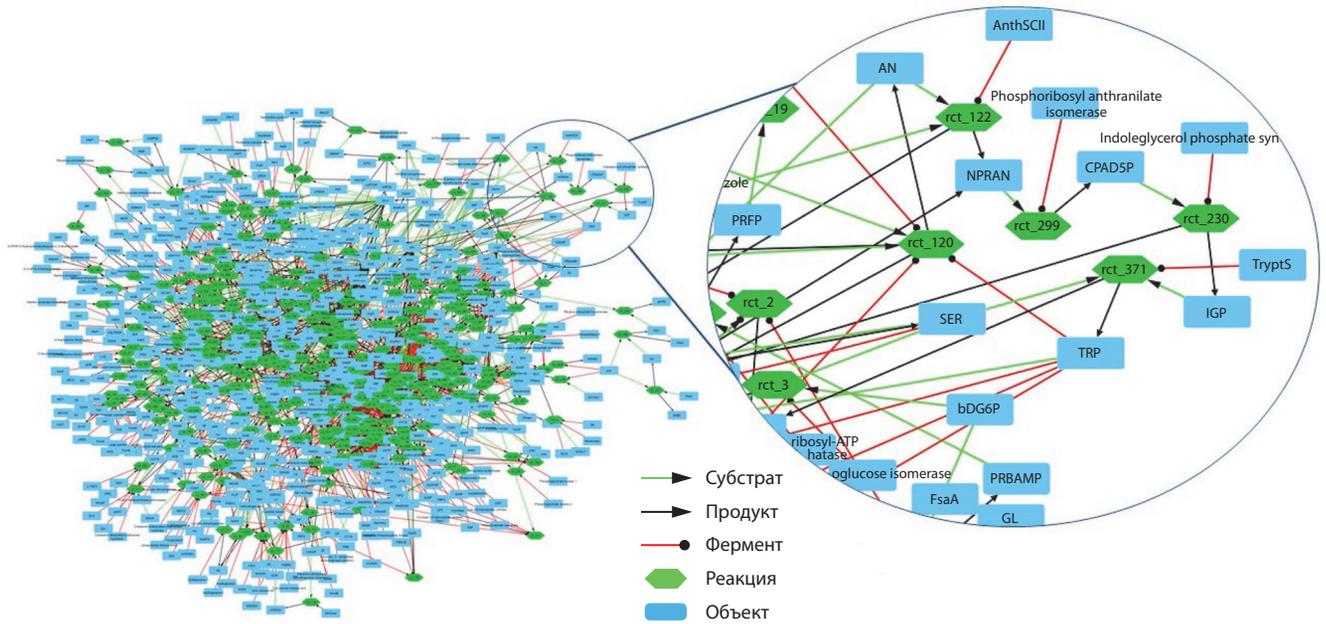


Рис. 3. Структурная модель (граф G), построенная по 300 подсистемам метаболических путей *E. coli*, взятых из базы данных MAMMOTh (Kazan-tsev et al., 2018).

Здесь и на рис. 4: в голубых квадратах представлены вещества, участвующие в метаболических реакциях; зеленым шестиугольником обозначены реакции; стрелками задаются отношения взаимодействующих веществ: зеленая стрелка задает субстрат реакции, черная – продукт реакции, красная – регуляторное влияние вещества на реакцию.

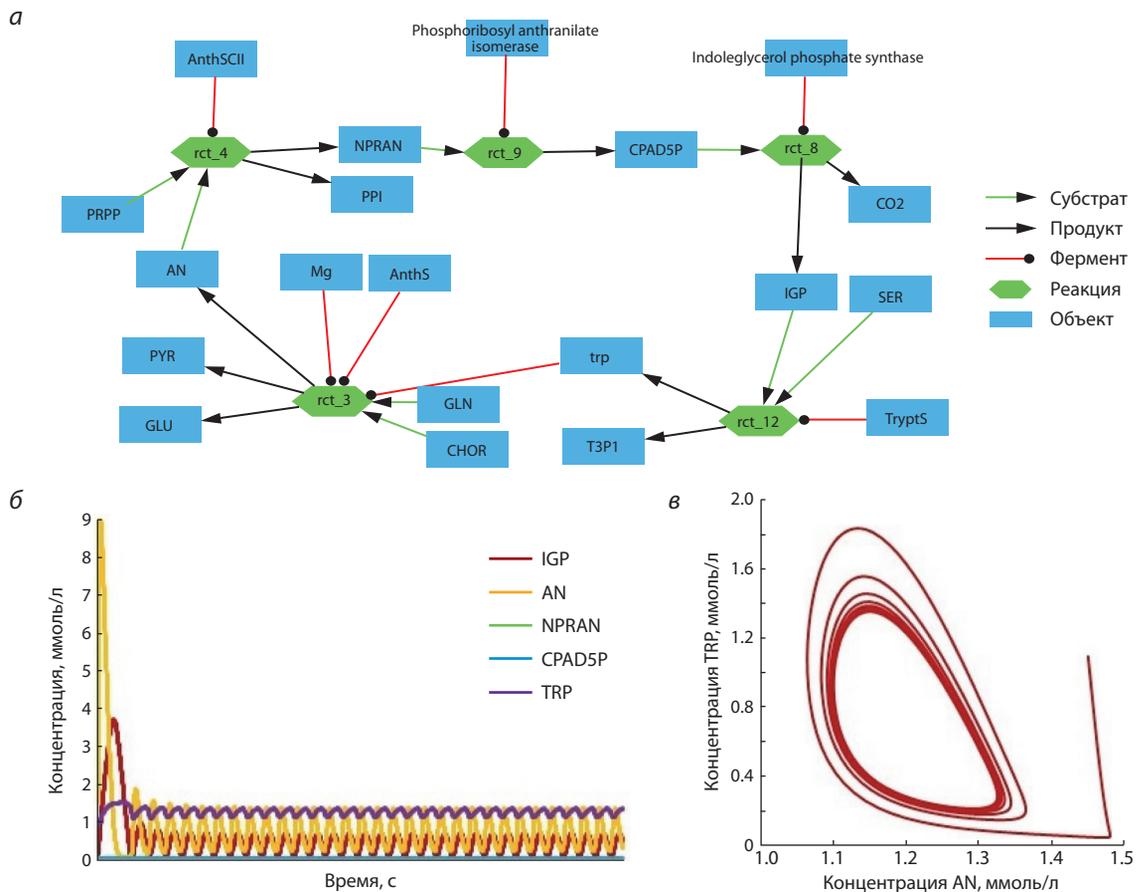


Рис. 4. Потенциально осциллирующий контур и его численный анализ.

a – исследуемый контур, являющийся частью метаболического пути биосинтеза триптофана; *б* – график с результатами моделирования, зависимость концентрации указанных веществ от времени; *в* – фазовая траектория по результатам моделирования, по осям абсцисс и ординат указаны концентрации веществ anthranilate (AN) и L-tryptophan (TRP) соответственно.

Здесь CHOR, GLN, PYR, GLU, AN, PRPP, NPRAN, PPI, CPAD5P, IGP, SER, T3P1, TRP – обозначения биохимических веществ, вступающих в реакции. После точки с запятой указаны вещества, выступающие в роли регу-

ляторов протекания реакций. Полные названия веществ приведены в табл. 2.

Модель была построена в Copasi и состоит из пяти дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d([IGP])}{dt} &= + \left(\frac{3.1 \cdot [\text{"Indoleglycerol phosphate synthase"}] \cdot \frac{[CPAD5P]}{0.0012}}{1 + \frac{[CPAD5P]}{0.0012} + \frac{[IGP]}{0.12}} \right) \\ &- \left(\frac{1.4 \cdot [\text{TryptS}] \cdot \frac{[IGP]}{0.05} \cdot \frac{[SER]}{0.4}}{\left(1 + \frac{[IGP]}{0.05} + \frac{[T3P1]}{5}\right) \cdot \left(1 + \frac{[SER]}{0.4} + \frac{[TRP]}{40}\right)} \right) - (kD_IGP \cdot [IGP]), \\ \frac{d([TRP])}{dt} &= - (kD_TRP \cdot [TRP]) + \left(\frac{1.4 \cdot [\text{TryptS}] \cdot \frac{[IGP]}{0.05} \cdot \frac{[SER]}{0.4}}{\left(1 + \frac{[IGP]}{0.05} + \frac{[T3P1]}{5}\right) \cdot \left(1 + \frac{[SER]}{0.4} + \frac{[TRP]}{40}\right)} \right), \\ \frac{d([AN])}{dt} &= + \left(\frac{260 \cdot [\text{AnthS}] \cdot \frac{[CHOR]}{1.5} \cdot \frac{[GLN]}{0.2}}{\left(1 + \frac{[CHOR]}{1.5} + \frac{[PYR]}{150} + \frac{[TRP]}{0.6}\right) \cdot \left(1 + \frac{[GLN]}{0.2} + \frac{[GLU]}{20}\right)} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{[TRP]}{TRP_denominator}\right)^{TRP_power}} \cdot \frac{\frac{[Mg]}{1}}{1 + \frac{[Mg]}{1}} \right) \\ &- \left(\frac{AN_PRPP_kf \cdot [\text{AnthSCII}] \cdot \frac{[AN]}{1.1} \cdot \frac{[PRPP]}{2.9}}{\left(1 + \frac{[AN]}{1.1}\right) \cdot \left(1 + \frac{[PRPP]}{2.9}\right)} \right) - (kD_AN \cdot [AN]), \\ \frac{d([NPRAN])}{dt} &= + \left(\frac{AN_PRPP_kf \cdot [\text{AnthSCII}] \cdot \frac{[AN]}{1.1} \cdot \frac{[PRPP]}{2.9}}{\left(1 + \frac{[AN]}{1.1}\right) \cdot \left(1 + \frac{[PRPP]}{2.9}\right)} \right) \\ &- \left(\frac{AN_PRPP_kf \cdot [\text{"Phosphoribosyl anthranilate isomerase"}] \cdot \frac{[NPRAN]}{0.007}}{1 + \frac{[NPRAN]}{0.007} + \frac{[CPAD5P]}{0.7}} \right) - (kD_NPRAN \cdot [NPRAN]), \\ \frac{d([CPAD5P])}{dt} &= + \left(\frac{AN_PRPP_kf \cdot [\text{"Phosphoribosyl anthranilate isomerase"}] \cdot \frac{[NPRAN]}{0.007}}{1 + \frac{[NPRAN]}{0.007} + \frac{[CPAD5P]}{0.7}} \right) \\ &- \left(\frac{3.1 \cdot [\text{"Indoleglycerol phosphate synthase"}] \cdot \frac{[CPAD5P]}{0.0012}}{1 + \frac{[CPAD5P]}{0.0012} + \frac{[IGP]}{0.12}} \right) - (kD_CPAD5P \cdot [CPAD5P]), \end{aligned}$$

где $kD_{\text{«название вещества»}}$ – константы деградации соответствующих веществ, параметры TRP_power и $TRP_denominator$ варьировались в процессе поиска осциллирующего поведения системы. Приведенные числовые параметры взяты из базы данных MAMMOTH.

Математическая модель только одного из шести найденных контуров демонстрирует осциллирующее поведение. Такое малое количество связано с тем, что мы рассматривали сеть, состоящую лишь из 300 ферментативных реакций, для которых имелись математические модели,

адаптированные к экспериментальным данным. В свою очередь в настоящее время не так много математических моделей, описывающих ферментативные реакции биологических систем. Представленные в базах тысячи существующих моделей нередко сгенерированы автоматически, как, например, в проекте Path2Models для базы данных biomodels.net. Все реже проводят экспериментальные измерения кинетических параметров биохимических реакций. Использование графов с большей размерностью (полногеномные модели) для исследования осциллирую-

Таблица 2. Список полных названий биохимических веществ, используемых в модели

Сокращение	Полное название
CHOR	Chorismate
GLN	L-glutamine
PYR	Pyruvate
GLU	L-glutamate
AN	Anthranilate
AnthS	Anthranilate synthase
TRP	L-tryptophan
PRPP	5-Phospho- α -D-ribose 1-diphosphate
NPRAN	N-(5-phosphoribosyl)-anthranilate
PPI	Diphosphate
AnthSCII	Anthranilate synthase component II
CPAD5P	1-(o-carboxyphenylamino)-1'-deoxyribulose-5'-phosphate
PRAI	Phosphoribosyl anthranilate isomerase
IGP	Indole-3-glycerol-phosphate
SER	L-serine
T3P1	D-glyceraldehyde 3-phosphate
TryptS	Tryptophan synthase

щего поведения позволит увеличить количество вариантов для проверки, однако это потребует дополнительного учета регуляторной компоненты генетического синтеза. Все это представляет дополнительные сложности в изучении данной задачи.

Заключение

В статье сделан обзор ряда биологических процессов, имеющих колебательную природу, а также математических моделей этих процессов. Отмечается, что важнейшим фактором возникновения циклического поведения являются обратные связи в системе. На основе анализа этих факторов представлен алгоритм нахождения циклических режимов функционирования молекулярно-биологических систем.

Список литературы / References

Акиншин А.А., Голубятников В.П. Циклы в симметричных динамических системах. *Вестн. НГУ*. 2012;12(2):3-12.
[Akinshin A.A., Golubyatnikov V.P. Cycles in symmetric dynamical systems. *Vestnik NGU = Herald of the Novosibirsk State University*. 2012;12(2):3-12. (in Russian)]

Базыкин А.Д. Нелинейная динамика взаимодействующих популяций. М.; Ижевск, 2003.
[Bazykin A.D. Nonlinear Dynamics of Interacting Populations. Moscow-Izhevsk, 2003. (in Russian)]

Гайдов Ю.А., Голубятников В.П. О некоторых нелинейных динамических системах, моделирующих несимметричные генные сети. *Вестн. НГУ*. 2007;7(2):19-27.
[Gaidov Yu.A., Golubyatnikov V.P. On some nonlinear dynamical systems modelling asymmetric gene networks. *Vestnik NGU = Herald of the Novosibirsk State University*. 2007;7(2):19-27. (in Russian)]

Голубятников В.П., Казанцев М.В. Об одной кусочно-линейной динамической системе, моделирующей генную сеть с переменной обратной связью. *Сиб. журн. чистой и прикл. математики*. 2016;16(4):28-37. DOI 10.17377/PAM.2016.16.404.
[Golubyatnikov V.P., Kazantsev M.V. On a piecewise linear dynamical system that models a gene network with variable feedback. *Sibirskiy Zhurnal Chistoy i Prikladnoy Matematiki = Siberian Journal of Pure and Applied Mathematics*. 2016;16(4):28-37. DOI 10.17377/PAM.2016.16.404. (in Russian)]

Голубятников В.П., Кириллова Н.Е. О циклах в моделях функционирования кольцевых генных сетей. *Сиб. журн. чистой и прикл. математики*. 2018;18(1):54-63. DOI 10.17377/PAM.2018.18.5.
[Golubyatnikov V.P., Kirillova N.E. On cycles in models of functioning of circular gene networks. *Sibirskiy Zhurnal Chistoy i Prikladnoy Matematiki = Siberian Journal of Pure and Applied Mathematics*. 2018;18(1):54-63. DOI 10.17377/PAM.2018.18.5. (in Russian)]

Демиденко Г.В., Колчанов Н.А., Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Фадеев С.И. Математическое моделирование регулярных контуров генных сетей. *Журн. вычисл. математики и мат. физики*. 2004;44(12):2276-2295.
[Demidenko G.V., Kolchanov N.A., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Fadeev S.I. Mathematical modeling of gene networks regulation contours. *Zhurnal Vychislitel'noy Matematiki i Matematicheskoy Fiziki = Computational Mathematics and Mathematical Physics*. 2004;44:2276-2295. (in Russian)]

Жаботинский А.М. Концентрационные автоколебания. М.: Наука, 1974.
[Zhabotinsky A.M. Concentration Auto-oscillations. Moscow: Nauka Publ., 1974. (in Russian)]

Заварзин Г.А. Становление системы биогеохимических циклов. *Палеонтол. журн.* 2003;6:16-24.
[Zavarzin G.A. Establishment of a system of biogeochemical cycles. *Paleontologicheskii Zhurnal = Paleontological Journal*. 2003;6:16-24. (in Russian)]

Заварзин Г.А. Эволюция прокариотной биосферы: «микробы в круговороте жизни»: 120 лет спустя: Чтение им. С.Н. Виноградского. М.: МАКС Пресс, 2011.
[Zavarzin G.A. Evolution of the Prokaryotic Biosphere: "Microbes in the cycle of life". 120 years afterwards: S.N. Winogradsky memorial lectures. Moscow: MAKS Press Publ., 2011. (in Russian)]

Колчанов Н.А., Гончаров С.С., Лихошвай В.А., Иванисенко В.А. Системная компьютерная биология. Новосибирск: СО РАН, 2008.
[Kolchanov N.A., Goncharov S.S., Likhoshvai V.A., Ivanisenko V.A. Computational Systems Biology. Novosibirsk: Publ. House SB RAS, 2008. (in Russian)]

Колчанов Н.А., Игнатьева Е.В., Подколдная О.А., Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г. Генные сети. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):833-850.
[Kolchanov N.A., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. Gene networks. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2):833-850. (in Russian)]

Колчанов Н.А., Матушкин Ю.Г., Фролов А.С. Компьютерный анализ эволюции генетических регуляторных систем. В: Шумный В.К., Маркель А.Л. (ред.). Современные концепции эволюционной генетики. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000;60-75.
[Kolchanov N.A., Matushkin Yu.G., Frolov A.S. Computer analysis of the evolution of genetic regulatory systems. In: Shumny V.K., Markel A.L. (Eds.). Current Concepts of Evolutionary Genetics. Novosibirsk: Institute of Cytology and Genetics SB RAS, 2000; 60-75. (in Russian)]

Кузнецов А.П., Селиверстова Е.С., Трубецков Д.И., Тюрюкина Л.В. Феномен уравнения ван дер Поля. *Изв. вузов. Прикл. нелинейная динамика*. 2014;22(4):3-42. DOI 10.18500/0869-6632-2014-22-4-3-42.
[Kuznetsov A.P., Seliverstova E.S., Trubetskov D.I., Turukina L.V. Phenomenon of the van der Pol equation. *Izvestiya Vysshikh*

- Uchebnykh Zavedeniy. Prikladnaya Nelineynaya Dinamika = Izvestiya VUZ. Applied Nonlinear Dynamics.* 2014;22(4):3-42. DOI 10.18500/0869-6632-2014-22-4-3-42. (in Russian)]
- Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Фадеев С.И. О связи графа генной сети с качественными режимами ее функционирования. *Молекуляр. биология.* 2001;35(6):1080-1087. [Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Fadeev S.I. On the relationship of the gene network graph with the qualitative modes of its functioning. *Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology.* 2001; 35(6):1080-1087. (in Russian)]
- Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г., Фадеев С.И. Задачи теории функционирования генных сетей. *Сиб. журн. индустр. математики.* 2003;6(2):64-80. [Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Fadeev S.I. Problems in the theory of the functioning of genetic networks. *Sibirskii Zhurnal Industrial'noi Matematiki = Journal of Applied and Industrial Mathematics.* 2003;6(2):64-80. (in Russian)]
- Муштакова С.П. Колебательные реакции в химии. *Сорос. образов. журн.* 1997;7:31-36. [Mushtakova S.P. Oscillatory reactions in chemistry. *Sorosovskij Obrazovatelnyj Zhurnal = Soros Educational Journal.* 1997;7:31-36. (in Russian)]
- Перцев Н.В., Логинов К.К. Стохастическая модель динамики биологического сообщества в условиях потребления особями вредных пищевых ресурсов. *Мат. биология и биоинформатика.* 2011;6(1):1-13. [Pertsev N.V., Loginiv K.K. Stochastic model of dynamics of a biological community under conditions of consumption of harmful food resources by individuals. *Matematicheskaya Biologiya i Bioinformatika = Mathematical Biology and Bioinformatics.* 2011;6(1): 1-13. (in Russian)]
- Ризниченко Г.Ю. Лекции по математическим моделям в биологии. М.; Ижевск, 2002. [Riznichenko G.Yu. Lectures on Mathematical Models in Biology. Moscow-Izhevsk, 2002. (in Russian)]
- Ризниченко Г.Ю. Математическое моделирование биологических процессов. Модели в биофизике и экологии. М.: Изд-во Юрайт, 2017. [Riznichenko G.Yu. Mathematical Modeling of Biological Processes. Models in Biophysics and Ecology. Moscow: Urait Publ., 2017. (in Russian)]
- Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическое моделирование в биофизике. М.: Наука, 1975. [Romanovsky Yu.M., Stepanova N.V., Chernavsky D.S. Mathematical Modeling in Biophysics. Moscow: Nauka Publ., 1975. (in Russian)]
- Фадеев С.И., Лихошвай В.А. О гипотетических генных сетях. *Сиб. журн. индустр. математики.* 2003;6(3):134-153. [Fadeev S.I., Likhoshvai V.A. On hypothetical gene networks. *Sibirskii Zhurnal Industrial'noi Matematiki = Journal of Applied and Industrial Mathematics.* 2003;6(3):134-153. (in Russian)]
- Филд Р., Бургер М. Колебания и бегущие волны в химических системах. М.: Мир, 1988. [Field R., Burger M. (Eds.) Oscillations and Traveling Waves in Chemical Systems. Chichester: John Wiley Publ., 1985. (Russ. ed.: Fild R., Burger M. Kolebaniya i begushchie volny v khimicheskikh sistemakh. Moscow: Mir Publ., 1988. (in Russian))]
- Четвериков С.С. Волны жизни. *Рус. орнитол. журн.* 2009;18:1822-1829. [Chetverikov S.S. The waves of life. *Russkii Ornitologicheskii Zhurnal = The Russian Journal of Ornithology.* 2009;18:1822-1829. (in Russian)]
- Шноль С.Э. Космофизические факторы в случайных процессах. Stockholm (Швеция): Svenska fysikarkivet (the Swedish physics archive), 2009. [Shnol S.E. Kosmofysiska Faktorer i Slumpmassiga Processer. Stockholm (Sweden): Svenska fysikarkivet (the Swedish physics archive), 2009. (in Russian)]
- Шноль Э.Э. (науч. ред.). Исследования по математической биологии: Сб. науч. трудов, посвященный памяти А.Д. Базыкина. Пушкинский науч. центр РАН, 1996. [Shnol E.E. (Ed.). Studies in Mathematical Biology: Collection of scientific papers in memoriam A.D. Bazykin. Pushchino Scientific Center RAS, 1996. (in Russian)]
- Allen G.J., Chu S.P., Schumacher K., Shimazaki C.T., Vafeados D., Kemper A., Hawke S.D., Tallman G., Tsien R.Y., Harper J.F., Chory J., Schroeder J.I. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science.* 2000;289:2338-2342. DOI 10.1126/science.289.5488.2338.
- Ananko E.A. GeneNet: a database on structure and functional organisation of gene networks. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:398-401. DOI 10.1093/nar/30.1.398.
- Ashkenazy Y., Ivanov P.C., Havlin S., Peng C.K., Goldberger A.L., Stanley H.E. Magnitude and sign correlations in heartbeat fluctuations. *Phys. Rev. Lett.* 2001;86:1900-1903. DOI 10.1103/PhysRevLett.86.1900.
- Bashkirtseva I., Ryashko L. Stochastic sensitivity and variability of glycolytic oscillations in the randomly forced Sel'kov model. *Eur. Phys. J. B.* 2017;90:17. DOI 10.1140/epjb/e2016-70674-4.
- Becks L., Arndt H. Different types of synchrony in chaotic and cyclic communities. *Nat. Commun.* 2013;4:1359. DOI 10.1038/ncomms2355.
- Bier M., Bakker B.M., Westerhoff H.V. How yeast cells synchronize their glycolytic oscillations: a perturbation analytic treatment. *Biophys. J.* 2000;78:1087-1093. DOI 10.1016/S0006-3495(00)76667-7.
- Boccalandro H.E., González C.V., Wunderlin D.A., Silva M.F. Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, fluctuate during the day/night cycle in *Vitis vinifera* cv Malbec: evidence of its antioxidant role in fruits. *J. Pineal Res.* 2011;51:226-232. DOI 10.1111/j.1600-079X.2011.00884.x.
- Boiteux A., Goldbeter A., Hess B. Control of oscillating glycolysis of yeast by stochastic, periodic, and steady source of substrate: a model and experimental study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975;72:3829-3833. DOI 10.1073/pnas.72.10.3829.
- Cardon S.Z., Iberall A.S. Oscillations in biological systems. *Biosystems.* 1970;3:237-249. DOI 10.1016/0303-2647(70)90004-3.
- Caspi R., Billington R., Ferrer L., Foerster H., Fulcher C.A., Keseler I.M., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Mueller L.A., Ong Q., Paley S., Subhraveti P., Weaver D.S., Karp P.D. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D471-D480. DOI 10.1093/nar/gkv1164.
- Chen W.W., Niepel M., Sorger P.K. Classic and contemporary approaches to modeling biochemical reactions. *Genes Dev.* 2010;24:1861-1875. DOI 10.1101/gad.1945410.
- Cooper S. Bacterial Growth and Division. Acad. Press, Inc., 1991.
- Cowan A.E., Moraru I.I., Schaff J.C., Slepchenko B.M., Loew L.M. Spatial modeling of cell signaling networks. In: Asthagiri A.R., Arkin A.P. (Eds.). *Methods in Cell Biology.* Acad. Press, 2012;195-221. DOI 10.1016/B978-0-12-388403-9.00008-4.
- Dupont G., Berridge M.J., Goldbeter A. Signal-induced Ca²⁺ oscillations: properties of a model based on Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Cell Calcium.* 1991;12:73-85. DOI 10.1016/0143-4160(91)90010-C.
- Dupont G., Goldbeter A. Theoretical insights into the origin of signal-induced calcium oscillations. In: *Cell to Cell Signalling.* Elsevier, 1989;461-474. DOI 10.1016/B978-0-12-287960-9.50040-X
- Dupont G., Goldbeter A. One-pool model for Ca²⁺ oscillations involving Ca²⁺ and inositol 1,4,5-trisphosphate as co-agonists for Ca²⁺ release. *Cell Calcium.* 1993;14:311-322. DOI 10.1016/0143-4160(93)90052-8.
- Elowitz M.B., Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature.* 2000;403:335-338. DOI 10.1038/35002125.
- Erdakov L.N., Moroldov I.V. Variability of long-term cyclicality in the population dynamics of the northern red-backed vole (*Myodes Ru-*

- tilus (Pallas, 1779)). *Principles Ecol.* 2017;25:26-36. DOI 10.15393/jl.art.2017.7342.
- Funahashi A., Morohashi M., Kitano H., Tanimura N. CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *Biosilico.* 2003;1:159-162. DOI 10.1016/S1478-5382(03)02370-9.
- Garde A.H., Hansen A.M., Skovgaard L.T., Christensen J.M. Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin A_{1c}, IgA, prolactin, and free testosterone in healthy women. *Clin. Chem.* 2000;46(4): 551-559. DOI 10.1093/clinchem/46.4.551.
- Goldbeter A. Computational approaches to cellular rhythms. *Nature.* 2002;420:238-245. DOI 10.1038/nature01259.
- Goldbeter A. Oscillatory enzyme reactions and Michaelis–Menten kinetics. *FEBS Lett.* 2013;587:2778-2784. DOI 10.1016/j.febslet.2013.07.031.
- Goldbeter A., Dupont G., Berridge M.J. Minimal model for signal-induced Ca²⁺ oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990;87:1461-1465. DOI 10.1073/pnas.87.4.1461.
- Goldbeter A., Lefever R. Dissipative structures for an allosteric model. *Biophys. J.* 1972;12:1302-1315. DOI 10.1016/S0006-3495(72)86164-2.
- Golubiatnikov V.P., Golubiatnikov I.V., Likhoshvai V.A. On the existence and stability of cycles in five-dimensional models of gene networks. *Numer. Anal. Appl.* 2010;3:329-335. DOI 10.1134/S199542391004004X.
- Goodwin B.C. Oscillatory behavior in enzymatic control processes. *Adv. Enzyme Regul.* 1965;3:425-437. DOI 10.1016/0065-2571(65)90067-1.
- Hardin P.E., Hall J.C., Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature.* 1990;343:536-540. DOI 10.1038/343536a0.
- Hecker M., Lambeck S., Toepfer S., van Someren E., Guthke R. Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models – a review. *Biosystems.* 2009;96:86-103. DOI 10.1016/j.biosystems.2008.12.004.
- Higgins J. A chemical mechanism for oscillation of glycolytic intermediates in yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1964;51:989-994. DOI 10.1073/pnas.51.6.989.
- Higgins J. The theory of oscillating reactions – kinetics symposium. *Ind. Eng. Chem.* 1967;59:18-62. DOI 10.1021/ie50689a006.
- Holtum J.A.M., Winter K. Photosynthetic CO₂ uptake in seedlings of two tropical tree species exposed to oscillating elevated concentrations of CO₂. *Planta.* 2003;218:152-158. DOI 10.1007/s00425-003-1089-1.
- Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. COPASI – a Complex Pathway Simulator. *Bioinformatics.* 2006;22:3067-3074. DOI 10.1093/bioinformatics/btl485.
- Hucka M., Finney A., Sauro H.M., Bolouri H., Doyle J.C., Kitano H., and the rest of the SBML Forum: Arkin A.P., Bornstein B.J., Bray D., Cornish-Bowden A., Cuellar A.A., Dronov S., Gilles E.D., Ginkel M., Gor V., Goryanin I.I., Hedley W.J., Hodgman T.C., Hofmeyr J.-H., Hunter P.J., Juty N.S., Kasberger J.L., Kremling A., Kummer U., Le Novère N., Loew L.M., Lucio D., Mendes P., Minch E., Mjolsness E.D., Nakayama Y., Nelson M.R., Nielsen P.F., Sakurada T., Schaff J.C., Shapiro B.E., Shimizu T.S., Spence H.D., Stelling J., Takahashi K., Tomita M., Wagner J., Wang J. The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics.* 2003;19:524-531. DOI 10.1093/bioinformatics/btg015.
- Johnson K.A. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. *FEBS Lett.* 2013;587:2753-2766. DOI 10.1016/j.febslet.2013.07.012.
- Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:27-30. DOI 10.1093/nar/28.1.27.
- Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Lashin S.A., Ree N.A., Timonov V.S., Ratushnyi A.V., Khlebodarova T.M., Likhoshvai V.A. MAMMOTH: a new database for curated mathematical models of biomolecular systems. *J. Bioinf. Comput. Biol.* 2018;16:1740010. DOI 10.1142/S0219720017400108.
- Keseler I.M., Mackie A., Santos-Zavaleta A., Billington R., Bonavides-Martínez C., Caspi R., Fulcher C., Gama-Castro S., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Muñoz-Rascado L., Ong Q., Paley S., Peralta-Gil M., Subhraveti P., Velázquez-Ramírez D.A., Weaver D., Collado-Vides J., Paulsen I., Karp P.D. The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D543-D550. DOI 10.1093/nar/gkw1003.
- Kraus M., Wolf Björn, Wolf Bernhard. Crosstalk between cellular morphology and calcium oscillation patterns. Insights from a stochastic computer model. *Cell Calcium.* 1996;19:461-472. DOI 10.1016/S0143-4160(96)90055-X.
- Lahav G., Rosenfeld N., Sigal A., Geva-Zatorsky N., Levine A.J., Elowitz M.B., Alon U. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat. Genet.* 2004;36:147-150. DOI 10.1038/ng1293.
- Lavrentovich M., Hemkin S. A mathematical model of spontaneous calcium(II) oscillations in astrocytes. *J. Theor. Biol.* 2008;251:553-560. DOI 10.1016/j.jtbi.2007.12.011.
- Le Novère N., Bornstein B., Broicher A., Courtot M., Donizelli M., Dharuri H., Li L., Sauro H., Schilstra M., Shapiro B., Snoep J.L., Hucka M. BioModels Database: a free, centralized database of curated, published, quantitative kinetic models of biochemical and cellular systems. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D689-D691. DOI 10.1093/nar/gkj092.
- Le Novère N., Hucka M., Mi H., Moodie S., Schreiber F., Sorokin A., Demir E., Wegner K., Aladjem M.I., Wimalaratne S.M., Bergman F.T., Gauges R., Ghazal P., Kawaji H., Li L., Matsuoka Y., Villéger A., Boyd S.E., Calzone L., Courtot M., Dogrusoz U., Freeman T.C., Funahashi A., Ghosh S., Jouraku A., Kim S., Kolpakov F., Luna A., Sahle S., Schmidt E., Watterson S., Wu G., Goryanin I., Kell D.B., Sander C., Sauro H., Snoep J.L., Kohn K., Kitano H. The Systems Biology Graphical Notation. *Nat. Biotechnol.* 2009;27: 735-741. DOI 10.1038/nbt.1558.
- Likhoshvai V.A., Fadeev S.I., Matushkin Y.G. The global operation modes of gene networks determined by the structure of negative feedbacks. In: *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure.* Boston, MA: Springer US, 2004;319-329. DOI 10.1007/978-1-4419-7152-4_34.
- Likhoshvai V.A., Golubiatnikov V.P., Khlebodarova T.M. Limit cycles in models of circular gene networks regulated by negative feedback loops. *BMC Bioinform.* 2020;21:255. DOI 10.1186/s12859-020-03598-z.
- Lotka A.J. Contribution to the theory of periodic reactions. *J. Phys. Chem.* 1910;14:271-274. DOI 10.1021/j150111a004.
- Lotka A.J. Undamped oscillations derived from the law of mass action. *J. Am. Chem. Soc.* 1920;42:1595-1599. DOI 10.1021/ja01453a010.
- Malik-Sheriff R.S., Glont M., Nguyen T.V.N., Tiwari K., Roberts M.G., Xavier A., Vu M.T., Men J., Maire M., Kananathan S., Fairbanks E.L., Meyer J.P., Arankalle C., Varusai T.M., Knight-Schrijver V., Li L., Dueñas-Roca C., Dass G., Keating S.M., Park Y.M., Buso N., Rodriguez N., Hucka M., Hermjakob H. BioModels – 15 years of sharing computational models in life science. *Nucleic Acids Res.* 2019;48:407-415. DOI 10.1093/nar/gkz1055.
- Meyer T. Calcium spiking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1991; 20:153-174. DOI 10.1146/annurev.biophys.20.1.153.
- Meyer T., Stryer L. Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:5051-5055. DOI 10.1073/pnas.85.14.5051.
- Michaelis L., Menten M.L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 1913;49:333-369.
- Novák B., Tyson J.J. Design principles of biochemical oscillators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9:981-991. DOI 10.1038/nrm2530.

- Ocone A., Millar A.J., Sanguinetti G. Hybrid regulatory models: a statistically tractable approach to model regulatory network dynamics. *Bioinformatics*. 2013;29:910-916. DOI 10.1093/bioinformatics/btt069.
- Pasti L., Volterra A., Pozzan T., Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. *J. Neurosci*. 1997;17:7817-7830. DOI 10.1523/jneurosci.17-20-07817.1997.
- Podkolodnaya O.A., Tverdokhlebova N.N., Podkolodnyy N.L. Computational modeling of the cell-autonomous mammalian circadian oscillator. *BMC Syst. Biol.* 2017;11:27-42. DOI 10.1186/s12918-016-0379-8.
- Podkolodnyy N.L., Tverdokhlebova N.N., Podkolodnaya O.A. Analysis of the circadian rhythm of biological processes in mouse liver and kidney. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(8):903-910. DOI 10.18699/VJ17.311 (in Russian)
- Price J.L., Blau J., Rothenfluh A., Abodeely M., Kloss B., Young M.W. *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*. 1998;94:83-95. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81224-6.
- Prives C. Signaling to p53. *Cell*. 1998;95:5-8. DOI 10.1016/S0092-8674(00)81774-2.
- Rompala K., Rand R., Howland H. Dynamics of three coupled van der Pol oscillators with application to circadian rhythms. *Commun. Nonlinear Sci. Numer. Simul.* 2007;12:794-803. DOI 10.1016/j.cnsns.2005.08.002.
- Ryashko L. Sensitivity analysis of the noise-induced oscillatory multistability in Higgins model of glycolysis. *Chaos*. 2018;28. DOI 10.1063/1.4989982.
- Schaff J., Fink C.C., Slepchenko B., Carson J.H., Loew L.M. A general computational framework for modeling cellular structure and function. *Biophys. J.* 1997;73:1135-1146. DOI 10.1016/S0006-3495(97)78146-3.
- Sel'kov E.E. Self-oscillations in glycolysis. 1. A simple kinetic model. *Eur. J. Biochem.* 1968;4:79-86. DOI 10.1111/j.1432-1033.1968.tb00175.x.
- Siwicki K.K., Eastman C., Petersen G., Rosbash M., Hall J.C. Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron*. 1988;1:141-150. DOI 10.1016/0896-6273(88)90198-5.
- Smolen P., Baxter D.A., Byrne J.H. Mathematical modeling of gene networks. *Neuron*. 2000;26:567-580. DOI 10.1016/S0896-6273(00)81194-0.
- Struyf E., Smis A., Van Damme S., Meire P., Conley D.J. The global biogeochemical silicon cycle. *Silicon*. 2009;1:207-213. DOI 10.1007/s12633-010-9035-x.
- Tyson J.J., Chen K.C., Novak B. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003;15:221-231. DOI 10.1016/S0955-0674(03)00017-6.
- Tyson J.J., Laomettachit T., Kraikivski P. Modeling the dynamic behavior of biochemical regulatory networks. *J. Theor. Biol.* 2019;462: 514-527. DOI 10.1016/j.jtbi.2018.11.034.
- Tyson J.J., Novák B. Functional motifs in biochemical reaction networks. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2010;61:219-240. DOI 10.1146/annurev.physchem.012809.103457.
- Van Cappellen P. Biomineralization and global biogeochemical cycles. *Rev. Mineral. Geochem.* 2003;54:357-381. DOI 10.2113/0540357.
- van der Pol B., van der Mark J. The heartbeat considered as a relaxation oscillation, and an electrical model of the heart. *Lond. Edinb. Dubl. Phil. Mag. J. Sci.* 1928;6:763-775. DOI 10.1080/14786441108564652.
- Volterra V. Математическая теория борьбы за существование (пер. П.П. Лазарева). *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*. 1928;8:13-34. DOI 10.3367/UFNr.0008.192801b.0013.
- Walter C. Oscillations in controlled biochemical systems. *Biophys. J.* 1969;9:863-872. DOI 10.1016/S0006-3495(69)86423-4.
- Walter C.F. The occurrence and the significance of limit cycle behavior in controlled biochemical systems. *J. Theor. Biol.* 1970;27:259-272. DOI 10.1016/0022-5193(70)90141-4.
- Wong A.S.Y., Huck W.T.S. Grip on complexity in chemical reaction networks. *Beilstein J. Organic Chem.* 2017;13:1486-1497. DOI 10.3762/bjoc.13.147.
- Yasuma F., Hayano J.I. Respiratory sinus arrhythmia: why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm? *Chest*. 2004;125: 683-690. DOI 10.1378/chest.125.2.683.
- Young M.W., Bargiello T.A., Jackson F.R. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature*. 1984; 312:752-754.

ORCID ID

T.N. Lakhova orcid.org/0000-0003-1729-7712
F.V. Kazantsev orcid.org/0000-0002-5711-7539
S.A. Lashin orcid.org/0000-0003-3138-381X
Yu.G. Matushkin orcid.org/0000-0001-7754-8611

Благодарности. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № 0259-2021-0009 «Системная биология и биоинформатика: реконструкция, анализ и моделирование структурно-функциональной организации и эволюции генов человека, животных, растений и микроорганизмов» и проекта РНФ № 18-14-00293 (визуализация и структурный анализ графов метаболических сетей).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.11.2020. После доработки 15.03.2021. Принята к публикации 18.03.2021.

A hypomorphic mutation in the mouse *Csn1s1* gene generated by CRISPR/Cas9 pronuclear microinjection

A.V. Smirnov¹✉, T.A. Shnaider¹, A.N. Korablev¹, A.M. Yunusova¹, I.A. Serova¹, N.R. Battulin^{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

✉ hldn89@gmail.com; battulin@bionet.nsc.ru

Abstract. Caseins are major milk proteins that have an evolutionarily conserved role in nutrition. Sequence variations in the casein genes affect milk composition in livestock species. Regulatory elements of the casein genes could be used to direct the expression of desired transgenes into the milk of transgenic animals. Dozens of casein alleles have been identified for goats, cows, sheep, camels and horses, and these sequence variants are associated with altered gene expression and milk protein content. Most of the known mutations affecting casein genes' expression are located in the promoter and 3'-untranslated regions. We performed pronuclear microinjections with Cas9 mRNA and sgRNA against the first coding exon of the mouse *Csn1s1* gene to introduce random mutations in the α -casein (*Csn1s1*) signal peptide sequence at the beginning of the mouse gene. Sanger sequencing of the founder mice identified 40 mutations. As expected, mutations clustered around the sgRNA cut site (3 bp from PAM). Most of the mutations represented small deletions (1–10 bp), but we detected several larger deletions as well (100–300 bp). Functionally most mutations led to gene knockout due to a frameshift or a start codon loss. Some of the mutations represented in-frame indels in the first coding exon. Of these, we describe a novel hypomorphic *Csn1s1* (*Csn1s1*^{c.4-SinsTCC}) allele. We measured *Csn1s1* protein levels and confirmed that the mutation has a negative effect on milk composition, which shows a 50 % reduction in gene expression and a 40–80 % decrease in *Csn1s1* protein amount, compared to the wild-type allele. We assumed that mutation affected transcript stability or splicing by an unknown mechanism. This mutation can potentially serve as a genetic marker for low *Csn1s1* expression.

Key words: casein; CRISPR; pronuclear microinjection; hypomorphic mutation.

For citation: Smirnov A.V., Shnaider T.A., Korablev A.N., Yunusova A.M., Serova I.A., Battulin N.R. A hypomorphic mutation in the mouse *Csn1s1* gene generated by CRISPR/Cas9 pronuclear microinjection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):331-336. DOI 10.18699/VJ21.036

Гипоморфная мутация гена *Csn1s1* мыши, полученная пронукулярной микроинъекцией CRISPR/Cas9

А.В. Смирнов¹✉, Т.А. Шнайдер¹, А.Н. Кораблев¹, А.М. Юнусова¹, И.А. Серова¹, Н.Р. Баттулин^{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

✉ hldn89@gmail.com; battulin@bionet.nsc.ru

Аннотация. Казеины – это основные молочные белки, которые играют важную эволюционно консервативную роль в питании. Вариации последовательности казеиновых генов влияют на состав молока у животных. Регуляторные элементы казеиновых генов можно использовать для управления экспрессией желаемых трансгенов в молоке трансгенных животных. Десятки аллелей казеина идентифицированы у коз, коров, овец, верблюдов и лошадей, и эти варианты связаны с измененной экспрессией генов и содержанием молочного белка. Большинство известных мутаций, влияющих на экспрессию генов казеина, находится в промоторных и 3'-нетранслируемых областях. Мы выполнили пронукулярные микроинъекции с мРНК Cas9 и sgRNA против первого кодирующего экзона гена *Csn1s1* мыши, чтобы ввести случайные мутации в последовательность сигнального пептида α -казеина (*Csn1s1*) в начале гена мыши. Секвенирование мышей-основателей по Сэнгеру выявило 40 мутаций. Как и ожидалось, мутации группировались вокруг сайта разреза sgRNA (3 п.н. от PAM). Большинство мутаций представляют собой небольшие делеции (1–10 п.н.), но мы также обнаружили несколько более крупных делеций (100–300 п.н.). Функционально большинство мутаций приводило к нокаутам генов из-за сдвига рамки считывания или потери стартовых кодонов. Некоторые из мутаций представлены инделами в рамках считывания в первом кодирующем экзоне. Из них мы описываем новый гипоморфный аллель *Csn1s1* (*Csn1s1*^{c.4-SinsTCC}). Мы измерили уровни белка *Csn1s1* и подтвердили, что мутация отрицательно влияет на состав молока, который показывает снижение экспрессии гена на 50 % и уменьшение количества белка *Csn1s1* на 40–80 % по сравнению с аллелем дикого типа. Мы предположили, что мутация влияет на стабильность транскрипта или сплайсинг по неизвестному механизму. Эта мутация потенциально может служить генетическим маркером низкой экспрессии *Csn1s1*.

Ключевые слова: казеин; CRISPR; пронукулярная микроинъекция; гипоморфные мутации.

Introduction

Caseins are major milk proteins that have an evolutionary conserved role in nutrition (Rijnkels et al., 2003). Casein locus has been studied for a long time to understand the principle of gene regulation and hormone-induced expression (Rijnkels et al., 2013; Dos Santos et al., 2015; Lee et al., 2017). At the same time, regulatory elements of the casein genes could be used to direct the expression of desired transgenes into milk of transgenic animals (Houdebine, 2009; Kim et al., 2015). This strategy is frequently employed to create “enriched” milk with improved composition (An et al., 2012; Wan et al., 2012; Yuan et al., 2014), or to achieve large scale production of recombinant human proteins in mouse models (Wu et al., 2012; Burkov et al., 2013; Qian et al., 2014) and in livestock species (Kalds et al., 2019). Milk-specific signal peptides are used in biotechnology to enhance recombinant protein secretion during lactation (Yu et al., 2006; Liu et al., 2014; Lu et al., 2019).

During breeding, casein genes acquired many sequence variations that can lead to altered gene expression and are characteristic of some goat and cow breeds (Yue et al., 2011; Fomichev et al., 2012; Guan et al., 2019). Many of these sequence variants could be used as markers for breeding. In dairy industry casein composition is an important milk trait directly influencing quality of dairy products (Sanchez et al., 2018; Cieslak et al., 2019). Hypomorphic casein mutation are also associated with other traits such as litter size (Wang et al., 2018). For example, K. Wang with colleagues showed that 11 bp del in the intron 8 of the goat *Csn1s1* negatively affects the expression of the gene (Wang et al., 2018). Other known hypomorphic mutations are located in the promoter and 3'-untranslated regions (UTRs) of casein genes (Huang et al., 2012; Noce et al., 2016).

Novel CRISPR methods greatly facilitate genome editing in farm animals (Kalds et al., 2019), including targeted transgene integration (Park et al., 2017) and mutation modeling (Li et al., 2017; Zhou et al., 2019). The latter approach has potential to explain the molecular mechanism of how hypomorphic mutations affect milk proteins. In this report, we used CRISPR/Cas9 to create a set of mutations within a signal peptide sequence of the α -casein (*Csn1s1*) gene in mice. One of the mutants was chosen to study effects of a small in-frame insertion on the *Csn1s1* expression during lactation.

Materials and methods

Generation and genotyping of the *Csn1s1* mutant mice.

In vitro transcription and purification of the gRNA were performed with MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) and MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Cas9 mRNA (GeneArt™ CRISPR Nuclease mRNA) was purchased from Thermo Fisher Scientific. 50 ng/μL Cas9 mRNA and 25 ng/μL gRNA (5'-GTGAG GATGAGGAGTTTCA-3') were mixed in RNase-free water, backfilled into an injection needle with positive balancing pressure (Transjector 5246, Eppendorf) and injected into the cytoplasm of zygotes (C57BL/6 × CBA background). After injections, the embryos were cultured for 1 hour in drops of M16 medium at 37 °C and an atmosphere of 5 % CO₂. The viable microinjected zygotes were transplanted the same day

into oviducts of pseudopregnant CD-1 females (0.5 days after coitus). Isoflurane inhalation anesthesia was applied in these experiments.

Mutations were detected using PCR and Sanger sequencing of the target region of the *Csn1s1* exon 2 (Supplementary 1)¹. Primers for PCR were as follows: 5'-GCGCATAACTAAG CATCTTATGCT-3' (forward primer), 5'-TGACTTGGAG TTTAGATTTGGACA-3' (reverse primer). Selected male mice founders were crossed with C57BL/6 females. For mutation c.4-5insTCC described in this paper, founder male was crossed with two F₁ heterozygous daughters. Offspring was genotyped and two sibling females were selected for each group (wt, heterozygous or homozygous mutation) for further analysis.

All experiments were conducted at the Centre for Genetic Resources of Laboratory Animals at the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (RFMEFI61914X0005 and RFMEFI61914X0010). All experiments were performed in accordance with protocols and guidelines approved by the Animal Care and Use Committee Federal Research Centre of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS operating under standards set by regulations documents Federal Health Ministry (2010/708n/RF), NRC and FELASA recommendations. Experimental protocols were approved by the Bioethics Review Committee of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS.

Droplet digital PCR analysis. Total cellular RNA was extracted from mouse mammary glands at day 8 of lactation using TRI Reagent (Sigma-Aldrich). 1 μg of total RNA was used to generate cDNA in a 20 μl reaction using RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific) with random hexamer primers according to the manufacturer's instructions. Droplet Digital PCR (ddPCR) was performed using a QX100 system (Bio-Rad) with primers and probes specific for the *Csn1s1* and *Csn2* mouse transcripts (Supplementary 2). The primers and probes sequences were as follows: 5'-TGTAGTGGAT CAGGCACTGG-3' (*Csn1s1* forward primer), 5'-TCCTTG GAGACAATGGGCTT-3' (*Csn1s1* reverse primer), 5'-HEX-CCAGTTCTCTGTTCAGCCCTTCCCACA-BHQ2-3' (*Csn1s1* probe), 5'-AGGACTTGACAGCCATGAAGG-3' (*Csn2* forward primer), 5'-ATGTTCAACAGATTCCCTC ACTGGA-3' (*Csn2* reverse primer), 5'-FAM-ATCCTCGCC TGCCTTGTGGCCCTTGC-BHQ1-3' (*Csn2* probe). ddPCR reactions were set in 20 μl volumes containing 1× ddPCR™ Supermix for Probes (no dUTP), 900 nM primers and 250 nM probes, and 1 μl of 5000-fold diluted cDNA. ddPCR reactions for each sample were performed in duplicates. PCR was conducted according to the following program: 95 °C for 10 min, then 40 cycles of 95 °C for 30 s and 61 °C for 1 min, with a ramp rate of 2 °C per second, and a final step at 98 °C for 5 min. The results were analyzed using QuantaSoft software (Bio-Rad). Concentrations of cDNA copies of *Csn1s1* and *Csn2* were derived from ddPCR and relative expression of *Csn1s1* to *Csn2* was calculated for each animal.

Milk and mammary gland protein analysis. Milk was obtained from narcotized female mice at day 8 of lactation after oxytocin administration (Uusi-Oukari et al., 1997). The milk was collected with a pipette attached to an aspiration

¹ Supplementary materials 1 and 2 are available at: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2021-25/appx8.pdf>

device, transferred into a microcentrifuge tube and stored at -80°C . Inguinal mammary glands (MGs) were extracted from the same (euthanized) mice and stored at -80°C . For protein extraction MGs were minced in Dounce homogenizers, resuspended in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 15 mM Tris pH 7.4) with protease inhibitor cocktail (1x Complete ULTRA (Roche), 1x PhosSTOP (Roche), 5 mM NaF (Sigma)). The lysates were incubated on ice for 30 min and then centrifuged at 4°C for 10 min at 10000 g. Supernatant was sonicated and stored at -80°C . Total protein concentrations for milk and MG lysates were determined with Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. To prepare samples for SDS-PAGE, milk or MG protein samples were mixed with RIPA and SDS-PAGE loading buffer (Bio-Rad) to a final concentration of $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ and heated at 65°C for 20 minutes. The samples (25 μg) were separated on a 12 % polyacrylamide gel and stained with Coomassie Blue G-250. ThermoFisher PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa) was used as a protein molecular weight marker. *Csn1s1*, albumin and total protein concentrations were evaluated using Quantity One (Bio-Rad) and ImageJ software.

Coomassie-stained gel was used for wet transfer of the proteins to PVDF membrane (0.45 μm Immobilon-P, Merck). The membrane was blocked with 5 % milk in TBST (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) for 2 hours and incubated with primary mouse anti-*Csn1s1* antibodies (1:1000) (sc-373711, Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C . Next day membrane was repeatedly washed with TBST and incubated with secondary mouse HRP-antibodies (1:1000) (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology) at 25°C for 2 hours. Immunodetection was performed with ECL substrate solution (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Results

Generation of the *Csn1s1* mutant mice

We performed pronuclear microinjections with Cas9 mRNA and sgRNA against the first coding exon of the mouse *Csn1s1* gene (Fig. 1, a). Cas9-induced mutations in this region could potentially affect signal peptide coding sequence and lead to altered milk composition. We screened founder mice by

Sanger sequencing and identified multiple random mutations at the Cas9 cut site (presented in Supplementary 1). The sgRNA targeted the *Csn1s1* site with high efficiency as we detected 41 mutant alleles, 4–5 mosaic alleles (additional background signal) and only 4–5 wild-type alleles in 20 founder mice ($\sim 90\%$ allele mutation efficiency). As expected, mutations clustered around the sgRNA cut site (3 bp from PAM). Most of the mutations represented small deletions (1–10 bp), but we detected several larger deletions as well (100–300 bp). Of note, some of the unique mutation variants had increased incidence rate. For example, 12 bp deletion (GAAACTCCTCAT) arose independently four times and another 10 bp deletion (CCATGAAACT) – three times (see Supplementary 1). We suspect this bias towards some variants is caused by microhomology-mediated end-joining (MMEJ), since these two mutations are flanked with 3 and 2 similar nucleotides (CAT and CC, respectively) (see Supplementary 1). Although mutations were mostly deleterious for the gene expression and led to a *Csn1s1* knockout (KO) by frameshift, several in-frame mutation variants resulted in subtle changes in signal peptide coding sequence without KO (see Supplementary 1). We selected one of the mutants, tagged *Csn1s1^{c.4-5insTCC}*, which had a 3 bp insertion following the start codon (see Fig. 1, b). To study gene expression and milk composition we chose 6 female siblings (2 wild-type, 2 heterozygotes, 2 homozygotes) from the *Csn1s1^{c.4-5insTCC}* line for milk and mammary glands collection.

Mutation c.4-5insTCC leads to reduced expression of the *Csn1s1* gene

We estimated the *Csn1s1* gene expression in mammary glands of wild-type and mutant mice at day 8 of lactation using droplet digital PCR (ddPCR). We selected *Csn2* (β -casein) as a reference gene as it has a similar expression profile in mammary gland (see Supplementary 2). ddPCR analysis revealed that *Csn1s1:Csn2* ratio was roughly 1:3 (0.338) in wild-type siblings (Fig. 2), which is in agreement with published data (Yamaji et al., 2013). Heterozygous and homozygous *Csn1s1^{c.4-5insTCC}* siblings showed lower *Csn1s1* expression with ratios around 1:4 (0.248) and 1:6 (0.168), respectively (see Fig. 2), compared to wild-type siblings. We also used females from the parental strains C57BL/6 and CBA as controls for normal caseins level (see Fig. 2). In rare cases, Cas9 activity can provoke rearrangements near the target locus.

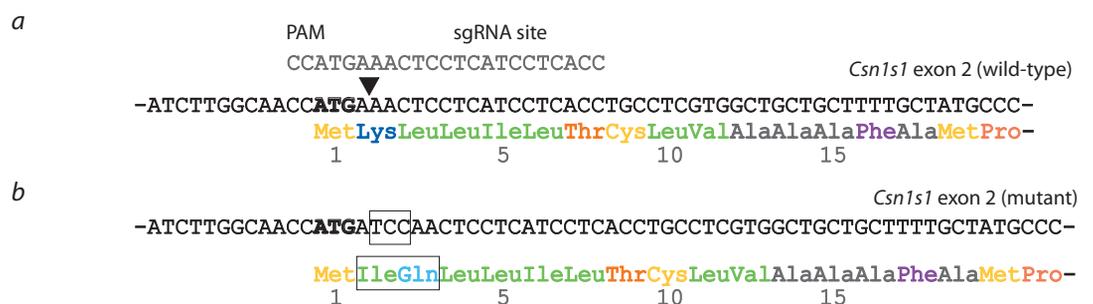


Fig. 1. Generation of the *Csn1s1* mutant mice by CRISPR/Cas9 pronuclear microinjection.

a – sequence of the first coding exon (63 bp) of the *Csn1s1* gene (exon 2, NM_007784.3). Black arrowhead indicates Cas9 cleavage site. Complementary 20 bp sgRNA sequence with PAM is shown above; b – sequence of the mutated *Csn1s1* exon with a 3 bp insertion in the second codon (framed). Start codon (ATG) is highlighted.

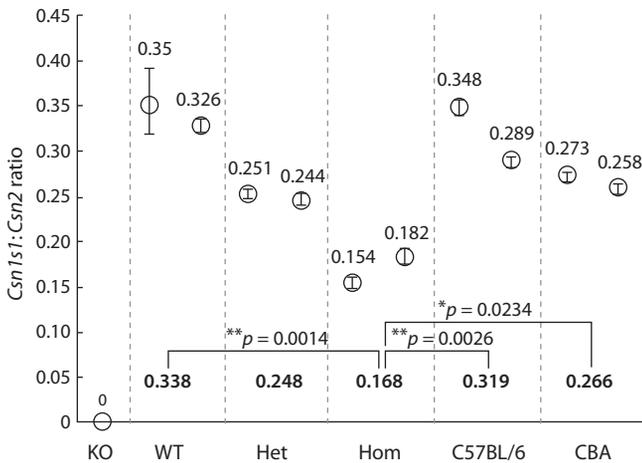


Fig. 2. Droplet digital PCR analysis of the *Csn1s1* and *Csn2* expression in mammary gland. Data presented as ratios of *Csn1s1/Csn2* transcripts.

Error bars – standard deviations. Bold numbers at the bottom represent mean ratios for two females of each group. KO – *Csn1s1* knockout female; WT, Het, Hom – siblings with corresponding mutation genotype; C57BL/6, CBA – females from the inbred strains. Statistics: one-way ANOVA.

We sequenced mutation-flanking regions, including the *Csn1s1* promoter and surrounding introns (2.3 kb + 1.1 kb) from homozygous mice (data not shown). We also sequenced top two off-targets for the *Csn1s1* sgRNA in the F0 founder (Chr1:24388301; Chr4:140044179). No mutations were found in the examined sequences. Thus, we could confirm that the 3 bp in-frame insertion in the first coding exon led to a 30–50 % decrease in the *Csn1s1* gene expression.

Milk protein composition in c.4-5insTCC mice

We measured *Csn1s1* protein levels and confirmed that mutation has a negative effect on milk composition. We collected milk and mammary glands from lactating females at the day 8 of lactation. *Csn1s1* knockout mouse was taken from another experiment (“KO”) as additional control for the *Csn1s1* levels. Separation of milk proteins on 12 % SDS-PAGE resulted in a typical band pattern for mouse milk (Fig. 3, a). In wild-type mice, *Csn1s1* represents a major protein fraction and corresponds to approx. 30 % of total milk protein (Kolb et al., 2011). In homozygous mutants, loss of *Csn1s1* could be observed both at the Coomassie-stained gel (see Fig. 3, a) and after western blotting (see Fig. 3, b). *Csn1s1* levels fell down to 30 % in homozygotes, both for milk and for mammary gland lysates (see Fig. 3, c). However, exact ratios varied depending on the control protein band used for calculations. For instance, we performed the following calculations for the milk *Csn1s1*: *Csn1s1* (gel) vs total protein (gel) – 40 % reduction; *Csn1s1* (gel) vs albumin (gel) – 70 % reduction; *Csn1s1* (western blot membrane) vs total protein (gel) – 80 % reduction. This effect was even more pronounced in mammary gland lysates (intracellular casein levels): *Csn1s1* (western blot membrane) vs total gel – 80 % reduction.

Discussion

We report a novel in-frame *Csn1s1* hypomorphic mutation that leads to a 50 % gene expression decrease in mice. In most cases, mutation effect is tied to disruption of a regulatory element (enhancer, promoter, UTR, miRNA site) (Hogg, Harries, 2014). Frame-shifting indels in the coding sequence could initiate transcript surveillance pathway called non-

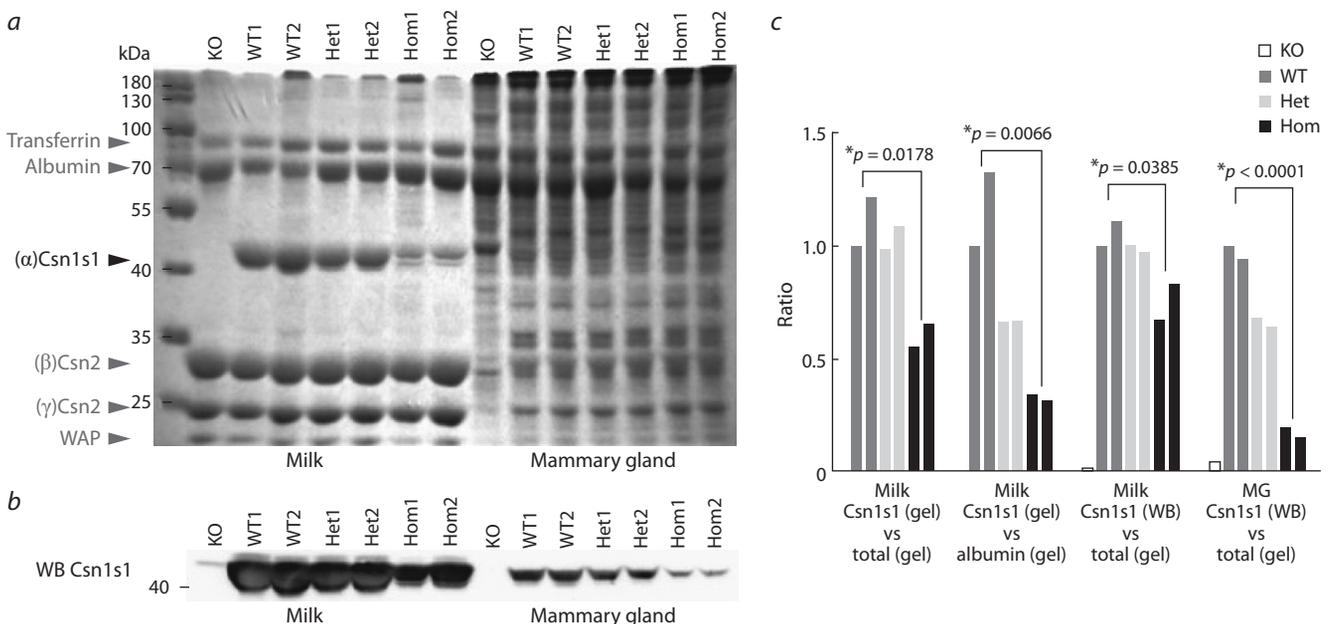


Fig. 3. Detection of the *Csn1s1* protein in milk and mammary glands of the mutant mice.

a – coomassie-stained 12 % SDS-polyacrylamide gel analysis of the whole milk and mammary gland lysates from wild-type (WT1, WT2), heterozygous (Het1, Het2) and homozygous (Hom1, Hom2) *Csn1s1* mutant mice. KO – the *Csn1s1* knockout mice. ThermoFisher PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa) was used as a protein molecular weight marker. Major milk proteins are indicated with arrows. *Csn1s1* protein expected size – 43 kDa; b – Western blot of the same Coomassie-stained gel transferred to a PVDF membrane; c – quantitation of *Csn1s1* protein in the milk of mutant mice using data from Fig. 3, a and b. Intensity of the *Csn1s1* protein band was calculated in relation to the whole milk protein signal (total protein). MG – mammary gland. ImageJ software was used for analysis. Statistics: one-way ANOVA, *p*-values shown for WT vs homozygotes comparisons. One of the WT controls (WT1) was set to 1 (100 %).

sense-mediated mRNA decay (NMD) (Popp, Maquat, 2016; Lindeboom et al., 2019). Alternatively, in-frame mutations can lead to exon removal by alternative splicing (Mucaki et al., 2020; Thompson et al., 2020). Essentially, exon skipping could be promoted by internal exon splicing enhancers and suppressors (ESEs and ESSs) which are hard to predict (Sterne-Weiler, Sanford, 2014; Tuladhar et al., 2019), unlike typical splice site mutations (Cartegni et al., 2002). In our mutant mice, promoter had no alterations as the mutation happened in the coding sequence, quite far from a transcription start site. We assumed that it affected transcript stability or splicing by unknown mechanism. It should also be noted that mutated *Csn1s1* protein was still secreted in milk, thus the function of N-terminal signal peptide was not critically affected by the mutation.

Conclusion

We demonstrated that CRISPR/Cas9 approach could be conveniently exploited to induce a spectrum of mutations in the *Csn1s1* gene either by random mutagenesis, or, ideally, by a set of single-stranded oligo DNA nucleotides (ssODNs). Our results warn that careful examination of the gene's expression is required in addition to protein analysis.

References

An L.Y., Yuan Y.G., Yu B.L., Yang T.J., Cheng Y. Generation of human lactoferrin transgenic cloned goats using donor cells with dual markers and a modified selection procedure. *Theriogenology*. 2012; 78:1303-1311. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.05.027.

Burkov I.A., Serova I.A., Battulin N.R., Smirnov A.V., Babkin I.V., Andreeva L.E., Dvoryanchikov G.A., Serov O.L. Expression of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene under control of the 5'-regulatory sequence of the goat alpha-S1-casein gene with and without a MAR element in transgenic mice. *Transgenic Res.* 2013;22:949-964. DOI 10.1007/s11248-013-9697-4.

Cartegni L., Chew S.L., Krainer A.R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* 2002;3(4):285-298. DOI 10.1038/nrg775. PMID 11967553.

Cieslak J., Wodas L., Borowska A., Pawlak P., Czyzak-Runowska G., Wojtowski J., Puppel K., Kuczynska B., Mackowski M. 5'-flanking variants of equine casein genes (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *CSN3*) and their relationship with gene expression and milk composition. *J. Appl. Genet.* 2019;60(1):71-78. DOI 10.1007/s13353-018-0473-2.

Dos Santos C.O., Dolzhenko E., Hodges E., Smith A.D., Hannon G.J. An epigenetic memory of pregnancy in the mouse mammary gland. *Cell Rep.* 2015;11:1102-1109. DOI 10.1016/j.celrep.2015.04.015.

Fomichev K.A., Sazanova A.L., Malewski T., Kaminski S., Sazanov A.A. Associations between two novel rSNPs in 5'-flanking region of the bovine casein gene cluster and milk performance traits. *Gene.* 2012;496:49-54. DOI 10.1016/j.gene.2011.12.038.

Guan D., Marmol-Sánchez E., Cardoso T.F., Such X., Landi V., Tawari N.R., Amills M. Genomic analysis of the origins of extant casein variation in goats. *J. Dairy Sci.* 2019;102:5230-5241. DOI 10.3168/jds.2018-15281.

Hogg D.R., Harries L.W. Human genetic variation and its effect on miRNA biogenesis, activity and function. *Biochem. Soc. Trans.* 2014; 42(4):1184-1189. DOI 10.1042/BST20140055. PMID 25110023.

Houdebine L.M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2009;32:107-121. DOI 10.1016/j.cimid.2007.11.005.

Huang W., Peñagaricano F., Ahmad K.R., Lucey J.A., Weigel K.A., Khatib H. Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2012;95:440-449. DOI 10.3168/jds.2011-4757.

Kalds P., Zhou S., Cai B., Liu J., Wang Y., Petersen B., Sonstegard T., Wang X., Chen Y. Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR Era. *Front. Genet.* 2019;10:750. DOI 10.3389/fgene.2019.00750. eCollection2019.

Kim J.J., Yu J., Bag J., Bakovic M., Cant J.P. Translation attenuation via 3' terminal codon usage in bovine *csn1s2* is responsible for the difference in α_{s2} - and β -casein profile in milk. *RNA Biol.* 2015;12: 354-367. DOI 10.1080/15476286.2015.1017231.

Kolb A.F., Huber R.C., Lillico S.G., Carlisle A., Robinson C.J., Neil C., Petrie L., Sorensen D.B., Olsson I.A., Whitelaw C.B. Milk lacking α -casein leads to permanent reduction in body size in mice. *PLoS One.* 2011;6:e21775. DOI 10.1371/journal.pone.0021775.

Lee H.K., Willi M., Wang C., Yang C.M., Smith H.E., Liu C., Hennighausen L. Functional assessment of CTCF sites at cytokine-sensing mammary enhancers using CRISPR/Cas9 gene editing in mice. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:4606-4618. DOI 10.1093/nar/gkx185.

Li W.R., Liu C.X., Zhang X.M., Chen L., Peng X.R., He S.G., Lin J.P., Han B., Wang L.Q., Huang J.C., Liu M.J. CRISPR/Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep. *FEBS J.* 2017;284:2764-2773. DOI 10.1111/febs.14144.

Lindeboom R.G.H., Vermeulen M., Lehner B., Supek F. The impact of nonsense-mediated mRNA decay on genetic disease, gene editing and cancer immunotherapy. *Nat. Genet.* 2019;51(11):1645-1651. DOI 10.1038/s41588-019-0517-5. Epub 2019 Oct 28. PMID 31659324. PMCID PMC6858879.

Liu H.C., Pai S.Y., Chen H.L., Lai C.W., Tsai T.C., Cheng W.T., Yang S.H., Chen C.M. Recombinant Derp5 allergen with α_{s1} -casein signal peptide secreted in murine milk protects against dust mite allergen-induced airway inflammation. *J. Dairy Sci.* 2014;97:6792-6803. DOI 10.3168/jds.2014-8484.

Lu R., Zhang T., Song S., Zhou M., Jiang L., He Z., Yuan Y., Yuan T., Lu Y., Yan K., Cheng Y. Accurately cleavable goat β -lactoglobulin signal peptide efficiently guided translation of a recombinant human plasminogen activator in transgenic rabbit mammary gland. *Biosci. Rep.* 2019;39:6. DOI 10.1042/BSR20190596.

Mucaki E.J., Shirley B.C., Rogan P.K. Expression changes confirm genomic variants predicted to result in allele-specific, alternative mRNA splicing. *Front. Genet.* 2020;11:109. DOI 10.3389/fgene.2020.00109. PMID 32211018. PMCID PMC7066660.

Noce A., Pazzola M., Dettori M.L., Amills M., Castelló A., Cecchinato A., Bittante G., Vacca G.M. Variations at regulatory regions of the milk protein genes are associated with milk traits and coagulation properties in the Sarda sheep. *Anim. Genet.* 2016;47:717-726. DOI 10.1111/age.12474.

Park K.E., Powell A., Sandmaier S.E., Kim C.M., Mileham A., Donovan D.M., Telugu B.P. Targeted gene knock-in by CRISPR/Cas ribonucleoproteins in porcine zygotes. *Sci. Rep.* 2017;7:42458. DOI 10.1038/srep42458.

Popp M.W., Maquat L.E. Leveraging rules of nonsense-mediated mRNA decay for genome engineering and personalized medicine. *Cell.* 2016;165(6):1319-1322. DOI 10.1016/j.cell.2016.05.053. PMID 27259145. PMCID PMC4924582.

Qian X., Kraft J., Ni Y., Zhao F.Q. Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice. *Sci. Rep.* 2014;4:6465. DOI 10.1038/srep06465.

Rijnkels M., Elnitski L., Miller W., Rosen J.M. Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. *Genomics.* 2003;82:417-432. DOI 10.1016/s0888-7543(03)00114-9.

Rijnkels M., Freeman-Zadrowski C., Hernandez J., Potluri V., Wang L., Li W., Lemay D.G. Epigenetic modifications unlock the milk protein gene loci during mouse mammary gland development and differentiation. *PLoS One.* 2013;8:e53270. DOI 10.1371/journal.pone.0053270.

Sanchez M.P., Wolf V., El Jabri M., Beuvier E., Rolet-Répecaud O., Gaüzère Y., Minéry S., Brochard M., Michenet A., Taussat S.,

- Barbat-Leterrier A., Delacroix-Buchet A., Laithier C., Fritz S., Boichard D. Short communication: Confirmation of candidate causative variants on milk composition and cheesemaking properties in Montbéliarde cows. *J. Dairy Sci.* 2018;101:10076-10081. DOI 10.3168/jds.2018-14986.
- Sterne-Weiler T., Sanford J.R. Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code. *Genome Biol.* 2014;15(1):201. DOI 10.1186/gb4150. PMID 24456648. PMCID PMC4053859.
- Thompson B.A., Walters R., Parsons M.T., Dumenil T., Drost M., Tiersma Y., Lindor N.M., Tavtigian S.V., de Wind N., Spurdle A.B., InSiGHT Variant Interpretation Committee. Contribution of mRNA splicing to mismatch repair gene sequence variant interpretation. *Front. Genet.* 2020;11:798. DOI 10.3389/fgene.2020.00798. PMID 32849802. PMCID PMC7398121.
- Tuladhar R., Yeu Y., Tyler Piazza J., Tan Z., Rene Clemenceau J., Wu X., Barrett Q., Herbert J., Mathews D.H., Kim J., Hyun Hwang T., Lum L. CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat. Commun.* 2019;10(1):4056. DOI 10.1038/s41467-019-12028-5. PMID 31492834. PMCID PMC6731291.
- Uusi-Oukari M., Hyttinen J.M., Korhonen V.P., Västi A., Alhonen L., Jänne O.A., Jänne J. Bovine alpha s1-casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res.* 1997;6:75-84. DOI 10.1023/a:1018461201385.
- Wan Y.J., Zhang Y.L., Zhou Z.R., Jia R.X., Li M., Song H., Wang H.Z., Wang L.Z., Zhang G.M., You J.H., Wang F. Efficiency of donor cell preparation and recipient oocyte source for production of transgenic cloned dairy goats harboring human lactoferrin. *Theriogenology.* 2012;78:583-592. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.03.004.
- Wang K., Yan H., Xu H., Yang Q., Zhang S., Pan C., Chen H., Zhu H., Liu J., Qu L., Lan X. A novel indel within goat *casein alpha S1* gene is significantly associated with litter size. *Gene.* 2018;671:161-169. DOI 10.1016/j.gene.2018.05.119.
- Wu X., Lin Y., Xiong F., Zhou Y., Yu F., Deng J., Huang P., Chen H. The extremely high level expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res.* 2012;21:1359-1366. DOI 10.1007/s11248-012-9612-4.
- Yamaji D., Kang K., Robinson G.W., Hennighausen L. Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B concentration. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:1622-1636. DOI 10.1093/nar/gks1310.
- Yu Z., Meng Q., Yu H., Fan B., Yu S., Fei J., Wang L., Dai Y., Li N. Expression and bioactivity of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic mice. *J. Dairy Sci.* 2006;89:2911-2918. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(06)72563-2.
- Yuan Y.G., An L., Yu B., Song S., Zhou F., Zhang L., Gu Y., Yu M., Cheng Y. Expression of recombinant human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic goats using a hybrid promoter/enhancer. *J. Anal. Method. Chem.* 2014;281031. DOI 10.1155/2014/281031.
- Yue X.P., Zhang X.M., Wang W., Ma R.N., Deng C.J., Lan X.Y., Chen H., Li F., Xu X.R., Ma Y., Lei C.Z. The *CSN1S1* N and F alleles identified by PCR-SSCP and their associations with milk yield and composition in Chinese dairy goats. *Mol. Biol. Rep.* 2011;38:2821-2825. DOI 10.1007/s11033-010-0428-0.
- Zhou S., Cai B., He C., Wang Y., Ding Q., Liu J., Liu Y., Ding Y., Zhao X., Li G., Li C., Yu H., Kou Q., Niu W., Petersen B., Sonstegard T., Ma B., Chen Y., Wang X. Programmable base editing of the sheep genome revealed no genome-wide off-target mutations. *Front. Genet.* 2019;10:215. DOI 10.3389/fgene.2019.00215.

Acknowledgements. The authors are grateful to the Centre for Genetic Resources of Laboratory Animals at the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS (RFMEFI61914X0005 and RFMEFI61914X0010) for help with some animal procedures. The authors were supported by Russian Science Foundation (16-14-00095). Data analysis was performed on computational nodes of the Institute of Cytology and Genetics (budget project No. 0259-2021-0016).

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

Received October 22, 2020. Revised January 28, 2021. Accepted February 8, 2021.

Новые генетические технологии защиты растений от паразитических нематод

А.В. Кочетов¹, Т.А. Гавриленко^{1, 2}, О.С. Афанасенко^{1, 3} ✉

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

³ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ olga.s.afan@gmail.com

Аннотация. Нематоды относятся к числу значимых вредителей сельскохозяйственных растений. В обзоре рассмотрены последние данные о молекулярных механизмах устойчивости растений к цистообразующим и галловым нематодам, среди которых одни из наиболее вредоносных видов: *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne chitwoodi* и *M. incognita*. Например, золотистая картофельная нематода *G. rostochiensis*, зарегистрированная в 61 субъекте РФ на общей площади 1.8 млн га, способна приводить к потере от 19 до 90 % урожая картофеля. Биологические особенности нематод затрудняют разработку агротехнических способов борьбы с ними: цисты *G. rostochiensis* сохраняют жизнеспособность в почве в течение многих лет, нематоды токсичны или малоэффективны, поэтому предпочтительным методом борьбы с ними является интродукция генов устойчивости от родственных культурных и дикорастущих видов. Стратегия жизненного цикла цистообразующих и галловых нематод основана на способности личинок проникать в корни восприимчивых видов растений, репрограммировать клетки растения-хозяина, формирующие гигантские клетки или синцитии в качестве питающих структур, а также ингибировать иммунный ответ. Молекулярные механизмы, лежащие в основе такого взаимодействия в системе «патоген-хозяин», вызывают значительный интерес как с точки зрения управления морфогенезом растений, так и в аспекте разработки безопасных и эффективных способов борьбы с паразитическими нематодами. В обзоре рассмотрены данные об эффекторах, с помощью которых разные виды нематод контролируют иммунный ответ растения-хозяина, а также гены устойчивости (*R*-гены) и некоторые молекулярные механизмы, прерывающие формирование питающих структур и развитие паразита. Приведены новые данные о способах генетического контроля, основанных на одном из активно обсуждаемых в последнее время варианте механизма РНК-интерференции – HIGS (host induced gene silencing), представляющем собой адресное выключение экспрессии гена-мишени в клетках личинки нематоды с помощью специфических двуцепочечных РНК, синтезирующихся в клетках растения-хозяина. Индукция РНК-интерференции в клетках растений приводит к появлению молекул-медиаторов, способных инициировать аналогичный процесс в клетках фитофагов, взаимодействующих с растением, в том числе у личинок нематод. Описаны случаи, в которых такое адресное выключение экспрессии генов-мишеней приводило к нарушениям развития личинок и высокому уровню защиты сельскохозяйственных растений от наиболее опасных видов нематод.

Ключевые слова: цистообразующие нематоды; галловые нематоды; картофель; гены-эффекторы; *R*-гены; РНК-интерференция; хозяин-индуцированный генетический сайленсинг.

Для цитирования: Кочетов А.В., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. Новые генетические технологии защиты растений от паразитических нематод. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):337-343. DOI 10.18699/VJ21.037

New genetic tools for plant defense against parasitic nematodes

A.V. Kochetov¹, T.A. Gavrilenko^{1, 2}, O.S. Afanasenko^{1, 3} ✉

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

² Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

³ All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia

✉ olga.s.afan@gmail.com

Abstract. Nematodes belong to economically important pests. Here we reviewed the recent data on molecular mechanisms of plant resistance to cyst and gall nematodes including the most devastating *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne chitwoodi*, and *M. incognita*. The Golden Potato Cyst Nematode (*G. rostochiensis*, GPCN) may be taken as an example of an economically important pest: in Russia, it occurs in 61 regions with a total area of 1.8 million ha and may cause the yield loss from 19 to 90 %. The biological characteristics of sedentary nematodes makes their agrotechnical control problematic, i. e. the GPCN cysts remain dormant in soil for many years until a susceptible host appears, whereas nematicides are either toxic or inefficient. Introgression of resistance genes (*R*-genes) from related cultivated or wild species is likely to be the most appropriate way for their biocontrol. The life cycle of sedentary nematodes is based on juveniles' penetration into the host root where they reprogram plant cells into a syncytium or the so-called 'giant cells' and inhibit the plant defense response. Molecular mechanisms of plant-nematode interaction

are unusual and this phenomenon provides a very interesting model for the investigation of plant morphogenesis control as well as for the development of new genetic instruments of biocontrol. Here we reviewed recent publications on plant parasitic nematode effectors used for hijacking of the plant immune system, data on *R*-genes and molecular mechanisms of their activities. In addition, host-induced gene silencing (HIGS) is discussed as a perspective mechanism for nematode biocontrol. HIGS is based on the RNA interference in the cells of the host plant addressed against the nematode genes important for their development and productivity. Several recent investigations demonstrated efficiency of HIGS against sedentary nematodes.

Key words: cyst nematodes; gall nematodes; potato; effector genes; *R*-genes; RNA interference; host induced genetic silencing.

For citation: Kochetov A.V., Gavrilenko T.A., Afanasenko O.S. New genetic tools for plant defense against parasitic nematodes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):337-343. DOI 10.18699/VJ21.037 (in Russian)

Введение

Фитопаразитические нематоды относятся к числу значимых вредителей сельского хозяйства и распространены по всему миру (около 4 тыс. видов, большинство из которых встречаются в странах с тропическим и субтропическим климатом) (Зиновьева и др., 2012). Из многочисленных видов фитопаразитических нематод в обзоре наибольшее внимание уделено цистообразующим и галловым, поскольку к ним относятся виды, наносящие значительный урон экономически важным сельскохозяйственным культурам растений, среди которых *Globodera rostochiensis* (Woll), *G. pallida* (Stone), *Heterodera schachtii* (Schmidt), *Meloidogyne chitwoodi* (Golden et al.), *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White). Следует отметить, что *M. incognita* называют наиболее опасным и вредным организмом, поражающим культурные растения (Trudgill, Blok, 2001).

Разработка способов борьбы с паразитическими нематодами считается одной из актуальных биотехнологических задач, однако их биологические особенности затрудняют применение типовых агротехнических и химических методов защиты. Примером может служить золотистая картофельная нематода (ЗКН) *G. rostochiensis* – широко распространенный карантинный вредитель, приводящий к существенным потерям в картофелеводстве (Evans, Trudgill, 1992). В России ЗКН зарегистрирована в 61 субъекте, включающем 861 административный район на территории общей площадью 1.8 млн га (Справочник по карантинному фитосанитарному состоянию, 2017). В зависимости от сорта и сезонных условий потери урожая картофеля могут составлять от 19 до 90 % (Friedman, 1985), при этом покоящиеся в почве цисты ЗКН способны сохранять жизнеспособность более 30 лет (Winslow, Willis, 1972). Кроме того, следует учитывать высокую вероятность распространения ЗКН в новых, не характерных для этого вида регионах вследствие прогнозов по изменению климата (Jones et al., 2017), а также возможности появления на территории РФ других опасных для картофелеводства карантинных видов нематод.

Способы борьбы с ЗКН включают использование нематодцидов (Kearn et al., 2017) и применение в севообороте родственных культур, способных инициировать выход личинок ЗКН, но не являющихся для них хозяевами, что приводит к гибели личинок и снижению инфицированности почвы (например, *Solanum sisymbriifolium*) (Dandurand et al., 2019; Kooliyottil et al., 2019). Однако эти методы могут быть недостаточно результативны или экологичны:

так, эффективные нематодциды токсичны и запрещены в европейских странах (Trudgill et al., 2003). Таким образом, предпочтительным подходом к контролю ЗКН в разных странах является возделывание устойчивых сортов с интрогрессированными генами устойчивости (*R*-генами) от родственных культурных (*S. tuberosum* ssp. *andigenum*) и дикорастущих (*S. canasense*, *S. oplocense*, *S. spegazzinii*, *S. vernei*) видов картофеля (Dalamu et al., 2012).

Молекулярные механизмы патогенеза также превращают ЗКН в непростую мишень для существующих способов защиты растений. Личинки ЗКН после выхода из яиц в почве проникают в корни восприимчивых растений, движутся до проводящих тканей и иницируют формирование питающего синцития. Для этого личинка ЗКН впрыскивает в клетки растения секрет из пищеводных желез, иницирующий репрограммирование и слияние клеток в синцитий (описаны синцитии, образовавшиеся в результате последовательного слияния более чем 200 клеток), а также ингибирующий иммунный ответ у восприимчивых сортов (Mejias et al., 2019). Сходный механизм формирования системы питания выработали галлообразующие нематоды семейства *Meloidogynidae* (мелойдогинид), также способные репрограммировать клетки растения-хозяина, инициировать процесс митоза без цитокинеза с формированием так называемых гигантских клеток, размер которых может более чем в 300 раз превышать исходную клетку. Личинка нематоды в данном случае формирует специализированный орган – галл, в котором может быть несколько гигантских клеток (Зиновьева и др., 2012; Mejias et al., 2019). Оба типа питающих структур (синцитий и гигантские клетки) характеризуются общими структурно-функциональными особенностями: развитый эндоплазматический ретикулум, утолщенные клеточные стенки, большое количество митохондрий, фрагментированная вакуоль и т.п. (Rodiuc et al., 2014; Palomares-Rius et al., 2017; Mejias et al., 2019). Механизмы индуцированного нематодами репрограммирования активно исследуют, так как этот биологический феномен представляет собой перспективную модель для изучения генетического контроля морфогенеза растений.

Известно, что личинки южной галловой нематоды *Meloidogyne incognita* секретируют сложный набор веществ различной природы, содержащий не менее 500 белков, функции большинства из которых неизвестны (Wang et al., 2012). В настоящее время можно выделить несколько PPN-эффекторов (plant parasitic nematode effectors), о функциях которых есть экспериментальные данные.

PPN-эффекторы, способные связывать активные формы кислорода (АФК), которые образуются в результате сверхчувствительной реакции. Эффективные способы борьбы с патогенами, выработанные растениями в ходе эволюции, включают распознавание специфических молекулярных паттернов (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), индукцию системного защитного ответа и локально – программируемой клеточной смерти в месте инвазии. В случае личинок нематод зона мертвых клеток блокирует поступление питательных веществ и останавливает жизненный цикл. Известно, что АФК являются одним из ключевых медиаторов в регуляторных контурах, контролирующих этот вид иммунного ответа (effector-triggered immunity, ETI). Показано, что один из PPN-эффекторов яванской галловой нематоды *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) взаимодействует с каталитической субъединицей тиоредоксинредуктазы и связывает АФК, что блокирует передачу сигнала и ингибирует развитие иммунного ответа (Lin et al., 2016). Другую клеточную систему используют для этой же цели личинки свекловичной цистообразующей нематоды *Heterodera schachtii*: эффектор Hs10A06 связывается со спермидинсинтазой, что увеличивает синтез спермидина, также связывающего АФК (Hewezi et al., 2015).

PPN-эффекторы, ингибирующие локальный и системный иммунный ответ. Помимо связывания АФК PPN-эффекторы способны инактивировать PR-белки и ингибировать системный иммунный ответ, в частности в качестве мишеней могут быть использованы ферменты бета-1,3-эндоглюканазы, 1,3-бета-глюкансинтазы и др. (Mejias et al., 2019). Для ингибирования специфического иммунитета можно применять инактивацию специфического белка-рецептора: например, PPN-эффектор *G. pallida* RNA1B является убиквитинлигазой, способной как активировать убиквитинилирование и протеолиз белка-рецептора семейства NBS-LRR, так и ингибировать индукцию специфического иммунитета в целом, например в ответ на молекулярные паттерны других патогенов (Kud et al., 2019).

PPN-эффекторы, способные ингибировать иммунный ответ на уровне молекулярно-генетических регуляторных контуров. В качестве примера можно привести эффектор *M. incognita*, взаимодействующий с одной из субъединиц сигнаlosомы COP9 (Bournaud et al., 2018). Характерно, что этот белок, участвующий в пути передачи сигнала салициловой кислоты, также является мишенью для ряда эффекторов грибов и вирусов. Аналогичным образом PPN-эффекторы сразу нескольких видов нематод (*M. chitwoodi*, *G. rostochiensis*, *H. schachtii*) используют в качестве мишени белок PLCP (papain-like cysteine protein), который также служит одной из общих мишеней для различных патогенов (Mejias et al., 2019)

PPN-эффекторы, задействованные в индукции формирования синцития или гигантских клеток. Про функции этих белков известно немного. Цистообразующая бледная картофельная нематода *G. pallida* продуцирует эффектор GpSPRY-414-2, который связывается с белком CLASP, ассоциированным с микротрубочками и участвующим в делении и росте клеток (Mei et al., 2018);

вероятно, эту мишень используют для реорганизации цитоскелета в синцитии. Можно отметить PPN-эффекторы цистообразующих нематод, структура которых сходна с CLAVATA3 (CLV3)/ESR (CLE) – регуляторными пептидами, задействованными в контроле деления и дифференцировки клеток растений, а также эффекторы *H. schachtii*, взаимодействующие с транспортером ауксина LAX3 (Gheysen, Mitchum, 2019). Тема репрограммирования клеток растения-хозяина тесно связана и с вопросом специфичности нематод: помимо преодоления иммунной системы важным элементом жизненного цикла патогена является адресное воздействие на системы молекулярно-генетического управления морфогенезом, что также относится к актуальным направлениям исследований (Sabeh et al., 2019).

Гены устойчивости (R-гены)

Гены устойчивости к *G. rostochiensis* свидетельствуют о том, что в настоящее время большинство сортов картофеля содержат по одному R-гену (Whitworth et al., 2018), обеспечивающему высокую устойчивость к патотипу ЗКН Ro1. К их числу относятся *H1*, интрогрессированный от *S. tuberosum* ssp. *andigenum* (Bakker et al., 2004), и *Gro1-4* от *S. spagazzinii* (Barone et al., 1990; Ballvora et al., 1995). Защита, контролируемая идентифицированными генами устойчивости, основана на механизме реакции сверхчувствительности: индукция программируемой клеточной смерти формирует зону мертвых клеток, отсекающих личинку ЗКН от поступления питательных веществ, что не позволяет ей завершить жизненный цикл (Kaloshian et al., 2011; Зиновьева и др., 2012; Kochetov et al., 2017). Несмотря на то что гены *H1* и *Gro1-4* сохраняют эффективность в Европе и России, следует учитывать, что нематоды способны к быстрой эволюции, поэтому поиск новых генов устойчивости к ЗКН считается одной из приоритетных задач генетики растений (Whitworth et al., 2018; Strachan et al., 2019). Одним из классических способов расширения набора генов устойчивости с перспективами их дальнейшего пирамидирования является поиск новых генов в природных популяциях растений. В качестве примера можно привести систематический скрининг биоресурсных коллекций ВИР, показавший наличие нового R-гена для *G. rostochiensis* у некоторых генотипов *S. phureja* (Limantseva et al., 2014). Сравнительный анализ транскриптомов устойчивых и восприимчивых генотипов позволил определить механизм устойчивости, основанный на индукции реакции сверхчувствительности и локальной программируемой клеточной смерти в зоне инвазии личинок. Особенности взаимодействия нематод с корнями растений служат существенное повреждение тканей при миграции личинок и индукция неспецифического ответа на этот вид стресса (wounding), который у устойчивых линий дополняется специфическим PAMP-опосредованным иммунным ответом в виде реакции сверхчувствительности и системного синтеза защитных белков (Kochetov et al., 2017, 2020).

Подобный подход использован для изучения генетических механизмов устойчивости к галловым нематодам различных экономически важных видов пасленовых, на-

пример картофеля (Bali et al., 2019), томата (Schaff et al., 2007) и табака (Li et al., 2018). В работе S. Bali и коллег исследован селекционный клон с интрогрессированным из дикого диплоидного мексиканского вида картофеля *S. bulbocastanum* геном *RMCI(bulb)*, обеспечивающим устойчивость к *Meloidogyne chitwoodi*. Аналогично данным, представленным A.V. Kochetov и сотрудниками (2017, 2020), личинки нематоды проникают в корни как восприимчивых, так и устойчивых сортов растений, однако РАМР-опосредованная реакция сверхчувствительности ограничивает формирование питающих гигантских клеток, и жизненный цикл нематоды прерывается. Развитие иммунного ответа приводит к масштабным изменениям в транскриптоме, что позволяет выявлять дифференциально экспрессирующиеся гены у восприимчивых и устойчивых генотипов, реконструировать системы взаимодействующих генов (генные сети), пути передачи сигнала и молекулярные механизмы устойчивости. Показано, что индукция устойчивости связана с накоплением АФК, увеличением активности генов сигнальных путей жасмоновой и салициловой кислот, синтеза компонентов клеточной стенки, полиаминов, PR-белков (Bali et al., 2019). X. Li и коллеги исследовали взаимодействие устойчивых и восприимчивых генотипов *Nicotiana tabacum* с *M. incognita*. На этой модели также продемонстрировано, что личинки нематод проникают в корни как устойчивых, так и восприимчивых растений, но у первых на седьмой день инициируются реакция сверхчувствительности и локальный некроз в районе гигантских питающих клеток. В результате сравнительного анализа транскриптома и дифференциально экспрессирующихся генов выявлены путь передачи сигнала салициловой кислоты, гены антиоксидантов, а также метаболические пути синтеза фенилпропаноидов, алкалоидов и терпеноидов, что может быть характерно для табака (Li et al., 2018).

Несмотря на то что защитные механизмы часто связаны со специфическими рецепторами и индукцией реакции сверхчувствительности, в основе иммунного ответа могут быть разные молекулярные события. Можно отметить, что разнообразие защитных механизмов в природных популяциях растений изучено недостаточно и новые варианты генов устойчивости могут отличаться от классических рецепторов семейства NBS-LRR, активирующих реакцию сверхчувствительности при появлении нематод-специфических молекулярных паттернов. Например, ген *Rhg1* сои, кодирующий специфический вариант белка везикулярного транспорта α -SNAP (Bayless et al., 2018), способен интерферировать с молекулярными механизмами патогенеза цистообразующих нематод, однако при этом его экспрессия в трансгенных растениях других видов (картофеля, арабидопсы, других разновидностей сои) приводила как к увеличенной устойчивости к *H. schachtii*, *G. rostochiensis* и *G. pallida*, так и негативно влияла на рост и развитие растений (Butler et al., 2019). По-видимому, в процессе эволюции у устойчивых форм сои сформировался баланс в экспрессии генов, кодирующих белки α -SNAP, обеспечивающий устойчивость к патогену и компенсацию негативного эффекта такого необычного *R*-гена.

Новые способы генетического контроля устойчивости растений к нематодам

В последнее время значительный интерес вызывает один из вариантов технологии РНК-интерференции, а именно HIGS (host induced gene silencing), представляющий собой адресное выключение экспрессии гена-мишени в клетках личинки нематоды с помощью специфических двуцепочечных РНК (дцРНК), синтезирующихся в клетках растения-хозяина. дцРНК способны индуцировать систему защитного ответа на основе РНК-интерференции, приводящую к появлению коротких интерферирующих РНК (short interfering RNA, siRNA) и комплексов RISC, способных распознавать и разрушать мишени – молекулы РНК, содержащие участки, идентичные или высокогомологичные такой дцРНК-затравке. Этот механизм является не только способом борьбы с вирусами, но и одним из фундаментальных молекулярных механизмов контроля экспрессии генов у эукариот. Однако дцРНК, siRNA или другие промежуточные формы процесса РНК-интерференции могут проникать в клетки организмов, взаимодействующих с растением, например в клетки пищеварительной системы насекомых-фитофагов, гифы паразитических грибов, клетки нематод и др. При этом если дцРНК сконструирована из сегментов мРНК, соответствующих не гену растения-хозяина, а гену фитофага, то в ряде случаев при взаимодействии этого фитофага с растением отмечены индукция РНК-интерференции и специфическое ингибирование экспрессии гена-мишени в клетках фитофага. Если данный ген выполнял жизненно важные функции, то растения, продуцирующие такие дцРНК, становились токсичными для соответствующего вредителя.

Указанный биологический феномен демонстрирует возможность обмена регуляторной генетической информацией между организмами различной таксономической принадлежности в природных и искусственных экосистемах, что требует дальнейшего всестороннего исследования. Тем не менее очевидно и прикладное значение феномена HIGS, так как дцРНК, специфические для мРНК конкретного гена-мишени, не оказывают воздействия на организмы, в транскриптомах которых нет мРНК протяженными участками сходства. В структуре мРНК эукариот помимо белок-кодирующей части (открытой рамки считывания, CDS) выделяют 5'- и 3'-концевые не-транслируемые последовательности (НТП). 5'-НТП играет важную роль в контроле инициации трансляции, в то время как функции 3'-НТП могут быть связаны с управлением цитоплазматической стабильности индивидуальных мРНК (Кочетов и др., 2002; Kochetov, Sarai, 2004; Ventoso et al., 2012). В качестве адресной нуклеотидной последовательности для индукции РНК-интерференции при конструировании дцРНК можно использовать более протяженные 3'-НТП мРНК гена-мишени, которые, в отличие от белок-кодирующих участков, в большинстве случаев не являются эволюционно консервативными, что расширяет диапазон возможностей селективного видо-специфического выключения отдельных генов.

Следует отметить, что эффективность воздействия дцРНК может зависеть от морфологических и биохимиче-

ских особенностей организма-мишени, в частности включающих барьеры на пути проникновения дцРНК внутрь клеток и содержание в тканях дцРНК-специфических рибонуклеаз. При этом не все гены организма-реципиента могут быть супрессированы с помощью РНК-интерференции. Так, в работе S. Iqbal и коллег (2020) приведены результаты систематического исследования генов домашнего хозяйства *M. incognita*, которые в перспективе могут быть использованы как мишени для HIGS. Выбор подходящего гена-мишени – одна из важных задач, так как некоторые гены домашнего хозяйства могут быть малочувствительны к РНК-интерференции либо эффект от их супрессии может быть недостаточно выражен. Авторы использовали методику, адаптированную из ранних экспериментов на *Caenorhabditis elegans*, – вымачивание личинок нематоды в растворе, содержащем дцРНК, и последующий анализ характеристик, включая инфекционную способность личинок и характеристики взрослых нематод после инфицирования личинками растений томата. Проанализировано 20 генов: экспрессия восьми генов не репрессировалась дцРНК и не вызывала морфологических проявлений, в то время как супрессия десяти генов приводила к абберациям в морфологических характеристиках нематод и снижению их способности к инфицированию растений. Трансгенные растения, экспрессирующие дцРНК против шести генов нематоды, в экспериментах проявляли устойчивость, сопоставимую с присутствием у растений *R*-генов: снижение инфицированности растений доходило до 89 % (Iqbal et al., 2020).

Далее приведены данные успешного применения технологии HIGS как потенциального инструмента борьбы с паразитическими нематодами. Интересные результаты получены при попытке использования HIGS в качестве мишени гена *M. incognita*, кодирующего PPN-эффектор Mi-MSP2, участвующий в супрессии защитного ответа растения-хозяина. Трансгенные растения, экспрессирующие такие дцРНК, характеризовались сниженной на 88 % экспрессией гена-мишени у самок нематоды, а также уменьшенной на 80 % продукцией яиц (Joshi et al., 2019). Применение этой технологии для защиты растений баклажана показало, что дцРНК стабильно экспрессировалась в трансгенных формах вплоть до третьего поколения от самоопыления и обеспечивала высокий уровень защиты от нематоды (Chaudhary et al., 2019). Для *M. incognita*, одного из наиболее опасных вредителей растений, обладающего широким кругом хозяев, экспериментально доказана эффективность HIGS для нескольких генов, включая PPN-эффекторы (Shivakumara et al., 2017; снижение продуктивности самок нематоды составило 40–70 %), ген стерол-связывающего белка (Shivakumara et al., 2019; снижение продуктивности нематод до 50 %), ген L-цистеиновой протеазы (Dutta et al., 2015; снижение продуктивности на 60–80 %), гены кутикулярного коллагена (Banerjee et al., 2018; снижение продуктивности нематод до 80 %, структурные абберации у личинок).

Развитие других видов нематод также может быть супрессировано с помощью HIGS. Отмечено снижение продуктивности самок *H. schachtii* на трансгенных растениях, экспрессирующих дцРНК сложной структуры,

содержащую сегменты генов эндоглюканазы и белка MSP (major sperm protein) (Amin et al., 2018); кроме того, показана возможность применения HIGS для *Heterodera glycines* (Hu et al., 2019), *Bursaphelenchus xylophilus* (Qiu et al., 2019) и других видов нематод. Свекловичная цистообразующая нематода *H. schachtii* также служит примером актуальности разработки новых генетических технологий биологического контроля. Этот паразит поражает более 200 видов растений, принадлежащих 98 родам, и является одним из основных вредителей сахарной свеклы. Яйца в цистах сохраняют жизнеспособность в почве в течение нескольких лет. Стандартные способы борьбы с помощью нематодов на основе фосфоорганических соединений и карбаматов затруднены из-за их высокой токсичности; применение в севообороте других видов растений, способных инициировать выход личинок из яиц, но не являющихся хозяевами для *H. schachtii*, экономически неэффективно для высокоинтенсивных технологий возделывания сахарной свеклы. Использование устойчивых форм растений также проблематично из-за их повышенной чувствительности к некоторым грибным патогенам (Amin et al., 2018), что в совокупности демонстрирует отсутствие эффективных способов борьбы и необходимость разработки новых технологий, к числу которых относится HIGS.

Заключение

Применение технологии HIGS основано на получении генетически-модифицированных форм растений, которые не экспрессируют чужеродные белки, но производят некодирующую двуцепочечную РНК, содержащую участки мРНК гена-мишени, в данном случае гена нематоды. РНК-интерференцию, как и белок-кодирующие гены, активно применяют для супрессии генов растений (Кочетов и др., 2004; Trifonova et al., 2007; Sugawara et al., 2016). Поскольку при продукции некодирующей дцРНК не производятся новые для растения-хозяина белки, отсутствует вероятность развития у потребителей аллергических реакций или специфических изменений в метаболизме растений, связанных с новыми ферментативными или регуляторными активностями. К рискам применения таких растений в практике сельского хозяйства следует отнести потенциальную возможность неспецифического действия дцРНК на другие организмы, взаимодействующие с растениями, если их мРНК каких-либо генов содержат протяженные участки сходства. Дальнейшее систематическое исследование структуры геномов организмов разной принадлежности в различных природных и агроэкосистемах, вероятно, позволит с точностью прогнозировать такие риски и откроет путь к инженерии устойчивости сельскохозяйственных растений к разнообразным вредителям и патогенам.

Список литературы / References

- Зиновьева С.В., Чижов В.Н., Приданников М.В., Субботин С.А., Рысс А.Ю., Хусаинов Р.В. Фитопаразитические нематоды России. Изд-во: Товарищество научных изданий КМК, 2012;374.
[Zinovieva S.V., Chizhov V.N., Pridannikov M.V., Subbotin S.A., Ryss A.Yu., Khusainov R.V. Phytoparasitic nematodes of Russia. KMK Scientific Publishing Association, 2012;374. (in Russian)]

- Кочетов А.В., Сырник О.А., Рогозин И.Б., Глазко Г.В., Комарова М.Л., Шумный В.К. Контекстная организация 5'-нетранслируемых районов генов высших растений. *Молекулярная биология*. 2002;36(4):649-656.
[Kochetov A.V., Sirnik O.A., Rogosin I.B., Glazko G.V., Komarova M.L., Shumny V.K. Contextual features of higher plant mRNA 5'-untranslated regions. *Molekulyarnaya Biologiya = Molecular Biology*. 2002;36(4):649-656. (in Russian)]
- Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифонова Е.А., Шумный В.К. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы. *Генетика*. 2004;40(2):282-285.
[Kochetov A.V., Titov S.E., Kolodyazhnaia Ia.S., Komarova M., Koval' V.S., Makarova N.N., Iliyskiy Iu.Iu., Trifonova E.A., Shumny V.K. Tobacco transformants bearing antisense suppressor of proline dehydrogenase gene are characterized by higher proline content and cytoplasm osmotic pressure. *Genetika = Genetics*. 2004;40(2):282-285. (in Russian)]
- Справочник по карантинному фитосанитарному состоянию территории государств – участников СНГ на 01.01.2017 г. М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2017;106.
[Handbook on the plant quarantine conditions in CIS member states as of January 1, 2017. Moscow: All-Russia Plant Quarantine Center Publ., 2017;106. (in Russian)]
- Amin R.B., Karegar A., Afsharifar A., Niazi A., Karimi M. Disruption of the pathogenicity and sex ratio of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by host-delivered RNA interference. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2018;31(12):1337-1346. DOI 10.1094/MPMI-05-18-0141-R.
- Bakker E., Achenbach U., Bakker J., van Vliet J., Peleman J., Segers B., van der Heijden S., van der Linde P., Graveland R., Hutten R., van Eck H., Coppoolse E., An der Vossen E., Bakker J., Govere A. A high-resolution map of the H1 locus harboring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Theor. Appl. Genet.* 2004;109:146-152. DOI 10.1007/s00122-004-1606-z.
- Bali S., Vining K., Gleason C., Majtahedi H., Brown C.R., Sathuvalli V. Transcriptome profiling of resistance response to *Meloidogyne chitwoodi* introgressed from wild species *Solanum bulbocastanum* into cultivated potato. *BMC Genomics*. 2019;20(1):907. DOI 10.1186/s12864-019-6257-1.
- Ballvora A., Hesselbach J., Niewöhner J., Leiste D., Salamini F., Gebhardt C. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.* 1995;249:82-90.
- Banerjee S., Gill S.S., Gawade B.H., Jain P.K., Subramaniam K., Sirohi A. Host Delivered RNAi of Two Cuticle Collagen Genes, *Mi-col-1* and *Lemmi-5* Hampers Structure and Fecundity in *Meloidogyne incognita*. *Front. Plant Sci.* 2018;8:2266. DOI 10.3389/fpls.2017.02266.
- Barone A., Ritter E., Schachtschabel U., Debener T., Salamini F., Gebhardt C. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 1990;224:177-182.
- Bayless A.M., Zapotocny R.W., Grunwald D.J., Amundson K.K., Diers B.W., Bent A.F. An atypical N-ethylmaleimide sensitive factor enables the viability of nematode-resistant Rhg1 soybeans. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2018;115(19):E4512-E4521.
- Bournaud C., Gillet F.-X., Murad A.M., Bresso E., Albuquerque E.V.S., Grossi-de-Sá M.F. *Meloidogyne incognita* PASSE-MURAILLE (*MiPM*) gene encodes a cell-penetrating protein that interacts with the CSN5 subunit of the COP9 signalosome. *Front. Plant Sci.* 2018;9:904. DOI 10.3389/fpls.2018.00904.
- Butler K.J., Chen S., Smith J.M., Wang X., Bent A.F. Soybean Resistance Locus Rhg1 Confers Resistance to Multiple Cyst Nematodes in Diverse Plant Species. *Phytopathology*. 2019;109(12):2107-2115. DOI 10.1094/PHYTO-07-19-0225-R.
- Chaudhary S., Dutta T.K., Tyagi N., Shivakumara T.N., Papolu P.K., Chobhe K.A., Rao U. Host-induced silencing of Mi-*msp-1* confers resistance to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in eggplant. *Transgenic. Res.* 2019;28(3-4):327-340. DOI 10.1007/s11248-019-00126-5.
- Dalamu B.V., Umamaheshwari R., Shrama R., Kaushik S.K., Joseph T.A., Singh B.P., Gebhardt C. Potato cyst nematode (PCN) resistance: genes, genotypes and markers – an update. *SABRAO J. Breed. Genet.* 2012;44:202-228.
- Dandurand L.M., Zasada I.A., LaMondia J.A. Effect of the trap crop, *Solanum sisymbriifolium*, on *Globodera pallida*, *Globodera tabacum*, and *Globodera ellingtonae*. *J. Nematol.* 2019;51:1-11. DOI 10.21307/jofnem-2019-030.
- Dutta T.K., Papolu P.K., Banakar P., Choudhary D., Sirohi A., Rao U. Tomato transgenic plants expressing hairpin construct of a nematode protease gene conferred enhanced resistance to root-knot nematodes. *Front. Microbiol.* 2015;6:260. DOI 10.3389/fmicb.2015.00260.
- Evans K., Trudgill D.L. Pest aspects of potato production. Part 1. The nematode pests of potatoes. In: Harris P. (Ed.). *The potato crop*. London: Chapman & Hall, 1992.
- Friedman W. Pests not known to occur in the United States or of limited distribution, No. 68: Golden Nematode. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine, 1985;10.
- Gheysen G., Mitchum M.G. Phytoparasitic nematode control of plant hormone pathways. *Plant Physiol.* 2019;179:1212-1226. DOI 10.1104/pp.18.01067.
- Hewezi T., Juvale P.S., Piya S., Maier T.R., Rambani A., Rice J.H., Mitchum M.G., Davis E.L., Hussey R.S., Baum T.J. The cyst nematode effector protein 10A07 targets and recruits host posttranslational machinery to mediate its nuclear trafficking and to promote parasitism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2015;27:891-907. DOI 10.1105/tpc.114.135327.
- Hu Y., You J., Li C., Pan F., Wang C. The *Heterodera glycines* effector Hg16B09 is required for nematode parasitism and suppresses plant defense response. *Plant Sci.* 2019;289:110271. DOI 10.1016/j.plantsci.2019.110271.
- Iqbal S., Fosu-Nyarko J., Jones M.G.K. Attempt to silence genes of the RNAi pathways of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* results in diverse responses including increase and no change in expression of some genes. *Front. Plant Sci.* 2020;11:328. DOI 10.3389/fpls.2020.00328.
- Jones L.M., Koehler A.K., Trnka M., Balek J., Challinor A.J., Atkinson H.J., Urwin P.E. Climate change is predicted to alter the current pest status of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* in the United Kingdom. *Glob. Chang Biol.* 2017;23(11):4497-4507. DOI 10.1111/gcb.13676.
- Joshi I., Kumar A., Singh A.K., Kohli D., Raman K.V., Sirohi A., Chaudhury A., Jain P.K. Development of nematode resistance in *Arabidopsis* by HD-RNAi-mediated silencing of the effector gene *Mi-*msp2**. *Sci. Rep.* 2019;9(1):17404. DOI 10.1038/s41598-019-53485-8.
- Kaloshian I., Desmond O.J., Atamian H.S. Disease resistance-genes and defense responses during incompatible interactions. In: Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (Eds.). *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. New York: Springer, 2011;309-324.
- Kearn J., Lilley C., Urwin P., O'Connor V., Holden-Dye L. Progressive metabolic impairment underlies the novel nematocidal action of fluensulfone on the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2017;142:83-90. DOI 10.1016/j.pestbp.2017.01.009.
- Kochetov A.V., Egorova A.A., Glagoleva A.Y., Strygina K.V., Khlestkina E.K., Gerasimova S.V., Shatskaya N.V., Vasilyev G.V., Afonnikov D.A., Shmakov N.A., Antonova O.Y., Alpatyeva N.V., Khiutti A., Afanasenko O.S., Gavrilenko T.A. The mechanism of potato

- resistance to *Globodera rostochiensis*: comparison of root transcriptomes of resistant and susceptible *Solanum phureja* genotypes. *BMC Plant Biol.* 2020;20(Suppl 1):350. DOI 10.1186/s12870-020-02334-2.
- Kochetov A.V., Glagoleva A.Y., Strygina K.V., Khlestkina E.K., Gerasimova S.V., Ibragimova S.M., Shatskaya N.V., Vasilyev G.V., Afonnikov D.A., Shmakov N.A., Antonova O.Y., Gavrilenko T.A., Alpatyeva N.V., Khiutti A., Afanasenko O.S. Differential expression of NBS-LRR-encoding genes in the root transcriptomes of two *Solanum phureja* genotypes with contrasting resistance to *Globodera rostochiensis*. *BMC Plant Biol.* 2017;17(Suppl 2):251. DOI 10.1186/s12870-017-1193-1.
- Kochetov A.V., Sarai A. Translational polymorphism as a potential source of plant proteins variety in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics.* 2004;20:445-447.
- Kooliyottill R., Dandurand L.-M., Kuhl J.C., Caplan A., Xiao F., Mimeo B., Lafond-Lapalme J. Transcriptome analysis of *Globodera pallida* from the susceptible host *Solanum tuberosum* or the resistant plant *Solanum sisymbriifolium*. *Sci. Rep.* 2019;9(1):13256. DOI 10.1038/s41598-019-49725-6.
- Kud J., Wang W., Gross R., Fan Y., Huang L., Yuan Y., Gray A., Duarte A., Kuhl J.C., Caplan A., Goverse A., Liu Y., Dandurand L.M., Xiao F. The potato cyst nematode effector RHA1B is a ubiquitin ligase and uses two distinct mechanisms to suppress plant immune signaling. *PLoS Pathog.* 2019;15(4):e1007720. DOI 10.1371/journal.ppat.1007720.
- Li X., Xing X., Tian P., Zhang M., Huo Z., Zhao K., Liu C., Duan D., He W., Yang T. Comparative transcriptome profiling reveals defense-related genes against *Meloidogyne incognita* invasion in tobacco. *Molecules.* 2018;23(8):2081. DOI 10.3390/molecules23082081.
- Limantseva L., Mironenko N., Shuvalov O., Antonova O., Khiutti A., Novikova L., Afanasenko O., Spooner D., Gavrilenko T. Characterization of resistance to *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1 in cultivated and wild potato species accessions from the Vavilov Institute of Plant Industry. *Plant Breed.* 2014;133:660-665.
- Lin B., Zhuo K., Hu L., Sun L., Liao J., Zhang L.H., Chen S., Wang X. A novel nematode effector suppresses plant immunity by activating host reactive oxygen species scavenging system. *New Phytol.* 2016; 209:1159-1173. DOI 10.1111/nph.13701.
- Mei Y., Wright K.M., Haegeman A., Bauters L., Diaz-Granados A., Goverse A., Gheysen G., T Jones J., Mantelin S. The *Globodera pallida* SPRYSEC effector GpSPRY-414-2 that suppresses plant defenses targets a regulatory component of the dynamic microtubule network. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1019. DOI 10.3389/fpls.2018.01019.
- Mejias J., Truong N.M., Abad P., Favery B., Quentin M. Plant proteins and processes targeted by parasitic nematode effectors. *Front. Plant Sci.* 2019;10:970. DOI 10.3389/fpls.2019.00970.
- Palomares-Rius J.E., Escobar C., Cabrera J., Vovlas A., Castillo P. Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. *Front. Plant Sci.* 2017;8:1987. DOI 10.3389/fpls.2017.01987.
- Qiu X., Yang L., Ye J., Wang W., Zhao T., Hu H., Zhou G. Silencing of *cyp-33C9* gene affects the reproduction and pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(18):4520. DOI 10.3390/ijms20184520.
- Rodiuc N., Vieira P., Banora M.Y., de Almeida Engler J. On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Front. Plant Sci.* 2014;5:160. DOI 10.3389/fpls.2014.00160.
- Sabeh M., Lord E., Grenier É., St-Arnaud M., Mimeo B. What determines host specificity in hyperspecialized plant parasitic nematodes? *BMC Genomics.* 2019;20(1):457. DOI 10.1186/s12864-019-5853-4.
- Schaff J.E., Nielsen D.M., Smith C.P., Scholl E.H., Bird D.M. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. *Plant Physiol.* 2007;144(2):1079-1092. DOI 10.1104/pp.106.090241.
- Shivakumara T.N., Chaudhary S., Kamaraju D., Dutta T.K., Papolu P.K., Banakar P., Sreevathsa R., Singh B., Manjiaiah K.M., Rao U. Host-induced silencing of two pharyngeal gland genes conferred transcriptional alteration of cell wall-modifying enzymes of *Meloidogyne incognita* vis-à-vis perturbed nematode infectivity in eggplant. *Front. Plant Sci.* 2017;8:473. DOI 10.3389/fpls.2017.00473.
- Shivakumara T.N., Somvanshi V.S., Phani V., Chaudhary S., Hada A., Budhwar R., Shukla R.N., Rao U. *Meloidogyne incognita* (Nematoda: Meloidogynidae) sterol-binding protein Mi-SBP-1 as a target for its management. *Int. J. Parasitol.* 2019;49(13-14):1061-1073. DOI 10.1016/j.ijpara.2019.09.002.
- Strachan S.M., Armstrong M.R., Kaur A., Wright K.M., Lim T.Y., Baker K., Jones J., Bryan G., Blok V., Hein I. Mapping the H2 resistance effective against *Globodera pallida* pathotype Pa1 in tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* 2019;132(4):1283-1294. DOI 10.1007/s00122-019-03278-4.
- Sugawara T., Trifonova E.A., Kochetov A.V., Kanayama Y. Expression of extracellular ribonuclease gene increases resistance to cucumber mosaic virus in tobacco. *BMC Plant Biol.* 2016;16(Suppl 3):246. DOI 10.1186/s12870-016-0928-8.
- Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L., Scherban A.B., Shumny V.K., Polyakova A.M., Lapshina L.A., Kochetov A.V., Malinovsky V.I. Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus. *Plant Cell Rep.* 2007;26:1121-1126. DOI 10.1007/s00299-006-0298-z.
- Trudgill D.L., Blok V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic rootpathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2001;39:53-77. DOI 10.1146/annurev.phyto.39.1.53.
- Trudgill D.L., Elliot M.J., Evans K., Phillips M.S. The white potato cyst nematode (*Globodera pallida*) – a critical analysis of the threat in Britain. *Ann. Appl. Biol.* 2003;143:73-80.
- Ventoso I., Kochetov A., Montaner D., Dopazo J., Santoyo J. Extensive translational remodeling during ER stress response in mammalian cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e35915. DOI 10.1371/journal.pone.0035915.
- Wang X.R., Moreno Y.A., Wu H.R., Ma C., Li Y.F., Zhang J.A., Yang C., Sun S., Ma W.-J., Geary T.G. Proteomic profiles of soluble proteins from the esophageal gland in female *Meloidogyne incognita*. *Int. J. Parasitol.* 2012;42:1177-1183. DOI 10.1016/j.ijpara.2012.10.008.
- Whitworth J.L., Novy R.G., Zasada I.A., Wang X., Dandurand L.M., Kuhl J.C. Resistance of potato breeding clones and cultivars to three species of potato cyst nematode. *Plant Dis.* 2018;102(11):2120-2128. DOI 10.1094/PDIS-12-17-1978-RE.
- Winslow R.D., Willis R.J. Nematode diseases of potatoes. II. Potato cyst nematode, *Heterodera rostochiensis*. In: Webster J. (Ed.). *Economic Nematology*. New York: Acad. Press, 1972;18-34.

ORCID ID

A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181
T.A. Gavrilenko orcid.org/0000-0002-2605-6569
O.S. Afanasenko orcid.org/0000-0001-7368-0797

Благодарности. Обзор литературы подготовлен в рамках гранта Российского научного фонда 16-16-04073П.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.09.2020. После доработки 23.11.2020. Принята к публикации 25.11.2020.

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

Методы высокопроизводительного репортерного анализа энхансеров

С.Е. Романов^{1, 2}, Д.А. Калашникова^{1, 2}, П.П. Лактионов^{1, 2} 

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, лаборатория эпигенетики факультета естественных наук, Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория геномики, Новосибирск, Россия
 laktionov@mcb.nsc.ru

Аннотация. Корректное развертывание генетических программ развития и дифференцировки опирается на тонко координированную регуляцию экспрессии специфических наборов генов. Исключительную роль в управлении этим процессом играют регуляторные элементы генома, к которым относятся промоторы, энхансеры, инсультаторы и сайленсеры. Нарушения в их работе могут приводить к развитию различных патологий, включая онкологические заболевания, пороки развития и аутоиммунные заболевания. Развитие технологий высокопроизводительного геномного анализа позволило значительно ускорить накопление информации о специфических эпигенетических характеристиках регуляторных элементов. В совокупности с полногеномными исследованиями распределения эпигенетических меток, регуляторных белков и пространственной структуры хроматина такие данные значительно расширяют представления о принципах эпигенетической регуляции генов и позволяют осуществлять поиск потенциальных регуляторных элементов *in silico*. Вместе с тем основные экспериментальные подходы, используемые для исследования локальных характеристик хроматина, имеют ряд технических ограничений, которые снижают достоверность биоинформатической идентификации регуляторных областей генома. В связи с этим, а также с учетом вариабельности функций эпигенетических детерминант и многокомпонентной регуляции работы элементов генома определение их регуляторной роли часто требует функциональной проверки. Разработано множество методов, позволяющих провести исследование функциональной роли регуляторных элементов в масштабе генома. В настоящем обзоре кратко описаны основные экспериментальные подходы для проведения идентификации регуляторных элементов *in silico* и присущие им технические ограничения. Рассмотрены оригинальные методы высокопроизводительного репортерного анализа активности энхансеров, которые используют для валидации предсказанных регуляторных элементов и *de novo* поиска. Описанные методы анализа дают возможность оценить функциональную роль нуклеотидной последовательности регуляторного элемента, определить его точные границы, а также оценить влияние локального состояния хроматина на активность энхансеров и экспрессию генов. Применение таких методологических подходов обеспечило значительный вклад в понимание фундаментальных принципов регуляции генной экспрессии.

Ключевые слова: регуляторные элементы генома; энхансеры; высокопроизводительные методы анализа.

Для цитирования: Романов С.Е., Калашникова Д.А., Лактионов П.П. Методы высокопроизводительного репортерного анализа энхансеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(3):344-355. DOI 10.18699/VJ21.038

Methods of massive parallel reporter assays for investigation of enhancers

S.E. Romanov^{1, 2}, D.A. Kalashnikova^{1, 2}, P.P. Laktionov^{1, 2} 

¹ Novosibirsk State University, Epigenetics Laboratory, Department of Natural Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Genomics Laboratory, Novosibirsk, Russia
 laktionov@mcb.nsc.ru

Abstract. The correct deployment of genetic programs for development and differentiation relies on finely coordinated regulation of specific gene sets. Genomic regulatory elements play an exceptional role in this process. There are few types of gene regulatory elements, including promoters, enhancers, insulators and silencers. Alterations of gene regulatory elements may cause various pathologies, including cancer, congenital disorders and autoimmune diseases. The development of high-throughput genomic assays has made it possible to significantly accelerate the accumulation of information about the characteristic epigenetic properties of regulatory elements. In combination with high-throughput studies focused on the genome-wide distribution of epigenetic marks, regulatory proteins and the spatial structure of chromatin, this significantly expands the understanding of the principles of epigenetic regulation of genes and allows potential regulatory elements to be searched for *in silico*. However, common experimental approaches used to study the local characteristics of chromatin have a number of technical limitations that may reduce the reliability of computational identification of genomic regulatory sequences. Taking into account the

variability of the functions of epigenetic determinants and complex multicomponent regulation of genomic elements activity, their functional verification is often required. A plethora of methods have been developed to study the functional role of regulatory elements on the genome scale. Common experimental approaches for *in silico* identification of regulatory elements and their inherent technical limitations will be described. The present review is focused on original high-throughput methods of enhancer activity reporter analysis that are currently used to validate predicted regulatory elements and to perform *de novo* searches. The methods described allow assessing the functional role of the nucleotide sequence of a regulatory element, to determine its exact boundaries and to assess the influence of the local state of chromatin on the activity of enhancers and gene expression. These approaches have contributed substantially to the understanding of the fundamental principles of gene regulation.

Key words: gene regulatory elements; enhancers; massive parallel assays.

For citation: Romanov S.E., Kalashnikova D.A., Laktionov P.P. Methods of massive parallel reporter assays for investigation of enhancers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(3):344-355. DOI 10.18699/VJ21.038

Введение

Корректная реализация программ развития и поддержания функций организма основана на экспрессии специфических для клеток и тканей наборов генов. Координация экспрессии генов осуществляется многоуровневой системой регуляции, включающей генетические и эпигенетические механизмы, основанные на взаимодействии геномных последовательностей, эпигенетических модификаций, регуляторных белков и специфических транскрипционных факторов. Определенные участки генома, ассоциированные с характерными эпигенетическими детерминантами, а также служащие сайтами привлечения регуляторных белков, способны модифицировать экспрессию генов. Такие регуляторные элементы генома играют ключевую роль в реализации генетических программ развития, дифференцировки, поддержания клеточного и тканевого гомеостаза (Phillips-Cremmins, Corces, 2013; Andersson et al., 2014; Kundaje et al., 2015).

Нарушения функции регуляторных геномных элементов могут приводить к развитию различных патологий, включая онкологические заболевания, пороки развития и аутоиммунные заболевания (Maurano et al., 2012; Corradin et al., 2014; Miguel-Escalada et al., 2015; Bradner et al., 2017; Chatterjee, Ahituv, 2017). В исследованиях по полногеномному поиску ассоциаций показано, что более 90 % ассоциированных с развитием заболеваний однонуклеотидных полиморфизмов располагается в некодирующих районах генома (Manolio et al., 2009; Maurano et al., 2012). Причем значительная часть таких геномных вариантов находится в областях, демонстрирующих эпигенетические характеристики энхансеров, а также затрагивает энхансеры, специфичные для клеточных линий, задействованных в патогенезе заболевания (Ernst et al., 2011; Akhtar-Zaidi et al., 2012; Trynka et al., 2013). В качестве примера можно привести генетические варианты, ассоциированные с развитием диабета второго типа, локализованные в районах потенциальных энхансеров, специфичных для клеток островков Лангерганса (Stitzel et al., 2010; Pasquali et al., 2014).

На сегодняшний день накоплено значительное количество информации о характерных эпигенетических свойствах регуляторных элементов, позволяющих идентифицировать потенциальные регуляторные участки генома *in silico* (Ernst et al., 2011). Однако валидация и функциональное описание регуляторных элементов часто требуют прямой экспериментальной проверки. Классическим

способом ее проведения являются различные вариации репортерного анализа и функционального мутагенеза. С развитием методов массового параллельного секвенирования были разработаны методики исследования, позволяющие изучать активность регуляторных элементов в масштабе генома.

В представленном обзоре будут рассмотрены существующие методологические решения в области высокопроизводительного анализа энхансеров, которые внесли значительный вклад в понимание фундаментальных принципов их работы.

Типы регуляторных элементов

Выделяют несколько типов регуляторных элементов генома: промоторы, энхансеры, инсультаторы и сайленсеры.

Промоторы располагаются в районе точки старта транскрипции и у эукариот представляют собой участок ДНК, на котором происходит сборка транскрипционного комплекса, состоящего из главных факторов транскрипции, РНК-полимеразы и прочих регуляторных белков, в том числе опосредующих взаимодействие с энхансерами (Andersson, Sandelin, 2020).

Энхансеры – это участки ДНК, содержащие сайты связывания транскрипционных факторов и кофакторов. В составе белкового комплекса они способны физически взаимодействовать с промотором гена и активировать его экспрессию (Shlyueva et al., 2014). Энхансеры могут оказывать влияние на целевые промоторы, находясь на значительном удалении и вне зависимости от взаимной пространственной ориентации (Pennacchio et al., 2013). Так, например, энхансер ZRS, доминантная мутация которого приводит к наследственным формам полидактилии, в геноме мыши находится приблизительно в 1 млн п. о. от контролируемого им гена *Sonic hedgehog* (*Shh*) (Lettice et al., 2014). В среднем энхансеры удалены от целевых генов на 20–50 тыс. п. о. в геномах позвоночных и на 4–10 тыс. п. о. – в геноме плодовой мушки (Furlong, Levine, 2018).

Регуляторная сеть взаимодействий энхансеров с промоторами может быть достаточно сложной. Отдельные гены имеют общие энхансеры с другими генами, подвергают регуляции несколькими энхансерами и специфичными энхансерами в разных типах клеток организма. Так, экспрессия гена *Arx* контролируется четырьмя энхансерами в ткани мозга мыши (Dickel et al., 2018). Регуляция гена специфичными энхансерами наблюдается и при разви-

тии патологий, например энхансер протоонкогена *Мус* располагается в районе сайта терминации транскрипции при раке поджелудочной железы, при раке прямой кишки обнаруживается со стороны 5'-области гена, а в случае Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза – ниже 3'-области гена (Sur, Taipale, 2016).

В исследованиях на плодовой мушке было показано, что до 30 % энхансеров способны выступать в качестве дистанционных регуляторных элементов, не затрагивая при этом экспрессию генов, расположенных между ними и целевыми генами (Ghavi-Helm et al., 2014; Kvon et al., 2014). Это означает, что должны существовать тонко настроенные регуляторные механизмы, обеспечивающие адресное взаимодействие промотора целевого гена и специфического энхансера. Выделяют несколько функционально пересекающихся концепций, описывающих механику организации промотор-энхансерных взаимодействий, основными из которых являются установление контактов посредством белковых гомо-олигомеров и формирование петель хроматина, в том числе под действием моторных белков, таких как РНК-полимераза II и когезин.

В регуляции пространственной структуры хроматина важную роль играют регуляторные элементы – инсуляторы. Взаимодействуя со специфическими белками, инсуляторы способны блокировать энхансер-промоторные взаимодействия и предотвращать распространение репрессивных меток хроматина, выступая в качестве барьерных элементов (Kellum, Schedl, 1991, 1992; Geyer, Corces, 1992; Cai, Levine, 1995). С развитием современных методов анализа пространственной структуры ядра стало очевидным, что функциональное влияние инсуляторов во многом определяется их участием в регуляции внутри- и межхромосомных контактов (Yang, Corces, 2011). Инсуляторные белки играют ключевую роль в формировании обособленных друг от друга участков генома протяженностью порядка сотен тысяч пар нуклеотидов – топологически ассоциированных доменов (ТАД) (Dixon et al., 2012). Такие участки характеризуются высокой частотой внутренних ДНК-контактов и нередко ограничены сайтами связывания инсуляторных белков, а также активно транскрибируемыми генами (Phillips-Cremins et al., 2013; Rao et al., 2014). Наряду с регуляцией пространственной структуры ядра, инсуляторы вовлечены во множество регуляторных процессов, среди которых активация и репрессия генной экспрессии, альтернативный сплайсинг, паузирование РНК-полимеразы (Shukla et al., 2011; Paredes et al., 2013; Phillips-Cremins, Corces, 2013).

Функция сайленсеров заключается в подавлении экспрессии генов, такая репрессия в основном осуществляется посредством установления репрессивных хроматиновых меток и конкуренции с активирующими белками (Li et al., 2004; Srinivasan, Atchison, 2004; Harris et al., 2005; Lanzuolo et al., 2007; Tiwari et al., 2008).

Идентификация регуляторных элементов генома

Развитие современных методов высокопроизводительного анализа значительно ускорило и упростило поиск потенциальных регуляторных элементов. Предположения о возможной регуляторной роли участка генома обычно

строятся на нескольких типах данных: (1) оценка доступности ДНК для регуляторных белков, (2) наличие характерных эпигенетических детерминант, (3) оценка генной экспрессии и (4) анализ пространственной структуры локуса.

Определенные участки активных регуляторных элементов связаны со специфическими белками, в результате чего, как правило, свободны от нуклеосом. Для идентификации локусов, свободных от нуклеосом и соответствующих потенциальным регуляторным элементам, используются методы оценки доступности ДНК для ДНКазы I (DNase-seq), микрококковой нуклеазы (MNase-seq) и транспозазы Tn5 (assay for transposase-accessible chromatin, ATAC-seq) с последующим анализом высокопроизводительным секвенированием, а также метод FAIRE-seq (Nagy et al., 2003; Gaulton et al., 2010; Song, Crawford, 2010; Buenrostro et al., 2013). Эти методы способны идентифицировать предполагаемые энхансеры, инсуляторы и сайленсеры, но не позволяют напрямую оценить, к какому функциональному классу принадлежит обнаруженный регуляторный элемент (Song et al., 2011; Murtha et al., 2014; Huang et al., 2019).

Геномное картирование специфичных факторов хроматина и гистоновых модификаций также применяется для идентификации отдельных классов регуляторных элементов. Основной метод оценки представленности таких эпигенетических детерминант в том или ином районе генома – это метод иммунопреципитации хроматина с последующим массовым параллельным секвенированием (ChIP-seq). Характерной гистоновой модификацией промоторов является гистон H3, трижды метилированный по остатку лизина в 4-й позиции (H3K4me3) (Bernstein et al., 2005). Монометилирование по этой же позиции гистона H3 ассоциировано с энхансерами, причем одновременное наличие модификации H3K27me3 свидетельствует о подготовленном к активации состоянии энхансера, в то время как наличие H3K27ac – об активном состоянии (Heintzman et al., 2007; Creighton et al., 2010; Rada-Iglesias et al., 2011; Bonn et al., 2012; Arnold et al., 2013). Для энхансеров свойственно обогащение гистоновой ацетилтрансферазой p300 (Visel et al., 2009). Картирование специфических транскрипционных факторов также используется для идентификации энхансеров. Так, например, области ДНК, обогащенные гистоновыми метками активных энхансеров, белками комплекса Mediator и мастер-регуляторами Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 и Esrrb, представляют так называемые супер-энхансеры, контролирующие экспрессию тканеспецифичных наборов генов в эмбриональных стволовых клетках (Whyte et al., 2013). Для идентификации инсуляторов у позвоночных анализируют геномное распределение белка CTCF и кофакторов, задействованных в формировании петель, таких как Rad21 и YY (Dixon et al., 2012, 2015; Nora et al., 2017; Rao et al., 2017). Сайленсеры же, как правило, обогащены гистоновой модификацией H3K27me3, ассоциированной с действием белков-репрессоров группы Polycomb, а также модификациями H3K9me2/3, характерными для гетерохроматина (Barski et al., 2007).

Как уже упоминалось ранее, пространственная организация ядра опосредует взаимодействие целевых локусов

генома и дистальных регуляторных элементов. Пространственную структуру хроматина изучают методами фиксации ДНК-ДНК-контактов, берущими начало от метода 3C (chromosome conformation capture) (Dekker et al., 2002; Tolhuis et al., 2002). Наиболее широко используемый метод HiC позволяет определять ДНК-контакты в масштабах генома и не требует исходных предположений о конкретных контактирующих фрагментах, в отличие от более ранних методов (Gavrilov et al., 2009; Lieberman-Aiden et al., 2009). Комбинации методов анализа пространственной структуры хроматина и иммунопреципитации хроматина (ChIA-PET, HiChIP и PLAC-ChIP) дают возможность устанавливать ДНК-контакты в областях генома, специфически обогащенных конкретными хроматиновыми белками или модификациями гистонов (Fullwood, Ruan, 2009; Fang et al., 2016; Mumbach et al., 2016). Анализ ДНК-ДНК-контактов позволяет идентифицировать промотор-энхансерные взаимодействия, выделять ТАД и более крупные компартменты хроматина.

Полученные в ходе исследовательских работ данные об эпигенетических характеристиках и пространственной организации геномов модельных объектов доступны широкому кругу исследователей и депонируются в базах данных ENCODE, The Epigenome Roadmap, FANTOM и прочих (Birney et al., 2007; Bernstein et al., 2010; Andersson et al., 2014; Forrest et al., 2014; Kellis et al., 2014; Kundaje et al., 2015). Информация из таких открытых источников активно используется для предсказания и поиска потенциальных регуляторных элементов.

Однако необходимо учитывать, что методики анализа взаимодействий белок-ДНК и ДНК-ДНК способны детектировать нефункциональные взаимодействия, это может приводить к получению ложнопозитивных результатов. Локальное обогащение характерными эпигенетическими детерминантами, обнаруженное методом ChIP-seq, не обязательно свидетельствует о наличии регуляторного элемента в данном районе генома (Kvon et al., 2012). Это связано с тем, что для реализации функции регуляторного элемента часто требуется координированное связывание ряда транскрипционных факторов, и наличия только одного из них просто недостаточно (Halfon et al., 2000; Sandmann et al., 2007).

Нефункциональное связывание транскрипционного фактора может быть транзитным и обусловленным общей ДНК-связывающей активностью (Hammag et al., 2012). Метод иммунопреципитации хроматина детектирует такие транзитные взаимодействия, поскольку основан на фиксации хроматина формальдегидом с формированием ковалентных сшивок между ДНК и ассоциированными белками. Некоторое время назад были предложены модификации метода, которые исключают необходимость фиксации хроматина и потенциально улучшают точность метода (Skene, Henikoff, 2017; Kaya-Okur et al., 2019). В вариации метода CUT&RUN используется микрококковая нуклеаза, слитая с белком А (Skene, Henikoff, 2017). Белок А связывается со специфическими антителами на исследуемый белок, а микрококковая нуклеаза вносит разрывы ДНК в области его связывания. Это позволяет выделить короткие геномные фрагменты, обогащенные исследуемым белком, и проанализировать их представлен-

ность высокопроизводительным секвенированием. В методе CUT&TAG вместо нуклеазы используется транспозаза Tn5, что дает возможность одновременно внедрить ДНК-адаптеры для проведения массового параллельного секвенирования, которые будут фланкировать сайт узнавания исследуемого белка (Kaya-Okur et al., 2019). Указанные методы были разработаны сравнительно недавно и пока не получили широкого применения.

Появление ложнопозитивных результатов в экспериментах ChIP-seq также может быть связано с экспериментальными вариациями, такими как режим фрагментации хроматина, глубина секвенирования и величина пороговых значений для идентификации сайтов связывания (Rye et al., 2011; Gomes et al., 2014; Jung et al., 2014). Важно также отметить, что при наличии высоко- и низкоафинных сайтов связывания белков метод ChIP-seq детектирует преимущественно все же высокоафинные (Nettling et al., 2016). Такая особенность также является ограничением метода, поскольку появляется все больше свидетельств в пользу того, что неоптимальные сайты связывания транскрипционных факторов в составе энхансеров необходимы для тонкой регуляции активности генов в ходе развития (Crocker et al., 2015, 2016; Farley et al., 2015).

Помимо технических ограничений методов анализа, важно отметить, что нередко функциональные регуляторные элементы демонстрируют наличие эпигенетических детерминант, в целом не характерных для их класса. В качестве примера можно привести экспериментально обнаруженные сайленсеры в культурах клеток K562 и HepG2B, которые, согласно данным базы ENCODE, помимо обогащения репрессивными гистоновыми модификациями H3K9me3 и H3K27me3, содержали также гистоновые метки активного хроматина H3K36me3 и H3K79me2 (Pang, Snyder, 2020). Ввиду экспериментальных ограничений методов, вариабельности функций эпигенетических детерминант и участия множества компонентов в реализации функций элементов генома определение их регуляторной роли часто требует той или иной функциональной проверки.

Методы исследования энхансеров

Основными методами оценки функциональной роли регуляторных элементов генома являются вариации репортерного анализа. Одной из первых работ, в которой была продемонстрирована функциональная роль регуляторных элементов генома, была посвящена исследованию энхансера раннего гена вируса SV40 (Banerji et al., 1981). В ней показано, что фрагмент ДНК из двух повторов протяженностью 72 п. н., расположенный в районе 5'-конца раннего гена вируса SV40, в составе генетической конструкции способен более чем в 200 раз активировать экспрессию гена β-глобина кролика в клетках HeLa (Banerji et al., 1981).

Стандартные генетические конструкции, используемые для анализа активности энхансеров, содержат репортерный ген под контролем минимального промотора, который не способен обеспечить экспрессию без дополнительного активирующего воздействия. В состав конструкции вводят геномную последовательность энхансера, причем она может располагаться как перед промотором, так и за

кодирующей последовательностью репортерного гена. Полученной конструкцией трансформируют клетки и оценивают изменение экспрессии репортерного гена относительно контрольной конструкции, в которой отсутствует потенциальный энхансер.

Одна из первых работ, направленная на функциональное тестирование энхансеров в масштабе всего генома *in vivo*, была основана на принципах классического репортерного анализа (Kvon et al., 2014). Для исследования было использовано около 8000 линий *Drosophila melanogaster*, содержащих в одном и том же участке генома трансгенную конструкцию, состоящую из последовательно расположенных: потенциального энхансера, минимального промотора и гена белка Gal4. Методом *in situ* гибридизации оценивалась экспрессия Gal4 на разных стадиях эмбриогенеза, причем для каждого потенциального регуляторного элемента было проанализировано по 400 эмбрионов, находящихся на разных стадиях развития. Было идентифицировано более трех тыс. энхансеров. Около четверти из них были расположены вблизи регулируемых генов и чуть более четверти – на удалении в 20–100 т. п. н., в среднем же они находились на расстоянии в 10 т. п. н. от генов-мишеней (Kvon et al., 2014). Ориентировочно треть обнаруженных энхансеров располагалась в межгенных областях регулируемых генов. Впоследствии также было функционально подтверждено, что энхансеры способны регулировать не только близлежащие, но и расположенные через один либо два гены (Kvon et al., 2014). Полученные данные значительно расширили представления о фундаментальных принципах функционирования энхансеров, однако выполнение подобных проектов требует колоссальных затрат времени и ресурсов.

Методы высокопроизводительного репортерного анализа энхансеров

Методы высокопроизводительного репортерного анализа пришли на смену классическим подходам и позволяют исследовать тысячи регуляторных последовательностей в одном эксперименте. Можно выделить два принципиальных подхода для проведения таких исследований (рис. 1). В рамках первого в составе репортерных конструкций под контролем фрагмента генома – потенциального энхансера и минимального промотора – располагается репортерный ген, содержащий перед сигналом полиаденилирования вырожденную короткую нуклеотидную последовательность – ДНК-баркод (см. рис. 1, а). В случае активации экспрессии репортерного гена, ДНК-баркод будет содержаться на 3'-конце его транскрипта. Высокопроизводительным секвенированием полученного пула конструкций определяют уникальные ДНК-баркоды, соответствующие каждому из исследуемых фрагментов генома (рис. 2). После проведения трансгенеза с использованием таких конструкций выполняется анализ представленности ДНК-баркодов методом высокопроизводительного анализа транскриптома (RNA-seq). Уровень экспрессии того или иного ДНК-баркода позволяет сделать вывод об активирующей способности соответствующего ему конкретного регуляторного элемента. Данный подход лежит в основе методов количественной оценки активности фрагментов

генома, объединенных термином MPRA (massive parallel reporter assay), вариации которых будут рассмотрены в представленном обзоре (Kwasnieski et al., 2012, 2014; Melnikov et al., 2012; Kheradpour et al., 2013; Maricque et al., 2017).

Второй принципиальный подход позволяет оценить качественную способность фрагмента генома проявлять свойства энхансеров. На первом этапе подготавливается пул генетических конструкций, последовательно содержащих исследуемый фрагмент генома, минимальный промотор и репортерный ген, кодирующий флуоресцентный белок либо люциферазу. На следующем этапе проводится трансгенез полученным пулом конструкций и при помощи проточной цитометрии отбираются клетки, экспрессирующие флуоресцентный белок. Активация экспрессии репортерного гена означает, что фрагмент генома, содержащийся в составе конструкции, способен демонстрировать свойства энхансера. Из полученных клеток выделяют ДНК, амплифицируют фрагменты конструкций, соответствующих исследуемым фрагментам генома, и осуществляют массовое параллельное секвенирование для идентификации конкретных фрагментов генома, обнаруживающих свойства энхансеров. К таким методам можно отнести FIREWACH и SIF-seq (Dickel et al., 2014; Murtha et al., 2014) (см. рис. 1, б, в).

В настоящее время используют и комбинации двух подходов, описанных выше, когда на первом этапе методами проточной цитометрии отбирают клетки, несущие конструкции, содержащие потенциальные энхансеры. Затем количественно оценивают активирующую способность конкретных фрагментов генома посредством анализа представленности ДНК-баркодов методом RNA-seq (Maricque et al., 2018).

Методы MPRA-анализа успешно применяются для исследования активирующих свойств нуклеотидной последовательности энхансеров, функционального влияния мотивов связывания регуляторных белков, а также для поиска и валидации энхансеров. С помощью такой методологии изучали влияние одиночных мутаций в составе трех энхансеров, активных в клетках печени, – ALDOB, ECR11 и LTV1 (Patwardhan et al., 2012). Для этого была синтезирована ДНК-библиотека, содержащая более 100000 мутированных вариантов исследуемых энхансеров. Такие фрагменты были клонированы в конструкции, содержащие минимальный промотор, ген люциферазы и транскрибируемые ДНК-баркоды. Полученные ДНК-библиотеки вводили в печень мышей, и спустя сутки транскриптом клеток печени был проанализирован методом RNA-seq (Kim, Ahituv, 2013).

В результате анализа установлено, что большинство одиночных мутаций оказывали слабый эффект на активность исследуемых энхансеров. Кроме того, показано, что нарушающие функцию энхансера мутации затрагивают предсказанные биоинформатическими методами сайты связывания активных в клетках печени транскрипционных факторов HNF4 и HNF1 (Kel et al., 2003). Важно отметить, что эксперимент также продемонстрировал серьезные расхождения в теории и практике. Так, в составе энхансера ECR11 мутации, вызывающие функциональные нарушения, были сконцентрированы в районе, не содержа-

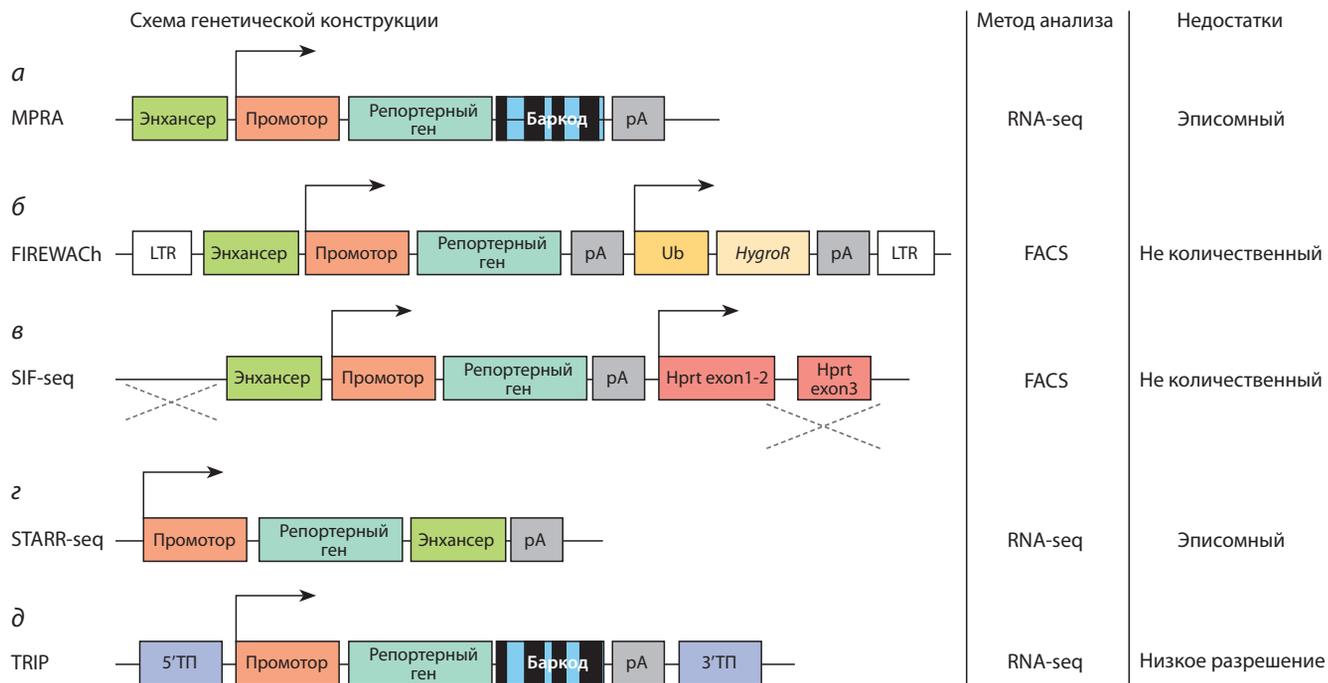


Рис. 1. Схема генетических конструкций, используемых для проведения MPRA-анализа (a–г) и метода TRIP.

pA – сигнал полиаденилирования; LTR – длинный концевой повтор; Ub – промотор убиквитина; *HygroR* – ген резистентности к гигромицину; Hprt exon – экзон гена *Hprt*.

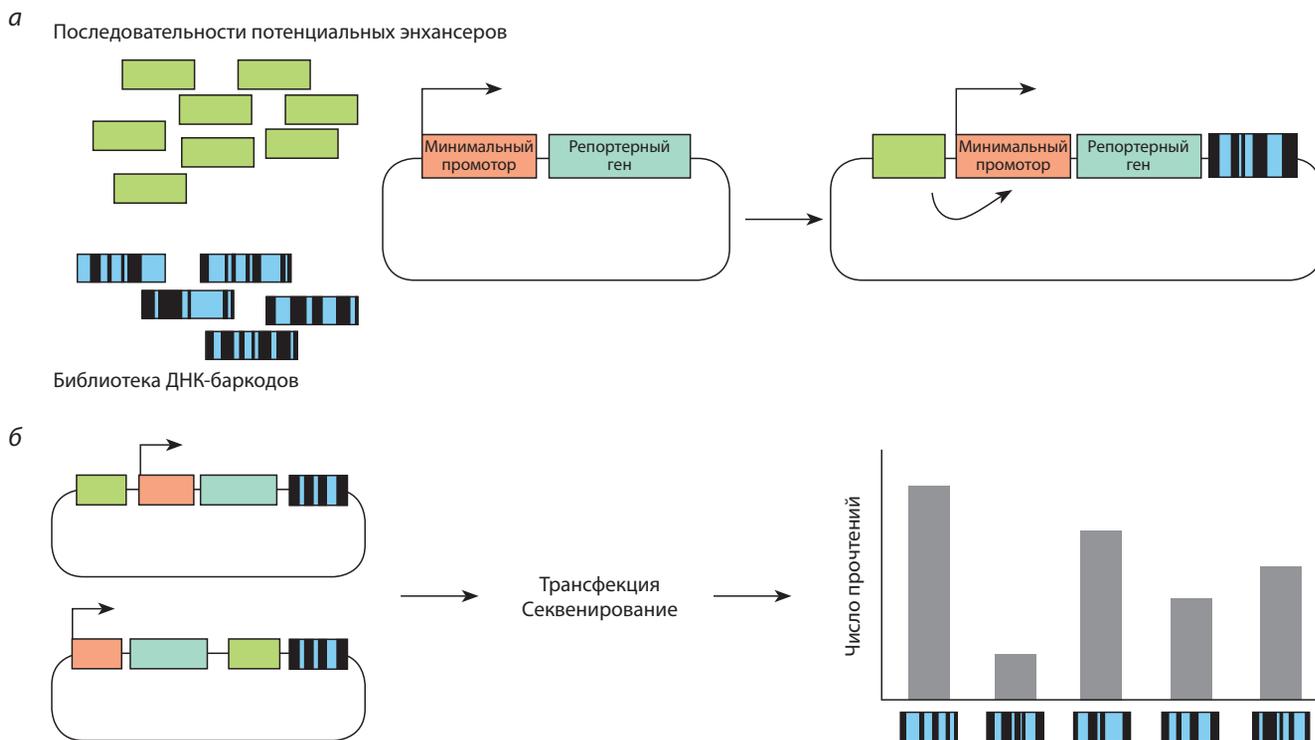


Рис. 2. Принцип работы методов MPRA-анализа.

а – на первом этапе MPRA-анализа готовят пул потенциальных регуляторных последовательностей. Для получения таких последовательностей используются технологии синтеза либо обогащение методами иммунопреципитации хроматина и пр. Затем создают пул генетических конструкций, содержащих минимальный промотор и репортерный ген под контролем исследуемых регуляторных элементов. Каждому регуляторному элементу в составе таких конструкций соответствует уникальный ДНК-баркод, располагающийся на конце кодирующей последовательности репортерного гена; **б** – после проведения трансфекции клеток полученными конструкциями, в случае если исследуемый регуляторный элемент проявляет свойства энхансера, происходит активация экспрессии репортерного гена. Методом RNA-seq оценивается уровень экспрессии уникальных ДНК-баркодов в транскриптоме клетки. Нормализация на представленность ДНК-баркодов в исходном пуле генетических конструкций и установление соответствия уникальных ДНК-баркодов конкретным ДНК-фрагментам позволяют сделать вывод о наличии регуляторной функции последних.

щем предсказанных сайтов связывания транскрипционных факторов, мутации же в области, имеющей большинство таких предсказанных сайтов, не приводили к изменению активности энхансера. С одной стороны, это наглядно демонстрирует, что MPRA-анализ применим для уточнения границ энхансеров, а с другой, подчеркивает важность экспериментальной проверки предиктивных данных.

Методологию MPRA также используют для *de novo* поиска и валидации предсказанных энхансеров. Элегантный подход поиска энхансеров был реализован в методе STARR-seq (Arnold et al., 2013) (см. рис. 1, з). Авторы использовали способность энхансеров активировать экспрессию вне зависимости от положения относительно гена и разработали репортерные конструкции, в составе которых за минимальным промотором следовала открытая рамка считывания, в которую клонировали исследуемый фрагмент генома. После трансформации клеток такими конструкциями, в случае если участок генома проявляет энхансерную функцию, это будет приводить к его транскрипции. Уровень же представленности этого фрагмента в транскриптоме клетки позволяет сделать вывод о выраженности активирующей функции. Такой подход полностью исключает необходимость применения ДНК-баркодов, поскольку в их роли выступают сами исследуемые фрагменты.

Для проведения эксперимента была подготовлена библиотека плазмид, содержащих миллионы случайных фрагментов генома плодовой мушки. После трансфекции культуры клеток S2 был проведен высокопроизводительный анализ профиля транскрипции методом RNA-seq. Были идентифицированы тысячи геномных фрагментов, демонстрирующих свойства энхансеров. Наиболее активные из них находились вблизи генов домашнего хозяйства и транскрипционных факторов, контролирующих развитие. Показано также, что около трети фрагментов, проявляющих ярко выраженные активирующие свойства, в геноме клеток S2 располагались в областях закрытого хроматина, в котором отсутствовала модификация активных энхансеров H3K27ac. Таким образом, маловероятно, что в геноме исследуемых клеток эти фрагменты способны выполнять роль энхансеров, и эта находка, скорее, подчеркивает некоторые ограничения эписомных методов MPRA, которые будут рассмотрены ниже.

Интересная модификация метода STARR-seq была использована в работе по исследованию энхансеров в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) человека (Barakat et al., 2018). В оригинальной работе (Arnold et al., 2013) ДНК-библиотеки были созданы путем ультразвуковой дезинтеграции геномной ДНК *D. melanogaster* и массового клонирования полученных фрагментов. Однако такой подход плохо применим для более крупных геномов, поскольку достижение достаточной представленности регуляторных элементов в итоговых ДНК-библиотеках – крайне затруднительная задача. Действительно, согласно расчетным данным, применение оригинального метода STARR-seq для исследования регуляторных элементов генома мыши потребует создания более 200 млн уникальных конструкций (Murtha et al., 2014). Экспериментальная проверка показала, что использование плазмидной библиотеки, содержащей 1.3 млн уникальных фрагмен-

тов генома человека, позволило идентифицировать лишь шесть энхансеров (Murtha et al., 2014).

Для преодоления этого ограничения был предложен метод ChIP-STARR-seq, в рамках которого на первом этапе методом иммунопреципитации хроматина проводили выделение фрагментов генома, обогащенных транскрипционными факторами OCT4, NANOG, а также гистоновыми модификациями H3K4me1 и H3K27ac (Barakat et al., 2018). Полученные ДНК-фрагменты затем были клонированы в состав ДНК-библиотек, аналогичных используемым в оригинальном методе. Было установлено, что только часть фрагментов генома, демонстрирующих обогащение указанными факторами, проявляла энхансерную активность. Лишь около 25 % фрагментов, связанных OCT4, демонстрировали свойства энхансеров. Для фрагментов, обогащенных NANOG и гистоновыми модификациями H3K4me1 и H3K27ac, эта доля составила 15, 9 и 10 % соответственно. Показано, что ни отдельные факторы, ни их комбинации не способны однозначно предсказать энхансеры. Кроме того, выявлена группа энхансеров, ассоциированных с регуляцией общих клеточных процессов, которые ранее не были обнаружены в эмбриональных стволовых клетках. Оказалось, что такие энхансеры демонстрируют достаточно слабое обогащение ТФ OCT4 и NANOG, а также гистоновой модификацией H3K4me1, и, вероятно, по этой причине раньше их не детектировали в поисковых работах на основе метода иммунопреципитации хроматина.

Депонированная в базах данных информация о геномном распределении гистоновых модификаций и регуляторных белков, а также доступности хроматина дает возможность предполагать, какие участки генома способны проявлять свойства энхансеров. С применением MPRA-методологии исследована активность регуляторных элементов клеток K562 и эмбриональных стволовых клеток человека E1, идентифицированных на основе анализа структуры хроматина и аннотированных в базе ENCODE (Kwasniewski et al., 2014). Оказалось, что лишь около четверти из них оказывали влияние на экспрессию генов, что подчеркивает важность подобной экспериментальной проверки (Kwasniewski et al., 2014). Вместе с тем подобный эффект может быть обусловлен экспериментальными ограничениями описанных методов MPRA. Например, тем фактом, что описанные выше подходы являются эписомными – репортерные конструкции не встраиваются в геном, а значит, активность энхансеров оценивается вне хроматинового контекста. Значительные отличия в активности энхансеров в составе плазмид и при интеграции в геном были подтверждены и экспериментально (Inoue et al., 2017).

Такое экспериментальное расхождение выглядит логичным, ведь наблюдение о влиянии структуры хроматина на регуляцию генов было продемонстрировано в классических генетических экспериментах еще в начале прошлого века (Muller, 1930). Применение оригинального высокопроизводительного метода репортерного анализа (метод TRIP), пересекающегося с MPRA-подходами, позволило детализировать локальные эффекты хроматина на экспрессию генов в эмбриональных стволовых клетках мыши (Akhtar et al., 2013) (рис. 1, д). В этом исследова-

нии с использованием системы геномной интеграции на основе транспозазы PiggyBac в геном клеток были случайным образом встроены репортерные конструкции, содержащие на 3'-конце репортерного гена уникальные ДНК-баркоды.

На следующем этапе такие встройки были прокартированы, и каждый ДНК-баркод ассоциирован с конкретным геномным локусом. Суммарно было получено более 17 тыс. таких встроек. Далее при помощи метода RNA-seq были проанализированы представленности ДНК-баркодов, что позволило оценить транскрипционную активность каждой встройки и влияние на нее локальной структуры хроматина. Репортерные конструкции, интегрированные в районы компактизованного хроматина и области доменов, ассоциированных с ядерной ламиной, ожидаемо демонстрировали сниженный уровень экспрессии. Репортерные же конструкции, располагающиеся в пределах 200 т. п. н. от активных генов, также транскрибировались более активно. Интересно, что приблизительно в таких же границах наблюдалась повышенная встречаемость энхансеров. Энхансеры оказывали активирующее влияние на экспрессию репортерных конструкций на удалении вплоть до 20 т. п. н. Важно отметить, что в данном случае речь идет о линейном расстоянии и не учитывается пространственная структура хроматина. Предполагается, что формирование протяженных активно транскрибирующихся участков обусловлено воздействием нескольких энхансеров. Это дополнительно подчеркивает необходимость исследования регуляторных элементов в условиях, приближенных к нативным.

Влияние хроматина на функцию регуляторных элементов в той или иной степени учитывается в методах MPRA-анализа, подразумевающих геномную интеграцию репортерной конструкции (Dickel et al., 2014; Murtha et al., 2014; Maricque et al., 2017, 2018). Методы FIREWACH и SIF-seq были использованы для идентификации энхансеров в ЭСК мыши, однако не позволяли оценивать активность регуляторных элементов количественно (см. общее описание подходов выше) (Dickel et al., 2014; Murtha et al., 2014).

Метод FIREWACH основан на геномной интеграции репортерных конструкций при помощи лентивирусной трансдукции (см. рис. 1, б). Такой метод геномной интеграции, хотя и демонстрирует некоторые закономерности, все же обеспечивает встройки конструкции в случайные области генома (Yang et al., 2008). Следовательно, адекватное сравнение активности различных регуляторных элементов затруднительно, поскольку с высокой долей вероятности репортерные конструкции будут встраиваться в различные участки генома с непредсказуемым влиянием локального хроматинового окружения.

Метод SIF-seq лишен этого недостатка, поскольку интеграция репортерных конструкций осуществляется в один и тот же участок генома, расположенный в районе гена *Hprt* (Dickel et al., 2014) (см. рис. 1, в). Однако в этом случае все тестируемые регуляторные элементы потенциально оказываются в одинаковом хроматиновом окружении. Поскольку корректная работа энхансера определяется специфическим набором хроматиновых

факторов, высока вероятность того, что он станет нефункционален, будучи перенесенным в нетождественное хроматиновое окружение.

Рассмотренные выше подходы не позволяли ответить на один из основополагающих вопросов в области понимания принципов работы энхансеров, а именно, в какой степени их активность определяется последовательностью ДНК, а в какой – свойствами окружающего хроматина? Систематическое исследование этого вопроса проведено в работе, в которой было изучено влияние различного хроматинового окружения на сравнительную активность энхансеров (Maricque et al., 2018). В этом исследовании были подготовлены 15 линий клеток K562, содержащих единичные встройки репортерных конструкций, располагающиеся в различном хроматиновом окружении и содержащие сайты распознавания Cre-рекомбиназы (*loxP*), позволяющие направленно встраивать трансгены. Важно отметить, что в составе таких встроек за пределами фланкированного *loxP*-сайтами фрагмента находились ДНК-баркод и сигнал полиаденилирования, причем каждой линии соответствовал единственный уникальный ДНК-баркод.

Описанные линии были объединены в общий пул, с использованием которого проводили Cre-опосредованную направленную интеграцию конструкций, содержащих репортерный ген, оканчивающийся транскрибируемым вырожденным ДНК-баркодом, под контролем минимального промотора и исследуемого фрагмента генома. В качестве таких фрагментов были 300 искусственно синтезированных регуляторных элементов, которые ранее были исследованы методом эписомного MPRA-анализа и ранжированы по уровню активности (Kwasnieski et al., 2014). Для каждого геномного фрагмента предварительно были установлены соответствующие им уникальные ДНК-баркоды. При успешной интеграции происходила замена исходной *loxP*-кассеты на репортерную конструкцию, содержащую предполагаемые энхансеры. Причем в случае активации репортерного гена в его составе будут транскрибироваться два ДНК-баркода, один из которых позволяет установить исследуемый регуляторный элемент, а второй – определить, в клетки какой линии произошла встройка, и, следовательно, выяснить, в каком хроматиновом окружении находится данная репортерная конструкция. Анализ представленности комбинаций ДНК-баркодов в транскриптоме клеток дал возможность оценить уровень активности исследуемых регуляторных элементов в различном хроматиновом окружении. Было установлено, что хроматиновое окружение ожидаемо оказывает серьезный эффект на активность цис-элементов. Однако в одном и том же хроматиновом окружении сравнительная активность различных регуляторных элементов сохраняется. Продемонстрировано также, что активность промотора влияет на экспрессию репортерных конструкций, но вместе с тем не меняет сравнительную активность регуляторных элементов. Полученные результаты свидетельствуют в пользу модели, согласно которой нуклеотидная последовательность энхансера определяет его общую активность, которая уже модулируется структурой хроматинового окружения.

Заклучение

Методы MPRA дают возможность детально исследовать регуляторный потенциал фрагментов генома и служат удобным инструментом для исследования влияния вариаций нуклеотидной последовательности на их функцию. Однако необходимо отметить ограничения методов, которые должны учитываться при интерпретации полученных результатов. Общим недостатком всех вариаций методов MPRA – это необходимость использования минимального промотора, который не способен активировать экспрессию репортерного гена в отсутствие энхансера, поскольку наличие базальной активности может существенно исказить результаты. Вместе с тем выбранный промотор может в значительной мере воздействовать на активность конкретного энхансера (Zabidi et al., 2015; Maricque et al., 2018). Идеальным экспериментом представляется анализ активности энхансеров в комбинации с различными промоторами, однако выполнение таких работ представляется крайне сложным и трудоемким.

Синтез фрагментов ДНК, используемых в качестве исследуемых регуляторных элементов, накладывает ограничения на общую длину такого фрагмента. Как правило, длина исследуемых фрагментов ограничена приблизительно 200 п. н., что часто усложняет анализ вклада остальных участков энхансеров, выпадающих за эти пределы (Kwasniewski et al., 2014). Основанные на эписомных конструкциях методы MPRA не учитывают возможного влияния хроматинового окружения на регуляторный элемент, поэтому могут быть использованы для исследования непосредственной активирующей способности последовательности ДНК. Методы MPRA, включающие геномную интеграцию репортерных конструкций, позволяют в некоторой степени преодолеть это ограничение. Однако случайная или сайт-специфичная интеграция все же не может обеспечить исследование активности регуляторного элемента в нативном хроматиновом окружении. Это является серьезным ограничением методов MPRA, поскольку функция регуляторного геномного элемента зависит от структуры окружающего хроматина и пространственной организации локуса.

Современные методы высокопроизводительного направленного мутагенеза CRISPR/Cas9, а также методы направленной модуляции экспрессии, использующие инактивированную форму эндонуклеазы Cas9 (dCas9), слитой с активаторными либо репрессорными белками, позволяют исследовать регуляторные элементы в нативном геномном окружении (Chavez et al., 2015; Sanjana et al., 2016; Canver et al., 2017; Li et al., 2020). При очевидных преимуществах, такие методы также не лишены потенциальных недостатков. Например, точечные замены, возникающие в результате направленного мутагенеза, могут оказаться недостаточными для нарушения функции энхансера. Кроме того, направленный мутагенез сопряжен с ошибками в распознавании целевых районов генома, потенциально усложняющими интерпретацию полученных результатов.

Важно отметить, что белок-репрессор KRAB, широко используемый для направленной инактивации энхансеров, может инициировать формирование участков гетерохроматина протяженностью 1–2 т. п. н. (Gasparini et al.,

2019). Эта особенность может снижать разрешающую способность метода и усложнить определение конкретных функциональных фрагментов энхансера, а также усилить нежелательные побочные эффекты в случае наличия ошибочных сайтов узнавания dCas9. Помимо возможных технических сложностей, в случае успешного нарушения функции энхансера фенотипические проявления могут достаточно быстро восстанавливаться за счет предположительного существования дублирующих энхансеров (Diao et al., 2016).

Технологии MPRA и высокопроизводительные методы на основе системы CRISPR/Cas9, скорее, являются взаимодополняющими для детального описания регуляторных функций исследуемых фрагментов генома. Вместе с обширными массивами накопленных данных о структуре и пространственной организации хроматина в различных клетках и тканях использование таких методов дает возможность значительно продвинуться в области понимания механизмов точной регуляции экспрессии генов в ходе развития и при различных патологиях. Все это позволяет надеяться, что в скором времени современная геномика сможет перейти от подробного функционального описания регуляторных элементов к созданию количественных биологических моделей регуляции генной экспрессии.

Список литературы / References

- Akhtar-Zaidi B., Cowper-Sal-lari R., Corradin O., Saiakhova A., Bartels C.F., Balasubramanian D., Myeroff L., Lutterbaugh J., Jarrar A., Kalady M.F., Willis J., Moore J.H., Tesar P.J., Laframboise T., Markowitz S., Lupien M., Scacheri P.C. Epigenomic enhancer profiling defines a signature of colon cancer. *Science*. 2012;336:736-739.
- Akhtar W., de Jong J., Pindyurin A.V., Pagie L., Meuleman W., de Ridder J., Berns A., Wessels L.F., van Lohuizen M., van Steensel B. Chromatin position effects assayed by thousands of reporters integrated in parallel. *Cell*. 2013;154:914-927.
- Andersson R., Gebhard C., Miguel-Escalada I., Hoof I., Bornholdt J., Boyd M., Chen Y., ..., Suzuki H., Hayashizaki Y., Muller F., Forrest A.R.R., Carninci P., Rehli M., Sandelin A. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*. 2014;507:455-461.
- Andersson R., Sandelin A. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet.* 2020;21:71-87.
- Arnold C.D., Gerlach D., Stelzer C., Boryn L.M., Rath M., Stark A. Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq. *Science*. 2013;339:1074-1077.
- Banerji J., Rusconi S., Schaffner W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*. 1981;27:299-308.
- Barakat T.S., Halbritter F., Zhang M., Rendeiro A.F., Perenthaler E., Bock C., Chambers I. Functional dissection of the enhancer repertoire in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2018;23:276-288 e278.
- Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y., Schones D.E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007;129:823-837.
- Bernstein B.E., Kamal M., Lindblad-Toh K., Bekiranov S., Bailey D.K., Huebert D.J., McMahon S., Karlsson E.K., Kulbokas E.J. 3rd, Gingeras T.R., Schreiber S.L., Lander E.S. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. 2005;120:169-181.
- Bernstein B.E., Stamatoyannopoulos J.A., Costello J.F., Ren B., Milosavljevic A., Meissner A., Kellis M., Marra M.A., Beaudet A.L., Ecker J.R., Farnham P.J., Hirst M., Lander E.S., Mikkelsen T.S., Thomson J.A. The NIH roadmap epigenomics mapping consortium. *Nat. Biotechnol.* 2010;28:1045-1048.

- Birney E., Stamatoyannopoulos J.A., Dutta A., Guigo R., Gingeras T.R., Margulies E.H., Weng Z., ..., Lander E.S., Koriabine M., Nefedov M., Osoegawa K., Yoshinaga Y., Zhu B., de Jong P.J. Identification and analysis of functional elements in 1 % of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007;447:799-816.
- Bonn S., Zinzen R.P., Girardot C., Gustafson E.H., Perez-Gonzalez A., Delhomme N., Ghavi-Helm Y., Wilczynski B., Riddell A., Furlong E.E. Tissue-specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. *Nat. Genet.* 2012;44:148-156.
- Bradner J.E., Hnisz D., Young R.A. Transcriptional addiction in cancer. *Cell*. 2017;168:629-643.
- Buenrostro J.D., Giresi P.G., Zaba L.C., Chang H.Y., Greenleaf W.J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods*. 2013;10:1213-1218.
- Cai H., Levine M. Modulation of enhancer-promoter interactions by insulators in the *Drosophila* embryo. *Nature*. 1995;376:533-536.
- Canver M.C., Bauer D.E., Orkin S.H. Functional interrogation of non-coding DNA through CRISPR genome editing. *Methods*. 2017; (121-122):118-129.
- Chatterjee S., Ahituv N. Gene regulatory elements, major drivers of human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2017;18:45-63.
- Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B.W., Tuttle M., Eswar P.R.I., Lin S., Kiani S., Guzman C.D., Wiegand D.J., Ter-Ovanesyan D., Braff J.L., Davidsohn N., Housden B.E., Perrimon N., Weiss R., Aach J., Collins J.J., Church G.M. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat. Methods*. 2015;12:326-328.
- Corradin O., Saiakhova A., Akhtar-Zaidi B., Myeroff L., Willis J., Cowper-Sallari R., Lupien M., Markowitz S., Sacheri P.C. Combinatorial effects of multiple enhancer variants in linkage disequilibrium dictate levels of gene expression to confer susceptibility to common traits. *Genome Res*. 2014;24:1-13.
- Creyghton M.P., Cheng A.W., Welstead G.G., Kooistra T., Carey B.W., Steine E.J., Hanna J., Lodato M.A., Frampton G.M., Sharp P.A., Boyer L.A., Young R.A., Jaenisch R. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107:21931-21936.
- Crocker J., Abe N., Rinaldi L., McGregor A.P., Frankel N., Wang S., Alsawadi A., Valenti P., Plaza S., Payne F., Mann R.S., Stern D.L. Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. *Cell*. 2015;160:191-203.
- Crocker J., Noon E.P., Stern D.L. The soft touch: low-affinity transcription factor binding sites in development and evolution. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2016;117:455-469.
- Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. Capturing chromosome conformation. *Science*. 2002;295:1306-1311.
- Diao Y., Li B., Meng Z., Jung I., Lee A.Y., Dixon J., Maliskova L., Guan K.L., Shen Y., Ren B. A new class of temporarily phenotypic enhancers identified by CRISPR/Cas9-mediated genetic screening. *Genome Res*. 2016;26:397-405.
- Dickel D.E., Ypsilanti A.R., Pla R., Zhu Y., Barozzi I., Mannion B.J., Khin Y.S., Fukuda-Yuzawa Y., Plajzer-Frick I., Pickle C.S., Lee E.A., Harrington A.N., Pham Q.T., Garvin T.H., Kato M., Osterwalder M., Akiyama J.A., Afzal V., Rubenstein J.L.R., Pennacchio L.A., Visel A. Ultraconserved enhancers are required for normal development. *Cell*. 2018;172:491-499.e415.
- Dickel D.E., Zhu Y., Nord A.S., Wylie J.N., Akiyama J.A., Afzal V., Plajzer-Frick I., Kirkpatrick A., Gottgens B., Bruneau B.G., Visel A., Pennacchio L.A. Function-based identification of mammalian enhancers using site-specific integration. *Nat. Meth.* 2014;11:566-571.
- Dixon J.R., Jung I., Selvaraj S., Shen Y., Antosiewicz-Bourget J.E., Lee A.Y., Ye Z., Kim A., Rajagopal N., Xie W., Diao Y., Liang J., Zhao H., Lobanenkov V.V., Ecker J.R., Thomson J.A., Ren B. Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation. *Nature*. 2015;518:331-336.
- Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 2012;485:376-380.
- Ernst J., Kheradpour P., Mikkelsen T.S., Shores N., Ward L.D., Epstein C.B., Zhang X., Wang L., Issner R., Coyne M., Ku M., Durham T., Kellis M., Bernstein B.E. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. 2011;473:43-49.
- Fang R., Yu M., Li G., Chee S., Liu T., Schmitt A.D., Ren B. Mapping of long-range chromatin interactions by proximity ligation-assisted ChIP-seq. *Cell Res*. 2016;26:1345-1348.
- Farley E.K., Olson K.M., Zhang W., Brandt A.J., Rokhsar D.S., Levine M.S. Suboptimization of developmental enhancers. *Science*. 2015;350:325-328.
- Forrest A.R., Kawaji H., Rehli M., Baillie J.K., de Hoon M.J., Haberland V., Lassmann T., ..., Bajic V.B., Taylor M.S., Makeev V.J., Sandelin A., Hume D.A., Carninci P., Hayashizaki Y. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*. 2014;507:462-470.
- Fullwood M.J., Ruan Y. ChIP-based methods for the identification of long-range chromatin interactions. *J. Cell. Biochem.* 2009;107:30-39.
- Furlong E.E.M., Levine M. Developmental enhancers and chromosome topology. *Science*. 2018;361:1341-1345.
- Gasparini M., Hill A.J., McFaline-Figueroa J.L., Martin B., Kim S., Zhang M.D., Jackson D., Leith A., Schreiber J., Noble W.S., Trapnell C., Ahituv N., Shendure J. A genome-wide framework for mapping gene regulation via cellular genetic screens. *Cell*. 2019;176:1516.
- Gaulton K.J., Nammo T., Pasquali L., Simon J.M., Giresi P.G., Fogarty M.P., Panhuis T.M., Mieczkowski P., Secchi A., Bosco D., Berney T., Montanya E., Mohlke K.L., Lieb J.D., Ferrer J. A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nat. Genet.* 2010;42:255-259.
- Gavrilov A., Eivazova E., Priozhkova I., Lipinski M., Razin S., Vasetsky Y. Chromosome conformation capture (from 3C to 5C) and its ChIP-based modification. *Methods Mol. Biol.* 2009;567:171-188.
- Geyer P.K., Corces V.G. DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev*. 1992;6:1865-1873.
- Ghavi-Helm Y., Klein F.A., Pakozdi T., Ciglar L., Noordermeer D., Huber W., Furlong E.E. Enhancer loops appear stable during development and are associated with paused polymerase. *Nature*. 2014; 512:96-100.
- Gomes A.L., Abeel T., Peterson M., Azizi E., Lyubetskaya A., Carvalho L., Galagan J. Decoding ChIP-seq with a double-binding signal refines binding peaks to single-nucleotides and predicts cooperative interaction. *Genome Res*. 2014;24:1686-1697.
- Halfon M.S., Carmena A., Gisselbrecht S., Sackerson C.M., Jimenez F., Baylies M.K., Michelson A.M. Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell*. 2000;103:63-74.
- Hammar P., Leroy P., Mahmutovic A., Marklund E.G., Berg O.G., Elf J. The lac repressor displays facilitated diffusion in living cells. *Science*. 2012;336:1595-1598.
- Harris M.B., Mostecky J., Rothman P.B. Repression of an interleukin-4-responsive promoter requires cooperative BCL-6 function. *J. Biol. Chem.* 2005;280:13114-13121.
- Heintzman N.D., Stuart R.K., Hon G., Fu Y., Ching C.W., Hawkins R.D., Barrera L.O., Van Calcar S., Qu C., Ching K.A., Wang W., Weng Z., Green R.D., Crawford G.E., Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* 2007;39:311-318.
- Huang D., Petrykowska H.M., Miller B.F., Elnitski L., Ovcharenko I. Identification of human silencers by correlating cross-tissue epigenetic profiles and gene expression. *Genome Res*. 2019;29:657-667.
- Inoue F., Kircher M., Martin B., Cooper G.M., Witten D.M., McManus M.T., Ahituv N., Shendure J. A systematic comparison reveals substantial differences in chromosomal versus episomal encoding of enhancer activity. *Genome Res*. 2017;27:38-52.

- Jung Y.L., Luquette L.J., Ho J.W., Ferrari F., Tolstorukov M., Minoda A., Issner R., Epstein C.B., Karpen G.H., Kuroda M.I., Park P.J. Impact of sequencing depth in ChIP-seq experiments. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:e74.
- Kaya-Okur H.S., Wu S.J., Codomo C.A., Pledger E.S., Bryson T.D., Henikoff J.G., Ahmad K., Henikoff S. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. *Nat. Commun.* 2019;10:1930.
- Kel A.E., Gossling E., Reuter I., Cheremushkin E., Kel-Margoulis O.V., Wingender E. MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3576-3579.
- Kellis M., Wold B., Snyder M.P., Bernstein B.E., Kundaje A., Marinov G.K., Ward L.D., Birney E., Crawford G.E., Dekker J., Dunham I., Elnitski L.L., Farnham P.J., Feingold E.A., Gerstein M., Giddings M.C., Gilbert D.M., Gingeras T.R., Green E.D., Guigo R., Hubbard T., Kent J., Lieb J.D., Myers R.M., Pazin M.J., Ren B., Stamatoyannopoulos J.A., Weng Z., White K.P., Hardison R.C. Defining functional DNA elements in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111:6131-6138.
- Kellum R., Schedl P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell.* 1991;64:941-950.
- Kellum R., Schedl P. A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12:2424-2431.
- Kheradpour P., Ernst J., Melnikov A., Rogov P., Wang L., Zhang X., Alston J., Mikkelsen T.S., Kellis M. Systematic dissection of regulatory motifs in 2000 predicted human enhancers using a massively parallel reporter assay. *Genome Res.* 2013;23:800-811.
- Kim M.J., Ahituv N. The hydrodynamic tail vein assay as a tool for the study of liver promoters and enhancers. *Methods Mol. Biol.* 2013;1015:279-289.
- Kundaje A., Meuleman W., Ernst J., Bilenky M., Yen A., Heravi-Mousavi A., Kheradpour P., ..., Hirst M., Meissner A., Milosavljevic A., Ren B., Stamatoyannopoulos J.A., Wang T., Kellis M. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature.* 2015;518:317-330.
- Kvon E.Z., Kazmar T., Stampfel G., Yanez-Cuna J.O., Pagani M., Schernhuber K., Dickson B.J., Stark A. Genome-scale functional characterization of *Drosophila* developmental enhancers *in vivo*. *Nature.* 2014;512:91-95.
- Kvon E.Z., Stampfel G., Yanez-Cuna J.O., Dickson B.J., Stark A. HOT regions function as patterned developmental enhancers and have a distinct *cis*-regulatory signature. *Genes Dev.* 2012;26:908-913.
- Kwasniewski J.C., Fiore C., Chaudhari H.G., Cohen B.A. High-throughput functional testing of ENCODE segmentation predictions. *Genome Res.* 2014;24:1595-1602.
- Kwasniewski J.C., Mogno I., Myers C.A., Corbo J.C., Cohen B.A. Complex effects of nucleotide variants in a mammalian *cis*-regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:19498-19503.
- Lanzuolo C., Roue V., Dekker J., Bantignies F., Orlando V. Polycomb response elements mediate the formation of chromosome higher-order structures in the bithorax complex. *Nat. Cell Biol.* 2007;9:1167-1174.
- Lettice L.A., Williamson I., Devenney P.S., Kilanowski F., Dorin J., Hill R.E. Development of five digits is controlled by a bipartite long-range *cis*-regulator. *Development.* 2014;141:1715-1725.
- Li K., Liu Y., Cao H., Zhang Y., Gu Z., Liu X., Yu A., Kaphle P., Dickerson K.E., Ni M., Xu J. Interrogation of enhancer function by enhancer-targeting CRISPR epigenetic editing. *Nat. Commun.* 2020;11:485.
- Li L., He S., Sun J.M., Davie J.R. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem. Cell Biol.* 2004;82:460-471.
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragozy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science.* 2009;326:289-293.
- Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J., Goldstein D.B., Hindorf L.A., Hunter D.J., McCarthy M.I., ..., Clark A.G., Eichler E.E., Gibson G., Haines J.L., Mackay T.F., McCarroll S.A., Visscher P.M. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009;461:747-753.
- Maricque B.B., Chaudhari H.G., Cohen B.A. A massively parallel reporter assay dissects the influence of chromatin structure on *cis*-regulatory activity. *Nat. Biotechnol.* 2018. DOI 10.1038/nbt.4285.
- Maricque B.B., Dougherty J.D., Cohen B.A. A genome-integrated massively parallel reporter assay reveals DNA sequence determinants of *cis*-regulatory activity in neural cells. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:e16.
- Maurano M.T., Humbert R., Rynes E., Thurman R.E., Haugen E., Wang H., Reynolds A.P., ..., Ziegler S., Cotsapas C., Sotoodehnia N., Glass I., Sunyaev S.R., Kaul R., Stamatoyannopoulos J.A. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science.* 2012;337:1190-1195.
- Melnikov A., Murugan A., Zhang X., Tesileanu T., Wang L., Rogov P., Feizi S., Gnirke A., Callan C.G. Jr., Kinney J.B., Kellis M., Lander E.S., Mikkelsen T.S. Systematic dissection and optimization of inducible enhancers in human cells using a massively parallel reporter assay. *Nat. Biotechnol.* 2012;30:271-277.
- Miguel-Escalada I., Pasquali L., Ferrer J. Transcriptional enhancers: functional insights and role in human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2015;33:71-76.
- Muller H.J. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* 1930;299-334.
- Mumbach M.R., Rubin A.J., Flynn R.A., Dai C., Khavari P.A., Greenleaf W.J., Chang H.Y. HiChIP: efficient and sensitive analysis of protein-directed genome architecture. *Nat. Methods.* 2016;13:919-922.
- Murtha M., Tokcaer-Keskin Z., Tang Z., Strino F., Chen X., Wang Y., Xi X., Basilico C., Brown S., Bonneau R., Kluger Y., Dailey L. FIREWACH: high-throughput functional detection of transcriptional regulatory modules in mammalian cells. *Nat. Methods.* 2014;11:559-565.
- Nagy P.L., Cleary M.L., Brown P.O., Lieb J.D. Genomewide demarcation of RNA polymerase II transcription units revealed by physical fractionation of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:6364-6369.
- Nettling M., Treutler H., Cerquides J., Grosse I. Detecting and correcting the binding-affinity bias in ChIP-seq data using inter-species information. *BMC Genomics.* 2016;17:347.
- Nora E.P., Goloborodko A., Valton A.L., Gibcus J.H., Uebbersohn A., Abdennur N., Dekker J., Mirny L.A., Bruneau B.G. Targeted degradation of CTCF decouples local insulation of chromosome domains from genomic compartmentalization. *Cell.* 2017;169:930-944.e922.
- Pang B., Snyder M.P. Systematic identification of silencers in human cells. *Nat. Genet.* 2020;52:254-263.
- Paredes S.H., Melgar M.F., Sethupathy P. Promoter-proximal CCCTC-factor binding is associated with an increase in the transcriptional pausing index. *Bioinformatics.* 2013;29:1485-1487.
- Pasquali L., Gaulton K.J., Rodriguez-Segui S.A., Mularoni L., Miguel-Escalada I., Akerman I., Tena J.J., ..., Berney T., Gloyn A.L., Ravassard P., Skarmeta J.L.G., Muller F., McCarthy M.I., Ferrer J. Pancreatic islet enhancer clusters enriched in type 2 diabetes risk-associated variants. *Nat. Genet.* 2014;46:136-143.
- Patwardhan R.P., Hiatt J.B., Witten D.M., Kim M.J., Smith R.P., May D., Lee C., Andrie J.M., Lee S.I., Cooper G.M., Ahituv N., Pennacchio L.A., Shendure J. Massively parallel functional dissection of mammalian enhancers *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 2012;30:265-270.
- Pennacchio L.A., Bickmore W., Dean A., Nobrega M.A., Bejerano G. Enhancers: five essential questions. *Nat. Rev. Genet.* 2013;14:288-295.
- Phillips-Cremins J.E., Corces V.G. Chromatin insulators: linking genome organization to cellular function. *Mol. Cell.* 2013;50:461-474.

- Phillips-Cremins J.E., Sauria M.E., Sanyal A., Gerasimova T.I., Lajoie B.R., Bell J.S., Ong C.T., Hookway T.A., Guo C., Sun Y., Bland M.J., Wagstaff W., Dalton S., McDevitt T.C., Sen R., Dekker J., Taylor J., Corces V.G. Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment. *Cell*. 2013;153:1281-1295.
- Rada-Iglesias A., Bajpai R., Swigut T., Brugmann S.A., Flynn R.A., Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature*. 2011;470:279-283.
- Rao S.S., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., Aiden E.L. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*. 2014;159:1665-1680.
- Rao S.S.P., Huang S.C., Glenn St Hilaire B., Engreitz J.M., Perez E.M., Kieffer-Kwon K.R., Sanborn A.L., Johnstone S.E., Bascom G.D., Bochkov I.D., Huang X., Shamim M.S., Shin J., Turner D., Ye Z., Omer A.D., Robinson J.T., Schlick T., Bernstein B.E., Casellas R., Lander E.S., Aiden E.L. Cohesin loss eliminates all loop domains. *Cell*. 2017;171:305-320 e324.
- Rye M.B., Saetrom P., Drablos F. A manually curated ChIP-seq benchmark demonstrates room for improvement in current peak-finder programs. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:e25. DOI 10.1093/nar/gkq1187.
- Sandmann T., Girardot C., Brehme M., Tongprasit W., Stolc V., Furlong E.E. A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*. 2007;21:436-449.
- Sanjana N.E., Wright J., Zheng K., Shalem O., Fontanillas P., Joung J., Cheng C., Regev A., Zhang F. High-resolution interrogation of functional elements in the noncoding genome. *Science*. 2016;353:1545-1549.
- Shlyueva D., Stampfel G., Stark A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat. Rev. Genet*. 2014;15:272-286.
- Shukla S., Kavak E., Gregory M., Imashimizu M., Shutinoski B., Kashlev M., Oberdoerffer P., Sandberg R., Oberdoerffer S. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*. 2011;479:74-79.
- Skene P.J., Henikoff S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *eLife*. 2017;6:e21856. DOI 10.7554/eLife.21856.
- Song L., Crawford G.E. DNase-seq: a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. *Cold Spring Harb. Protoc*. 2010;2010(2):pdbprot 5384.
- Song L., Zhang Z., Grasfeder L.L., Boyle A.P., Giresi P.G., Lee B.K., Sheffield N.C., ..., Winter D., Clarke N.D., Birney E., Iyer V.R., Crawford G.E., Lieb J.D., Furey T.S. Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. *Genome Res*. 2011;21:1757-1767.
- Srinivasan L., Atchison M.L. YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev*. 2004;18:2596-2601.
- Stitzel M.L., Sethupathy P., Pearson D.S., Chines P.S., Song L., Erdos M.R., Welch R., Parker S.C., Boyle A.P., Scott L.J., Margulies E.H., Boehnke M., Furey T.S., Crawford G.E., Collins F.S. Global epigenomic analysis of primary human pancreatic islets provides insights into type 2 diabetes susceptibility loci. *Cell Metab*. 2010;12:443-455.
- Sur I., Taipale J. The role of enhancers in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2016;16:483-493.
- Tiwari V.K., McGarvey K.M., Licchesi J.D., Ohm J.E., Herman J.G., Schubeler D., Baylin S.B. PcG proteins, DNA methylation, and gene repression by chromatin looping. *PLoS Biol*. 2008;6:2911-2927.
- Tolhuis B., Palstra R.J., Splinter E., Grosveld F., de Laat W. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol. Cell*. 2002;10:1453-1465.
- Trynka G., Sandor C., Han B., Xu H., Stranger B.E., Liu X.S., Raychaudhuri S. Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. *Nat. Genet*. 2013;45:124-130.
- Visel A., Blow M.J., Li Z., Zhang T., Akiyama J.A., Holt A., Plajzer-Frick I., Shoukry M., Wright C., Chen F., Afzal V., Ren B., Rubin E.M., Pennacchio L.A. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature*. 2009;457:854-858.
- Whyte W.A., Orlando D.A., Hnisz D., Abraham B.J., Lin C.Y., Kagey M.H., Rahl P.B., Lee T.I., Young R.A. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*. 2013;153:307-319.
- Yang J., Corces V.G. Chromatin insulators: a role in nuclear organization and gene expression. *Adv. Cancer Res*. 2011;110:43-76.
- Yang S.H., Cheng P.H., Sullivan R.T., Thomas J.W., Chan A.W. Lentiviral integration preferences in transgenic mice. *Genesis*. 2008;46:711-718.
- Zabidi M.A., Arnold C.D., Schernhuber K., Pagani M., Rath M., Frank O., Stark A. Enhancer-core-promoter specificity separates developmental and housekeeping gene regulation. *Nature*. 2015;518:556-559.

ORCID ID

S.E. Romanov orcid.org/0000-0002-5989-5756
D.A. Kalashnikova orcid.org/0000-0002-0209-4616
P.P. Laktionov orcid.org/0000-0003-2174-6496

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70141.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.11.2020. После доработки 28.03.2021. Принята к публикации 28.03.2021.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, PubMed Central, Ebsco, DOAJ, Ulrich’s Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 20.05.2021. Выход в свет 31.05.2021. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 12.79.

Уч.-изд. л. 15.3. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–50 экз.). Заказ № 103. Цена свободная.

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН», Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.