

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJGB-22-27

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

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

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJGB-22-27

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief*A.V. Kochetov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia**Deputy Editor-in-Chief***N.A. Kolchanov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.N. Leonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*N.B. Rubtsov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.K. Shumny*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial board***O.S. Afanasenko*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.I. Aftanas*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia*E.E. Andronov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*Yu.S. Aulchenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*L.A. Bespalova*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*N.P. Bondar*, Cand. Sci. (Biology), Russia*S.A. Borinskaya*, Dr. Sci. (Biology), Russia*P.M. Borodin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A. Börner*, Dr. Sci., Germany*M. Chen*, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China*S.A. Demakov*, Dr. Sci. (Biology), Russia*T.A. Gavrilenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*I. Grosse*, Professor, Dr. Sci., Germany*N.E. Gruntenko*, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.G. Inge-Vechtomov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khlestkina*, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.K. Khusnutdinova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*A.V. Kilchevsky*, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology),

Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia*A.M. Kudryavtsev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.M. Larkin*, Cand. Sci. (Biology), Great Britain*I.N. Lavrik*, Dr. Sci. (Biology), Germany*J. Le Gouis*, Dr. Sci., France*I.N. Lebedev*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*B. Lugtenberg*, Professor, Dr. Sci., Netherlands*L.A. Lutova*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.Yu. Makeev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.),
Russia*V.I. Molodin*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia*M.P. Moshkin*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*S.R. Mursalimov*, Cand. Sci. (Biology), Russia*L.Yu. Novikova*, Dr. Sci. (Agricul.), Russia*E.K. Potokina*, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.P. Puzyrev*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
Russia*D.V. Pyshnyi*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry),
Russia*I.B. Rogozin*, Cand. Sci. (Biology), United States*A.O. Ruvinsky*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia*E.Y. Rykova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*E.A. Salina*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*Y.N. Shavrukov*, Dr. Sci. (Biology), Australia*R.I. Sheiko*, Corr. Member of the NAS of Belarus,
Dr. Sci. (Agricul.), Belarus*S.V. Shestakov*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*V.A. Stepanov*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.A. Tikhonovich*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*A.V. Vasiliev*, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*M.I. Voevoda*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
Russia*N.K. Yankovsky*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia*I.K. Zakharov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.A. Zakharov-Gezekhus*, Corr. Member of the RAS,
Dr. Sci. (Biology), Russia

Молекулярная и клеточная биология

- 227 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Экспериментальное изучение влияния SNP TATA-боксов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на взаимодействие с TATA-связывающим белком.
Е.Б. Шарыпова, И.А. Драчкова, И.В. Чадаева, М.П. Пономаренко, Л.К. Савинкова
- 234 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов гранулезы на компетентность к созреванию и оплодотворению ооцитов *Sus scrofa domestica*.
Т.И. Кузьмина, И.В. Чистякова, А.О. Притужалова, Д.Н. Татарская
- 240 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Биохимические и технологические свойства рекомбинантного химозина лося (*Alces alces*).
Д.В. Балабова, А.П. Рудометов, С.В. Беленькая, А.Н. Белов, А.Д. Коваль, А.А. Бондарь, А.Ю. Бакулина, Е.А. Рухлова, В.В. Ельчанинов, Д.Н. Щербаков (на англ. языке)

Генетика и селекция растений

- 250 **ОБЗОР**
Метаболизм крахмала у картофеля *Solanum tuberosum* L.
Е.М. Сергеева, К.Т. Ларичев, Е.А. Салина, А.В. Кочетов
- 264 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Прогноз зоны возделывания винограда на европейской территории России в условиях изменения климата.
Л.Ю. Новикова, П.В. Озерский
- 272 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Трансмиссия вириона веретеновидности клубней картофеля между *Phytophthora infestans* и растениями-хозяевами.
О.С. Афанасенко, А.В. Хютти, Н.В. Мироненко, Н.М. Лашина (на англ. языке)

Генетика и селекция животных

- 281 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Социальное поведение и пространственная ориентация у линий крыс с генетической предрасположенностью к кататонии (ГК) и стереотипиям (МД).
В.С. Плеканчук, О.И. Прокудина, М.А. Рязанова (на англ. языке)
- 290 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Молекулярно-генетические подходы к видовой идентификации паразитических плоских червей рода *Ligophorus* (*Monogenea*), обитающих на лобане.
Е.А. Водясова, Э.С. Челебиева, О.В. Шихат, Д.М. Атопкин, Е.В. Дмитриева
- 298 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Сравнительный анализ частот ДНК-полиморфизмов, ассоциированных с заболеваниями и хозяйственно важными признаками, в геномах российских и зарубежных пород крупного рогатого скота.
А.В. Игошин, Г.А. Ромашов, Е.Н. Черняева, Н.П. Елаткин, Н.С. Юдин, Д.М. Ларкин

Медицинская генетика

- 308 **ОБЗОР**
Молекулярно-генетические особенности патогенеза идиопатического легочного фиброза.
Р.Н. Мустафин
- 319 **ОБЗОР**
Анализ спектра мутаций гена рецептора низкой плотности (*LDLR*) при семейной гиперхолестеринемии в России.
В.Б. Васильев, Ф.М. Захарова, Т.Ю. Богословская, М.Ю. Мандельштам

Тест-системы и вакцинопрофилактика

- 327 **ОБЗОР**
Разработка и создание кандидатных вакцин против COVID-19 на основе растительных систем экспрессии: состояние исследований и перспективы.
Е.А. Уварова, П.А. Белавин, Е.В. Дейнеко

Molecular and cell biology

- 227 ORIGINAL ARTICLE
An experimental study of the effects of SNPs in the TATA boxes of the *GRIN1*, *ASCL3* and *NOS1* genes on interactions with the TATA-binding protein.
E.B. Sharypova, I.A. Drachkova, I.V. Chadaeva, M.P. Ponomarenko, L.K. Savinkova
- 234 ORIGINAL ARTICLE
The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica* oocytes.
T.I. Kuzmina, I.V. Chistyakova, A.O. Prituzhalova, D.N. Tatarskaya
- 240 ORIGINAL ARTICLE
Biochemical and technological properties of moose (*Alces alces*) recombinant chymosin.
D.V. Balabova, A.P. Rudometov, S.V. Belenkaya, A.N. Belov, A.D. Koval, A.A. Bondar, A.Yu. Bakulina, E.A. Rukhlova, V.V. Elchaninov, D.N. Shcherbakov

Plant genetics and breeding

- 250 REVIEW
Starch metabolism in potato *Solanum tuberosum* L.
E.M. Sergeeva, K.T. Larichev, E.A. Salina, A.V. Kochetov
- 264 ORIGINAL ARTICLE
Forecast for the zone of viticulture in European Russia under climate change.
L.Yu. Novikova, P.V. Ozerski
- 272 ORIGINAL ARTICLE
Transmission of potato spindle tuber viroid between *Phytophthora infestans* and host plants.
O.S. Afanasenko, A.V. Khiutti, N.V. Mironenko, N.M. Lashina

Animal genetics and breeding

- 281 ORIGINAL ARTICLE
Social behavior and spatial orientation in rat strains with genetic predisposition to catatonia (GC) and stereotypes (PM).
V.S. Plekanchuk, O.I. Prokudina, M.A. Ryazanova
- 290 ORIGINAL ARTICLE
Molecular-genetic approaches to species identification of platyhelminthes of the genus *Ligophorus* (Monogenea) parasitising flathead mullet.
E.A. Vodiasova, E.S. Chelebieva, O.V. Shikhat, D.M. Atopkin, E.V. Dmitrieva
- 298 ORIGINAL ARTICLE
Comparative analysis of allele frequencies for DNA polymorphisms associated with disease and economically important traits in the genomes of Russian and foreign cattle breeds.
A.V. Igoshin, G.A. Romashov, E.N. Chernyaeva, N.P. Elatkin, N.S. Yudin, D.M. Larkin

Medical genetics

- 308 REVIEW
Molecular genetics of idiopathic pulmonary fibrosis.
R.N. Mustafin
- 319 REVIEW
Analysis of the low density lipoprotein receptor gene (*LDLR*) mutation spectrum in Russian familial hypercholesterolemia.
V.B. Vasilyev, F.M. Zakharova, T.Yu. Bogoslovskaya, M.Yu. Mandelshtam

Test kits and preventive vaccination

- 327 REVIEW
Design and assembly of plant-based COVID-19 candidate vaccines: recent development and future prospects.
E.A. Uvarova, P.A. Belavin, E.V. Deineko

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

Экспериментальное изучение влияния SNP TATA-боксов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на взаимодействие с TATA-связывающим белком

Е.Б. Шарыпова, И.А. Драчкова, И.В. Чадаева, М.П. Пономаренко, Л.К. Савинкова 

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
 savinkl@mail.ru

Аннотация. Гены *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* связаны с различными фенотипами нервно-психических расстройств. Эти гены делают вклад в развитие шизофрении, болезней Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсии и др. и ассоциируются также с различными онкологическими заболеваниями. Например, повышенная экспрессия *ASCL3* наблюдается при раке молочной железы, *NOS1* – в клеточных линиях рака яичников. Ранее на основе наших и литературных данных мы получили результаты, свидетельствующие в пользу того, что SNP, нарушающие эритропоэз, с большой вероятностью могут быть связаны с когнитивными и нервно-психическими расстройствами у человека. В настоящей работе исследовано влияние выявленных с помощью SNP_TATA_Z-tester неаннотированных SNP TATA-боксов промоторов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1*, участвующих в нервно-психических расстройствах и онкологических заболеваниях, на взаимодействие TATA-связывающего белка (TBP). Для изучения *in vitro* кинетических характеристик образования комплексов TBP/TATA и аффинности с помощью метода задержки ДНК в геле использованы двуцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды, идентичные TATA-содержащим участкам промоторов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* (референсным и минорным аллелям), и рекомбинантный TBP человека. Показано, например, что аллель «А» rs1402667001 промотора гена *GRIN1* повышает аффинность TBP/TATA в 1.4 раза, а аллель «С» TATA-боксов промотора гена *ASCL3* снижает аффинность в 1.4 раза; при этом время жизни комплексов в обоих случаях уменьшается примерно на 20 % за счет изменения скоростей образования и диссоциации комплексов (k_a и k_d соответственно). Наши экспериментальные результаты согласуются с литературными данными, показывающими низкую экспрессию гена *GRIN1* при шизофренических расстройствах и повышенный риск возникновения рака шейки матки, мочевого пузыря, почек и лимфомы при пониженной экспрессии гена *ASCL3*. Влияние аллеля «А» SNP –27G>A (rs1195040887) промотора гена *NOS1* гипотетически может свидетельствовать о повышенном риске возникновения ишемического повреждения мозга у носителей. Сравнение экспериментальных значений аффинности (K_D) TBP/TATA «диких» (WT) и минорных аллелей с прогнозируемыми показало, что данные хорошо коррелируют друг с другом: коэффициент линейной корреляции $r = 0.94$ ($p < 0.01$).

Ключевые слова: *GRIN1*; *ASCL3*; *NOS1*; TATA-связывающий белок; аффинность; TBP/TATA взаимодействие.

Для цитирования: Шарыпова Е.Б., Драчкова И.А., Чадаева И.В., Пономаренко М.П., Савинкова Л.К. Экспериментальное изучение влияния SNP TATA-боксов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на взаимодействие с TATA-связывающим белком. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3):227-233. DOI 10.18699/VJGB-22-29

An experimental study of the effects of SNPs in the TATA boxes of the *GRIN1*, *ASCL3* and *NOS1* genes on interactions with the TATA-binding protein

E.B. Sharypova, I.A. Drachkova, I.V. Chadaeva, M.P. Ponomarenko, L.K. Savinkova 

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
 savinkl@mail.ru

Abstract. The *GRIN1*, *ASCL3*, and *NOS1* genes are associated with various phenotypes of neuropsychiatric disorders. For instance, these genes contribute to the development of schizophrenia, Alzheimer's and Parkinson's diseases, and epilepsy. These genes are also associated with various cancers. For example, *ASCL3* is overexpressed in breast cancer, and *NOS1*, in ovarian cancer cell lines. Based on our findings and literature data, we had previously obtained results suggesting that the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that disrupt erythropoiesis are highly likely to be associated with cognitive and neuropsychiatric disorders in humans. In the present work, using SNP_TATA_Z-tester, we investigated the influence of unannotated SNPs in the TATA boxes of the promoters of the *GRIN1*, *ASCL3*, and *NOS1* genes (which are involved in neuropsychiatric disorders and cancers) on the interaction of the TATA boxes with the TATA-binding protein (TBP). Double-stranded oligodeoxyribonucleotides identical to the TATA-containing promoter regions of the *GRIN1*, *ASCL3*, and *NOS1* genes (reference and minor alleles) and recombinant human TBP

were employed to study *in vitro* (by an electrophoretic mobility shift assay) kinetic characteristics of the formation of TBP–TATA complexes and their affinity. It was found, for example, that allele A of rs1402667001 in the *GRIN1* promoter increases TBP–TATA affinity 1.4-fold, whereas allele C in the TATA box of the *ASCL3* promoter decreases the affinity 1.4-fold. The lifetime of the complexes in both cases decreased by ~20 % due to changes in the rates of association and dissociation of the complexes (k_a and k_d , respectively). Our experimental results are consistent with the literature showing *GRIN1* underexpression in schizophrenic disorders as well as an increased risk of cervical, bladder, and kidney cancers and lymphoma during *ASCL3* underexpression. The effect of allele A of the –27G>A SNP (rs1195040887) in the *NOS1* promoter is suggestive of an increased risk of ischemic damage to the brain in carriers. A comparison of experimental TBP–TATA affinity values (K_D) of wild-type and minor alleles with predicted ones showed that the data correlate well (linear correlation coefficient $r = 0.94$, $p < 0.01$).

Key words: *GRIN1*; *ASCL3*; *NOS1*; TATA-binding protein; affinity; TBP/TATA interaction.

For citation: Sharypova E.B., Drachkova I.A., Chadaeva I.V., Ponomarenko M.P., Savinkova L.K. An experimental study of the effects of SNPs in the TATA boxes of the *GRIN1*, *ASCL3* and *NOS1* genes on interactions with the TATA-binding protein. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):227-233. DOI 10.18699/VJGB-22-29

Введение

Ранее с помощью веб-сервиса SNP_TATA_Comparator (Ponomarenko M. et al., 2015) и экспериментов *in vitro* мы изучали влияние SNP TATA-боксов кор-промоторов генов человека для прогнозирования потенциальных SNP-маркеров устойчивости к противораковой терапии (Турнаев и др., 2016), ожирению (Arkova et al., 2015), аутоиммунным заболеваниям (Ponomarenko M.P. et al., 2016), болезни Альцгеймера (Ponomarenko P. et al., 2017), нарушений циркадного ритма (Ponomarenko P. et al., 2016) и эритропоэза (Шарыпова и др., 2018), аномалии женского репродуктивного потенциала (Chadaeva et al., 2018), агрессивности (Chadaeva et al., 2016) и др. Затем на основе литературных сведений и собственных данных мы получили результаты, свидетельствующие в пользу того, что SNP, нарушающие эритропоэз, с большой вероятностью могут быть связаны с когнитивными и нервно-психическими расстройствами у человека (Ponomarenko M. et al., 2020).

Цель настоящей работы заключалась в поиске и экспериментальной верификации *in vitro* влияния неаннотированных SNP TATA-боксов промоторов генов *NOS1*, *GRIN1* и *ASCL3*, участвующих в нервно-психических расстройствах и онкологических заболеваниях, на аффинность и кинетические характеристики комплексов TBP/TATA. Установление причинных регуляторных механизмов заболеваний становится обычным явлением, но экспериментальная аннотация вариаций в генах-мишенях, особенно в регуляторных областях, все еще является основным узким местом для использования в персонализированной медицине. Поэтому экспериментальные количественные методы аннотации SNP регуляторных районов конкретных генов остаются актуальной задачей. В данной работе представлены прогнозы влияния неаннотированных SNP TATA-боксов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на термодинамические и кинетические характеристики комплексов TBP/TATA и результаты их экспериментальной верификации *in vitro*.

Ген *GRIN1* расположен на хромосоме 9q34.3, кодирует субъединицу GluN1 (NR1) рецептора N-метил-D-аспартата и играет ключевую роль в синаптических функциях (Sin et al., 2002). Белок, кодируемый геном *GRIN1*, является критической субъединицей рецепторов N-метил-D-аспартата, членов суперсемейства каналов рецепторов глутамата, которые представляют собой гетеромерные

белковые комплексы с несколькими субъединицами, расположенными так, чтобы образовывать лиганд-зависимый ионный канал. Эти субъединицы очень важны в пластичности синапсов, которая, как полагают, лежит в основе памяти и обучения.

Проведенный впервые в работе (Forero, 2020) метаанализ и анализ сходимости доступных GWES (genome-wide expression studies) для эпилептогенеза у человека и модельных животных позволил идентифицировать несколько главных генов-кандидатов, в том числе *GRIN1*. Использование моделей животных и посмертные исследования мозга пациентов показали, что уровни транскрипции и экспрессии гена белка GluN1 при шизофрении отличались от контролей (условно здоровых добровольцев), хотя в различных отделах мозга происходили разные изменения (Ding et al., 2017).

Семейство генов achaete-scute complex-like (ASCL) состоит из пяти членов: *ASCL1*, *ASCL2*, *ASCL3*, *ASCL4* и *ASCL5*. Ген *ASCL3* расположен на хромосоме 11. Первоначально *ASCL3* (SGN1) характеризовался как фактор транскрипции, специфически локализованный в клетках протоков слюнных желез (Park et al., 2017). Показано, что нарушение регуляции генов семейства achaete-scute complex-like (ASCL) играет ключевую роль в психиатрических и неврологических расстройствах (Hanahan, Weinberg, 2011). Все гены *ASCL* кодируют основные факторы транскрипции спираль-петля-спираль, которые контролируют развитие нервной системы (Rugel-Stahl et al., 2012), поэтому их называют пронейральными генами. Экспрессия генов семейства ASCL и их влияние на клетки не ограничиваются нервной системой. Например, их экспрессия обнаружена в клетках-предшественниках во время дифференцировки мышц и клеток кишечника (Fox, 1998).

С помощью биоинформатического анализа выявлено потенциальное участие нескольких представителей семейства ASCL в возникновении и прогрессировании опухолей при различных типах рака. *ASCL3* проявлял повышенную экспрессию при раке молочной железы (Hanahan, Weinberg, 2011), но низкую, по сравнению с нормой – при раке почки, шейки матки и мочевого пузыря, лимфоме и меланоме. Анализ различных подтипов опухолей почек показал, что *ASCL3* проявлял пониженную экспрессию при почечной онкоцитоме. Как уже отмечалось, при лим-

фоме, раке шейки матки, мочевого пузыря, почек и эпителия было выявлено снижение экспрессии *ASCL3* (Hanahan, Weinberg, 2011), что позволяет рассматривать этот ген в качестве подходящей мишени для изучения не только психиатрических и неврологических расстройств, но и онкологических заболеваний.

Ген *NOS1* является основной изоформой синтаз оксида азота и широко экспрессируется во всех тканях, продуцируя приблизительно 90 % NO в центральной нервной системе (Akyol et al., 2004). Ген картирован на хромосоме 12q24. В ряде работ продемонстрировано, что варианты *NOS1* связаны с такими расстройствами, как болезнь Альцгеймера (Mishizen-Eberz et al., 2004), шизофрения (Shinkai et al., 2002; Saadat, 2010) и болезнь Паркинсона (Hancock et al., 2008; Yu et al., 2018). Используя метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR), авторы (Freudenberg et al., 2015) показали, что уровень экспрессии белка *Nos1* был конститутивно высоким в клеточных линиях рака яичников, уровень экспрессии мРНК *NOS1* варьировал в разных линиях клеток рака яичников. Согласно результатам проведенного исследования, *NOS1* способствует функционированию клеток рака яичников, включая пролиферацию, инвазию и химиорезистентность, обеспечивая потенциальную мишень для лечения.

Материалы и методы

Последовательности ДНК. Неаннотированные SNP гена *GRIN1* – rs1402667001, гена *ASCL3* – rs1049743008:c и гена *NOS1* – rs1195040887 взяты из базы данных dbSNP (Sherry et al., 2001). Последовательности промоторов в пределах [–100; –1] относительно TSS (transcription start site), а также наличие в них ТАТА-боксов получены из базы данных EPD (eukaryotic promotor database) (Praz et al., 2002).

Анализ последовательностей ДНК *in silico*. Последовательности ДНК генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* человека между нуклеотидами от –100 до –1 вверх от старта транскрипции, извлеченные из референсного генома, анализировали с помощью нашего веб-сервиса SNP_TATA_Z-tester, модифицированной версии SNP_TATA_Comparator (Ponomarenko M. et al., 2015).

Синтетические двуцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН). Для экспериментальной проверки использовали ОДН длиной 26 пар оснований, идентичные референсным и минорным аллелям генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1*, которые синтезированы и дополнительно очищены электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в «Биосан» (Новосибирск, Россия).

Последовательности двуцепочечных олигонуклеотидов, идентичных промоторным районам генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1*, содержащим ТАТА-подобные элементы (референсные и минорные аллели):

GRIN1 (WT) – 5'-tggagggggACAAAGACAgggtggtg-3'
GRIN1 (–34g>a) – 5'-tggagggaggACAAAGACAgggtggtg-3'
ASCL3 (WT) – 5'-tcgaaaaTAAAAATAaaacat-3'
ASCL3 (–45T>c) – 5'-tcgaaaaTAAAAcAAAAataaacat-3'
NOS1 (WT) – 5'-tgtttcctGATAGAAAAaaaaaatgg-3'
NOS1 (–27G>a) – 5'-tgtttcctGATAaAAAAaaaaaatgg-3'

Мечение олигодезоксирибонуклеотидов по 5'-концам ³²P-γАТФ. Для получения меченых двуцепочечных

ОДН обе цепи метили ³²P-γАТФ («Биосан», Новосибирск, Россия) с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (SibEnzyme, Новосибирск, Россия), отжигали при 95 °С (в эквимольном соотношении) и медленно охлаждали до комнатной температуры. Отожженные дуплексы очищали и анализировали электрофорезом в 15 % ПААГ в неденатурирующих условиях с последующей радиоавтографией на фосфоримиджере Molecular Imager PharoFX Plus (Bio-Rad). Немеченные дуплексы получали так же и использовали без дополнительной очистки в ПААГ.

Выделение и очистка рекомбинантного ТАТА-связывающего белка. В работе использовали рекомбинантный ТАТА-связывающий белок (ТВР) человека, экспрессированный в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hТВР (любезно предоставлена проф. В. Puhg (Центр регуляции гена, Отделение биохимии и молекулярной биологии, Университет Пенсильвании, США). Экспрессию и очистку ТВР проводили согласно (Pugh, 1995), за исключением концентрации ИПТГ (1 мМ вместо 0.1 мМ) и времени индукции (3 ч вместо 1.5 ч).

Константы скорости ассоциации (k_a) и константы скорости диссоциации (k_d), характеризующие скорости образования и распада комплексов, определяли, снимая кинетику связывания ТВР с ТАТА-содержащими двуцепочечными ОДН, идентичными ТАТА-боксам дикого типа (референсный аллель) и ТАТА-боксам, несущим SNP. Эксперименты выполняли с использованием нескольких концентраций ³²P-ОДН и фиксированной концентрации ТВР (обычно 0.4 нМ). Эксперименты по связыванию ТВР/ОДН проводили при 25 °С в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.6), 5 мМ MgCl₂, 70 мМ KCl, 1 мМ DTT, 100 мкг/мл BSA, 0.01 % NP-40 и 5 % глицерин, подробно см. (Drachkova et al., 2014). Электрофорез проводили в нативном 5 % ПААГ на трис-глициновом буфере (pH 8.3) в течение 40 мин при температуре 10 °С. Гели высушивали и экспонировали с экраном Imaging Screen-K (Kodak) для фосфоримиджера Molecular Imager PharoFX Plus (Bio-Rad). Экран сканировали на фосфоримиджере и осуществляли количественный анализ радиоавтографов с помощью программы Quantity One v. 4.5.0 (Bio-Rad).

Статистический анализ данных. Сравнение прогнозируемых и экспериментальных значений аффинности комплексов ТВР/ТАТА «нормальных» и минорных аллелей выполнено в пакете программ Statistica (Statsoft™, США).

Результаты и обсуждение

Транскрипция, как правило, наиболее чувствительна к внутренним и внешним сигналам, поступающим в клетку, и является основным механизмом, контролирующим экспрессию генов. Мы рассматриваем ее начальный этап – взаимодействие ТАТА-связывающего белка (ТВР) с промотором, запускающее сборку транскрипционного комплекса.

Результаты верификации *in vitro*, сделанные с помощью веб-сервиса SNP_TATA_Z-tester прогнозов влияния замен в ТАТА-боксах генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на аффинность ТВР/ТАТА, которые включают экспериментальные значения аффинности (K_D) для дикого типа (WT) и минорных аллелей и значения констант ассоциации (k_a) и

Экспериментальная верификация *in vitro* прогнозов влияния rs1402667001, rs1049743008 и rs1195040887 генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на аффинность и кинетические характеристики комплексов ТВР/ТАТА

		Прогноз		Эксперимент					
		$-\ln(K_D)$	$\Delta, \ln \text{ ед.}$	$-\ln(K_D)$	$K_D, \text{ нМ}$	$\Delta, \ln \text{ ед.}$	$k_{af} (\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}) \cdot 10^3$	$k_{diss} \text{ с}^{-1} \cdot 10^{-4}$	$t_{1/2}, \text{ мин}$
<i>GRIN1</i>	WT	17.59 ± 0.08	0.00	14.95 ± 0.05	320 ± 50	0.00	1.4 ± 0.3	4.5 ± 0.4	25.7 ± 3
	-34G>a rs1402667001	17.74 ± 0.08	0.15	15.42 ± 0.08	200 ± 50	2.32	2.8 ± 0.4	5.7 ± 0.8	20.3 ± 5
<i>ASCL3</i>	WT	19.04 ± 0.08	0.00	18.24 ± 0.09	12 ± 5	0.00	7.0 ± 1.0	8.0 ± 3	14.4 ± 6
	-45T>c rs1049743008	18.75 ± 0.08	0.29	17.90 ± 0.08	17 ± 3	0.85	6.2 ± 0.5	10.0 ± 1	11.5 ± 1
<i>NOS1</i>	WT	18.56 ± 0.08	0.00	18.77 ± 0.08	70 ± 20	0.00	2.8 ± 0.3	2.0 ± 0.4	58.0 ± 6
	-27G>a rs1195040887	18.96 ± 0.08	0.34	18.95 ± 0.08	59 ± 9	0.18	4.7 ± 0.4	2.8 ± 0.3	38.0 ± 5

Примечание. «±» – стандартное отклонение; $K_D = k_d/k_a$; Δ – разница между аффинностью ТВР к ОДН, содержащим и не содержащим SNP, выраженная в логарифмических единицах; $\Delta = -\ln[K_D, \text{TATA}_{Mut}] - (-\ln[K_D, \text{TATA}])$; $t_{1/2} = \ln 2/k_d$.

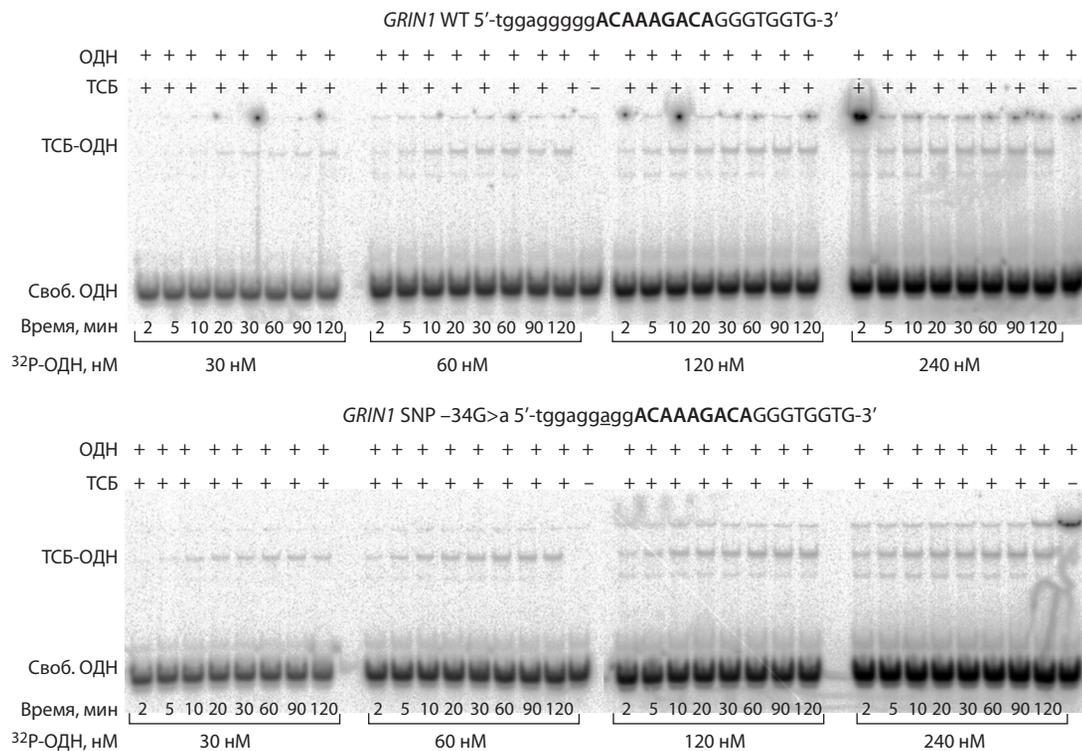


Рис. 1. Электрофореграммы, полученные при измерении кинетических изотерм связывания ТВР с ОДН, идентичными ТАТА-элементу промотора гена *GRIN1* (WT) и минорному аллелю «а» (SNP -34G>a).

диссоциации (k_d), отражающих скорости образования и распада комплексов ТВР/ТАТА, представлены в таблице.

Приведенные в таблице данные получены с помощью метода EMSA. На рис. 1 в качестве примера показаны электрофореграммы для гена *GRIN1*.

Как видно из результатов таблицы, сродство ТВР/ТАТА в случае гена *GRIN1* дикого типа (WT) можно охарактеризовать как низкоспецифическое ($K_D = 320 \text{ нМ}$). Последовательность ТАТА-элемента хотя и АТ-богатая (АСАААГАСА), но третий «Т», имеющий максимальный вес в ТАТА-боксе, отсутствует. Кроме того, конформационная пластичность трех «А», которых явно недостаточно для образования нужной конформации для связывания

ТВР, заблокирована с двух сторон тугоплавкими «С» и «G». Замена (-34G>a) во фланкирующей ТАТА-элемент последовательности не увеличивает значительно пластичность этого участка ДНК, однако у минорного аллеля по сравнению с диким типом сродство увеличивается почти в 1.4 раза ($K_D = 200 \text{ нМ}$), а скорость образования комплексов ТВР/ОДН – в 2 раза (1.4 и $2.8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) (рис. 2). Немного возрастает (на 20%) и скорость диссоциации комплексов в случае минорного аллеля. Все это приводит к небольшому уменьшению времени полураспада комплексов – с 25 до 20 мин, т. е. делает их менее прочными. Из последовательности используемого ОДН, которая идентична участку промоторной области гена *GRIN1*, видно, что промотор

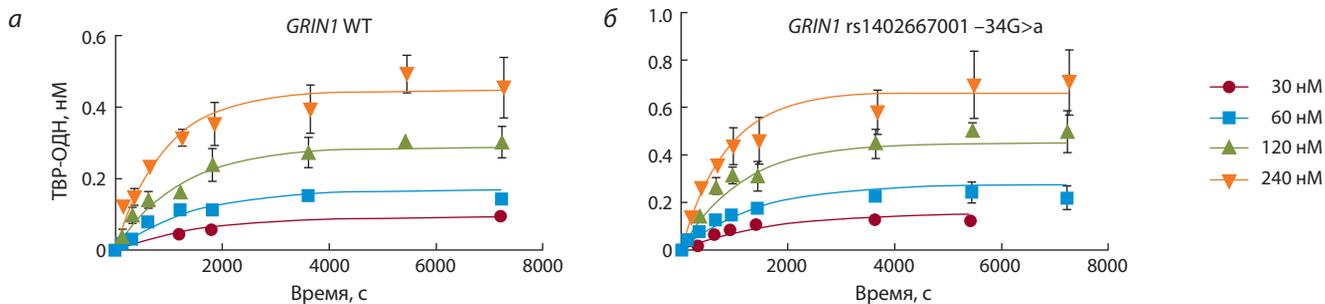


Рис. 2. Кинетические изотермы связывания TBP с ОДН, идентичными TATA-боксу промотора гена *GRIN1* (WT) (а) и минорному аллелю «а» (б). Изотермы связывания, значения k_a и k_d получены на основании электрофореграмм (см. рис. 1) с помощью программы GraphPad Prism 5.

не содержит консенсусной последовательности TATA-бокса, но содержит G-богатый бокс, который связывается ТФ SP3, что активирует транскрипцию генов в эмбриональных кортикальных нейронах цыпленка и репрессирует в недифференцированных клетках (Chaudhary et al., 2017), как показано при исследовании гена *GRIN1* курицы.

Полученная нами низкая аффинность TBP с TATA-подобным элементом промотора *GRIN1*, которая коррелирует с низкой экспрессией гена (Liu et al., 2019), согласуется с результатами о низкой экспрессии гена при шизофренических расстройствах на модельных животных. На основании наших данных о повышении аффинности TBP/TATA для минорного аллеля «а» (rs1402667001) гипотетически можно предположить, что носители этого аллеля имеют пониженный риск возникновения шизофрении по сравнению с носителями мажорного аллеля «Г». Следует отметить, что несмотря на активные исследования, роль *GRIN1* в этиологии шизофрении остается до некоторой степени неопределенной. Так, X. Zhao с коллегами (Zhao et al., 2006) рассматривали случай-контроль, чтобы изучить связь между геном *GRIN1* и риском шизофрении в популяции северной части Китая с использованием секвенирования ДНК по Сэнгеру. Распределение как генотипа, так и аллеля rs117783907 (-1945G/t) достоверно различалось между случаем и контрольной группой ($p < 0.0083$). Частоты генотипов rs138961287 и rs11146020 тоже статистически различались ($p < 0.05$), что указывает на то, что rs138961287, rs117783907 и rs11146020 связаны с шизофренией. В другом исследовании ассоциации в северной китайской популяции Хань сообщалось, что аллель «с» rs11146020 снижает риск шизофрении (Begni et al., 2003), тогда как в итальянской популяции этот аллель являлся фактором риска шизофрении (Saadat, 2010). Кроме того, в результате метаанализа в работе (Zwicker et al., 2018) сделано предположение, что аллель «с» rs11146020 может быть связан с повышенным риском развития шизофрении. Таким образом, результаты противоречивые. Вероятно, в различных этнических группах влияние экологических и генетических факторов и их взаимодействие могут различаться по влиянию на риск психических расстройств (Zwicker et al., 2018). Вероятность развития психоза возрастает по мере накопления многочисленных вариантов генетического риска и воздействия множественных неблагоприятных факторов окружающей среды (Gray et al., 2015).

J. Ding с коллегами (Ding et al., 2017) исследовали экспрессию большой группы генов в посмертном мозге

пациентов с большим депрессивным расстройством и контролей. Результаты показали повышенные уровни экспрессии большинства глутаматергических генов (*GRIN1*, *GRIN2A-D*, *GRIA2-4*, *GRIK1-2*, *GRM1* и др.), протестированных в дорсолатеральной префронтальной коре (в основном у женщин). Исходя из этих данных можно предположить, что исследованный нами rs1402667001, увеличивающий аффинность TBP к TATA-подобному элементу, гипотетически может быть кандидатным SNP повышенного риска шизофрении. Несмотря на противоречивые результаты, Z. Zou с соавторами считают, что связь гена *GRIN1* с шизофренией и другими психозами неоспорима, а кодируемая им субъединица NR1 может быть перспективной терапевтической мишенью для лечения шизофрении (Zou et al., 2020).

Как видно из приведенной последовательности промоторного района гена *ASCL3*, идентичной участку, где обычно расположен TATA-бокс (-20, -70 п.о. от старта транскрипции), она обогащена нуклеотидами «А» и содержит «Т», который имеет максимальный вес в последовательности TATA-бокса и может занимать третье положение в данном случае, при связывании с TBP. Поэтому мы наблюдаем высокую аффинность TBP/TATA: $K_D = 12$ нМ. SNP -45T>C (rs1049743008), заменяющий «Т» на тугоплавкий «С», приводит к снижению аффинности в 1.4 раза ($K_D = 17$ нМ), хотя скорость образования комплексов TBP/TATA возрастает незначительно (12%), а скорость диссоциации немного больше – на 20%. В результате время полужизни комплексов с минорным аллелем также немного сокращается (14.4 и 11.5 мин), т.е. уменьшается их прочность. Исходя из того, что изменение аффинности взаимодействия TBP/TATA коррелирует с изменением экспрессии гена (Mogno et al., 2010), можно предположить, что носители аллеля «С» с пониженной аффинностью TBP/TATA (и экспрессией *ASCL3*) имеют повышенный риск возникновения онкологических заболеваний – рака шейки матки, мочевого пузыря и почек, лимфомы, эпителия. Подтверждают это предположение и результаты исследования (Hanahan, Weinberg, 2011), авторы которого показали, что пять из 21 проанализированного ими типа опухолей имели корреляцию с пониженной в разной степени экспрессией *ASCL3*.

Промотор гена *NOS1* содержит TATA-подобный элемент с последовательностью GATAGAAA, с которой TBP взаимодействует с аффинностью 70 нМ. При замене тугоплавкого «G» на «А» аффинность незначительно по-

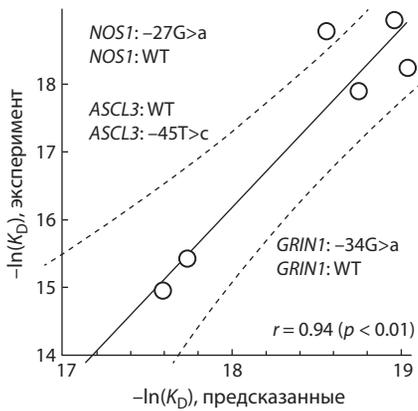


Рис. 3. Достоверная корреляция между измеренными экспериментально величинами аффинности ТВР/ДНК и предсказанными *in silico* с использованием веб-сервиса SNP_TATA_Z-tester.

Штриховыми линиями показаны границы 95 % доверительного интервала для линии регрессии; оценки сделаны с использованием пакета Statistica (Statsoft™, США).

выпадает, на 14 % ($K_D = 59 \pm 9$ нМ). При этом скорость образования комплексов ТВР/ТАТА (k_a) возрастает в 1.7 раза, скорость диссоциации комплексов (k_d) – в 1.4 раза, а время жизни комплексов сокращается почти в 1.4 раза.

На основании результатов работы (Zou et al., 2020), свидетельствующих о том, что ингибиторы *NOS1* могут эффективно снижать степень ишемического повреждения головного мозга, гипотетически можно предположить, что аллель «А» (SNP –27G>A, rs1195040887) с повышенной аффинностью ТВР/ТАТА и экспрессией гена может быть кандидатным для повышенного риска возникновения ишемического повреждения мозга, связанного с церебральным параличом. Связь *NOS1* с различными заболеваниями предполагает плейотропную роль *NOS1* во многих физиологических процессах и, вероятно, потенциально общий патомеханизм.

Сравнение экспериментальных значений сродства (K_D) комплексов ТВР/ТАТА референсных (норма) и минорных аллелей с прогнозируемыми с помощью веб-сервиса SNP_TATA_Z-tester (Ponomarenko M. et al., 2015) показало, что данные хорошо коррелируют друг с другом (рис. 3). Коэффициент линейной корреляции $r = 0.94$ ($p < 0.01$).

Итак, мы определили аффинность и кинетические характеристики вза-

имодействия ТВР с ТАТА-боксами, содержащими неаннотированные SNP, которые могут быть потенциально функционально значимыми и ассоциированы с повышенным риском возникновения таких нервно-психиатрических заболеваний, как ишемическое повреждение мозга, связанное с церебральным параличом, шизофрения и др., а также возникновения онкологических заболеваний – рака шейки матки, мочевого пузыря и почек, лимфомы и эпителия.

Заключение

Полученные результаты показывают влияние выявленных SNP (rs1402667001, rs1049743008 и rs1195040887) ТАТА-боксов промоторов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на аффинность и скорости образования (k_a) и распада (k_d) комплексов ТВР/ТАТА. Экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что выявленные кандидатные SNP-маркеры нейрональных генов могут делать вклад в развитие как нервно-психических, так и онкологических заболеваний, что согласуется с литературными данными. Результаты влияния SNP на аффинность ТВР/ТАТА и, следовательно, на экспрессию рассмотренных генов предполагают их возможную роль в повышенном риске возникновения заболеваний, которые ассоциируются с этими генами, и имеют потенциал для улучшения здоровья человека и разработки новых диагностических маркеров.

Список литературы / References

- Турнаев И.И., Рассказов Д.А., Аркова О.В., Пономаренко М.П., Пономаренко П.М., Савинкова Л.К., Колчанов Н.А. Гипотетические SNP-маркеры, значимо изменяющие оценки сродства ТАТА-связывающего белка к промоторам онкогенов *VEGFA*, *ERBB2*, *IGF1R*, *FLT1*, *KDR* и *MET* – мишеней для химиотерапии. *Молекуляр. биология*. 2016;50(1):161-173. DOI 10.7868/S0026898416010201.
- [Turnaev I.I., Rasskazov D.A., Arkova O.V., Ponomarenko M.P., Ponomarenko P.M., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. Hypothetical SNP markers that significantly affect the affinity of the TATA-binding protein to *VEGFA*, *ERBB2*, *IGF1R*, *FLT1*, *KDR*, and *MET* oncogene promoters as chemotherapy targets. *Molecular Biology*. 2016;50(1):141-152. DOI 10.1134/S0026893316010209.]
- Шарыпова Е.Б., Драчкова И.А., Кашина Е.В., Рассказов Д.А., Пономаренко П.М., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А., Савинкова Л.К. Экспериментальное изучение влияния редких полиморфизмов ТАТА-боксов промоторов генов *HBB*, *HBD* и *F9* человека на кинетику взаимодействия с ТАТА-связывающим белком. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):145-152. DOI 10.18699/VJ18.342.
- [Sharypova E.B., Drachkova I.A., Kashina E.V., Rasskazov D.A., Ponomarenko P.M., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A., Savinkova L.K. An experimental study of the effect of rare polymorphisms of human *HBB*, *HBD* and *F9* promoter TATA boxes on the kinetics of interaction with the TATA-binding protein. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):145-152. DOI 10.18699/VJ18.342. (in Russian)]
- Akyol O., Zoroglu S.S., Armutcu F., Sahin S., Gurel A. Nitric oxide as a physiopathological factor in neuropsychiatric disorders. *In Vivo*. 2004;18:377-390.
- Arkova O.V., Ponomarenko M.P., Rasskazov D.A., Drachkova I.A., Arshinova T.V., Ponomarenko P.M., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. Obesity-related known and candidate SNP markers can significantly change affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genom*. 2015;16(Suppl.13):S5. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S5.
- Begni S., Moraschi S., Bignotti S., Fumagalli F., Rillosi L., Perez J., Gennarelli M. Association between the G1001C polymorphism in the *GRIN1* gene promoter region and schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 2003;53(7):617-619. DOI 10.1016/s0006-3223(02)01783-3.
- Chadaeva I.V., Ponomarenko M.P., Rasskazov D.A., Sharypova E.B., Kashina E.V., Matveeva M.Y., Arshinova T.V., Ponomarenko P.M., Arkova O.V., Bondar N.P., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. Candidate SNP markers of aggressiveness-related complications and comorbidities of genetic diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genom*. 2016;17(Suppl.14):995. DOI 10.1186/s12864-016-3353-3.
- Chadaeva I.V., Ponomarenko P.M., Rasskazov D.A., Sharypova E.B., Kashina E.V., Zhechev D.A., Drachkova I.A., Arkova O.V., Savinkova L.K., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A., Osadchuk L.V., Osadchuk A.V. Candidate SNP markers of reproductive potential are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genom*. 2018;19(Suppl.3):0. DOI 10.1186/s12864-018-4478-3.
- Chaudhary S., Kaushik M., Kukreti R., Kukreti S. Structural switch from a multistranded G-quadruplex to single strands as a consequence of point mutation in the promoter of the human *GRIN1* gene. *Mol. Biosyst*. 2017;13(9):1805-1816. DOI 10.1039/c7mb00360a.

- Ding J., Zhou H.-H., Ma Q.-R., He Z.-Y., Ma J.-B., Liu Y.-M., Zhang Y.-W., He Y.-Q., Liu J. Expression of NR1 and apoptosis levels in the hippocampal cells of mice treated with MK-801. *Mol. Med. Rep.* 2017;16(6):8359-8364. DOI 10.3892/mmr.2017.7674.
- Drachkova I., Savinkova L., Arshinova T., Ponomarenko M., Peltek S., Kolchanov N. The mechanism by which TATA-box polymorphisms associated with human hereditary diseases influence interactions with the TATA-binding protein. *Hum. Mutat.* 2014;35(5):601-608. DOI 10.1002/humu.22535.
- Forero D.A. Functional genomics of epileptogenesis in animal models and humans. *Cell Mol. Neurobiol.* Publ. online 28 July 2020. Publ. 2021;41:1579-1587. DOI 10.1007/s10571-020-00927-x.
- Fox P.C. Acquired salivary dysfunction. Drugs and radiation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998;842:132-137. DOI 10.1111/j.1749-632.1998.tb09641.x.
- Freudenberg F., Altho A., Reif A. Neuronal nitric oxide synthase (*NOS1*) and its adaptor, *NOS1AP*, as a genetic risk factors for psychiatric disorders. *Genes Brain Behav.* 2015;14(1):46-63. DOI 10.1111/gbb.12193.
- Gray A.L., Hyde T.M., Deep-Soboslay A., Kleinman J.E., Sodhi M.S. Sex differences in glutamate receptor gene expression in major depression and suicide. *Mol. Psychiatry.* 2015;20(9):1057-1068. DOI 10.1038/mp.2015.91.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-674. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hancock D.B., Martin E.R., Vance J.M., Scott W.K. Nitric oxide synthase genes and their interactions with environmental factors in Parkinson's disease. *Neurogenetics.* 2008;9(4):249-262. DOI 10.1007/s10048-008-0137-1.
- Liu Y.-P., Ding M., Zhang X.-C., Liu Y., Xuan J.-F., Xing J.-K., Xia X., Yao J., Wang B.-J. Association between polymorphisms in the *GRIN1* gene 5' regulatory region and schizophrenia in a northern Han Chinese population and haplotype effect on protein expression *in vitro*. *BMC Med. Genet.* 2019;20(1):26. DOI 10.1186/s12881-019-0757-3.
- Mishizen-Eberz A.J., Rissman R.A., Carter T.L., Ikonovic M.D., Wolfe B.B., Armstrong D.M. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol. Dis.* 2004;15(1):80-92. DOI 10.1016/j.nbd.2003.09.016.
- Mogno I., Vallania F., Mitra R.D., Cohen B.A. TATA is a modular component of synthetic promoters. *Genome Res.* 2010;20(10):1391-1397. DOI 10.1101/gr.106732.110.
- Park Y.-J., Koh J., Kwon J.T., Park Y.-S., Yang L., Cha S. Uncovering stem cell differentiation factors for salivary gland regeneration by quantitative analysis of differential proteomes. *PLoS One.* 2017;12(2):e0169677. DOI 10.1371/journal.pone.0169677.
- Ponomarenko M.P., Arkova O., Rasskazov D., Ponomarenko P., Savinkova L., Kolchanov N. Candidate SNP markers of gender-biased autoimmune complications of monogenic diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *Front Immunol.* 2016;7:130. DOI 10.3389/fimmu.2016.00130.
- Ponomarenko M., Rasskazov D., Arkova O., Ponomarenko P., Suslov V., Savinkova L., Kolchanov N. How to use SNP_TATA_Comparator to find a significant change in gene expression caused by the regulatory SNP of this gene's promoter via a change in affinity of the TATA-binding protein for this promoter. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015:359835. DOI 10.1155/2015/359835.
- Ponomarenko M., Sharypova E., Drachkova I., Chadaeva I., Arkova O., Podkolodnaya O., Ponomarenko P., Kolchanov N., Savinkova L. Unannotated single nucleotide polymorphisms in the TATA box of erythropoiesis genes show *in vitro* positive involvements in cognitive and mental disorders. *BMC Med. Genet.* 2020;21(Suppl.1):165. DOI 10.1186/s12881-020-01106-x.
- Ponomarenko P., Chadaeva I., Rasskazov D.A., Sharypova E., Kashina E.V., Drachkova I., Zhechev D., Ponomarenko M.P., Savinkova L.K., Kolchanov N. Candidate SNP markers of familial and sporadic Alzheimer's diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *Front. Aging Neurosci.* 2017;20(9):231. DOI 10.3389/fnagi.2017.00231.
- Ponomarenko P., Rasskazov D., Suslov V., Sharypova E., Savinkova L., Podkolodnaya O., Podkolodny N.L., Tverdokhle N.N., Chadaeva I., Ponomarenko M., Kolchanov N. Candidate SNP markers of chronopathologies are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *Biomed. Res. Int.* 2016;2016:8642703. DOI 10.1155/2016/8642703.
- Praz V., P rier R.C., Bonnard C., Bucher P. The Eukaryotic Promoter Database, EPD: new entry types and links to gene expression data. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:322-324. DOI 10.1093/nar/30.1.322.
- Pugh B.F. Purification of the human TATA-binding protein, TBP. In: Tymms M.J. (Ed.) *In Vitro Transcription and Translation Protocols*. (Ser. Methods in Molecular Biology, Vol. 37). Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1995.
- Rugel-Stahl A., Elliott M.E., Ovitt C.E. Ascl3 marks adult progenitor cells of the mouse salivary gland. *Stem Cell Res.* 2012;8(3):379-387. DOI 10.1016/j.scr.2012.01.002.
- Saadat M. N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (*GRIN1*) G1001C polymorphism and susceptibility to schizophrenia: a meta-analysis. *EXCLI J.* 2010;9:11-6.
- Sherry S., Ward M., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E., Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:308-311. DOI 10.1093/nar/29.1.308.
- Shinkai T., Ohmori O., Hori H., Nakamura J. Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (*NOS1*) gene with schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 2002;7(6):560-563. DOI 10.1038/sj.mp.4001041.
- Sin W.C., Haas K., Ruthazer E.S., Cline H.T. Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature.* 2002;419(6906):475-480. DOI 10.1038/nature00987.
- Yu T., Xia L., Bi D., Wang Y., Shang Q., Zhu D., Song J., Wang J., Wang X., Zhu C., Xing Q. Association of *NOS1* gene polymorphisms with cerebral palsy in a Han Chinese population: a case-control study. *BMC Med. Genomics.* 2018;11(1):56. DOI 10.1186/s12920-018-0374-6.
- Zhao X., Li H., Shi Y., Tang R., Chen W., Liu J., Feng G., Shi J., Yan L., Liu H., He L. Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene *GRIN1* and schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 2006;59:747-753. DOI 10.1016/j.biopsych.2005.10.023.
- Zou Z., Li X., Sun Y., Li L., Zhang Q., Zhu L., Zhong Z., Wang M., Wang Q., Liu Z., Wang Y., Ping Y., Yao K., Hao B., Liu Q. *NOS1* expression promotes proliferation and invasion and enhances chemoresistance in ovarian cancer. *Oncol. Lett.* 2020;19(4):2989-2995. DOI 10.3892/ol.2020.11355.
- Zwicker A., Denovan-Wright E.M., Uher R. Gene-environment interplay in the etiology of psychosis. *Psychol. Med.* 2018;48(12):1925-1936. DOI 10.1017/S003329171700383X.

ORCID ID

E.B. Sharypova orcid.org/0000-0002-1467-9312
I.A. Drachkova orcid.org/0000-0002-2522-1657

I.V. Chadaeva orcid.org/0000-0002-2724-5441
M.P. Ponomarenko orcid.org/0000-0003-1663-318X
L.K. Savinkova orcid.org/0000-0003-4543-4104

Благодарности. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0016 ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.10.2021. После доработки 27.12.2021. Принята к публикации 30.12.2021.

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

Роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов гранулы на компетентность к созреванию и оплодотворению ооцитов *Sus scrofa domestica*

Т.И. Кузьмина¹✉, И.В. Чистякова¹, А.О. Притужалова¹✉, Д.Н. Татарская²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

² Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

✉ prof.kouzmina@mail.ru; aklevakina14@mail.ru

Аннотация. Репродуктивные технологии являются одним из ключевых направлений в условиях необходимости сохранения и отбора выдающихся по хозяйственно полезным признакам особей сельскохозяйственных животных. Совершенствование имеющихся моделей созревания ооцитов *in vitro* в различных вариациях способствует решению проблемы низкого выхода эмбрионов свиней на завершающих стадиях доимплантационного развития. В настоящем исследовании с использованием технологии созревания и оплодотворения донорских ооцитов свиней *in vitro* предложена модель среды для культивирования гамет (NCSU-23 с 10% гомологичной фолликулярной жидкостью, 10 МЕ ХГЧ и 10 МЕ ХГ лошади), модернизированная введением 1 · 10⁶ клеток гранулы (КГ) на 1 мл среды и 0.001% наночастиц высокодисперсного кремнезема (нВДК). Анализ статуса хроматина ооцитов по методу Тарковского и оценка уровня деструктивных изменений хроматина соматических клеток овариальных фолликулов (апоптоз, пикноз) выявили значительное повышение показателей ядерного созревания гамет и снижение доли клеток гранулы с дегенерированным хроматином при применении разработанной системы культивирования. Обнаружено позитивное влияние совместного введения КГ и нВДК в систему дозревания, позволившего увеличить показатели мейотического созревания и оплодотворяемости ооцитов. Оптимальные показатели фертильности ооцитов достигнуты при сочетанном использовании в системе дозревания КГ и нВДК (доля созревших клеток достигла 89%, уровень ооцитов с дегенерацией хромосом составил 12%, 39% эмбрионов достигли завершающей стадии доимплантационного развития). Положительный эффект нВДК на показатели оплодотворяемости ооцитов сопровождался резким снижением деструктивных процессов в КГ при их культивировании в присутствии нВДК. Уровень пикнозов составил 32%, а уровень апоптозов (TUNEL-test) – 21% по сравнению с контролем (43 и 31% соответственно, $p < 0.01$). Таким образом, выявлена высокая эффективность системы созревания ооцитов свиней в условиях совместного кокультивирования гамет с КГ и нВДК, что позволяет рекомендовать модель разработанной среды в технологии экстракорпорального созревания женских гамет *Sus scrofa domestica* для повышения качества донорских яйцеклеток, используемых в клеточной и генетической инженерии.

Ключевые слова: ооциты свиней; созревание *in vitro*; наночастицы высокодисперсного кремнезема; апоптоз; гранула.

Для цитирования: Кузьмина Т.И., Чистякова И.В., Притужалова А.О., Татарская Д.Н. Роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов гранулы на компетентность к созреванию и оплодотворению ооцитов *Sus scrofa domestica*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(3):234-239. DOI 10.18699/VJGB-22-30

The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica* oocytes

T.I. Kuzmina¹✉, I.V. Chistyakova¹, A.O. Prituzhalova¹✉, D.N. Tatarskaya²

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

² Pushkin Leningrad State University, Pushkin, St. Petersburg, Russia

✉ prof.kouzmina@mail.ru; aklevakina14@mail.ru

Abstract. Reproductive technologies are some of the key directions in the context of the need to preserve and select highly productive farmed animals in terms of economically useful traits. Improvements of the existing models of the *in vitro* oocyte maturation system help to solve the problem of low yield of porcine embryos at the final stages of preimplantation development. In the present study, a model of culture medium for gametes (NCSU-23 with 10%

homologous follicular fluid, 10 IU hCG and 10 IU eCG) modernized by the addition of $1 \cdot 10^6$ granulosa cells (GCs) per ml and 0.001 % of highly dispersed silica nanoparticles (HDSn) is proposed for use in the IVM and IVF technology of donor porcine oocytes. Analysis of the oocyte chromatin status by the Tarkowsky method and assessment of the level of destructive changes in chromatin (apoptosis, pyknosis) revealed a significant percentage increase in matured oocytes and a decrease in the proportion of granulosa cells with degenerated chromatin when using the original culture system. The positive effects of a joint addition of GCs and HDSn to the maturation system have made it possible to increase the indicators of the meiotic maturation and fertilization of oocytes. Optimal results of developmental competence of oocytes were achieved with the joint use of GCs and HDSn in the maturation system (the proportion of matured cells reached 89 %, the level of oocytes with chromosome degeneration was 12 %, 39 % of embryos reached the final stage of preimplantation development). The positive effect of HDSn on oocyte fertilization was accompanied by an abrupt decrease in destructive processes in GCs during culture in the presence of HDSn. The level of somatic cells with pyknotic nuclei was 32 % and the level of apoptosis (TUNEL-test), 21 %, compared with the control (43 and 31 %, $p < 0.01$, respectively). Thus, a high efficiency of the porcine oocyte maturation system in the joint culture of gametes with GCs and HDSn was revealed. It makes it possible to recommend a model of this culture medium at the IVM of female gametes of *Sus scrofa domestica* for improving the quality of donor oocytes used in cell and genetic engineering.

Key words: porcine oocytes; maturation *in vitro*; highly dispersed silica nanoparticles; apoptosis; granulosa.

For citation: Kuzmina T.I., Chistyakova I.V., Prituzhalova A.O., Tatarskaya D.N. The role of highly dispersed silica nanoparticles in the realization of the effects of granulosa on the maturation and fertilization competence of *Sus scrofa domestica* oocytes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):234-239. DOI 10.18699/VJGB-22-30

Введение

Клеточные репродуктивные и ДНК-биотехнологии играют важную роль в интенсификации селекционного процесса в животноводстве, поскольку они являются инструментом для увеличения числа выдающихся по хозяйственно полезным признакам особей (Romar et al., 2019). Биотехнологический интерес к виду *Sus scrofa domestica* возрос из-за возможности его использования в биомедицине, в силу особенностей физиологии (близость к виду *Homo sapiens*), для ксенотрансплантации органов. Производство *in vitro* жизнеспособных нативных и реконструированных (клонированных, трансгенных) эмбрионов свиньи в массовых масштабах возможно, однако в настоящее время отдельные этапы технологии экстракорпорального созревания яйцеклеток *S. scrofa domestica* и их оплодотворения требуют совершенствования (Fowler et al., 2018). Разработка стандартизированных протоколов методологии получения эмбрионов свиней *in vitro* необходима, чтобы в полной мере использовать возможности инновационных клеточных репродуктивных технологий в свиноводстве и биомедицине, в том числе для создания генетически модифицированных свиней.

Эффективность различных этапов экстракорпорального получения эмбрионов свиней неоднозначна. Решения проблем требуют разработка систем дозревания ооцитов, низкое процентное содержание моноспермных зигот и зигот, которые развиваются до завершающей стадии доимплантационного развития – бластоцисты (Martinez et al., 2019). На данный момент существует множество исследований по разработке унифицированной системы созревания донорских ооцитов свиней *in vitro*, но выход эмбрионов на завершающих стадиях доимплантационного развития до сих пор не превышает 45–50 % (Soriano-Úbeda et al., 2017).

Вышеизложенное позволяет определить задачу моделирования состава культуральных сред для завершения мейотического созревания свиных ооцитов вне организ-

ма как высокоактуальную. В организме формирование яйцеклетки проходит в тесной взаимосвязи с соматическими клетками овариального фолликула (кумулюс, гранулеза), которые продуцируют ряд биоактивных молекул, вовлеченных в процессы роста и созревания ооцитов. Пионерные работы L.R. Abeydeera показали эффективность использования стенок фолликула и фолликулярной жидкости в составе систем дозревания ооцитов (Abeydeera et al., 1998). Однако процедуры по препарированию фолликула, объективность оценки его качества эмбриотехнологом пролонгируют длительность первого этапа технологии получения эмбрионов. Использование в системе дозревания гамет животных *in vitro* инновационных материалов, в том числе их наноразмерных частиц, – стремительно развивающаяся отрасль бионанотехнологий (Remião et al., 2018). Рядом исследователей проведены оценки цито- и генотоксичности наночастиц различного происхождения на половых клетках млекопитающих (Roy et al., 2020).

В наших работах ранее выявлены положительные эффекты наночастиц высокодисперсного кремнезема (нВДК) на функционирование клеточных компартов нативных и девитрифицированных женских гамет сельскохозяйственных животных, деструктивные процессы хроматина в ядрах половых и соматических клеток овариальных фолликулов (Кузьмина и др., 2017, 2020). Следуя вышесказанному, логичным представляется введение в состав базовых культуральных сред клеток гранулезы как потенциального поставщика биологически активных веществ природного происхождения, в первую очередь стероидов, и наночастиц различного происхождения.

Цель настоящего исследования – оценить роль наночастиц высокодисперсного кремнезема в реализации эффектов введения клеток гранулезы в систему экстракорпорального дозревания ооцитов свиней на показатели фертильности гамет.

Материалы и методы

Все реагенты, использованные при выполнении экспериментов, за исключением обозначенных в тексте, производства компании Sigma-Aldrich (США). Пластиковая лабораторная посуда фирмы BD Falcon™ (США).

Ооцит-кумулосные комплексы (ОКК) были выделены из антральных фолликулов яичников *S. scrofa domestica* породы ландрас *post mortem* в возрасте 6–8 месяцев. Животных овариоэктомировали на мясокомбинате, яичники доставляли в лабораторию в растворе 0.9 % NaCl при температуре 30–35 °С, содержащем 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 нг/мл амфотерицина. ОКК аспирировали из антральных фолликулов (с высоким тургором, диаметром от 3 до 6 мм, высокой степенью васкуляризации). В экспериментах использовали ооциты с гомогенной ооплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные компактным слоем кумулосных клеток (не менее 5–6 слоев).

После морфологической оценки ОКК в количестве 40–50 шт. помещали в капли (объем 500 мкл) сред для культивирования следующего состава: группа I – синтетическая питательная среда North Carolina State University-23 (NCSU-23) + 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм); группа II – синтетическая питательная среда NCSU-23 + 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) + 0.001 % нВДК; группа III – синтетическая питательная среда NCSU-23 + 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) + $1 \cdot 10^6$ клеток гранулезы (КГ) на 1 мл среды; группа IV – синтетическая питательная среда NCSU-23 + 10 МЕ хорионического гонадотропина человека + 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади + 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) + $1 \cdot 10^6$ КГ на 1 мл среды + 0.001 % нВДК. нВДК синтезированы в Институте прикладной химии им. А.А. Чуйко НАН Украины. При выборе концентрации руководствовались рекомендациями разработчиков (Зюсюн и др., 2015). ОКК комплексы культивировали 22 ч при температуре 38.5 °С, в атмосфере 5 % CO₂ в вышеобозначенных средах, затем проводили смену сред с исключением во всех исследуемых группах гормональных добавок и последующим культивированием еще в течение 22 ч.

Для оценки статуса хроматина при мейотическом созревании ооцитов и уровня пикноза в клетках гранулезы использовали цитологический метод (Кузьмина и др., 2008). ОКК помещали на 5–10 мин в теплый (37 °С) 0.9 % гипотонический раствор 3-замещенного цитрата натрия и очищали от кумулоса, затем клетки переносили на сухое обезжиренное стекло и фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3:1). Высушенные образцы ооцитов и суховоздушные препараты клеток гранулезы окрашивали 4 % раствором Романовского–Гимза (азур-эозином) в течение 3–4 мин.

Уровень апоптоза в КГ после их культивирования на протяжении 22 ч в среде NCSU-23 с 10 МЕ хориониче-

ского гонадотропина человека, 10 МЕ хорионического гонадотропина лошади, 10 % фолликулярной жидкости (диаметр фолликулов 3–6 мм) и через 22 ч (общее время культивирования 44 ч) после смены состава среды (исключение гормональных добавок) оценивали методом TUNEL (Janowski et al., 2012). Опытная группа дополнялась введением в состав контрольной 0.001 % нВДК на всех этапах культивирования.

Для экстракорпорального оплодотворения использовали модифицированную среду mTBM, содержащую 113.1 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 20.0 mM Трис, 11.0 mM глюкозы, 5.0 mM натрия пирувата, 1 mM кофеина и 0.1 % BSA. Через 44 ч культивирования ооциты механически (пипетированием) освобождали от клеток кумулоса. Затем в количестве 10 шт. помещали в капли среды mTBM (объемом 90 мкл под парафиновым маслом) в 35 мм чашки для культивирования на 30 мин в CO₂-инкубатор для эквilibрации. Оплодотворяли ооциты нативной спермой (исходная концентрация в разбавителе $3 \cdot 10^9$ сперматозоидов на 1 мл). После трехкратного центрифугирования 10 мл суспензии сперматозоидов (80 г в течение 3 мин при комнатной температуре) осадок ресуспендировали в 10 мл DPBS с 0.1 % BSA и доводили концентрацию сперматозоидов до $2 \cdot 10^6$ кл./мл. 16 мкл суспензии сперматозоидов добавляли в капли с ооцитами объемом 90 мкл и культивировали в CO₂-инкубаторе при 38.5 °С в атмосфере 5 % CO₂ и 90 % влажности. Через 6 ч после инкубирования со сперматозоидами ооциты были перенесены в 500 мкл среды NCSU-23 с 0.4 % BSA для культивирования в CO₂-инкубаторе в течение 7 дней при температуре 38.5 °С в атмосфере 5 % O₂, 5 % CO₂ и 90 % N₂ со сменой среды через каждые 48 ч культивирования (Egerszegi et al., 2010).

Чтобы определить уровень апоптозов в КГ, их суспензию помещали на покрытые poly-L-lysine предметные стекла и подсушивали на воздухе. Далее тестирование уровня апоптозов проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя и методом, адаптированным к клеткам гранулезы, представленным в (Janowski et al., 2012). Для этого КГ фиксировали в 4 % (v/v) растворе параформальдегида в течение 30 мин, выдерживали 2 мин в 10 % растворе Тритона X-100 на 0.1 % цитрате натрия. Затем КГ инкубировали с реагентом TUNEL (Roche Diagnostics, GmbH, Германия) 60 мин при 37 °С, в темноте. После инкубации клетки промывали в растворе DPBS, окрашивали в растворе 0.1 % (w/v) пропидиум йодида (экспозиция 20 мин), вновь промывали в DPBS и экспонировали 1 ч в темноте при комнатной температуре. Хранили образцы в холодильнике при температуре от +3 до +5 °С. Образцы анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа ZEISS AxioLab. A1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты обрабатывали в пакете статистической программы SigmaStat (Jandel Scientific Software, США). Для оценки достоверности переменных частотных значений использовали критерий χ^2 Пирсона. Значимость различий сравниваемых значений оценивали при следующих уровнях: $p < 0.05$, $p < 0.01$ и $p < 0.001$ для трех-пяти независимых экспериментов.

Результаты и обсуждение

Клетки гранулезы и кумулюса секретируют огромное количество ростовых и иных факторов, детерминирующих формирование яйцеклетки и последующее развитие эмбрионов (Sapiragi, 2000). Наночастицы различных химических соединений, в том числе ВДК, способны синхронизировать ядерно-цитоплазматическое созревание ооцитов животных и защищать внутриклеточные компоненты от губительных для их функционирования факторов, включая активные формы кислорода (АФК) (Кузьмина и др., 2017, 2020). На рис. 1 представлены данные анализа статуса хроматина ооцитов свиней при культивировании с клетками гранулезы и нВДК.

Введение нВДК в среду для дозревания способствовало реинициации и завершению мейоза (рис. 2) в ооцитах, прокультивированных без КГ, по сравнению с клетками контрольной группы (79 и 75 % против 89 и 84 %, $p < 0.05$). Более того, стимулирующий эффект нВДК на созревание ооцитов наблюдали и при кокультивировании гамет с КГ (85 и 79 % против 93 и 89 %, $p < 0.05$). Важно отметить, что добавление нВДК обеспечило снижение доли дегенерированных ооцитов в опытных группах в сравнении с контрольными, прокультивированными с или без соматических клеток (15 и 12 % против 25 и 18 %, $p < 0.01$).

Во второй серии экспериментов мы оценили влияние нВДК на деструктивные процессы в КГ при культивировании *in vitro* (рис. 3). Показан ингибирующий эффект

наночастиц ВДК на деструктивные процессы хроматина (апоптоз, пикноз) в клетках гранулезы при пролонгированном культивировании. Так, через 22 ч культивирования доля клеток с пикнотическими ядрами была ниже на 7 % в группе, прокультивированной с нВДК, по сравнению с контролем (21 и 28 %, $p < 0.01$), а доля апоптотических клеток – ниже на 6 % (13 и 19 %, $p < 0.05$). После 44 ч культивирования доля клеток в состоянии пикноза в контрольной группе достигла 43 % ($p < 0.01$), в состоянии апоптоза – 31 % ($p < 0.01$). В опытной группе эти показатели оказались значительно ниже: 32 и 21 % ($p < 0.01$).

Результаты анализа показателей фертильности ооцитов, созревших в различных системах, представлены на рис. 4. При обогащении среды для дозревания нВДК выявлено повышение компетентности ооцитов к оплодотворению, выразившееся в увеличении доли раздробившихся клеток на 12 % (51 %, $p < 0.05$) и выхода доимплантационных эмбрионов на стадии бластоцисты на 11 % (23 %, $p < 0.01$) в сравнении с контрольной группой (39 и 12 % соответственно). При этом максимальные показатели оплодотворяемости отмечены среди ооцитов, прокультивированных совместно с клетками гранулезы и нВДК (61 и 39 % соответственно, $p < 0.01$ относительно контрольных групп).

Оксидативный стресс является одним из основных факторов, снижающих компетентность к развитию ооцитов при культивировании (Wei et al., 2016). Положительное влияние наночастиц на созревание ооцитов, возможно,

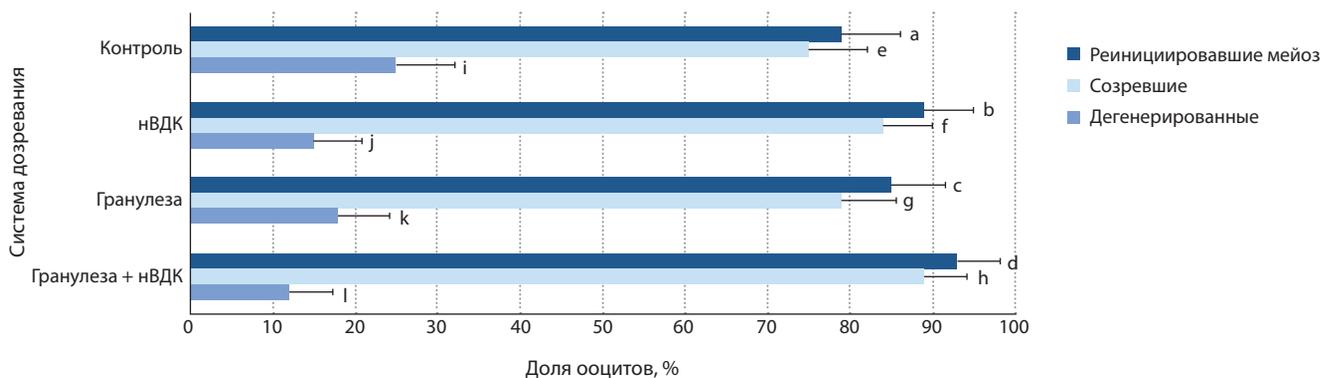


Рис. 1. Показатели статуса хроматина ооцитов свиней после культивирования с клетками гранулезы и нВДК (время культивирования 44 ч, число ооцитов – 600).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a:b; c:d; e:f; g:h; i:j – $p < 0.05$; a:d; e:h; i:l – $p < 0.1$.

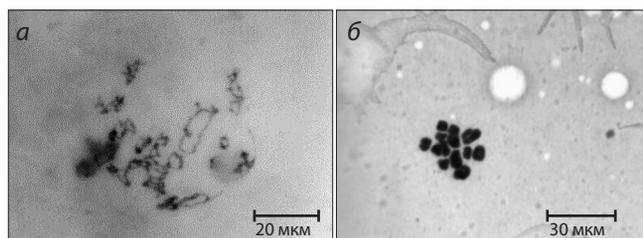


Рис. 2. Репрезентативное изображение хроматина ооцитов *S. scrofa domestica* на стадиях диплотены (а) и метафазы II (б).

Цитологический препарат, окрашивание азур-эозином по Романовскому-Гимзе; микроскоп ZEISS Axio Lab. A1 (Carl Zeiss).

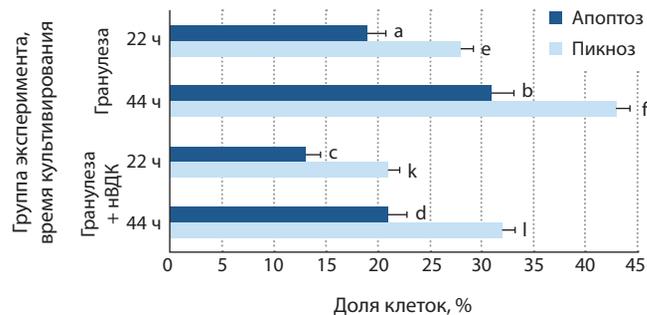


Рис. 3. Деструктивные процессы хроматина в клетках гранулезы овариальных фолликулов свиней (число клеток – 7539).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a:c; a:d; e:l – $p < 0.05$; a:b; b:c; b:d; c:d; e:f; e:k; f:l; k:l – $p < 0.01$.

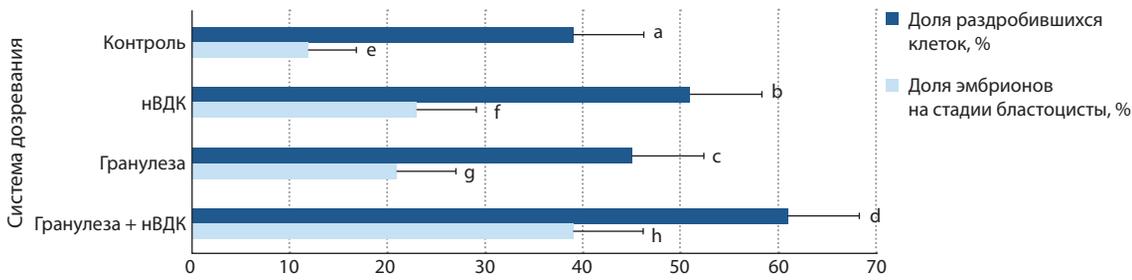


Рис. 4. Анализ показателей оплодотворяемости ооцитов *S. scrofa domesticus*, созревших в различных системах культивирования (число ооцитов – 736).

Статистическая значимость различий (критерий χ^2 Пирсона): a : b, e : g – $p < 0.05$; a : d, c : d, e : f, e : h, f : h, g : h – $p < 0.01$.

объясняется способностью нВДК нивелировать разрушающее действие свободно-радикальных процессов в процессе культивирования клеток путем снижения образования продуктов окислительной модификации белков (Савченко, 2013). Кроме того, в результате влияния окислительного стресса на клетки в эндоплазматическом ретикулуме происходит синтез и сборка липидных капель, детерминирующих цитопротекторный эффект при действии реактивных форм кислорода на мембранные структуры органелл, а также снабжающих митохондрии жирными кислотами для производства АТФ (Lee et al., 2012; Zhang X., Zhang K., 2012). Известно, что внутриклеточная форма липидных капель в виде «гранул» и их диффузное расположение обеспечивают мобилизацию жирных кислот, способствуя нормальному созреванию ооцит-кумулясных комплексов (Bradley et al., 2019). В наших ранних исследованиях было показано, что нВДК способствуют накоплению и формированию в ооцитах свиней в процессе созревания *in vitro* липидных капель с диффузной локализацией, что обеспечивает нормальное развитие гамет (Новичкова, Кузьмина, 2019).

Известно, что коммуникация КГ, как и клеток кумулюса с ооцитом, детерминирует рост и формирование женской гаметы. Успешное созревание ооцитов и дальнейшее эмбриональное развитие зависят от действия определенных гормонов, в частности прогестерона и эстрадиола, секретируемых гранулезными клетками. В свою очередь, влияние указанных гормонов на ооциты опосредуется клетками лучистого венца, экспрессирующими FSHR (рецептор фолликулостимулирующего гормона), контролирующего процессы пролиферации кумулюсных клеток и развития гаметы (Okazaki et al., 2003). Было показано, что введение в культуральную среду прогестерона и β -эстрадиола способствует увеличению уровня экспрессии FSHR, выживаемости кумулюсных клеток и снижению уровня апоптоза (Okamoto et al., 2016). нВДК предотвращают апоптоз в соматических клетках и мужских гаметах животных путем стимуляции работы антиоксидантной системы, взаимодействуя с рецепторами на поверхности клетки (Бойцева и др., 2017; Кузьмина и др., 2017).

Заключение

Разработка эффективных протоколов получения нативных и реконструированных эмбрионов *S. scrofa domesticus in vitro* позволит значительно интенсифицировать этапы инновационных клеточных репродуктивных технологий,

используемых в животноводстве, ветеринарии, биомедицине. Настоящее исследование направлено на совершенствование систем экстракорпорального дозревания донорских ооцитов свиней для получения яйцеклеток, компетентных к оплодотворению и развитию эмбрионов. С учетом значимости соматических клеток овариальных фолликулов в формировании зрелого ооцита в экспериментах использовали кокультивирование ооцит-кумулясных комплексов с клетками гранулезы. Систему дозревания модернизировали путем введения в среду нВДК.

При проведении экспериментов обнаружено положительное влияние разработанной системы на показатели фертильности ооцитов (выход созревших ооцитов, уровень дробления и достижение эмбрионами завершающей стадии доимплантационного развития). Позитивный эффект максимально выражался при совместном использовании в системе культивирования нВДК и клеток гранулезы. Высокие показатели фертильности ооцитов, созревших в среде с нВДК, вероятно, обусловлены снижением уровня деструктивных изменений в окружающих их клетках кумулюса (субпопуляция клеток гранулезы).

В исследовании обнаружено, что введение нВДК в среду культивирования вызывает снижение уровня апоптозов и пикнозов в клетках гранулезы, что априори свидетельствует об увеличении количества жизнеспособных клеток, их гормонсинтезирующей активности и обеспечивает физиологичность процессов, вовлеченных в формирование яйцеклеток с высокой фертильностью. Наиболее значимым показателем при оценке эффективности любой разработанной системы дозревания является выход эмбрионов. В наших исследованиях выход эмбрионов на завершающей стадии доимплантационного развития при совместном использовании в системе дозревания нВДК и клеток гранулезы был максимальным (39 %), что позволяет рекомендовать предложенную систему культивирования для экстракорпорального созревания донорских ооцитов *S. scrofa domesticus*.

Список литературы / References

- Бойцева Е.Н., Бычкова Н.В., Кузьмина Т.И. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на апоптоз сперматозоидов *Bos taurus*. *Цитология*. 2017;5(59):375-380.
[Boyitseva E.N., Bychkova N.V., Kuzmina T.I. Effects of highly dispersed silica nanoparticles on the apoptosis of *Bos taurus* spermatozoa. *Tsitologiya = Cytology*. 2017;5(59):375-380. (in Russian)]
Зюсюн А.Б., Щербак О.В., Осипчук О.С., Ковтун С.И., Дзіцюк В.В. Застосування наноматеріалу в ембріогенетичній системі *in vitro*

- отримання ембріонів свиней. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015;17:164-168.
- [Zyuzyn A.B., Shcherbak O.V., Osypchuk O.S., Kovtun S.I., Dzit-syuk V.V. Using of nanomaterials in embryogenetic system for receiving pig's embryos *in vitro*. *Faktyrnyy Eksperymentalnoy Evolutsii Organizmov = Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2015;17:164-168. (in Ukrainian)]
- Кузьмина Т.И., Альм Х., Торнер Х. Методы получения эмбрионов свиней *in vitro*: методические рекомендации. СПб.; Пушкин, 2008. [Kuzmina T.I., Alm H., Torner H. Methods of Porcine Embryos Production *in vitro*. St. Petersburg; Puskin, 2008. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Новичкова Д.А., Чистякова И.В., Епишко О.А. Воздействие наночастиц высокодисперсного кремнезема на хроматин соматических клеток фолликулов свиньи. *Ветеринария*. 2017;2:43-45.
- [Kuzmina T.I., Novichkova D.A., Chistyakova I.V., Epishko O.A. Effects of highly dispersed silica nanoparticles on the chromatin in somatic cells of porcine follicles. *Veterinariya = Veterinary Medicine Journal*. 2017;2:43-45. (in Russian)]
- Кузьмина Т.И., Чистякова И.В., Татарская Д.Н. Функциональная активность митохондрий и статус хроматина нативных и девитрифицированных ооцитов *Bos taurus* под воздействием наночастиц высокодисперсного кремнезема. *С.-х. биология*. 2020;55(4):784-793. DOI 10.15389/agrobiology.2020.4.784rus.
- [Kuzmina T.I., Chistyakova I.V., Tatarskaya D.N. The influence of highly dispersed silica nanoparticles on the functional activity of mitochondria and chromatin state in native and devitrified *Bos taurus* oocytes. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2020;55(4):784-793. DOI 10.15389/agrobiology.2020.4.784eng.]
- Новичкова Д.А., Кузьмина Т.И. Влияние наночастиц высокодисперсного кремнезема на функционирование липидома в ооцитах *Sus scrofa domesticus*. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019;S1:30-34.
- [Novichkova D.A., Kuzmina T.I. Effect of highly dispersed silica nanoparticles on the functioning of lipidome in *Sus scrofa domesticus* oocytes. *Meditsina Ekstremal'nykh Situatsiy = Medicine of Extreme Situations*. 2019;S1:30-34. (in Russian)]
- Савченко Д.С. Изучение антиоксидантных свойств наноконструкта высокодисперсного кремнезема с наночастицами серебра. *Медицина и образование в Сибири*. 2013;6:23-30.
- [Savchenko D.S. Studyng of antioxidatic properties of nanocomposite of highly dispersive silicon dioxide with silver nanoparticles. *Meditsina i Obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia*. 2013;6:23-30. (in Russian)]
- Abeydeera L.R., Wang W.H., Cantley T.C., Rieke A., Day B.N. Coculture with follicular shell pieces can enhance the developmental competence of pig oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular glutathione. *Biol. Reprod.* 1998;58(1):213-218. DOI 10.1095/biolreprod58.1.213.
- Bradley J., Pope I., Wang Y., Langbein W., Borri P., Swann K. Dynamic label-free imaging of lipid droplets and their link to fatty acid and pyruvate oxidation in mouse eggs. *J. Cell Sci.* 2019;132(13):jcs228999. DOI 10.1242/jcs.228999.
- Canipari R. Oocyte-granulosa cell interactions. *Hum. Reprod. Update.* 2000;6(3):279-289. DOI 10.1093/humupd/6.3.279.
- Egerszegi I., Alm H., Rátky J., Heleil B., Brüssow K.P., Torner H. Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010;22(5):830-838. DOI 10.1071/RD09140.
- Fowler K.E., Mandawala A.A., Griffin D.K., Walling G.E., Harvey S.C. The production of pig preimplantation embryos *in vitro*: current progress and future prospects. *Reprod. Biol.* 2018;18(3):203-211. DOI 10.1016/j.repbio.2018.07.001.
- Janowski D., Salilew-Wondim D., Torner H., Tesfaye D., Ghanem N., Tomek W., El-Sayed A., Schellander K., Holker M. Incidence of apoptosis and transcript abundance in bovine follicular cells is associated with the quality of the enclosed oocyte. *Theriogenology*. 2012;78(3):656-669. DOI 10.1016/j.theriogenology.2012.03.012.
- Lee J.S., Mendez R., Heng H.H., Yang Z.Q., Zhang K. Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am. J. Transl. Res.* 2012;4(1):102-113.
- Martinez E.A., Martinez C.A., Cambra J.M., Maside C., Lucas X., Vazquez J.L., Vazquez J.M., Roca J., Rodriguez-Martinez H., Gil M.A., Parrilla I., Cuello C. Achievements and future perspectives of embryo transfer technology in pigs. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(4):4-13. DOI 10.1111/rda.13465.
- Okamoto A., Ikeda M., Kaneko A., Kishida C., Shimada M., Yamashita Y. The novel pig *in vitro* maturation system to improve developmental competence of oocytes derived from atretic non-vascularized follicle. *Biol. Reprod.* 2016;95(4):7. DOI 10.1095/biolreprod.116.138982.
- Okazaki T., Nishibori M., Yamashita Y., Shimada M. LH reduces proliferative activity of cumulus cells and accelerates GVBD of porcine oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003;209:43-50. DOI 10.1016/j.mce.2003.08.002.
- Remião M.H., Segatto N.V., Pohlmann A., Guterres S.S., Seixas F.K., Collares T. The potential of nanotechnology in medically assisted reproduction. *Front. Pharmacol.* 2018;8:994. DOI 10.3389/fphar.2017.00994.
- Romar R., Canovas S., Matas C., Gadea J., Coy P. Pig *in vitro* fertilization: where are we and where do we go? *Theriogenology*. 2019;137:113-121. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.05.045.
- Roy P.K., Qamar A.Y., Fang X., Kim G., Bang S., Zoysa M., Shin S.T., Cho J. Chitosan nanoparticles enhance developmental competence of *in vitro*-matured porcine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 2020;56(2):342-350. DOI 10.1111/rda.13871.
- Soriano-Úbeda C., García-Vázquez F.A., Romero-Aguirregomez-corta J., Matas C. Improving porcine *in vitro* fertilization output by simulating the oviductal environment. *Sci. Rep.* 2017;7:43616. DOI 10.1038/srep43616.
- Wei J.H., Yuan X.Y., Zhang J.M., Wei J.Q. Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2016;198:22-26. DOI 10.1016/j.ejogrb.2015.12.010.
- Zhang X., Zhang K. Endoplasmic reticulum stress-associated lipid droplet formation and type II diabetes. *Biochem. Res. Int.* 2012;2012:247275. DOI 10.1155/2012/247275.

ORCID ID

T.I. Kuzmina orcid.org/0000-0002-4218-6080
I.V. Chistyakova orcid.org/0000-0001-7229-5766
A.O. Prituzhalova orcid.org/0000-0002-2865-9582
D.N. Tatarskaya orcid.org/0000-0002-8834-1912

Благодарности. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проекты № 0445-2021-0005 и 121052600350-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.11.2021. После доработки 09.01.2022. Принята к публикации 11.01.2022.

Biochemical and technological properties of moose (*Alces alces*) recombinant chymosin

D.V. Balabova¹, A.P. Rudometov², S.V. Belenkaya^{1, 2, 3}, A.N. Belov⁴, A.D. Koval⁴,
A.A. Bondar⁵, A.Yu. Bakulina^{2, 3}, E.A. Rukhlova², V.V. Elchaninov⁴, D.N. Shcherbakov^{1, 2} 

¹ Altai State University, Barnaul, Russia

² State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴ Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnology, Siberian Research Institute of Cheese-Making, Barnaul, Russia

⁵ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 dshcherbakov@gmail.com

Abstract. Recombinant chymosins (rChns) of the cow and the camel are currently considered as standard milk coagulants for cheese-making. The search for a new type of milk-clotting enzymes that may exist in nature and can surpass the existing "cheese-making" standards is an urgent biotechnological task. Within this study, we for the first time constructed an expression vector allowing production of a recombinant analog of moose chymosin in the expression system of *Escherichia coli* (strain SHuffle express). We built a model of the spatial structure of moose chymosin and compared the topography of positive and negative surface charges with the correspondent structures of cow and camel chymosins. We found that the distribution of charges on the surface of moose chymosin has common features with that of cow and camel chymosins. However, the moose enzyme carries a unique positively charged patch, which is likely to affect its interaction with the substrate. Biochemical and technological properties of the moose rChn were studied. Commercial rChns of cow and camel were used as comparison enzymes. In some technological parameters, the moose rChn proved to be superior to the reference enzymes. Compared with the cow and camel rChns, the moose chymosin specific activity is less dependent on the changes in CaCl₂ concentration in the range of 1–5 mM and pH in the range of 6–7, which is an attractive technological property. The total proteolytic activity of the moose rChn occupies an intermediate position between the rChns of cow and camel. The combination of biochemical and technological properties of the moose rChn argues for further study of this enzyme.

Key words: moose; recombinant chymosin; milk-clotting activity; biochemical properties; cheese-making; *Alces alces*.

For citation: Balabova D.V., Rudometov A.P., Belenkaya S.V., Belov A.N., Koval A.D., Bondar A.A., Bakulina A.Yu., Rukhlova E.A., Elchaninov V.V., Shcherbakov D.N. Biochemical and technological properties of moose (*Alces alces*) recombinant chymosin. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):240-249. DOI 10.18699/VJGB-22-31

Биохимические и технологические свойства рекомбинантного химозина лося (*Alces alces*)

Д.В. Балабова¹, А.П. Рудометов², С.В. Беленькая^{1, 2, 3}, А.Н. Белов⁴, А.Д. Коваль⁴,
А.А. Бондарь⁵, А.Ю. Бакулина^{2, 3}, Е.А. Рухлова², В.В. Ельчанинов⁴, Д.Н. Щербakov^{1, 2} 

¹ Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴ Федеральный Алтайский научный центр агrobiотехнологий, Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия, Барнаул, Россия

⁵ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 dshcherbakov@gmail.com

Аннотация. Эталонными коагулянтами молока для сыроделия в настоящее время считаются рекомбинантные химозины (рХн) коровы и верблюда. Нахождение молокосвертывающих ферментов, способных превзойти эталонные коагулянты молока, является актуальной биотехнологической задачей. Нами сконструирован экспрессирующий вектор, который позволил впервые получить рекомбинантный аналог химозина лося в системе экспрессии *Escherichia coli* (штамм SHuffle Express). Построена модель пространственной структуры химозина лося, и проведено сравнение топографии положительных и отрицательных поверхностных зарядов с соответствующими структурами химозинов коровы и верблюда. Обнаружено, что распределение зарядов на поверхности химозина лося имеет общие черты с распределением зарядов химозинов коровы и верблюда. Отличительная особенность химозина лося – наличие положительно заряженного поверхностного участка, который, вероятно, влияет на его взаимодействие с субстратом. Исследованы основные биохимические и технологические свойства рХн лося. В качестве ферментов сравнения использовали коммерческие рХн

коровы и верблюда. Установлено, что по некоторым технологическим показателям рХн лося превосходил ферменты сравнения. По сравнению с рХн коровы и верблюда специфическая активность рХн лося в меньшей степени зависит от изменения концентрации CaCl_2 в диапазоне 1–5 мМ и рН в диапазоне 6–7, что является привлекательным технологическим свойством. По общей протеолитической активности рХн лося занимает промежуточное положение между ферментами коровы и верблюда. Совокупность биохимических и технологических свойств рХн лося свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения этого фермента. Ключевые слова: лось; рекомбинантный химозин; молокосвертывающая активность; биохимические свойства; сыроделие; *Alces alces*.

Introduction

The segment of recombinant enzymes occupies a significant part of the modern biotechnology market (Trono, 2019). One of the first industrial enzymes obtained using genetic engineering technologies was cow's recombinant chymosin (Flamm, 1991), which has been considered the standard of a milk-clotting enzyme (ME) in cheese-making for a long time (Belov et al., 2009; Jacob et al., 2011). The rapid development of molecular biology methods (primarily next-generation sequencing and genetic engineering) has intensified the search for enzymes with superior biochemical and technological properties compared to the milk coagulants traditionally used in the industry.

The main goal of such a search is to find the enzymes possessing approximately the same sensitivity to pH and concentration of calcium ions in milk compared with a bovine (*Bos taurus*) chymosin but would outperform it in a milk-clotting activity (MA) and, at the same time, would demonstrate a lower overall proteolytic activity (PA) and thermal stability (TS).

Previously, researchers have obtained and studied rChns of sheep (*Ovis aries*) (Rogelj et al., 2001), goat (*Capra hircus*) (Vega-Hernández et al., 2004; Vallejo et al., 2012; Tyagi et al., 2016), water buffalo (*Bubalus arnee bubalis*) (Vallejo et al., 2012; Tyagi et al., 2017), and camel (*Camelus dromedarius*) (Kappeler et al., 2006). It was shown that the rChns of goat, buffalo, and sheep are ordinary ME and cannot compete with the bovine Chn. The camel rChn showed a higher affinity toward bovine κ -casein (κ -Cs) and had a better MA/PA ratio than the cow rChn, but was inferior to the bovine enzyme in TS (Bansal et al., 2009). Nevertheless, after a comprehensive study of its biochemical and technological properties, the camel's rChn is widely used in the practice of cheese-making (Bansal et al., 2009; Moynihan et al., 2014; Gumus, Hayaloglu, 2019) and is now considered a reference ME along with the bovine rChn.

Later, the rChns of yak (*Bos grunniens*) (Luo et al., 2016; Ersöz, İnan, 2019), alpaca (*Vicugna pacos*) (Belenkaya et al., 2018), and Altai maral (*Cervus elaphus sibiricus*) (Belenkaya et al., 2020a, b) have been obtained and studied. The complete biochemical and technological characteristics of the yak rChn have not yet been established. The available literature data indicate, on the one hand, that the yak rChn has a low technologically significant threshold for TS, and on the other hand, a higher total PA, compared to that of the bovine rChn (Belenkaya et al., 2020c). According to our data, the rChn of maral has an excessively high total PA and TS, limiting its potential use only to the production of cheeses with short ripening and storage periods (Belenkaya et al., 2020a). The genetically

engineered Chn of alpaca surpasses the bovine rChn in the MA/PA ratio but is inferior in this parameter to the rChn of the camel. In addition, similar to the rChn of camel, the rChn of alpaca has a higher TS than the bovine rChn. Taken together, the facts mentioned above show that despite the presence of some interesting characteristics, the complex of biochemical and technological properties of the rChns of yak, alpaca, and maral hardly allows these enzymes to be considered as an alternative to the rChns of cow and camel.

Here we present a new milk-clotting enzyme – recombinant chymosin of moose (rChn-Alc) in a prokaryotic expression system and investigate some of its biochemical properties in comparison with standard milk-clotting enzymes. The recombinant prochymosin (rProChn) of moose developed in the prokaryotic expression system was activated by a stepwise pH change method, and an active rChn-Alc preparation capable of effectively coagulating cow's milk was obtained. It was shown that compared to the reference milk coagulants, the specific enzymatic activity of rChn-Alc was less sensitive to changes in the H^+ concentration in the pH range of 6.0–7.0. Concerning an important technological indicator, the total PA, rChn-Alc was found to occupy an intermediate position between the cow rChn and the camel rChn. The specific MA of the moose rChn was lower than that of the cow and camel rChns, possibly due to incomplete refolding of the enzyme obtained in the *E. coli* expression system. The results obtained expand the understanding of the biochemical and technological properties of Chns of various species and create a basis for further search for technological coagulants of cow's milk that would surpass the existing reference milk-converting enzymes in their properties.

Materials and methods

Work organization. The optimization of the structure of the moose prochymosin gene and the construction of a producer strain were carried out at the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”. Works on obtaining a preparation of recombinant moose prochymosin and determining its biochemical and technological properties were carried out at Altai State University. All work was carried out in 2019.

Strains and media. *Escherichia coli* strain NEB Stable used to construct and propagate all plasmids was purchased from New England Biolabs (NEB, Ipswich, USA). *E. coli* strain SHuffle express was purchased from New England Biolabs (NEB, Ipswich, USA) and used as a heterologous host to produce the rProChn of moose (GenBank MT542132). The medium Lysogeny broth (LB) (1.0 % bacto-peptone, 0.5 % yeast extract, and 1.0 % NaCl) in liquid or solid (1.5 % agar) form was used to culture NEB stable cells at 37 °C. *E. coli*

SHuffle express cells were cultured at 30 °C in LB medium (AppliChem, USA) with the addition of isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for induction (final concentration 1.0 mM).

Subcloning of prochymosin gene into pET21a expression vector. Codon optimization of the moose prochymosin sequence (accession number MT542132) for the selected expression system was performed by the online service Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>), followed by synthesis and integration into pGH cloning plasmid. Synthetic gene sequence containing *BamHI* and *HindIII* restriction sites at the 5'- and 3'-ends, respectively, was digested and subcloned into the expression vector pET21a (Novagen, Germany). The structure of the recombinant plasmid was verified by Sanger sequencing. As a result, the expression vector pET21-CYM-Alc was obtained.

***E. coli* transformation and recombinant protein production.** For obtaining the target protein, the chemical transformation of *E. coli* strain SHuffle express was carried out with the resulting construct. Individual *E. coli* colonies containing recombinant plasmids were cultured overnight on an orbital shaker (Biosan, Latvia) in LB medium containing 100 µg/ml ampicillin at 37 °C and 180 rpm. The inoculum in a ratio of 1/100 was transferred to an Erlenmeyer flask containing LB medium and grown at 37 °C and 180 rpm. After the optical density (OD600) reached a value of 0.8, IPTG (Anatrace Products, USA) was added to the mixture to a final concentration of 1.0 mM. The culture was additionally incubated on a shaker for 12 h at 25 °C and 180 rpm. The biomass was centrifuged for 20 min at 5000 g and 4 °C to precipitate the inclusion bodies. *E. coli* cells were then resuspended in STET buffer (AppliChem, USA) (8.0 % sucrose; 50 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 5.0 % (w/v) Triton X-100, pH 8.0) in proportion of 20 ml per 1 gram of biomass and incubated overnight at 4 °C. Thereafter cells were destroyed using a Soniprep 150 Plus ultrasonic homogenizer (MSE, PRC). Inclusion bodies were precipitated by centrifugation at 20,000 g for 20 min at 4 °C (Wei et al., 1999). The sedimented inclusion bodies were solubilized in buffer A (50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 10.7) containing 8.0 M urea, incubated for 24 h at 15 °C and centrifuged at 20,000 g for 20 min.

Further work was carried out with a supernatant containing recombinant ProChn (rProChn). The target protein was renatured according to the method of Wei et al. (1999). The supernatant was diluted 3× with buffer A and incubated for 12 h at 15 °C. Following the incubation, the supernatant diluted with alkaline buffer was adjusted to pH 8.0 with 1.0 M HCl, kept at 15 °C for 1 h, and dialyzed against buffer B (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) overnight at 4 °C (Wei et al., 1999). As a result, an experimental preparation of moose rProChn was obtained.

The recombinant protein production in *E. coli* cells was analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to the Laemmli method (Laemmli, 1970). To analyze the electrophoretic mobility of the protein and determine molecular weights, the molecular weight markers PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) were used. Protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford, 1976).

Activation of moose recombinant prochymosin. Activation of the moose rProChn was carried out by a stepwise changing of pH (Belenkaya et al., 2020b). To avoid autocatalytic conversion (Pedersen et al., 1979) of zymogen to an active enzyme after the isolation from inclusion bodies and partial purification, the preparations of moose rProChn were stored in weakly alkaline conditions (buffer B) prior to activation. For activation, HCl (2.0 M) was added to the rProChn sample, adjusting pH to 3.0 with continuous stirring. Then stirring was stopped, and the mixture was incubated at pH 3.0 for 2 h. After incubation, pH of the sample was adjusted to 5.8 using 0.5 M NaOH. As a result, the rChn of moose (rChn-Alc) was obtained.

Comparison preparations of commercial reference coagulants. Biochemical properties of rChn-Alc were compared with the properties of commercial reference coagulants: bovine rChn (rChn-Bos) (granular dry form with declared MA – 2201 IMCU/g) and commercial camel rChn (rChn-Cam) (liquid form with declared MA – 1000 IMCU/ml), produced by “Chr. Hansen” (Denmark).

Three-dimensional structure modeling and imaging. The homology model of the moose Chn three-dimensional structure was built on Swiss-model server (Waterhouse et al., 2018). The bovine Chn structure was used as a template for the modeling (Jensen et al., 2013). The images of surface charges were built with Coulombic Surface Coloring function of Chimera 1.14 software package.

Milk-clotting activity assays. A 10.0 % solution of standardized skimmed milk powder (MZSF OJSC, Russia) in 5 mM CaCl₂, pH 6.5, was used as a substrate. A 0.5 % aqueous solution of a dry bovine rChn with a certified MA value was used as a control. Prior to determining the MA, the control sample and the liquid preparation of rChn were kept in a water bath at 35 °C for 15 min and cooled to room temperature. The procedure for determining MA was carried out in a water bath at 35 °C. Substrate solution (2.5 ml) was placed into a glass tube and heated at 35 °C for 5 min. An aliquot (0.25 ml) of an enzyme was added to the substrate, a stopwatch was turned on, and the resulting reaction mixture was immediately thoroughly mixed. The time when the first flakes of the coagulated substrate were observed in the drops of reaction mixture applied onto the tube wall was considered to be the clotting time. The milk-clotting activity was expressed in arbitrary units (AU) per 1 ml (AU/ml) and calculated using the equation:

$$MA = 0.005 \cdot A \cdot T_1 / T_2,$$

where A – certified MA value of the control rChn sample in AU per 1 gram, 0.005 – the dilution factor, T_1 – coagulation time for the control rChn sample of chymosin, T_2 – coagulation time for the test rChn sample.

Determination of total MA in each sample was performed in triplicate ($n = 3$). The relative MA of rChn-Alc was calculated after determining the total MA and protein concentration. For determining the relative MA of commercial reference chymosins, a 1.0 % aqueous solution of rChn-Bos was prepared, and the liquid rChn-Cam was diluted 10 times with distilled water. Protein concentration was determined in the resulting solutions with the Bradford assay. The MA values declared by the manufacturer were used to calculate the relative MA of the commercial reference enzymes. The relative MA was expressed in AU per milligram (AU/mg). To convert IMCU

(International Milk Clotting Units) values into AU, a multiplication coefficient of 125 was used.

General proteolytic activity assays. A 1.0 % solution of Hammerstein-grade casein in a 20 mM Na-phosphate buffer (pH 5.6) was used as a substrate. The investigated MEs were introduced into the substrate solution in a 1:4 ratio and incubated at 35 °C for 0 ('zero' point), 30, 90, and 180 min. The reaction was stopped by adding trichloroacetic acid. The precipitates were filtered, and the OD of the filtrate was measured at 280 nm (OD280) with a 'zero' point as a control. To assess the specificity of the rChn preparations, the OD280 values of the samples incubated for 180 min were designated as the PA values. The specificity was defined as the ratio of MA to general PA (MA/PA). When calculating the specificity of rChn-Bos and rChn-Cam, the MA values stated by the manufacturer were used. The enzymes studied were normalized by MA.

Thermal stability assays. Aliquots of ME were heated in the temperature range of 30–60 °C for 30 min and then assessed for residual MA. The MA values obtained in the samples heated at 30 °C were assigned as 100 %. The enzymes studied were normalized by MA.

Dependence of rennet coagulation time on pH. Solutions (10.0 %) of standardized skimmed milk (SSM) were adjusted to pH levels of 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8 and 7.0, and the rennet coagulation time (RCT) of the studied preparations of rChns was then determined. The RCT values at a pH of 6.0 was assigned as 100 %. The enzymes studied were normalized by MA.

Dependence of rennet coagulation time on the calcium chloride concentration. Dry powder of CaCl₂ was added to the SSM to a final concentration of 1–5 mM, and the clot formation time was measured therein. The RCT values obtained in CaCl₂-free samples of SSM were taken as 1.0. The enzymes studied were normalized by MA.

Results

Expression of recombinant moose prochymosin. We used the *E. coli* strain SHuffle express to produce moose prochymosin in the laboratory to study its biochemical properties since *E. coli* is the most studied system for the expression of heterologous genes; functionally active chymosins of a number of mammals have already been obtained in this system (Rogelj et al., 2001; Belenkaya et al., 2020a, b), and despite the presence of drawbacks it allows obtaining samples of recombinant proteins in quantities sufficient for primary biochemical analysis in a short time. To obtain a producer strain, the designed nucleotide sequence of the moose ProChn gene, 1095 bp in size, was synthesized and cloned as part of the pET21a plasmid vector. The production and purification of the target protein were carried out as described previously (Belenkaya et al., 2018, 2020a). In order to evaluate the efficiency of the synthesis of rProChn of moose, as well as to determine its localization in the *E. coli* cell, an electrophoretic analysis of protein preparations obtained from the cells of the producer strain was carried out (Fig. 1).

Analysis of *E. coli* cells containing the pET21-CYM-Alc plasmid after induction with IPTG showed a high protein content, which coincides with the calculated one for rProChn of moose in terms of electrophoretic mobility (41 kDa). Its

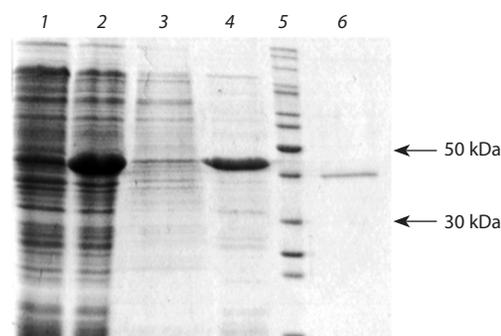


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of protein samples obtained from the producer strain cells:

1 – producer cell biomass before IPTG adding; 2 – producer cell biomass after 5 h IPTG adding; 3 – soluble biomass fraction after treatment with STET buffer; 4 – insoluble fraction (inclusion bodies) after treatment with lysis buffer; 5 – molecular-weight markers (200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 and 15 kDa); 6 – moose rChn obtained as a result of zymogen activation.

content was ≥ 30 % (see Fig. 1, lane 1) of the total amount of cell proteins. It can be seen that the soluble fraction of *E. coli* biomass after treatment with STET buffer and centrifugation (lane 3) contains almost no target protein, while the fraction of inclusion bodies is nearly completely represented by rProChn of moose (lane 4).

Activation of rProChn and obtaining of rChn-Alc. The initial MA of the rProChn was < 1.0 AU/ml. After activation, MA was equal to 843 AU/ml. Thus, as a result of activation, the total MA of the preparation increased more than 840 times, indicating the efficiency of the conversion of rProChn into active rChn of moose. In this case, a propeptide is cleaved from the N-terminus of prochymosin molecule, resulting in a change in the length of the protein in the polyacrylamide gel, which is recorded using SDS-PAGE analysis (see Fig. 1, lane 6).

Three-dimensional structure and surface charges of chymosin. Analyses of Chn sequences from different mammals demonstrated that the moose Chn is close to the other ones, especially the bovine Chn. Amino acid sequences of the bovine and moose Chn share 93.5 % identity, differing in 21 out of 323 positions. Three-dimensional structures of proteins with such a high similarity level are expected to be very close. In comparison, the camel and bovine Chn have 83.3 % identity, and their structures are similar. Therefore, we built a homology model of the moose Chn and used it for analyzing the surface charges.

Previous studies of camel and bovine chymosins revealed three positively charged patches on their surfaces that can contribute to the enzyme-substrate interaction (Jensen et al., 2013). Patch 1 and patch 3 are identical in the bovine and moose Chn, and patch 2 in the moose Chn has the same total charge as patch 2 in the bovine Chn, but charge distributions are different. Also, an additional charged patch in the moose Chn can be seen, designated as patch 4 (Fig. 2).

Technological properties

Specific MA. Milk-clotting activity is a basic technological characteristic of any new rChn since it indicates its ability to hydrolyze the Chn-sensitive peptide bond in the kappa-casein molecule and cause milk coagulation. Specialists in cheesemaking are aware of the paradox “cow Chn – camel milk and

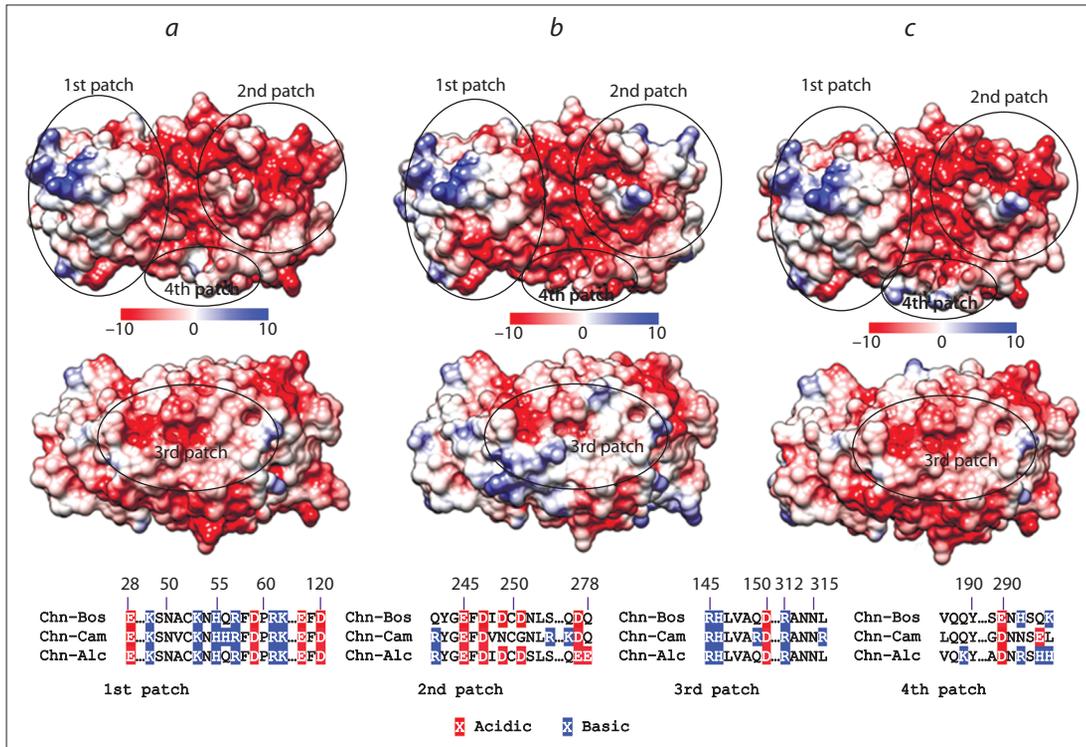


Fig. 2. Surface charged patches on chymosin: bovine (a), camel (b), moose (c).

Molecular surfaces are colored with Chimera software by the potential values in kcal/mole at 298 K. All proteins oriented with the C-terminal domain to the left and the N-terminal domain to the right, looking into the binding cleft (top) and rotated 180 degrees around the horizontal direction (bottom). The sequences of the chymosin charged patches are aligned, charged residues are highlighted.

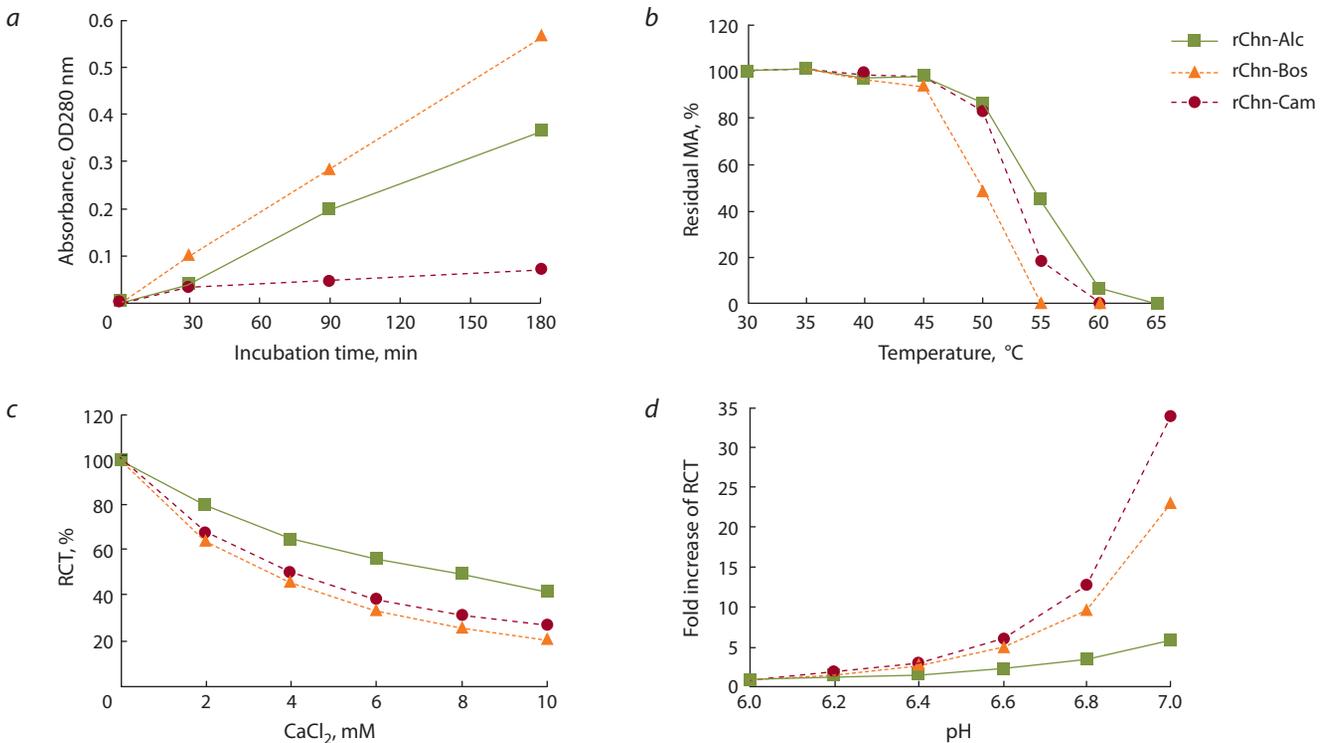


Fig. 3. Results of a comparative study of the following dependency patterns: general proteolytic activity (OD280) on the incubation time (a), residual MA (%) on the heating temperature (b), RCT on the calcium chloride concentration (c) and pH (d).

Table 1. Total and specific milk-clotting activity of recombinant chymosins

Sample	Total MA, AU/ml	Protein concentration, mg/ml	Specific MA, AU/mg	Specific MA, %
rChn-Alc	843 ± 14	0.027 ± 0.002	31 197 ± 526	37
rChn-Bos	2751	0.033 ± 0.005	85 323 ± 12 928	100
rChn-Cam	125 000	0.928 ± 0.029	136 944 ± 2099	161

camel Chn – cow milk”. The paradox lies in the inability of the cow Chn to coagulate camel milk, while the camel enzyme effectively coagulates cow milk (Kappeler et al., 2006). Therefore, the study of any new ME for cheese-making begins with determining its MA in relation to cow’s milk as the main raw material for cheese production. Only when one is sure that the new enzyme is capable of coagulating cow’s milk is it reasonable to start investigating its other technological properties. Since the cow rChn and the camel rChn can be considered reference MEs for cheese-making, it is advisable to compare the biochemical properties of the new milk coagulant with them in order to assess its technological prospects.

In terms of specific MA, the moose rChn was inferior to the reference MEs – the cow and camel rChns – by 2.7 and 4.4 times, respectively (Table 1). The specific MA of rChn-Cam is 1.61 times higher than the specific coagulation activity of rChn-Bos. This is in good agreement with the data of (Kappeler et al., 2006; Belenkaya et al., 2020c), where it was shown that the ratio of the specific MA of rChn-Bos to the rChn-Cam is 1:1.7.

General proteolytic activity and specificity. To predict the technological prospects of any new ME, it is necessary to study its general PA. Excessive PA of milk coagulant is considered a negative factor in cheese production since it leads to a decrease in the yield and deterioration of the organoleptic properties of the cheeses produced (Singh et al., 2003; Harboe et al., 2010).

Conventionally, the PA of milk coagulants can be divided into specific and non-specific. The specific or milk-clotting activity of ME provides the hydrolysis of the F105-M106 bond in the κ -casein molecule, causing the destabilization of casein micelles and leading to the formation of a milk clot. Non-specific or general PA characterizes the ability of ME to hydrolyze any peptide bonds, with the exception of the F105-M106 bond of κ -casein. The ideal milk coagulant for cheese-making should exhibit the maximal MA with the minimal general PA (Harboe et al., 2010). The ratio of MA to general PA (MA/PA) is called specificity. The higher the value, the more versatile the ME, and the wider the range of cheeses to be produced.

The dynamics of accumulation of milk substrate proteolysis products under the action of rChn-Alc is similar to rChn-Bos and differs markedly from rChn-Cam (Fig. 3, a). These differences are most clearly observed after 90 min of incubation. After 180 min of incubation of the enzyme-substrate mixture, the general PA values (expressed in OD280 units) of the rChns of moose, cow, and camel were 0.362 ± 0.023 , 0.565 ± 0.020 , and 0.072 ± 0.012 , respectively. As expected, rChn-Cam showed an exceptionally low level of non-specific proteolysis, which is in good agreement with the data (Bansal et al., 2009), according to which the PA of rChn-Cam was

Table 2. Specific MA, general PA, and specificity of recombinant moose, cow, and camel chymosins

Sample	Specific MA, %	General PA, %	Specificity, MA/PA
rChn-Alc	37	64	0.6
rChn-Bos	100	100	1.0
rChn-Cam	65	13	5.0

4 times lower than that of rChn-Bos. Apparently, low values of the general PA are typical for the rChns of representatives of the Camelidae family. According to our data, the general PA of another member of this family, the alpaca, is about 3 times lower than that of the cow (Belenkaya et al., 2018).

If we take the general PA of rChn-Bos as 100 %, then the PA of rChn-Alc and rChn-Cam will be 64 and 13 %, respectively. Using data on specific MA and general PA, specificity can be calculated (Table 2).

By specificity, and hence by the degree of cheese-making universality, the studied enzymes were arranged in the following order: rChn-Cam > rChn-Bos > rChn-Alc. The ratio of MA/PA calculated for the moose rChn was 1.6 and 8.3 times lower than for the cow and camel rChns. It is possible that the low specificity of rChn-Alc is a consequence of its low specific MA, which, as we have already noted, may be due to incomplete refolding of its zymogen. On average, the efficiency of restoring the correct folding (in terms of MA) of genetically engineered chymosins obtained after solubilization of inclusion bodies rarely exceeds 30 % (Wei et al., 1999, 2000; Chen et al., 2000; Eskandari et al., 2012).

Thermostability. Milk coagulants with a high threshold of thermal inactivation may show undesirable PA at the stages of cheese production associated with an increase in the heating temperature of the clot, as well as during prolonged maturation and storage of finished products. Therefore, the TS is an important technological characteristic of any new ME that claims to be used in cheese-making.

The proteolytic activity of MEs is registered in various types of cheeses (Masotti et al., 2010; Sforza et al., 2012; Gumus, Hayaloglu, 2019; Lamichhane et al., 2019; D’Incecco et al., 2020; Mane, McSweeney, 2020) and makes a significant contribution to the “proteolytic maturation” of the product. Information about the TS of the milk coagulant used allows one to regulate the degree of proteolysis and influence the maturation time of cheeses by varying the processing temperature of the cheese grain or by using ME with different thermal activation thresholds (Lamichhane et al., 2019).

It was found that the rChn of a camel is more thermally stable than that of a cow (Kappeler et al., 2006; Jensen et

al., 2013; Belenkaya et al., 2020c). It is also known that the general PA of these enzymes increases with increasing temperature – rChn-Bos shows the maximum PA at 55.0 °C, and rChn-Bos at 52.5 °C (Kappeler et al., 2006). An increase in the heating temperature of the clot from 50 to 56 °C when producing very hard, granular, cows' milk cheese using the rChn of a cow or a camel leads to a significant decrease in the concentration of products of proteolysis of α S1-casein. But even after processing the clot at 56 °C, the concentration of markers of proteolysis of α S1-casein was higher in maturing and stored cheeses produced using a more thermally stable rChn-Cam than when using rChn-Bos (Costabel et al., 2015). This is despite the fact that the general PA of a camel enzyme is 3.5–4.0 times lower than that of a cow (Kappeler et al., 2006).

The ranges of TS of the rChns of the same species obtained in different expression systems may differ. The thresholds of total temperature inactivation of the camel rChn expressed in higher mold fungi (*Aspergillus niger*) and yeast (*Komagataella (Pichia) pastoris*) differed by 10 °C (Belenkaya et al., 2020c). The experimental rChn-Bos synthesized in the *E. coli* BL21(DE3) system exceeded the commercial rChn-Bos expressed in *A. niger* by 15 °C (Belenkaya et al., 2018). These data indicate a possible role of posttranslational modifications as a factor influencing the temperature stability of rChns.

The threshold of thermal inactivation was considered the T (°C) at which the studied rChn lost >20 % of the initial coagulation activity. According to this criterion, the TS threshold for rChn-Bos was 50 °C, and for rChn-Alc and rChn-Cam – 55 °C (see Fig. 3, b). After 30 min of heating up at 55 °C, rChn-Bos was completely inactivated. Despite the same TS threshold, rChn-Alc and rChn-Cam differed in the dynamics of thermal inactivation in the temperature range of 50–65 °C. After heating up to 55 °C, the residual coagulation activity of the moose rChn was almost 2.5 times higher than that of rChn-Cam and amounted to 44.9 and 18.2 %, respectively. The recombinant camel rChn was completely inactivated after heating at 60 °C, while rChn-Alc still retained 6.5 % of the original MA at this temperature, suggesting higher temperature stability of rChn-Alc compared to rChn-Cam.

Thus, taking into account the same threshold of thermal inactivation of rChn-Alc and rChn-Cam, according to the TS criterion, the studied enzymes are arranged as follows: rChn-Alc > rChn-Cam > rChn-Bos. Increased, in comparison with reference enzymes, TS limits the scope of application of the moose rChn assumes its use, first of all, in the production of cheeses with short maturation and storage periods.

Dependence of rennet coagulation time on the calcium chloride concentration. Most rennet cheeses are made from pasteurized milk. It is known that during pasteurization, denatured β -lactoglobulin binds to micellar κ -casein, which leads to an increase in the duration of RCT (Fox et al., 2017). In addition, during high-temperature processing of raw milk, part of the salts and calcium ions present in it precipitates in the form of insoluble calcium phosphate. As a result, the concentration of Ca^{2+} in milk decreases, which also increases the RCT. In order to avoid increasing the dose of introduced ME and improve the coagulation ability of pasteurized milk, CaCl_2 is added to it in an amount of 0.1–0.4 g/l (~1–4 mM). However, an increase of the CaCl_2 concentration in the milk substrate causes not only an increase in the coagulation activ-

ity but also in the general PA of the enzyme, especially at the stage of milk coagulation (Wang et al., 2015). Therefore, the use of ME with high sensitivity to Ca^{2+} concentration is associated with the risk of negative consequences of increasing its general PA. Based on this, it is necessary that the new milk coagulant, in comparison with modern reference technological enzymes, has a comparable or lower sensitivity to changes in the concentration of CaCl_2 in the milk substrate.

Just as in the case of other MEs (Fox et al., 2017), the duration of RCT under the action of the studied rChns decreased in response to an increase in the concentration of calcium chloride. In the range of 0–10 mM of CaCl_2 clot formation time is reduced by 0–58 % for rChn-Alc, 0–79 % for rChn-Bos, and 0–73 % for rChn-Cam. The dynamics of changes in the dependence of RCT on the concentration of calcium chloride for the cow and camel rChns is almost the same (see Fig. 3, c). Recombinant Chn of moose differs from reference enzymes – its coagulation activity is less sensitive to changes in the concentration of CaCl_2 in the milk substrate. At 4 mM CaCl_2 , the RCT of the milk substrate decreases by 2.0 and 2.2 times, respectively, under the action of rChn-Bos and rChn-Cam, and only by 1.5 times for rChn-Alc. This, in particular, means that the risk of an increase in the general PA when using the moose rChn to curdle pasteurized milk with added CaCl_2 is much less than that of reference coagulants, which is a positive factor from the point of view of cheese production.

Thus, we suppose that the sensitivity of coagulation activity of rChn-Alc to an increase in the concentration of CaCl_2 in milk fully meets the requirements of cheese production.

Dependence of rennet coagulation time on pH. The optimums of the specific activity of various types of chymosins lie in the pH range of 4.6–6.0 (Belenkaya et al., 2020c). However, in the production of most types of rennet cheeses, ME is added to the milk mixture at a pH of 6.5–6.6. Therefore, one of the technological requirements for any new coagulant is its ability to effectively curdle milk in a slightly acidic pH range that is far from the pH optimum.

The duration of RCT depends on the electrostatic and hydrophobic properties of casein micelles, which are related to the H^+ concentration. When milk is acidified, the total negative charge of caseins decreases due to the pH approaching the pI values. This reduces the forces of electrostatic repulsion between the micelles and simultaneously increases the casein-casein hydrophobic interactions, which accelerates the formation of milk clot. If the pH increases, the casein-casein hydrophobic interactions weaken as the total negative charges of caseins increase. The growing forces of electrostatic repulsion prevent the convergence of similarly charged casein micelles and slow down the formation of milk clot (Lucey, 2002; Harboe et al., 2010; Fox et al., 2017).

By the nature of the dependence of the coagulation ability on pH, the most promising for cheese-making are MEs, which slowly lose activity when moving away from the pH-optimum to the alkaline region and can exhibit high MA at weakly acidic and neutral pH values.

Compared to the reference rChns, the coagulation activity of rChn-Alc is much less dependent on changes in milk pH from 6.0 to 7.0 (see Fig. 3, d). At a pH of 6.4–6.6, the RCT for rChn-Alc increases 1.6–2.3 times, and for rChn-Bos and rChn-Cam, this parameter increases 2.5–5.0 and 2.9–6.0 times,

respectively. At pH 7.0, the rChns of cow and camel showed extremely low (we can say, trace) coagulation activity, and the differences between them and the rChn of moose were most clearly manifested. Based on the data obtained, it can be argued that in the working “cheese-making” pH range of 6.5–6.6, the consumption of the moose rChn will be lower than that of the reference MEs, which is an important technological characteristic. However, the ability of rChn-Alc to show significant coagulation activity at neutral pH values is not unique. Previously, similar properties were found in the rChns of the goat (Vallejo et al., 2012) and yak (Ersöz, İnan, 2019).

Thus, the moose rChn is able to effectively curdle cow’s milk at a pH of 6.5–6.6, and is not inferior in this indicator to commercial genetically engineered chymosins.

Discussion

For the first time, recombinant moose chymosin was obtained, and its characteristics, important for the production of rennet cheeses, were also investigated. We have chosen a prokaryotic expression system for preliminary characterization of the enzyme, because it is easier to work with and since it was known that other recombinant chymosins obtained in prokaryotes retain their activity (Eskandari et al., 2012; Belenkaya et al., 2020a, c). The conditions used for the expression of the moose chymosin gene in the *E. coli* system lead to a highly efficient synthesis of the target protein, with almost all of it accumulating in an insoluble form in inclusion bodies. As expected, MA rProChn was very low, and after activation MA rChn-Alc it was 843 AU/ml. According to the total MA, the moose rChn obtained by us was 2.4–2.8 times inferior to other genetically engineered rChns (2014 AU/ml for alpaca and 2330 AU/ml for maral) obtained in the *E. coli* expression system (Belenkaya et al., 2018, 2020a, b).

It is possible that the low specific MA of rChn-Alc, compared with the reference milk coagulants, is due to the insufficient efficiency of its zymogen refolding after isolation from the inclusion bodies. It is known that the stage of restoring the correct three-dimensional structure is a “bottleneck” in obtaining rChn in *E. coli* expression systems and leads to a decrease in the yield and specific activity of the target product (Wei et al., 1999, 2000; Chen et al., 2000; Eskandari et al., 2012).

Also, we cannot exclude the possibility that under our conditions the moose chymosin was not activated quite correctly, with the N-end cut off in a different position, thus affecting its activity. For example, loss of the first three residues of camel chymosin significantly decreased its activity (Jensen et al., 2013). We have so far characterized only the enzymatic properties and determined the approximate molecular weight using SDS-PAGE analysis, but we do not know the exact amino acid sequence of rChn-Alc.

Previously, it was suggested that the technological properties of the camel Chn depend on its surface charge distribution (Jensen et al., 2013). The total charge of κ -casein C-terminal part is negative, as is the total charge of all known chymosins. Positively charged patches on the chymosin surface can play a role in properly positioning and binding the enzyme to the substrate (Jensen et al., 2013). Most positively charged patches in the moose Chn are similar to those in the bovine Chn, but patch 2 has intermediate characteristics between the corresponding patches in the bovine and camel Chn. An additional

patch 4 in the moose Chn is located close to the substrate-binding cleft (see Fig. 2). It is challenging to conclude whether the differences in positively charged patches in chymosins are stochastic or whether they result from adaptation to some conditions, such as species-specific variations in κ -caseins charge distributions. Further studies of the chymosins from different mammals may clarify this question.

The resulting preparation of rChn-Alc is able to coagulate cow’s milk. In terms of specific MA, however, it is inferior to the reference commercial rChns of cow and camel. It means that in cheese-making the consumption of the rChn of moose, obtained in the *E. coli* expression system, will be higher than that of rChn-Bos and rChn-Cam. In order to compete with reference enzymes, the specific MA of the moose rChn should be increased 3–4 times. However, in a number of technological parameters, the moose rChn is superior to the reference commercial enzymes. Thus, in comparison with the rChn of a cow and a camel, the specific activity of the rChn of moose is less dependent on changes in the concentration of CaCl_2 in the range of 1–5 mM and pH in the range of 6–7, which is an attractive technological property.

In general, though obtained in the prokaryotic system, the moose chymosin meets the basic requirements for enzymes for cheese-making, encouraging us to study this protein. The main problem of yeast expression systems is a strong ability to glycosylate proteins. *Pichia* may have an advantage in the glycosylation of secreted proteins over *Saccharomyces cerevisiae* because the former does create proteins with long carbohydrate chains via hyperglycosylation (Akishev et al., 2021). In an experiment to obtain recombinant camel chymosin, the prochymosin gene was successfully cloned and expressed in *P. pastoris* under the control of the GAP promoter and purified from culture via a combination of cation and anion exchange chromatography. *Camelus bactrianus* recombinant chymosin manifested high milk-clotting activity (9605 U/mg) (Akishev et al., 2021). One of the priority tasks is to obtain the moose rChn in the eukaryotic expression system and to compare its technological properties (primarily specific MA) with the properties of the enzyme produced in the *E. coli* expression system.

Conclusion

The nucleotide sequence encoding moose (*Alces alces*) prochymosin was optimized for its efficient expression in *E. coli* cells of the SHuffle express strain. The synthesized prochymosin gene was cloned into the pET21a vector, resulting in the pET21-CYM-Alc expression vector. The constructed model of the spatial structure of the moose Chn showed that the ionic charges on the surface of the protein molecule are distributed similarly to those for the cow and camel Chn, but the moose enzyme has a unique charged site, which probably affects its MA.

A sample of moose rProChn was developed and its biochemical and technological properties were studied. In some of the technological parameters, it surpasses the reference commercial enzymes. Thus, the specific activity of the moose rChn is less dependent on changes in CaCl_2 concentration in the range of 1–5 mM and substrate pH in the range of 6–7, compared to the cow and camel rChn. The total proteolytic activity of the moose rChn occupies an intermediate position between

the cow and camel rChn. In terms of such indicators as specific milk-clotting activity, specificity and thermal stability, the moose rChn is inferior to reference commercial chymosins.

References

- Akischev Z., Kiribayeva A., Mussakhmetov A., Baltin K., Ramankulov Y., Khassenov B. Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris*. *Heliyon*. 2021;7(5):e07137. DOI 10.1016/j.heliyon.2021.e07137.
- Bansal N., Drake M.A., Piraino P., Broe M.L., Harboe M., Fox P.F., McSweeney P.L.H. Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 2009;19(9):510-517. DOI 10.1016/j.idairyj.2009.03.010.
- Belenkaya S.V., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Shcherbakov D.N., Elchaninov V.V. Basic biochemical properties of recombinant chymosins (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020a;56(4):363-372. DOI 10.1134/S0003683820040031.
- Belenkaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A., Elchaninov V.V., Bakulina A.Yu., Rukhlova E.A., Lavrik O.I., Ilyichev A.A., Shcherbakov D.N. Characterization of the Altai maral chymosin gene, production of a chymosin recombinant analog in the prokaryotic expression system, and analysis of its several biochemical properties. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020b;85(7):781-791. DOI 10.1134/S0006297920070068.
- Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Biochemical properties of recombinant chymosin in alpaca (*Vicugna pacos* L.). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018;54(6):569-576. DOI 10.1134/S0003683818060054.
- Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. Production of maral (*Cervus elaphus sibiricus* Severtzov) recombinant chymosin in the prokaryotic expression system and the study of the aggregate of its biochemical properties relevant for the cheese-making industry. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020c;56(6):647-656. DOI 10.1134/S0003683820060034.
- Belov A.N., Koval A.D., Avdanina E.A., Elchaninov V.V. Effects of milk clotting preparation on cheese organoleptic indices. *Syrodelie i Maslodellie = Cheese Making and Butter Making*. 2009;1:22-24. (in Russian)
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Chen H., Zhang G., Zhang Y., Dong Y., Yang K. Functional implications of disulfide bond, Cys206-Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin). *Biochemistry*. 2000;39(40):12140-12148. DOI 10.1021/bi000976o.
- Costabel L.M., Bergamini C.V., Pozza L., Cuffia F., Candiotti M.C., Hynes E. Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses. *J. Dairy Res.* 2015;82(3):375-384. DOI 10.1017/S0022029915000175.
- D'Incecco P., Limbo S., Hogenboom J., Rosi V., Gobbi S., Pellegrino L. Impact of extending hard-cheese ripening: a multiparameter characterization of Parmigiano Reggiano cheese ripened up to 50 months. *Foods*. 2020;9(3):268. DOI 10.3390/foods9030268.
- Ersöz F., İnan M. Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 2019;154:126-133. DOI 10.1016/j.pep.2018.10.007.
- Eskandari M.H., Hosseini A., Zarasvand S.A., Aminlari M. Cloning, expression, purification and refolding of caprine prochymosin. *Food Biotechnol.* 2012;26(2):143-153. DOI 10.1080/08905436.2012.670829.
- Flamm E.L. How FDA approved chymosin: a case history. *Nat. Biotechnol.* 1991;9(4):349-351. DOI 10.1038/nbt0491-349.
- Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. Enzymatic coagulation of milk. In: *Fundamentals of Cheese Science*. Boston: Springer, 2017;185-229. DOI 10.1007/978-1-4899-7681-9_7.
- Gumus P., Hayaloglu A.A. Effects of blends of camel and calf chymosin on proteolysis, residual coagulant activity, microstructure, and sensory characteristics of Beyaz peynir. *J. Dairy Sci.* 2019;102(7):5945-5956. DOI 10.3168/jds.2018-15671.
- Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. The production, action and application of rennet and coagulants. In: Law B.A., Tamime A.Y. (Eds.) *Technology of Cheesemaking*. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010;98-129. DOI 10.1002/9781444323740.ch3.
- Jacob M., Jaros D., Rohm H. Recent advances in milk clotting enzymes. *Int. J. Dairy Tech.* 2011;64(1):14-33. DOI 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x.
- Jensen J.L., Molgaard A., Poulsen J.-C.N., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjernø K., Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S. Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2013;69(Pt.5):901-913. DOI 10.1107/S0907444913003260.
- Kappeler S.R., van den Brink H.J.M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhani Z., Hansen E.B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;342(2):647-654. DOI 10.1016/j.bbrc.2006.02.014.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. DOI 10.1038/227680a0.
- Lamichhane P., Sharma P., Kennedy D., Kelly A.L., Sheehan J.J. Microstructure and fracture properties of semi-hard cheese: differentiating the effects of primary proteolysis and calcium solubilization. *Food Res. Int.* 2019;125:108525. DOI 10.1016/j.foodres.2019.108525.
- Lucey J.A. Formation and physical properties of milk protein gels. *J. Dairy Sci.* 2002;85(2):281-294. DOI 10.3168/JDS.S0022-0302(02)74078-2.
- Luo F., Jiang W.H., Yang Y.X., Li J., Jiang M.F. Cloning and expression of yak active chymosin in *Pichia pastoris*. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2016;29(9):1363-1370. DOI 10.5713/AJAS.16.0038.
- Mane A., McSweeney P.L.H. Proteolysis in Irish farmhouse Camembert cheese during ripening. *J. Food Biochem.* 2020;44(1):1-14. DOI 10.1111/jfbc.13101.
- Masotti F., Hogenboom J.A., Rosi V., de Noni I., Pellegrino L. Proteolysis indices related to cheese ripening and typicalness in PDO Grana Padano cheese. *Int. Dairy J.* 2010;20(5):352-359. DOI 10.1016/j.idairyj.2009.11.020.
- Moynihan A.C., Govindasamy-Lucey S., Jaeggi J.J., Johnson M.E., Lucey J.A., McSweeney P.L.H. Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 2014;97(1):85-96. DOI 10.3168/jds.2013-7081.
- Pedersen V.B., Christensen K.A., Foltmann B. Investigations on the activation of bovine prochymosin. *Eur. J. Biochem.* 1979;94(2):573-580. DOI 10.1111/j.1432-1033.1979.tb12927.x.
- Rogelj I., Perko B., Francky A., Penca V., Pungercar J. Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *J. Dairy Sci.* 2001;84(5):1020-1026. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(01)74561-4.
- Sforza S., Cavatorta V., Lambertini F., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. Cheese peptidomics: a detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. *J. Dairy Sci.* 2012;95(7):3514-3526. DOI 10.3168/jds.2011-5046.
- Singh T.K., Drake M.A., Cadwallader K.R. Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2003;2(4):166-189. DOI 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00021.x.
- Trono D. Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries. In: Singh R.S., Singhanian R.R., Pandey A., Larroche C. (Eds.) *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology*. Elsevier, 2019;349-387. DOI 10.1016/B978-0-444-64114-4.00013-3.

- Tyagi A., Kumar A., Mohanty A.K., Kaushik J.K., Grover S., Batish V.K. Expression of buffalo chymosin in *Pichia pastoris* for application in mozzarella cheese. *LWT – Food Sci. Technol.* 2017;84:733-739. DOI 10.1016/j.lwt.2017.06.033.
- Tyagi A., Kumar A., Yadav A.K., Chandola Saklani A., Grover S., Batish V.K. Functional expression of recombinant goat chymosin in *Pichia pastoris* bioreactor cultures: a commercially viable alternate. *LWT – Food Sci. Technol.* 2016;69:217-224. DOI 10.1016/j.lwt.2016.01.015.
- Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Short communication: a comparative analysis of recombinant chymosins. *J. Dairy Sci.* 2012;95(2):609-613. DOI 10.3168/jds.2011-4445.
- Vega-Hernández M.C., Gómez-Coello A., Villar J., Claverie-Martin F. Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin. *J. Biotechnol.* 2004;114(1-2):69-79. DOI 10.1016/j.jbiotec.2004.06.002.
- Wang N., Wang K.Y., Li G., Guo W., Liu D. Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 2015;111:75-81. DOI 10.1016/j.pep.2015.03.012.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303. DOI 10.1093/nar/gky427.
- Wei C., Tang B., Zhang Y., Yang K. Oxidative refolding of recombinant prochymosin. *Biochem. J.* 1999;340(1):345-351. DOI 10.1042/0264-6021:3400345.
- Wei C., Zhang Y., Yang K. Chaperone-mediated refolding of recombinant prochymosin. *J. Protein Chem.* 2000;19(6):449-456. DOI 10.1023/A:1026593113633.

ORCID ID

D.V. Balabova orcid.org/0000-0002-3925-0862
A.P. Rudometov orcid.org/0000-0003-2808-4309
A.A. Bondar orcid.org/0000-0001-9181-0487
A.Yu. Bakulina orcid.org/0000-0002-4723-9225
V.V. Elchaninov orcid.org/0000-0002-4355-6055
D.N. Shcherbakov orcid.org/0000-0001-8023-4453

Acknowledgements. Sanger DNA sequencing was performed in Genomics Core Facility (ICBFM SB RAS, Novosibirsk).

This study was funded by the State Task of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation (topic No. FZMW-2020-0002, "Design of recombinant enzyme producers for the cheese-making industry") and The Russian Foundation for Basic Research (grant number 19-44-220010).

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

Received November 17, 2021. Revised February 19, 2022. Accepted March 3, 2022.

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

Метаболизм крахмала у картофеля *Solanum tuberosum* L.

Е.М. Сергеева , К.Т. Ларичев, Е.А. Салина, А.В. Кочетов

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

Аннотация. Крахмал – основной запасной углевод растений и важный источник калорий в рационе питания человека и животных, широко применяется также для ряда промышленных нужд. Нативный крахмал представляет собой не растворимые в воде полукристаллические гранулы, сформированные молекулами амилозы и амилопектина, которые являются природными полимерами глюкозы. Физико-химические свойства крахмала определяются соотношением амилозы и амилопектина в грануле, степенью их полимеризации и фосфорилирования. Одно из основных растений-производителей крахмала – картофель *Solanum tuberosum* L. Растущие потребности рынка диктуют необходимость получения сортов с повышенным содержанием и заданными свойствами крахмала, необходимым условием чего является получение детальной информации о процессе его метаболизма в организме растения. Процесс метаболизма крахмала сложен и представляет собой согласованную работу множества ферментов, транспортных и направляющих белков, транскрипционных и других регуляторных факторов. По принципу выполняемой биологической функции крахмал делится на два типа: транзитный, который синтезируется в хлоропластах фотосинтезирующих органов и распадается при отсутствии освещения, обеспечивая клетку углеводами; и запасной, который синтезируется и хранится в амилопластах запасящих органов (зерен, клубней). Основные ферментативные реакции биосинтеза и деградации крахмала, а также транспорта и метаболизма углеводов хорошо изучены на транзитном крахмале модельного объекта *Arabidopsis thaliana*; об особенностях метаболизма крахмала в запасящих органах, в частности клубнях картофеля, известно несколько меньше. При этом ряд вопросов остается открытым: недостаточно изучены участие различных изоформ ферментов и влияние на них регуляторных факторов в зависимости от ткани и стадии развития растения, а также условий внешней среды; реализация альтернативных путей ферментативных превращений; участие направляющих и транспортных белков. В данном обзоре рассмотрены ключевые ферментативные реакции углеводного обмена, биосинтеза и деградации транзитного и запасного крахмала, общие для растений, и отмечены особенности, характерные для картофеля; уделено внимание известным регуляторным факторам, влияющим на метаболизм крахмала.

Ключевые слова: картофель; *Solanum tuberosum*; крахмал; амилоза; амилопектин; синтез; деградация.

Для цитирования: Сергеева Е.М., Ларичев К.Т., Салина Е.А., Кочетов А.В. Метаболизм крахмала у картофеля *Solanum tuberosum* L. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(3):250-263. DOI 10.18699/VJGB-22-32

Starch metabolism in potato *Solanum tuberosum* L.

Е.М. Sergeeva , К.Т. Larichev, Е.А. Salina, А.В. Kochetov

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

Abstract. Starch is a major storage carbohydrate in plants. It is an important source of calories in the human and animal diet. Also, it is widely used in various industries. Native starch consists of water-insoluble semicrystalline granules formed by natural glucose polymers amylose and amylopectin. The physicochemical properties of starch are determined by the amylose:amylopectin ratio in the granule and degrees of their polymerization and phosphorylation. Potato *Solanum tuberosum* L. is one of the main starch-producing crops. Growing industrial needs necessitate the breeding of plant varieties with increased starch content and specified starch properties. This task demands detailed information on starch metabolism in the producing plant. It is a complex process, requiring the orchestrated work of many enzymes, transporter and targeting proteins, transcription factors, and other regulators. Two types of starch are recognized with regard to their biological functions. Transitory starch is synthesized in chloroplasts of photosynthetic organs and degraded in the absence of light, providing carbohydrates for cell needs. Storage starch is synthesized and stored in amyloplasts of storage organs: grains and tubers. The main enzymatic reactions of starch biosynthesis and degradation, as well as carbohydrate transport and metabolism, are well known in the case of transitory starch of the model plant *Arabidopsis thaliana*. Less is known about features of starch metabolism in storage organs, in particular, potato tubers. Several issues remain obscure: the roles of enzyme isoforms and different regulatory factors in tissues at various plant developmental stages and under different environmental conditions; alternative enzymatic processes; targeting and transport proteins. In this

review, the key enzymatic reactions of plant carbohydrate metabolism, transitory and storage starch biosynthesis, and starch degradation are discussed, and features specific for potato are outlined. Attention is also paid to the known regulatory factors affecting starch metabolism.

Key words: potato; *Solanum tuberosum*; starch; amylose; amylopectin; synthesis; degradation.

For citation: Sergeeva E.M., Larichev K.T., Salina E.A., Kochetov A.V. Starch metabolism in potato *Solanum tuberosum* L. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):250-263. DOI 10.18699/VJGB-22-32

Введение

Крахмал – основной запасной углевод растений, составляющий до 85 % сухого веса их съедобных частей, таких как зерна злаковых (кукуруза *Zea mays* L., рис *Oryza sativa* L., пшеница *Triticum* ssp., ячмень *Hordeum vulgare* L.), клубни картофеля *Solanum tuberosum* L., корнеплоды (маниок *Manihot esculenta* Crantz, батат *Ipomoea batatas* (L.) Lam., ямс *Dioscorea alata* L.), стебли саговой пальмы *Metroxylon sagu* Rottb., плоды овощных бананов *Musa* spp. (Zeeman et al., 2010; Santana, Meireles, 2014). Крахмал обеспечивает значительную часть калорий в рационе питания человека и животных, а также является природным возобновляемым и биоразлагаемым сырьем, которое широко используется в пищевой промышленности для производства тканей, бумаги, лекарств и пластиков.

По своей химической структуре крахмал это смесь природных полимеров глюкозы – амилозы и амилопектина, которые формируют не растворимые в воде полукристаллические гранулы. Амилопектин представляет собой сильно разветвленные молекулы гликанов, линейные участки которых сформированы за счет α -1,4-гликозидных, а точки ветвления цепей – α -1,6-гликозидных связей. Амилоза – практически линейный полимер, с небольшим количеством разветвлений. Молекулы амилопектина, на который приходится около 75–80 % массы крахмала, формируют структурный каркас гранулы, состоящий из повторяющихся аморфных и полукристаллических ламелл. Молекулы амилозы распределены в полукристаллическом матриксе, сформированном амилопектином (Zeeman et al., 2010; Tetlow, Bertoft, 2020).

Соотношение амилозы и амилопектина определяет свойства крахмала, необходимые для конкретных нужд промышленности: диетические, физико-химические и функциональные. В составе продуктов питания крахмал разделяют на гликемический и резистентный. Амилопектин быстро переваривается в тонком кишечнике и придает крахмалу гликемические свойства. Увеличение содержания амилозы, напротив, придает крахмалу свойства резистентного (Li et al., 2008). Резистентный крахмал устойчив к действию амилаз в тонком кишечнике. В толстом кишечнике он выполняет роль субстрата для расщепления микроорганизмами, в результате чего образуются короткоцепочечные жирные кислоты, которые оказывают местный противоопухолевый и противовоспалительный эффект (Birt et al., 2013). При использовании крахмалов учитывают также их физико-химические (желатинизация и ретроградация) и функциональные свойства (набухание, способность к образованию клейстера и его вязкость). Данные свойства определяются генетически детерминированными признаками: размером и морфологией крахмальных гранул, соотношением амилозы и амилопектина,

степенью разветвления и уровнем фосфорилирования молекул гликанов (Visser et al., 1991; Schwall et al., 2000; Hofvander et al., 2004; Хлесткин и др., 2017).

Картофель *Solanum tuberosum* L. является четвертым по значимости продуцентом крахмала в мире (после кукурузы, маниока и пшеницы). При этом картофельный крахмал обладает рядом функционально важных характеристик, отличных от крахмалов злаковых. Так, амилоза и амилопектин картофельного крахмала имеют более высокую степень полимеризации и фосфорилирования, что делает его коммерчески выгодным для производства биопластиков (Hofvander et al., 2004; Reyniers et al., 2020). В связи с увеличивающимися нуждами промышленности наблюдается устойчивый рост мирового производства картофельного крахмала: в 2018 г. производство составило 3.7, а в 2020 г. – 3.9 млн тонн (<https://www.researchandmarkets.com/reports/5330932/potato-starch-market-global-industry-trends>). Получение нативных крахмалов с заданными свойствами, а также увеличение общего количества крахмала, продуцируемого растением, считаются актуальными задачами в селекции картофеля.

Ключевые ферменты биосинтеза крахмала (см. таблицу) и кодирующие их гены хорошо изучены как на модельных объектах (*Arabidopsis thaliana* L.), так и у сельскохозяйственных культур, в том числе картофеля (Streb, Zeeman, 2012; Van Harsselaar et al., 2017; Слугина, Кочиева, 2018).

Процесс биосинтеза крахмала представляет собой реакцию полимеризации, в которой в качестве субстрата использованы молекулы АДФ-глюкозы и которая катализируется ферментами крахмалсинтазами GBSS (granule bound starch synthase) и SS (soluble starch synthase), а также крахмалветвящими SBE (starch branching enzyme) и девятью ферментами DBE (debranching enzyme).

Метаболизм крахмала является частью общего углеводного обмена и играет важную роль в функционировании организма растения: влияет на процессы роста и развития, участвует в ответе на стрессовые факторы. Ферменты и кодирующие их гены, связанные с метаболизмом крахмала и углеводным обменом растений, активно изучались на протяжении последних трех десятилетий; существует большой объем данных по локализации этих генов в геномах растений и их экспрессии. Так, у картофеля *S. tuberosum* 75 генов картированы на референсный геном и изучен спектр экспрессии 64 генов в листьях и клубнях (Van Harsselaar et al., 2017; Слугина, Кочиева, 2018). Показано, что в геномах современных растений гены метаболизма крахмала в течение эволюции неоднократно подвергались дупликациям и образованию паралогов за счет суб- и неофункционализации. Паралогичные гены, которые кодируют различные изоформы ферментов,

Ферменты, принимающие участие в метаболизме крахмала

Фермент	Номер EC	Изоформы	Функция фермента
Метаболизм углеводов			
Сахарозсинтаза	EC:2.4.1.13	SuSy1, SuSy2, SuSy3, SuSy4, SuSy5, SuSy6, SuSy7	Обратимое расщепление сахарозы до фруктозы и УДФ-глюкозы (Stein, Granot, 2019)
УДФ-глюкозопирофосфорилаза	EC:2.7.7.9	UGPase1, UGPase2	Обратимое превращение УДФ-глюкозы и пирофосфата в глюкозо-1-фосфат и УДФ (Kleczkowski et al., 2010)
Фосфоглюкоизомераза	EC:5.3.1.9	PGI, PGI-like1, PGI-like2	Обратимое превращение фруктозо-6-фосфата в глюкозо-6-фосфат (Yu et al., 2000)
Фосфоглюкомутаза	EC:5.4.2.2	PGM1, PGM2.1, PGM2.2	Обратимое превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат (Yu et al., 2000)
АДФ-глюкозо-пирофосфорилаза. Большая и малая субъединицы	EC:2.7.7.27	AGPL1, AGPL2, AGPL3	Обратимый синтез АДФ-глюкозы и пирофосфата из глюкозо-1-фосфата и АТФ (Geigenberger et al., 1999)
	EC:2.7.7.27	AGPS1.1, AGPS1.2, AGPS2	
Щелочная пирофосфатаза	EC:3.6.1.1	PPase, PPase-like	Расщепление пирофосфата до ортофосфата (George et al., 2010)
Синтез гранулы крахмала			
Грануло связанная крахмал-синтаза	EC:2.4.1.242	GBSS1	Синтез молекул амилозы за счет формирования α -1,4-гликозидных связей (Pfister, Zeeman, 2016)
Растворимые крахмалсинтазы	EC:2.4.1.21	SS1, SS2, SS3, SS4, SS5, SS6	SS1, SS2, SS3 – синтез молекул амилопектина за счет формирования α -1,4-гликозидных связей (Pfister, Zeeman, 2016). SS4, SS5 – инициация образования гранул (Helle et al., 2018, Tetlow, Bertoft, 2020). SS6 – белок связан с гранулами крахмала в клубнях картофеля, функция неизвестна (Helle et al., 2018)
Крахмалветвящие ферменты	EC:2.4.1.18	SBE1.1, SBE1.2, SBE2, SBE3	SBE2, SBE3 – ветвление молекул амилозы и амилопектина за счет формирования α -1,6-гликозидных связей (Tetlow, Bertoft, 2020). Функция SBE1 неизвестна (Van Harselaar et al., 2017)
Деветвящие ферменты (1→6) glucan hydrolase starch-debranching enzyme (DBE). Изоамилаза	EC:3.2.1.68	ISA1.1, ISA1.2, ISA2, ISA3	Гидролиз α -1,6-гликозидных связей амилопектина. ISA1 и ISA2 участвуют в синтезе амилопектина, влияют на формирование его полукристаллической структуры (Hennen-Bierwagen et al., 2012). Комплекс ISA1/ISA2 участвует в регуляции образования крахмальной гранулы (Bustos et al., 2004). ISA3 участвует в деградации крахмала (Streb, Zeeman, 2012; Pfister, Zeeman, 2016)
Деградация крахмала			
α -гликан- H_2O -дикиназа	EC:2.7.9.4	GWD	Фосфорилирование гликанов в позиции C6 (Ritte et al., 2006)
Фосфогликан- H_2O -дикиназа	EC:2.7.9.5	PWD	Фосфорилирование гликанов в позиции C3 (Ritte et al., 2006)
Фосфогликанфосфатаза	EC:3.1.3.48	LSF1, LSF2 SEX4, SEX4-like	Дефосфорилирование гликанов, SEX4 дефосфорилирует C3- и C6-позицию гликозидных остатков, LSF2 – C3-позицию (Hejazi et al., 2010; Santelia et al., 2011)
α -амилаза	EC:3.2.1.1	AMY1.1, AMY1.2, AMY2 (AMY23), AMY3, AMY3-like	AMY3 – гидролиз α -1,4-гликозидных связей амилозы и амилопектина (Yu et al., 2005). AMY2 (AMY23) может принимать участие в холодном осахаривании крахмала (Hou et al., 2017)

Окончание таблицы

Фермент	Номер ЕС	Изоформы	Функция фермента
β-амилаза	ЕС:3.2.1.2	VAM1, VAM2, VAM3.1, VAM3.2, VAM4, VAM6.1, VAM6.2, VAM6.3, VAM7, VAM9	VAM1 и VAM3 – расщепление α-1,4-гликозидных связей амилозы и амилопектина, образование мальтозы (Fulton et al., 2008). VAM1, VAM9 могут принимать участие в холодом осахаривании крахмала (Hou et al., 2017)
α-гликанфосфорилаза	ЕС:2.4.1.1	PHO1a, PHO1b, PHO2a, PHO2b	Образование глюкозо-1-фосфата за счет расщепления мальтоолигосахаридов, участвует также в росте гранулы крахмала (Pfister, Zeeman, 2016)
4-α-гликанотрансфераза	ЕС:2.4.1.25	DPE1, DPE2	Расщепление мальтоолигосахаридов до глюкозы (Critchley et al., 2001), участвует в инициации образования гранулы (Tetlow, Bertoft, 2020)

демонстрируют специфичный для ткани и/или стадии развития характер экспрессии (Van Harsselaar et al., 2017; Qu et al., 2018; López-González et al., 2019). На уровень экспрессии генов метаболизма крахмала влияют различные факторы: циркадные ритмы, фотопериод, уровень фитогормонов и сахаров; а также стрессовые условия (воздействие засухи, низких температур) (López-González et al., 2019). Несмотря на то что основные ферментативные реакции биосинтеза и деградации крахмала достаточно хорошо изучены, остается много неясных моментов, касающихся реализации альтернативных путей ферментативных превращений и их локализации в клетке, а также степени участия разных изоформ ферментов в метаболизме крахмала в разных органах и на разных стадиях развития и влияния на них регуляторных факторов.

К настоящему времени определены функции ряда белков метаболизма крахмала у картофеля (см. таблицу). Большинство ферментов представлены изоформами с частично перекрывающимися функциями (Van Harsselaar et al., 2017). Важную роль в процессе метаболизма крахмала играют белки-транслокаторы, необходимые для транспорта метаболитов через мембрану пластид, которые тоже представлены различными изоформами: аденилатный транслокатор (NTT1 и NTT2) (Tjaden et al., 2001), глюкозотранспортер pGlcT1 (Cho et al., 2011), транслокатор глюкозо-6-фосфата (изоформы GPT1.1, GPT1.2, GPT2.1, GPT2.2) (Kammerer et al., 1998), мальтозотранспортер MEX1 (Cho et al., 2011) и триозофосфатный транслокатор (TPT, TPT-like) (Flügge et al., 1989).

Путем отбора растений, несущих определенные аллельные варианты генов биосинтеза крахмала, возможно получить линии растений с измененным соотношением амилозы и амилопектина. Такие линии существуют, например, у кукурузы *Z. mays*. Мутация *amylose extender (ae⁻)* связана с утратой каталитической активности крахмалветвящего фермента SBEIIb. Крахмал растений кукурузы с *ae⁻* фенотипом имеет повышенное содержание амилозы и более длинные цепи амилопектина (Stinard et al., 1993). Фенотип, при котором в крахмале у кукурузы практически полностью отсутствует амилоза, в связи с чем эндосперм зерна имеет клейкую текстуру, называется *waxy* (восковая) и обусловлен мутацией в гене гранулосвязанной крахмалсинтазы *GBSSI* (Hossain et al., 2019).

В то же время получение сортов картофеля с заданными свойствами крахмала с помощью селекции затруднено из-за его автотетраплоидного генома. Единственный культивируемый сорт безамилозного картофеля *Eliane* выведен с помощью технологий мутационной селекции (Muth et al., 2008). При этом методами генетической инженерии и геномного редактирования, направленными на модификацию ключевых генов биосинтеза крахмала, были успешно созданы растения картофеля с ожидаемыми фенотипами: безамилозный крахмал (нокаут и нокдаун гена *GBSSI*), крахмал с повышенным содержанием амилозы (одновременный нокдаун генов *SBE1* и *SBE2*) и крахмал с измененными свойствами амилопектина (редактирование генов *SBE1* и/или *SBE2*) (Visser et al., 1991; Schwall et al., 2000; Hofvander et al., 2004; Andersson et al., 2006, 2017; Tuncel et al., 2019).

В ряде случаев оказалось, что растения с ожидаемым фенотипом обладали также нецелевыми признаками: например, при антисенс-супрессии генов крахмалветвящих ферментов *SBE1* и *SBE2* увеличение концентрации амилозы сопровождалось снижением количества крахмала и формированием мелких гранул при большей массе клубней (Hofvander et al., 2004). Видимо, внесение изменений в отдельные звенья метаболизма крахмала может влиять на общий углеводный обмен растения. Ассоциативное исследование позволило выявить генетические локусы, связанные с признаками содержания крахмала в клубнях картофеля и урожайности (масса клубней), при этом функция многих обнаруженных генов была неизвестна либо относилась к сигнальной, транскрипционной и посттранскрипционной регуляции (Schönhals et al., 2017). Интересно, что некоторые из найденных SNP влияют на признаки урожайности и содержания крахмала в клубнях как антагонисты (Schönhals et al., 2017). Таким образом, изучение путей регуляции генов метаболизма крахмала актуально для улучшения качества и урожайности картофеля.

Углеводный обмен у растений картофеля

По принципу выполняемой биологической функции крахмал делится на два типа – транзиторийный и запасной. Транзиторийный крахмал синтезируется и накапливается в хлоропластах фотосинтезирующих тканей (листьев)

в течение светового дня, а в отсутствие освещения распадается, чтобы обеспечить клетку питательными веществами. Запасной крахмал синтезируется в амилопластах (нефотосинтезирующих пластидах) запасующих органов (например, клубней картофеля) и хранится в них в течение длительного времени, чтобы впоследствии быть использованным для подготовки к прорастанию побегов (Zeeman et al., 2010; Streb, Zeeman, 2012).

Принципиальное различие углеводного обмена в клетках листьев и запасующих органов заключается в источнике углеводов и АТФ, необходимых для биосинтеза крахмала и осуществления ферментативных реакций: в листьях данные вещества могут образовываться непосредственно в клетках, в которых происходит синтез транзитного крахмала, а в запасующие органы они попадают за счет импорта из фотосинтезирующих.

В результате реакции фотосинтеза в хлоропластах образуется АТФ и осуществляется цикл Кальвина–Бенсона, при котором происходит фиксация атмосферного углекислого газа с образованием триозофосфата как одного из промежуточных продуктов (Streb, Zeeman, 2012). Часть молекул триозофосфата остается в строме хлоропласта и используется в качестве источника углеводов для биосинтеза транзитного крахмала, другая часть транспортируется в цитозоль с помощью триозофосфатного транслокатора (ТРТ) (Flügge et al., 1989). В хлоропласте триозофосфат после последовательности ферментативных реакций превращается в глюкозо-1-фосфат (G1P), из которого с помощью АДФ-глюкозопирофосфорилазы (AGPase) синтезируется АДФ-глюкоза, основной субстрат для биосинтеза крахмала (см. рисунок).

В свою очередь молекулы триозофосфата, экспортированные в цитозоль, превращаются в сахарозу, которая затем по флоэме и апопласту доставляется в запасующие органы (клубни), где служит источником углеводов для синтеза запасного крахмала. Внутри клеток запасующих органов сахароза попадает с помощью белков-сахарозотранспортеров либо, будучи гидролизованной инвертазой до глюкозы и фруктозы, через гексозотранспортеры (Ruan, 2014). В цитоплазме клеток клубня сахароза расщепляется двумя альтернативными путями: сахаролитическим, с использованием фермента сахарозосинтазы SuSy, или гидролитическим, катализируемым инвертазой Inv. Inv необратимо расщепляет сахарозу до глюкозы и фруктозы, а SuSy катализирует обратимую реакцию расщепления на фруктозу и УДФ-глюкозу (Stein, Granot, 2019). Преобладающий путь расщепления сахарозы зависит от стадии развития клубня. В начале роста, когда происходит активное клеточное деление, преобладает инвертазный путь деградации, а на этапе накопления крахмала наблюдается переход к сахаролитическому (Appeldoorn et al., 1997). Путь, осуществляемый SuSy, играет важную роль в интенсивности накопления крахмала у картофеля: показано, что уменьшение активности гена сахарозосинтазы вызвало уменьшение содержания крахмала в зрелых клубнях (Zrenner et al., 1995; Baroja-Fernández et al., 2009). Сахарозосинтазы SuSy картофеля представлены в виде семи изогенов, которые имеют тканеспецифичную экспрессию; так, в растущих клубнях экспрессируется ген *SuSy4* (Van Harsselaar et al., 2017). Вероятно, отдельные

изоформы сахарозосинтаз могут принимать участие в транспорте сахарозы по флоэме, как показано у *A. thaliana* (Yao et al., 2020).

Далее за счет реакций, осуществляемых ферментами фруктокиназой (ФК), гексокиназой (НК) и УДФ-глюкозопирофосфорилазой, в цитозоле клеток запасующей паренхимы формируется пул фосфорилированных гексоз, реакции перехода между которыми являются обратимыми и катализируются цитозольными изоформами ферментов фосфоглюкоизомеразы PGI2 и фосфоглюкомутазы PGM2 (Yu et al., 2000; Kleczkowski et al., 2010). Один из гексофосфатов, а именно глюкозо-6-фосфат (G6P), транспортируется в амилопласты посредством мембранного глюкозо-6-фосфат транслокатора (GPT), где используется для синтеза АДФ-глюкозы (Kammerer et al., 1998). Показано, что интенсивность биосинтеза крахмала в клубнях картофеля напрямую зависит от транспорта G6P (Tauberger et al., 2000; Fernie et al., 2002).

Также в запасующие ткани из фотосинтезирующих импортируется АТФ, который попадает в амилопласты с помощью пластидного аденилатного транслокатора (NTT). Даже небольшое уменьшение активности NTT приводит к уменьшению общего содержания крахмала в клубнях картофеля (Tjaden et al., 2001), а сочетание сверхэкспрессии NTT и GPT – к увеличению (Zhang L. et al., 2008). Возможно, существует дублирующий путь транспорта гексоз в клетки амилопласта: импорт глюкозо-1-фосфата (G1P) и использование его как непосредственного субстрата для синтеза АДФ-глюкозы. Есть доказательства того, что данный путь реализуется у картофеля, хотя соответствующий транспортный белок на настоящий момент неизвестен (Fettke et al., 2010). Недавнее исследование у *A. thaliana* выявило два кандидата на роль транспортера глюкозо-1-фосфата через плазматическую мембрану (Malinova et al., 2020).

Субстратом для биосинтеза крахмала служит АДФ-глюкоза, которая образуется в строме хлоропластов и амилопластов за счет обратимой реакции, катализируемой ферментом АДФ-глюкозопирофосфорилазой (AGPase). AGPase синтезирует АДФ-глюкозу и пирофосфат (PPi) из G1P и АТФ. Фермент является гетеротетрамером, состоящим из двух больших и двух малых субъединиц (AGPL и AGPS), и его активность играет критическую роль в биосинтезе крахмала в клубнях картофеля (Geigenberger et al., 1999). Щелочная пирофосфатаза (PPase) расщепляет образовавшийся пирофосфат до ортофосфата и влияет, таким образом, на направление обратимой реакции, катализируемой AGPase, в сторону синтеза АДФ-глюкозы, как показано у растений табака (George et al., 2010). Однако в клубнях картофеля механизм участия PPase в биосинтезе крахмала, судя по всему, значительно отличается и пока остается неизвестным. Так, показан существенный вклад пластидной формы PPase в процесс накопления крахмала в клубнях: у линий с нокадауном гена *StpsPPase* наблюдалось уменьшение количества крахмала и уменьшение размера гранул. При этом увеличивались уровни пирофосфата, а также глюкозы, фруктозы, фосфорилированных гексоз и, что неожиданно, АДФ-глюкозы. Увеличение содержания АДФ-глюкозы свидетельствует в пользу

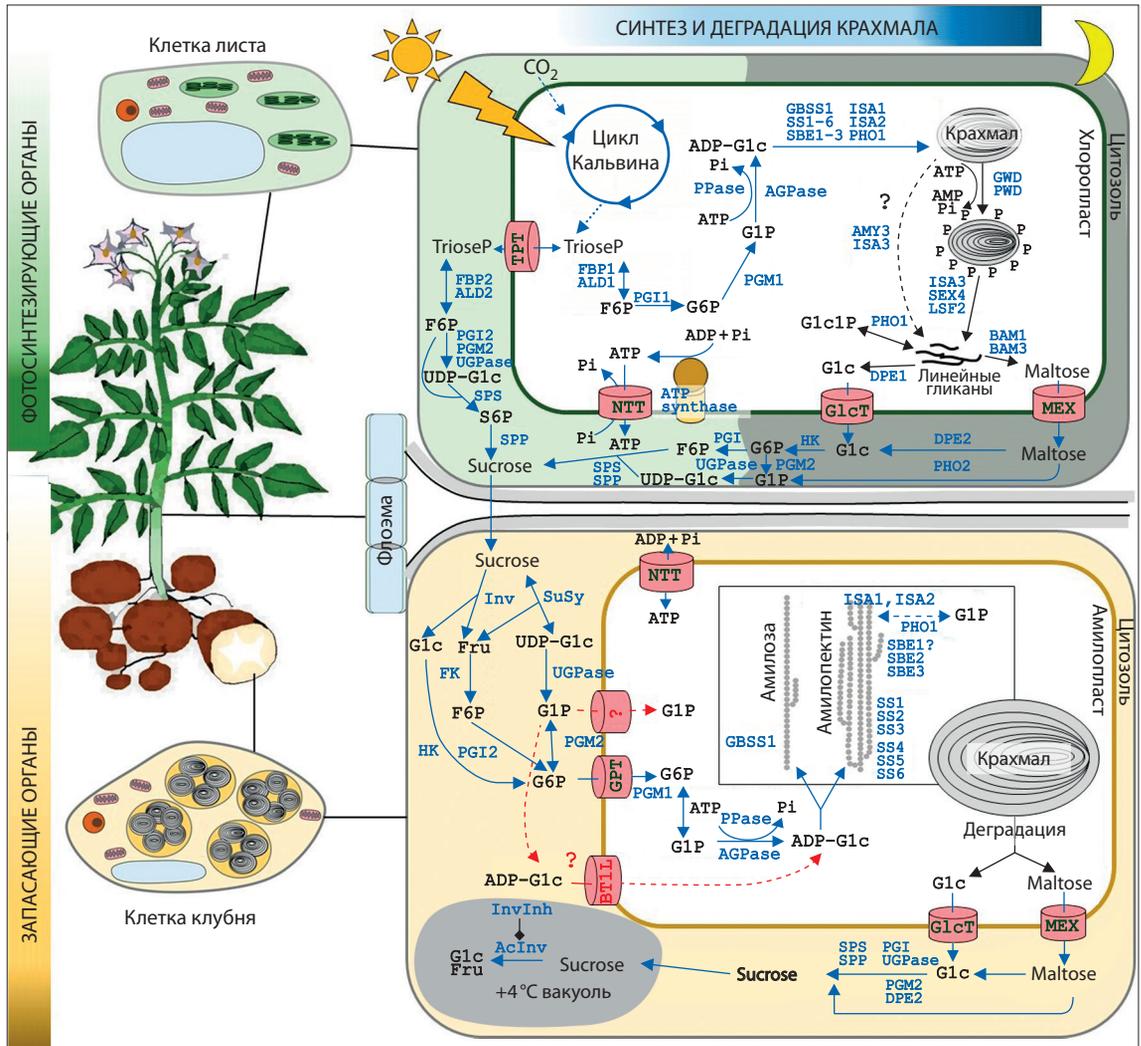


Схема метаболизма крахмала в фотосинтезирующих (листья) и запасующих (клубни) органах картофеля.

Пути биосинтеза крахмала, а также метаболизма сахаров обозначены синими стрелками, путь деградации крахмала – черными стрелками. В листьях более подробно показан путь деградации, в клубнях – путь биосинтеза крахмала. Альтернативный путь синтеза АДФ-глюкозы в цитозоле и последующего транспорта в амилопласт с помощью BT1 (Brittle1-like transporter) обозначен красной стрелкой. Углеводы (черный цвет): Fru – фруктоза; F6P – фруктозо-6-фосфат; Glc – глюкоза; G1P – глюкозо-1-фосфат; G6P – глюкозо-6-фосфат; S6P – сахарозо-6-фосфат; TrioseP – триозофосфат; ADP-Glc – АДФ-глюкоза; UDP-Glc – УДФ-глюкоза; Sucrose – сахароза; Maltose – мальтоза. Ферменты и ингибитор инвертазы (синий цвет): AcInv – вакуолярная инвертаза; AGPase – АДФ-глюкозопирофосфорилаза; ALD – альдолаза; AMY – α-амилаза; BAM – β-амилаза; FK – фруктокиназа; DPE – 4-α-гликанотрансфераза; FBP – фруктозо-1,6-бисфосфатаза; GBSS – гранулосвязанная крахмалсинтаза; GWD – α-гликан-Н₂О-дикиназа; HK – гекокиназа; ISA – изоамилаза; InvInh – ингибитор инвертазы; Inv – инвертаза; PGI – фосфоглюкоизомераза; PGM – фосфоглюкомутаза; PHO – α-гликанфосфорилаза; PPase – щелочная пирофосфатаза; PWD – фосфогликан-Н₂О-дикиназа; SBE – крахмалветвящий фермент; SEX, LSF – фосфогликанфосфатазы; SPP – сахарозофосфатфосфатаза; SPS – сахарозофосфатсинтаза; SS – крахмалсинтаза; SuSy – сахарозосинтаза; UGPase – УДФ-глюкозопирофосфорилаза. Транспортные белки (зеленый цвет): GPT – транспортер глюкозо-6-фосфата; NTT – АДФ-АДФ антипортер; MEX – мальтозотранспортер; TPT – триозофосфатный/фосфатный транслокатор; GlcT – глюкозотранспортер; BT1L – Brittle1-подобный транспортер.

того, что в клубнях картофеля пирофосфат не оказывает влияния на направление реакции, катализируемой AGPase (Andersson et al., 2018).

У злаковых (однодольных) растений имеется альтернативный цитозольный путь синтеза АДФ-глюкозы за счет действия ферментов SuSy и UGPase, который является значимым при росте зерна. Транспорт АДФ-глюкозы в амилопласт осуществляется с помощью транспортного белка Brittle1-like transporter (BT1) (Bowsher et al., 2007). У картофеля *S. tuberosum* обнаружен гомолог этого белка: StBT1, который выполняет функцию однонаправленного

транспорта АМФ, АДФ и АТФ; при этом доказательства транспорта АДФ-глюкозы через мембрану амилопластов отсутствуют (Leroch et al., 2005).

Синтез крахмальной гранулы

Биосинтез транзитного крахмала в хлоропластах листьев и запасного крахмала в амилопластах клубней происходит по одинаковой схеме. В процессе синтеза молекул амилозы и амилопектина принимают участие 16 ключевых ферментов, которые относятся к следующим группам: крахмалсинтазы, крахмалветвящие и девятя-

щие ферменты (см. таблицу). Большинство ферментов существуют в виде спектра изоформ, функции которых могут частично перекрываться (Pfister, Zeeman, 2016; Van Harsselaar et al., 2017).

Крахмалсинтазы катализируют формирование гликозидных связей путем переноса глюкозного остатка АДФ-глюкозы на нередуцирующий конец молекулы глюкозного полимера и являются группой ферментов, которая подразделяется на крахмалсинтазы, связанные с гранулой (*granule bound starch synthases, GBSS*), и растворимые крахмалсинтазы (*soluble starch synthases, SS*). GBSS отвечает за синтез длинных цепей: преимущественно амилозы, а также фракции длинных цепей у амилопектина. Растворимые крахмалсинтазы представлены спектром изоформ (SS1, SS2, SS3, SS4, SS5, SS6), из которых SS1, SS2, SS3 осуществляют рост цепей различной длины у амилопектина (Pfister, Zeeman, 2016). Изоформа SS4 играет особую роль среди крахмалсинтаз, так как участвует в инициации образования гранул крахмала (Tetlow, Bertoft, 2020). У *Arabidopsis* с выключенным геном *ss4* наблюдали одну-две крахмальные гранулы большого размера вместо пяти-семи небольших у растения дикого типа (Roldán et al., 2007). Функции изоформ крахмалсинтазы SS5 и SS6 пока неясны. У белка SS5 на С-конце отсутствует характерный для крахмалсинтаз консервативный район, содержащий каталитический домен GT1, при этом белок имеет консервативный сайт связывания гликанов. Вероятно, SS5 участвует в процессе инициации образования крахмальной гранулы; показано, что утрата белка SS5 у *Arabidopsis* вызывает уменьшение количества гранул в листьях (Abt et al., 2020). Изоформа SS6 и кодирующий ее ген были выявлены в геноме картофеля относительно недавно (Van Harsselaar et al., 2017), функциональная роль этого фермента неясна. Возможно, он участвует в процессе роста гранулы, поскольку физически связан с ней. Кроме того, у SS6 присутствуют консервативные мотивы XXGGL и KXGGL, характерные для гликозилтрансферазных доменов крахмалсинтаз GT1 и GT5 соответственно (Helle et al., 2018).

Инициация образования крахмальной гранулы долгое время оставалась малоизученным вопросом. Существующие исследования касаются образования гранулы у транзитного крахмала модельного объекта *A. thaliana*, но, вероятно, ключевые моменты механизма формирования гранулы можно в некоторой степени экстраполировать и на другие виды растений (Mérida, Fettke, 2021). Как указано выше, основным ферментом инициации является SS4, также участие в образовании и росте гранулы, по всей видимости, принимают SS5 и SS6. Акцептором для роста гранулы служат мальтоолигосахариды, образованные при деградации полигликанов амилазами (Mérida, Fettke, 2021). Пространственное взаимодействие крахмалсинтаз, молекул субстрата (АДФ-глюкозы) и растущей гранулы осуществляется с помощью направляющих белков: факторов PTST2 (*protein targeting to starch 2*) и PTST1, которые связаны с крахмалсинтазами SS4 и GBSS1 соответственно, а также содержат углевод-связывающий домен (Seung et al., 2015, 2017). Необходимо отметить, что в клубнях картофеля фактор PTST2 не обнаружен. Это свидетельствует в пользу того, что процессы иници-

ации образования гранул крахмала в листьях *Arabidopsis* и клубнях картофеля различаются (Helle et al., 2018). На инициацию формирования крахмальных гранул в клубнях картофеля оказывает влияние и гетеромультимерный комплекс, сформированный изоамилазами ISA1 и ISA2. Судя по всему, изоамилазы подавляют образование новых гранул крахмала, препятствуя образованию растворимых молекул гликанов в строме хлоропласта (Bustos et al., 2004).

По мере удлинения цепей молекул амилозы и амилопектина, осуществляемого крахмалсинтазами SS1, SS2 и SS3, происходит присоединение к ним боковых ветвей, катализируемое крахмалветвящими ферментами SBE (*starch branching enzymes*) (Pfister, Zeeman, 2016). Крахмалветвящие ферменты расщепляют α -1,4-гликозидные связи полигликанов, синтезированных крахмалсинтазами, и присоединяют образованные короткие цепи на так называемую цепь-акцептор за счет формирования α -1,6-гликозидной связи. Крахмалветвящие ферменты картофеля представлены изоформами SBE1.1, SBE1.2, SBE2, SBE3 (ранее обозначаемая как SBE1) (см. таблицу) (Van Harsselaar et al., 2017). Таким образом, упоминающиеся в других работах формы SBE1 и SBE2 по классификации Ван Харселаар и соавторов обозначены как SBE3 и SBE2. SBE3 преимущественно синтезирует длинные боковые цепи, SBE2 обеспечивает продукцию коротких цепей амилопектина (Tetlow, Bertoft, 2020). Функция SBE1.1 и SBE1.2 в биосинтезе крахмала картофеля неизвестна, однако у *Arabidopsis* обнаружено их плеiotропное влияние на рост и развитие растения: трансформанты со сверхэкспрессией *SBE1* имели нарушенную окраску, низкий рост, длинный жизненный цикл и давали меньше семян, чем контрольные растения (Wang X. et al., 2010). Совместная работа разных изоформ влияет на структуру амилопектина. На растениях картофеля с нокаутом генов *sbe3* и/или *sbe2* (в оригинальном исследовании обозначены как *sbe1* и *sbe2*) показано, что при неактивном *sbe3* формируется крахмал, состоящий из более длинных молекул амилопектина с уменьшенной степенью ветвления. Нокаут гена *sbe2* (при активном *sbe3*) не оказал заметного влияния на структуру амилопектина, при этом увеличилось количество крахмальных гранул в клубнях картофеля и уменьшился их размер (Tuncel et al., 2019).

Другая группа ферментов, принимающих участие в формировании структуры амилопектина, – деветвящие ферменты DBE (*debranching enzymes*) (см. таблицу), которые осуществляют перестройку разветвленных гликанов в формы, способные к более успешной кристаллизации, что важно при формировании гранулы (Pfister, Zeeman, 2016). DBE представлены изоамилазами (ISA), которые катализируют гидролиз α -1,6-гликозидных связей амилопектина, убирая избыточное разветвление. Изоамилазы картофеля существуют в виде изоформ ISA1, ISA2, ISA3. Белки ISA1 и ISA2 могут формировать гетеромультимеры, которые более эффективно удаляют длинные наружные цепи амилопектина (Hussain et al., 2003). ISA3 играет важную роль в процессе деградации крахмала за счет расщепления коротких наружных цепей гликанов (Streb et al., 2008). Трансгенные растения картофеля с пониженным уровнем экспрессии генов *isa1*, *isa2*, *isa3* показали существенное уменьшение содержания крахмала в развивающихся

клубнях и при этом не изменившийся уровень крахмала в листьях. Кроме того, наблюдалось увеличение количества и уменьшение размера гранул, а также рост уровня сахарозы, видимо, связанный с увеличением суммарной поверхности гранул и доступа ферментов деградации (Ferreira et al., 2017).

Помимо крахмалсинтаз, ветвящих и деветвящих ферментов, в синтезе крахмальной гранулы принимают участие α -гликанфосфорилазы, представленные пластидной (PHO1) и цитоплазматической (PHO2) изоформами, которые катализируют обратимую реакцию переноса гликозильной группы от глюкозо-1-фосфата (G1P) на нередуцирующий конец цепи α -1,4-связанных гликанов (Pfister, Zeeman, 2016). PHO2 участвует в метаболизме углеводов в цитоплазме, а PHO1 играет роль в процессах биосинтеза и деградации крахмала в пластидах. Показано, что при низких температурах в клубнях картофеля может реализовываться фосфорилазный путь биосинтеза крахмала с использованием G1P в качестве субстрата (Fettke et al., 2012).

Деградация крахмальной гранулы

Процесс деградации крахмала является неотъемлемой частью его метаболизма и общего углеводного обмена, однако изучен в значительно меньшей степени, чем биосинтез. Наиболее подробно описаны пути деградации транзиторного крахмала в листьях модельного объекта *A. thaliana*; данные же о процессе распада крахмала в клубнях картофеля получены преимущественно при исследовании процессов холодого осахаривания и прорастания. Основные этапы деградации крахмала заключаются в высвобождении растворимых гликанов из гранул крахмала, превращении гликанов в линейные формы (мальтоолигосахариды), гидролизе последних до мальтозы и ее дальнейшем метаболизме в клетке. В процессе деградации крахмала принимает участие широкий спектр ферментов: α - и β -амилазы, изоамилаза, α -гликан- H_2O -дикиназа и фосфогликан- H_2O -дикиназа, α -гликан фосфорилаза, фосфогликанфосфатаза, и 4- α -гликанотрансфераза (см. таблицу).

Деградация крахмальной гранулы инициируется действием α -гликан- H_2O -дикиназы (glucan water dikinase, GWD) и фосфогликан- H_2O -дикиназы (phosphoglucan water dikinase, PWD), которые фосфорилируют гликан по позициям С6 и С3 глюкозных остатков, делая их более гидрофильными и обеспечивая последующий доступ α -, β - и изоамилазам (см. таблицу) (Ritte et al., 2006; Streb, Zeeman, 2012). Фосфорилирование α -гликан- H_2O -дикиназой, судя по всему, играет основную роль в процессе распада крахмала в клубнях и листьях картофеля (Claassen et al., 1993; Orzechowski et al., 2021). Клубни трансгенных растений картофеля со сниженным уровнем гена *StGWD* были менее подвержены деградации крахмала при воздействии низких температур (Lorberth et al., 1998).

Следующий этап деградации крахмальной гранулы включает в себя гидролиз гликанов амилазами. В геноме картофеля α - и β -амилазы представлены достаточно широким спектром изоформ, однако точная функция большинства из них неизвестна (см. таблицу) (Van Harsselaar et al., 2017). Если экстраполировать данные, полученные

для *Arabidopsis*, β -амилазы VAM1 и VAM3 могут осуществлять гидролиз линейных участков цепей амилозы и амилопектина; для деградации же разветвленных частей молекул необходимо участие деветвящего фермента DBE (у картофеля изоамилаза ISA3) (Hussain et al., 2003; Fulton et al., 2008; Pfister, Zeeman, 2016). У картофеля при сайленсинге гена *StBAM3* наблюдали увеличение содержания крахмала в листьях по сравнению с диким фенотипом (Scheidig et al., 2002). В клубнях показано влияние активности специфичных форм амилаз в процессе холодого осахаривания: α -амилазы AMY2 (AMY23) и β -амилаз VAM1, VAM9. Предположительной функцией VAM1 и VAM9 является деградация крахмала в пластиде, а AMY2 – деградация фитогликогена в цитозоле (Hou et al., 2017). У *A. thaliana* описан также альтернативный путь деградации крахмала, инициируемый действием α -амилазы AMY3, которая высвобождает из гранул крахмала линейные и разветвленные гликаны, затем гидролизуются β - и изоамилазами (см. рисунок) (Streb et al., 2008).

Параллельно гидролизу гликанов крахмала амилазами идет процесс их дефосфорилирования, который катализируется фосфогликанфосфатазами SEX4 (Starch Excess) и LSF2 (LIKE SEX FOUR2), изначально описанными у *Arabidopsis*. Эти два процесса взаимосвязаны: фосфорилирование дикиназами увеличивает растворимость гранулы и обеспечивает доступ для работы амилаз, при этом фосфатные остатки могут препятствовать процессу гидролиза (Hejazi et al., 2010; Santelia et al., 2011). У картофеля уменьшение активности генов *SEX4* или *LSF2* ингибировало деградацию крахмала в листьях; количество крахмала в клубнях оставалось неизменным, и наблюдалось увеличение уровня фосфорилирования и уменьшение размера гранул (Samodien et al., 2018).

В результате совместного действия дикиназ, амилаз и фосфатаз образуется пул растворимых мальтоолигосахаридов (линейных гликанов), распад которых происходит с помощью двух альтернативных путей: гидролитического, за счет действия β -амилаз, либо фосфоролитического, осуществляемого α -гликанфосфорилазой PHO1 (Weise et al., 2006; Fulton et al., 2008). При реализации фосфоролитического пути деградации конечным продуктом является G1P, который может использоваться внутри пластиды для метаболических нужд. Также возможно образование глюкозы в результате действия 4- α -гликанотрансферазы DPE1 (disproportionating enzyme) и экспорт в цитозоль посредством глюкозотранспортера pGlcT1 (Critchley et al., 2001; Cho et al., 2011). У растений картофеля с сайленсингом гена хлоропластного фермента DPE в листьях выявлено уменьшение скорости деградации крахмала и при этом накопление мальтоолигосахаридов, в клубнях такого эффекта не наблюдали (Lloyd et al., 2004). В клубнях в условиях холодого осахаривания увеличивались активность β -амилаз и концентрация мальтозы (Nielsen et al., 1997).

Мальтоза, которая является преобладающим продуктом гидролитического пути деградации крахмала, экспортируется в цитозоль с помощью трансмембранного транспортного белка MEX1 (Cho et al., 2011). Затем, уже в цитозоле клетки, мальтоза вследствие действия ферментов 4- α -гликанотрансферазы DPE2 либо фосфорилазы PHO2

распадается до глюкозы или глюкозо-1-фосфата, из которых за счет согласованного действия ферментов PGI2, PGM2, НК, UGPase, SPS (сахарозофосфатсинтаза) и SPP (сахарозофосфатфосфатаза) синтезируется сахароза (см. рисунок) (López-González et al., 2019).

В клубнях картофеля сахароза используется как источник питательных веществ в процессе прорастания световых ростков, при этом ее уровень является регуляторным фактором, запускающим выход клубня из состояния покоя (Sonnewald S., Sonnewald U., 2014).

Для замедления процесса прорастания световых ростков клубней картофель хранят в условиях пониженных температур (2–5 °C), что запускает процесс так называемого холодового осахаривания, которое заключается в гидролизе сахарозы кислой вакуолярной инвертазой AcInv (ген *Pain-1*) и накоплении в клубнях редуцирующих сахаров (глюкозы и фруктозы) (см. рисунок) (Sowokinos et al., 2018). При нокауте гена вакуолярной инвертазы наблюдали более низкое содержание редуцирующих сахаров (Clasen et al., 2016). Одним из ключевых регуляторов процесса холодового осахаривания является ингибитор инвертаз (InhInv) SbAI, который подавляет активность AcInv (McKenzie et al., 2013). Показано, что SbAI может также подавлять активность α - и β -амилаз в клубнях картофеля (StAmy23, StBAM1 и StBAM9), тем самым влияя на скорость деградации крахмала при холодовом осахаривании (Zhang H. et al., 2014).

Механизмы контроля метаболизма крахмала

Синтез, деградация крахмала и метаболизм продуктов его распада требуют согласованной работы множества ферментов, транспортных и направляющих белков, что подразумевает наличие различных уровней регуляции: экспрессии генов, их посттранскрипционной регуляции, а также посттрансляционной регуляции активности ферментов. Профили экспрессии генов ключевых ферментов метаболизма крахмала достаточно хорошо изучены у разных видов растений, однако о факторах, регулирующих экспрессию, известно гораздо меньше (López-González et al., 2019). Сложность обусловлена тем, что ферменты метаболизма крахмала представлены большим количеством изоформ, которые кодируются соответствующим количеством паралогичных генов, для которых характерны спектры экспрессии, специфичные как для определенной ткани (листья, развивающиеся семена и клубни), так и для стадии развития, что показано, например, у *Arabidopsis* и кукурузы (Tsai et al., 2009; Chen et al., 2014). У картофеля тканеспецифичный характер экспрессии выявлен для генов *SuSy4*, *SS5*, *SBE3*, *APL3*, *PHO1a*, *PHO1b*, *GPT1.1*, *GPT2.1*, *SEX4*, *NTT2* (в клубнях) и *AMY1.1*, *APL1*, *BAM3.1* (в листьях) (Van Harsselaar et al., 2017). На экспрессию генов биосинтеза крахмала оказывает влияние ряд внешних и внутренних факторов: циркадные ритмы, световой цикл и уровень сахаров (Tiessen et al., 2002; Kötting et al., 2010). Так, уровень экспрессии генов *GBSSI*, *LSF1*, *LSF2*, *SEX4*, *BAM3* в листьях *A. thaliana* контролируется транскрипционными факторами, зависящими от циркадных ритмов и светового периода, что необходимо для быстрого удовлетворения потребностей в энергии в ответ на меняющиеся условия окружающей среды (Tenorio et

al., 2003; Flis et al., 2016). В растущих клубнях картофеля наблюдали зависимое от фотопериода изменение уровня экспрессии генов *GBSS*, *SuSy* и *AGPase*, при этом более высокий уровень отмечался в конце светового периода, а наиболее низкий – в начале, что обусловлено изменением уровня притока фотоассимилятов, транспортируемых из листьев (Geigenberger, Stitt, 2000; Ferreira et al., 2010).

Важной стадией развития растения картофеля является процесс туберизации, т. е. формирование запасующего органа (клубня) из подземного побега (столона), в связи с чем происходит активный биосинтез крахмала, образование крахмальных гранул и увеличение потока метаболитов. Туберизация – сложный процесс, на который влияют факторы внешней среды (фотопериод), биохимические, гормональные и другие сигналы (микроРНК, транскрипционные факторы) (Hannapel et al., 2017; Kondhare et al., 2021). Изучение процесса туберизации внесло большой вклад в понимание механизмов регуляции метаболизма крахмала в клубнях картофеля.

Фитогормоны являются важным фактором, оказывающим влияние на метаболизм крахмала. Так, показана корреляция между уровнем абсцизовой кислоты и накоплением крахмала в клубнях картофеля (Borzenkova, Borovkova, 2003). При обработке столонов ИУК (гетероауксином) наблюдалось увеличение содержания крахмала в растущих клубнях, при этом двукратное увеличение концентрации ИУК имело противоположный эффект (Wang D. et al., 2018). При формировании запасующих корней маниока показана корреляция уровня транскрипции гена ауксина и генов биосинтеза крахмала (*PGM*, *AGPase*, *GBSS*, *SS*, *BE*) (Rüscher et al., 2021).

Другое важное сигнальное вещество, влияющее на экспрессию генов метаболизма крахмала, – это сахара (гексозы, сахароза и трегалоза). У картофеля сахароза индуцирует увеличение экспрессии генов *SuSy* и *AGPase* (Salanoubat, Belliard, 1989; Müller-Röber et al., 1990). В растущих клубнях уровень экспрессии *SuSy* и *AGPase* высокий, а при отсоединении клубня от растения быстро уменьшается (Ferreira et al., 2010).

На разных стадиях развития клубня наблюдали дифференциальную экспрессию генов биосинтеза крахмала (Ferreira et al., 2010; Van Harsselaar et al., 2017). На стадии столона был повышен уровень экспрессии гена *SS4*, который снижался по мере роста клубня, что подтверждает роль этой крахмалсинтазы в инициации гранулообразования (Ferreira et al., 2010). Также при росте клубня увеличивался уровень экспрессии гена сахарозосинтазы *SuSy4* и уменьшался уровень экспрессии инвертазы клеточной стенки *cw-Inv*, что свидетельствует о переходе к сахарозосинтазному пути расщепления сахарозы. Увеличение экспрессии по мере роста клубня наблюдали для генов *GPT*, *NTT*, *AGPase*, крахмалсинтаз и крахмалветвящих ферментов, из них специфичная активность именно для тканей клубней показана для изогенов *SuSy4*, *SBE3*, *GPT2.1* (Ferreira et al., 2010; Van Harsselaar et al., 2017). Для изучения механизмов молекулярно-генетической регуляции активности генов был использован анализ коэкспрессии и обнаружена ассоциация транскрипционных факторов *LOB*, *TIFY5a*, *WRKY4* с экспрессией генов *SuSy4* и *GPT2.1* (Van Harsselaar et al., 2017). Анализ

сетей коэкспрессии для генов биосинтеза крахмала семи видов растений (*Arabidopsis thaliana*, маниок *Manihot esculenta*, просо *Panicum virgatum*, кукуруза *Zea mays*, рис *Oryza sativa*, ячмень *Hordeum vulgare*, батат *Ipomoea batatas*) показал участие 24 транскрипционных факторов (López-González et al., 2019).

Посттранскрипционные механизмы регуляции генов метаболизма крахмала малоизучены. В целом посттранскрипционная регуляция осуществляется рядом факторов, таких как РНК-связывающие белки, микроРНК, альтернативный сплайсинг, благодаря чему растения могут быстро репрограммировать свой транскриптом в ответ на внутренние и внешние стимулы. У картофеля показано влияние фотопериода на профили экспрессии микроРНК при росте и развитии клубней: гены-мишени для дифференциально экспрессирующихся микроРНК кодируют транскрипционные факторы и РНК-связывающиеся регуляторные белки (*StGRAS*, *StTCP2/4* и *StPTB6*) (Kondhare et al., 2018).

Следующий уровень – посттрансляционный, который заключается в регуляции активности белков с помощью аллостерического контроля, при котором происходит связывание эффекторной молекулы с некаталитическим сайтом фермента, за счет чего меняются его конформация и каталитические свойства и, в свою очередь, специфичность и взаимодействие с другими белками (Zeeman et al., 2010). Аллостерическая регуляция включает в себя фосфорилирование белков, формирование их мультимерных комплексов и дисульфидных мостиков (Kötting et al., 2010; Zeeman et al., 2010). Показано, что многие ферменты метаболизма крахмала у *A. thaliana*, такие как PGI, PGM1, AGPase, SS3, GWD1, GWD2, DPE2, AMY3, BAM1, BAM3, LDA, pGlcT и MEX1, находятся в фосфорилированном статусе (Kötting et al., 2010). У картофеля наглядным примером фермента, подлежащего аллостерической регуляции, является АДФ-глюкозопирофосфорилаза AGPase, которая активируется в присутствии 3-фосфоглицериновой кислоты и ингибируется неорганическим фосфатом (Sowokinos, Preiss, 1982). В зависимости от окислительно-восстановительного статуса клетки AGPase может обратимо инактивироваться за счет образования дисульфидных мостиков между малыми субъединицами гетеротетрамера (Ballicora et al., 2000).

Ферменты могут собираться в комплексы, известные как «метаболоны» (Sweetlove, Fernie, 2013). Комплексы, образованные ферментами биосинтеза крахмала SSIII, SSIIa, SBEIIa и SBEIIb, обнаружены в эндосперме развивающихся семян злаков (Tetlow et al., 2008). Образование белковых комплексов PTST2 и SS4 происходит при инициации образования крахмальной гранулы в листьях *Arabidopsis* (Seung et al., 2015, 2017). У картофеля изоамилазы ISA1 и ISA2 формируют гетеротетрамерный комплекс, который контролирует образование гранул крахмала (Bustos et al., 2004).

Заключение

Растущая необходимость в производстве крахмала для нужд промышленности делает крайне актуальным изучение его метаболизма у растений картофеля, в особен-

ности в клубнях. За последние три десятилетия был получен большой объем данных о ключевых ферментах метаболизма крахмала и углеводного обмена различных видов растений (как сельскохозяйственных, так и модельного объекта *A. thaliana*). Несмотря на то что в общих чертах схема биосинтеза крахмала одинакова у изученных видов, наблюдаются и существенные различия, связанные с присутствием множества изоформ ферментов и особенностями их функций, различающимися путями транспорта метаболитов (например, транспорт АДФ-глюкозы через пластидную мембрану у злаковых), а также сложной и многоуровневой системой регуляции, которая управляется как внешними (фотопериод, температура), так и внутренними факторами (действие фитогормонов, метаболитов, микроРНК, регуляторных белков). Так, в геноме картофеля *Solanum tuberosum* идентифицированы изогены, кодирующие шесть изоформ крахмалсинтаз, семь – сахарозосинтаз, девять – β -амилаз, и по три-пять изоформ крахмалветвящих и других ферментов (Van Harselaar et al., 2017).

Функция многих изоформ (например, большинства α - и β -амилаз) до сих пор неизвестна. Для ряда изогенов показана клубнеспецифичная экспрессия (*SuSy4*, *SS5*, *SBE3*, *APL3*, *PHO1a*, *PHO1b*, *GPT1.1*, *GPT2.1*, *SEX4*, *NTT2*), а также изменения активности на разных стадиях формирования клубней (Ferreira et al., 2010; Van Harselaar et al., 2017). Отмечено специфичное участие изоформ амилаз при деградации крахмала и метаболизме углеводов при холодом осахаривании (*AMY23*, *BAM1*, *BAM9*) (Hou et al., 2017). Выявлено также влияние ряда различных факторов на процесс накопления крахмала при развитии клубня: транскрипционных факторов (*LOB*, *TIFY5a*, *WRKY4*), фитогормонов (ауксин, абсцизовая кислота), сахаров и микроРНК, содержание которых может опосредовать влияние фотопериода. При этом информация о функциях многих изоформ ферментов и о белках-участниках процесса, выполняющих регуляторные и направляющие функции в процессе метаболизма крахмала в растениях картофеля, до сих пор остается неполной. Для решения этой проблемы предлагают использовать современные методы, такие как совместный анализ метаболома и транскриптома внутри отдельной клетки либо ткани (López-González et al., 2019). Перспективным для поиска новых компонентов является подход протеомики «снизу-вверх» (bottom-up) (Helle et al., 2018). Например, при анализе 36 белков, связанных с крахмальными гранулами картофеля, кроме уже известных ферментов метаболизма крахмала были выявлены направляющие и регуляторные белки, описанные у *Arabidopsis*: PTST1 (Protein Targeting to Starch), ESV1 (Early StarVation1) и LESV (Like ESV), а также ингибиторы протеаз типа Кунитц (Kunitz-type proteinase inhibitor), тиоредоксин (TRX) и глутатионпероксидаза (GPX), которые участвуют в процессе окислительно-восстановительной регуляции (Helle et al., 2018). Развернутая информация обо всех компонентах, принимающих участие в процессе метаболизма крахмала, и о схеме их взаимодействия, в том числе при меняющихся условиях внешней среды, очень важна для получения сортов картофеля с повышенной продуктивностью и заданными свойствами крахмала.

Список литературы / References

- Слугина М.А., Кочиева Е.З. Использование генов углеводного обмена для улучшения качества клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.). *С.-х. биология*. 2018;53(3):450-463. DOI 10.15389/agrobiol.2018.3.450rus.
[Slugina M.A., Kochieva E.Z. The use of carbohydrate metabolism genes for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2018;53(3):450-463. DOI 10.15389/agrobiol.2018.3.450eng.]
- Хлесткин В.К., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А. Гены-мишени для получения сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с заданными свойствами крахмала. *С.-х. биология*. 2017;52(1):25-36. DOI 10.15389/agrobiol.2017.1.25rus.
[Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Target genes for development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars with desired starch properties. *Selskokhozyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2017;52(1):25-36. DOI 10.15389/agrobiol.2017.1.25eng.]
- Abt M., Pfister B., Sharma M., Eicke S., Bürgy L., Neale I., Seung D., Zeeman S.C. STARH SYNTHASE5, a noncanonical starch synthase-like protein, promotes starch granule initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2020;32(8):2543-2565. DOI 10.1105/tpc.19.00946.
- Andersson M., Melander M., Pojmark P., Larsson H., Bülow L., Hofvander P. Targeted gene suppression by RNA interference: an efficient method for production of high-amylose potato lines. *J. Biotechnol.* 2006;123:137-148. DOI 10.1016/j.jbiotec.2005.11.001.
- Andersson M., Turesson H., Arrivault S., Zhang Y., Fält A.-S., Fernie A.R., Hofvander P. Inhibition of plastid PPase and NTT leads to major changes in starch and tuber formation in potato. *J. Exp. Bot.* 2018;69(8):1913-1924. DOI 10.1093/jxb/ery051.
- Andersson M., Turesson H., Nicolai A., Fält A.S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* 2017;36:117-128. DOI 10.1007/s00299-016-2062-3.
- Appeldoorn N.J.G., de Bruijn S.M., Koot-Gronsveld E.A.M., Visser R.G.F., Vreugdenhil D., van der Plas L.H.W. Developmental changes of enzymes involved in conversion of sucrose to hexose-phosphate during early tuberisation of potato. *Planta*. 1997;202:220-226. DOI 10.1007/s004250050122.
- Ballicora M.A., Frueauf J.B., Fu Y., Schurmann P., Preiss J. Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 2000;275(2):1315-1320. DOI 10.1074/jbc.275.2.1315.
- Baroja-Fernández E., Muñoz F.J., Montero M., Etxeberria E., Sesma M.T., Ovecka M., Bahaji A., Ezquer I., Li J., Prat S., Pozueta-Romero J. Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant Cell Physiol.* 2009;50(9):1651-1662. DOI 10.1093/pcp/pcp108.
- Birt D.F., Boylston T., Hendrich S., Jane J.L., Hollis J., Li L., McClelland J., Moore S., Phillips G.J., Rowling M., Schalinske K., Scott M.P., Whitley E.M. Resistant starch: promise for improving human health. *Adv. Nutr.* 2013;4(6):587-601. DOI 10.3945/an.113.004325.
- Borzenkova R.A., Borovkova M.P. Developmental patterns of phytohormone content in the cortex and pith of potato tubers as related to their growth and starch content. *Russ. J. Plant Physiol.* 2003;50:119-124. DOI 10.1023/A:1021957022595.
- Bowsher C.G., Scrase-Field E.F.A.L., Esposito S., Emes M.J., Tetlow I.J. Characterization of ADP-glucose transport across the cereal endosperm amyloplast envelope. *J. Exp. Bot.* 2007;58(6):1321-1332. DOI 10.1093/jxb/erl297.
- Bustos R., Fahy B., Hylton C.M., Seale R., Nebane N.M., Edwards A., Martin C., Smith A.M. Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101(7):2215-2220. DOI 10.1073/pnas.0305920101.
- Chen J., Zeng B., Zhang M., Xie S., Wang G., Hauck A., Lai J. Dynamic transcriptome landscape of maize embryo and endosperm development. *Plant Physiol.* 2014;166(1):252-264. DOI 10.1104/pp.114.240689.
- Cho M.H., Lim H., Shin D.H., Jeon J.S., Bhoo S.H., Park Y.I., Hahn T.R. Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 2011;190(1):101-112. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03580.x.
- Claassen P.A.M., Budde M.A.W., Van Calker M.H. Increase in phosphorylase activity during cold-induced sugar accumulation in potato tubers. *Potato Res.* 1993;36:205-217. DOI 10.1007/BF02360529.
- Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebe R., Davison S., Ray E.E., Daulhac A., Coffman A., Yabandih A., Retterath A., Haun W., Baltes N.J., Mathis L., Voytas D.F., Zhang F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol. J.* 2016;14(1):169-176. DOI 10.1111/pbi.12370.
- Critchley J.H., Zeeman S.C., Takaha T., Smith A.M., Smith S.M. A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2001;26(1):89-100. DOI 10.1046/j.1365-313x.2001.01012.x.
- Fernie A.R., Swiedrych A., Tauberger E., Lytovchenko A., Trethewey R.N., Willmitzer L. Potato plants exhibiting combined antisense repression of cytosolic and plastidial isoforms of phosphoglucomutase surprisingly approximate wild type with respect to the rate of starch synthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 2002;40(11):921-927. DOI 10.1016/S0981-9428(02)01457-2.
- Ferreira S.J., Senning M., Fischer-Stettler M., Streb S., Ast M., Neuhaus H.E., Zeeman S.C., Sonnewald S., Sonnewald U. Simultaneous silencing of isoamylases ISA1, ISA2 and ISA3 by multi-target RNAi in potato tubers leads to decreased starch content and an early sprouting phenotype. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181444. DOI 10.1371/journal.pone.0181444.
- Ferreira S.J., Senning M., Sonnewald S., Kessling P.M., Goldstein R., Sonnewald U. Comparative transcriptome analysis coupled to X-ray CT reveals sucrose supply and growth velocity as major determinants of potato tuber starch biosynthesis. *BMC Genomics*. 2010;11:93. DOI 10.1186/1471-2164-11-93.
- Fettke J., Albrecht T., Hejazi M., Mahlow S., Nakamura Y., Steup M. Glucose 1-phosphate is efficiently taken up by potato (*Solanum tuberosum*) tuber parenchyma cells and converted to reserve starch granules. *New Phytol.* 2010;185(3):663-675. DOI 10.1111/j.1469-8137.2009.03126.x.
- Fettke J., Leifels L., Brust H., Herbst K., Steup M. Two carbon fluxes to reserve starch in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber cells are closely interconnected but differently modulated by temperature. *J. Exp. Bot.* 2012;63(8):3011-3029. DOI 10.1093/jxb/ers014.
- Flis A., Sulpice R., Seaton D.D., Ivakov A.A., Liput M., Abel C., Millar A.J., Stitt M. Photoperiod-dependent changes in the phase of core clock transcripts and global transcriptional outputs at dawn and dusk in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 2016;39(9):1955-1981. DOI 10.1111/pce.12754.
- Flügge U.I., Fischer K., Gross A., Sebald W., Lottspeich F., Eckerstrom C. The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J.* 1989;8(1):39-46.
- Fulton D.C., Stettler M., Mettler T., Vaughan C.K., Li J., Francisco P., Gil M., Reinhold H., Eicke S., Messerli G., Dorken G., Halliday K., Smith A.M., Smith S.M., Zeeman S.C. β -AMYLASE4, a non-catalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell*. 2008;20(4):1040-1058. DOI 10.1105/tpc.107.056507.
- Geigenberger P., Muller-Rober B., Stitt M. Contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis is decreased by water stress in growing potato tubers. *Planta*. 1999;209(3):338-345. DOI 10.1007/s004250050641.
- Geigenberger P., Stitt M. Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and AGPS transcript in growing potato tubers that are sup-

- pressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant J.* 2000;23:795-806. DOI 10.1046/j.1365-313x.2000.00848.x.
- George G.M., van der Merwe M.J., Nunes-Nesi A., Bauer R., Fernie A.R., Kossmann J., Lloyd J.R. Virus-induced gene silencing of plastidial soluble inorganic pyrophosphatase impairs essential leaf anabolic pathways and reduces drought stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 2010;154(1):55-66. DOI 10.1104/pp.110.157776.
- Hannapel D.J., Sharma P., Lin T., Banerjee A.K. The multiple signals that control tuber formation. *Plant Physiol.* 2017;174(2):845-856. DOI 10.1104/pp.17.00272.
- Hejazi M., Fettke J., Kötting O., Zeeman S.C., Steup M. The Laforin-like dual-specificity phosphatase SEX4 from *Arabidopsis* hydrolyzes both C6- and C3-phosphate esters introduced by starch-related dikinases and thereby affects phase transition of α -glucans. *Plant Physiol.* 2010;152(2):711-722. DOI 10.1104/pp.109.149914.
- Helle S., Bray F., Verbeke J., Devassine S., Courseaux A., Facon M., Tokarski C., Rolando C., Szydowski N. Proteome analysis of potato starch reveals the presence of new starch metabolic proteins as well as multiple protease inhibitors. *Front. Plant Sci.* 2018;9:746. DOI 10.3389/fpls.2018.00746.
- Hennen-Bierwagen T.A., James M.G., Myers A.M. Involvement of debranching enzymes in starch biosynthesis. In: Tetlow I.J. (Ed.) *Essential Reviews in Experimental Biology*. Vol. 5. The Synthesis and Breakdown of Starch. Society for Experimental Biology, London, 2012;179-215.
- Hofvander P., Andersson M., Larsson C.T., Larsson H. Field performance and starch characteristics of high-amylose potatoes obtained by antisense gene targeting of two branching enzymes. *Plant Biotechnol. J.* 2004;2:311-320. DOI 10.1111/j.1467-7652.2004.00073.x.
- Hossain F., Chhabra R., Devi E.L., Zunjare R.U., Jaiswal S.K., Muthusamy V. Molecular analysis of mutant *granule-bound starch synthase-I (waxy1)* gene in diverse waxy maize inbreds. *3 Biotech.* 2019;9(1):3. DOI 10.1007/s13205-018-1530-6.
- Hou J., Zhang H., Liu J., Reid S., Liu T., Xu S., Tian Z., Sonnewald U., Song B., Xie C. Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways. *J. Exp. Bot.* 2017;68(9):2317-2331. DOI 10.1093/jxb/erx076.
- Hussain H., Mant A., Seale R., Zeeman S., Hinchliffe E., Edwards A., Hylton C., Bornemann S., Smith A.M., Martin C., Bustos R. Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell.* 2003;15(1):133-149. DOI 10.1105/tpc.006635.
- Kammerer B., Fischer K., Hilpert B., Schubert S., Gutensohn M., Weber A., Flügge U.I. Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell.* 1998;10(1):105-117. DOI 10.1105/tpc.10.1.105.
- Kleczkowski L.A., Kunz S., Wilczynska M. Mechanisms of UDP-glucose synthesis in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2010;29(4):191-203. DOI 10.1080/07352689.2010.483578.
- Kondhare K.R., Malankar N.N., Devani R.S., Banerjee A.K. Genome-wide transcriptome analysis reveals small RNA profiles involved in early stages of stolon-to-tuber transitions in potato under photoperiodic conditions. *BMC Plant Biol.* 2018;18:284. DOI 10.1186/s12870-018-1501-4.
- Kondhare K.R., Patil A.B., Giri A.P. Auxin: an emerging regulator of tuber and storage root development. *Plant Sci.* 2021;306:110854. DOI 10.1016/j.plantsci.2021.110854.
- Kötting O., Kossmann J., Zeeman S.C., Lloyd J.R. Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010;13(3):321-329. DOI 10.1016/j.pbi.2010.01.003.
- Leroch M., Kirchberger S., Haferkamp I., Wahl M., Neuhaus H.E., Tjaden J. Identification and characterization of a novel plastidial adenine nucleotide uniporter from *Solanum tuberosum*. *J. Biol. Chem.* 2005;280(18):17992-8000. DOI 10.1074/jbc.M412462200.
- Li L., Jiang H.X., Campbell M., Blanco M., Jane J.L. Characterization of maize amylose-extender (*ae*) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures. *Carbohydr. Polym.* 2008;74(3):396-404. DOI 10.1016/j.carbpol.2008.03.012.
- Lloyd J.R., Blennow A., Burhenne K., Kossmann J. Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiol.* 2004;134(4):1347-1354. DOI 10.1104/pp.103.038026.
- López-González C., Juárez-Colunga S., Morales-Eliás N.C., Tiessen A. Exploring regulatory networks in plants: transcription factors of starch metabolism. *Peer. J.* 2019;7:e6841. DOI 10.7717/peerj.6841.
- Lorberth R., Ritte G., Willmitzer L., Kossmann J. Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat. Biotechnol.* 1998;16(5):473-477. DOI 10.1038/nbt0598-473.
- Malinova I., Kössler S., Orawetz T., Matthes U., Orzechowski S., Koch A., Fettke J. Identification of two *Arabidopsis thaliana* plasma membrane transporters able to transport glucose 1-phosphate. *Plant Cell Physiol.* 2020;61(2):381-392. DOI 10.1093/pcp/pcz206.
- McKenzie M.J., Chen R.K., Harris J.C., Ashworth M.J., Brummell D.A. Post-translational regulation of acid invertase activity by vacuolar invertase inhibitor affects resistance to cold-induced sweetening of potato tubers. *Plant Cell Environ.* 2013;36(1):176-185. DOI 10.1111/j.1365-3040.2012.02565.x.
- Mérida A., Fettke J. Starch granule initiation in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant J.* 2021;107(3):688-697. DOI 10.1111/tpj.15359.
- Müller-Röber B.T., Kossmann J., Hannah L.C., Willmitzer L., Sonnewald U. One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato respond strongly to elevated levels of sucrose. *Mol. Gen. Genet.* 1990;224:136-146. DOI 10.1007/BF00259460.
- Muth J., Hartje S., Twyman R.M., Hofferbert H.R., Tacke E., Prüfer D. Precision breeding for novel starch variants in potato. *Plant Biotechnol. J.* 2008;6(6):576-584. DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00340.x.
- Nielsen T.H., Deiting U., Stitt M. $\text{A}\beta$ -amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol.* 1997;113(2):503-510. DOI 10.1104/pp.113.2.503.
- Orzechowski S., Sitnicka D., Grabowska A., Compart J., Fettke J., Zdunek-Zastocka E. Effect of short-term cold treatment on carbohydrate metabolism in potato leaves. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(13):7203. DOI 10.3390/ijms22137203.
- Pfister B., Zeeman S.C. Formation of starch in plant cells. *Cell Mol. Life Sci.* 2016;73(14):2781-2807. DOI 10.1007/s00018-016-2250-x.
- Qu J., Xu S., Zhang Z., Chen G., Zhong Y., Liu L., Zhang R., Xue J., Guo D. Evolutionary, structural and expression analysis of core genes involved in starch synthesis. *Sci. Rep.* 2018;8:12736. DOI 10.1038/s41598-018-30411-y.
- Reyniers S., Ooms N., Gomand S.V., Delcour J.A. What makes starch from potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers unique: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020;19(5):2588-2612. DOI 10.1111/1541-4337.12596.
- Ritte G., Heydenreich M., Mahlow S., Haebel S., Kötting O., Steup M. Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Lett.* 2006;580(20):4872-4876. DOI 10.1016/j.febslet.2006.07.085.
- Roldán I., Wattedled F., Lucas M.M., Delvallé D., Planchot V., Jiménez S., Pérez R., Ball S., D'Hulst C., Mérida A. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* 2007;49:492-504. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02968.x.
- Ruan Y.L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2014;65:33-67. DOI 10.1146/annurev-arplant-050213-040251.
- Rüscher D., Corral J.M., Carluccio A.V., Klemens P.A.W., Gisel A., Stavolone L., Neuhaus H.E., Ludewig F., Sonnewald U., Zierer W. Auxin signaling and vascular cambium formation enable storage metabolism in cassava tuberous roots. *J. Exp. Bot.* 2021;72(10):3688-3703. DOI 10.1093/jxb/erab106.

- Salanoubat M., Belliard G. The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene*. 1989;84:181-185. DOI 10.1016/0378-1119(89)90153-4.
- Samodien E., Jewell J.F., Loedolff B., Oberlander K., George G.M., Zeeman S.C., Damberger F.F., van der Vyver C., Kossmann J., Lloyd J.R. Repression of *Sex4* and *Like Sex Four2* orthologs in potato increases tuber starch bound phosphate with concomitant alterations in starch physical properties. *Front. Plant Sci.* 2018;9:1044. DOI 10.3389/fpls.2018.01044.
- Santana A.L., Meireles M.A.A. New starches are the trend for industry applications: a review. *Food Public Health*. 2014;4(5):229-241. DOI 10.5923/j.fph.20140405.04.
- Santelia D., Kötting O., Seung D., Schubert M., Thalmann M., Bischof S., Meekins D.A., Lutz A., Patron N., Gentry M.S., Alain F.H., Zeeman S.C. The phosphoglucan phosphatase Like Sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2011;23(11):4096-4111. DOI 10.1105/tpc.111.092155.
- Scheidig A., Fröhlich A., Schulze S., Lloyd J.R., Kossmann J. Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J*. 2002;30(5):581-591. DOI 10.1046/j.1365-313x.2002.01317.x.
- Schönhals E.M., Ding J., Ritter E., Paulo J.M., Cara N., Tacke E., Hoferbert H.R., Lübeck J., Strahwald J., Gebhardt C. Physical mapping of QTL for tuber yield, starch content and starch yield in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) by means of genome wide genotyping by sequencing and the 8.3 K SolCAP SNP array. *BMC Genomics*. 2017;18:642. DOI 10.1186/s12864-017-3979-9.
- Schwall G.P., Safford R., Westcott R.J., Jeffcoat R., Tayal A., Shi Y.C., Gidley M.J., Jobling S.A. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nat. Biotechnol.* 2000;18(5):551-554. DOI 10.1038/75427.
- Seung D., Boudet J., Monroe J., Schreier T.B., David L.C., Abt M., Lu K.J., Zanella M., Zeeman S.C. Homologs of PROTEIN TARGETING TO STARCH control starch granule initiation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*. 2017;29(7):1657-1677. DOI 10.1105/tpc.17.00222.
- Seung D., Soyk S., Coiro M., Maier B.A., Eicke S., Zeeman S.C. PROTEIN TARGETING TO STARCH is required for localising GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE to starch granules and for normal amylose synthesis in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 2015;13(2):e1002080. DOI 10.1371/journal.pbio.1002080.
- Sonnenwald S., Sonnenwald U. Regulation of potato tuber sprouting. *Planta*. 2014;239(1):27-38. DOI 10.1007/s00425-013-1968-z.
- Sowokinos J.R., Hayes R.J., Thill C.A. Coordinated regulation of cold induced sweetening in tetraploid potato families by isozymes of UDP-glucose pyrophosphorylase and vacuolar acid invertase. *Am. J. Potato Res.* 2018;95:487-494. DOI 10.1007/s12230-018-9653-1.
- Sowokinos J.R., Preiss J. Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*: III. Purification, physical, and catalytic properties of ADPglucose pyrophosphorylase in potatoes. *Plant Physiol.* 1982;69(6):1459-1466. DOI 10.1104/pp.69.6.1459.
- Stein O., Granot D. An overview of sucrose synthases in plants. *Front. Plant Sci.* 2019;10:95. DOI 10.3389/fpls.2019.00095.
- Stinard P.S., Robertson D.S., Schnable P.S. Genetic isolation, cloning, and analysis of a mutator-induced, dominant antimorph of the maize *amylose extender1* locus. *Plant Cell*. 1993;5(11):1555-1566. DOI 10.1105/tpc.5.11.1555.
- Streb S., Delatte T., Umhang M., Eicke S., Schorderet M., Reinhardt D., Zeeman S.C. Starch granule biosynthesis in *Arabidopsis* is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase. *Plant Cell*. 2008;20(12):3448-3466. DOI 10.1105/tpc.108.063487.
- Streb S., Zeeman S.C. Starch metabolism in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book*. 2012;10:e0160. DOI 10.1199/tab.0160.
- Sweetlove L.J., Fernie A.R. The spatial organization of metabolism within the plant cell. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013;64:723-746. DOI 10.1146/annurev-arplant-050312-120233.
- Tauberger E., Fernie A.R., Emmermann M., Renz A., Kossmann J., Willmitzer L., Trethewey R.N. Antisense inhibition of plastidial phosphoglucosyltransferase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate. *Plant J*. 2000;23(1):43-53. DOI 10.1046/j.1365-313x.2000.00783.x.
- Tenorio G., Orea A., Romero J.M., Mérida A. Oscillation of mRNA level and activity of granule-bound starch synthase I in *Arabidopsis* leaves during the day/night cycle. *Plant Mol. Biol.* 2003;51(6):949-958. DOI 10.1023/a:1023053420632.
- Tetlow I.J., Beisel K.G., Cameron S., Makhmoudova A., Liu F., Bresolin N.S., Wait R., Morell M.K., Emes M.J. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol.* 2008;146(4):1878-1891. DOI 10.1104/pp.108.116244.
- Tetlow I.J., Bertoft E. A review of starch biosynthesis in relation to the building block-backbone model. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:7011. DOI 10.3390/ijms21197011.
- Tiessen A., Hendriks J.H.M., Stitt M., Branscheid A., Gibon Y., Faré E.M., Geigenberger P. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell*. 2002;14:2191-2213. DOI 10.1105/tpc.003640.
- Tjaden J., Möhlmann T., Kampfenkel K., Neuhaus E. Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *Plant J*. 2001;16:531-540. DOI 10.1046/j.1365-313x.1998.00317.x.
- Tsai H.-L., Lue W.-L., Lu K.-J., Hsieh M.-H., Wang S.-M., Chen J. Starch synthesis in *Arabidopsis* is achieved by spatial cotranscription of core starch metabolism genes. *Plant Physiol.* 2009;151(3):1582-1595. DOI 10.1104/pp.109.144196.
- Tuncel A., Corbin K.R., Ahn-Jarvis J., Harris S., Hawkins E., Smedley M.A., Harwood W., Warren F.J., Patron N.J., Smith A.M. Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. *Plant Biotechnol. J.* 2019;17(12):2259-2271. DOI 10.1111/pbi.13137.
- Van Harsseelaar J.K., Lorenz J., Senning M., Sonnenwald U., Sonnenwald S. Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genomics*. 2017;18(1):37. DOI 10.1186/s12864-016-3381-z.
- Visser R.G., Somhorst I., Kuipers G.J., Ruys N.J., Feenstra W.J., Jacobsen E. Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol. Gen. Genet.* 1991;225(2):289-296. DOI 10.1007/BF00269861.
- Wang D., Cheng L., Wang Y., Zhang F. Comparative proteomic analysis of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization *in vitro* regulated by IAA. *Am. J. Potato Res.* 2018;95(4):395-412. DOI 10.1007/s12230-018-9640-6.
- Wang X., Xue L., Sun J., Zuo J. The *Arabidopsis BE1* gene, encoding a putative glycoside hydrolase localized in plastids, plays crucial roles during embryogenesis and carbohydrate metabolism. *J. Integr. Plant Biol.* 2010;52:273-288. DOI 10.1111/j.1744-7909.2010.00930.x.
- Weise S.E., Schrader S.M., Kleinbeck K.R., Sharkey T.D. Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phospholytic breakdown of transitory starch. *Plant Physiol.* 2006;141(3):879-886. DOI 10.1104/pp.106.081174.
- Yao D., Gonzales-Vigil E., Mansfield S.D. *Arabidopsis* sucrose synthase localization indicates a primary role in sucrose translocation in phloem. *J. Exp. Bot.* 2020;71(6):1858-1869. DOI 10.1093/jxb/erz539.
- Yu T.S., Lue W.L., Wang S.M., Chen J. Mutation of *Arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol.* 2000;123(1):319-326. DOI 10.1104/pp.123.1.319.

- Yu T.S., Zeeman S.C., Thorneycroft D., Fulton D.C., Dunstan H., Lue W.L., Hegemann B., Tung S.Y., Umemoto T., Chapple A., Tsai D.L., Wang S.M., Smith A.M., Chen J., Smith S.M. α -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. *J. Biol. Chem.* 2005;280(11):9773-9779. DOI 10.1074/jbc.M413638200.
- Zeeman S.C., Kossmann J., Smith A.M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010;61:209-234. DOI 10.1146/annurev-arplant-042809-112301.
- Zhang H., Liu J., Hou J., Yao Y., Lin Y., Ou Y., Song B., Xie C. The potato amylase inhibitor gene *SbAI* regulates cold-induced sweetening in potato tubers by modulating amylase activity. *Plant Biotechnol. J.* 2014;12(7):984-993. DOI 10.1111/pbi.12221.
- Zhang L., Häusler R.E., Greiten C., Hajirezaei M.R., Haferkamp I., Neuhaus H.E., Flügge U.I., Ludewig F. Overriding the co-limiting import of carbon and energy into tuber amyloplasts increases the starch content and yield of transgenic potato plants. *Plant Biotechnol. J.* 2008;6(5):453-464. DOI 10.1111/j.1467-7652.2008.00332.x.
- Zrenner R., Salanoubat M., Willmitzer L., Sonnewald U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 1995;7(1):97-107. DOI 10.1046/j.1365-313x.1995.07010097.x.

ORCID ID

E.M. Sergeeva orcid.org/0000-0001-8234-3063
E.A. Salina orcid.org/0000-0001-8590-847X
A.V. Kochetov orcid.org/0000-0003-3151-5181

Благодарности. Работа выполнена за счет средств бюджетного проекта № 0259-2021-0012.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.10.2021. После доработки 20.12.2021. Принята к публикации 20.12.2021.

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

Прогноз зоны возделывания винограда на европейской территории России в условиях изменения климата

Л.Ю. Новикова , П.В. Озерский

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия
 l.novikova@vir.nw.ru

Аннотация. Потепление климата оказалось существенным фактором для виноградарства и виноделия всех виноградарских районов мира. Многие страны рассматривают продвижение виноградарства на север и в горные районы как возможный путь адаптации к потеплению. Факторы, лимитирующие зону виноградарства в России, определены советским ученым Ф.Ф. Давитая в 1948 г. и актуальны до сих пор. Это сумма активных температур выше 10 °C ($\Sigma T_{10} > 2500$ °C), средний из абсолютных минимумов температуры ($T_{\min} > -35$ °C), продолжительность безморозного периода ($L_{ff} < 150$ сут) и гидротермический коэффициент ($0.5 < ГТК < 2.5$). Значения лимитирующих факторов современной зоны промышленного виноградарства (ЗПВ) соответствуют определенным Ф.Ф. Давитая диапазонам, за исключением T_{\min} , которая в современной ЗПВ на европейской территории России везде выше -26 °C. Целью исследования было определение возможности продвижения на север границ зоны промышленного виноградарства в современных и прогнозируемых климатических условиях европейской территории России. По суточным данным 1980–2019 гг. для 150 метеостанций Росгидромета рассчитали среднесуточные значения, тренды и прогнозы к 2050 г. значений лимитирующих факторов ЗПВ, определили точки, лежащие в допустимом для виноградарства диапазоне. В программе QGIS нанесли точки на карту европейской территории России, определили предельную широту. Были рассмотрены варианты с $T_{\min} > -26$ °C и $T_{\min} > -35$ °C. В 1980–2019 гг. в среднем на европейской территории России наблюдался рост ΣT_{10} , T_{\min} , L_{ff} и снижение ГТК. Однако южнее 55° N в ряде точек прослеживалась тенденция к снижению T_{\min} . Рост теплообеспеченности вегетационного периода на европейской территории России создает предпосылки продвижения промышленного виноградарства к северу от современной предельной широты 46.6° до 51.8° в текущих условиях, а к 2050 г. – до 60.7° N. Кроме того, уже сейчас виноградарство возможно в районе Калининграда (54° N, 20° E). При дополнительных мерах по укрытию на зиму до -35 °C виноградарство возможно до 53.3° N в текущих условиях и до 60.7° N – в прогнозируемых. Возможное снижение минимальной температуры зимы на юге европейской территории России потребует дополнительных мер защиты зимой, а повышение засушливости климата на северо-западном побережье Каспийского моря будет уменьшать площади под неорошаемыми виноградниками.

Ключевые слова: виноградарство; лимитирующие климатические факторы; изменения климата; тренды; прогнозы; ГИС.

Для цитирования: Новикова Л.Ю., Озерский П.В. Прогноз зоны возделывания винограда на европейской территории России в условиях изменения климата. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3): 264-271. DOI 10.18699/VJGB-22-33

Forecast for the zone of viticulture in European Russia under climate change

L.Yu. Novikova , P.V. Ozerski

Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia
 l.novikova@vir.nw.ru

Abstract. Climate warming has turned out to be a significant factor in viticulture and winemaking in all grape-growing areas of the world. Many countries consider the advance of viticulture to the north and to mountainous areas as a possible way to adapt to warming. The factors limiting the zone of viticulture in Russia have been identified by Soviet scientist F.F. Davitaya in 1948, and they are still relevant. They are the sum of active temperatures above 10 °C ($\Sigma T_{10} > 2500$ °C), mean of absolute minimum temperatures ($T_{\min} > -35$ °C), length of the frost-free period ($L_{ff} < 150$ days), and hydrothermal coefficient ($0.5 < HTC < 2.5$). The values of these limiting factors in the present-day zone of commercial viticulture (ZCV) correspond to the ranges defined by F.F. Davitaya, with the exception of T_{\min} , which in the modern ZCV in European Russia is above -26 °C everywhere. The objective of this work was to assess the possibility of moving the boundaries of the ZCV to the north under the existing and predicted climate conditions in European Russia. The 1980–2019 daily data from 150 weather stations of the Federal Service for Hydrometeorology and Environmental Monitoring were used to calculate mean long-term values, trends and

forecasts for 2050 for the ZCV limiting factors and locate the points lying in the range acceptable for viticulture. The QGIS program was applied to plot the points on the European Russia map and mark the terminal latitude. Versions with $T_{\min} > -26^{\circ}\text{C}$ and $T_{\min} > -35^{\circ}\text{C}$ were considered. On average for European Russia, in 1980–2019, there was an increase in ΣT_{10} , T_{\min} , and L_{ff} and a decrease in HTC. However, in the same period, T_{\min} showed a tendency toward decreasing at a number of points at latitudes lower than 55°N . The increase in heat supply during the growing season in European Russia implies a possibility of expanding the ZCV northward, beyond the present-day terminal latitude of 46.6°N , to 51.8°N under the existing conditions, and up to 60.7°N by 2050. In addition, even under the current conditions viticulture is possible in the area of Kaliningrad (54°N , 20°E). Using extra protective measures in winters not colder than -35°C would make it possible to grow grapes at up to 53.3°N under the current conditions and at up to 60.7°N under the prognosticated ones. At the same time, a possible decrease in the minimum winter temperature at the south of European Russia will require additional protective measures in winter, while an increase in the aridity of the climate on the northwest coast of the Caspian Sea will reduce the area under non-irrigated vineyards.

Key words: viticulture; climatic limiting factors; climate change; trends; forecast; GIS.

For citation: Novikova L.Yu., Ozerski P.V. Forecast for the zone of viticulture in European Russia under climate change. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):264–271. DOI 10.18699/VJGB-22-33

Введение

Климатические зоны высококачественного виноградарства и виноделия узки и сильно зависят от изменений климата (Hannah et al., 2013; Mozell, Thach, 2014; Santos et al., 2020). Рост температур более чем на 1°C в период малого климатического оптимума VIII–XIII вв. привел к продвижению границы возделывания винограда в Западной и Центральной Европе к северу на $3\text{--}4^{\circ}$, а начиная с XV в. эта граница сдвинулась к югу (Бараш, 1989; Хромов, Петросянц, 2012). В настоящее время зона виноградарства в Северном полушарии располагается между 30-й и 50-й параллелями, где средняя температура апреля–октября варьирует от 12 до 22°C , что соответствует температурному диапазону $13\text{--}21^{\circ}\text{C}$ для производства вина высокого качества (Schultz, Jones, 2010; Jones, 2012).

Согласно прогнозам, будущее потепление окажет на виноградарство, с одной стороны, благотворное воздействие в результате включения новых территорий, а с другой – создаст серьезные проблемы в районах традиционного виноградарства (Roy et al., 2017; Hewer, Brunette, 2020; Vyshkvarkova, Rybalko, 2021). К 2050 г. по сценарию глобального изменения климата RCP 4.5 прогнозируется уменьшение площадей, пригодных для виноградарства, в основных винодельческих регионах на $19\text{--}62\%$, а по сценарию RCP 8.5 – на $25\text{--}73\%$ (Hannah et al., 2013). Современное изменение климата инициирует смещение зоны промышленного возделывания винограда к северу и в горные регионы (Jones, 2012; Vršič, Vodovnik, 2012; Hannah et al., 2013; Mozell, Thach, 2014; Quénot et al., 2014). Россия относится к странам, для которых потепление может иметь особенно значительные последствия (Houtan et al., 2021).

Для прогнозирования влияния изменений климата на эффективность виноградарства регионов используются оценки климатических ресурсов территории с помощью различных индексов, таких как суммы активных и эффективных температур, биологически активные суммы эффективных температур, индекс Винклера, средняя температура апреля–октября, индекс опасности весенних заморозков, индекс засушливости, индекс холода, гелиотермические индексы Хуглина и Брана, гидротермический коэффициент Селянинова и др. (Lorenzo et al.,

2013; Blanco-Ward et al., 2019; Рыбалко, 2020; Pipan et al., 2021; Vyshkvarkova, Rybalko, 2021). Лимитирующие факторы виноградарства различны в разных эколого-географических условиях. Важнейшее требование культуры винограда предъявляет к температуре и освещенности в период активной вегетации. В засушливых регионах ограничивающим фактором становятся осадки, виноград выращивается на поливе. Вблизи северных границ виноградарства лимитируют зимние условия (Лиховской и др., 2016; Roy et al., 2017).

На основе анализа мировых зон виноградарства в первой трети XX в. Ф.Ф. Давитая (1948) дал комплексную оценку диапазона климатических потребностей винограда, выделив актуальные для СССР характеристики: температура начала и конца вегетации – 10°C ; сумма температур за вегетацию выше 10°C (ΣT_{10}) – больше 2500°C ; тормозящая высокая температура (T_{\max}) – $35\text{--}40^{\circ}\text{C}$; необходимый минимум средней температуры самого теплого месяца ($T_{\text{июля}}$) – $16\text{--}18^{\circ}\text{C}$, для качественного виноделия – $17\text{--}19^{\circ}\text{C}$; продолжительность безморозного периода (L_{ff}) – не менее 150 дней; средний из абсолютных минимумов температуры (T_{\min}) неукрытого виноградарства – до -15°C , при обычных способах защиты от холода – до -35°C ; ГТК от 0.5 до $1.5\text{--}2.5$ (с. 172–174). Эта система показателей актуальна до сих пор (Мищенко, 2009; Roy et al., 2017; Hewer, Brunette, 2020).

Для визуализации географических районов с климатом, в настоящее время или в перспективе пригодным для выращивания тех или иных культур, применяют ГИС-методы (Hannah et al., 2013; Nesbitt et al., 2018). ГИС-методы позволяют также определять и уточнять параметры климатической ниши вида – диапазона агроклиматических параметров, при которых возможно его развитие. Для этого анализируются данные конкретных географических точек, где встречается этот вид (Soberon, Nakamura, 2009; Peterson et al., 2015; Wójtowicz M., Wójtowicz A., 2020).

В России зона промышленного возделывания винограда (ЗПВ) сосредоточена между Черным, Азовским и Каспийским морями и в Крыму; географические координаты: $41.6\text{--}46.6^{\circ}\text{N}$, $32.5\text{--}48.5^{\circ}\text{E}$ (АгроАтлас, 2008) (рис. 1). Диапазон климатических характеристик ЗПВ на европейской территории России (ЕТР) начала XXI в.

находится в определенных Ф.Ф. Давитая (1948) пределах, значительно отступая от них только по одному показателю – минимальной температуре зимы, которая в современной зоне не опускается ниже -26°C (Чистяков, Новикова, 2020). Основным ограничением продвижения культуры на север является T_{\min} , на северо-западное побережье Каспийского моря – низкий ГТК. Если принять возможность возделывания при $T_{\min} > -35^{\circ}\text{C}$, то лимитирующими факторами на севере становятся ΣT_{10} и L_{ff} .

Предметом нашего интереса является продвижение культуры на север, поэтому ограничения, накладываемые температурами выше $35\text{--}40^{\circ}\text{C}$, не рассматривались (Leewen et al., 2013). Температура июля выше 16°C наблюдается на ЕТР южнее $60\text{--}63^{\circ}\text{N}$, этот фактор тоже не является лимитирующим и далее не рассматривается. Таким образом, к лимитирующим факторам ЗПВ на ЕТР при продвижении на север относятся ΣT_{10} , L_{ff} , T_{\min} и ГТК. Недостаток влагообеспеченности (требование ГТК > 0.5) ограничивает неполивное виноградарство на северо-восточном побережье Каспийского моря.

Целью данной работы было определение возможности продвижения на север границ ЗПВ в современных и прогнозируемых климатических условиях ЕТР.

Материалы и метод

Рассмотрена европейская территория России, условно ограниченная 63°N и 60°E . Использована программа QGIS 3.22.0¹. Анализ климата на ЕТР проведен точно, по данным 150 метеостанций Росгидромета с числом лет наблюдений более двадцати в период 1980–2019 гг. Взяты суточные данные из открытого интернет-источника (ВНИИ гидрометеорологической информации)². Для каждой точки за каждый год в программе VITIS TIME SERIES (Новикова, Лебедева, 2019) рассчитаны значения ΣT_{10} , T_{\min} , L_{ff} и ГТК и их тренды за период 1980–2019 гг.

Средние значения 1980–2019 гг. отнесены к 2000 г., рассчитаны индивидуальные для каждой точки прогнозы ΣT_{10} , L_{ff} , T_{\min} и ГТК на 2050 г., определены точки с возможностью возделывания винограда по совокупности требований, предложенных Ф.Ф. Давитая (1948) для укрывного виноградарства и с учетом особенностей современного российского виноградарства с $T_{\min} < -26^{\circ}\text{C}$. В исследовании принят уровень значимости 5 %.

Результаты

Изменения климатических факторов виноградарства на ЕТР в 1980–2019 гг.

В 1980–2019 гг. в среднем на ЕТР наблюдались рост ΣT_{10} , T_{\min} , L_{ff} и снижение ГТК. Усредненный тренд по 150 станциям составил: $\Delta \Sigma T_{10} = 11.52^{\circ}\text{C}/\text{год}$, $\Delta T_{\min} = 0.02^{\circ}\text{C}/\text{год}$, $\Delta L_{\text{ff}} = 0.31 \text{ сут}/\text{год}$, $\Delta \text{ГТК} = -0.01 \text{ ед}/\text{год}$ (см. таблицу).

Сумма активных температур выше 10°C (ΣT_{10}) увеличивалась во всех исследованных точках, при этом в 144 из 150 точек достоверно. В среднем с широтой интенсивность летнего потепления уменьшается, корреляция между скоростью роста ΣT_{10} и широтой $r = -0.51$. Тренды

L_{ff} , T_{\min} и ГТК имели как положительные, так и отрицательные значения (см. таблицу, рис. 1).

При средней по исследованным станциям тенденции к увеличению T_{\min} в 48 точках тренд нулевой или отрицательный. Достоверных трендов T_{\min} всего восемь, из них два отрицательны. С широтой тренд T_{\min} увеличивается ($r = 0.52$), т. е. потепление в зимнее время интенсивнее идет на севере ЕТР. Из 61 точки, расположенной севернее 55°N , отрицательный тренд отмечается только в трех точках (см. рис. 1, б).

Продолжительность безморозного периода (L_{ff}) в среднем увеличивается, однако в 25 точках из 150 исследованных наблюдаются отрицательные тренды. Достоверных трендов всего 40, из них в 39 точках это положительные значения.

При средней тенденции к уменьшению ГТК, обусловленной активным ростом температур и в среднем отсутствием тенденции в изменении осадков, в 8 точках ГТК увеличивался. Тренды ГТК в достоверны в 20 точках, все отрицательны.

Потенциальная зона промышленного виноградарства

В современных климатических условиях, которые определены как средние значения лимитирующих факторов 1980–2019 гг., возделывание винограда без полива и при обычных мерах укрытия на зиму возможно в 36 точках из 150 изученных (рис. 2, а), включая одну точку в районе Калининграда (г. Балтийск, в 1980–2019 гг. $\Sigma T_{10} = 2567^{\circ}\text{C}$, $L_{\text{ff}} = 229 \text{ сут}$, $T_{\min} = -15^{\circ}\text{C}$, ГТК = 1.2). Если прибавить точки, в которых можно компенсировать недостаточное увлажнение (ГТК < 0.5) поливом, то их число достигнет 41 (см. рис. 2, б). Если же добавить области с зимними температурными минимумами до -35°C , то число точек возрастет до 58 (см. рис. 2, в). Теплообеспеченность вегетационного периода на ЕТР создает предпосылки продвижения культуры винограда к северу от современной предельной широты ЗПВ 46.6°N до 51.8°N уже в настоящее время, а при дополнительных мерах по укрытию на зиму до -35°C – возможно, до 53.3°N .

К 2050 г. прогнозируется ухудшение условий перезимовки на юге ЕТР, т. е. в ряде точек минимальная температура зимы опустится ниже -26°C . Но за счет продвижения тепла на север количество точек, пригодных для промышленного возделывания винограда, увеличится до 43, при дополнительных агротехнических мерах – до 56 с включением поливных виноградников (см. рис. 2, д) и до 95 с включением точек с температурами зимой до -35°C (см. рис. 2, е). Рост теплообеспеченности вегетационного периода создает предпосылки продвижения виноградарства к 2050 г. до 60.7°N . В зону виноградарства может войти Санкт-Петербург, для которого к 2050 г. прогнозируются следующие показатели: $\Sigma T_{10} = 2772^{\circ}\text{C}$, $T_{\min} = -18^{\circ}\text{C}$, $L_{\text{ff}} = 191 \text{ сут}$, ГТК = 1.4. Без побережья Балтийского моря самая северная прогнозируемая точка имеет широту 58.1°N .

Обсуждение

Темпы изменения климата и аномальность урожаев важнейших сельскохозяйственных культур в мире нарастают (Jägermeier et al., 2021). Однако изменение агроклиматических показателей имеет региональную специфику (Сиро-

¹ QGIS. Свободная географическая информационная система с открытым кодом. <https://qgis.org/ru/site> (дата обращения: 20.08.2021).

² ВНИИ гидрометеорологической информации – мировой центр данных. <http://www.meteo.ru> (дата обращения: 07.06.2020).

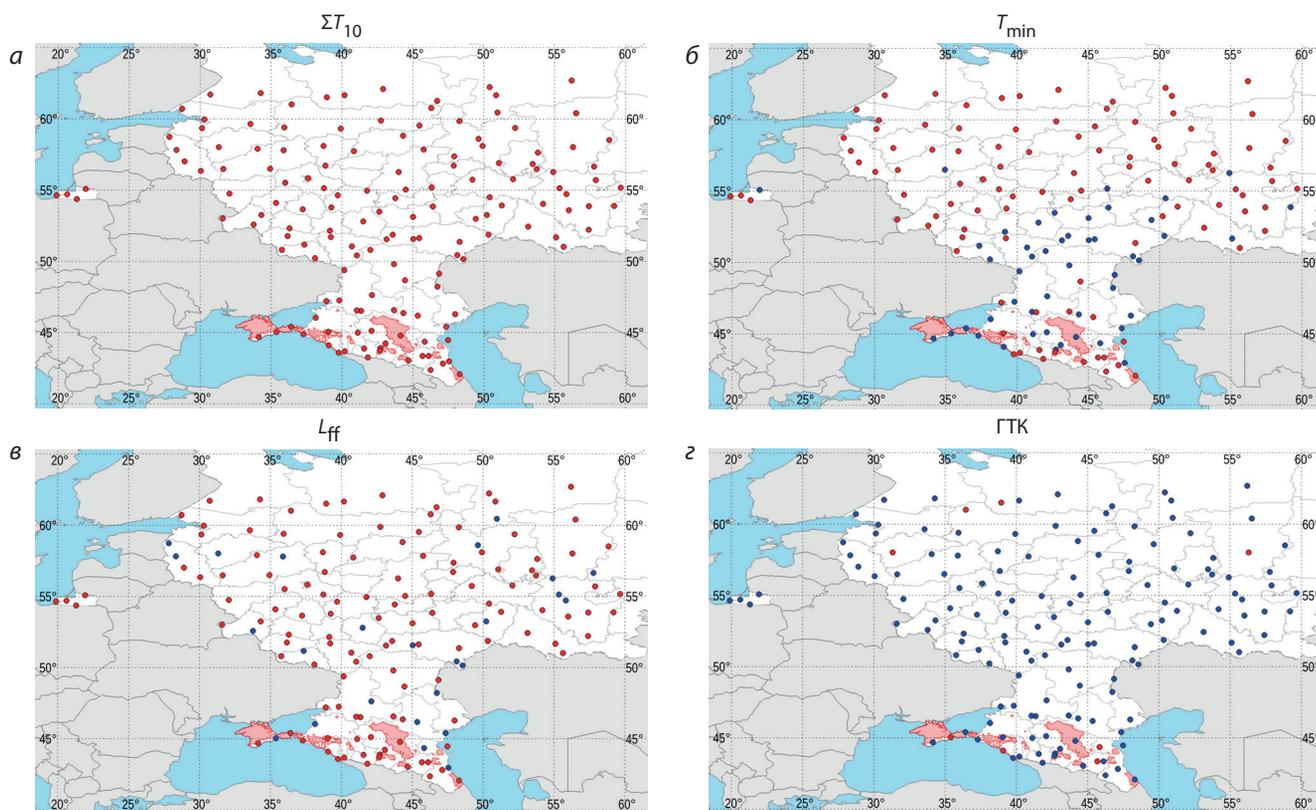


Рис. 1. Тренды лимитирующих факторов винограда на 150 метеостанциях европейской территории России: а – сумма температур выше 10 °С; б – абсолютный минимум температуры; в – продолжительность безморозного периода; г – ГТК.

Красные точки – тренды положительные, синие – тренды нулевые или отрицательные. Заштрихована зона промышленного виноградарства на начало XXI в. Карта взята с ресурса АгроАтлас (АгроАтлас, 2008), модифицирована.

Тренды лимитирующих факторов зоны промышленного виноградарства на 150 метеостанциях европейской территории России в 1980–2019 гг.

Показатель	Среднее			Тренд, ед/год		
	Среднее	Min	Max	Среднее	Min	Max
Сумма активных температур выше 10 °С	2533.8	365.1	4333.1	11.52	0.62	25.01
Средний абсолютный минимум температуры, °С	-27.4	-40.2	-4.6	0.02	-0.16	0.19
Продолжительность безморозного периода, сут	156.7	79.7	295.3	0.31	-0.57	1.19
ГТК	1.2	0.3	3.7	-0.01	-0.02	0.01

тенко и др., 2013; Newer, Brunette, 2020), что подтвердило и наше исследование. С 1970-х гг. во всех регионах ЕТР увеличиваются суммы активных температур, причем активнее на юге, но температура января быстрее растет в северных широтах. Суммы осадков имеют как положительные, так и отрицательные тенденции (Сиротенко и др., 2013). Темп изменений увеличился в начале XXI в. Так, в 1975–2004 гг. ГТК уменьшался на большей части ЕТР, за исключением нескольких регионов, а в 1980–2019 гг. мы видим реализацию прогнозов о росте засушливости на всей ЕТР (Сиротенко, Павлова, 2009). Потепление сопровождается увеличением нестабильности климата.

В 2007 г. прогнозировалось уменьшение количества зим с критическими понижениями температуры воздуха (Кокорин, Кураев, 2007), а по данным 1980–2019 гг. минимальная температура и количество опасных морозов зимой не уменьшаются, несмотря на повышение среднезимней температуры. Тенденция к повышению частоты экстремальных явлений, снижению абсолютного минимума годовой температуры отмечается во многих регионах мира на фоне общего потепления (Vucur et al., 2019).

Исследование изменений климата вблизи северной границы зоны промышленного виноградарства ЕТР – на Донской ампелографической коллекции им. Я.И. Пота-

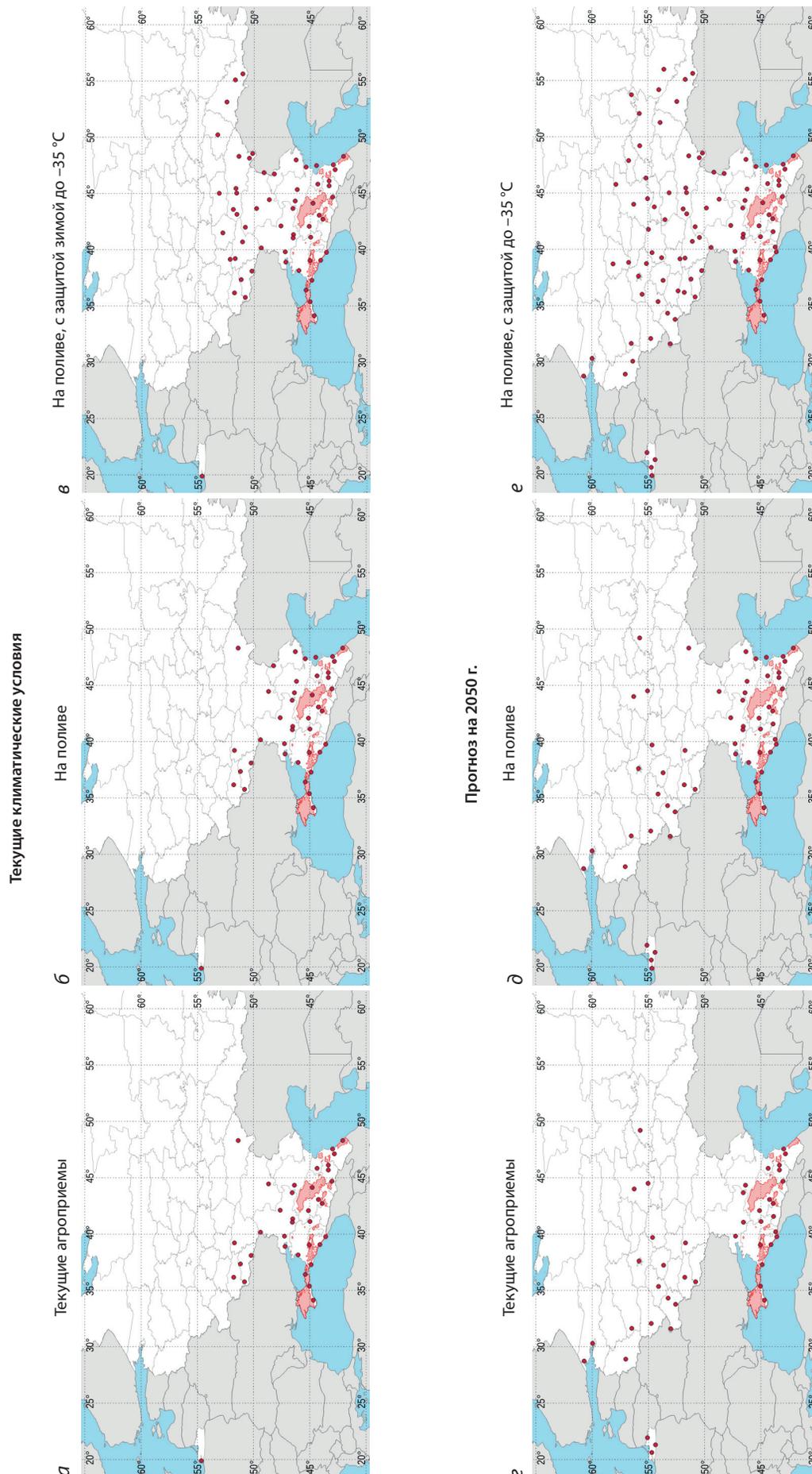


Рис. 2. Точки европейской территории России, в которых климатические условия пригодны для возделывания винограда с практикующей агротехникой (а, г), на полове (б, д), с укрытием зимой до -35°C (в, е) в современных условиях и к 2050 г. Заштрихована зона промышленного возделывания на начало XXI в.

пенко – также показало, что в 1981–2017 гг. увеличивалась сумма температур выше 10 °С (на 170 °С/10 лет), уменьшалась сумма осадков за период активной вегетации (на 21 мм/10 лет), росла средняя температура периода зимнего покоя (на 0.5 °С/10 лет) и продолжительность безморозного периода (на 0.7 сут/год). При этом количество суток за зиму с температурами ниже –20 °С и минимальная температура зимы не менялись (Новикова, Наумова, 2018; Novikova, Naumova, 2019).

Оценки климатических требований винограда, проведенные Ф.Ф. Давитая в 1930-х гг. на основе мирового опыта виноградарства, оказались актуальными для ЕТР и на начало XXI в. Несмотря на то что существуют сорта с температурными потребностями 2100 °С и ниже (Мищенко, 2009; Наумова, Новикова, 2015), ЗПВ на ЕТР ограничена значением 2500 °С, что объясняется необходимостью обеспеченности 80–90 % лет нужными сорту суммами температур для рентабельного сельского хозяйства (Лосев, Журина, 2004). Наблюдается совпадение диапазонов и остальных климатических факторов, за исключением минимальной температуры зимы, которая в современной ЗПВ на ЕТР составляет –26 °С, что выше указанной Ф.Ф. Давитая величины –35 °С. Близки к оценкам Ф.Ф. Давитая значения лимитирующих факторов зоны виноградарства в канадской провинции Квебек: $L_{ff} > 150$ сут, сумма эффективных температур (degree days, DD) выше 10 °С за апрель–октябрь $DD_{10} > 900$ °С, $T_{min} > -34$ °С, ежегодное число очень холодных (ниже –22 °С) дней – меньше 30 (Roy et al., 2017). Канадские исследователи (Hewer, Brunette, 2020) ранжируют территории по минимальной температуре зимы по степени пригодности для виноградарства: –34...–30 °С – мало подходящие условия, –30...–27 °С – средние, –27...–22 °С – хорошие, выше –22 °С – очень хорошие. Таким образом, рассмотренные варианты с температурными пределами $T_{min} > -35$ °С и $T_{min} > -26$ °С отвечают разной степени риска и экономической эффективности виноградарства. Приводимая Ф.Ф. Давитая граница $T_{min} > -35$ °С, возможно, соответствует любительскому виноградарству.

Современные изменения климата влияют на все признаки винограда (Vršič, Vodovnik, 2012; Novikova, Naumova, 2019, 2020) и требуют адаптации виноградарства и виноделия во всех виноградарских районах мира (White et al., 2006; Schultz, Jones, 2010; Jones, 2012; Hannah et al., 2013; Quénot et al., 2014; Bardaji, Iraizoz, 2015). Многие страны рассматривают продвижение на север и в горные районы как вероятный путь адаптации виноградарства к потеплению (White et al., 2006; Hannah et al., 2013; Schultze et al., 2016; Tóth, Végrári, 2016; Roy et al., 2017; Vyshkvarkova, Rybalko, 2021). Наши расчеты показали, что на ЕТР возможно существенное продвижение виноградарства к северу по сравнению с текущей широтой 46.6° N: уже при существующих сегодня климатических условиях можно возделывать виноград в районе Калининграда, а к 2050 г. – и в Ленинградской области. Напомним, что в максимум потепления XII–XIII вв. виноградарство было развито на Балтийском побережье, а также в Англии (Хромов, Петросянц, 2012).

В то же время тренды 1980–2019 гг. показывают снижение минимальной зимней температуры в южных регионах

ЕТР, что может сделать здесь виноградарство менее прибыльным из-за необходимости дополнительных мер по укрытию на зиму.

Для основных виноградарских регионов мира уменьшение осадков и рост высоких температур (Biasi et al., 2019; Santos et al., 2020) становятся факторами риска и увеличивают потребность в орошении (Hall et al., 2016; Chrysargyris et al., 2020). Снижение ГТК на всей ЕТР ограничивает неполивное виноградарство к северу от Каспийского моря, где засушливость климата будет усиливаться. Для остальной части ЕТР условия влагообеспеченности остаются благоприятными. Исследование крымских коллег подтверждает, что виноградарство в районе Севастополя в XXI в. будет возможно без орошения, но виноградные лозы могут испытывать дефицит влаги (Vyshkvarkova et al., 2021).

Краткосрочные адаптационные меры должны быть сосредоточены на конкретных угрозах, главным образом на изменениях в практике управления растениеводством (например, орошение, солнцезащитные средства для защиты листьев). Далее изменение состава и вкуса винограда и вина вызовет корректировку регионального сортимента, стиля виноделия (Mira de Orduña, 2010; Fraga, Santos, 2017). Рост теплообеспеченности инициирует продвижение виноградарства в северные и горные регионы.

Мы не рассматривали отрицательное влияние роста высоких температур, так как южная граница ЗПВ в России лежит на широте 41.6° N, что выше южной границы мирового виноградарства (30° N). Однако в перспективе сохраняется опасность избыточно высоких температур на юге ЗПВ. Кроме того, не рассмотрен важнейший вопрос соответствия качества почв ЕТР потребностям виноградарства. Эти аспекты требуют дополнительного исследования.

Заключение

Рост теплообеспеченности вегетационного периода на европейской территории России создает предпосылки для продвижения культуры винограда к северу от современной предельной широты 46.6° N до 51.8° N, а к 2050 г. – до 60.7° N. Кроме того, уже в сложившихся условиях виноградарство возможно в районе Калининграда (54° N, 20° E). При дополнительных мерах по укрытию на зиму до –35 °С потенциальная зона виноградарства достигает 53.3° N в текущих и 60.7° N в прогнозируемых условиях. Повышение засушливости климата на северо-западном побережье Каспийского моря будет уменьшать площади под неорошаемыми виноградниками. Вероятное снижение минимальной температуры зимы на юге ЕТР потребует дополнительных мер защиты зимой.

Список литературы / References

- АгроАтлас. Агроэкологический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их болезни, вредители и сорные растения. 2008. [Электронный ресурс]. <http://www.agroatlas.ru/en/index.html> (дата обращения: 20.08.2021).
- [AgroAtlas. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds. 2008. [Electronic resource]. <http://www.agroatlas.ru/en/index.html> (Accessed August 20, 2021).

- Бараш С.И. История неурожаев и погоды в Европе. Л.: Гидрометеоздат, 1989.
[Barash S.I. History of Bad Harvests and Weather in Europe. Leningrad: Hydrometeoizdat Publ., 1989. (in Russian)]
- Давитая Ф.Ф. Климатические зоны винограда в СССР. М.: Пищепромиздат, 1948.
[Davitaya F.F. Climatic Zones of Grapes in the USSR. Moscow: Pishchepromizdat Publ., 1948. (in Russian)]
- Кокорин А.О., Кураев С.Н. Обзор доклада Николааса Стерна «Экономика изменения климата». М.: WWF России, 2007.
[The Economics of Climate Change. The Stern Review. Nicholas Stern. Cabinet Office – HM Treasury, UK, 2006].
- Лиховской В.В., Зленко В.А., Волынкин В.А., Олейников Н.П., Полулях А.А., Васильк И.А., Трошин Л.П. Морозоустойчивость крымских абортгенных сортов винограда и их гибридов. *Науч. журн. КубГАУ*. 2016;117(03):681-694.
[Likhovskoi V.V., Zlenko V.A., Volinkin V.A., Oleinikov N.P., Polylyah A.A., Vasylyk I.A., Troshin L.P. Frost resistance of Crimean indigenous grape varieties and their hybrids. *Nauchnyy Zhurnal KubGAU = Scientific Journal of KubSAU*. 2016;117(03):681-694. (in Russian)]
- Лосев А.П., Журина Л.Л. Агрометеорология. М.: КолосС, 2004.
[Losev A.P., Zhurina L.L. Agrometeorology. Moscow: KolosS Publ., 2004. (in Russian)]
- Мищенко З.А. Агроклиматология. Киев: КНТ, 2009.
[Mishchenko Z.A. Agro-climatology. Kiev: KNT Publ., 2009. (in Russian)]
- Наумова Л.Г., Новикова Л.Ю. Температурный анализ межфазных периодов сортов винограда коллекции ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко. *Виноделие и виноградарство*. 2015;5:46-50.
[Naumova L.G., Novikova L.Yu. Temperature analysis of interphase periods of grape varieties of the collection of the All-Russian Scientific Research Institute of Viticulture and Winemaking named after Ya.I. Potapenko. *Vinodelie i Vinogradarstvo = Wine-making and Viticulture*. 2015;5:46-50. (in Russian)]
- Новикова Л.Ю., Лебедева Е.Г. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Программа для прогнозирования реакции сортов винограда на изменения климата VITIS TIME SERIES». RU 2019664805 от 13 ноября 2019 г. Оpubл. 2019. Бюл. 11.
[Novikova L.Yu., Lebedeva E.G. Certificate of state registration of the computer program 'Program for predicting the reaction of grape varieties to climate change VITIS TIME SERIES' No. 2019664805 dated November 13, 2019. (in Russian)]
- Новикова Л.Ю., Наумова Л.Г. Регрессионный анализ зимостойкости сортов винограда Донской ампеолографической коллекции им. Я.И. Потапенко. *Магарач. Виноградарство и виноделие*. 2018;4:59-61.
[Novikova L.Yu., Naumova L.G. Regression analysis of winter hardiness of grape cultivars from Ya.I. Potapenko Don ampelographic collection. *Magarach. Vinogradarstvo i Vinodelie = Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2018;4:59-61. (in Russian)]
- Рыбалко Е.А. Климатические индексы в виноградарстве. *Магарач. Виноградарство и виноделие*. 2020;22(1):26-28. DOI 10.35547/iM.2020.22.1.005.
[Rybalco E.A. Climatic indices in viticulture. *Magarach. Vinogradarstvo i Vinodelie = Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2020;22(1):26-28. DOI 10.35547/iM.2020.22.1.005. (in Russian)]
- Сиротенко О.Д., Абашина Е.В., Павлова В.Н. Динамика климатообусловленных изменений теплообеспеченности, увлажненности и продуктивности земельной зоны России. *Труды ФГБУ ВНИИСХМ*. 2013;38:41-53.
[Sirotenko O.D., Abashina E.V., Pavlova V.N. Dynamics of climate-conditioned changes in heat supply, moisture content and productivity of the agricultural zone of Russia. *Trudy FGBU VNIISHM = Proceedings of the FSBI VNIISHM*. 2013;38:41-53. (in Russian)]
- Сиротенко О.Д., Павлова В.Н. Влияние изменений климата на сельское хозяйство. В: Развитие сельскохозяйственной метеорологии в России. Обнинск, 2009;168-175.
[Sirotenko O.D., Pavlova V.N. The impact of climate change on agriculture. In: Development of Agricultural Meteorology in Russia. Obninsk, 2009;168-175. (in Russian)]
- Хромов С.П., Петросянц М.А. Метеорология и климатология. М.: Изд-во МГУ, 2012.
[Khromov S.P., Petrosyants M.A. Meteorology and Climatology. Moscow: Moscow State University Publ., 2012. (in Russian)]
- Чистяков П.Н., Новикова Л.Ю. Оценка возможности продвижения на север зоны возделывания винограда на ЕТР. В: Материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием «Вклад агрофизики в решение фундаментальных задач сельскохозяйственной науки», Санкт-Петербург, 1–2 окт. 2020 г. СПб.: ФГБНУ АФИ, 2020; 275-281.
[Chistyakov P.N., Novikova L.Yu. Evaluation of the possibility of moving northward of the zone of grape cultivation in the ETR. In: Book of abstracts of the All-Russian sci. conf. with international participation "Contribution of Agrophysics to Solving Fundamental Problems of Agricultural Science", St. Petersburg, October 1–2, 2020. St. Petersburg: FGBNU AFI, 2020;275-281. (in Russian)]
- Bardaji I., Iraizoz B. Uneven responses to climate and market influencing the geography of high-quality wine production in Europe. *Reg. Environ. Change*. 2015;15:79-92. DOI 10.1007/s10113-014-0623-y.
- Biasi R., Brunori E., Ferrara C., Salvati L. Assessing impacts of climate change on phenology and quality traits of *Vitis vinifera* L.: the contribution of local knowledge. *Plants*. 2019;8:121. DOI 10.3390/plants8050121.
- Blanco-Ward D., Ribeiro A.C., Barreales D., Castro J., Verdial J., Feliciano M., Viceto C., Rocha A., Carlos C., Silveira C., Miranda A. Climate change potential effects on grapevine bioclimatic indices: a case study for the Portuguese demarcated Douro Region (Portugal). *BIO Web of Conf.* 2019;12:01013. DOI 10.1051/bioconf/20191201013.
- Bucur G.M., Cojocar G., Antocea A.O. The climate change influences and trends on the grapevine growing in Southern Romania: a long-term study, 42nd World Congress of Vine and Wine. *BIO Web Conf.* 2019;15:01008. DOI 10.1051/bioconf/20191501008.
- Chrysargyris A., Xylia P., Litskas V., Stavrinides M., Heyman L., De-meestere K., Höfte M., Tzortzakis N. Assessing the impact of drought stress and soil cultivation in Chardonnay and Xynisteri grape cultivars. *Agronomy*. 2020;10:670. DOI 10.3390/agronomy10050670.
- Fraga H., Santos J.A. Daily prediction of seasonal grapevine production in the Douro wine region based on favourable meteorological conditions. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2017;23:296-304. DOI 10.1111/ajgw.12278.
- Hall A., Mathews A.J., Holzapfel B. Potential effect of atmospheric warming on grapevine phenology and post-harvest heat accumulation across a range of climates. *Int. J. Biometeorol.* 2016;60(9):1405-1422. DOI 10.1007/s00484-016-1133-z.
- Hannah L., Roehrdanz P.R., Ikegami M., Shepard A.V., Shaw M.R., Tabor G., Zhi L., Marquet P.A., Hijmans R.J. Climate change, wine, and conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013;110(17):6907-6912. DOI 10.1073/pnas.1210127110.
- Hewer M., Brunette M. Climate change impact assessment on grape and wine for Ontario, Canada's appellations of origin. *Reg. Environ. Change*. 2020;20(3):86. DOI 10.1007/s10113-020-01673-y.
- Houtan K.S., Tanaka K.R., Gagné T.O., Becker S.L. The geographic disparity of historical greenhouse emissions and projected climate change. *Sci. Adv.* 2021;7:eabe4342. DOI 10.1126/sciadv.abe4342.
- Jägermeyr J., Müller C., Ruane A.C., Elliott J., Balkovic J., Castillo O., Faye B., Foster I., Folberth C., Franke J.A., Fuchs K., Guarin J.R., Heinke J., Hoogenboom G., Iizumi T., Jain A.K., Kelly D., Khabarov N., Lange S., Lin T.-S., Liu W., Mialyk O., Minoli S., Moyer E.J., Okada M., Phillips M., Porter C., Rabin S.S., Scheer C., Schneider J.M., Schyns J.F., Skalsky R., Smerald A., Stella T., Stephens H., Webber H., Zabel F., Rosenzweig C. Climate impacts on global agriculture emerge earlier in new generation of climate and crop models. *Nat. Food*. 2021;2:873-885. DOI 10.1038/s43016-021-00400-y.

- Jones G. Climate, grapes, and wine: structure and suitability in a changing climate. *Acta Hort.* 2012;931:19-28. DOI 10.17660/ActaHortic.2012.931.1.
- Leewen C., Schultz H., de Cortazar-Atauri I.G., Duchêne E., Ollat N., Pieri P., Bois B., Goutouly J.-P., Quénel H., Touzard J.-M., Malheiro A.C., Bavaresco L., Delrot S. Why climate change will not dramatically decrease viticultural suitability in main wine-producing areas by 2050. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013;110(33):3051-3052. DOI 10.1073/pnas.1307927110.
- Lorenzo M.N., Taboada J.J., Lorenzo J.F., Ramos A.M. Influence of climate on grape production and wine quality in the Rías Baixas, north-western Spain. *Reg. Environ. Change.* 2013;13:887-896. DOI 10.1007/s10113-012-0387-1.
- Mira de Orduña R. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* 2010;43:1844-1855. DOI 10.1016/j.foodres.2010.05.001.
- Mozell M.R., Thach L. The impact of climate change on the global wine industry: challenges & solutions. *Wine Econ. Policy.* 2014;3(2):81-89. DOI 10.1016/j.wep.2014.08.001.
- Nesbitt A., Dorling S., Lovett A. A suitability model for viticulture in England and Wales: opportunities for investment, sector growth and increased climate resilience. *J. Land Use Sci.* 2018;13(4):414-438. DOI 10.1080/1747423X.2018.1537312.
- Novikova L.Yu., Naumova L.G. Structuring ampelographic collections by phenotypic characteristics and comparing the reaction of grape varieties to climate change. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2019;23(6):772-779. DOI 10.18699/VJ19.551.
- Novikova L.Y., Naumova L.G. Dependence of fresh grapes and wine taste scores on the origin of varieties and weather conditions of the harvest year in the northern zone of industrial viticulture in Russia. *Agronomy.* 2020;10(10):1613. DOI 10.3390/agronomy10101613.
- Peterson A.T., Papeş M., Soberón J. Mechanistic and correlative models of ecological niches. *Eur. J. Ecol.* 2015;1(2):28-38. DOI 10.1515/eje-2015-0014.
- Pipan P., Hall A., Rogiers S.Y., Holzapfel B.P. Accuracy of interpolated versus in-vineyard sensor climate data for heat accumulation modeling of phenology. *Front. Plant Sci.* 2021;12:635299. DOI 10.3389/fpls.2021.635299.
- Quénel H., Grosset M., Barbeau G., van Leeuwen C., Hofmann M., Foss C., Irimia L., Rochard J., Boulanger J.-P., Tissot C., Miranda C. Adaptation of viticulture to climate change: high resolution observation of adaptation scenario for viticulture: the ADVICLIM European project. *Bull. de l'OIV.* 2014;87(1001-1002-1003):395-406.
- Roy P., Grenier P., Barriault E., Logan T., Blondlot A., Bourgeois G., Chaumont D. Probabilistic climate change scenarios for viticultural potential in Québec. *Clim. Change.* 2017;143(1):43-58. DOI 10.1007/s10584-017-1960-x.
- Santos J.A., Fraga H., Malheiro A.C., Moutinho-Pereira J., Dinis L.-T., Correia C., Moriondo M., Leolini L., Dibari C., Costafreda-Aumedes S., Kartschall T., Menz C., Molitor D., Junk J., Beyer M., Schultz H.R. A review of the potential climate change impacts and adaptation options for European viticulture. *Appl. Sci.* 2020;10(9):3092. DOI 10.3390/app10093092.
- Schultz H.R., Jones G.V. Climate induced historic and future changes in viticulture. *J. Wine Res.* 2010;21:137-145. DOI 10.1080/09571264.2010.530098.
- Schultze S.R., Sabbatini P., Luo L. Effects of a warming trend on cool climate viticulture in Michigan, USA. *SpringerPlus.* 2016;5(1):1119. DOI 10.1186/s40064-016-2777-1.
- Soberon J., Nakamura M. Niches and distributional areas: concepts, methods and assumptions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106:19644-19650. DOI 10.1073/pnas.0901637106.
- Tóth J.P., Végvári Z. Future of wine grape growing regions in Europe. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2016;22:64-72. DOI 10.1111/ajgw.12168.
- Vršič S., Vodovnik T. Reactions of grape varieties to climate changes in North East Slovenia. *Plant Soil Environ.* 2012;58(1):34-41. DOI 10.17221/352/2011-PSE.
- Vyshkvarikova E., Rybalko E. Forecast of changes in air temperatures and heat indices in the Sevastopol region in the 21st century and their impacts on viticulture. *Agronomy.* 2021;11:954. DOI 10.3390/agronomy11050954.
- Vyshkvarikova E., Rybalko E., Marchukova O., Baranova N. Assessment of the current and projected conditions of water availability in the Sevastopol region for grape growing. *Agronomy.* 2021;11(8):1665. DOI 10.3390/agronomy11081665.
- White M.A., Diffenbaugh N.S., Jones G.V., Pal J.S., Giorgi F. Extreme heat reduces and shifts United States premium wine production in the 21st century. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103:11217-11222. DOI 10.1073/pnas.0603230103.
- Wójtowicz M., Wójtowicz A. The effect of climate change on linoleic fatty acid in oilseed rape. *Agronomy.* 2020;10(12):2003. DOI 10.3390/agronomy10122003.

ORCID ID

L.Yu. Novikova orcid.org/0000-0003-4051-3671
P.V. Ozerski orcid.org/0000-0001-7627-5412

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ВИР по теме № 0481-2022-0004 «Совершенствование подходов и методов *ex situ* сохранения идентифицированного генофонда вегетативно размножаемых культур и их диких родичей, разработка технологий их эффективного использования в селекции».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.11.2021. После доработки 14.01.2022. Принята к публикации 16.01.2022.

Transmission of potato spindle tuber viroid between *Phytophthora infestans* and host plants

O.S. Afanasenko , A.V. Khiutti, N.V. Mironenko, N.M. Lashina

All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia
 olga.s.afan@gmail.com

Abstract. Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is a naked, circular, single-stranded RNA (356–363 nucleotides in length) which lacks any protein-coding sequences. It is an economically important pathogen and is classified as a high-risk plant quarantine disease. Moreover, it is known that PSTVd is mechanically transmitted by vegetative plant propagation through infected pollen, and by aphids. The aim of this study is to determine the possibility of viroid transmission by potato pathogen *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. PSTVd-infected (strain VP87) potato cultivars Gala, Colomba, and Riviera were inoculated with *P. infestans* isolate PiVZR18, and in 7 days, after the appearance of symptoms, re-isolation of *P. infestans* on rye agar was conducted. RT-PCR diagnostics of PSTVd in a mixture of mycelia and sporangia were positive after 14 days of cultivation on rye agar. The PSTVd-infected *P. infestans* isolate PiVZR18v+ was used to inoculate the healthy, viroid-free plants of potato cv. Gala and tomato cv. Zagadka. After 60 days, an amplification fragment of PSTVd was detected in the tissues of one plant of tomato cv. Zagadka by RT-PCR with the primer set P3/P4, indicating successful transmission of PSTVd by *P. infestans* isolate PiVZR18v+. This result was confirmed by sequencing of the RT-PCR amplicon with primers P3/P4. The partial sequence of this amplicon was identical (99.5 %) to PSTVd strain VP87. RT-PCR showed the possibility of viroid stability in a pure culture of *P. infestans* isolate PiVZR18v+ after three consecutive passages on rye agar. PSTVd was not detected after the eighth passage on rye agar in *P. infestans* subculture. These results are initial evidence of potato viroid PSTVd being bidirectionally transferred between *P. infestans* and host plants.

Key words: potato; tomato; PSTVd strains; transmission; *Phytophthora infestans*; RT-PCR detection.

For citation: Afanasenko O.S., Khiutti A.V., Mironenko N.V., Lashina N.M. Transmission of potato spindle tuber viroid between *Phytophthora infestans* and host plants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):272-280. DOI 10.18699/VJGB-22-34

Трансмиссия вириода веретеновидности клубней картофеля между *Phytophthora infestans* и растениями-хозяевами

О.С. Афанасенко , А.В. Хютти, Н.В. Мироненко, Н.М. Лашина

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия
 olga.s.afan@gmail.com

Аннотация. Виرويد веретеновидных клубней картофеля (ВВКК) представляет собой кольцевую одноцепочечную РНК длиной 356–363 нуклеотида, в которой отсутствуют какие-либо последовательности, кодирующие белок. ВВКК является экономически значимым заболеванием картофеля, имеющим статус карантинного. Известно, что ВВКК передается механически при вегетативном размножении растений, через инфицированную пыльцу и с помощью тлей. Целью данного исследования было определение возможности передачи ВВКК (штамм VP87) от растений картофеля и томата, зараженных вириодом, патогену *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и от *P. infestans* – растениям картофеля и томата. Сорта картофеля Гала, Коломба и Ривьера, инфицированные ВВКК, инокулировали изолятом *P. infestans* PiVZR18; через 7 дней после появления симптомов фитофтороза провели повторное выделение *P. infestans* в чистую культуру на ржаной агар. Через 14 дней культивирования *P. infestans* на ржаном агаре в смеси мицелия и спорангиев методом ОТ-ПЦР был обнаружен ВВКК. ВВКК-инфицированным изолятом *P. infestans* (PiPSTVdv+) провели инокуляцию растений томата сорта Загадка и растений картофеля сорта Гала. Через 60 дней в листьях томата сорта Загадка методом ОТ-ПЦР с праймерами P3/P4 был выявлен диагностический продукт амплификации 360 п.о., свидетельствующий об успешной трансмиссии ВВКК изолятом PiVZR18v+. Результаты были подтверждены секвенированием продукта амплификации ВВКК. Нуклеотидная последовательность вириода в растении томата, зараженном изолятом PiVZR18v+, оказалась на 99.5 % идентичной использованному в эксперименте штамму VP87. Для доказательства возможности сохранения вириода в чистой культуре *P. infestans* изолят PiVZR18v+ пассировали на ржаном агаре с интервалом 30 дней. После трех последовательных пассажей на ржаном агаре ВВКК был диагностирован в культуре изолята, что подтверждено секвенированием продукта

амплификации с вириод-специфичными праймерами. В субкультуре *P. infestans* после восьмого пассажа на ржаном агаре ВВКК не обнаруживался. Полученные данные свидетельствуют о двунаправленной передаче ВВКК в патосистеме *P. infestans* – растение-хозяин.

Ключевые слова: картофель; томаты; штаммы ВВКК; трансмиссия; *Phytophthora infestans*; ОТ-ПЦР-диагностика.

Introduction

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) is an economically important pathogen, classified as a high-risk plant quarantine disease. According to the European Plant Protection Organization (EPPO), the disease has been reported in 37 countries on all continents (<https://gd.eppo.int/taxon/PSTVD0/distribution>). In Russia, and other former Soviet Union regions, PSTVd was detected in about 50–70 % of *in vitro* potato plants (Kastalyeva et al., 1992).

Natural infections of PSTVd have been found in the field, mainly in solanaceous crops, such as pepino (Puchta et al., 1990), potato (Diener, Raymer, 1969), and tomato (Puchta et al., 1990). Potato plants infected with PSTVd become smaller and show leaf yellowing, and infected tubers become smaller and cracked. The reduction in tuber weight depends on the viroid strain, potato cultivar, and length of time they have been infected with PSTVd (Pfannenstiel, Slack, 1980). Furthermore, a reduction in tuber yield of up to 24 % has been reported in cultivar Saco infected with mild strains of PSTVd, however, severe strain reduced the yield by up to 64 % (Singh R.P., 1970). In addition to direct losses, it is important to take into account indirect losses that can be significant due to the quarantine status.

PSTVd belongs to Family Pospiviroidae (IPOSPP), Genus *Pospiviroid* (IPOSPG) and consists of a naked, circular, single-stranded RNA (356–363 nucleotides in length) – the smallest among plant pathogens lacking a protein-coding ability – therefore, it is a parasite of the host transcription mechanism (Yanagisawa et al., 2019).

PSTVd has a wide host range of at least 138 species across 10 families (Singh R.P., 1973). The main hosts are from the Solanaceae family (Owens et al., 1992; Mertelik et al., 2010; Mackie et al., 2016). PSTVd is transmitted mechanically (Verhoeven, Roenhorst, 2010), by aphids (Syller et al., 1997). Moreover, it was found to be vertically transmitted through pollen to progeny seeds on potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*S. lycopersicum*) and horizontally transmitted through infected pollen to other potato and tomato plants (Kryczyński et al., 1988; Singh R.P. et al., 1992; Matsushita, Yanagisawa, 2018).

Viruses are common in fungi and oomycetes and some of these viruses share sequence identities with plant viruses belonging to different families and genera (Mascia et al., 2019). There are several examples of plant–virus transmission by phytopathogenic fungi and oomycetes. It was shown that soil-inhabiting fungi *Olpidium brassicae* and *O. radicale* belonging to Chytridiales and *Polymyxa graminis*, *Spongospora subterranean*, and *Synchytrium endobioticum* – belonging to the order Plasmodiophorales – transmit plant viruses (Bhat, Rao, 2020). Replications of the tobacco mosaic virus were demonstrated in the phytopathogenic fungi *Colletotrichum acutatum*, *C. clavatum*, and *C. theobromicola* (Mascia et al., 2019), cucumber mosaic virus was reported in *Rhizoctonia solani* (Andika et al., 2017), artichoke Italian latent virus,

artichoke mottled crinkle virus, potato virus X, potato virus Y, tobacco mosaic virus and cucumber mosaic virus plus its satellite RNA can replicate and persist in *Phytophthora infestans* at least through the first subculture (Mascia et al., 2019).

Wei et al. (2019) obtained preliminary data on the possibilities of replicating hop stunt viroid (HSVd), iresine 1 viroid belonging to the Pospiviroidae and avocado sunblotch viroid (Avsunviroidae) in at least one of phytopathogenic ascomycete fungi *Cryphonectria parasitica*, *Valsa mali*, and *Fusarium graminearum*.

Oomycete *P. infestans* causes significant losses to potato and tomato crops on a global scale. Despite intensive use of fungicides, the pathogen is constantly and ubiquitously present in potato crops. *P. infestans* is also the most harmful and widespread tomato pathogen, both in field and greenhouse conditions. This oomycete has a high adaptive potential to the host plants, which may indicate the formation of competitive relationships with other potato and tomato pathogens. In this regard, it is of interest to identify a possible role of *P. infestans* in transmission of PSTVd to potato and tomato plants.

Materials and methods

Plant materials. Potato cultivars that, according to our data, were susceptible to both PSTVd strain VP87 and *P. infestans* – Gala, Riviera, and Colomba and tomato cultivars Zagadka, Moskvich, and Damskiy Palchik were included in the study.

These potato and tomato cultivars were registered in the Russian State Register of Breeding Achievements.

PSTVd strains. Two intermediate PSTVd strains, VP35 (GenBank accession no. LC523658) and VP87 (LC523667), and severe strain FP10-13 (LC523676) deposited in the international information database DDBJ (DNA Data Bank of Japan), Data set “Viruses” (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>) were used in the study. These strains were isolated from infected potato leaves from the Volga Federal District (VP87 and VP35) and tubers from the Far Eastern Federal District (FP10-13) in 2019 (Matsushita et al., 2021).

The PSTVd strains were supported on living tomato plants of Russian cultivars Zagadka, Moskvich, and Damskiy Palchik.

Isolate of *P. infestans*. Isolate PiVZR18 of *P. infestans* was used in the experiments on viroid transmission. PiVZR18 was isolated from the natural population of *P. infestans* in the Leningrad Region (northwest of the European part of Russia) in 2018. Eight virulence genes (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, and 11) were identified in this isolate on a set of Black’s differentials (Black et al., 1953).

Viroid inoculation of plants. Potato and tomato plants were grown in a growth room at a temperature of 25 °C with a photoperiod of 16h/8h (day/night) in 2l pots filled with “Terra vita” soil. Seven-day germination potato plants and 14-day tomato plants were used for inoculation by PSTVd.

To prepare the inoculum, 0.1 g of fresh tomato leaf tissue – 60 days post inoculation (dpi) with PSTVd strain VP87 – was

ground in 1 ml sodium phosphate buffer (pH 7.0) and filtered through cheesecloth.

For mechanical inoculation, the cotyledons of tomato were dusted with carborundum and gently rubbed over the surface of the leaves with a plastic pestle. Ten microliters of inoculum was placed on the injured leaf surface and rubbed several times with a sterile plastic pestle. The inoculated plants were incubated for two months at 25 °C with light intensity (fluorescent, 40 W, ×4).

At 60 dpi, the presence of viroid in the inoculated tomato plants was determined by RT-PCR.

To inoculate 7-day potato plants of the cultivars Gala, Riviera, and Colomba, a 0.5–1.0 cm longitudinal stem incision was performed with a sterile razor on a stem apex (Suppl. Fig. 1)¹, and 10 µl of the PSTVd VP87 strain suspension – obtained as described above – was applied. Three plants of each potato cultivar were inoculated and the assay was repeated three times. In 60 dpi, the presence of PSTVd in the inoculated plants of potato cultivars was determined by RT-PCR.

***P. infestans* inoculation of plants.** Isolate PiVZR18 of *P. infestans* was cultured on rye agar medium (1.0 Li ddH₂O, 60.0 g rye organic berries (grind in blender), 20.0 g sucrose, 15.0 g agar) for 30 days in the dark at 15 °C for propagation and morphological observation (Medina, Platt, 1999).

Before inoculating the plants, the suspension was incubated at 12 °C for 2.5–3 h to release zoospores. Upon RT-PCR detection for viroid infection, both healthy and viroid-infected tomato and potato plants were inoculated with a suspension of *P. infestans* at a concentration of 50.000 zoospores in 1 ml. After inoculation, the plants were placed in humid chambers with a 14 h light period, at 23 °C during the day and 15 °C at night for a period of 13 dpi. To study PSTVd transmission from *P. infestans* to host plants, when typical symptoms of late blight appeared, the humid chamber was removed and the development of *P. infestans* slowed down. The affected leaves were removed and the plants continued to grow. For the purposes of PSTVd diagnostics, the upper leaves of the plants without late blight symptoms were cut off.

Viroid inoculation of *P. infestans*. Inoculum of PSTVd was obtained from the infected tomato plants as described above and applied to the 14-day *P. infestans* culture by transferring 10 µl per Petri dish (in the dish center). After inoculation, the culture was left to grow for 15 days at 10 °C. Then, mycelia from the periphery and from the center of the colony were transferred separately to a fresh medium. The culture was left in the same conditions for 30 days, after which RT-PCR analysis was conducted.

Isolation of *P. infestans* from infected potato and tomato plants. Seven days post inoculation (dpi) after the symptoms of late blight appeared, *P. infestans* was isolated from the plants. Sections of the infected leaves were placed between tuber slices of the healthy cv. Colomba, and at 6 days, mycelium was transferred with a needle to the surface of rye agar. The isolates were cultured for 30 days at 15 °C in the dark and then transferred to a fresh medium.

Viroid detection and sequencing. We collected the uppermost leaves from the inoculated potato or tomato plants

at 60 dpi. PSTVd detection in pure culture of *P. infestans* was carried out after 30 days of growing on rye agar. Approximately 0.1 g of tissue from leaves or mycelium was used for RNA extraction. Total RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as per the manufacturer's instructions (http://www.genome.duke.edu/cores/microarray/services/rna-qc/documents/RNeasy_Mini_Handbook.pdf) and subsequently used for one-step RT-PCR. Primer sets P3/P4 (Behjatnia et al., 1996) and P1/P2 (Gross et al., 1978) or 68PV-R+87PV-F (Yanagisawa et al., 2019) were used to detect PSTVd. RT-PCR was prepared with the PrimerScript One-Step RT-PCR Kit ver 2 reagents in 10 ml (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) following the manufacturer's instructions. The primer set ITS4/ITS5 (White et al., 1990; Ristaino et al., 1998) was used to detect the ITS region of *P. infestans* as an internal control.

RT-PCR was carried out on a MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA) at 50 °C for 30 min, 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 sec, 60 °C for 30 sec and 72 °C for 30 sec. An additional elongation step was performed at 72 °C for 5 min followed by storage at 12 °C. The sizes of the diagnostic fragments of PSTVd and the ITS region were 360 and 946 bp, respectively.

The PSTVd amplicons were sequenced at the Beagle Company (St. Petersburg, Russia). Alignment and manual editing of nucleotide sequences were performed using Vector NTI Advance 10 software (Thermo Fisher Scientific). The obtained nucleotide sequences were tested for similarity with PSTVd strain VP87 (LC523667), used in this study, deposited in the international information database DDBJ (DNA Data Bank of Japan), data set "Viruses" (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>).

Results

There is an absence of data on the possibility of replicating PSTVd in *P. infestans* and bidirectionally transferring it between host plants and *P. infestans*. In this study, we investigated the possibility of PSTVd transmission (1) from host plants to *P. infestans*, (2) from *P. infestans* to host plants, and (3) the possibility of PSTVd stability in pure cultures of *P. infestans*.

Transmission of PSTVd from host plants to *P. infestans*

From potato plants. Upon confirming PSTVd infection in tomato plants of cv. Zagadka by RT-PCR, inoculation of three potato cultivars (Gala, Colomba, and Riviera), using as an inoculum source extracted-sap of tomato infected with PSTVd strain VP87, was conducted (see Suppl. Fig. 1). After 60 days, detection of PSTVd presence in plants of these cultivars was carried out by RT-PCR with the P3/P4 primer set (Fig. 1). The brightest amplicons indicating a high accumulation of the viroid were found for cv. Gala and cv. Colomba. The viroid accumulation was lower in three plants of cv. Riviera (see Fig. 1).

PSTVd-infected and uninfected (control) potato plants were inoculated with *P. infestans* isolate PiVZR18. Seven days after the appearance of symptoms (Fig. 2, a) caused by *P. infestans*, the pathogen was first re-isolated from these cultivars on tuber slices of healthy cv. Colomba and then transferred to pure culture on rye agar (see Fig. 2).

¹ Supplementary Figures 1–3 are available in the online version of the paper: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx5.pdf>

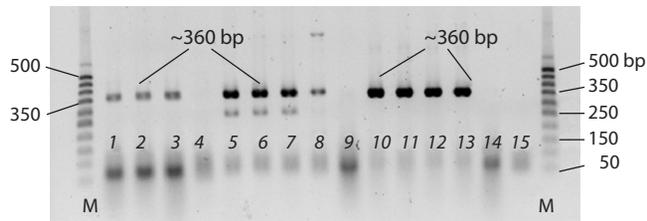


Fig. 1. RT-PCR detection of PSTVd with the primer set P3/P4 in leaves of infected potato plants by PSTVd strain VP87 before inoculation with *P. infestans*.

1–3, Individual plants of cv. Riviera; 4, mock-inoculated cv. Riviera; 5–8, individual plants of cv. Colomba; 9, mock-inoculated cv. Colomba; 10–13, individual plants of cv. Gala; 14, mock-inoculated cv. Gala; 15, negative control (distilled water); M, molecular weight marker 50 bp DNA ladder (Primetech DNA Ladder).

After culturing of *P. infestans* isolates on rye agar, PSTVd detection by RT-PCR was conducted with the primer set P3/P4 (Fig. 3, a). Amplicons of ~360 bp – indicating the presence of PSTVd – were detected in a mixture of mycelium and sporangia of pure culture of *P. infestans* isolates after colonization on the cultivars Gala, Riviera, and Colomba (see Fig. 3, a). To control for the negative results of viroid detection that are not due to the quality of RNA extracted from *P. infestans* samples, we used PCR with universal primers ITS4/ITS5 on rDNAs, which are species specific for *P. infestans* and displayed an amplicon of 946 bp (Ristaino et al., 1998) (see Fig. 3, b).

From tomato plants. The 15 plants of the two tomato cultivars (Moskvich and Damskiy Palchik) infected with three PSTVd strains (VP87, FP10-13, and VP35) were inoculated with the *P. infestans* isolate PiVZR18 to confirm the results obtained. Seven days after the appearance of the symptoms caused by *P. infestans*, 15 cultures of the pathogen were re-isolated from these plants, first on tuber slices of healthy cv. Colomba. After mycelial overgrowth on the surface of tuber slices, the first detection of viroid presence in the mycelium was performed. Out of 15 isolates, the brightest fragment indicating viroid infection of mycelium was detected with the primer set P3/P4 in the *P. infestans* isolate from cv. Moskvich infected with PSTVd strain VP87 (Fig. 4, line 1). Positive PSTVd detection was also obtained for cv. Damskiy Palchik, infected by PSTVd strain VP87 (line 4) and for the isolates from cv. Moskvich infected by PSTVd strain FP10-13 (lines 6–8) and by strain VP35 (lines 10–13). Weak amplicons were obtained in lines 3, 5, 9, 14, which indicates a low initial concentration of PSTVd in *P. infestans* mycelium obtained from the host plant (see Fig. 4).

PSTVd transmission from *P. infestans* to host plants

The PSTVd-infected *P. infestans* isolate PiVZR18v+ was used to inoculate the healthy, viroid-free plants of potato cv. Gala and tomato cv. Zagadka.

After 60 days, an amplification fragment of PSTVd was detected in the tissues of one plant of tomato cv. Zagadka by RT-PCR with the primer set P3/P4, indicating successful transmission of PSTVd by *P. infestans* isolate PiVZR18v+ (Fig. 5).

The detection of PSTVd in the RNA of cv. Zagadka inoculated with the *P. infestans* isolate PiVZR18v+ was

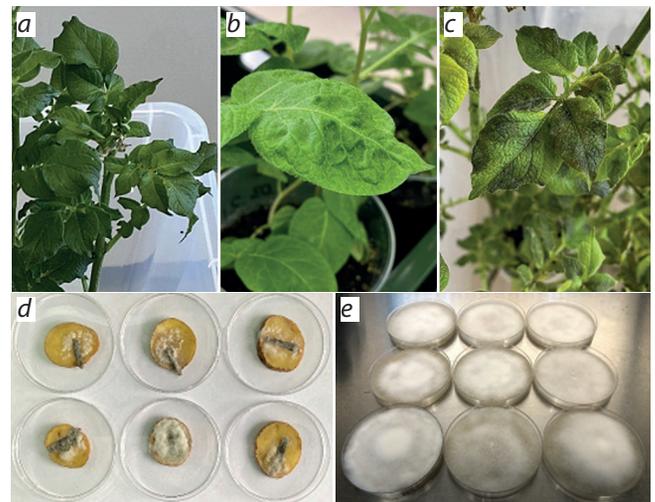


Fig. 2. PSTVd transmission from potato to *P. infestans*.

a, Mock-inoculated (distilled water) potato cv. Colomba; b, PSTVd-infected (strain VP87) potato cv. Colomba; c, symptoms of *P. infestans* on PSTVd-infected potato cv. Colomba (strain VP87); d, tuber slices of healthy cv. Colomba inoculated with *P. infestans* from the infected plants; e, *P. infestans* isolates from the PSTVd-infected plants of cv. Colomba on rye agar.

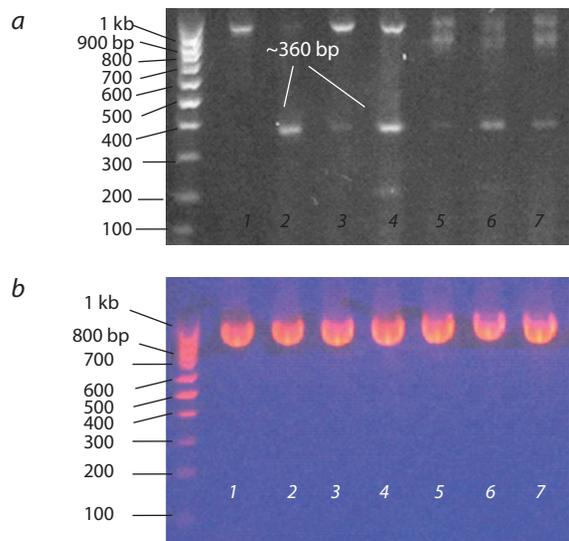


Fig. 3. RT-PCR detection of PSTVd in cultures of *P. infestans* isolated from potato plants infected with the PSTVd strain VP87 (a) and control of *P. infestans* RNA presence (b).

a, RT-PCR detection with the primer set P3/P4; b, RT-PCR amplification of the same RNA samples with the primer set ITS4/ITS5. Lines: 1, PSTVd-uninfected *P. infestans* isolate PiVZR18; 2, *P. infestans* isolates from PSTVd-infected potato cv. Gala; 3, 4, from cv. Riviera; 5–7, from cv. Colomba. Left line: molecular weight marker 100 bp (Gene Ruller, Fermentas).

confirmed by sequencing of the RT-PCR amplicon with primers P3/P4 (see Fig. 5, line 3). The partial sequence (204 bp) of this amplicon was identical (99.5 %) to PSTVd strain VP87 (LC523667) (Suppl. Fig. 2).

Stability of PSTVd in pure culture of *P. infestans*

The stability of strain VP87 in pure culture of *P. infestans* isolate PiVZR18v+ after consecutive passages on rye agar was studied. RT-PCR with primer sets P3/P4 (Fig. 6, a) and 68PV/87PV (Fig. 6, b) revealed amplification products

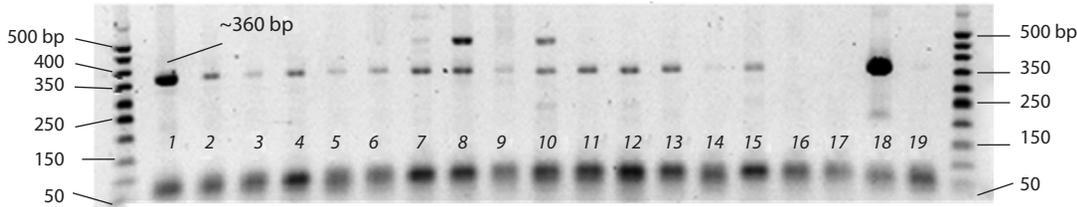


Fig. 4. RT-PCR detection of PSTVd with the primer set P3/P4 in *P. infestans* isolates grown on slices of potato cv. Colomba tubers after their isolation from infected with viroid tomato plants.

1, 2, Isolates from tomato cv. Moskvich infected by PSTVd strain VP87; 3, 4, isolates from tomato cv. Damskiy Palchik, infected by PSTVd strain VP87; 5–9, isolates from tomato cv. Moskvich, infected by PSTVd strain FP10-13; 10–13, isolates from tomato cv. Moskvich, infected by PSTVd strain VP35; 14, 15, isolates from tomato cv. Damskiy Palchik, infected by PSTVd strain VP35; 16, isolate PiVZR18 of *P. infestans* uninfected by PSTVd (negative control); 17, cv. Colomba potato tuber (negative control); 18, tomato cv. Moskvich infected by PSTVd strain VP87 (positive control); 19, distilled water (negative control). On the right and left sides of the gel, 50 bp DNA ladders (Primetech DNA Ladder) are shown.

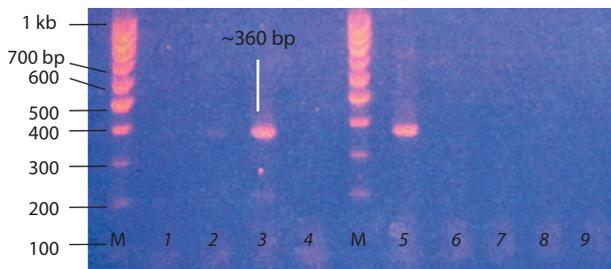


Fig. 5. RT-PCR detection of PSTVd with the primer set P3/P4 in potato and tomato plants 60 dpi with viroid-infected *P. infestans* isolate PiVZR18v+.

1, Potato cv. Gala; 2–4, tomato cv. Zagadka; 5, tomato cv. Zagadka infected by PSTVd strain VP87 (positive control); 6, potato cv. Gala uninfected by PSTVd (negative control); 7, tomato cv. Zagadka uninfected by PSTVd (negative control); 8, PSTVd-uninfected *P. infestans* isolate PiVZR18 (negative control); 9, distilled water (negative control); M, molecular weight marker 100 bp (Gene Ruller, Fermentas).

indicating the presence of PSTVd after the second and third passages on rye agar of *P. infestans* isolates from viroid-infected cv. Colomba (see the Table, Fig. 6). PSTVd stability in *P. infestans* isolates after three passages on rye agar was shown by sequencing of the RT-PCR amplicon with primers P3/P4.

The partial sequence of RT-PCR amplicon (near 232 bp) of viroid in *P. infestans* isolate PiVZRv+ after the third passage on rye agar received with the primer set P3/P4 is identical (98.3 %) to PSTVd strain VP87 (LC523667). Another partial sequence of RT-PCR amplicon (270 bp) received with the primer set 68PV/87PV of the same RNA sample is identical to PSTVd strain VP87 (LC523667) – 99.3 % (Suppl. Fig. 3).

On the other hand, PSTVd was not detected after the eighth passage on rye agar in *P. infestans* subculture (see the Table).

P. infestans isolates infected with viroid strain VP87 were characterized by more abundant, but also more compact mycelium, forming an almost felt-like colony (Fig. 7).

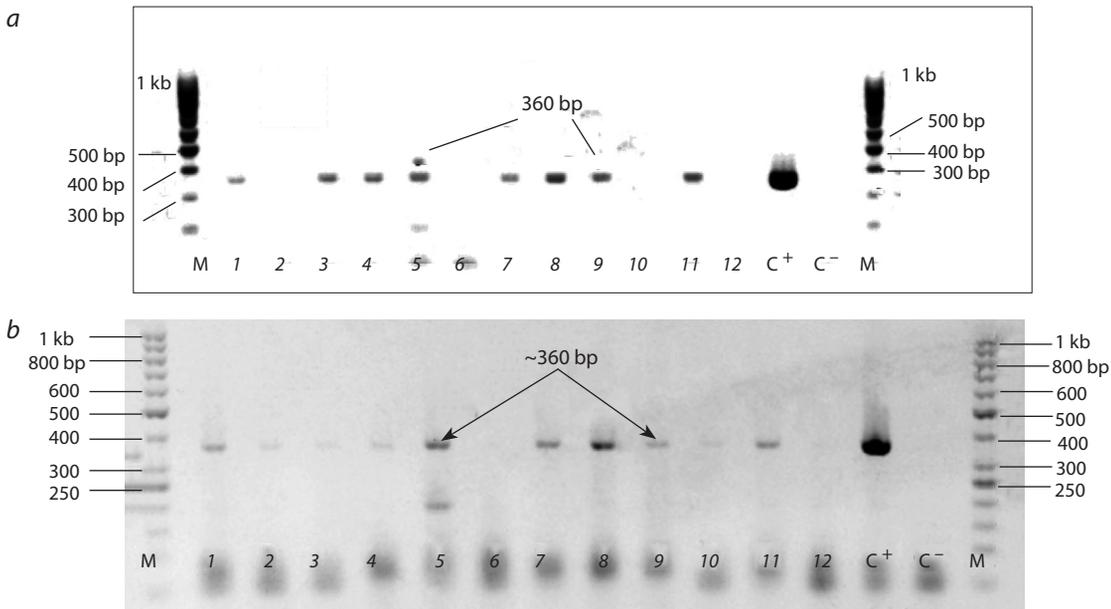


Fig. 6. RT-PCR detection of PSTVd with primer sets P3/P4 (a) and 68PV/87PV (b) in cultures of *P. infestans* isolates after colonization on PSTVd infected potato cv. Colomba.

1–4, Second passage on rye agar; 5–11, third passage on rye agar; 12, PSTVd-uninfected isolate PiVZR18 (negative control); C⁺, cv. Colomba infected by PSTVd (positive control); C⁻, distilled water; M, molecular weight marker 100 bp (a) and 50 bp (b) (Gene Ruller, Fermentas).

Virulence testing on a set of Black's potato differentials (11 lines with different resistance genes) (Black et al., 1953) of the PSTVd-infected PiVZR18v+ and the initial uninfected PiVZR18 isolates showed the same types of reactions on detached leaves of 11 lines after 7 dpi (Fig. 8, 9).

Presence of amplification product 360 bp in *P. infestans* isolates after colonization on viroid-infected plants of potato cv. Colomba (each passage is 30 days)

Number of passages on rye agar	Number of <i>P. infestans</i> isolates	
	Positive PSTVd detection	Negative PSTVd detection
One passage 30 days after re-isolation on rye agar	5	2
Two passages	3 (see Fig. 6)	1
Three passages	5 (see Fig. 6)	2
Eight passages	0	7

For both isolates, eight virulence genes (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, and 11) were identified. The PSTVd-infected *P. infestans* isolate seems to be less aggressive in comparison to the uninfected isolate; however, this observation requires further study.

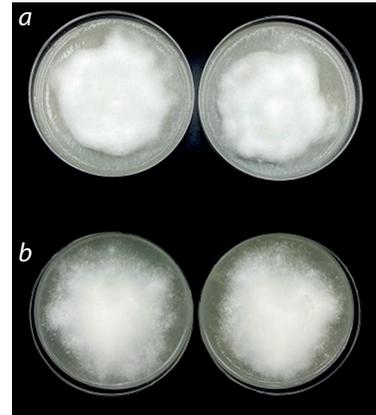


Fig. 7. Cultures of *P. infestans* PiVZR18: a, infected with viroid after three passages on rye agar; b, healthy.



Fig. 8. Virulence of the PSTVd-infected PiVZR18v+ to the lines of a set of Black's differentials (11 resistance genes). Eight virulence genes (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11) were determined.

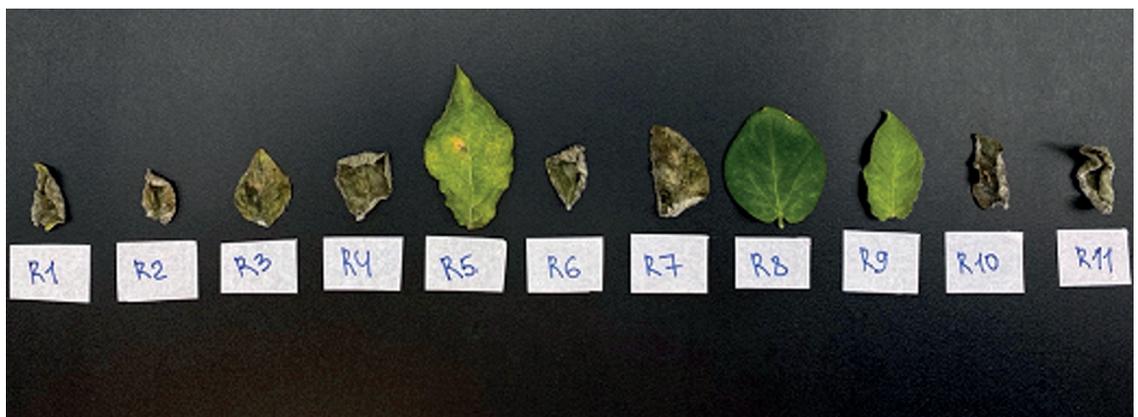


Fig. 9. Virulence of the initial PSTVd-uninfected *P. infestans* PiVZR18 isolate to the lines of a set of Black's differentials (11 resistance genes). Eight virulence genes (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11) were determined.

Discussion

Potato (*Solanum tuberosum*) is one of the most important staple crops worldwide. According to the FAO, over 390 million tons are produced on over 19 million ha of farmland worldwide (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>). The quarantine status of potato tuber spindle viroids and possible significant losses of potato yield determine the importance of studying various aspects of pathogen epidemiology.

PSTVd replication is accompanied by the accumulation of viroid-derived small RNAs (vd-siRNAs) suggested to play a central role in disease symptom development.

Potatoes were domesticated in the Andes in Southern Peru around 10,000 years ago. Nevertheless, the introduction of the potato to Europe, along with all its associated diseases, dates back to the 16–17th centuries (Khavkin, 2015). Late blight of potato and tomato is a devastating disease caused by fungus-like oomycete *P. infestans*. Despite many efforts, the severity of this disease has increased dramatically in recent years.

It is known that the mode and speed of spreading plant pathogens are the major factors in the development of epiphytotics. Early studies showed that PSTVd is spread primarily through the use of infected plant material produced vegetatively or as botanical seeds (Fernow et al., 1970), through mechanical spreading across the growing crop, particularly between plants of different species of the Solanaceae family (Manzer, Merriam, 1961; Verhoeven, Roenhorst, 2010). The success of mechanical transmission depends on infected host plant species or cultivars, as well as the frequency and severity of the disease and the temperature (Bulletin OEPP/EPP Bulletin, 2011). Importantly, transmission to potato and other test plants by aphids (*Myzus persicae*) was successful only if PSTVd RNA was encapsidated by potato leafroll virus (PLRV) particles (Salazar et al., 1995; Querci et al., 1997).

Some viruses are spread by vectors, which can include pathogenic fungi (Andika et al., 2017; Sutela et al., 2019), oomycetes (Mascia et al., 2019), and nematodes (Brown et al., 1989; Singh S. et al., 2020). Bidirectional transfer between *Fusarium graminearum* and tobacco plants of hop stunt viroid (HSVd) during infection was shown by Wei et al. (2019). However, *Nicotiana benthamiana* is not a natural host for either HSVd or *F. graminearum*. Given this fact (Serra et al., 2020), more evidence is needed to validate the possibility of viroid transmission by phytopathogenic fungi. We showed the presence of PSTVd in *P. infestans* isolates after colonization on plants of three potato cultivars infected with viroid. After three passages on rye agar (30 days each), RT-PCR analysis showed the presence of viroid in pure cultures of *P. infestans*. The partial RT-PCR amplicon sequence of viroid in *P. infestans* isolate PiVZRv+ after the third passage on rye agar is identical (98.3–99.3 %) to PSTVd strain VP87 that was used for the initial inoculation.

Sixty days after inoculation of healthy tomato plants with *P. infestans* isolate carrying PSTVd, RT-PCR revealed a 360 bp amplification product, indicating successful infection of the plants. This is the first report of horizontal transfer of potato viroid PSTVd between *P. infestans* and host plants.

Moreover, there is evidence that small RNAs (sRNAs, approximately 20–30 nt) can horizontally transfer from microbes to plants and spread silencing information toward the targeted genes (Han, Luan, 2015). Small RNAs were also found in

fungi (Wang, Dean, 2020) and fungal-like *Oomycota* (Jahan et al., 2015). In addition, sRNAs of 19–40 nt were found from *P. infestans* (Vetukuri et al., 2012). There are numerous reports of sRNA cross-transfer between plants and pathogens (Zeng et al., 2019; Wang, Dean, 2020). sRNAs can be transported within an organism through the inner side of the plasma membrane (symplast), or cell wall (apoplast) (Wang, Dean, 2020). It is suggested that sRNAs are translocated by extracellular vesicles (EVs) from *Arabidopsis* to *P. capsica* (Hou et al., 2019) and *B. cinerea* (Cai et al., 2018). Furthermore, it is possible that interaction between oomycete and potato involves not only sRNA exchange but also the movement of larger viroid RNA molecules from mycelium into a plant and *vice versa*.

PSTVd replicates in the nucleus, traffics long distances in the phloem, and moves cell-to-cell via plasmodesmata in plants (Takeda, Ding, 2009). After the third subculture, PSTVd was detected from *P. infestans*, suggesting that PSTVd can replicate in the nucleus and locate to non-septate hyphae of *P. infestans* (see the Table). On the other hand, after the eighth subculture, PSTVd accumulation in *P. infestans* was not detected by RT-PCR. The same results were obtained by Wei et al. (2019), in which PSTVd was eliminated from *Cryphonectria parasitica*, *Valsa mali*, and *Fusarium graminearum* after eight subcultures. This disappearance could be caused by a defense mechanism against viroid, namely, the RNA silencing system. Viroids are the target of the RNA silencing system and become elicitors of the host defense system via RNA silencing (Cottilli et al., 2019; Wei et al., 2020). Thus, PSTVd could have been degraded by the silencing system, resulting in the elimination of PSTVd from *P. infestans*.

Phytophthora infestans produce sporangia on the surface of potato leaves, and then zoospores, released from sporangia, form walled cysts on the plant surface (Mazumdar et al., 2021). The cysts germinate and extend a germ tube into the leaves and stems of the host plants. PSTVd transferred from *P. infestans* to plants, suggesting that PSTVd was present not only in mycelium but also in sporangia and zoospores. Mature sporangia were dispersed by wind or water (Leesutthiphonchai et al., 2018). Thus, there is a possibility that PSTVd can spread long distances via infected sporangia. In contrast, there is still no evidence of viroid infection in isolates of *P. infestans* from field populations and the possibility of viroid stability in the mycelium of *P. infestans* in tubers is unclear.

Concerning mycoviruses, there are two hypotheses of their origin: the first states that they are of an unknown but ancient origin and have coevolved along with their hosts, the second one suggests they have relatively recently moved from a fungal plant host into fungus (Pearson et al., 2009). Both hypotheses are also applicable to PSTVd. Prolonged coexistence of viroid–*P. infestans*–host plants can lead to viroid transition from a host plant to an oomycete.

Conclusion

Potato spindle tuber viroid is known as autonomously replicating pathogen only of plants and mainly of solanaceous crops, that lacks any protein-coding sequences. Herein, we demonstrate the possibility of viroid transmission from host plants (potato and tomato) to *Phytophthora infestans*, from *P. infestans* to host plants, and the possibility of PSTVd

stability in pure cultures of *P. infestans* after three consecutive passages on rye agar. These results are initial evidence of bidirectionally transferred potato viroid PSTVd between *P. infestans* and host plants.

References

- Andika I.B., Weia Sh., Cao Ch., Salaipetha L., Kondo H., Suna L. Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: a naturally occurring cross-kingdom viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017;114(46):12267-12272. DOI 10.1073/pnas.1714916114.
- Behjatnia A., Dry I., Krake L., Condé B.D., Connelly M.I., Randles J., Rezaian M.A. New potato spindle tuber viroid and tomato leaf curl geminivirus strains from a wild *Solanum* sp. *Phytopathology*. 1996;86:880-886. DOI 10.1094/Phyto-86-880.
- Bhat A.L.I., Rao G.P. Characterization of Plant Viruses. Methods and Protocols. Humana, New York: Springer Science+Business Media, 2020. DOI 10.1007/978-1-0716-0334-5_1.
- Black W., Mastenbroek C., Mills W.R., Peterson L.C. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica*. 1953;2:173-178. DOI 10.1007/BF00053724.
- Brown D.J.F., Ploeg A.T., Robinson D.J. A review of reported associations between *Trichodorus* and *Paratrichodorus* species (Nematoda: Trichodoridae) and tobnaviruses with a description of laboratory methods for examining virus transmission by trichodorids. *Rev. Nematol.* 1989;12(3):235-241.
- Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2011. *Potato spindle tuber viroid* on potato. 2011;41(3):394-399.
- Cai Q., Qiao L., Wang M., He B., Lin F.M., Palmquist J., Huang S.D., Jin H. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*. 2018;360:1126-1129. DOI 10.1126/science.aar4142.
- Cottilli P., Belda-Palazón B., Adkar-Purushothama C.R., Perreault J.-P., Schleiff E., Rodrigo I., Ferrando A., Lisón P. Citrus exocortis viroid causes ribosomal stress in tomato plants. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(16):8649-8661. DOI 10.1093/nar/gkz679.
- Diener T.O., Raymer W.B. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. II. Characterization and partial purification. *Virology*. 1969;37(3):351-366. DOI 10.1016/0042-6822(69)90219-0.
- Fernow K.H., Peterson L.C., Plaisted R.L. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *Am. Potato J.* 1970;47:75-80. DOI 10.1007/BF02864807.
- Gross H.J., Domdey H., Lossow C., Jank P.R.M., Alberty H., Sanger H.L. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*. 1978;273:203-208. DOI 10.1038/273203a0.
- Han L., Luan Y.-S. Horizontal transfer of small RNAs to and from plants. *Front. Plant Sci.* 2015;6:1113. DOI 10.3389/fpls.2015.01113.
- Hou Y., Zhai Y., Feng L., Karimi H.Z., Rutter B.D., Zeng L., Choi D.S., Zhang B., Gu W., Chen X., Ye W., Innes R.W., Zhai J., Ma W. A *Phytophthora* effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility. *Cell Host Microbe*. 2019;25(1):153-165.e5. DOI 10.1016/j.chom.2018.11.007.
- Jahan S.N., sman A.K.M., Corcoran P., Fogelqvist J., Vetukuri R.R., Dixelius C. Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Exp. Bot.* 2015;66:2785-2794. DOI 10.1093/jxb/erv094.
- Kastalyeva T.B., Mozhaeva K.A., Pisetskaya N.F., Romanova S.A., Trofimets L.N. The potato spindle tuber viroid and bringing potato into a healthy state. *Vestnik RASKHN = Herald of the Russian Academy of Agricultural Sciences*. 1992;3:22-24. (in Russian)
- Khavkin E.E. Potato late blight as a model of pathogen-host plant co-evolution. *Russ. J. Plant Physiol.* 2015;62(3):408-419. DOI 10.1134/S1021443715030103.
- Krczyński S., Paduch-Cichal E.L., Skrzeczkowski J. Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plants. *J. Phytopathol.* 1988;121(1):51-57. DOI 10.1111/j.1439-0434.1988.tb00952.x.
- Leesuthiphonchai W., Vu A.L., Ah-Fong A.M.V., Judelson H.S. How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. *Phytopathology*. 2018;108(8):916-924. DOI 10.1094/PHYTO-04-18-0130-IA.
- Mackie A.E., Rodoni B.C., Barbetti M.J., McKirdy S.J., Jones R.A.C. Potato spindle tuber viroid: alternative host reservoirs and strain found in a remote subtropical irrigation area. *Eur. J. Plant Pathol.* 2016;145(2):433-446. DOI 10.1007/s10658-016-0857-2.
- Manzer F.E., Merriam D. Field transmission of potato spindle tuber virus and virus X by cultivating and hilling equipment. *Am. Potato J.* 1961;38:346-352.
- Mascia T., Vučurović A., Minutillo S.A., Nigro F., Labarile R., Savoia M.A., Palukaitis P., Gallitelli D. Infection of *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora infestans* by taxonomically different plant viruses. *Eur. J. Plant Pathol.* 2019;153(4):1001-1017. DOI 10.1007/s10658-018-01615-9.
- Matsushita Y., Yanagisawa H. Distribution of *Tomato planta macho viroid* in germinating pollen and transmitting tract. *Virus Genes*. 2018;54:124-129. DOI 10.1007/s11262-017-1510-7.
- Matsushita Y., Yanagisawa H., Khiutti A., Mironenko N., Ohto Y., Afanasenko O. Genetic diversity and pathogenicity of potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid isolates in Russia. *Eur. J. Plant Pathol.* 2021;161:529-542. DOI 10.1007/s10658-021-02339-z.
- Mazumdar P., Singh P., Kethiravan D., Ramathani I., Ramakrishnan N. Late blight in tomato: insights into the pathogenesis of the aggressive pathogen *Phytophthora infestans* and future research priorities. *Planta*. 2021;253(6):119. DOI 10.1007/s00425-021-03636-x.
- Medina M.V., Platt H.W. Comparison of different culture media on the mycelial growth, sporangia and oospore production of *Phytophthora infestans*. *Am. J. Potato Res.* 1999;76:121-125. DOI 10.1007/BF02853576.
- Mertelik J., Kloudova K., Cervena G., Necekalova J., Mikulkova H., Levkanicova Z., Dedic P., Ptacek J. First report of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in *Brugmansia* spp., *Solanum jasminoides*, *Solanum muricatum* and *Petunia* spp. in the Czech Republic. *Plant Pathol.* 2010;59(2):392. DOI 10.1111/j.1365-3059.2009.02115.x.
- Owens R.A., Khurana S.M.P., Smith D.R., Singh M.N., Garg I.D. A new mild strain of potato spindle tuber viroid isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Dis.* 1992;76(5):527-529. DOI 10.1094/PD-76-0527.
- Pearson M.N., Beever R.E., Boine B., Arthur K. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 2009;10(1):115-128. DOI 10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x.
- Pfannenstiel M.A., Slack S.A. Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid. *Phytopathology*. 1980;70(9):922-926. DOI 10.1094/Phyto-70-922.
- Puchta H., Herold T., Verhoeven K., Roenhorst A., Ramm K., Schmidt-Puchta W., Sanger H.L. A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Mol. Biol.* 1990;15(3):509-511. DOI 10.1007/BF00019169.
- Querci M., Owens R.A., Bartolini I., Lazarte V., Salazar L.F. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *J. Gen. Virol.* 1997;78(Pt.6):1207-1211. DOI 10.1099/0022-1317-78-6-1207.
- Ristaino J.B., Madritch M., Trout C.L., Parra G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998;64(3):948-954. DOI 10.1128/AEM.64.3.948-954.
- Salazar L.F., Querci M., Bartolini I., Lazarte V. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*. 1995;30(1):56-58.
- Serra P., Carbonell A., Navarro B., Gago-Zachert S., Li S., Di Serio F., Flores R. Symptomatic plant viroid infections in phytopathogenic fungi: a request for a critical reassessment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020;117(19):10126-10128. DOI 10.1073/pnas.1922249117.

- Singh R.P. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *Am. Potato J.* 1970;47:225-227. DOI 10.1007/BF02872303.
- Singh R.P. Experimental host range of the potato spindle tuber 'virus'. *Am. Potato J.* 1973;50:111-123. DOI 10.1007/BF02857207.
- Singh R.P., Boucher A., Somerville T.H. Detection of *Potato spindle tuber viroid* in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Dis.* 1992;76:951-953.
- Singh S., Awasthi L.P., Jangre A., Nirmalkar V.K. Chapter 22 – Transmission of plant viruses through soil-inhabiting nematode vectors. In: Awasthi L.P. (Ed.) *Applied Plant Virology*. Acad. Press, 2020;291-300. DOI 10.1016/B978-0-12-818654-1.00022-0.
- Sutela S., Poimala A., Vainio E.J. Viruses of fungi and oomycetes in the soil environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2019;95(9):fiz119. DOI 10.1093/femsec/fiz119.
- Syller J., Marczewski W., Pawłowicz J. Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. *Eur. J. Plant Pathol.* 1997;103:285-289. DOI 10.1023/A:1008648822190.
- Takeda R., Ding B. Viroid intercellular trafficking: RNA motifs, cellular factors and broad impacts. *Viruses.* 2009;1(2):210-221. DOI 10.3390/v1020210.
- Verhoeven J.T.J., Roenhorst J.W. High stability of original predominant pospiviroid genotypes upon mechanical inoculation from ornamentals to potato and tomato. *Arch. Virol.* 2010;155:269-274. DOI 10.1007/s00705-009-0572-9.
- Vetukuri R.R., Åsman A.K.M., Tellgren-Roth C., Jahan S.N., Reimegård J., Fogelqvist J., Savenkov E., Söderbom F., Avrova A.O., Whisson S.C., Dixelius C. Evidence for small RNAs homologous to effector-encoding genes and transposable elements in the oomycete *Phytophthora infestans*. *PLoS One.* 2012;7(12):e51399. DOI 10.1371/journal.pone.0051399.
- Wang M., Dean R.A. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Mol. Plant Pathol.* 2020;21:589-601. DOI 10.1111/mpp.12911.
- Wei Sh., Bian R., Andika I.B., Niu E., Liu Q., Kondo H., Yang L., Zhou H., Pang T., Lian Z., Liu X., Wu Y., Sun L. Symptomatic plant viroid infections in phytopathogenic fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(26):13042-13050. DOI 10.1073/pnas.1900762116.
- Wei S., Bian R., Andika I.B., Niu E., Liu Q., Kondo H., Yang L., Zhou H., Pang T., Lian Z., Liu X., Wu Y., Sun L. Nucleotide substitutions in plant viroid genomes that multiply in phytopathogenic fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020;117(19):10129-10130. DOI 10.1073/pnas.2001670117.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.) *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. Acad. Press, 1990;315-322. DOI 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- 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(2):22-31. DOI 10.1016/j.virol.2018.09.021.
- Zeng J., Gupta V.K., Jiang Y., Yang B., Gong L., Zhu H. Cross-kingdom small RNAs among animals, plants and microbes. *Cells.* 2019;8(4):371. DOI 10.3390/cells8040371.

ORCID ID

O.S. Afanasenko orcid.org/0000-0001-7368-0797
A.V. Khiutti orcid.org/0000-0003-1479-7746
N.V. Mironenko orcid.org/0000-0003-3383-2973
N.M. Lashina orcid.org/0000-0003-1419-7134

Acknowledgements. This study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 20-46-07001.

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

Received December 27, 2021. Revised February 3, 2022. Accepted February 3, 2022.

Social behavior and spatial orientation in rat strains with genetic predisposition to catatonia (GC) and stereotypes (PM)

V.S. Plekanchuk^{1, 2}✉, O.I. Prokudina¹, M.A. Ryazanova¹

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ lada9604@mail.ru

Abstract. Various psychopathologies, including schizophrenia, bipolar disorder and major depression, are associated with abnormalities in social behavior and learning. One of the syndromes that may also take place in these disorders is catatonia. Catatonia is a psychomotor syndrome in which motor excitement, stereotypy, stuporous state, including the phenomenon of “waxy flexibility” (catalepsy), can be observed. Rats with genetic catatonia (GC) and pendulum-like movements (PM) of the anterior half of the body have physiological and behavioral changes similar to those observed in schizophrenia and depression in humans and can be considered as incomplete experimental models of these pathologies. The social behavior of the GC and PM rats has not been previously studied, and the cognitive abilities of animals of these strains are also insufficiently studied. To determine whether the GC and PM rats have changes in social behavior and spatial learning, behavioral phenotyping was performed in the resident-intruder test, three-chamber test, Barnes maze test. Some deviations in social behavior, such as increased offensive aggression in PM rats in the resident-intruder test, increased or decreased social interactions depending on the environment in different tests in GC, were shown. In addition, principal component analysis revealed a negative association between catatonic freezing and the socialization index in the three-chamber test. Decreased locomotor activity of GC rats can adversely affect the performance of tasks on spatial memory. It has been shown that PM rats do not use a spatial strategy in the Barnes maze, which may indicate impairment of learning and spatial memory. Key words: catatonia; GC rat strain; PM rat strain; epilepsy; stereotypes; learning; social interaction.

For citation: Plekanchuk V.S., Prokudina O.I., Ryazanova M.A. Social behavior and spatial orientation in rat strains with genetic predisposition to catatonia (GC) and stereotypes (PM). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):281-289. DOI 10.18699/VJGB-22-35

Социальное поведение и пространственная ориентация у линий крыс с генетической предрасположенностью к кататонии (ГК) и стереотипиям (МД)

В.С. Плеканчук^{1, 2}✉, О.И. Прокудина¹, М.А. Рязанова¹

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ lada9604@mail.ru

Аннотация. Различные психопатологии, включая шизофрению, биполярное расстройство и большое депрессивное расстройство, ассоциированы с отклонениями в социальном поведении и обучении. Одним из синдромов, который также может иметь место при этих расстройствах, является кататония. Кататония – психомоторное расстройство, при котором могут наблюдаться двигательное возбуждение, стереотипии, ступор, в том числе с явлением «восковой гибкости» (катаlepsии). Крысы с генетической кататонией (ГК) и маятникообразными стереотипными движениями (МД) имеют физиологические и поведенческие изменения, сходные с наблюдаемыми при шизофрении и депрессии у человека, и могут рассматриваться как неполные экспериментальные модели этих патологий. Социальное поведение крыс линий ГК и МД ранее не было исследовано, также недостаточно изучены когнитивные способности животных данных линий. Чтобы определить, имеются ли изменения в социальном поведении и пространственном обучении у крыс линий ГК и МД, было проведено их поведенческое фенотипирование в тесте «резидент-интродер», трехкамерном тесте и лабиринте Барнс. В нашей работе показаны некоторые отклонения в социальном поведении, такие как усиление оборонительной агрессии у крыс МД, увеличение или уменьшение уровня социальных взаимодействий в зависимости от условий тестирования у крыс ГК. Кроме того, анализ главных компонент

выявил отрицательную связь между кататоническим застыванием и индексом социальности в трехкамерном тесте. Снижение двигательной активности крыс ГК может негативно влиять на выполнение заданий по оценке пространственной памяти. Показано, что крысы МД не используют пространственную стратегию в лабиринте Барнс, что может указывать на нарушение обучения и пространственной памяти.

Ключевые слова: кататония; линия крыс ГК; линия крыс МД; эпилепсия; стереотипии; обучение; социальное взаимодействие.

Introduction

In psychiatric classification, there is an acute issue of division and diagnosis of individual nosological units. A lot of evidence pointing to the generally continuous nature of psychopathological variation versus discrete has been accumulated (Krueger et al., 2018). In DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders), there are many “spectra” and groups of disorders (Autism Spectrum Disorder, Schizophrenia Spectrum and Other Psychotic Disorders, Bipolar and related disorders), the symptoms of which overlap very strongly. The comorbidity observed between major depression and schizophrenia (Samsom, Wong, 2015), bipolar disorder, attention deficit hyperactivity disorder, and autism (Kiser et al., 2015) implies that the same pathophysiological processes occur in these diseases. In this regard, new concepts are being created that try to explain the pathogenesis of distinct psychiatric symptoms and emphasize the exploration of endophenotypes but not of complex diseases (Anderzhanova et al., 2017). This approach solves the “problem of comorbidity” by explicitly modeling patterns of co-occurrence among signs and symptoms (Krueger et al., 2018).

One of the syndromes that can be used as a “specifier” in DSM-5 for the characterization of several clinical phenotypes including schizophrenia spectrum disorders, affective, and neurodevelopmental disorders is catatonia (Wilson et al., 2015). Catatonia is a psychomotor syndrome characterized by various signs: stupor, catalepsy (posturing, waxy flexibility), stereotypy, mutism. This motor and behavioral alteration may occur in many psychiatric conditions but predominantly in schizophrenia, affective psychosis, autism (Fink, Taylor, 2001). While many aspects of human psychopathologies cannot be simulated in animals, some symptoms of catatonia can. Different animal models can help characterize the nature of specific psychopathology symptoms, and there are special behavioral parameters of potential relevance to signs and symptoms of schizophrenia. Excessive catatonic reactions in animals can also correspond to catatonia in humans and include presence of bizarre motor activity, decrease in motor activity, or catatonic excitement (intense bursts of agitated stereotypy).

For genetically based modeling of schizophrenia-relevant and catatonia-relevant symptoms, the GC (genetic catatonia) and the PM (pendulum-like movements) rat strains were offered (Timofeeva, 1985). The strains were obtained by selection for intensification of such catatonic reactions as freezing or catalepsy (GC strain) and stereotyped pendulum movements (PM strain). The GC rats demonstrate occasional freezing or, instead, hyperkinetic behavioral reactions that resemble the manifestations of the catatonic syndrome (Ryazanova et al., 2012). These reactions can be spontaneous, as well as in response to a weak stressful stimulus, such as in a special test for catatonic freezing (Fig. 1, a). In addition, rats of this strain are characterized by increased stress reactivity (Alekhina et al., 2015), increased shock-induced aggression (Nikulina et

al., 1987), impaired filtration of sensorimotor information (manifested by a deficiency of PPI) (Ryazanova et al., 2017). PM rats are characterized by rhythmic side-to-side rocking of the head and forebody in the absence of locomotion (see Fig. 1, b). More than that, rats selected for an increased amplitude of pendulum-like movements after the 40th generation started generating seizures to audiogenic stimulation (Alekhina et al., 2007).

Despite some parameters supporting face validity of this model, phenotype of these strains is not yet well explored. For example, aspects of behavior and cognitive activity such as social interactions and learning are also of interest. A variety of neuropsychiatric disorders are characterized by disruptions in social behavior and social recognition, including depression, autism spectrum disorders, bipolar disorders, obsessive-compulsive disorders, and schizophrenia. In animals, altered social interaction responses in a variety of situations are considered as analogs related to negative – social withdrawal – symptoms of schizophrenia (Powell, Miyakawa, 2006), hyperactivity and aggressive behavior directly related to positive symptoms of schizophrenia (Volavka, Citrome, 2008).

To determine whether selection for predisposition to the catatonic freezing and the amplitude of pendulum-like movements influenced social interactions and learning in the GC and PM rat strains, behavioral phenotyping of rats in the resident intruder test, three-chamber test, Barnes maze test was carried out.

Methods

The study was carried out on male rats of the GC (genetic catatonia), PM (pendulum-like movements), Wistar and WAG (Wistar Albino Glaxo) strains. Since the PM rat strain is outbred, rats of the outbred Wistar strain were used as a control, while for the inbred GC, the inbred WAG were used.

Experiment 1 included the catatonic freezing test (22 males at the age of 2 months from each strain); the three-chamber paradigm test (the same 15 males at the age of 5 months from each strain) and the resident-intruder test (5 days after the three-chamber test). In the Experiment 2, another 60 rats (15 males at the age of 4 months from each strain) were tested in the Barnes maze.

Rats were kept under standard vivarium conditions with a free access to food and water. All experimental procedures complied with the rules and regulations formulated in the EU Council Directive 1986 (86/609/EEC) and the Declaration of Helsinki on the protection of vertebrate animals used in experimental research and approved by the ICG SB RAS Bioethics Committee (protocol No. 43, 28.09.2018).

Experiment 1. Social behavior and catatonia

The catatonic freezing test is a selection criterion for the GC rats and was carried out according to the protocol (Timofeeva, 1985). To determine the presence or absence of freezing

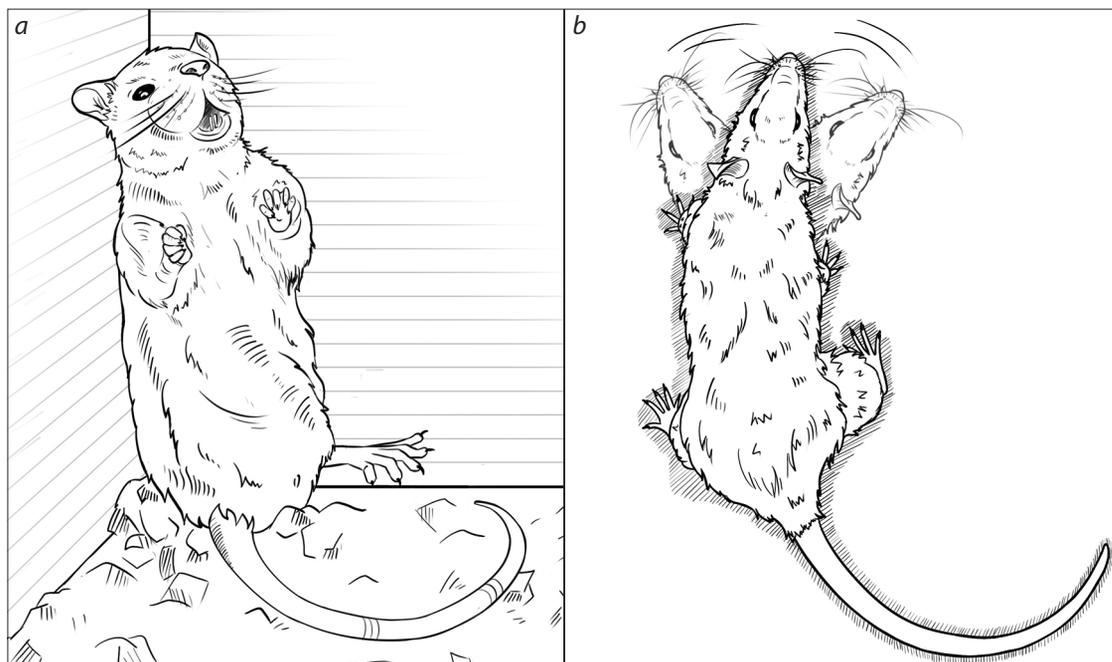


Fig. 1. Catatonic reactions in rats: *a*, catalepsy in GC; *b*, pendulum-like movements of the PM rats.

reactions and their duration, the rat was uplifted in the corner of the cage by the forelegs using a test stick. The freezing time was estimated as a time during which the animal retained the induced posture or freezing position on 4 paws after the stick was removed. Rats were tested two times on different days.

The three-chamber paradigm test. The three-chamber social interaction assay was performed to assess social deficits according to the protocol (Kaidanovich-Beilin et al., 2011). Testing was carried out in a test arena manufactured by OpenScience, Russia, model TS1701-R. The apparatus for the test is comprised of a rectangular, three-chamber box. Each chamber is 40×85 cm and the dividing walls are made from clear Plexiglas, with an open middle section, which allows free access to each chamber. For habituation, the test rat was placed into a Plexiglas's arena containing two empty cylindrical containers in two side chambers for 10 minutes.

Session I. Wistar males of the same weight without any prior contact (not littermates) with the subject were used as control animals (Stranger 1 and Stranger 2). One of the control rats (Stranger 1) was placed in one of the containers located in one of the side chambers. The placement of Stranger 1 on the left or right side of the chamber was systematically altered between trials. After removing the walls between the compartments, the following parameters were monitored and recorded: duration of direct contacts of the subject rat with Stranger 1; duration of contacts with empty enclosure. The duration of session I was 10 minutes. Then the **Session II** began. The second control rat was placed in the empty cylinder in the opposite side chamber. Duration of direct contacts of the subject rat with Stranger 1 and Stranger 2 were monitored and recorded within 10 minutes. The socialization index was calculated by the formula $(T_1 - T_0) / (T_1 + T_0) \times 100\%$, where T_1 is the time of contact with the containment cup housing Stranger 1 rat; T_0 – time of contact with the empty enclosure. The social novelty index is calculated by the formula $(T_2 - T_1) / (T_2 + T_1) \times 100\%$,

where T_1 is the time of contact with familiar rat (Stranger 1), T_2 is the time of contact with the container housing Stranger 2 rat. The freezing time in this test was also recorded at each session (Freezing 1 and Freezing 2, respectively).

The resident-intruder test. To measure offensive aggression, the resident-intruder test was performed according to the standard protocol (Koolhaas et al., 2013). To assess the defensive behavior of resident males of the studied strain, they were placed in cages for 7 days before the test. To preserve olfactory signals, the cage was not cleaned before the test. The intruder (the Wistar male of the same size) was placed in the resident's cage through the partition, then the partition was removed. Testing was carried out for 10 minutes. Durations of the behavioral parameters were registered: (1) total offense: sum of lateral threat, upright, clinch and keep down; (2) social exploration: sum of social explore, ano-genital sniffing and move towards; (3) non-social activity: non-social explore, rearing, grooming; (4) inactivity, including rest and freezing (freezing in the RI). Also the numbers of mounts and attack latencies were analyzed.

The analysis of the main factors determining the variability of behavior characteristics in Experiment 1 was investigated by the Principal Component Analysis.

Experiment 2. Spatial learning

The Barnes maze was used to test the acquisition of spatial memory. Testing was carried out in a setup manufactured by RPC OpenScience, Russia, model TS1101-R (field diameter 122 cm, 18 holes are located around the perimeter). Testing in the Barnes maze included 3-minute training sessions once a day for 5 days (Stansley, Yamamoto, 2015). Probe trial was administered 24 hours after the acquisition session (Day 7). The following parameters were to be calculated: (1) primary latency, (2) primary errors, (3) distance moved (in cm), and (4) velocity (cm/s) (Gawel et al., 2019).

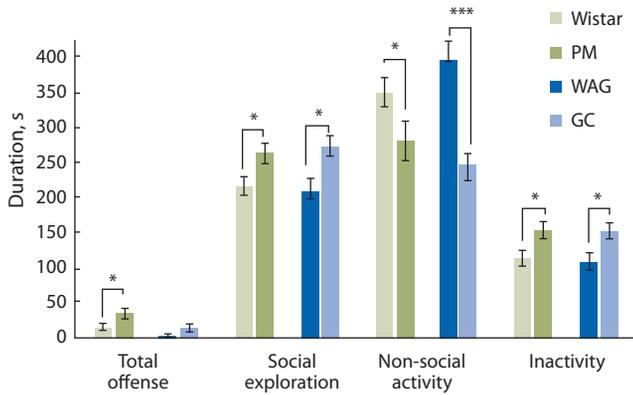


Fig. 2. Behavioral profile of resident males during a ten minutes' resident-intruder test.

Differences marked are shown for PM versus Wistar rats, and GC versus WAG. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, Student's *t*-test.

Video tracking and registration of behavioral parameters were carried out using the program EthoVision XT 15 (Noldus, Wageningen, Netherlands). In addition, on 4, 5 and 7 day trial was classified into 1 of 3 categories of search strategy (Yassine et al., 2013) reflecting the use of either a direct spatial strategy (defined as direct visit to the target, sometimes preceded by at most 1 adjacent hole visit), a serial strategy (minimum of 2 adjacent hole visits in a serial manner before reaching the target) or a mixed (i. e., random) strategy (remaining trials). The data were subsequently analyzed in terms of percentage of trials with a direct spatial strategy.

Statistics

The obtained data were processed using STATISTICA 10.0. In the paper, data are presented as mean \pm SEM. Behavioral scores from Experiment 1 were analyzed by Student *t*-tests (except for parameters: lateral threatening, clinch attack, attack latencies, which was analyzed by Mann–Whitney U test). When comparing a rate, Fisher's exact test was used. The analysis of the main factors that determine the variability of behavior characteristics in Experiment 1 was investigated by the principal component analysis. In Experiment 2, comparisons of components were made using the Mann–Whitney U test. Data analysis from the training sessions of Barnes maze was carried out using repeated measures ANOVA, followed by Fisher LSD post hoc analyses to analyze group differences. Statistical evaluation of the probe trial data was performed using one-way ANOVA, Fisher LSD post hoc analyses.

Results

Experiment 1. Social behavior and catatonia

The catatonic freezing test revealed a mean duration of freezing in the GC and PM rats is by far longer than in the control rats (35.6 ± 3.4 s in GC vs 18.4 ± 3.0 s in WAG, $p < 0.001$; 23.7 ± 3.7 s in PM vs 16.6 ± 4.5 s in Wistar, $p < 0.05$). In addition, a rate of rats in populations that freeze for longer than 10 seconds was estimated. In the GC (95.5 %) and PM (77.3 %) strains, the rate is significantly higher than in the control strains (63.6 and 39.1 %, respectively; $p < 0.01$, $F = 0.0351$ for GC; $F = 0.0155$ for PM).

Component patterns for Experiment 1

Test	Variables	C1	C2	C3
The catatonic freezing test	Catatonic freezing	-0.69	-	-
The resident-intruder test	Freezing in the RI	-	-	0.57
	Mount	-	0.74	-
	Offense	-	-	0.71
	Social exploration	-	0.66	-
The three-chamber test	Sociability index	0.59	-	-
	Social novelty index	-	-	-
	Freezing 1	-0.68	-	-
	Freezing 2	-0.65	-	-

Note. Catatonic freezing – duration of stupor in the catatonic freezing test; Freezing in RI – duration of immobility in the resident-intruder test; Mount – number of mounts in the resident-intruder test; Offense in RI – total duration of aggressive behavior in the resident-intruder test; Social exploration in RI – total duration of non-aggressive social behavior in the resident-intruder test; Sociability index – in the three-chamber paradigm test; Social novelty index – in the three-chamber paradigm test; Freezing 1 and Freezing 2 in the three-chamber test – duration of immobility in the session I and in the session II, respectively, of the three-chamber paradigm test. Only component patterns above 0.55 were recorded.

A study of behavior in the three-chamber paradigm test showed a decrease in the sociability index in the GC rats (18.6 ± 10.2) compared to WAG (56.0 ± 10.1) ($p < 0.05$). The sociability index in the PM rats (35.7 ± 15.4 vs 44.6 ± 14.6), as well as the social novelty index in both groups (-9.4 ± 12.1 in GC, -0.7 ± 15.8 in PM) did not differ from the control (-15.8 ± 12.9 in WAG, -29.6 ± 12.5 in Wistar).

In the resident-intruder test the parameters of resident's behavior in the home cage when adding an intruder were registered and combined in categories (see Methods). The analysis revealed an increased level of social exploration of PM versus Wistar, as well as GC compared to WAG ($p < 0.05$) (Fig. 2). Moreover, unlike the GC, PM rats exhibited more aggressive behavior both in total duration ($p < 0.05$) and short attack latencies (90.3 ± 16.9) compared to Wistar (273.7 ± 65.8 , $p < 0.05$). In addition, the GC and PM strains showed significantly increased sexual behavior ($p < 0.01$), which was estimated in the number of mounts (3.5 ± 0.9 in GC vs 0.0 ± 0 in WAG; 2.9 ± 0.7 in PM vs 0.6 ± 0.4 in Wistar). Non-social activity of the GC and PM rats was significantly lower compared to control ($p < 0.05$ and $p < 0.001$), while the time of inactivity was higher ($p < 0.05$). Thus, the behavior of the GC and PM rats in the home cage when the intruder is placed shifts towards an increase in social interactions with a decrease in exploratory activity.

The principal component analysis of Experiment 1 parameters produced three factors with eigenvalues greater than 1. These three factors explain 57 % of the variance in the correlation matrix. The factor patterns are presented in the Table.

Component 1 (24.1 % of variance) was explained by stupor in the catatonic freezing test (-0.69) and in the three-chamber paradigm test (-0.68 for session I; -0.65 for session II) and sociability index value (0.59).

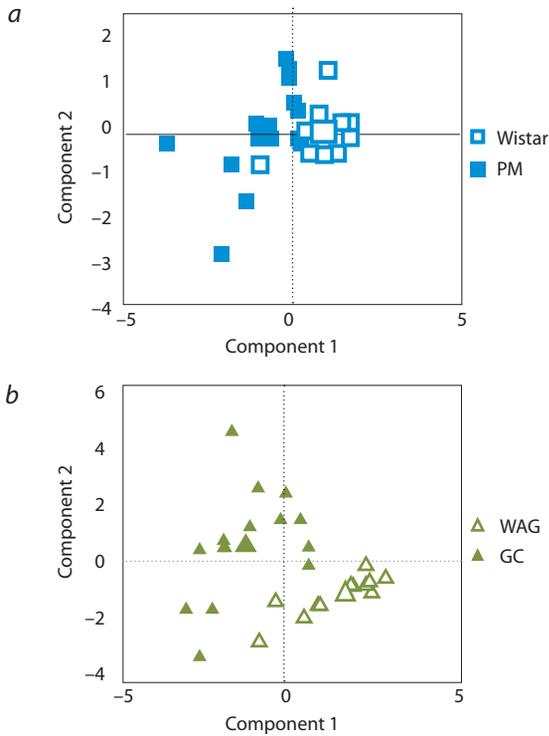


Fig. 3. Principal component scores plot: *a*, the PM compared with Wistar. The mean scores of two principal components are indicated by larger squares; *b*, the GC compared with WAG. The mean scores of two principal components are indicated by larger triangles.

Component 2 (18.7 % of variance) was mainly loaded by number of mounts (0.74) and total duration of non-aggressive social behavior (0.66) in the resident-intruder test.

Component 3 (14.2 % of variance) was loaded by the total duration of aggressive behavior (0.71) and duration of immobility (0.57) in the resident-intruder test.

Mann–Whitney U test procedures showed a strain effect for Component 1 in PM and Wistar rats ($p < 0.001$) (Fig. 3, *a*). For WAG and GC, a significant difference was shown in Component 1 ($p < 0.001$) and Component 2 ($p < 0.01$) (Fig. 3, *b*).

Experiment 2. Barnes maze task

The data analysis revealed that latency time for the GC group was significantly increased in the probe trial when compared to the WAG group ($F[1.26] = 5.9, p < 0.05$) (Fig. 5, *a*). No difference was found between PM and Wistar. The average velocity of movement across the maze field did not differ for Wistar and PM. Comparison of GC and WAG rats speed revealed a significant effect of the test day ($F[4, 108] = 13.7, p < 0.0001$) and the interaction of factors of the genotype and the test day on the speed ($F[4, 108] = 3.95, p < 0.001$) was found. The average velocity of movement across the maze field was significantly lower for GC in day 3 (effect of the genotype factor, $p < 0.001$), in day 4 ($p < 0.05$), in day 5 ($p < 0.05$) (Fig. 4, *b*) and in the probe trial ($F[1.28] = 12, p < 0.01$) (see Fig. 5, *b*). Total distance moved did not differ between groups. The use of spatial strategy increased with the training during the acquisition phase, except for the PM group: in the 7th day

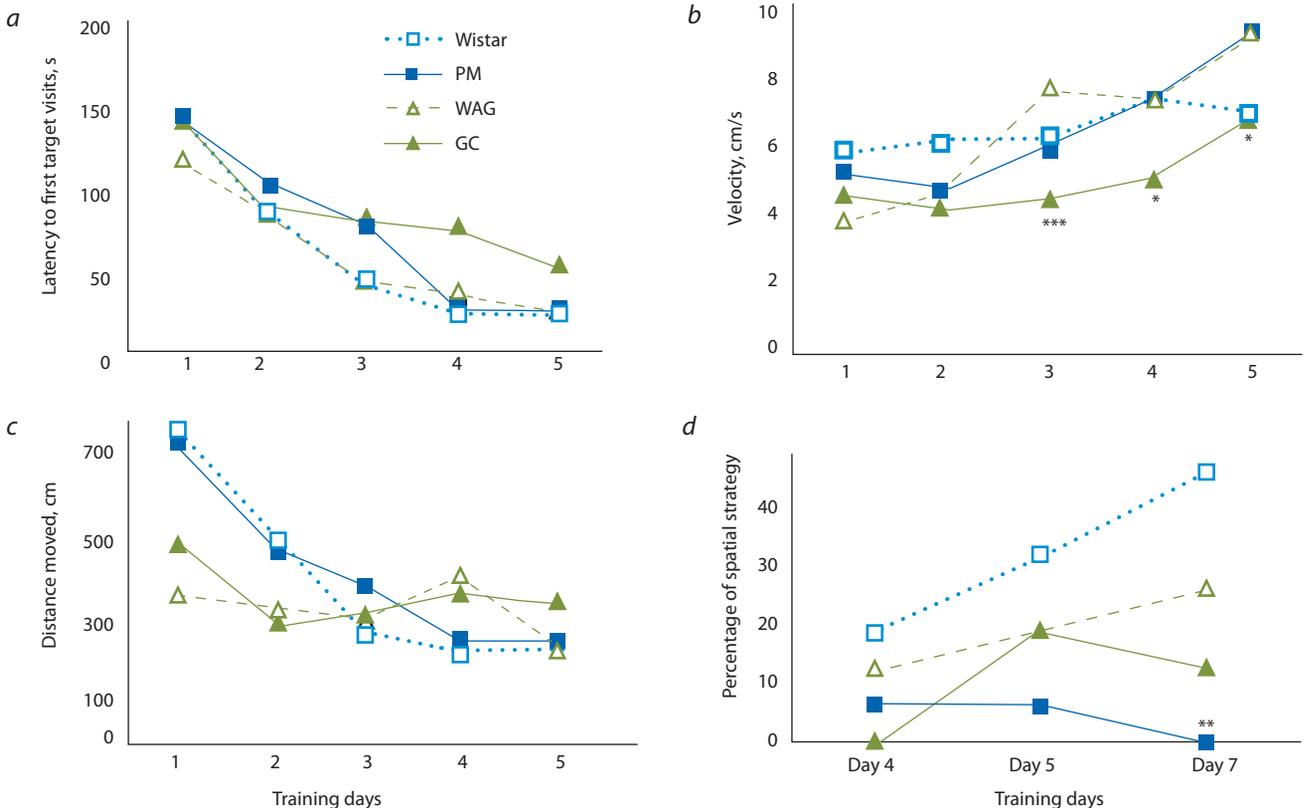


Fig. 4. Spatial learning of the PM and GC rats during the acquisition session in the Barnes maze compared to Wistar and WAG, respectively: *a*, mean latencies to enter the escape hole; *b*, the average velocity of movement across the maze field; *c*, mean distance traveled; *d*, the incidence of spatial strategy in groups.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

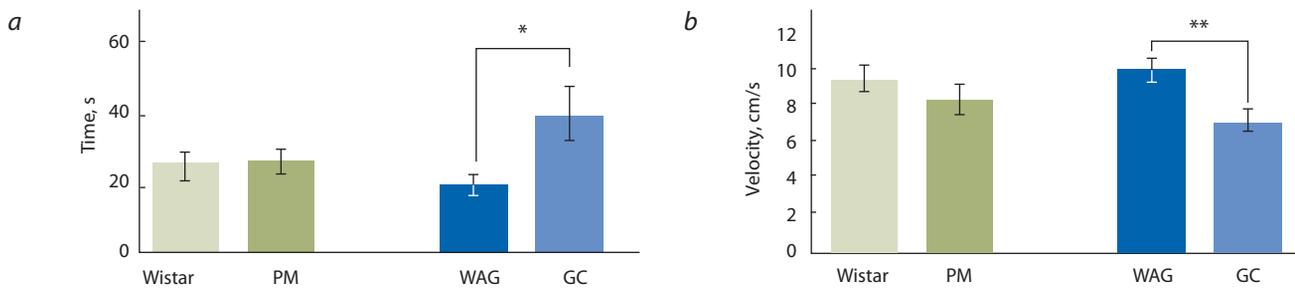


Fig. 5. Probe trial in the Barnes maze of the PM and GC rats compared to Wistar and WAG, respectively: *a*, mean latencies to enter the escape hole; *b*, the average velocity of movement across the maze field.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

of trials, the incidence of spatial strategy in the PM rats was 0 % (0/15) compared to 46.7 % (7/15) in the Wistar rats ($p < 0.01$, $F = 0.0063$, Fisher's exact test) (see Fig. 4, *d*).

There was no significant effect of genetic group on the mean number of errors per trial made during the probe trial.

Discussion

Experiment 1. Social behavior and catatonia

Decreased sociability in the three-chamber test shown by GC rats in this work is consistent with literature data about social abnormalities in different animal models of psychopathologies. Most of the animal models of schizophrenia have decreased or normal social interaction (Jones et al., 2011; Nani et al., 2019). In particular, in the model of negative symptoms of schizophrenia in animals induced by NMDA-receptor antagonists, social interaction deficits have been shown (Neill et al., 2010). DISC-1 mutations known to cause schizophrenia-like abnormalities in rodents can impair cognitive and social behaviors in some transgenic mice (Shevelkin et al., 2017; Sultana, Lee, 2020), but not in rats (Li, Zhang, 2017; Glenn et al., 2021). Research of knockouts of the Neuregulin-1 (NRG1) gene which has been identified as a candidate susceptibility gene for schizophrenia, revealed a selective impairment in response to social novelty in NRG1 mutants, but not in sociability (O'Tuathaigh et al., 2007). Developmental models of schizophrenia, such as using neonatal lesions of the rat ventral hippocampus or prenatal administration of methylazomethanol into pregnant rats, result in deficits in social behavior, as well as impaired memory, and increased anxiety (Sams-Dodd et al., 1997; Winship et al., 2019). Another selective breeding model of psychopathology that exhibits increased freezing to context (but unlike rats of the GC strain only onto acute prior stress) is the Wistar Kyoto (WKY) rats (Nosek et al., 2008). WKY is a depression model characterized by elevated anxiety- and depression-like behavior. In the social interaction assessment, the WKY rats avoided contact with another rats (Nam et al., 2014).

However, in the resident-intruder test, the total time that the GC and PM rats spent on direct contact with a social object (intruder) was significantly higher than that of control. This discrepancy in social activity in the two tests may be explained by different environmental conditions that affect emotional state and motivation. Stress level of the three-chamber test is mostly caused by placing the experimental animal into a novel environment by the experimenter. Earlier

it was shown that the GC rats react more strongly even to the handling required to place the animal in the experimental setup: corticosterone concentrations were increased during handling, but reduced at rest (Alekhina et al., 2016). Such an increased stress reactivity in the GC rats may explain the decrease in sociability index in the three-chamber test due to the passive-defensive reaction in response to handling stress in the three-chamber test, but not in the resident-intruder test, which does not require handling. Previously, it was shown that passive-defensive reflex expressed in the form of catatonic stupor is of dominant character and significantly prevails over cognitive and alimentary reflexes (Petrova, 1990). The results of this work suggest that the predisposition to catatonic stupor also negatively affects social motivation during testing in the three-chamber paradigm.

The data on the increase in social contacts of both GC rats and PM rats in the resident-intruder test shown in this work are of interest. It is known that an increase in social interaction in rodents can be achieved in certain ways, such as medial prefrontal cortex lesions (Gonzalez et al., 2000) or low doses of ethanol (Varlinskaya et al., 2001). At the neurochemical level, a wide variety of systems have been examined for their role in the normal expression of social behavior (Crowley et al., 1989). Oxytocin, vasopressin, endogenous opioids and catecholamines appear to participate in a wide variety of affiliative behaviors (Nelson, Panksepp, 1998). Acute administration of opiate drugs, low dose morphine and naltrexone produced a more robust attenuation of social investigation than non-social exploratory activity in rats. Amphetamine increased both forms of investigation and haloperidol had the opposite effect (Deak et al., 2009). More than that, there is evidence of the involvement of the glutamate system in the formation of social deviations. D-Cycloserine, a partial agonist at the glycine recognition site of the glutamatergic NMDA receptor, can increase social investigation and sexual behavior and decrease aggressiveness in mice (McAllister, 1994). There are results supporting a role of glutamate receptors subunits in the modulation of social behavior (Vekovischeva et al., 2004; Adamczyk et al., 2012), however the study of the glutamate receptors genes mRNA in the hippocampus and frontal cortex of the GC rats did not reveal any changes (Plekanchuk, Ryazanova, 2021).

The increased mounting in the GC and PM rats shown in this paper may be indicative of aggressiveness between rats of the same sex. It has previously been shown that the

GC rats demonstrate a high level of shock-induced aggression (Nikulina et al., 1987), but not aggression towards male rats or interspecies aggression towards mice (Alekhina et al., 1987). In addition, both PM and GC rats have an increased aggressive response towards humans (Alekhina et al., 2016; Alekhina, Kozhemyakina, 2019).

Considering the fact that PM rats, in addition to catatonic symptoms, have a predisposition to audiogenic seizures, the connection between epilepsy and psychopathology in humans should be mentioned. Many symptoms of neurologic or psychiatric illnesses – such as cognitive impairment, depression, anxiety, attention deficits – occur more frequently in people with epilepsy than in the general population (Brooks-Kayal et al., 2013). The rat lines selectively bred for differences in amygdala excitability, manifested by “fast” or “slow” kindling epileptogenesis, display several comorbid features related to anxiety and learning. Seizure-prone genetic background provides poorer original learning and easier disruption of new learning, as well as increased anxiety and impulsivity (McLntyre et al., 2004). Rats in the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy showed disturbed communicative behavior, with impaired social behavioral patterns, increased motor activity and impaired memory function (Smolensky et al., 2019). Aggression is one of several psychiatric disorders that is observed, among others, in epileptic patients (Deb et al., 2020). This association has been reliably replicated in several animal models including those using pilocarpine (Desjardins et al., 2001) and domoic acid (Fuquay et al., 2012), in which aggression develops either in parallel to spontaneous seizures or precedes the development of recurrent seizures. The increased offensive behavior of the PM rats in the resident-intruder test shown in this work may confirm the likely relationship between seizure predisposition and aggressiveness.

Experiment 2. The Barnes maze task

Rodent basal cognitive abilities include, along with elementary logic tasks solutions and generalization capacity of a low level, spatial behavior and memory. This type of cognitive ability requires the formation of mental representations of spatial environmental characteristics (Poletaeva, Zorina, 2014). To test the acquisition of spatial memory in PM and GC, the Barnes maze was used. The increased time required to search for the target hole in the GC rats may indicate impaired spatial learning. However, a decreased locomotor activity has earlier been shown in rats of this line (Petrova, 1990), and to assess whether potential disturbances are in fact memory impairments it is necessary to take into account such parameters as primary errors and search strategy. No differences were shown for these parameters in GC compared to WAG. The reduced GC rats velocity of movement across the maze field for 3–7 days confirms the effect of motor activity on latency to first target visits. The GC rats appear to have no learning impairment in this test. The fact that the velocity of movement of the GC rats in the field does not differ in the first two days of testing, but is less than in the control on the following days, may indicate a slower adaptation to new conditions.

Estimation of the search strategy showed differences in PM in comparison with Wistar. After a few days of training, non-cognitively impaired animals frequently use the spatial

strategy to resolve the BM task. The fact that after a few days of learning trials the PM rats still use mixed (i. e., random) and serial strategies instead of spatial to resolve the maze means that they are cognitively impaired and do not employ spatial clues to reach the target hole (Yassine et al., 2013). It has previously been shown that the PM rats exhibit longer latency and lower rate of successful trials in the Morris water test, at the same time, the GC rats did not differ from the control in these parameters (Barykina et al., 2009). The Morris water maze is more stressful for animals than the Barnes maze, because there is water immersion (Gawel et al., 2019). Water-maze training induced greater increases in plasma corticosterone which may affect the performance of animals (Harrison et al., 2009). In addition, the GC rats are inclined to passive drift and longer floating episodes in the Morris water test (Barykina et al., 2009). Low movement speed in Barnes’s maze, high time of inactivity and low exploratory activity in the resident-intruder test in the GC rats are caused by catatonic freezing. The data shown in this work confirm the manifestation of catatonic inhibition by the GC rats in different stressful situations (Barykina et al., 2009).

Conclusion

Selection for the duration of catatonic freezing and the amplitude of pendulum-like movements influenced social interactions and learning in the GC and PM rat strains. In particular, the GC rats have increased or decreased social interactions depending on the environment, and a negative relationship between catatonic freezing and sociality were shown in this work. The PM rats show increased social activity and offensive aggression in the resident-intruder test. Except for the reduced velocity of movement across the maze field, the GC rats appear to have no difficulty in solving the Barnes maze, whereas the PM rats do not use a spatial strategy in the maze, which may indicate impairment of learning and spatial memory.

References

- Adamczyk A., Mejias R., Takamiya K., Yocum J., Krasnova I.N., Caldero J., Wang T. GluA3-deficiency in mice is associated with increased social and aggressive behavior and elevated dopamine in striatum. *Behav. Brain Res.* 2012;229(1):265-272. DOI 10.1016/j.bbr.2012.01.007.
- Alekhina T.A., Kozhemyakina R.V. Modeling of focal seizures with automatisms in rats with pendulum movements. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019;168(2):300-303. DOI 10.1007/s10517-019-04695-7.
- Alekhina T.A., Palchikova N.A., Igonina T.N., Kuznetsova N.V. Comparative analysis of imipramine intake reactions in catatonic and wistar rats. *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology.* 2015;101(3):249-257. (in Russian)
- Alekhina T.A., Palchikova N.A., Kozhemyakina R.V., Prokudina O.I. The signs of destabilization in behavioral and somatovegetative parameters of rats selected for catatonia. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2016;6(8):798-803. DOI 10.1134/S2079059716080025.
- Alekhina T.A., Prokudina O.I., Ryzanova M.A., Ukolova T.N., Barykina N.N., Kolpakov V.G. Typological characteristics of behavior in strains of rats bred for enhancement and absence of pendulum movements. Association with brain monoamines. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 2007;57(3):336-343. (in Russian)
- Alekhina T.A., Shtilman N.I., Nikulina E.M., Pavlov I.F., Barykina N.N. Aggression and learning in a strain of rats predisposed to catalepsy. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 1987;37(3):537-541. (in Russian)

- Anderzhanova E., Kirmeier T., Wotjak C.T. Animal models in psychiatric research: the RDoC system as a new framework for endophenotype-oriented translational neuroscience. *Neurobiol. Stress.* 2017;7:47-56. DOI 10.1016/j.ynstr.2017.03.003.
- Barykina N.N., Chugui V.F., Alekhina T.A., Ryazanova M.A., Ukolova T.N., Sakharov D.G., Kolpakov V.G. Learning of rats predisposed to catalepsy in Morris water test. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 2009;59(6):728-735. (in Russian)
- Brooks-Kayal A.R., Bath K.G., Berg A.T., Galanopoulou A.S., Holmes G.L., Jensen F.E., Scharfman H.E. Issues related to symptomatic and disease-modifying treatments affecting cognitive and neuropsychiatric comorbidities of epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54 (Suppl.4):44-60. DOI 10.1111/epi.12298.
- Crowley W.R., O'Connor L.H., Feder H.H. Neurotransmitter systems and social behavior. In: Balthazart J. (Ed.) *Molecular and Cellular Basis of Social Behavior in Vertebrates. Advances in Comparative and Environmental Physiology.* Vol. 3. Berlin; Heidelberg; Springer, 1989;161-208. DOI 10.1007/978-3-642-73827-2_4.
- Deak T., Arakawa H., Bekkedal M.Y., Panksepp J. Validation of a novel social investigation task that may dissociate social motivation from exploratory activity. *Behav. Brain Res.* 2009;199(2):326-333. DOI 10.1016/j.bbr.2008.12.011.
- Deb S., Brizard B.A., Limbu B. Association between epilepsy and challenging behaviour in adults with intellectual disabilities: systematic review and meta-analysis. *BJPsych Open.* 2020;6(5):e114. DOI 10.1192/bjo.2020.96.
- Desjardins D., Parker G., Cook L.L., Persinger M.A. Agonistic behavior in groups of limbic epileptic male rats: pattern of brain damage and moderating effects from normal rats. *Brain Res.* 2001;905(1-2): 26-33. DOI 10.1016/S0006-8993(01)02454-4.
- Fink M., Taylor M.A. The many varieties of catatonia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2001;251(Suppl.1):I/8-I/13. DOI 10.1007/p100014200.
- Fuquay J.M., Muha N., Pennington P.L., Ramsdell J.S. Domoic acid induced status epilepticus promotes aggressive behavior in rats. *Physiol. Behav.* 2012;105(2):315-320. DOI 10.1016/j.physbeh. 2011.08.013.
- Gawel K., Gibula E., Marszalek-Grabska M., Filarowska J., Kotlinska J.H. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents – methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2019;392(1):1-18. DOI 10.1007/s00210-018-1589-y.
- Glenn M.J., Batallán Burrowes A.A., Yu W., Blackmer-Raynolds L., Norchi A., Doak A.L. Progression of behavioral deficits during periadolescent development differs in female and male DISC1 knockout rats. *Genes Brain Behav.* 2021;e12741. DOI 10.1111/gbb.12741.
- Gonzalez L.E., Rujano M., Tucci S., Paredes D., Silva E., Alba G., Hernandez L. Medial prefrontal transection enhances social interaction: I: Behavioral studies. *Brain Res.* 2000;887(1):7-15. DOI 10.1016/S0006-8993(00)02931-0.
- Harrison F.E., Hosseini A.H., McDonald M.P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* 2009;198(1):247-251. DOI 10.1016/j.bbr.2008.10.015.
- Jones C.A., Watson D.J.G., Fone K.C.F. Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 2011;164(4):1162-1194. DOI 10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x.
- Kaidonovich-Beilin O., Lipina T., Vukobradovic I., Roder J., Woodgett J.R. Assessment of social interaction behaviors. *J. Vis. Exp.* 2011;48:e2473. DOI 10.3791/2473.
- Kiser D.P., Rivero O., Lesch K.P. Annual research review: the (epi)genetics of neurodevelopmental disorders in the era of whole-genome sequencing – unveiling the dark matter. *J. Child Psychol. Psychiatry.* 2015;56(3):278-295. DOI 10.1111/jcpp.12392.
- Koolhaas J.M., Coppens C.M., de Boer S.F., Buwalda B., Meerlo P., Timmermans P.J. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *J. Vis. Exp.* 2013;77:e4367. DOI 10.3791/4367.
- Krueger R.F., Kotov R., Watson D., Forbes M.K., Eaton N.R., Ruggero C.J., Zimmermann J. Progress in achieving quantitative classification of psychopathology. *World Psychiatry.* 2018;17(3):282-293. DOI 10.1002/wps.20566.
- Li M., Zhang M. SU10. Behavioral characteristics of a DISC1 knockout rat model. *Schizophr. Bull.* 2017;43(Suppl.1):S164. DOI 10.1093/schbul/sbx024.009.
- McAllister K.H. D-cycloserine enhances social behaviour in individually-housed mice in the resident-intruder test. *Psychopharmacology.* 1994;116(3):317-325. DOI 10.1016/0031-9384(86)90007-7.
- McLntyre D.C., McLeod W.S., Anisman H. Working and reference memory in seizure-prone and seizure-resistant rats: impact of amygdala kindling. *Behav. Neurosci.* 2004;118(2):314-323. DOI 10.1037/0735-7044.118.2.314.
- Nam H., Clinton S.M., Jackson N.L., Kerman I.A. Learned helplessness and social avoidance in the Wistar-Kyoto rat. *Front. Behav. Neurosci.* 2014;8:109. DOI 10.3389/fnbeh.2014.00109.
- Nani J.V., Rodríguez B., Cruz F.C., Hayashi M.A.F. Animal models in psychiatric disorder studies. In: Tvrdá E., Yenisseti S.C. (Eds.) *Animal Models in Medicine and Biology.* IntechOpen, 2019. DOI 10.5772/intechopen.89034.
- Neill J.C., Barnes S., Cook S., Grayson B., Idris N.F., McLean S.L., Harte M.K. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol. Ther.* 2010;128(3):419-432. DOI 10.1016/j.pharmthera.2010.07.004.
- Nelson E.E., Panksepp J. Brain substrates of infant-mother attachment: contributions of opioids, oxytocin, and norepinephrine. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1998;22(3):437-452. DOI 10.1016/S0149-7634(97)00052-3.
- Nikulina E.M., Popova N.K., Kolpakov V.G., Alekhina T.A. Brain dopaminergic system in rats with a genetic predisposition to catalepsy. *Biog. Amines.* 1987;4(4-6):399-406.
- Nosek K., Dennis K., Andrus B.M., Ahmadiyeh N., Baum A.E., Woods L.C.S., Redei E.E. Context and strain-dependent behavioral response to stress. *Behav. Brain Funct.* 2008;4(1):1-8. DOI 10.1186/1744-9081-4-23.
- O'Tuathaigh C.M.P., Babovic D., O'Sullivan G.J., Clifford J.J., Tighe O., Croke D.T., Waddington J.L. Phenotypic characterization of spatial cognition and social behavior in mice with 'knockout' of the schizophrenia risk gene neuregulin 1. *Neuroscience.* 2007;147(1): 18-27. DOI 10.1016/j.neuroscience.2007.03.051.
- Petrova E.V. Features of changes in congenital and acquired forms of behavior in rats with genetic catalepsy. *Zhurnal Vysshey Nervnoy Deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 1990;40(3):475-480. (in Russian)
- Plekanchuk V.S., Ryazanova M.A. Expression of glutamate receptor genes in the hippocampus and frontal cortex in GC rat strain with genetic catatonia. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2021;57(1):156-163. DOI 10.1134/s0022093021010154.
- Poletaeva I.I., Zorina Z.A. A genetic approach to the study of simple cognitive abilities in animals. *Rossiyskiy Zhurnal Kognitivnoy Nauki = Russian Journal of Cognitive Science.* 2014;1(3):31-55.
- Powell C.M., Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol. Psychiatry.* 2006;59(12):1198-1207. DOI 10.1016/j.biopsych.2006.05.008.
- Ryazanova M.A., Igonina T.N., Alekhina T.A., Prokudina O.I. The increase in the proportion of nervous animals bred for catatonia: the participation of central adrenoreceptors in catatonic reactions. *Russ. J. Genet.* 2012;48:1141-1147. DOI 10.1134/S1022795412100092.
- Ryazanova M.A., Prokudina O.I., Plekanchuk V.S., Alekhina T.A. Expression of catecholaminergic genes in the midbrain and pre-pulse inhibition in rats with a genetic catatonia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21(7):798-803. DOI 10.18699/VJ17.296. (in Russian)

- Sams-Dodd F., Lipska B.K., Weinberger D.R. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology*. 1997;132(3):303-310. DOI 10.1007/s002130050349.
- Sansom J.N., Wong A.H.C. Schizophrenia and depression co-morbidity: what we have learned from animal models. *Front. Psychiatry*. 2015;6:13. DOI 10.3389/fpsy.2015.00013.
- Shevelkin A.V., Terrillion C.E., Abazyan B.N., Kajstura T.J., Jouroukhin Y.A., Rudow G.L., Pletnikov M.V. Expression of mutant DISC1 in Purkinje cells increases their spontaneous activity and impairs cognitive and social behaviors in mice. *Neurobiol. Dis.* 2017;103:144-153. DOI 10.1016/j.nbd.2017.04.008.
- Smolensky I.V., Zubareva O.E., Kalemenev S.V., Lavrentyeva V.V., Dyomina A.V., Karepanov A.A., Zaitsev A.V. Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Behav. Brain Res.* 2019;372:112044. DOI 10.1016/j.bbr.2019.112044.
- Stansley B.J., Yamamoto B.K. Behavioral impairments and serotonin reductions in rats after chronic L-dopa. *Psychopharmacology*. 2015;232(17):3203-3213. DOI 10.1007/s00213-015-3980-4.
- Sultana R., Lee C.C. Expression of behavioral phenotypes in genetic and environmental mouse models of schizophrenia. *Front. Behav. Neurosci.* 2020;14:29. DOI 10.3389/fnbeh.2020.00029.
- Timofeeva A.S. (Ed.) Genetic and Evolutionary Problems in Psychiatry. Novosibirsk: Nauka Publ., 1985. (in Russian)
- Varlinskaya E.I., Spear L.P., Spear N.E. Acute effects of ethanol on behavior of adolescent rats: role of social context. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2001;25(3):377-385. DOI 10.1111/j.1530-0277.2001.tb02224.x.
- Vekovischeva O.Y., Aitta-aho T., Echenko O., Kankaanpää A., Seppälä T., Honkanen A., Korpi E.R. Reduced aggression in AMPA-type glutamate receptor GluR-A subunit-deficient mice. *Genes Brain Behav.* 2004;3(5):253-265. DOI 10.1111/j.1601-1848.2004.00075.x.
- Volavka J., Citrome L. Heterogeneity of violence in schizophrenia and implications for long-term treatment. *Int. J. Clin. Pract.* 2008;62(8):1237-1245. DOI 10.1111/j.1742-1241.2008.01797.x.
- Wilson J.E., Niu K., Nicolson S.E., Levine S.Z., Heckers S. The diagnostic criteria and structure of catatonia. *Schizophr. Res.* 2015;164(1-3):256-262. DOI 10.1016/j.schres.2014.12.036.
- Winship I.R., Dursun S.M., Baker G.B., Balista P.A., Kandratavicius L., Maia-de-Oliveira J.P., Howland J.G. An overview of animal models related to schizophrenia. *Can. J. Psychiatry.* 2019;64(1):5-17. DOI 10.1177/0706743718773728.
- Yassine N., Lazaris A., Dornier-Ciossek C., Després O., Meyer L., Maître M., Mathis C. Detecting spatial memory deficits beyond blindness in tg2576 Alzheimer mice. *Neurobiol. Aging.* 2013;34(3):716-730. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.016.

ORCID ID

V.S. Plekanchuk orcid.org/0000-0002-3492-0513

Acknowledgements. The authors thank R.V. Kozhemyakina, Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia, for help with planning the experiment. This work was supported by the Ministry of Education and Science of Russian Federation, grant No. 2019-0546 (FSUS-2020-0040) and budget project No. FWNR-2022-0019.

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

Received September 17, 2021. Revised November 13, 2021. Accepted December 1, 2021.

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

Молекулярно-генетические подходы к видовой идентификации паразитических плоских червей рода *Ligophorus* (Monogenea), обитающих на лобане

Е.А. Водясова¹✉, Э.С. Челебиева¹, О.В. Шихат¹, Д.М. Атопкин², Е.В. Дмитриева¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук», Севастополь, Россия

² Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, Дальневосточное отделение Российской академии наук, Владивосток, Россия

✉ eavodiasova@gmail.com

Аннотация. *Mugil cephalus* L., 1758 (лобан) – ценная промысловая рыба и перспективный объект разведения в бассейнах Черного и Азовского морей. Изучение его паразитофауны крайне важно для рыбного промысла и марикультуры. Одними из массовых эктопаразитов, обитающих на жабрах кефалевых, являются моногенеи рода *Ligophorus*. На лобане в Азово-Черноморском регионе паразитируют два представителя этого рода: *Ligophorus mediterraneus* Sarabeev, Balbuena et Euzet, 2005 и *Ligophorus cephalis* Rubtsova, Balbuena, Sarabeev, Blasco-Costa et Euzet, 2006. Морфологическое определение этих видов весьма трудоемко и требует высокого уровня квалификации. Для быстрого и точного различия двух названных видов паразитов нами разработан метод, основанный на ПЦР переменных участков рибосомного гена 28S. Данный ген широко используется для молекулярной таксономии рода *Ligophorus*. В настоящей работе применялись три подхода: анализ длины амплифицированных фрагментов, аллель-специфичная ПЦР с детекцией в конечной точке и аллель-специфичная ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. Первый подход заключался в подборе праймеров для получения ПЦР-продуктов различной длины, которые были характерны для *L. mediterraneus* или *L. cephalis*. Этот подход был осуществлен благодаря наличию нескольких переменных локусов, которые находятся на расстоянии друг от друга. ПЦР-смесь содержала три праймера: один прямой и два обратных. Прямой праймер был комплементарен консервативному участку, который не различался между видами. Обратные праймеры были видоспецифичны, при этом для каждого вида они были комплементарны различным участкам ДНК, которые расположены на удалении 100 п. н. друг от друга. В результате *L. mediterraneus* характеризовался более короткими ампликонами, чем *L. cephalis*. Для второго и третьего подхода конструировалась пара праймеров по следующему принципу: прямой праймер был комплементарен обоим видам, так как подбирался к консервативному участку гена. Обратные праймеры были видоспецифичными и разрабатывались к переменному участку 28S. На этом участке два вида паразита различались тремя точечными мутациями. Таким образом, одна пара праймеров была комплементарна *L. mediterraneus*, вторая – *L. cephalis*. Анализ длины амплифицированных фрагментов и аллель-специфичная ПЦР в реальном времени продемонстрировали 100 % совпадение результатов генотипирования при сравнении с морфологической идентификацией и секвенированием по Сэнгеру. Разработанные протоколы генотипирования могут быть использованы не только для различия обитающих на лобане двух видов *Ligophorus* при экологических исследованиях и в ветеринарной практике, но и для последующей разработки подобных методов для других моногеней, среди которых много патогенных видов.

Ключевые слова: генотипирование; аллель-специфичная ПЦР; Monogenea; *Ligophorus*; *Mugil cephalus*.

Для цитирования: Водясова Е.А., Челебиева Э.С., Шихат О.В., Атопкин Д.М., Дмитриева Е.В. Молекулярно-генетические подходы к видовой идентификации паразитических плоских червей рода *Ligophorus* (Monogenea), обитающих на лобане. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3):290-297. DOI 10.18699/VJGB-22-36

Molecular-genetic approaches to species identification of platyhelminthes of the genus *Ligophorus* (Monogenea) parasitising flathead mullet

Е.А. Vodiasova¹✉, E.S. Chelebieva¹, O.V. Shikhat¹, D.M. Atopkin², E.V. Dmitrieva¹

¹ A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

² Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

✉ eavodiasova@gmail.com

Abstract. *Mugil cephalus* L., 1758 (flathead mullet) is a valuable commercial fish and a promising object of artificial breeding in the Black Sea and the Sea of Azov, and the study of its parasite fauna is important for fishery and mariculture. Monogeneans of the genus *Ligophorus* are common ectoparasites dwelling on the gills of mullets. Two representatives of this genus parasitise flathead mullet in the Azov-Black Sea region, namely *Ligophorus*

mediterraneus Sarabeev, Balbuena et Euzet, 2005 and *Ligophorus cephalis* Rubtsova, Balbuena, Sarabeev, Blasco-Costa et Euzet, 2006. Morphological identification of these species requires spending much time and a high level of experience in monogenean taxonomy. For quick and correct species identification of these parasites, we have developed a genotyping approach based on the polymerase chain reaction of allele-specific gene sites for various Monogenea species. A fragment of the 28S ribosomal gene, which includes conserved and variable sites, was chosen as a genetic marker. Three approaches were used as follows: amplified fragment length analysis, allele-specific PCR with endpoint detection and allele-specific real-time PCR using SYBR Green intercalating dye. The first approach was by obtaining PCR products of different lengths that were specific either to *L. mediterraneus* or to *L. cephalis*. This approach was implemented due to the presence of several variable sites located at a distance from each other. The PCR mixture contained three primers: one forward and two reverse. The forward primer was complementary to the conserved site, which did not differ between species. Reverse primers were species-specific and, for each species, they were complementary to different DNA regions located 100 bp apart. As a result, *L. mediterraneus* was characterized by shorter amplicons than *L. cephalis*. For the second and third approaches, a pair of primers was designed according to the following principle: the forward primer was complementary to both species, since it was selected for the conserved gene region. Reverse primers were species-specific and were designed for the 28S variable region. The two parasite species were distinguished by three-point mutations. Thus, one pair of primers was complementary to *L. mediterraneus*, the other, to *L. cephalis*. The amplified fragment length analysis and the allele-specific real-time PCR demonstrated 100 % coincidence of genotyping results compared with Sanger sequencing. The developed genotyping protocols can be used not only to distinguish two species of *Ligophorus* from flathead mullet in ecological studies and veterinary practice but also for further development of similar approaches for other monogeneans, among which there are many pathogenic species.

Key words: genotyping; allele-specific PCR; Monogenea; *Ligophorus*; *Mugil cephalus*.

For citation: Vodiasova E.A., Chelebieva E.S., Shikhat O.V., Atopkin D.M., Dmitrieva E.V. Molecular-genetic approaches to species identification of platyhelminthes of the genus *Ligophorus* (Monogenea) parasitising flathead mullet. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):290-297. DOI 10.18699/VJGB-22-36

Введение

Моногенеи (Platyhelminthes: Monogenea) – паразиты, преимущественно рыб, имеющие прямой жизненный цикл. Каждый год описывают десятки новых таксонов этих паразитов. Их разнообразие достигло 5000 видов (Vanhove, 2013), и многие имеют эпизоотическое значение (Cribb et al., 2002; Bakke et al., 2007; Rubio-Godoy, 2007). Границы большинства видов установлены на основании морфологических критериев, а для видовой идентификации используются главным образом форма и размеры структур прикрепительного диска (Yamaguti, 1963; Гусев и др., 1985; Pugachev et al., 2009; Vignon, 2011; Strona et al., 2014; Kalafi et al., 2016). Однако эти структуры имеют высокую внутривидовую изменчивость (Ergens, Gelnar, 1985; Caltran et al., 1995; Dmitrieva, Dimitrov, 2002; Olstad et al., 2009; Mladineo et al., 2013). Последнее существенно затрудняет определение видовой принадлежности моногеней, а также ставит вопрос об установлении рамок их внутри- и межвидовой изменчивости. Сопоставление с реальными коллекционными образцами для подтверждения определения часто осложнено из-за труднодоступности коллекций с типовыми материалами. Сравнение организмов с множеством «похожих» видов из разных районов по кратким описаниям и порой неточным рисункам далеко не всегда позволяет достоверно определить вид. В результате увеличение числа «ложных» и недооценка «скрытых» видовых таксонов могут приводить к неправильному пониманию филогенеза, разнообразия и распространения представителей отдельных групп моногеней (Poiso et al., 2011), а иногда к проблемам с определением статуса патогенных видов, как, например, в случае с *Gyrodactylus salaris* и *G. thymalli* (Fromm et al., 2014; Mieszkowska et al., 2018).

В связи с вышесказанным разработка подходов и методов, позволяющих максимально точно идентифицировать виды моногеней, остается актуальной задачей как в теоретическом, так и в практическом плане. Одним из перспективных направлений в молекулярно-генетических исследованиях паразитов является разработка методов генотипирования видов и внутривидовых локальных группировок, как для целей исследования биоразнообразия отдельных таксонов, так и для целей экспресс-диагностики видов и их популяций (Токарев и др., 2015). В отношении моногеней такие работы единичны (Fromm et al., 2013, 2014; Mieszkowska et al., 2018), при этом в нескольких статьях рассматриваются проблемы ДНК-баркодинга видов моногеней (Littlewood, 2008; Vanhove, 2013). Молекулярные исследования моногеней рода *Ligophorus* Euzet et Suriano, 1977 ограничены несколькими работами, по результатам которых в базе GenBank NCBI размещено 135 последовательностей рибосомного кластера яДНК (на 27.11.2021). Фрагменты 18S, ITS1, 5.8S и 28S получены для 12 видов из Средиземного моря и двух видов из Черного моря (Blasco-Costa et al., 2012; Rodríguez-González et al., 2015). Для двух видов у побережья Бразилии секвенированы 18S, ITS1, 5.8S и 28S (Marchiori et al., 2015), а для 14 видов из Индийского океана получены фрагменты 18S, 28S и ITS1 (Soo et al., 2015; Khang et al., 2016; Pakdee et al., 2019). В ряде исследований (Blasco-Costa et al., 2012; Rodríguez-González et al., 2015; Khang et al., 2016) проводилось сравнение морфологической и генетической изменчивости, показавшее большую степень конгруэнтности между филогенетическими реконструкциями, основанными на этих данных, что позволяет предполагать перспективность применения последовательностей рибосомного кластера для генотипирования видов этого рода.

Лобан *Mugil cephalus* L., 1758 относится к промысловым рыбам Черного и Азовского морей, а также перспективным объектам марикультуры в регионе, поэтому изучение его паразитофауны крайне важно не только с научной, но и с практической стороны. Моногенеи рода *Ligophorus*, обитающие на жабрах кефалевых, являются для лобана одними из массовых эктопаразитов. В Азово-Черноморском регионе на лобане регистрируются *L. mediterraneus* Sarabeev, Balbuena et Euzet, 2005 и *L. cephalis* Rubtsova, Balbuena, Sarabeev, Blasco-Costa et Euzet, 2006, имеющие морфологически сходные прикрепительные структуры (Dmitrieva et al., 2009a, b), что затрудняет их видовое определение. В то же время данные виды имеют хороший уровень генетической дивергенции по рибосомным генам 28S и ITS1 (Blasco-Costa et al., 2012). Такое расхождение обусловлено одиночными нуклеотидными заменами, которые характерны для *L. cephalis* и *L. mediterraneus*. При оценке зараженности этими видами больших выборок рыб, например при выполнении экологических исследований или при ветеринарно-санитарных обследованиях, использование морфологических признаков затруднительно, а секвенирование с последующим проведением молекулярной таксономии занимает много времени и требует больших финансовых затрат. Кроме того, на одной особи кефали могут паразитировать до восьми видов *Ligophorus* (Dmitrieva et al., 2012; Soo et al., 2015). Эта ситуация не уникальна, она встречается в отношении видов одного рода у многих представителей семейства Dactylogyridae, к которым относятся и лигофорусы.

С появлением ПЦР в реальном времени стали создавать альтернативные подходы для генотипирования, основанные на аллель-специфической ПЦР, которые позволяют быстро и надежно провести видовую идентификацию. Однако для представителей семейства Dactylogyridae эти подходы не использовались. Таким образом, нашей целью было разработать экспресс-методику, с помощью которой можно различить два вида моногеней *L. cephalis* и *L. mediterraneus*, паразитирующих на лобане в Азово-Черноморском регионе, на основе изменчивости гена 28S. Учитывая, что многие представители Dactylogyridae имеют эпизоотическое значение, разработка простых и недорогих методов экспресс-генотипирования видов этого таксона для различия патогенных и непатогенных видов, в том числе на стадии личинки, актуальна и в практическом смысле.

Материалы и методы

Сбор материала. Материалом для работы послужили 20 экземпляров моногеней рода *Ligophorus*, собранных с жабр трех особей *Mugil cephalus* осенью 2019 г. в Черном море у побережья Крыма, в Балаклавской бухте. Червей собирали живыми, из части особи подготавливали глицерин-желатиновый препарат (Гусев, 1983) для идентификации видов по морфологии структур прикрепительного диска, другую часть этой же моногенеи фиксировали в 96 % этаноле для молекулярно-генетических исследований.

Таксономическая идентификация. Видовое определение проводили по форме и размерам срединных крючков и соединительных пластинок моногеней с использованием микроскопа Olympus CX41 и фазово-контрастной

оптики при увеличении $\times 800$ – 2000 на основе описаний видов *Ligophorus* от черноморских кефалей (Dmitrieva et al., 2009a, b). Измерения и фотографирование осуществляли с помощью программы для обработки цифровых изображений CellSense.

Выделение ДНК и молекулярно-генетический анализ. Выделение проводили с использованием набора «ДНК-экстран» (ООО «Синтол», Россия). Каждую особь инкубировали в 100 мкл лизирующего буфера (ООО «Синтол») с 5 мкл протеиназы К (ООО «Синтол») и 1 мкл 2-меркаптоэтанола при температуре 56 °C в течение 3 ч. После лизирования пробы встряхивали 20 с и дальнейшее выделение ДНК выполняли согласно рекомендациям производителя. Элюцию ДНК проводили в 30 мкл. Выделенную ДНК хранили при –20 °C.

Для молекулярной таксономии вида в качестве генетического маркера был выбран рибосомный ген 28S, который используется при анализе данного рода (Blasco-Costa et al., 2012; Soo et al., 2015; Pakdee et al., 2019). Фрагмент гена 28S амплифицировали с помощью праймеров U178 (5'-GCACCCGCTGAAУТТАAG-3') и LSU1200R (5'-GCATAGTTCACCATCTTTCCGG-3') (Littlewood et al., 2000; Lockyer et al., 2003) по следующему протоколу: предварительная денатурация при 95 °C в течение 3 мин; затем 38 циклов (денатурация при 94 °C – 40 с, отжиг при 56 °C – 30 с, синтез при 72 °C – 45 с). Каждую ПЦР-реакцию выполняли в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1–10 нг матричной ДНК, по 0.4 мкМ каждого праймера, 5x ПЦР-смесь ScreenMix с Taq-полимеразой (ООО «Евроген», Россия). Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1 % агарозном геле, окрашиванием бромидом этидия и визуализацией в ультрафиолетовом свете. ПЦР-продукты секвенировали в обоих направлениях с помощью стандартного набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems Inc.). Полученные фрагменты 28S выравнивали в программе BIOEDIT (Hall, 1999), *L. mediterraneus* (JN996829, JN996828, JN996827) и *L. cephalis* (JN996830) выбрали в качестве референсных последовательности. Все нуклеотидные последовательности, полученные в ходе этого исследования, депонированы в международный банк генетических данных GenBank: *L. mediterraneus* (MZ413895–MZ413898) и *L. cephalis* (MZ413887–MZ413893).

Подбор праймеров для генотипирования *L. mediterraneus* и *L. cephalis*. Анализ фрагмента рибосомного гена 28S не выявил внутривидовой изменчивости по данному генетическому маркеру. Все нуклеотидные последовательности для каждого вида моногеней с лобана как из Средиземного моря (JN996829, JN996828, JN996827, JN996830), так и из Черного моря (данная работа) были идентичны. Всего было проанализировано семь последовательностей фрагмента 28S для *L. mediterraneus* и восемь последовательностей для *L. cephalis*. В то же время обнаружено несколько участков, имеющих характерные для *L. mediterraneus* и *L. cephalis* мутации в районе 450–480, 540–570 и 680–705 п. н. (рис. 1).

Для генотипирования отбирали те области ДНК, которые различались минимум на три нуклеотидные замены между двумя видами. Подбор праймеров, фланкирующих

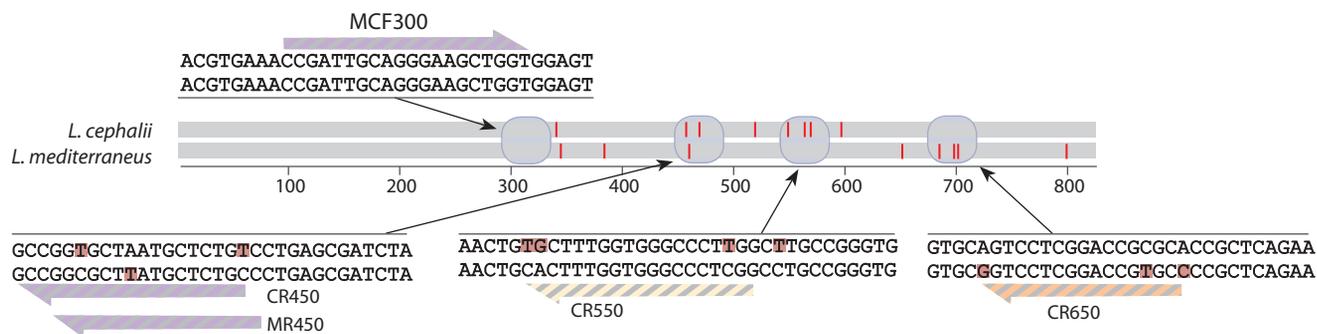


Рис. 1. Консервативные и полиморфные участки рибосомного гена 28S для *L. mediterraneus* и *L. cephalii*.

Таблица 1. Последовательности разработанных праймеров, используемых для генотипирования

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'	Температура плавления, °C
MCF300	AAACCGATTGCAGGGAAGCTGG	59.8
CR450	GGACAGAGCATTAGCACCGGC	60.0
MR450	GGCAGAGCATAAGCGCCG	60.7
CR550	AGCCAAGGGCCACCAAAGCA	63.4
CR650	GTGCGCGTCCGAGGACT	61.5

Таблица 2. Использование разработанных праймеров в зависимости от выбранного метода генотипирования

Метод	Праймер		Длина фрагмента, п. н.	Вид
	прямой	обратный		
Анализ длин ПЦР-продукта	U178	MR450	630	<i>L. mediterraneus</i>
		CR550	750	<i>L. cephalii</i>
	U178	MR450	630	<i>L. mediterraneus</i>
		CR650	880	<i>L. cephalii</i>
Аллель-специфическая ПЦР в конечной точке	U178	MR450	630	<i>L. mediterraneus</i>
		CR450	630	<i>L. cephalii</i>
Аллель-специфическая ПЦР в режиме реального времени	MCF300	MR450	170	<i>L. mediterraneus</i>
		CR450	170	<i>L. cephalii</i>

полиморфные регионы, производился с использованием интернет-ресурса <https://benchling.com/>. Разработанные праймеры представлены в табл. 1.

Все обратные праймеры были протестированы на уровень идентичности к другим видам с помощью алгоритма blastn по генетической базе данных NCBI. Проверка была только для обратных праймеров, так как именно они обуславливают определение вида. По результатам праймеры CR450 и CR550 показали 100 % идентичность при 100 % покрытии только к виду *L. cephalii*. Праймер MR450 кроме 100 % идентичности к *L. mediterraneus* продемонстрировал такую же идентичность к виду *L. saladensis* (номер GenBank KF442629). Данный вид встречается только у берегов Бразилии и обитает на другом хозяине – *Mugil liza*. Схожая ситуация и с прай-

мером CR650: помимо 100 % идентичности с *L. cephalii*, обнаружена 100 % идентичность с *L. heteronchus* (номер GenBank JN996812). Этот паразит тоже обитает на другом хозяине – *Planiliza saliens*. Таким образом, среди всех известных паразитов лобана разработанные нами праймеры позволяют идентифицировать два вида – *L. mediterraneus* и *L. cephalii*, что дает возможность использовать их не только в Азово-Черноморском бассейне.

Анализ длин амплифицированных фрагментов. Для генотипирования на основе анализа различных длин ампликонов было выбрано два варианта смеси праймеров. В первом случае длины ампликонов, характерные для *L. mediterraneus* и *L. cephalii*, различались на 120 нуклеотидов, во втором – на 250 нуклеотидов (табл. 2). Суть разработанного нами подхода заключается в следующем.

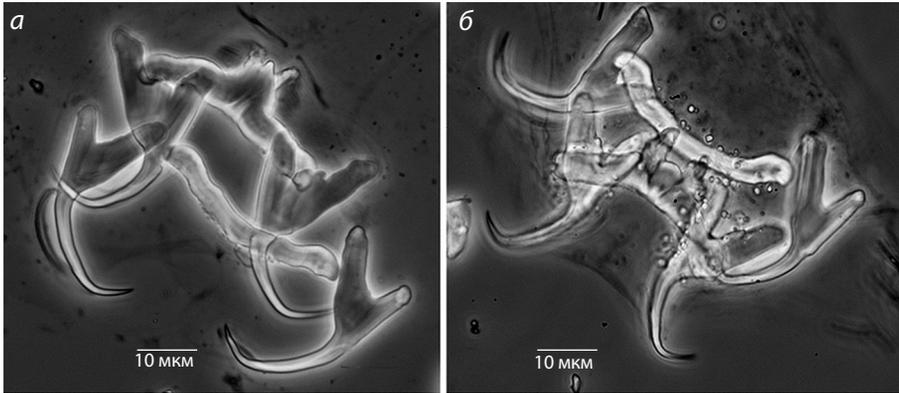


Рис. 2. Структуры прикрепительных дисков моногеней *L. cephalis* (а) и *L. mediterraneus* (б), собранных с жабр лобана *Mugil cephalus* в Черном море у побережья Крыма.

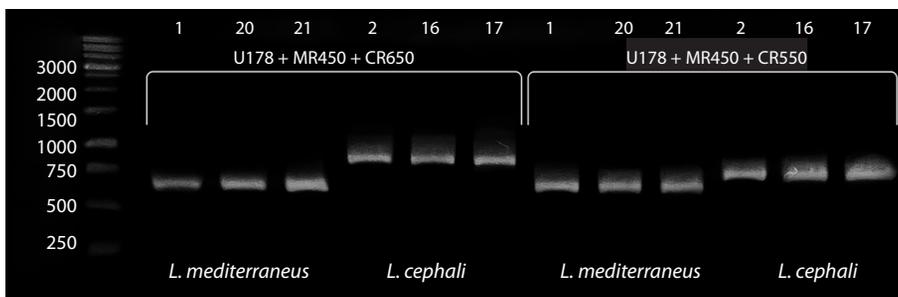


Рис. 3. Типирование образцов ДНК при помощи анализа длины амплифицированных фрагментов. Здесь и на рис. 4: вверху указаны номера исследуемых особей и используемая смесь праймеров, внизу – вид, который был определен на основе морфологии и молекулярной таксономии.

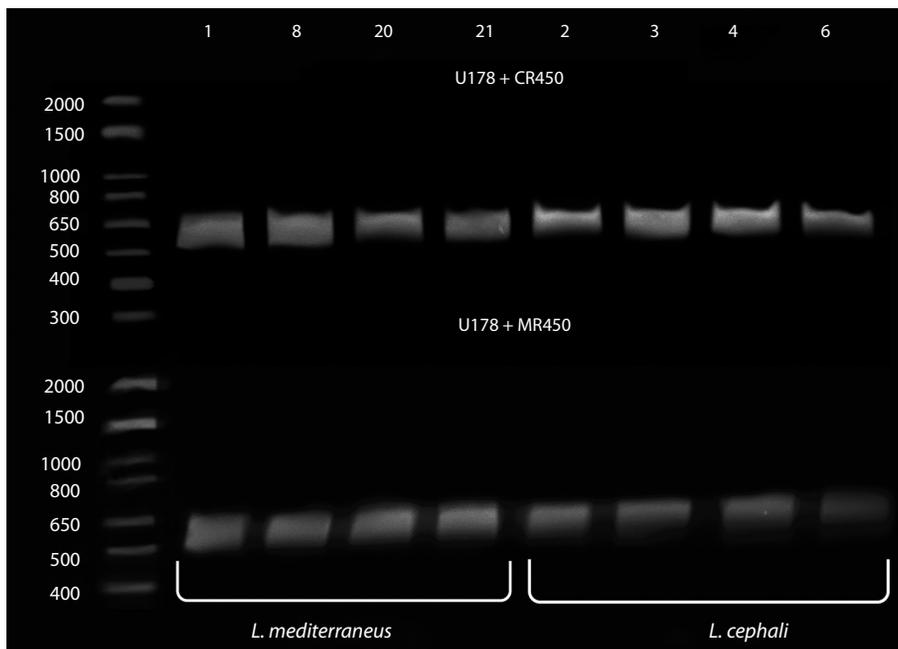


Рис. 4. Типирование образцов ДНК при помощи аллель-специфичной ПЦР с детекцией в конечной точке.

В ПЦР-смесь добавляются не два праймера (как при традиционной ПЦР), а три. Один праймер (прямой, U178) является комплементарным консервативному участку 28S и, соответственно, будет отжигаться у обоих видов. Вторым праймер (обратный) разрабатывали для участка, который различается между двумя видами

на несколько мутаций. В данной смеси это праймер MR450, который комплементарен последовательности, характеризующей вид *L. mediterraneus*. Третий праймер (обратный, CR550 или CR650) также разрабатывали для участка, который различается между двумя видами на несколько мутаций, но комплементарен *L. cephalis*.

Таким образом, в зависимости от матрицы ДНК будет происходить отжиг и наработка продукта с участием только одного из двух обратных праймеров. Обратные праймеры подобраны таким образом, что в случае отжига MR450 будет нарабатываться продукт длиной 630 п. н., а при отжиге другого обратного праймера длина ампликона будет длиннее. Так, при использовании праймера CR550 длина составит 750 п. н., а при использовании CR650 – 880 п. н. В результате постановки ПЦР-реакции с тремя праймерами можно различить два вида лигофорусов, основываясь на длине ампликонов.

Соотношение в ПЦР-смеси и условия амплификации были одинаковыми в обоих вариантах. Объем реакционной смеси 20 мкл. Конечная концентрация каждого праймера (ООО «Евроген», Россия) 0.25 мкМ. Амплификация проходила по следующему протоколу: предварительная денатурация при 95 °С – 3 мин, затем 38 циклов (денатурация при 94 °С – 40 с, отжиг при 56 °С – 30 с, синтез при 72 °С – 45 с). Детекцию продуктов амплификации проводили с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, окрашиванием бромидом этидия и визуализацией в ультрафиолетовом свете. Для видов моногеней была характерна своя длина ампликона, которая указана в табл. 1.

Аллель-специфичная ПЦР в конечной точке и ПЦР в реальном времени. Генотипирование на основе аллель-специфичной ПЦР с детекцией ПЦР-продукта в конечной точке, как и в режиме реального времени, проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл. Конечная концентрация каждого праймера (ООО «Евро-

ген», Россия) составляла 0.2 мкМ. Используемые пары праймеров для каждого подхода указаны в табл. 2. Амплификация с детекцией ПЦР-продукта в конечной точке проходила по такому же протоколу, как и для анализа длин амплифицированных фрагментов.

При тестировании метода генотипирования с помощью аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени каждый образец анализировали в трех повторностях. Объем и состав реакционной смеси не менялся, тогда как условия амплификации были изменены: предварительная денатурация при 95 °С – 3 мин и затем 40 циклов (денатурация при 95 °С – 10 с, отжиг при 60 °С – 10 с, синтез при 72 °С – 30 с). В конце анализировали кривую плавления для оценки образования димеров праймеров.

Результаты и обсуждение

Морфологическая идентификация видов

Среди 20 собранных особей по морфологии идентифицировано два вида (рис. 2): 9 экземпляров *L. cephalis* (пробы № 2, 3, 4, 6, 7, 10, 16, 17, 19) и 11 экземпляров *L. mediterraneus* (пробы № 1, 5, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 20, 21).

Идентификация видов

с помощью различных методов генотипирования

Для всех 20 особей проводился морфологический анализ, с помощью которого были идентифицированы виды моногеней. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей фрагмента рибосомного гена 28S подтвердил морфологическую идентификацию 11 особей и позволил выделить участки, по которым различаются эти два вида (см. рис. 1). Затем ко всем 20 особям *Ligophorus* были применены описанные выше методы разделения двух видов на основе аллель-специфичной ПЦР для оценки их эффективности.

Метод генотипирования анализа длины ПЦР-продуктов двух полиморфных участков рибосомного гена 28S показал четкое разделение видов *L. cephalis* и *L. mediterraneus* (рис. 3). При использовании обоих вариантов смеси праймеров (U178+MR450+CR650 и U178+MR450+CR550) для всех особей наблюдалась амплификация ПЦР-продуктов только с одним обратным праймером, который имел полную комплементарность к исследуемому участку 28S.

При генотипировании аллель-специфичной ПЦР с детекцией в конечной точке для каждой пробы ставилось две реакции амплификации с разным составом праймеров. В одном варианте обратный праймер был комплементарен участку гена 28S, характерному для *L. mediterraneus* (MR450), в другом – этому же участку гена 28S, характерному для *L. cephalis* (CR450). Праймеры отличались на три нуклеотида. В ходе работы не удалось подобрать условия амплификации, при которых не происходило бы отжига праймеров, которые не полностью комплементарны. В результате при детекции в агарозном геле в конечной точке ПЦР-продукты обнаруживались всегда, хотя и с различной интенсивностью (рис. 4).

Применение этого же подхода, но с детекцией в режиме реального времени позволяет четко различить два вида (рис. 5). Это связано с различной скоростью накопления ПЦР-продуктов при использовании полностью и частично

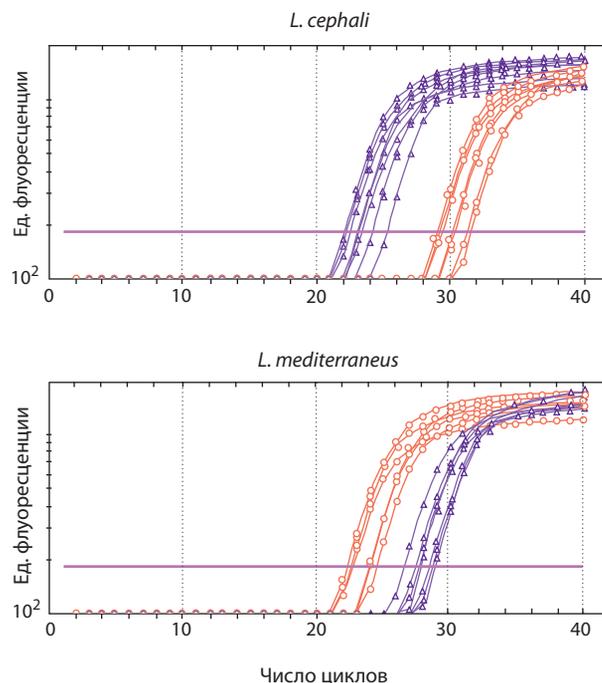


Рис. 5. Типирование образцов ДНК при помощи аллель-специфичной ПЦР в реальном времени.

По оси ординат значения даны в логарифмической шкале. Фиолетовым цветом обозначены кривые амплификации для смеси праймеров MCF300+CR450, желтым – для MCF300+MR450.

комплементарных праймеров. В данном подходе был заменен прямой праймер, чтобы получить более короткие продукты амплификации, что рекомендуется для ПЦР в реальном времени. Для каждой особи ставятся две реакции амплификации и затем вид определяется по меньшему значению *St* (номер цикла, в котором сигнал флуоресценции пересекает пороговую линию). Накопление продуктов идет быстрее в случае полной комплементарности праймера и матрицы исследуемой ДНК. Для всех особей было показано 100 % совпадение при идентификации с помощью аллель-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени с результатами морфологического анализа и данными секвенирования.

Заключение

В настоящей работе был разработан молекулярно-генетический подход, позволяющий быстро различить два вида моногеней – *L. mediterraneus* и *L. cephalis*, обитающих на *Mugil cephalus* в Азово-Черноморском бассейне. Из трех протестированных подходов два (метод анализа длин амплифицированных фрагментов и аллель-специфичная ПЦР в реальном времени) позволили достоверно различить *L. mediterraneus* и *L. cephalis*. Применение аллель-специфичной ПЦР с детекцией продуктов амплификации в конечной точке неэффективно, так как происходит отжиг и накопление продукта для обоих праймеров, комплементарных последовательностям, характерным как *L. mediterraneus*, так и *L. cephalis*. Наиболее экономически выгоден предложенный нами подход с использованием ПЦР-смеси, содержащей три праймера. Достаточно эффективным и быстрым можно считать метод аллель-

специфичной ПЦР в реальном времени, недостатком которого является лишь его высокая стоимость. Тем не менее разработанный подход гораздо быстрее и экономически выгоднее, чем секвенирование нуклеотидных последовательностей фрагмента рибосомного гена 28S.

Предлагаемые методы генотипирования могут использоваться для быстрого разделения двух видов плоских паразитических червей рода *Ligophorus* при оценке степени зараженности лобана этими паразитами в Азово-Черноморском регионе. Также следует отметить, что, исходя из данных о нуклеотидных последовательностях 28S для других паразитов этого рода, разработанные нами праймеры имеют 100 % идентичность только с этими двумя видами из всех обитающих на лобане. Это позволяет применять их и в других районах Мирового океана. Разработанный подход крайне полезен при проведении различных исследований рассматриваемых видов, таких как изучение их распространения, изменения соотношения двух видов на одной особи хозяина, конкуренции видов, влияния различных факторов на их численность и т. д. Кроме того, полученные результаты демонстрируют перспективность разработки таких подходов для оценки численности других видов моногеней, в том числе патогенных.

Список литературы / References

Гусев А.В. Методика сбора и обработки материалов по моногенейм, паразитирующим у рыб. Л.: Наука, 1983.

[Gusev A.V. Method for Collecting and Processing Materials on Monogeneans Parasitizing Fish. Leningrad: Nauka Publ., 1983. (in Russian)]

Гусев А.В., Пугачев О.Н., Эргенс Р.Р., Хотеновский И.А. Класс Monogenea. В: Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т. 2. Под ред. О.Н. Бауера, А.В. Гусева. Л.: Наука, 1985;10-387.

[Gusev A.V., Pugachev O.N., Ergens R.R., Khotenovskiy I.A. Class Monogenea. In: Bauer O.N., Gusev A.V. (Eds.) Key to the Parasites of Freshwater Fish of the USSR Fauna. Vol. 2. Leningrad: Nauka Publ., 1985;10-387. (in Russian)]

Токарев Ю.С., Васильева А.А., Грушевая И.В., Малыш Ю.М. Мультилокусное генотипирование как современный подход в диагностике микроспоридий – облигатных внутриклеточных паразитов животных. *Пробл. соврем. науки и образования*. 2015;12:51-55.

[Tokarev Yu.S., Vasilieva A.A., Grushevaya I.V., Malysh Yu.M. Multilocus genotyping as a modern approach to the diagnosis of microsporidia, obligate intracellular parasites of animals. *Problemy Sovremennoi Nauki i Obrazovaniya = Problems of Modern Science and Education*. 2015;12:51-55. (in Russian)]

Bakke T.A., Cable J., Harris P.D. The biology of gyrodactylid monogeneans: the "Russian-Doll Killers". *Adv. Parasitol.* 2007;64:161-376. DOI 10.1016/S0065-308X(06)64003-7.

Blasco-Costa I., Miguez-Lozano R., Sarabev V., Balbuena J.A. Molecular phylogeny of species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) and their affinities within the Dactylogyridae. *Parasitol. Int.* 2012;61(6):619-627. DOI 10.1016/j.parint.2012.06.004.

Caltran H., Silan P., Roux M. *Ligophorus imitans* (Monogenea) Ectoparasite of *Liza ramada* (Teleostei). I. Populations naturelles et variabilité morphologique. *Ecologie*. 1995;26(2):95-104.

Cribb T.H., Chisholm L.A., Bray R.A. Diversity in the Monogenea and Digenea: does lifestyle matter? *Int. J. Parasitol.* 2002;32(3):321-328. DOI 10.1016/S0020-7519(01)00333-2.

Dmitrieva E., Dimitrov G. Variability in the taxonomic characters of Black Sea gyrodactylids (Monogenea). *Syst. Parasitol.* 2002;51(3):199-206. DOI 10.1023/A:1014594614921.

Dmitrieva E.V., Gerasev P.I., Gibson D.I., Pronkina N.V., Galli P. Descriptions of eight new species of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae) from Red Sea mullets. *Syst. Parasitol.* 2012;81(3):203-237. DOI 10.1007/s11230-011-9341-8.

Dmitrieva E.V., Gerasev P.I., Merella P., Pugachev O.N. Redescription of *Ligophorus mediterraneus* Sarabev, Balbuena & Euzet, 2005 (Monogenea: Ancyrocephalidae) with some methodological notes. *Syst. Parasitol.* 2009a;73(2):95-105. DOI 10.1007/s11230-009-9177-7.

Dmitrieva E.V., Gerasev P.I., Merella P., Pugachev O.N. Redescriptions of *Ligophorus cephalis* Rubtsova, Balbuena, Sarabev, Blasco-Costa & Euzet, 2006 and *L. chabaudi* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae), with notes on the functional morphology of the copulatory organ. *Syst. Parasitol.* 2009b;73(3):175-191. DOI 10.1007/s11230-009-9192-8.

Ergens R., Gelnar M. Experimental verification of the effect of temperature on the size of hard parts of opisthaptor of *Gyrodactylus katharineri* Malmberg, 1964 (Monogenea). *Folia Parasitologica*. 1985;32(4):377-380.

Fromm B., Burow S., Hahn C., Bachmann L. MicroRNA loci support conspecificity of *Gyrodactylus salaris* and *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes: Monogenea). *Int. J. Parasitol.* 2014;44(11):787-793. DOI 10.1016/j.ijpara.2014.05.010.

Fromm B., Worren M.M., Hahn C., Hovig E., Bachmann L. Substantial loss of conserved and gain of novel microRNA families in flatworms. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2619-2628. DOI 10.1093/molbev/mst155.

Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41. 1999;95-98.

Kalafi E.Y., Tan W.B., Town C., Dhillon S.K. Automated identification of Monogeneans using digital image processing and K-nearest neighbour approaches. *BMC Bioinform.* 2016;17(19):511. DOI 10.1186/s12859-016-1376-z.

Khang T.F., Soo O.Y.M., Tan W.B., Lim L.H.S. Monogenean anchor morphometry: systematic value, phylogenetic signal, and evolution. *PeerJ*. 2016;4:e1668. DOI 10.7717/peerj.1668.

Littlewood D.T.J. Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. *Parasite*. 2008;15:333-341. DOI 10.1051/parasite/2008153333.

Littlewood D.T.J., Curini-Galletti M., Herniou E.A. The interrelationships of Proseriata (Platyhelminthes: Seriata) tested with molecules and morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2000;16(3):449-466. DOI 10.1006/mpev.2000.0802.

Lockyer A.E., Olson P.D., Littlewood D.T.J. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory. *Biol. J. Linn. Soc.* 2003;78(2):155-171. DOI 10.1046/j.1095-8312.2003.00141.x.

Marchiori N.C., Pariselle A., Pereira J.J., Agnès J.-F., Durand J.-D., Vanhove M.P.M. A comparative study of *Ligophorus uruguayense* and *L. saladensis* (Monogenea: Ancyrocephalidae) from *Mugiliza* (Teleostei: Mugilidae) in southern Brazil. *Folia Parasitol.* 2015;62:024. DOI 10.14411/fp.2015.024.

Mieszkowska A., Górniak M., Jurczak-Kurek A., Zięta M.S. Revision of *Gyrodactylus salaris* phylogeny inspired by new evidence for Eemian crossing between lineages living on grayling in Baltic and White sea basins. *PeerJ*. 2018;6:e5167. DOI 10.7717/peerj.5167.

Mladineo I., Šegvić-Bubić T., Stanić R., Desdevises Y. Morphological plasticity and phylogeny in a monogenean parasite transferring between wild and reared fish populations. *PLoS One*. 2013;8(4):e62011. DOI 10.1371/journal.pone.0062011.

Olstad K., Bachmann L., Bakke T.A. Phenotypic plasticity of taxonomic and diagnostic structures in gyrodactylid-causing flatworms (Monogenea, Platyhelminthes). *Parasitology*. 2009;136:1305-1315. DOI 10.1017/S0031182009990680.

- Pakdee W., Ogawa K., Pornruseetriratn S., Thaenkham U., Yee-min T. The first record of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Dactylogyridae) on *Crenimugil buechanani* (Teleostei: Mugilidae) from Thailand based on morphological and molecular analyses. *J. Helminthol.* 2019;93(6):752-762. DOI 10.1017/S0022149X1800072X.
- Poisot T., Verneau O., Desdevises Y. Morphological and molecular evolution are not linked in *Lamellodiscus* (Platyhelminthes, Monogenea). *PLoS One.* 2011;6(10):e26252. DOI 10.1371/journal.pone.0026252.
- Pugachev O.N., Gerasev P.I., Gushev A.V., Ergens R., Khotenowsky I. Guide to Monogeneoidea of freshwater fish of Palaearctic and Amur regions. Milan: Ledizione-Ledi Publ., 2009.
- Rodríguez-González A., Miguez-Lozano R., Llopis-Belenguer C., Balbuena J.A. Phenotypic plasticity in haptor structures of *Ligophorus cephalis* (Monogenea: Dactylogyridae) on the flathead mullet (*Mugil cephalus*): a geometric morphometric approach. *Int. J. Parasitol.* 2015;45(5):295-303. DOI 10.1016/j.ijpara.2015.01.005.
- Rubio-Godoy M. Fish host-monogenean parasite interactions, with special reference to Polyopisthocotylea. In: Terrazas L.I. (Ed.) Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases. Thiruvananthapuram: Research Signpost, 2007;91-109.
- Soo O.Y.M., Tan W.B., Lim L.H.S. Three new species of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae) from *Moolgarda buechanani* (Bleeker) off Johor, Malaysia based on morphological, morphometric and molecular data. *Raffles Bull. Zool.* 2015;63:49-65.
- Strona G., Montano S., Seveso D., Paolo G., Fattorini S. Identification of Monogenea made easier: a new statistical procedure for an automatic selection of diagnostic linear measurements in closely related species. *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.* 2014;52(2):95-99. DOI 10.1111/jzs.12050.
- Vanhove M.P.M., Tessens B., Schoelinck C., Jondelius U., Littlewood D.T.J., Artois T., Huysse T. Problematic barcoding in flatworms: a case-study on monogeneans and rhabdocoels (Platyhelminthes). *ZooKeys.* 2013;365:355-379. DOI 10.3897/zookeys.365.5776.
- Vignon M. Putting in shape – towards a unified approach for the taxonomic description of monogenean haptor hard parts. *Syst. Parasitol.* 2011;79(3):161-174. DOI 10.1007/s11230-011-9303-1.
- Yamaguti S. Systema helminthum. Vol. IV. Monogenea and Aspidocotylea. New York; London: Intersci. Publ., 1963.

ORCID ID

E.A. Vodiasova orcid.org/0000-0003-3886-2880
E.S. Chelebieva orcid.org/0000-0002-7662-2573
O.V. Shikhat orcid.org/0000-0003-1909-3836
D.M. Atopkin orcid.org/0000-0001-8417-3424
E.V. Dmitrieva orcid.org/0000-0001-6300-2458

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-44-920004_p_a и в соответствии с государственным заданием № 0556-2021-0002, номер гос. регистрации 121030100028-0.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.07.2021. После доработки 06.01.2022. Принята к публикации 18.01.2022.

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

Сравнительный анализ частот ДНК-полиморфизмов, ассоциированных с заболеваниями и хозяйственно важными признаками, в геномах российских и зарубежных пород крупного рогатого скота

А.В. Игошин¹, Г.А. Ромашов¹, Е.Н. Черняева², Н.П. Елаткин², Н.С. Юдин¹, Д.М. Ларкин^{1,3} 

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

² ООО «Мираторг-Генетика», Москва, Россия

³ Королевский ветеринарный колледж, Лондон, Великобритания

 dmlarkin@gmail.com

Аннотация. Генетический состав породы и ее генетические отличия от других пород определяют ее облик и характерные особенности, включая экономически важные признаки и встречаемость патологий. К настоящему времени выявлено множество локусов, контролирующих наиболее значимые фенотипы, что успешно используется в мировой практике для маркер-ассоциированной селекции в целях улучшения свойств пород. В настоящей работе проведен сравнительный анализ частот известных каузативных нуклеотидных замен, вставок и делеций, связанных с заболеваниями и хозяйственно ценными признаками, в российских и зарубежных породах крупного рогатого скота. Выявлены частоты вышеуказанных ДНК-полиморфизмов в популяциях российских пород крупного рогатого скота, выполнено их сравнение с частотами в зарубежных популяциях для пород, разводимых в Российской Федерации, а также с другими зарубежными породами. Наши результаты показывают схожесть частот большинства аллелей внутри пород (российского или зарубежного разведения), а также связь между представленностью аллелей исследуемых полиморфизмов и наличием определяемых ими фенотипических признаков. Были найдены и превышения по частотам ряда нежелательных аллелей в российских популяциях крупного рогатого скота, на которые стоит обратить внимание при селекционной работе с породами. Обнаружено, что аллели, отвечающие за повышенную фертильность породы герефорд, имеют повышенную частоту в популяциях российского разведения по сравнению с зарубежными популяциями. Интересно, что для азиатских турано-монгольских вагу и якутского скота наблюдалась меньшая связь между фенотипическими признаками и частотами известных каузативных аллелей по сравнению с европейскими породами. Наша работа указывает на конкретные генетические варианты, которые могут быть использованы для улучшения и/или поддержания качеств ряда пород крупного рогатого скота, разводимых в Российской Федерации.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; селекция; порода; Российская Федерация; генетические варианты; SNP; инсерция; делеция.

Для цитирования: Игошин А.В., Ромашов Г.А., Черняева Е.Н., Елаткин Н.П., Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Сравнительный анализ частот ДНК-полиморфизмов, ассоциированных с заболеваниями и хозяйственно важными признаками, в геномах российских и зарубежных пород крупного рогатого скота. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3):298-307. DOI 10.18699/VJGB-22-28

Comparative analysis of allele frequencies for DNA polymorphisms associated with disease and economically important traits in the genomes of Russian and foreign cattle breeds

A.V. Igoshin¹, G.A. Romashov¹, E.N. Chernyaeva², N.P. Elatkin², N.S. Yudin¹, D.M. Larkin^{1,3} 

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

² LLC "Miratorg-Genetika", Moscow, Russia

³ Royal Veterinary College, London, United Kingdom

 dmlarkin@gmail.com

Abstract. The genetic makeup of a breed including its genetic differences from other breeds determines its appearance and characteristics, including economically important traits and resistance to pathologies. To date, many loci controlling significant phenotypes have been identified, which is successfully used in the world practice of marker-assisted selection to improve breed properties. The aim of this study was a comparative analysis of frequencies for known causative

nucleotide substitutions, insertions and deletions associated with disease and economically important traits in Russian and foreign cattle breeds. As a result, we identified frequencies of these DNA polymorphisms in the populations of Russian cattle breeds, compared them with those of foreign populations of the same breed, as well as other foreign breeds. Our results indicate similarities in frequencies for most of such alleles within breeds (populations of Russian and foreign breeding), as well as the relationship between the causative allele prevalence and the presence of phenotypic traits under the effect. We also found an excess of some undesirable alleles in the Russian cattle populations, which should be paid attention to when designing breeding programs. We found that the alleles increasing fertility in the Hereford breed have a higher frequency in the Russian Hereford population compared to the foreign counterpart. Interestingly, unlike for the European breeds, for Asian Turano-Mongolian Wagyu and Yakut cattle, there was a less clear link between phenotypic traits and frequencies of known causative alleles. Our work points to specific genetic variants that could be used to improve and/or maintain the performance of certain cattle breeds bred in the Russian Federation. Key words: cattle; selection; breed; Russian Federation; genetic variants; SNP, insertion; deletion.

For citation: Igoshin A.V., Romashov G.A., Chernyaeva E.N., Elatkin N.P., Yudin N.S., Larkin D.M. Comparative analysis of allele frequencies for DNA polymorphisms associated with disease and economically important traits in the genomes of Russian and foreign cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):298-307. DOI 10.18699/VJGB-22-28

Введение

Распространенные типы генетических вариаций, такие как однонуклеотидные полиморфизмы, вставки и делеции нуклеотидов, среди прочих могут оказывать «полезное» или «вредное» влияние на здоровье и продуктивность животных (Liu, Bickhart, 2012; Bourque et al., 2018). Поэтому секвенирование генома *Bos taurus* вызвало всплеск исследований генетического разнообразия пород крупного рогатого скота (КРС) и его связи с хозяйственно важными признаками, адаптациями и заболеваниями, что открыло возможности для использования полученных знаний при создании пород с необходимыми качествами и улучшения существующих пород (Ларкин, Юдин, 2016; Юдин, Ларкин, 2019). Согласно базе данных OMA (www.omia.org; Lenffer et al., 2006), в настоящее время известны гены, контролирурующие 272 признака крупного рогатого скота, включая ряд заболеваний. Для 175 из них уже выявлены каузативные мутации в кодирующих и некодирующих областях ДНК, реализующие свой эффект путем различных механизмов, среди которых изменения в последовательности белка, в стабильности, экспрессии или процессинге РНК (Ibeagha-Awemu et al., 2008; Юдин, Воевода, 2015; Cierloch et al., 2017). На основании этой информации были разработаны тесты для генотипирования патологических мутаций и выбраковки животных-носителей из племенного стада (Романенкова и др., 2015; Форнара и др., 2019; Сабетова и др., 2021). С помощью такого подхода можно идентифицировать мутации в раннем возрасте для своевременной выбраковки животных или эмбрионов (Терлецкий и др., 2016). В то же время стоит учитывать, что «вредная» мутация может оказаться «полезной» для другого хозяйственно важного признака (Fasquelle et al., 2009). Идентификация аллелей генов, связанных с хозяйственно важными признаками, позволила проводить маркер-ориентированную селекцию по ним (Pighetti, Elliott, 2011; Abd El-Hack et al., 2018). Маркер-ориентированная селекция имеет особое значение для признаков, которые проявляются с возрастом или только у животных одного пола, например продуктивность или плодовитость (Зиновьева, 2016; Raina et al., 2020).

Российские породы КРС до сих пор были исследованы на наличие лишь нескольких наиболее распространенных

мутаций, ассоциированных с хозяйственно важными признаками и здоровьем (Романенкова и др., 2016, 2018; Усова и др., 2017; Суржикова и др., 2019). Целью нашей работы являлся анализ спектра и частот известных каузативных полиморфизмов ДНК у девяти российских пород крупного рогатого скота на основании данных полногеномного секвенирования и сравнения частот этих полиморфизмов с мировыми породами или зарубежными популяциями тех же самых пород для определения вариантов, по которым могла бы вестись селекция российских пород.

Материалы и методы

Список клинически и экономически значимых для КРС однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), вставок и делеций был составлен на основе информации из базы данных OMA (www.omia.org; Lenffer et al., 2006) и практического руководства Ирландской федерации разведения скота (McClure M., McClure J., 2016). Геномные позиции полиморфизмов, указанные в координатах сборки *Bos taurus* UMD3.1, были переведены в координаты сборки ARS-UCD1.2 с использованием программы LiftOver (Kuhn et al., 2013). Для полиморфизмов, присутствующих в выборке российских пород, выполнена сверка референсных и альтернативных аллелей на соответствие указанным в публикациях. Для четырех из 12 возможных замен (T↔A и G↔C) проверка соответствия аллелям, указанным в источниках, осложнена, поскольку: 1) может иметь место смена референсного аллеля при переходе к новой сборке генома; 2) в публикации аллель может быть указан для цепи, комплементарной референсной. В подобных случаях мы сверяли аллели полиморфизмов в контексте кодонов (в случае замен в кодирующей части) или окрестных последовательностей. Например, согласно (Hirano et al., 2013) и базе OMA, замена нуклеотида G на C в позиции BTA8:83909754, приводящая к замещению валина на лейцин, ведет к врожденной гипотрофии у телят. Однако, по всей видимости, данная замена была указана авторами для последовательности матричной РНК: в сборке ARS-UCD1.2 референсным является нуклеотид C, находящийся в составе триплета AAC, в мРНК соответствующий кодону GUU, кодирующему валин. Таким образом, в референсной сборке ARS-UCD1.2 «вредным» будет являться аллель G.

Таблица 1. Анализируемые выборки пород

Порода	Географическое происхождение	Численность выборки
Алтайская	Россия	20
Бурятская	»	19
Калмыцкая	»	13
Холмогорская	»	32
Якутская	»	30
Ярославская	»	22
Абердин-ангус (зарубежные)	Австралия, Канада, Новая Зеландия, США и пр.	401
Абердин-ангус (российские)	Россия (частично импортированы из США и Австралии)	46
Герефорд (зарубежные)	Австралия, Канада, Новая Зеландия, США и пр.	123
Герефорд (российские)	Россия	18
Вагю (зарубежные)	Австралия	9
Вагю (российские)	Россия	20
Северная финская	Финляндия	34
Западная финская	»	25
Восточная финская	»	25
Остальная выборка (>180 популяций/пород)	–	4409

В нашей работе мы использовали данные по SNP, вставкам и делециям у мировых пород проекта «1000 геномов быков» (1000 Bull Genomes Project) (Hayes, Daetwyler, 2019), включая полученные нами ранее результаты ресеквенирования восьми российских пород, а также исходные данные ресеквенирования («.fastq»-файлы) российской популяции абердин-ангусской породы (далее – ангус), предоставленные ООО «Мираторг-Генетика». При этом часть животных была импортирована из США и Австралии (табл. 1). Дополнительно мы использовали сведения по трем аборигенным финским породам, предоставленным Институтом природных ресурсов Финляндии (LUKE). Финляндия граничит с Россией и обладает во многом сходным, хотя и более мягким климатом, поэтому включение в исследование финских пород могло бы указать на особенности селекции, проявляющиеся в близких природных условиях двух стран.

Удаление последовательностей адаптеров из необработанных парных прочтений проводили в программе Trimmomatic-0.39. Очищенные прочтения были выравнены на референсную последовательность ARS-UCD1.2 с помощью BWA-MEM v.0.7.17 (Li, Durbin, 2009). Файлы, содержащие выравненные последовательности («.sam»-файлы), затем были преобразованы в «.bam»-формат и отсортированы с использованием программы SAMtools v.1.8 (Li et al., 2009). Далее библиотеки, принадлежащие одному и тому же животному, были объединены в один пул с применением модуля MergeSamFiles пакета Picard v.2.18.2 (<http://broadinstitute.github.io/picard>). Дубликаты были отмечены с помощью модуля MarkDuplicates вышеуказанной программы. Параметр OPTICAL_DUPLICATE_PIXEL_DISTANCE = 2500 был выбран в соответствии

с рекомендациями протокола проекта «1000 геномов быков». Рекалибровка качества оснований выполнена модулями BaseRecalibrator и PrintReads пакета GATK v.3.8 (McKenna et al., 2010) с использованием данных, предоставленных проектом «1000 геномов быков» (Hayes, Daetwyler, 2019). Идентификация полиморфизмов и объединение полученных gVCF-файлов осуществлены с помощью модулей HaplotypeCaller и GenotypeGVCFs программы GATK v.3.8 соответственно.

Извлечение SNP, инсерций и делеций из полногеномных VCF-файлов проводили с утилитой Tabix (Li, 2011), используя координаты полиморфизмов из ранее сформированного списка. Полученные VCF-файлы, содержащие выбранные полиморфизмы, были использованы для подсчета частот альтернативных аллелей в выборках в программе PLINK 2.0 (Purcell et al., 2007) с параметрами --vcf --chr-set 30 --freq --pheno --loop-cats. Подсчет осуществляли: 1) для пород, разводимых в России, а именно холмогорской, ярославской, алтайской, якутской, бурятской, калмыцкой, ангус, вагю и герефорд; 2) для зарубежных популяций тех же пород (при наличии); 3) для трех финских пород – северной финской, западной финской и восточной финской; 4) для совокупной выборки всех прочих мировых пород скота (см. табл. 1).

Наличие различий по частотам аллелей между перечисленными выборками проверяли с помощью точного теста Фишера, используя функцию 'fisher.test()' языка R. Таблицы сопряженности 2 × 2 составляли путем подсчета содержания референсного и альтернативного аллелей в хромосомном пуле каждой из двух исследуемых групп. Были выполнены три типа сравнений: 1) между породой, разводимой в России (либо зарубежной популяцией той

же породы, при наличии), и совокупной выборкой остальных мировых пород; 2) между породой, разводимой в Финляндии, и совокупной выборкой остальных мировых пород по аллелям, выявленным в первом типе сравнений; 3) только между российской популяцией и зарубежной популяцией той же породы. Для поправки на множественные сравнения использовали метод Storey и Tibshirani (Storey, Tibshirani, 2003) реализованный в функции 'qvalue()' языка R (Storey et al., 2020).

Результаты

Сформированный нами список клинически и экономически значимых полиморфизмов содержал 193 SNP и 63 инсерции/делеции. Поиск в VCF-файлах выявил присутствие в российских породах 38 SNP и одной инсерции из вышеупомянутых полиморфизмов (Приложение 1)¹, которые соответствовали не менее чем 21 фенотипическому признаку.

При сравнении с мировой выборкой 15 популяций по 39 полиморфизмам (всего 585 сравнений) в 229 случаях имелись статистически значимые ($q < 0.05$) различия в частотах аллелей (см. рисунок). Больше всего значимых различий с совокупной выборкой мировых пород было у зарубежных популяций пород ангус и герефорд (29 и 27 локусов соответственно). Из российских популяций наибольшее число отличий от мировой выборки имела якутская порода (16 локусов), а из финских – северная финская (20 локусов).

Наиболее значимое ($q = 4.24E-286$) различие с мировой выборкой по частотам аллелей наблюдалось для зарубежной популяции ангусов – по SNP rs109688013 в гене рецептора меланокортина-1 *MC1R*, носители альтернативного аллеля С которого имеют черный окрас шерсти (Klungland et al., 1995). Отличие от совокупной мировой выборки по данному локусу было статистически значимым для большинства остальных популяций, за исключением северной финской, а также отечественной и зарубежной популяций вагю. При этом оно было наивысшим среди 39 локусов для российской популяции ангусов ($q = 6.01E-35$), обеих популяций герефордов ($q = 6.22E-37$ для зарубежной и $7.34E-07$ для российской), для алтайской ($q = 1.99E-06$), холмогорской ($q = 9.27E-12$) и ярославской ($q = 2.76E-06$) пород. У зарубежных и отечественных ангусов частота аллеля С, дающего черный окрас, достигает 0.973 и 0.989, тогда как в остальных мировых породах – 0.339. В популяциях же алтайской, холмогорской, ярославской пород, отечественных и зарубежных герефордов он имеет частоту 0.026, 0.828, 0.772, 0 и 0.019 соответственно. В финских породах частота аллеля С варьирует от нулевой у западной финской до 0.052 у восточной финской и 0.258 у северной финской.

Из остальных локусов наибольшее отличие в исследуемых породах от глобальной популяции КРС проявляли полиморфизмы, связанные с молочными признаками, окрасом шерсти и нарушением свертываемости крови. Так, российская популяция вагю имела наиболее значимое ($q = 6.44E-21$) различие с мировой выборкой по частоте вставки 15 п. н. в позиции BTA27:16305660, приводя-

щей к нарушению функции гена *F11* и, как следствие, к дефициту фактора свертывания крови XI, кодируемого этим геном (Kunieda et al., 2005). У российских вагю частота данной вставки достигает 0.25, в то время как в глобальной популяции КРС она близка к нулю. Наиболее значимые различия с мировой выборкой для зарубежной популяции вагю ($q = 2.60E-05$) и якутской породы ($q = 2.21E-18$) наблюдались по SNP rs210634530 в гене микрофталмия-ассоциированного транскрипционного фактора MTF, который связан с проявлением фенотипа 'white spotting' – белой пятнистостью (Fontanesi et al., 2012). Частота нуклеотида Т, вызывающего белую пятнистость у якутской породы и зарубежных вагю, равна 0.083 и 0.111 соответственно, тогда как в мировой выборке она достигает 0.65. У бурятской и калмыцкой пород самое значимое отличие ($q = 6.81E-10$ и $2.33E-06$ соответственно) имел SNP rs109191047 в гене гормона роста *GHI*, ассоциированный с составом молока (Mullen et al., 2010). Частота нуклеотида G, повышающего содержание жира и белка в молоке, в мировой популяции составляет 0.100, достигая при этом в бурятской и калмыцкой породах 0.526 и 0.500 соответственно.

Сравнения между российской и соответствующей зарубежной популяциями, приведенные для животных пород ангус, герефорд и вагю, выявили четыре локуса, статистически значимо ($q < 0.05$) различающихся по частотам аллелей. Из них три SNP (rs43703017, rs43703015 и rs110014544) имели отличающиеся частоты в отечественной и зарубежной популяциях ангусов и определяли аллели гена каппа-казеина *CSN3*. Один SNP, расположенный в гене *CAPNI* (rs17872050), различался между популяциями герефордов и был связан с жесткостью мяса. Учитывая частотные различия на номинальном уровне значимости ($p < 0.05$), можно дополнительно отметить еще восемь локусов (табл. 2), среди которых миссенс-замена V311A (BTA26:34340886T > C) в гене *NHLRC2*, отличающаяся у ангусов и приводящая в гомозиготе к нотомелии – разновидности полимелии, при которой дополнительная конечность располагается вдоль или около срединной линии спины (Beever et al., 2014).

Обсуждение

Особенности генофонда пород

Генофонд сельскохозяйственных животных формируется под влиянием таких факторов, как селекция на улучшение продуктивных качеств, адаптация к условиям среды, гибридизация, *de novo* мутации, эффект основателя и генетический дрейф (Notter, 1999; Xu et al., 2015).

Как показано выше, значительная часть взятых в анализ полиморфизмов в исследуемых породах отличается от «среднемировой» выборки по частотам, отражая особенности генофонда конкретных популяций. Например, якутский скот демонстрирует наивысшую дивергенцию по частотам аллелей среди отечественных пород, выражающуюся как в большем числе различающихся локусов, так и в большей значимости различий, что согласуется с данными его филогении и анализа популяционной структуры (Yurchenko et al., 2018; Buggiotti et al., 2021).

Некоторые из исследуемых полиморфизмов вносят определяющий вклад в проявление характерных для поро-

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx6.pdf>



Частоты клинически и экономически значимых полиморфизмов в российских и зарубежных популяциях КРС.

Слева указаны гены, содержащие исследуемые полиморфные варианты. Более темный оттенок соответствует более высокой частоте референсного (зеленый) либо альтернативного (красный) аллеля. Справа указан фенотип, ассоциированный с этим аллелем. Названия полиморфизмов и численные значения их частот приведены в Приложении 2. Звездочками обозначены локусы, значимо различающиеся по частотам между указанной породой и глобальной популяцией КРС: ***** $q < 1.0E-25$, **** $q < 1.0E-10$, *** $q < 1.0E-5$, ** $q < 1.0E-3$, * $q < 0.05$. Рамкой показаны локусы, отличающиеся ($p < 0.05$) между российской и зарубежной популяциями одной и той же породы: красный цвет – «вредный» аллель имеет большую представленность в отечественной популяции, синий – в зарубежной, черный – значение аллеля для свойств пород мясного направления не установлено.

Таблица 2. Различия между отечественными и зарубежными популяциями внутри породы

Локус	Аллель		Частота аллеля, ассоциированного с фенотипом		Порода	Фенотип	Показатели статистической значимости	
	референсный	альтернативный	Российская популяция	Зарубежная популяция			p	q
rs43705173	G*	A	0.853	0.971	Герефорд	Пониженная выживаемость эмбрионов	0.0086	0.1465
rs43703015	T*	C	0.304	0.157	Ангус	Более быстрая коагуляция молока под действием сычужного фермента, сниженная концентрация лактозы	0.0011	0.0353
rs43703016	C	A*	0.696	0.833	Ангус	Сниженная концентрация каппа-казеина	0.0024	0.0563
rs43703017	A	G*	0.283	0.113	Ангус	Ухудшенные коагуляционные свойства и повышенность жирность молока	4.88E-05	0.0057
rs110014544	G*	A	0.304	0.159	Ангус	Более быстрая коагуляция молока под действием сычужного фермента	0.0012	0.0353
rs41255587	G*	A	0.620	0.725	Ангус	Более нежное мясо	0.0385	0.3753
rs109221039	A*	G	0.793	0.894	Ангус	Более нежное мясо	0.0088	0.1465
rs208753173	G*	A	0.917	0.988	Герефорд	Сниженная фертильность	0.0298	0.349
rs110942700	T	C*	0.083	0.267	Герефорд	Пониженная выживаемость эмбрионов	0.0201	0.262
BTA26:34340886	T	C*	0.065	0.024	Ангус	Дубликации при развитии	0.037	0.3753
rs17871051	G*	A	0.722	0.894	Герефорд	Более нежное мясо	0.0127	0.1854
rs17872050	C*	T	0.500	0.799	Герефорд	Более нежное мясо	0.0003	0.0154

* Аллель, ассоциированный с указанным фенотипом.

ды признаков. Так, содержание в породах упомянутого ранее аллеля rs109688013-C гена *MC1R* хорошо соотносится с типичным окрасом их представителей. У ангусов, имеющих черную масть, частота данного аллеля близка к единице. У ярославского и холмогорского скота rs109688013-C тоже преобладает, по всей видимости, определяя черную и черно-пеструю масти, в основном характерные для этих животных. В то же время у герефордов, которым не свойствен черный окрас, частота аллеля C близка к нулю. Аналогично наблюдается соответствие между окрасом и частотой аллеля C в популяциях финских пород. В породах, имеющих преимущественно масти светлого оттенка (палевая, светло-бурая и рыжая, часто белые морда, брюхо и спина), она небольшая (0.053 в восточной финской) или нулевая (в западной финской). У северной финской породы с преимущественно белым окрасом (некоторые особи черно-пестрые) частота rs109688013-C равна 0.258. Породы, для которых типичны красная (калмыцкая) или бурая (алтайская, бурятская) масти, имеют rs109688013-C в низкой частоте (0.03–0.08). Однако в популяциях вагю, для которых, как правило, характерен черный окрас, частота данного аллеля далека от единицы и имеет значения 0.42 в российских и 0.67 в зарубежных, вероятно, отражая генетические особенности турано-монгольских

пород. Это несоответствие наблюдается и у якутского скота, которому свойствен черно-пестрый окрас, но при этом частота rs109688013-C исчезающе мала. Учитывая генетическую удаленность турано-монгольских пород от других пород, можно предположить, что в контроль окраски тела у них вовлечены иные локусы.

Также вклад в окрас вносит однонуклеотидный полиморфизм rs210634530 в гене *MITF*, аллель T которого ассоциирован с признаком ‘white spotting’ – белой пятнистостью (пегостью). Наиболее высокая частота rs210634530-T наблюдается в популяциях герефордского скота (фиксирован в российской выборке, 0.92 в мировых), для которого характерны белые голова и брюхо. Кроме того, данный аллель преобладает в популяциях холмогорской, ярославской, алтайской и калмыцкой пород, имеющих белую пятнистость в окрасе, а также ангусов. В остальных популяциях частота аллеля T варьирует от низкой (якутская порода) до умеренной (бурятская, вагю). Связь с представленностью rs210634530-T прослеживается и для финских пород. Как говорилось выше, многие особи западной финской и восточной финской имеют белые морду, спину и брюхо. Северная финская же имеет либо белую, либо реже черно-пеструю масть. Следует учитывать, что в контроль фенотипа ‘white spot-

ting' кроме SNP rs210634530, по-видимому, вовлечены дополнительные локусы (Fontanesi et al., 2012), в связи с чем связь аллельной частоты rs210634530-Т с этой мастью не столь выражена.

Некоторые из генетических особенностей пород носят не вполне очевидный, на первый взгляд, характер. Например, как отечественные, так и зарубежные популяции ангусов и вагю имеют с высокой (0.89–0.95) частотой аллель rs43703011-G гена бета-казеина *CSN2*. Вариации гена *CSN2* по ряду несинонимичных позиций определяют его аллели – А1, А2, А3, В, С и т. д. Вышеупомянутый нуклеотид G SNP rs43703011 присутствует у нескольких аллелей гена *CNS2*, самый распространенный из которых – А2. Так называемое А2-молоко считается более предпочтительным для употребления в связи с лучшим усвоением и меньшими нежелательными эффектами со стороны пищеварительной системы человека (Jianqin et al., 2016). В последние годы селекционные программы во многих странах нацелены на повышение частоты аллеля А2 у молочного скота (Sebastiani et al., 2020). Учитывая, что ангус и вагю – мясные породы и не используются для производства молока, наблюдаемое у них преобладание нуклеотида G вряд ли может быть связано с селекцией на улучшение молочных качеств. Наиболее правдоподобным объяснением является отбор на показатели мясной продуктивности. Так, согласно (Hohmann et al., 2020), носительство аллеля А2 повышает дневной привес и вес при отъеме у немецких ангусов и симменталов. Таким образом, повышение частоты аллеля rs43703011-G, а следовательно, и аллеля А2 гена *CSN2*, может быть полезно для улучшения не только молочных, но и мясных пород.

Некоторые из обнаруженных вариантов специфичны для одной породы и практически отсутствуют в других. Наиболее выраженная породоспецифичность характерна для клинически значимых полиморфизмов в генах *F11*, *IARS* и *NHLRC2*. Ранее упомянутая инсерция в гене *F11*, приводящая к дефициту фактора свертывания крови XI, встречается почти исключительно в популяциях зарубежных и российских вагю. При этом данная мутация встречается лишь у двух животных среди более чем 5 тысяч представленных в проекте «1000 геномов быков». Связь активности фактора XI со вставкой АТАТГТGCАГААТАТ была впервые продемонстрирована для вагю (Kunieda et al., 2005). Гомозиготный генотип по данной мутации сопряжен с ухудшением свертываемости крови и увеличением длительности кровотечений. В отечественной популяции вагю частота этой вставки равна 0.25, что согласуется с данными ранних публикаций по ее распространенности у японской черной породы (Watanabe et al., 2006; Ohba et al., 2008). В то же время у зарубежных вагю, в нашем исследовании представленных выборкой из Австралии, эта вставка имеет частоту 0.11.

Другие примеры породоспецифичных вариантов – однонуклеотидные замены в генах *IARS* (ВТА8:83909754С > G) и *NHLRC2* (ВТА26:34340886Т > С). Мутация ВТА8:83909754С > G в гене *IARS* в гомозиготе приводит к врожденной гипотрофии у телят и повышению пренатальной смертности (Nigano et al., 2013, 2016). Данный вариант специфичен для вагю и, кроме нее, присутствует лишь у одного животного из выборки проекта «1000 гено-

мов быков». В российской и австралийской выборках этой породы его частота равна 0.075 и 0.056 соответственно. Мутация ВТА26:34340886Т > С в гене *NHLRC2*, приводящая в гомозиготе к нотомелии, породоспецифична для ангусов и была впервые обнаружена именно у этой породы (Beever et al., 2014). В выборке «1000 геномов быков», помимо ангусов, мутантный аллель найден только у одного животного неизвестной (crossbreed) породной принадлежности. В российской и зарубежной популяциях данной породы он представлен в частоте 0.065 и 0.024 соответственно.

Различия между отечественной и зарубежной популяциями одной породы

Наличие в нашем анализе зарубежных ангусов, герефордов и вагю может пролить свет на особенности селекции и адаптации отечественных популяций данных пород. В целом российские и зарубежные выборки одной и той же породы демонстрируют сходные профили частот аллелей, имея статистически подтверждаемые различия лишь по небольшому числу локусов. Выявленные различия могут быть обусловлены многими факторами или их сочетанием. Например, почти трехкратное превышение содержания у отечественных ангусов по сравнению с зарубежными аллеля ВТА26:34340886-С (здесь и далее см. табл. 2), приводящего к появлению дополнительных конечностей, может быть следствием эффекта основателя или дрейфа генов в целом, а также менее интенсивных усилий по элиминации данного варианта в российском стаде.

Межпопуляционные различия по локусам, связанным с репродукцией, могут быть результатом адаптации к условиям среды. В отечественной популяции герефордов аллели ряда полиморфизмов, негативно влияющие на выживаемость эмбрионов (rs43705173-G и rs110942700-С) и фертильность (rs208753173-G), имеют меньшую частоту в сравнении с зарубежной выборкой этой породы. Можно предположить, что российская выборка герефордов, в настоящее время представленная популяцией, разводимой в Западной Сибири с 1960-х гг. (Всяжих, Куринский, 1976), подвергалась действию отбора на улучшение репродуктивных показателей. В пользу этого предположения свидетельствуют данные А.И. Афанасьевой с коллегами (2015), согласно которым в условиях Алтайского края популяция герефордов сибирской селекции демонстрирует заметно меньшую частоту мертворождений (1.4 %) в сравнении с животными финской селекции (6.6 %), завезенными в 2011 г. Известно, что низкие температуры отрицательно влияют на воспроизводство крупного рогатого скота, снижая фертильность и повышая перинатальную смертность (Gwazdauskas, 1985; Мее, 2020). Поэтому популяционные отличия по упомянутым локусам могут отражать процесс генетической адаптации, направленной на компенсацию вызванного холодом ухудшения репродуктивных функций.

Отдельный интерес представляют однонуклеотидные полиморфизмы, связанные с мясными признаками и различающиеся в выборках ангусов (rs41255587 и rs109221039 в гене *CAST*) и герефордов (rs17871051 и rs17872050 в гене *CAPNI*). По всем четырем SNP миро-

вые популяции указанных пород имеют более высокую представленность аллелей, повышающих нежность мяса. Данный признак является важной гастрономической характеристикой, и его улучшение включено в программы по совершенствованию зарубежных мясных пород (Tatum 2006). В то же время нам неизвестно о ведении широкой селекционно-племенной работы такого рода в России, что, вероятно, и обуславливает наблюдаемые различия между выборками. Таким образом, российские популяции ангусов и герефордов имеют потенциал для улучшения мясных качеств путем селекции по локусам *CAST* и *CAPNI*.

Из исследованных локусов, различающихся между популяциями одной и той же породы, стоит также отметить четыре SNP (rs43703015, rs43703016, rs43703017 и rs110014544), которые определяют аллели гена каппа-казеина *CSN3* и частоты которых различны в российской и зарубежной выборках ангусов. Данные полиморфизмы ассоциированы с молочными признаками, в частности с концентрацией каппа-казеина в молоке и коагуляционными свойствами молока, что важно для сыроделия. При этом влияние аллелей *CSN3* на продуктивность мясного скота малоизученно. Исследования Tambasco с коллегами (Tambasco et al., 2003) и Curi с соавторами (Curi et al., 2005) не выявили какой-либо связи между аллелями *CSN3* и мясными признаками. Таким образом, наблюдаемые различия могут быть приурочены к эффекту основателя либо к отбору на хозяйственно важные признаки, имеющие пока еще не выявленную ассоциацию с полиморфизмами в гене *CSN3*.

Клинически значимые полиморфизмы, присутствующие в российских породах

В российских породах представлен ряд полиморфных вариантов, в гомозиготе вызывающих наследственные заболевания скота. Некоторые из которых (мутации в генах *F11*, *IARS* и *NHLRC2*) уже обсуждались выше в связи с их породоспецифичностью. Дополнительно упомянем варианты в генах *ROR2* и *LRP4*, связанные с проявлением межпальцевой гиперплазии (разрастание ткани между копытцами) и синдактилии (сращение пальцев, так называемое мулье копыто). В отличие от генов *F11*, *IARS* и *NHLRC2*, «вредные аллели» в *ROR2* (rs377953295-A) и *LRP4* (rs453049317-T) не породоспецифичны и достаточно распространены как в российских породах, так и в остальной мировой популяции КРС. Из российских популяций наибольшую представленность аллеля rs377953295-A в гене *ROR2* имеют калмыцкая (0.192) и алтайская (0.15) породы. В мировой выборке его частота достигает 0.13. Вариант rs453049317-T в гене *LRP4* имеет наивысшую частоту в алтайской породе (0.2) и отечественной популяции ангусов (0.12), тогда как в остальной совокупной мировой популяции она равна 0.076.

В настоящее время тестирование на генетические дефекты широко применяется в практике животноводства многих стран (Терлецкий и др., 2016). Так, тестирование на мутации в генах *F11* и *IARS* входит в программы генетического скрининга, рекомендованные Австралийской ассоциацией вагю (<https://www.wagyu.org.au/content/uploads/2020/08/Genetic-Conditions-in-Wagyu-FactSheet-2020.pdf>). Однако к устранению нежелательных

вариантов следует подходить с осторожностью. Например, существует предположение, что носительство мутаций, ассоциированных с синдактилией, улучшает молочную продуктивность коров, чем можно частично объяснить распространение данной патологии у крупного рогатого скота (Johnson et al., 2006).

Заключение

Проведенный анализ показал распределение аллельных частот для наиболее важных с точки зрения клинической значимости и хозяйственной ценности полиморфизмов ДНК, присутствующих в российских породах крупного рогатого скота. Некоторые варианты, приводящие к распространенным наследственным заболеваниям у КРС, имеют существенную представленность в отечественных популяциях и, вероятно, должны быть устранены. В то же время отличия российского скота от зарубежных популяций по ряду локусов предположительно имеют адаптивное значение. Данные настоящего исследования могут быть востребованы при проведении селекционно-племенной работы по улучшению существующих и созданию новых отечественных пород скота.

Список литературы / References

- Афанасьева А.И., Князев С.С., Лотц К.Н. Воспроизводительная способность мясного скота герефордской породы сибирской и финской селекции в условиях Алтайского края. *Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та*. 2015;8(130):86-89.
[Afanasyeva A.I., Knyazev S.S., Lotz K.N. Reproductive capacity of Hereford beef cattle of Siberian and Finnish breeding under the conditions of the Altai region. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University*. 2015;8(130):86-89. (in Russian)]
- Всяких А.С., Куринский М.С. Импортный скот в СССР. М.: Колос, 1976.
[Vsyakikh A.S., Kurinsky M.S. Imported Cattle in the USSR. Moscow: Kolos Publ., 1976. (in Russian)]
- Зиновьева Н.А. Гаплотипы фертильности голштинского скота. *С.-х. биология*. 2016;51(4):423-435. DOI 10.15389/agrobiology.2016.4.423rus.
[Zinovieva N.A. Haplotypes affecting fertility in Holstein cattle. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2016;51(4):423-435. DOI 10.15389/agrobiology.2016.4.423eng.]
- Ларкин Д.М., Юдин Н.С. Значимость геномных исследований для понимания истории формирования домашних животных. *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2016;34(4):123-128. DOI 10.18821/0208-0613-2016-34-4-123-128.
[Larkin D.M., Yudin N.S. The genomes and history of domestic animals. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2016;31(4):197-202. DOI 10.3103/S0891416816040054.]
- Романенкова О.С., Волкова В.В., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Диагностика гаплотипа HH5 в стадах голштинского и голштинизированного черно-пестрого скота России. *Молоч. и мясн. скотоводство*. 2018;6:13-15. DOI 10.25632/MMS.2018.2018.20295.
[Romanenkova O.S., Volkova V.V., Kostyunina O.V., Zinovieva N.A. Diagnostics of HH5 haplotype for Russian Holstein and Black-and-White cattle population. *Molochnoe i Myasnoe Skotvodstvo = Dairy and Beef Cattle Breeding*. 2018;6:13-15. DOI 10.25632/MMS.2018.2018.20295. (in Russian)]
- Романенкова О.В., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Разработка тест-системы для диагностики гаплотипа фертильности крупного рогатого скота HH3, ассоциированного с ранней эмбриональной смертностью. *Достижения науки и техники АПК*. 2015;29(11):91-94.

- [Romanenkova O.V., Gladyr E.A., Kostyunina O.V., Zinovieva N.A. Development of test system for diagnostics of cattle fertility haplotype HH3 associated with early embryonic mortality. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(11):91-94. (in Russian)]
- Романенкова О.В., Гладырь Е.А., Костюнина О.В., Зиновьева Н.А. Скрининг российской популяции крупного рогатого скота на наличие мутации в *APAF1*, ассоциированной с гаплотипом фертильности HH1. *Достижения науки и техники АПК*. 2016;30(2):94-97.
- [Romanenkova O.V., Gladyr E.A., Kostyunina O.V., Zinovieva N.A. Screening of cattle for the presence of mutation in *APAF1* gene, which is associated with fertility haplotype HH1. *Dostizheniya Nauki i Tekhniki APK = Achievements of Science and Technology of AIC*. 2016;30(2):94-97. (in Russian)]
- Сабетова К.Д., Подречнева И.Ю., Белокуров С.Г., Щеголев П.О., Кофиади И.А. Тест-система для диагностики *BLAD*-мутации в популяциях крупного рогатого скота. *Генетика*. 2021;57(8):934-940. DOI 10.31857/S0016675821080130.
- [Sabetova K.D., Podruchneva I.Yu., Belokurov S.G., Schegolev P.O., Kofiadi I.A. Test system for *BLAD* mutation diagnosis in cattle populations. *Russ. J. Genet.* 2021;57(8):936-941. DOI 10.1134/S1022795421080135.]
- Суржикова Е.С., Шарко Г.Н., Михайленко Т.Н. Аллельный спектр генов *CSN3*, *PIT-1*, *PRL* крупного рогатого скота чернопестрой породы. *Новости науки в АПК*. 2019;3:136-139. DOI 10.25930/2218-855X/032.3.12.2019.
- [Surzhikova E.S., Sharko G.N., Mikhailenko T.N. Allelic spectrum of *CSN3*, *PIT-1*, *PRL* genes in horned cattle of Black-and-White breed. *Novosti Nauki v APK = Science News of AIC*. 2019;3:136-139. DOI 10.25930/2218-855X/032.3.12.2019. (in Russian)]
- Терлецкий В.П., Буралхив Б.А., Усенбеков Е.С., Елубаева М., Тыщенко В.И., Бейшова И.С. Скрининг на носительство мутаций, детерминирующих развитие наследственных заболеваний у племенного крупного рогатого скота. *Акт. вопросы вет. биологии*. 2016;3:3-7.
- [Terletskiy V.P., Buralkhiyev B.A., Usenbekov Y.S., Yelubayeva M., Tyshchenko V.I., Beyshova I.S. Screening for mutations that determine the development of hereditary diseases in breeding cattle. *Aktual'nye Voprosy Veterinarnoi Biologii = Actual Questions of Veterinary Biology*. 2016;3:3-7. (in Russian)]
- Усова Т.П., Усманова Н.Н., Литвина Н.И., Усов Н.В. Распространение *BLAD*-синдрома у быков-производителей голштинской породы отечественной и импортной селекции. *Вестн. Рос. гос. аграр. заоч. ун-та*. 2017;25:20-24.
- [Usova T.P., Usmanova N.N., Litvina N.I., Usov N.V. The spread of *BLAD*-syndrome of breeding bulls of Holstein breed of Russian and import selection. *Vestnik Rossiyskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Zaochnogo Universiteta = Bulletin of the Russian State Agricultural Correspondence University*. 2017;25:20-24. (in Russian)]
- Форнара М.С., Костюнина О.В., Филипченко А.А., Сермягин А.А., Зиновьева Н.А. Система определения полиморфизма *SUGT1*, ассоциированного с гаплотипом фертильности симментальского скота FH4. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2019;3:92-97. DOI 10.26155/vet.zoo.bio.201903015.
- [Fornara M.S., Kostyunina O.V., Filipchenko A.A., Sermyagin A.A., Zinoviyeva N.A. Polymorphism determination system of gene *SUGT1* associated with Fleckvieh fertility haplotype FH4. *Veterinariya, Zootehniya i Biotekhnologiya = Veterinary Medicine, Zootechnics and Biotechnology*. 2019;3:92-97. DOI 10.26155/vet.zoo.bio.201903015. (in Russian)]
- Юдин Н.С., Воевода М.И. Молекулярно-генетические маркеры экономически важных признаков у молочного скота. *Генетика*. 2015;51(5):600-612. DOI 10.7868/S0016675815050082.
- [Yudin N.S., Voevoda M.I. Molecular genetic markers of economically important traits in dairy cattle. *Russ. J. Genet.* 2015;51(5):506-517. DOI 10.1134/S1022795415050087.]
- Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Происхождение, селекция и адаптация российских пород крупного рогатого скота по данным полногеномных исследований. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(5):559-568. DOI 10.18699/VJ19.525.
- [Yudin N.S., Larkin D.M. Whole genome studies of origin, selection and adaptation of the Russian cattle breeds. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(5):559-568. DOI 10.18699/VJ19.525. (in Russian)]
- Abd El-Hack M.E., Abdelnour S.A., Swelum A.A., Arif M. The application of gene marker-assisted selection and proteomics for the best meat quality criteria and body measurements in Qinchuan cattle breed. *Mol. Biol. Rep.* 2018;45(5):1445-1456. DOI 10.1007/s11033-018-4211-y.
- Beever J.E., Marron B.M., Parnell P.F., Teseling C.F., Steffen D.J., Denholm L.J. Developmental Duplications (DD): 1. Elucidation of the underlying molecular genetic basis of polymelia phenotypes in Angus cattle. In: Proc. XXVIII World Buiatrics Congress. Cairns, 2014.
- Bourque G., Burns K.H., Gehring M., Gorbunova V., Seluanov A., Hammell M., Imbeault M., Izsvák Z., Levin H.L., Macfarlan T.S., Mager D.L., Feschotte C. Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol.* 2018;19:199. DOI 10.1186/s13059-018-1577-z.
- Buggiotti L., Yurchenko A.A., Yudin N.S., Vander Jagt C.J., Vorobieva N.V., Kusliy M.A., Vasiliev S.K., Rodionov A.N., Boronetskaya O.I., Zinovieva N.A., Graphodatsky A.S., Daetwyler H.D., Larkin D.M. Demographic history, adaptation, and NRAP convergent evolution at amino acid residue 100 in the world northernmost cattle from Siberia. *Mol. Biol. Evol.* 2021;38(8):3093-3110. DOI 10.1093/molbev/msab078.
- Cieplach A., Rutkowska K., Oprzkadek J., Poławska E. Genetic disorders in beef cattle: a review. *Genes Genomics*. 2017;39(5):461-471. DOI 10.1007/s13258-017-0525-8.
- Curi R.A., de Oliveira H.N., Gimenes M.A., Silveira A.C., Lopes C.R. Effects of *CSN3* and *LGB* gene polymorphisms on production traits in beef cattle. *Genet. Mol. Biol.* 2005;28(2):262-266. DOI 10.1590/S1415-47572005000200015.
- Fasquelle C., Sartelet A., Li W., Dive M., Tamma N., Michaux C., Druet T., Huijbers I.J., Isacke C.M., Coppieters W., Georges M., Charlier C. Balancing selection of a frame-shift mutation in the *MRC2* gene accounts for the outbreak of the Crooked Tail Syndrome in Belgian Blue Cattle. *PLoS Genet.* 2009;5(9):e1000666. DOI 10.1371/journal.pgen.1000666.
- Fontanesi L., Scotti E., Russo V. Haplotype variability in the bovine *MITF* gene and association with piebaldism in Holstein and Simmental cattle breeds. *Anim. Genet.* 2012;43(3):250-256. DOI 10.1111/j.1365-2052.2011.02242.x.
- Gwazdauskas F.C. Effects of climate on reproduction in cattle. *J. Dairy Sci.* 1985;68(6):1568-1578. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(85)80995-4.
- Hayes B.J., Daetwyler H.D. 1000 Bull Genomes Project to map simple and complex genetic traits in cattle: applications and outcomes. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2019;7:89-102. DOI 10.1146/annurev-animal-020518-115024.
- Hirano T., Kobayashi N., Matsuhashi T., Watanabe D., Watanabe T., Takasuga A., Sugimoto M., Sugimoto Y. Mapping and exome sequencing identifies a mutation in the *IARS* gene as the cause of hereditary perinatal weak calf syndrome. *PLoS One*. 2013;8(5):e64036. DOI 10.1371/journal.pone.0064036.
- Hirano T., Matsuhashi T., Takeda K., Hara H., Kobayashi N., Kita K., Sugimoto Y., Hanzawa K. *IARS* mutation causes prenatal death in Japanese Black cattle. *Anim. Sci. J.* 2016;87(9):1178-1181. DOI 10.1111/asj.12639.
- Hohmann L.G., Weimann C., Scheper C., Erhardt G., König S. Associations between maternal milk protein genotypes with preweaning calf growth traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 2020;98(10):skaa280. DOI 10.1093/jas/skaa280.
- Ibeagha-Awemu E.M., Kgwatalala P., Ibeagha A.E., Zhao X. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of

- cattle, goat, sheep, and pig. *Mamm. Genome*. 2008;19(4):226-245. DOI 10.1007/s00335-008-9101-5.
- Jianqin S., Leiming X., Lu X., Yelland G.W., Ni J., Clarke A.J. Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutr. J.* 2016;15:35. DOI 10.1186/s12937-016-0147-z.
- Johnson E.B., Steffen D.J., Lynch K.W., Herz J. Defective splicing of *Megf7/Lrp4*, a regulator of distal limb development, in autosomal recessive mulefoot disease. *Genomics*. 2006;88(5):600-609. DOI 10.1016/j.ygeno.2006.08.005.
- Klungland H., Våge D.I., Gomez-Raya L., Adalsteinsson S., Lien S. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome*. 1995;6(9):636-639. DOI 10.1007/BF00352371.
- Kuhn R.M., Haussler D., Kent W.J. The UCSC genome browser and associated tools. *Brief. Bioinform.* 2013;14(2):144-161. DOI 10.1093/bib/bbs038.
- Kunieda M., Tsuji T., Abbasi A.R., Khalaj M., Ikeda M., Miyadera K., Ogawa H., Kunieda T. An insertion mutation of the bovine *FII* gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle. *Mamm. Genome*. 2005;16(5):383-389. DOI 10.1007/s00335-004-2462-5.
- Lenffer J., Nicholas F.W., Castle K., Rao A., Gregory S., Poidinger M., Mailman M.D., Ranganathan S. OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals): an enhanced platform and integration into the Entrez search interface at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(1):D599-D601. DOI 10.1093/nar/gkj152.
- Li H. Tabix: fast retrieval of sequence features from generic TAB-delimited files. *Bioinformatics*. 2011;27(5):718-719. DOI 10.1093/bioinformatics/btq671.
- Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760. DOI 10.1093/bioinformatics/btp324.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079. DOI 10.1093/bioinformatics/btp352.
- Liu G.E., Bickhart D.M. Copy number variation in the cattle genome. *Funct. Integr. Genomics*. 2012;12(4):609-624. DOI 10.1007/s10142-012-0289-9.
- McClure M., McClure J. Genetic Disease and Trait Information for IDB Genotyped Animals in Ireland. Bandon: Irish Cattle Breeding Federation, 2016.
- McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernysky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. DOI 10.1101/gr.107524.110.
- Mee J.F. Investigation of bovine abortion and stillbirth/perinatal mortality – similar diagnostic challenges, different approaches. *Ir. Vet. J.* 2020;73:20. DOI 10.1186/s13620-020-00172-0.
- Mullen M.P., Berry D.P., Howard D.J., Diskin M.G., Lynch C.O., Berkowicz E.W., Magee D.A., MacHugh D.E., Waters S.M. Associations between novel single nucleotide polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2010;93(12):5959-5969. DOI 10.3168/jds.2010-3385.
- Notter D.R. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J. Anim. Sci.* 1999;77(1):61-69. DOI 10.2527/1999.77161x.
- Ohba Y., Takasu M., Nishii N., Takeda E., Maeda S., Kunieda T., Kitagawa H. Pedigree analysis of factor XI deficiency in Japanese black cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 2008;70(3):297-299. DOI 10.1292/jvms.70.297.
- Pighetti G.M., Elliott A.A. Gene polymorphisms: the keys for marker assisted selection and unraveling core regulatory pathways for mastitis resistance. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2011;16(4):421-432. DOI 10.1007/s10911-011-9238-9.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81(3):559-575. DOI 10.1086/519795.
- Raina V.S., Kour A., Chakravarty A.K., Vohra V. Marker-assisted selection vis-à-vis bull fertility: coming full circle – a review. *Mol. Biol. Rep.* 2020;47(11):9123-9133. DOI 10.1007/s11033-020-05919-0.
- Sebastiani C., Arcangeli C., Ciullo M., Torricelli M., Cinti G., Fisichella S., Biagetti M. Frequencies evaluation of β -casein gene polymorphisms in dairy cows reared in Central Italy. *Animals (Basel)*. 2020;10(2):252. DOI 10.3390/ani10020252.
- Storey J.D., Bass A.J., Dabney A., Robinson D. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. R Packag. version 2.24.0. 2020. DOI 10.18129/B9.bioc.qvalue.
- Storey J.D., Tibshirani R. Statistical significance for genome-wide experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003;100(16):9440-9445. DOI 10.1073/pnas.1530509100.
- Tambasco D.D., Paz C.C.P., Tambasco-Studart M., Pereira A.P., Alencar M.M., Freitas A.R., Coutinho L.L., Packer I.U., Regitano L.C.A. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* \times *Bos indicus*. *J. Anim. Breed. Genet.* 2003;120(1):51-56. DOI 10.1046/j.1439-0388.2003.00371.x.
- Tatum J.D. Pre-Harvest Cattle Management Practices for Enhancing Beef Tenderness. Colorado State Univ., 2006.
- Watanabe D., Hirano T., Sugimoto Y., Ogata Y., Abe S., Ando T., Ohtsuka H., Kunieda T., Kawamura S. Carrier rate of Factor XI deficiency in stunted Japanese black cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 2006;68(12):1251-1255. DOI 10.1292/jvms.68.1251.
- Xu L., Bickhart D.M., Cole J.B., Schroeder S.G., Song J., Tassell C.P., Sonstegard T.S., Liu G.E. Genomic signatures reveal new evidences for selection of important traits in domestic cattle. *Mol. Biol. Evol.* 2015;32(3):711-725. DOI 10.1093/molbev/msu333.
- Yurchenko A., Yudin N., Aitnazarov R., Plyusnina A., Brukhin V., Soloshenko V., Lhasaranov B., Popov R., Paronyan I.A., Plemyshev K.V., Larkin D.M. Genome-wide genotyping uncovers genetic profiles and history of the Russian cattle breeds. *Heredity (Edinb.)*. 2018;120(2):125-137. DOI 10.1038/s41437-017-0024-3.

ORCID ID

N.S. Yudin orcid.org/0000-0002-1947-5554
D.M. Larkin orcid.org/0000-0001-7859-6201

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России (Соглашение о предоставлении гранта в форме субсидии № 075-15-2021-1004).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.11.2021. После доработки 20.12.2021. Принята к публикации 30.12.2021.

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

Молекулярно-генетические особенности патогенеза идиопатического легочного фиброза

Р.Н. Мустафин 

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия
 ruji79@mail.ru

Аннотация. Идиопатический легочный фиброз – тяжелая прогрессирующая интерстициальная болезнь легких с распространенностью 2–29 случаев на 100 000 человек населения в мире. Значимым фактором риска заболевания является старение, механизмы развития которого задействованы в патогенезе идиопатического легочного фиброза. К ним относятся истощение теломер, геномная нестабильность, дисфункция митохондрий и потеря протеостаза. Важную роль в развитии идиопатического легочного фиброза играют также эпителиально-мезенхимальный переход, активация TGF- β и снижение экспрессии сиртуина SIRT7. Молекулярно-генетические исследования показали, что в патогенезе идиопатического легочного фиброза имеют значение мутации и полиморфизмы в генах муцина (*MUC5B*), в генах, ответственных за целостность теломера (*TERC*, *TERT*, *TINF2*, *DKC1*, *RTEL1*, *PARN*), генов сурфактанта (*SFTPC*, *SFTPCA*, *SFTPA2*, *ABCA3*, *SP-A2*) и иммунной системы (*IL1RN*, *TOLLIP*), а также гаплотипы генов HLA (*DRB1*15:01*, *DQB1*06:02*). Перспективно изучение влияния на развитие болезни обратимых эпигенетических факторов, которые могут быть скорректированы таргетной терапией. Среди них с идиопатическим легочным фиброзом ассоциированы специфические микроРНК и длинные некодирующие РНК. Сделано предположение, что драйверным событием для идиопатического легочного фиброза служит дисрегуляция транспозонов, которые являются ключевыми источниками некодирующих РНК и влияют на механизмы старения. Это обусловлено тем, что при патологической активации транспозонов происходит нарушение регуляции генов, в эпигенетическом управлении которых участвуют происходящие от этих транспозонов микроРНК (в связи с комплементарностью нуклеотидных последовательностей). Анализ базы данных MDTE (miRNAs derived from Transposable Elements) позволил выявить 12 различных микроРНК, гены которых в эволюции возникли от транспозонов и ассоциированы с идиопатическим легочным фиброзом (miR-31, miR-302, miR-326, miR-335, miR-340, miR-374, miR-487, miR-493, miR-495, miR-630, miR-708, miR-1343). Описаны взаимосвязи мобильных элементов с TGF- β , сиртуинами и теломерами, дисфункция которых вовлечена в патогенез идиопатического легочного фиброза. Новые данные об эпигенетических механизмах развития патологии могут стать основой для улучшения результатов таргетной терапии болезни с использованием в качестве мишени некодирующих РНК.
Ключевые слова: идиопатический легочный фиброз; иммунная система; микроРНК; теломеры; транспозоны; эпигенетические факторы.

Для цитирования: Мустафин Р.Н. Молекулярно-генетические особенности патогенеза идиопатического легочного фиброза. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3):308-318. DOI 10.18699/VJGB-22-37

Molecular genetics of idiopathic pulmonary fibrosis

R.N. Mustafin 

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
 ruji79@mail.ru

Abstract. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a severe progressive interstitial lung disease with a prevalence of 2 to 29 per 100,000 of the world's population. Aging is a significant risk factor for IPF, and the mechanisms of aging (telomere depletion, genomic instability, mitochondrial dysfunction, loss of proteostasis) are involved in the pathogenesis of IPF. The pathogenesis of IPF consists of TGF- β activation, epithelial-mesenchymal transition, and SIRT7 expression decrease. Genetic studies have shown a role of mutations and polymorphisms in mucin genes (*MUC5B*), in the genes responsible for the integrity of telomeres (*TERC*, *TERT*, *TINF2*, *DKC1*, *RTEL1*, *PARN*), in surfactant-related genes (*SFTPC*, *SFTPCA*, *SFTPA2*, *ABCA3*, *SP-A2*), immune system genes (*IL1RN*, *TOLLIP*), and haplotypes of HLA genes (*DRB1*15:01*, *DQB1*06:02*) in IPF pathogenesis. The investigation of the influence of reversible epigenetic factors on the development of the disease, which can be corrected by targeted therapy, shows promise. Among them, an association of a number of specific microRNAs and long noncoding RNAs was revealed with IPF. Therefore, dysregulation of transposons, which serve as key sources of noncoding RNA and affect mechanisms of aging, may serve as a driver for IPF development. This is due to the fact that pathological activation of transposons leads to violation of the regulation of genes, in the epigenetic control of which microRNA originating from these transposons are involved (due to the complementarity of nucleotide sequences). Analysis of the MDTE database

(miRNAs derived from Transposable Elements) allowed the detection of 12 different miRNAs derived in evolution from transposons and associated with IPF (miR-31, miR-302, miR-326, miR-335, miR-340, miR-374, miR-487, miR-493, miR-495, miR-630, miR-708, miR-1343). We described the relationship of transposons with TGF- β , sirtuins and telomeres, dysfunction of which is involved in the pathogenesis of IPF. New data on IPF epigenetic mechanisms can become the basis for improving results of targeted therapy of the disease using noncoding RNAs.

Key words: idiopathic pulmonary fibrosis; immune system; microRNA; telomeres; transposons; epigenetic factors.

For citation: Mustafin R.N. Molecular genetics of idiopathic pulmonary fibrosis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):308-318. DOI 10.18699/VJGB-22-37

Введение

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) – это прогрессирующая тяжелая интерстициальная болезнь легких с ежегодной заболеваемостью в мире до 17.4 человека на 100 000 населения (Chioma, Drake, 2017). Распространенность ИЛФ в разных странах варьирует от 2 до 29 на 100 000 человек (Zhao et al., 2017): в Финляндии – 16–18 (Hodgson et al., 2002), в США – 14–42.7. Старение повышает риск развития ИЛФ, поскольку для лиц старше 75 лет распространенность болезни достигает 227.2 на 100 000, тогда как для людей в возрасте от 18 до 34 лет ИЛФ встречается с частотой 4 на 100 000. Средний возраст больных – 66 лет (Raghu et al., 2006). Выживаемость при ИЛФ составляет около 3 лет, а доступные лекарства лишь замедляют снижение функции легких, практически не влияя на смертность (Wuyma et al., 2017).

В патогенезе ИЛФ участвуют средовые воздействия и микроорганизмы (Sgalla et al., 2018). Потенциальную роль играют вирусные (Эпштейн–Барра, цитомегаловирус, герпесвирус-1,-7,-8 (Sheng et al., 2020), саркомы Капоши и гепатита С), бактериальные и грибковые инфекции. Показана ассоциация курения и вдыхания металлической пыли с риском развития ИЛФ (Chioma, Drake, 2017; Sgalla et al., 2018). Из средовых факторов выделяют также профессиональные вредности, такие как контакты с кремнием, бериллием, угольной пылью, асбестом, радиацией. Развитие ИЛФ могут вызвать некоторые противовоспалительные (сульфасалазин, ритуксимаб), химиотерапевтические (блеомицин, метотрексат), сердечные (амиодарон, пропранолол) препараты и антибиотики (нитрофурантоин, этамбутол) (Chioma, Drake, 2017). Проведенный в 2019 г. метаанализ исследований, включавший 3206 пациентов и 9368 здоровых индивидов, показал роль гастроэзофагеальной рефлюксной болезни в развитии ИЛФ (Methot et al., 2019).

Согласно общепринятой гипотезе, ИЛФ развивается в результате повторяющихся повреждений альвеолярного эпителия или эндотелия с провоцированием иммунных реакций для восстановления структуры ткани. При этом медиаторы воспаления, такие как профибротический цитокин – трансформирующий фактор роста β (TGF- β), активируют ангиогенез и продукцию компонентов внеклеточного матрикса (коллагена и фибронектина). Неспособность инактивировать фиброзный триггер приводит к обострению воспалительного ответа с избыточным отложением компонентов матрикса и образованием рубцов в легких (Chioma, Drake, 2017). Выявлено множество молекулярных медиаторов ИЛФ: белки поверхности клеток, внутриклеточные белки и растворимые молекулы (цитокины). Показана взаимосвязь ИЛФ с сиртуинами,

семейством гистоновых деацетилаз, которые нуждаются в NAD⁺ для своей каталитической активности. Экспрессия сиртуинов в фибробластах больных ИЛФ значительно снижается. Сходным образом обнаружено уменьшение концентрации SIRT7 в тканях легких на экспериментальных моделях мышей с ИЛФ, индуцированных блеомицином. Ингибирование SIRT7 в культурах фибробластов при помощи siРНК вызывало усиление синтеза коллагена. В то же время сверхэкспрессия SIRT7 в фибробластах легких приводит к более низким уровням COL1A1, COL1A2, COL3A1, оказывая антифибротический эффект (Wuyma et al., 2017).

Важное значение в патогенезе ИЛФ имеет эпителиально-мезенхимальный переход, во время которого подавляется экспрессия молекул адгезии (Е-кадгерина), а цитокератиновый цитоскелет трансформируется в виментинный. Соответственно эпителиальные клетки приобретают мезенхимальную морфологию (Li J. et al., 2021). Однако до сих пор нет законченной теории, которая бы полностью объясняла механизм развития ИЛФ. Наиболее объективные данные о патогенезе болезни можно получить с помощью молекулярно-генетических исследований, которые перспективны для выявления индивидуального риска ИЛФ и разработки эффективной таргетной терапии (Spagnolo, Cottin, 2017).

Генетические факторы идиопатического легочного фиброза

Семейные случаи ИЛФ с поражением двух и более членов семьи составляют в среднем 10–15 % всех форм болезни (Chioma, Drake, 2017). Различают спорадические и семейные случаи ИЛФ (Lawson et al., 2004), а также ассоциированные со специфическими наследственными синдромами (синдромальные) формы ИЛФ (Gochuico et al., 2012). Спорадические случаи относятся к многофакторным болезням, т. е. ассоциированы с полиморфными вариантами различных генов (табл. 1), но на их развитие оказывают влияние факторы внешней среды. Факторами риска спорадического ИЛФ являются мужской пол, курение, вдыхание металлической и древесной пыли или использование определенных лекарств, таких как метотрексат и блеомицин (Fernandez et al., 2012). Семейные ИЛФ (СИЛФ) сходны со спорадическими, но характеризуются более ранней манифестацией. Они обусловлены мутациями определенных генов (см. табл. 1) (Lawson et al., 2004).

Впервые СИЛФ были описаны еще в 1958 г. как ауто-сомно-доминантное заболевание с варьирующей пенетрантностью (McKusick, Fisher, 1958). До 18 % всех СИЛФ обусловлены мутациями в генах компонентов теломеразы:

Таблица 1. Генетика различных форм идиопатического легочного фиброза

Ген/мутация (полиморфизм)	Белковый (ПНК) продукт	Литературный источник
Наследственная болезнь		
<i>RTEL1</i> / c.602delG, c.1451C > T, c.1940C > T, c.2005C > T, c.3371A > C	Геликаза, регулирующая удлинение теломер	Stuart et al., 2015
<i>PARN</i> / IVS4-2a > g, c.529C > T, c.563_564insT, c.751delA, IVS16+1g > a, c.1262A > G	Нуклеаза деаденирования	
<i>MUC5B</i> / (rs35705950)	Муцин 5B	Seibold et al., 2011
<i>TERT</i> / c.97C > T, c.430G > A, c.1456C > T, c.2240delT, c. 2593C > T, c.2594G > A, c.3346_3522del	Обратная транскриптаза теломер	Tsakiri et al., 2007
<i>TERC</i> / r.37a > g	РНК-компонент теломер	
<i>TERT</i> / c.1892G > A, c.2594G > A, c.2648T > G	Обратная транскриптаза теломер	Fernandez et al., 2012
<i>SFTPC</i> / экзон 5 (+128T > A)	Белок сурфактанта С	Thomas et al., 2002
Синдромальная болезнь		
<i>AP3B1</i> / c.1525C > T (p.R509X), c.1739T > G (p.L580R), IVS10+5G > A, IVS11-1G > C	Белок внутриклеточного трафика	Gochuico et al., 2012
Спорадическая болезнь		
<i>AKAP13</i> / (rs62023891)	Лимфобластный онкоген	Allen et al., 2020
<i>ATP11A</i> / (rs9577395)	Мембранная АТФаза, регулирующая транспорт ионов кальция	
<i>DPP9</i> / (rs12610495)	Сериновая протеаза	
<i>DSP</i> / (rs2076295)	Десмоплакин для межклеточных контактов	
<i>IVD</i> / (rs59424629)	Изовалерил-КоА дегидрогеназа	
<i>IL1RN</i> / (VNTR*2)	Интерлейкин	Korthagen et al., 2012
<i>FAM13A</i> / (rs2013701)	Белок, участвующий в рецепторном сигналинге	Allen et al., 2020
<i>MUC5B</i> / (rs35705950)	Муцин 5B	Seibold et al., 2011; Noth et al., 2013; Lee M.G., Lee Y.H., 2015; Allen et al., 2020
<i>SFTPC</i> / (G4702C, C4859G, G4877A, G5089A, C5210A, G5236A, G5574A, A5786C, T6108C, C6699T)	Белок сурфактанта С	Lawson et al., 2004
<i>SPPL2C</i> / (rs17690703)	Лизосомальный мембранный белок	Noth et al., 2013
<i>TERC</i> / (rs12696304)	РНК-компонент теломер	Allen et al., 2020
<i>TERT</i> / (rs7725218)	Обратная транскриптаза теломер	
<i>TOLLIP</i> / (rs111521887, rs5743894, rs5743890)	Toll-взаимодействующий белок врожденной иммунной системы	Noth et al., 2013

TERT (с.97С > Т, с.430G > А, с.1456С > Т, с.2240delТ, с.2593С > Т, с.2594G > А, с.3346_3522del) и *TERC* (r.37a > g) (Tsakiri et al., 2007). Экзомное секвенирование позволило определить также более редкие формы СИЛФ, вызванные мутациями в гене геликазы, регулирующей элонгацию теломер (*RTEL1*: с.602delG, с.1451С > Т, с.1940С > Т, с.2005С > Т, с.3371А > С) и в гене нуклеазы деаденирования (*PARN*: IVS4-2a > g, с.529С > Т, с.563_564insТ, с.751delА, IVS16+1g > a, с.1262А > G) (Stuart et al., 2015). Выявлены случаи СИЛФ, обусловленные мутацией в экзоне 5 (+128Т > А) в гене белка сурфактанта *SFTPC* (Thomas et al., 2002).

Синдромальный ИЛФ развивается при аутосомно-рецессивном синдроме Германского–Пудлака, который обусловлен мутацией в гене *AP3B1* (кодирует белок внутриклеточного трафика). При этом характерными мутациями являются следующие: с.1525С > Т (р.R509X), с.1739Т > G (р.L580R), IVS10+5G > А, IVS11-1G > С (Gochuico et al., 2012).

В промоторной области гена муцина (*MUC5B*) расположен высококонсервативный для приматов полиморфный вариант rs35705950, который ассоциирован со спорадическими и семейными формами ИЛФ (Seibold et al., 2011). Полиморфизмы гена *SFTPC* (G4702С, C4859G, G4877А, G5089А, C5210А, G5236А, G5574А, A5786С, T6108С, C6699Т) ассоциированы со спорадическим ИЛФ (Lawson et al., 2004). При данной форме болезни определяется укорочение теломер циркулирующих лимфоцитов, что свидетельствует о роли изменений в генах *TERT* и *TERC* (Fernandez et al., 2012). Согласно эпидемиологическим данным, семейные формы с аутосомно-доминантным типом наследования составляют от 0.5–2 % (США) (Allam, Limper, 2006) до 3.3–3.7 % (Финляндия) (Hodgson et al., 2002) всех случаев ИЛФ.

Наиболее достоверные данные о генах, вовлеченных в патогенез ИЛФ, можно получить в масштабных исследованиях с помощью полногеномного анализа ассоциаций (GWAS). Так, на основании метаанализа пяти исследований больных ИЛФ по сравнению со здоровым контролем (88, 61, 54, 22 и 77 больных ИЛФ в выборках из разных стран) был выявлен гапоблок VNTR*2 гена *IL1RN* (кодирует антагонист рецептора интерлейкина-1), ассоциированный с восприимчивостью к развитию спорадического ИЛФ (Korthagen et al., 2012). При исследовании 544 пациентов с ИЛФ определены ассоциации с различными аллелями гена *TOLLIP* (rs111521887, rs5743894, rs5743890), аллелем гена *SPPL2C* (rs17690703) и аллелем гена *MUC5B* (rs35705950). Ген *TOLLIP* кодирует Toll-взаимодействующий белок, участвующий в работе врожденной иммунной системы, ген *SPPL2C* кодирует лизосомальный мембранный белок с консервативным трансмембранным доменом (Noth et al., 2013). Роль аллельного варианта *MUC5B* (rs35705950) в предрасположенности к ИЛФ была подтверждена в метаанализе 2859 больных ИЛФ (контроль – 6901 чел.) (Lee M.G., Lee Y.H., 2015). Белок Tollip играет важную роль в модулировании транспортировки и деградации TGF-β (Zhu L. et al., 2012), что согласуется с ролью TGF-β в патогенезе ИЛФ (Chioma, Drake, 2017).

Проведенное в 2016 г. GWAS на 1616 больных (контроль – 4683 чел.) показало связь двух гаплотипов

генов главного комплекса гистосовместимости (*HLA*): *DRB1*15:01* и *DQB1*06:02* с развитием ИЛФ. Это позволило предположить роль аутоиммунных процессов в развитии ИЛФ (Fingerlin et al., 2016). В 2020 г. GWAS на образцах ДНК 2668 пациентов показало ассоциацию спорадического ИЛФ с аллелями генов *MUC5B* (rs35705950), *TERC* (rs12696304), *TERT* (rs7725218), *DSP* (кодирует десмоплакин для межклеточных контактов, аллель rs2076295), *ATP11A* (кодирует мембранную АТФазу, регулирующую транспорт ионов кальция, вариант rs9577395), *IVD* (кодирует изовалерил-КоА дегидрогеназу, полиморфизм rs59424629), *AKAP13* (кодирует лимфобластный онкоген, аллель rs62023891), *FAM13A* (индуцируемый гипоксией ген, ассоциированный с раком легкого, вариант rs2013701), *DPP9* (кодирует сериновую протеазу, полиморфизм rs12610495) (Allen et al., 2020).

Таким образом, согласно большинству генетических исследований, ИЛФ ассоциирован с аллельными вариантами генов, ответственных за выработку муцина, функционирование теломер и иммунной системы, что свидетельствует о сложном патогенезе болезни. Кроме того, ИЛФ ассоциирован со старением. На молекулярном уровне в развитии ИЛФ участвуют характерные для старения процессы, включая истощение теломер, геномную нестабильность, дисфункцию митохондрий, клеточное старение и потерю протеостаза (Gulati, Thannickal, 2019). Одной из причин старения является дисфункция иммунной системы и теломер, обусловленная нарушением экспрессии транспозонов (Мустафин, 2019). Это связано с тем, что в эволюции транспозоны стали источниками нуклеотидных последовательностей как самих теломер (Arkhipova et al., 2017), так и генов, кодирующих теломеразу (Garavis et al., 2013). У дрозофилы роль теломеразы выполняют непосредственно ретротранспозоны TAHRE (telomere associated and HeT-A related), TART (telomere associated retrotransposon) и HeT-A (healing transposon) (Casacuberta, 2017). У человека выявлена способность LINE1-ретротранспозонов участвовать в альтернативном удлинении теломер (Бондарев, Хавинсон, 2016). Роль транспозонов в патогенезе ИЛФ вероятна, поскольку СИЛФ наиболее часто обусловлены мутациями в генах, обеспечивающих поддержание целостности теломер (гены *TERC* и *TERT*) (Tsakiri et al., 2007; Fernandez et al., 2012), а спорадические формы ИЛФ могут быть ассоциированы с полиморфными вариантами этих генов (Allen et al., 2020).

Мобильные элементы служат основой для эпигенетической регуляции развития организма (Мустафин, Хуснутдинова, 2019). Они представляют собой участки генома, способные к перемещению в новый локус, и занимают 45 % ДНК человека. Их классифицируют на ДНК-транспозоны (перемещение по механизму «вырезание и вставка») и ретротранспозоны (обратная транскрипция мРНК и вставка кДНК в геном) (Wei G. et al., 2016).

Роль микроРНК в патогенезе идиопатического легочного фиброза

К эпигенетическим факторам относятся метилирование ДНК, модификации гистонов и ремоделирование хроматина, а также РНК-интерференция с помощью неко-

дирующих РНК. Транспозоны – важнейшие источники возникновения генов микроРНК в ходе эволюции, в связи с чем еще в 2016 г. была создана база данных MDTE (miRNAs derived from Transposable Elements) (Wei G. et al., 2016), в которой собраны результаты работ различных авторов (Piriyaopongsa et al., 2007; Gu et al., 2009; Filshtein et al., 2012; Tempel et al., 2012; Qin et al., 2015). Изучение микроРНК может дать информацию о механизмах развития ИЛФ, а также стать основой для разработки эффективной терапии болезни. В иницировании и прогрессировании ИЛФ важную роль играют фибробласты легкого. Проведено исследование экспрессии микроРНК этих клеток. Обнаружено снижение уровней miR-101 у больных ИЛФ людей и на экспериментальных моделях (индуцированный блеомицином фиброз легких) (Huang C. et al., 2017). В развитии ИЛФ выявлена дисрегуляция различных микроРНК, влияющих на сигнальные пути TGF- β , которые индуцируют дифференцировку клеток, миграцию, инвазию и гиперпластические изменения. К таким микроРНК относятся miR-21, miR-424 (профибротические) и miR-9-5p, miR-18a-5p, miR-26a, miR-27b, miR-101, miR-153, miR-326, miR-489, miR-1343 (антифибротические) (Kang, 2017).

Обнаружен выраженный дисбаланс экспрессии микроРНК семейств miR-29, miR-21-5p, miR-92a-3p, miR-26a-5p, let-7d-5p при ИЛФ, в связи с чем данные молекулы рассматриваются в качестве потенциальных терапевтических мишеней (Vagnato et al., 2017). В эпителии легкого человека при ИЛФ и мышей с индуцированным блеомицином фиброзом легкого выявлено снижение уровня miR-323a, которая ослабляет передачу сигналов TGF- α и TGF- β (Ge et al., 2016). На эти пути оказывает влияние также miR-21, экспрессия которой повышается в тканях легких больных ИЛФ людей и экспериментальных мышей. MiR-21 вырабатывается фибробластами и регулирует экспрессию Smad7 за счет влияния на TGF- β 1, способствуя гиперпродукции межклеточного матрикса (Liu G. et al., 2010). Низкая экспрессия miR-184 при ИЛФ коррелирует с высоким уровнем онкосупрессорного белка p63, нокаун которого уменьшает TGF- β 1-индуцированный фиброз легкого. Было выявлено, что miR-184 комплементарно связывается с 3'-UTR мРНК гена *TP63*, подавляя его экспрессию (Li J. et al., 2021).

Среди перечисленных микроРНК, ассоциированных с ИЛФ (Huang C. et al., 2017), от транспозонов, согласно MDTE и данным различных авторов (Piriyaopongsa et al., 2007; Gu et al., 2009; Filshtein et al., 2012; Tempel et al., 2012; Qin et al., 2015; Wei G. et al., 2016), произошли miR-326 (источник – ДНК-транспозон *hAT-Tip100*) и miR-1343 (источник – ретроэлемента LINE2) (Wei G. et al., 2016). В 2015 г. Yang с коллегами в плазме крови больных ИЛФ по сравнению со здоровым контролем определили значительное изменение уровней 47 различных микроРНК (Yang et al., 2015), четыре из которых произошли от мобильных генетических элементов: miR-31 – от LINE2, miR-302 – от неавтономного ретроэлемента SINE/MIR, miR-335 – от SINE/MIR, miR-374 – от LINE2. Выявленные 47 микроРНК вовлечены в сигнальные пути TGF- β , митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), PI3K-Akt, Wnt, HIF-1, Jak-STAT, Notch, регуляции актинового

цитоскелета (Yang et al., 2015). В плазме крови больных ИЛФ определена пониженная экспрессия miR-630 (Li R. et al., 2018), произошедшей от SINE/MIR (Wei G. et al., 2016), miR-708-3p (Liu B. et al., 2018) от LINE2 (Wei G. et al., 2016). Повышенные уровни произошедших от транспозонов микроРНК показаны в отношении miR-487b (от SINE/MIR), miR-493 (от LINE2), miR-495 (от LTR-содержащего ретроэлемента ERVL-MaLT) (Zhang et al., 2021). МикроРНК miR-340-5p, которая способствует пролиферации фибробластов при ИЛФ за счет воздействия на пути ATF и MAPK/p38 (Wei Y.Q. et al., 2020), произошла от ДНК-транспозона *TcMar-Mariner* (Wei G. et al., 2016).

Данные об изменении экспрессии возникших в эволюции от мобильных элементов микроРНК (а также длинных некодирующих РНК (lncRNA)) при ИЛФ в сравнении с данными научной литературы в отношении этих микроРНК при бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких представлены в табл. 2. Уникальными в отношении изменения экспрессии при ИЛФ являются 13 из 24 микроРНК: miR-9-5p, miR-27b, miR-153, miR-184, miR-326, miR-340, miR-374, miR-424, miR-487b, miR-489, miR-493, miR-630, miR-1343. Среди них 8 микроРНК (miR-153, miR-326, miR-340, miR-374, miR-487b, miR-493, miR-630, miR-1343) имеют эволюционное происхождение от TE (Piriyaopongsa et al., 2007; Gu et al., 2009; Filshtein et al., 2012; Tempel et al., 2012; Qin et al., 2015; Wei G. et al., 2016).

Изучение роли эпигенетических факторов в развитии ИЛФ служит основой для разработки новых способов таргетной терапии болезни. Потенциальными агентами для лечения ИЛФ могут быть некодирующие РНК. Было показано, что lncRNA PCAT29 (prostate cancer-associated transcript 29), которая активирует miRNA-221 и подавляет TGF- β , может быть использована для воздействия на пути TGF- β при ИЛФ (Liu X. et al., 2018). Обнаружено, что при ИЛФ снижается экспрессия miR-506, которая комплементарна 3'-UTR субъединицы p65 NF- κ B. Соответственно, использование miR-506 в качестве мишени для таргетной терапии может оказывать воздействие на апоптоз и воспаление при ИЛФ (Zhu M. et al., 2019). Введение антисмысловых miR-21 снижало тяжесть патологии у мышей с индуцированным блеомицином фиброзом легкого, что свидетельствует о потенциальном применении данной микроРНК в лечении ИЛФ (Liu G. et al., 2010). Сходные данные получены в отношении miR-708-3p (Liu B. et al., 2018). Сверхэкспрессия miR-184 вызывает подавление TGF- β -индуцированных фиброзных процессов в легком, поэтому miR-184 может быть рассмотрена для таргетной терапии ИЛФ (Li J. et al., 2021). В эксперименте и в клинических исследованиях на больных ИЛФ людях определена также эффективность интерферирующей последовательности для длинной некодирующей РНК lncITPF (sh-lncITPF), воздействие которой снижает индекс фиброза, коллагена и виментина. У больных ИЛФ выявлена повышенная экспрессия lncRNA-ITPF, которая влияет на ацетилирование гистонов H3 и H4 в промоторной области гена *ITGBL1*, стимулируя таким образом фиброз. Транскрипция lncITPF находится под контролем TGF- β 1/Smad2/3 (Song et al., 2019). Для лечения ИЛФ предложен пептид DR8 (DHNNPQIR-NH₂), обладающий

Таблица 2. Сравнительный анализ роли микроРНК в развитии идиопатического легочного фиброза и других легочных заболеваний

МикроРНК (локус)/ происхождение от TE	Направление изменения экспрессии, ткань	Механизм влияния		
		на ИЛФ	на БА	на ХОБЛ
let-7d (9q22.32)/-	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Оказывает целевое воздей- ствие на мРНК генов <i>EDA</i> , <i>LIX1L</i> , <i>MAPK11</i> , <i>NME4</i>	–*	Позитивно коррелирует (Tasena et al., 2018)
miR-9-5p (5q14.3)/-	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Антифибротический	–	–
miR-18a (13q31.3)/-	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Антифибротический, целевое воздействие на мРНК генов <i>TGF-β</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-8</i>	Снижается экспрессия (Martinez-Nunez et al., 2014)	–
miR-21 (17q23.1)/-	↑ Фибробласты легкого	Профибротический (регу- лирует экспрессию <i>Smad7</i> , усиливая передачу сигналов <i>TGF-α</i> и <i>TGF-β</i>)	Повышается экс- прессия при тяжелой форме астмы (Liu J. et al., 2020)	Повышается экспрессия (He et al., 2021)
miR-26a (3p22.2)/-	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Антифибротический, про- воспалительный (повышает уровни <i>IL-5</i> , <i>-8</i> , <i>-12</i> , <i>TNF-α</i>)	Повышается экспрес- сия (Shi et al., 2019)	–
miR-27b (9q22.32)/-	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Антифибротический	–	–
miR-29 (7q32.3)/-	↓ Фибробласты легкого	Антифибротический, регуля- ция синтеза экстрацеллюляр- ного матрикса	–	Повышается экспрессия (Kara et al., 2016)
miR-31 (9p21.3) /LINE2	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы (Yang et al., 2015)	Антифибротический, про- воспалительный (повышает уровни <i>IL-5</i> , <i>-8</i> , <i>-12</i> , <i>TNF-α</i>)	Повышается экспрес- сия (Shi et al., 2019)	–
miR-92a-3p (13q31.3)/-	↓ Фибробласты легкого	Подавляет синтез матриксной металлопротеиназы (MMP-1)	–	Снижается экспрессия (Kara et al., 2016)
miR-101 (1p31.3)/-	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Антифибротический	–	Значительно повышается (Hassan et al., 2012)
miR-153 (2q35)/-	↓ Фибробласты легкого	Антифибротический (воздей- ствует на <i>TGF-βRII</i>)	–	–
miR-184 (15q25.1)/-	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Ингибирует белок p63, уменьшая сигналинг <i>TGF-β1</i> ; подавляет экспрессию <i>TP53</i>	–	–
miR-302 (4q25) /SINE/MIR	↑ Эпителий бронхиол, альвеолы (Yang et al., 2015)	Регулятор аллергического воспаления в тучных клетках, повышает выработку <i>IL-1β</i> , <i>IL-6</i> , <i>TNF-α</i>	Повышается экспрес- сия (Xiao et al., 2018)	–
miR-323 (14q32.31)/-	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Ослабляет передачу сиг- налов <i>TGF-α</i> и <i>TGF-β</i> , регу- лирует дифференцировку Т-лимфоцитов	Повышается экспрес- сия (Karner et al., 2017)	–
miR-326 (11q13.4) /ДНК-TE <i>hAT-Tip100</i>	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы (Huang C. et al., 2017)	Антифибротический	–	–

Окончание табл. 2

МикроРНК (локус)/ происхождение от TE	Направление изменения экспрессии, ткань	Механизм влияния		
		на ИЛФ	на БА	на ХОБЛ
miR-335 (7q32.2) /SINE/MIR	↓ Фибробласты легкого (Yang et al., 2015)	Подавляет экспрессию генов <i>Rb1</i> , <i>CARF</i> , <i>SGK3</i> , подавляет пролиферацию, миграцию и дифференцировку фибробластов	–	Снижается экспрессия у курильщиков (Ong et al., 2019)
miR-340 (5q35.3) /ДНК-ТЕ <i>TcMar-Mariner</i>	↑ Фибробласты легкого (Wei Y.Q. et al., 2020)	Воздействует на пути ATF и MAPK/p38, усиливая пролиферацию фибробластов	–	–
miR-374 (Xq13.2) /LINE2	↓ Фибробласты легкого (Yang et al., 2015)	Подавляет экспрессию MID1 убиквитинлигазы, ингибирует mTOR сигнальные пути (Unterbruner et al., 2018)	–	–
miR-424 (Xq26.3)/–	↑ Фибробласты легкого	Профибротический	–	–
miR-487b (14q32.31) /SINE/MIR	↑ Фибробласты легкого (Zhang et al., 2021)	Подавляет экспрессию IL-33, снижая уровни Ig-E (Liu B. et al., 2018)	–	–
miR-489 (7q21.3)/–	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы	Антифибротический	–	–
miR-493 (14q32.2) /LINE2	↑ Фибробласты легкого (Zhang et al., 2021)	Ингибирует пути Wnt/B-catenin, Wnt/PCP, MEK/ERK, PI3K/AKT (Huang L. et al., 2019)	–	–
miR-495 (14q32.31) /ERV1-MaLT	↑ Фибробласты легкого (Zhang et al., 2021)	Подавляет синтез TNF- α , IL-1 β , IL-6	Снижается экспрессия (Li W. et al., 2021)	Положительная корреляция (Li R. et al., 2020)
miR-630 (15q24.1) /SINE/MIR	↓ Фибробласты легкого (Li R. et al., 2018)	Регулирует экспрессию генов <i>CDH2</i> , <i>VIM</i> , <i>EZH2</i> , <i>SOCS2</i> , <i>TFG</i> , <i>TLR4</i> , <i>Smad9</i> , <i>EP300</i>	–	–
miR-708 (11q14.1) /LINE2	↓ Фибробласты легкого (Liu B. et al., 2018)	Подавляет экспрессию гена металлопротеиназы (<i>ADAM17</i>), ингибирует CD44, RARRES2, ADAM33	Снижается экспрессия (Dileepan et al., 2016)	–
miR-1343 (11p13) /LINE2	↓ Эпителий бронхиол, альвеолы (Huang C. et al., 2017)	Антифибротический (регулиру- ет экспрессию рецепторов TGF- β)	–	–
lncRNA APO03419.16	↑ Ткань легкого (Hao et al., 2017)	Регулирует сигнальные пути TGF- β 1	–	–
lncRNA ITPF	↑ Ткань легкого (Song et al., 2019)	Регулирует экспрессию гена <i>ITGBL1</i> , стимулируя фиброз легкого	–	–

Примечание. TE – транспозоны (transposable elements); ИЛФ – идиопатический легочный фиброз; БА – бронхиальная астма; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; прочерк – нет данных об ассоциации или корреляции.

мощной антиоксидантной активностью. В эксперименте на животных с индуцированным блеомицином ИЛФ было выявлено, что после использования DR8 значительно снижались показатели фиброза, в том числе профиброгенные и провоспалительные цитокины и маркерные белки. Под воздействием DR8 редуцировались патологические изменения, вызванные блеомицином, а также отложения

коллагена (особенно COL1). Эксперименты *in vivo* позволили обнаружить, что DR8 способен подавлять пролиферацию и генерирование реактивных форм кислорода, стимулированных посредством TGF- β 1 (Wang et al., 2019).

Длинные некодирующие РНК (lncRNA) относятся к эпигенетическим факторам, поскольку оказывают транскрипционное, посттранскрипционное и трансляционное

регуляторное воздействие на функционирование генома. Данный эффект реализуется как с помощью вторичной структуры РНК, обеспечивающей взаимодействие с белками, так и путем гибридизации с ДНК и РНК за счет комплементарности нуклеотидов. В отношении lncRNA имеются данные об эволюционном происхождении их генов от TE (Johnson, Guigo, 2014). Согласно базе данных NONCODEv4 (<http://www.noncode.org>), у человека аннотировано более 96 000 генов lncRNA, многие из которых имеют в своем составе последовательности TE, что свидетельствует о роли TE в происхождении генов lncRNA (Johnson, Guigo, 2014). Кроме того, lncRNA могут образовываться при процессинге транскриптов LTR-содержащих ретроэлементов (Lu et al., 2014) или LINE ретроэлементов (Hanson, Macfarlan, 2018). Анализ GENOCODE и последовательностей экспрессируемых РНК показал, что большинство lncRNA произошли от транспозонов, так как не менее 83 % из них содержат один или более фрагмент ретроэлементов. В среднем около 41 % всех нуклеотидных последовательностей lncRNA идентичны транспозонам (Kelley, Rinn, 2012). Таким образом, изменение экспрессии lncRNA при ИЛФ могло бы свидетельствовать о роли мобильных элементов в патогенезе болезни. Действительно, в исследовании (Hao et al., 2017) было выявлено снижение уровней 1376 различных lncRNA и повышение – 440 lncRNA в плазме крови больных ИЛФ по сравнению со здоровым контролем. Наиболее высокий уровень наблюдался для lncRNA AP003419.16, которая вовлечена в сигнальные пути TGF- β 1 и может быть использована в качестве маркера болезни (Hao et al., 2017).

Влияние транспозонов на факторы патогенеза легочного фиброза

Вышеизложенные факты свидетельствуют о роли транспозонов в возникновении некодирующих РНК, которые участвуют в патогенезе ИЛФ и многих других заболеваний человека. С данным предположением согласуются полученные результаты молекулярно-генетических исследований ИЛФ. Прежде всего это касается влияния транспозонов на процессы старения, которые вовлечены в патогенез ИЛФ и других многофакторных заболеваний (Gulati, Thannickal, 2019). С возрастом происходит активация ретроэлементов, содержащих длинные концевые повторы (Nevalainen et al., 2018) и LINE1 (Mahmood et al., 2020). Более того, их гиперэкспрессия при старении усиливает выработку интерферона, способствуя асептическому воспалению в тканях (De Sessa et al., 2013).

Транспозоны (за счет взаимосвязи с происходящими от них микроРНК) вовлечены в функционирование иммунной системы, изменения которой ассоциированы с ИЛФ (Korthagen et al., 2012; Noth et al., 2013; Fingerlin et al., 2016). В частности, происходящая от LINE2 микроРНК miR-31 обладает провоспалительным действием, усиливая синтез IL-5, -8, -12, TNF- α (Shi et al., 2019); miR-302, возникающая в эволюции от SINE/MIR, повышает выработку IL-1 β , IL-6, TNF- α (Xiao et al., 2018). От SINE/MIR произошла также miR-487b, которая подавляет экспрессию IL-33, снижая уровни Ig-E (Liu H.C. et al., 2018). MiR-495, возникающая от ERVL-MaLT, подавляет синтез TNF- α , IL-1 β , IL-6 (Li W. et al., 2021). В эволюции у млекопитающих

гены *RAG* были доместифицированы от древних ДНК-транспозонов для V(D)J-рекомбинации в иммунной системе. Антиген-специфичный иммунитет позвоночных обладает двумя основными признаками ДНК-транспозонов. Компоненты иммунитета состоят из рекомбиназы (кодируется генами *RAG1* и *RAG2*) и мобильной ДНК (ограничена специфическими сайтами, которые узнает рекомбиназа). Белки *RAG* гомологичны транспозазе *Tc1*-элемента (Lescale, Deriano, 2016). LTR-содержащие ретроэлементы участвуют в регуляции иммунной системы человека, поскольку являются энхансерами для гена HLA-G (Chuong, 2018).

Транспозоны влияют также на вовлеченные в патогенез ИЛФ сиртуины (Wyman et al., 2017) и TGF- β (Chioma, Drake, 2017; Kang, 2017; Liu G. et al., 2010). SIRT7 эпигенетически подавляет экспрессию LINE1 по всему геному. Важную роль в этом процессе играет взаимодействие SIRT7 с ламинами A/C, так как SIRT7 обеспечивает деацетилирование гистона H3K18, способствуя взаимодействию LINE1 с ядерной ламинной (Vazquez et al., 2019). Произошедший от LTR-содержащего ретроэлемента ген *PEG10* кодирует белок PEG10-RF1, взаимодействующий с членами суперсемейства I и II типа TGF- β (Lux et al., 2005). Выявлена роль эволюционно молодых ретроэлементов в регуляции путей TGF- β , наряду с PDGF, EGFR и p38 сигналингом (Nikitin et al., 2018). Кроме того, определена роль ретроэлементов в важном для развития ИЛФ эпителиально-мезенхимальном переходе (Sgalla et al., 2018; Li J. et al., 2021), который индуцируется с помощью неавтономного ретроэлемента Alu посредством модулирования экспрессии miR-566 (Ruocco et al., 2018). Дисфункция теломер, приводящая к развитию ИЛФ (Mathai et al., 2015; Chioma, Drake, 2017; Allen et al., 2020) и многих других заболеваний человека, связана, вероятно, также с изменением активности транспозонов, которые являются эволюционными источниками генов, вовлеченных в функционирование теломер (Arkhipova, 2017) и гена теломеразы (Garavis et al., 2013).

Заключение

Исследование эпигенетических факторов в развитии ИЛФ – перспективное направление в раскрытии патогенеза болезни и разработке более эффективных методов терапии. Благодаря изучению микроРНК было показано, что ИЛФ связан с дисбалансом в эпигенетической регуляции работы генома. Причиной развития ИЛФ может быть дисбаланс в управлении работой генома динамичными структурами, играющими роль в возраст-ассоциированной патологии и старении организма. Наиболее подходящими кандидатами являются транспозоны, влияющие на функционирование иммунной системы и тесно связанные с ней эволюционно. Сделано предположение, что изучение роли транспозонов в патогенезе ИЛФ может раскрыть пути молекулярного каскада болезни. Доказательством роли мобильных элементов в патогенезе ИЛФ служит эволюционное возникновение длинных некодирующих РНК и микроРНК от транспозонов. Анализ базы данных MDTE и научной литературы позволил обнаружить 12 специфических ассоциированных с ИЛФ микроРНК, которые произошли от транспозонов. Из них 8 микроРНК

(miR-153, miR-326, miR-340, miR-374, miR-487b, miR-493, miR-630, miR-1343) являются уникальными, так как изменение их экспрессии специфично для ИЛФ и не описано при других заболеваниях бронхолегочной системы.

Список литературы / References

- Бондарев И.Э., Хавинсон В.Х. Подавление альтернативного механизма удлинения теломер в раковых клетках с помощью ингибиторов обратной транскриптазы. *Успехи геронтологии*. 2016;29(2):218-221.
- [Bondarev I.E., Khavinson V.Kh. Suppression of alternative telomere lengthening in cancer cells with reverse transcriptase inhibitors. *Adv. Gerontol.* 2016;6(4):272-274. DOI 10.1134/S2079057016040020.]
- Мустафин Р.Н. Взаимосвязь транспозонов с теломерами при старении. *Успехи геронтологии*. 2019;32(5):693-701.
- [Mustafin R.N. Aging and interrelation of telomeres with transposable elements. *Adv. Gerontol.* 2019;32(5):693-701. (in Russian)].
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506.
- [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under the influence of stress. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(4):380-389. DOI 10.18699/VJ19.506.]
- Allam J.S., Limper A.H. Idiopathic pulmonary fibrosis: is it a familial disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2006;12:312-317. DOI 10.1097/01.mcp.0000239546.24831.61.
- Allen R.J., Guillen-Guio B., Oldham J.M., Ma S.F., Dressen A., Paynton M.L., Kraven L.M., Obeidat M., Li X., Ng M., Braybrooke R., Molina M., Hobbs B.D., Putman R.K., Flores C., Noth I., Jenkins R.G., Wain L.V. Genome-wide association study of susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2020;201(5):564-574. DOI 10.1164/rccm.201905-1017OC.
- Arkhipova I.R., Yushenova I.A., Rodriguez F. Giant reverse transcriptase-encoding transposable elements at telomeres. *Mol. Biol. Evol.* 2017;34(9):2245-2257. DOI 10.1093/molbev/msx159.
- Bagnato G., Roberts W.N., Roman J., Gangemi S. A systematic review of overlapping microRNA patterns in systemic sclerosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 2017;26:160125. DOI 10.1183/16000617.0125-2016.
- Casacuberta E. Drosophila: retrotransposons making up telomeres. *Viruses*. 2017;9(7):192. DOI 10.3390/v9070192.
- Chioma O.S., Drake W.P. Role of microbial agents in pulmonary fibrosis. *Yale J. Biol. Med.* 2017;90(2):219-227.
- Chuong E.B. The placenta goes viral: retroviruses control gene expression in pregnancy. *PLoS Biol.* 2018;16(10):e3000028. DOI 10.1371/journal.pbio.3000028.
- De Cecco M., Criscione S.W., Peterson A.L., Neretti N., Sediby J.M., Kreiling J.A. Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues. *Aging (Albany NY)*. 2013;5:867-883. DOI 10.18632/aging.100621.
- Dileepan M., Sarver A.E., Rao S.P., Panettieri R.A., Jr., Subramanian S., Kannan M.S. MicroRNA mediated chemokine responses in human airway smooth muscle cells. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150842. DOI 10.1371/journal.pone.0150842.
- Fernandez B.A., Fox G., Bhatia R., Sala E., Noble B., Nash D., Fernandez D., Duguid N., Dohey A., Kamel F., Edwards L., Mahoney K., Stuckless S., Parfrey P.S., Woods M.O. A Newfoundland cohort of familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis patients: clinical and genetic features. *Respir. Res.* 2012;13:64. DOI 10.1186/1465-9921-13-64.
- Filshtein T.J., Mackenzie C.O., Dale M.D., Dela-Cruz P.S., Ernst D.M., Frankenberg E.A., He C., Heath K.L., Jones A.S., Jones D.K., King E.R., Maher M.B., Mitchell T.J., Morgan R.R., Sirobushanam S., Halkyard S.D., Tiwari K.B., Rubin D.A., Borchert G.M., Larson E.D. Orbid: Origin-based identification of microRNA targets. *Mob. Genet. Elements*. 2012;2(4):184-192. DOI 10.4161/mge.21617.
- Fingerlin T.E., Zhang W., Yang I.V., Ainsworth H.C., Russell P.H., Blumhagen R.Z., Schwarz M.I., Brown K.K., Steele M.P., Loyd J.E., Cosgrove G.P., Lynch D.A., Growhng S., Markin C.R., Beckman K.B., Langefeld C.D., Schwartz D.A. Genome-wide imputation study identifies novel HLA locus for pulmonary fibrosis and potential role for auto-immunity in fibrotic idiopathic interstitial pneumonia. *BMC Genet.* 2016;17(1):74. DOI 10.1186/s12863-016-0377-2.
- Garavis M., Gonzalez C., Villasante A. On the origin of the eukaryotic chromosome: the role of noncanonical DNA structures in telomere evolution. *Genome Biol. Evol.* 2013;5:1142-1150. DOI 10.1093/gbe/evt079.
- Ge L., Habel D.M., Hansbro P.M., Kim R.Y., Gharib S.A., Edelman J.D., Konigshoff M., Parimon T., Brauer R., Huang Y., Allen J., Jiang D., Kurkciyan A.A., Mizuno T., Stripp B.R., Noble P.W., Hogaboam C.M., Chen P. miR-323a-3p regulates lung fibrosis by targeting multiple profibrotic pathways. *JCI Insight*. 2016;1(20):e90301. DOI 10.1172/jci.insight.90301.
- Gochuico B.R., Huizing M., Golas G.A., Scher C.D., Tsokos M., Denver S.D., Frei-Jones M.J., Gahl W.A. Interstitial lung disease and pulmonary fibrosis in Hermansky-Pudlak syndrome type 2, an adaptor protein-3 complex disease. *Mol. Med.* 2012;18(1):56-64. DOI 10.2119/molmed.2011.00198.
- Gu T.J., Yi X., Zhao X.W., Zhao Y., Yin J.Q. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics*. 2009;10:563.
- Gulati S., Thannickal V.J. The aging lung and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Med. Sci.* 2019;357:384-389. DOI 10.1016/j.amjms.2019.02.008.
- Hao X., Du Y., Qian L., Li D., Liu X. Upregulation of long noncoding RNA AP003419.16 predicts high risk of aging-associated idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol. Med. Rep.* 2017;16(6):8085-8091. DOI 10.3892/mmr.2017.7607.
- Hassan F., Nuovo G.J., Crawford M., Boyaka P.N., Kirkby S., Nana-Sinkam S.P., Cormet-Boyaka E. MiR-101 and miR-144 regulate the expression of the CFTR chloride channel in the lung. *PLoS One*. 2012;7(11):e50837. DOI 10.1371/journal.pone.0050837.
- He S., Sun S., Lu J., Chen L., Mei X., Li L., Zeng Z., Zhong M., Xie L. The effects of the miR-21/SMAD7/TGF- β pathway on Th17 cell differentiation in COPD. *Sci. Rep.* 2021;11:6338. DOI 10.1038/s41598-021-85637-0.
- Hodgson U., Laitinen T., Tukiainen P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*. 2002;57(4):338-342. DOI 10.1136/thorax.57.4.338.
- Honson D.D., Macfarlan T.S. A lncRNA-like role for LINE1s in development. *Dev. Cell*. 2018;46:132-134. DOI 10.1016/j.devcel.2018.06.022.
- Huang C., Xiao X., Yang Y., Mishra A., Liang Y., Zeng X., Yang X., Xu D., Blackburn M.R., Henke C.A., Liu L. MicroRNA-101 attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and activation. *J. Biol. Chem.* 2017;292:16420-16439. DOI 10.1074/jbc.M117.805747.
- Huang L., Huang L., Li Z., Wei Q. Molecular mechanisms and therapeutic potential of miR-493 in cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2019;29(6):521-528. DOI 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019030056.
- Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs. *RNA*. 2014;20:959-976. DOI 10.1261/rna.044560.114.
- Kang H. Role of microRNAs in TGF- β signaling pathway-mediated pulmonary fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(12):2527. DOI 10.3390/ijms18122527.
- Kara M., Kirkil G., Kalemci S. Differential expression of microRNAs in chronic obstructive pulmonary disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2016;25(1):21-26. DOI 10.17219/acem/28343.
- Karner J., Wawrzyniak M., Tankov S., Runnel T., Aints A., Kisand K., Altraja A., Kingo K., Akdis C.A., Akdis M., Rebane A. Increased

- microRNA-323-3p in IL-22/IL-17-producing T cells and asthma: a role in the regulation of the TGF- β pathway and IL-22 production. *Allergy*. 2017;72(1):55-65. DOI 10.1111/all.12907.
- Kelley D., Rinn J. Transposable elements reveal a stem cell-specific class of long noncoding RNAs. *Genome Biol.* 2012;13(11):R107. DOI 10.1186/gb-2012-13-11-r107.
- Korthagen N.M., van Moorsel C.H., Kazemier K.M., Ruven H.J., Grutters J.C. IL1RN genetic variations and risk of IPF: a meta-analysis and mRNA expression study. *Immunogenetics*. 2012;64:371-377. DOI 10.1007/s00251-012-0604-6.
- Lawson W.E., Grant S.W., Ambrosini V., Womble K.E., Dawson E.P., Lane K.B., Markin C., Renzoni E., Lympany P., Thomas A.Q., Roldan J., Scott T.A., Blackwell T.S., Phillips J.A., Loyd J.E., du Bois R.M. Genetic mutations in surfactant protein C are a rare cause of sporadic cases of IPF. *Thorax*. 2004;59(11):977-980. DOI 10.1136/thx.2004.026336.
- Lee M.G., Lee Y.H. A meta-analysis examining the association between the MUC5B rs35705950 T/G polymorphism and susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. *Inflamm. Res.* 2015;64(6):463-470. DOI 10.1007/s00011-015-0829-6.
- Lescale C., Deriano L. The RAG recombinase: beyond breaking. *Mech. Ageing Dev.* 2016;16:30263-30269. DOI 10.1016/j.mad.2016.11.003.
- Li J., Pan C., Tang C., Tan W., Zhang W., Guan J. miR-184 targets TP63 to block idiopathic pulmonary fibrosis by inhibiting proliferation and epithelial-mesenchymal transition of airway epithelial cells. *Lab. Invest.* 2021;101(2):142-154. DOI 10.1038/s41374-020-00487-0.
- Li R., Wang Y., Song X., Sun W., Zhang J., Liu Y., Li H., Meng C., Zhang J., Zheng Q., Lv C. Potential regulatory role of circular RNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Mol. Med.* 2018;42(6):3256-3268. DOI 10.3892/ijmm.2018.3892.
- Li R., Xu F., Wu X., Ji S., Xia R. CUL1-mediated organelle fission pathway inhibits the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Comput. Math. Methods Med.* 2020;2020:5390107. DOI 10.1155/2020/5390107.
- Li W., Wang X., Sun S., An H. Long non-coding RNA colorectal neoplasia differentially expressed correlates negatively with miR-33a and miR-495 and positively with inflammatory cytokines in asthmatic children. *Clin. Respir. J.* 2021;15(11):1175-1184. DOI 10.1111/crj.13424.
- Liu B., Li R., Zhang J., Meng C., Zhang J., Song X., Lv C. MicroRNA-708-3p as a potential therapeutic target via the ADAM17-GATA/STAT3 axis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp. Mol. Med.* 2018;50(3):e465. DOI 10.1038/emmm.2017.311.
- Liu G., Friggeri A., Yang Y., Milosevic J., Ding Q., Thannickal V.J., Kaminski N., Abraham E. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J. Exp. Med.* 2010;207(8):1589-1597. DOI 10.1084/jem.20100035.
- Liu H.C., Liao Y., Liu C.Q. miR-487b mitigates allergic rhinitis through inhibition of the IL-33/ST2 signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018;22(23):8076-8083. DOI 10.26355/eurrev_201812_16497.
- Liu J., Li C., Zhang C., Zhang Z. LncRNA-CASC7 enhances corticosteroid sensitivity via inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway by targeting miR-21 in severe asthma. *Pulmonology*. 2020;26(1):18-26. DOI 10.1016/j.pulmoe.2019.07.001.
- Liu X., Gao S., Xu H. LncRNACAT29 inhibits pulmonary fibrosis via the TGF- β 1-regulated RASAL1/ERK1/2 signal pathway. *Mol. Med. Rep.* 2018;17(6):7781-7788. DOI 10.3892/mmr.2018.8807.
- Lu X., Sachs F., Ramsay L., Jacques P.-E., Göke J., Bourque G., Ng H.-H. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014;21:423-425. DOI 10.1038/nsmb.2799.
- Lux A., Beil C., Majety M., Barron S., Gallione C.J., Kuhn H.M., Gerg J.N., Kioschis P., Marchuk D.A., Hafner M. Human retroviral gag- and gag-pol-like proteins interact with the transforming growth factor-beta receptor activin receptor-like kinase 1. *J. Biol. Chem.* 2005;280(9):8482-8493. DOI 10.1074/jbc.M409197200.
- Mahmood W., Erichsen L., Ott P., Schulz W., Fischer J.C., Arauzo-Bravo M.J., Bendhack M.L., Hassan M., Santourlidis S. Aging-associated distinctive DNA methylation changes of LINE-1 retrotransposons in pure cell-free DNA from human blood. *Sci. Rep.* 2020;10(1):22127. DOI 10.1038/s41598-020-79126-z.
- Martinez-Nunez R., Bondanese V.P., Louafi F., Francisco-Garcia A.S., Rupani H., Bedke N., Holgate S., Howerth P.H., Davies D.E., Sanchez-Elsner T. A microRNA network dysregulated in asthma controls IL-6 production in bronchial epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(10):e111659. DOI 10.1371/journal.pone.0111659.
- Mathai S.K., Yang I.V., Schwarz M.I., Schwartz D.A. Incorporating genetics into the identification and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Med.* 2015;13:191. DOI 10.1186/s12916-015-0434-0.
- McKusick V.A., Fisher A.M. Congenital cystic disease of the lung with progressive pulmonary fibrosis and carcinomatosis. *Ann. Intern. Med.* 1958;48:774-790. DOI 10.7326/0003-4819-48-4-774.
- Method D.B., Leblanc E., Lacasse Y. Meta-analysis of gastroesophageal reflux disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2019;155(1):33-43. DOI 10.1016/j.chest.2018.07.038.
- Nevalainen T., Autio A., Mishra B.H., Marttila S., Jyha M., Hurme M. Aging-associated pattern in the expression of human endogenous retroviruses. *PLoS One*. 2018;13(12):e0207407. DOI 10.1371/journal.pone.0207407.
- Nikitin D., Penzar D., Garazha A., Sorokin M., Tkachev V., Borisov N., Piltorak V., Buzdin A.A. Profiling of human molecular pathways affected by retrotransposons at the level of regulation by transcription factor proteins. *Front. Immunol.* 2018;9:30. DOI 10.3389/fimmu.2018.00030.
- Noth I., Zhang Y., Ma S.F., Flores C., Barbes M., Huang Y., Broderick S.M., Wade M.S., Kaminski N., Garcia J.G.N. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med.* 2013;1(4):309-317. DOI 10.1016/S2213-2600(13)70045-6.
- Ong J., van den Berg A., Faiz A., Boudewijn I.M., Timens W., Vermeulen C.J., Oliver B.G., Kok K., Terpstra M.M., van den Berge M., Brandsma C.A., Kluiver J. Current smoking is associated with decreased expression of miR-335-5p in parenchymal lung fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(20):5176. DOI 10.3390/ijms20205176.
- Piriyapongsa J., Marino-Ramirez L., Jordan I.K. Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements. *Genetics*. 2007;176(2):1323-1337. DOI 10.1534/genetics.107.072553.
- Qin S., Jin P., Zhou X., Chen L., Ma F. The role of transposable elements in the origin and evolution of microRNAs in human. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131365. DOI 10.1371/journal.pone.0131365.
- Raghu G., Weycker D., Edelsberg J., Bradford W.Z., Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;174:810-816. DOI 10.1164/rccm.200602-163OC.
- Ruocco F.D., Basso V., Rivoire M., Mehlen P., Ambati J., De Falco S., Tarallo V. *Alu* RNA accumulation induces epithelial-to-mesenchymal transition by modulating miR-566 and is associated with cancer progression. *Oncogene*. 2018;37(5):627-637. DOI 10.1038/onc.2017.369.
- Seibold M.A., Wise A., Speer M., Steele M., Brown K., Lloyd J.E., Fingerlin T.E., Garantziotis S., Herron A., Slifer S.H., Schwartz D.A. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2011;364:1503-1512. DOI 10.1056/NEJMoa1013660.
- Sgalla G., Iovene B., Clavello M., Ori M., Varone F., Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respir. Res.* 2018;19(1):32. DOI 10.1186/s12931-018-0730-2.
- Sheng G., Chen P., Wei Y., Yue H., Chu J., Zhao J., Wang Y., Zhang W., Zhang H.L. Viral infection increases the risk of idiopathic pulmonary fibrosis: a meta-analysis. *Chest*. 2020;157(5):1175-1187. DOI 10.1016/j.chest.2019.10.032.
- Shi Z., Sun Y., Wang K., Jia J., Yang J., Li Y. Effects of miR-26a/miR-146a/miR-31 on airway inflammation of asthma mice and asthma children. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2019;23(12):5432-5440. DOI 10.26355/eurrev_201906_18212.

- Song X., Xu P., Meng C., Song C., Blackwell T.S., Li R., Li H., Zhang J., Lv C. LncITPF promotes pulmonary fibrosis by targeting hnRNP-L depending on its host gene ITGBL1. *Mol. Ther.* 2019;27(2):380-393. DOI 10.1016/j.ymthe.2018.08.026.
- Spagnolo P., Cottin V. Genetics of idiopathic pulmonary fibrosis: from mechanistic pathways to personalized medicine. *J. Med. Genet.* 2017;54:93-99. DOI 10.1136/jmedgenet-2016-103973.
- Stuart B.D., Choi J., Zaidi S., Xing C., Holohan B., Chen R., Choi M., Dharwadkar P., Torres F., Girod C.E., Weissler J., Lifton R.P., Garcia C.K. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat. Genet.* 2015;47:512-517. DOI 10.1038/ng.3278.
- Tasena H., Faiz A., Timens W., Noordhoek J., Hylkema M.N., Gossens R., Hiemstra P.S., Spira A., Postma D.S., Tew G.W., Grimbaldston M.A., van den Berge M., Heijink I.H., Brandsma C. MicroRNA-mRNA regulatory networks underlying chronic mucus hypersecretion in COPD. *Eur. Respir. J.* 2018;52(3):1701556. DOI 10.1183/13993003.01556-2017.
- Tempel S., Pollet N., Tahiri F. ncRNAClassifier: a tool for detection and classification of transposable element sequences in RNA hairpins. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:246. DOI 10.1186/1471-2105-13-246.
- Thomas A.Q., Lane K., Phillips J., Prince M., Markin C., Speer M., Schwartz D.A., Gaddipati R., Marney A., Johnson J., Roberts R., Haines J., Stahlman M., Loyd J.E. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002;165(9):1322-1328. DOI 10.1164/rccm.200112-123OC.
- Tsakiri K.D., Cronkhite J.T., Kuan P.J., Xing C., Raghu G., Weissler J.C., Rosenblatt R.L., Shay J.W., Gracia C.K. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104(18):7552-7557. DOI 10.1073/pnas.0701009104.
- Unterbruner K., Matthes F., Schilling J., Nalavade R., Weber S., Winter J., Kraub S. MicroRNAs miR-19, miR-340, miR-374 and miR-542 regulate MID1 protein expression. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190437. DOI 10.1371/journal.pone.0190437.
- Vazquez B.N., Thackray J.K., Simonet N.G., An W., Vaquero A., Tischfield J.A., Serrano L. SIRT7 mediates L1 elements transcriptional repression and their association with the nuclear lamina. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:7870-7885. DOI 10.1093/nar/gkz519.
- Wang D., Yan Z., Bu L., An C., Deng B., Zang J., Rao J., Cheng L., Zhang J., Zhang B., Xie J. Protective effect of peptide DR8 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating the TGF- β /MAPK signaling pathway and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2019;382:114703. DOI 10.1016/j.taap.2019.114703.
- Wei G., Qin S., Li W., Chen L., Ma F. MDTE DB: a database for microRNAs derived from transposable element. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 2016;13(6):1155-1160. DOI 10.1109/TCBB.2015.2511767.
- Wei Y.Q., Guo Y.F., Yang S.M., Ma H.H., Li J. MiR-340-5p mitigates the proliferation and activation of fibroblast in lung fibrosis by targeting TGF- β /p38/ATF1 signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020;24(11):6252-6261. DOI 10.26355/eurrev_202006_21523.
- Wyman A.E., Noor Z., Fischelevich R., Lockatell V., Shah N.G., Todd N.W., Atamas S.P. Sirtuin 7 is decreased in pulmonary fibrosis and regulates the fibrotic phenotype of lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2017;312:L945-L958. DOI 10.1152/ajplung.00473.2016.
- Xiao L., Jiang L., Hu Q., Li Y. MiR-302e attenuates allergic inflammation *in vitro* model by targeting RelA. *Biosci. Rep.* 2018;38(3):BSR20180025. DOI 10.1042/BSR20180025.
- Yang G., Yang L., Wang W., Wang J., Wang J., Xu Z. Discovery and validation of extracellular/circulating microRNAs during idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. *Gene.* 2015;562:138-144. DOI 10.1016/j.gene.2015.02.065.
- Zhang Y.F., Gu L.N., Qi J., Xia Q.Q., Tian L.J., Jiang W.L., Cao M.S. Construction of potential idiopathic pulmonary fibrosis related microRNA and messenger RNA regulatory network. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2021;134(5):584-586. DOI 10.1097/CM9.0000000000001276.
- Zhao J., Ren Y., Qu Y., Jiang W., Lv C. Pharmacodynamic and pharmacokinetic assessment of pulmonary rehabilitation mixture for the treatment of pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* 2017;7:3458. DOI 10.1038/s41598-017-02774-1.
- Zhu L., Wang L., Luo X., Zhang Y., Ding Q., Jiang X., Wang X., Pan Y., Chen Y. Tollip, an intracellular trafficking protein, is a novel modulator of the transforming growth factor- β signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2012;287(47):39653-39663. DOI 10.1074/jbc.M112.388009.
- Zhu M., An Y., Zhang X., Wang Z., Duan H. Experimental pulmonary fibrosis was suppressed by microRNA-506 through NF- κ B-mediated apoptosis and inflammation. *Cell. Tissue Res.* 2019;378:255-265. DOI 10.1007/s00441-019-03054-2.

ORCID ID

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

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.08.2021. После доработки 14.09.2021. Принята к публикации 13.01.2022.

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

Анализ спектра мутаций гена рецептора низкой плотности (*LDLR*) при семейной гиперхолестеринемии в России

В.Б. Васильев , Ф.М. Захарова, Т.Ю. Богословская, М.Ю. Мандельштам

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
 vadim@biokemis.ru

Аннотация. Семейная гиперхолестеринемия – распространенное во всем мире наследственное заболевание человека, при котором чаще всего дефекты обнаруживаются в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (*LDLR*). Цель работы – систематизировать знания о мутациях гена *LDLR* в России. Проведен анализ литературы по предмету исследования, составлены сводные таблицы, показывающие встречаемость мутаций в отдельных регионах, и определены часто встречающиеся мутации. Более трети (80 из 203, т. е. 39.4 %) патогенных или вероятно патогенных мутаций представлены вариантами, специфичными для России и не встречающимися в других странах. Наибольшее количество вариантов охарактеризовано в крупных городах: Москве (130 патогенных мутаций), Санкт-Петербурге (50), Новосибирске (34) и Петрозаводске (19), тогда как регионы охарактеризованы гораздо хуже. Подавляющее число патогенных мутаций (142 из 203, или 70 %) найдено в единичных семьях, и только 61 вид мутаций встречался в двух или в нескольких родословных. Лишь 5 видов мутаций были найдены не менее чем в 10 семьях. Как и везде в мире, в России в гене *LDLR* преобладают миссенс-мутации, но особенным национальным своеобразием характеризуются мутации типа сдвига рамки считывания: из 27 найденных вариантов 19 (70 %) специфичны для России. Наивысшее число мутаций в гене *LDLR* в российской популяции обнаружено в четвертом и девятом экзонах. Это определяется тем, что четвертый и девятый экзоны являются самыми протяженными в гене и кодируют функционально важные участки белка, что обуславливает повышенную плотность патогенных мутаций в расчете на один нуклеотид длины именно в этих экзонах. Российская популяция имеет наибольшее число совпадающих мутаций с популяциями Польши, Чешской Республики, Нидерландов и Италии. Внедрение методов таргетного секвенирования существенно ускорило характеристику мутационного спектра при семейной гиперхолестеринемии, но из-за отсутствия систематических исследований в регионах большинство видов мутаций в России, вероятнее всего, еще не описано.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; рецептор липопротеинов низкой плотности; мутации.

Для цитирования: Васильев В.Б., Захарова Ф.М., Богословская Т.Ю., Мандельштам М.Ю. Анализ спектра мутаций гена рецептора низкой плотности (*LDLR*) при семейной гиперхолестеринемии в России. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3):319-326. DOI 10.18699/VJGB-22-38

Analysis of the low density lipoprotein receptor gene (*LDLR*) mutation spectrum in Russian familial hypercholesterolemia

V.B. Vasilyev , F.M. Zakharova, T.Yu. Bogoslovskaya, M.Yu. Mandelshtam

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia
 vadim@biokemis.ru

Abstract. Familial hypercholesterolemia (FH) is a very common human hereditary disease in Russia and in the whole world with most of mutations localized in the gene coding for the low density lipoprotein receptor (*LDLR*). The object of this review is to systematize the knowledge about *LDLR* mutations in Russia. With this aim we analyzed all available literature on the subject and tabulated the data. More than 1/3 (80 out of 203, i. e. 39.4 %) of all mutations reported from Russia were not described in other populations. To date, most *LDLR* gene mutations have been characterized in large cities: Moscow (130 entries), Saint Petersburg (50 entries), Novosibirsk (34 mutations) and Petrozavodsk (19 mutations). Other regions are poorly studied. The majority of pathogenic mutations (142 out of 203 reported here or 70 %) were revealed in single pedigrees; 61 variants of mutations were described in two or more genealogies; only 5 mutations were found in 10 or more families. As everywhere, missense mutations prevail among all types of nucleotide substitutions in *LDLR*, but the highest national specificity is imparted by frameshift mutations: out of 27 variants reported, 19 (or 70 %) are specific for Russia. The most abundant in mutations are exons 4 and 9 of the gene due to their largest size and higher occurrence of mutations in them. Poland,

the Czech Republic, Italy and the Netherlands share the highest number of mutations with the Russian population. Target sequencing significantly accelerates the characterization of mutation spectra in FH, but due to the absence of systematic investigations in the regions, one may suggest that most of *LDLR* mutations in the Russian population have not been described yet.

Key words: familial hypercholesterolemia; low density lipoprotein receptor gene; mutations.

For citation: Vasilyev V.B., Zakharova F.M., Bogoslovskaya T.Yu., Mandelshtam M.Yu. Analysis of the low density lipoprotein receptor gene (*LDLR*) mutation spectrum in Russian familial hypercholesterolemia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):319-326. DOI 10.18699/VJGB-22-38

Введение

Термин «семейная гиперхолестеринемия» (СГ) обычно используют для обозначения моногенных болезней, вызванных мутациями в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (*LDLR*) (OMIM 606945), в гене аполипопротеина В (*APOB*) (OMIM 107730), в гене *PCSK9* (OMIM 607786), в гене адапторного белка для рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛНП) *LDLRAP1* (OMIM 605747) и некоторых минорных генов, таких как *STAP1*, *APOE*, *LIPA*, или в генах переносчиков стеролов – стеролинах *ABCG5/ABCG8* (Defesche et al., 2017; Berberich, Hegele, 2019). При этом 80–85 % случаев СГ обусловлены мутациями в гене рецептора ЛНП. Мутации в гене аполипопротеина В ответственны за 5–10 % случаев СГ. Самыми редкими являются мутации в гене *PCSK9* и в гене адапторного белка для рецептора ЛНП, встречающиеся не более чем у 1 % пациентов с СГ.

Ранее считалось, что гетерозиготная СГ встречается у одного человека из 500 обследованных в популяции, но, согласно имеющимся сегодня данным, это происходит гораздо чаще. Обследование 69 106 пациентов в Дании, которым был поставлен диагноз СГ на основе рекомендаций голландской сети липидных клиник (Dutch Lipid Clinic Network, DLCN), определило, что заболевание встречается у них с частотой 1:219 (Benn et al., 2012). В России частота СГ может быть еще выше и составлять 1:148 (Ershova et al., 2017). Однако в этом случае учитывались случаи не только строго доказанной (definite), но и вероятной (probable) СГ. Подобная частота позволяет относить СГ к наиболее распространенным моногенным заболеваниям человека.

В базе данных ClinVar (Landrum et al., 2016) уже в 2018 г. фигурировало 4973 варианта гена *LDLR* (Iacocca et al., 2018), ассоциированных с заболеванием СГ, из которых 2351 вариант был классифицирован как патогенный, а 1525 – как вероятно патогенные. Остальные рассматривались как доброкачественные варианты или варианты неопределенного клинического значения. История исследования СГ в России недавно была рассмотрена в обзорах (Vasilyev et al., 2020; Meshkov et al., 2021a). Большинство мутаций, ведущих к СГ, как и ожидалось, обнаружено в гене *LDLR*, 187 патогенных или условно патогенных вариантов которого были определены в России (Meshkov et al., 2021a), из их числа 67 не были описаны в других популяциях мира. Несколько позже на основе таргетного секвенирования генов, вовлеченных в генез заболевания, была опубликована важная статья по генетике СГ в Санкт-Петербурге (Migoshnikova et al., 2021), в результате чего в петербургской популяции обнаружены 23 варианта последовательности гена *LDLR*, большинство из которых ранее

в этой популяции не были известны (Mandelshtam et al., 1993; Татищева и др., 2001; Zakharova et al., 2005; Захарова и др., 2007; Vasilyev et al., 2020). Лишь в последнее время появились публикации по изучению мутаций в регионах страны (Meshkov et al., 2021b). Новые статьи объясняют необходимость постоянного пересмотра таблиц мутаций гена *LDLR* в России (Meshkov et al., 2021a), что определяет, с нашей точки зрения, актуальность данного обзора: в нем упоминается уже 203 патогенных или вероятно патогенных варианта этого гена.

Методы

Проанализировав всю доступную литературу, в которой упоминались мутации гена *LDLR* в российской популяции, мы составили сводную таблицу, существенно расширяющую знания о спектре мутаций в России по сравнению с предыдущими работами (Mandelshtam et al., 1993, 1998; Мандельштам и др., 1998; Chakir et al., 1998a, b; Захарова и др., 2001, 2007; Крапивнер и др., 2001; Мандельштам, Масленников, 2001; Татищева и др., 2001; Мешков и др., 2004, 2009; Zakharova et al., 2005; Воевода и др., 2008; Комарова и др., 2013а, б; Komarova et al., 2013; Корнева и др., 2013–2017; Korneva et al., 2017; Шахтшнейдер и др., 2017, 2019; Averkova et al., 2018; Shakhshneider et al., 2019, 2021; Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021a, b) (Приложение)¹.

Под понятием мутация мы понимаем все редкие варианты гена, не являющиеся широко распространенными полиморфизмами и потенциально способные вызвать заболевание, включая варианты, патогенность которых доказана или весьма вероятна. Синонимичные замены в этом обзоре не рассматриваются, их перечень дан в статье (Vasilyev et al., 2020).

Результаты и обсуждение

В мире описано, как уже упоминалось (Iacocca et al., 2018), более 4900 вариантов гена *LDLR*. В настоящем обзоре сообщается о 203 патогенных или вероятно патогенных мутациях этого гена в России (см. Приложение). Однако это разнообразие, по-видимому, далеко не полностью исчерпывает вариативность гена рецептора в российской популяции, поскольку методы полногеномного секвенирования стали применяться относительно недавно и систематического изучения генетики заболевания во всех регионах страны не проводилось. Исследования проводили преимущественно в крупных городах (рис. 1). При этом почти все выявленные мутации специфичны для каждого из этих городов, и существенно меньшее коли-

¹ Приложение см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2022-26/appx7.pdf>

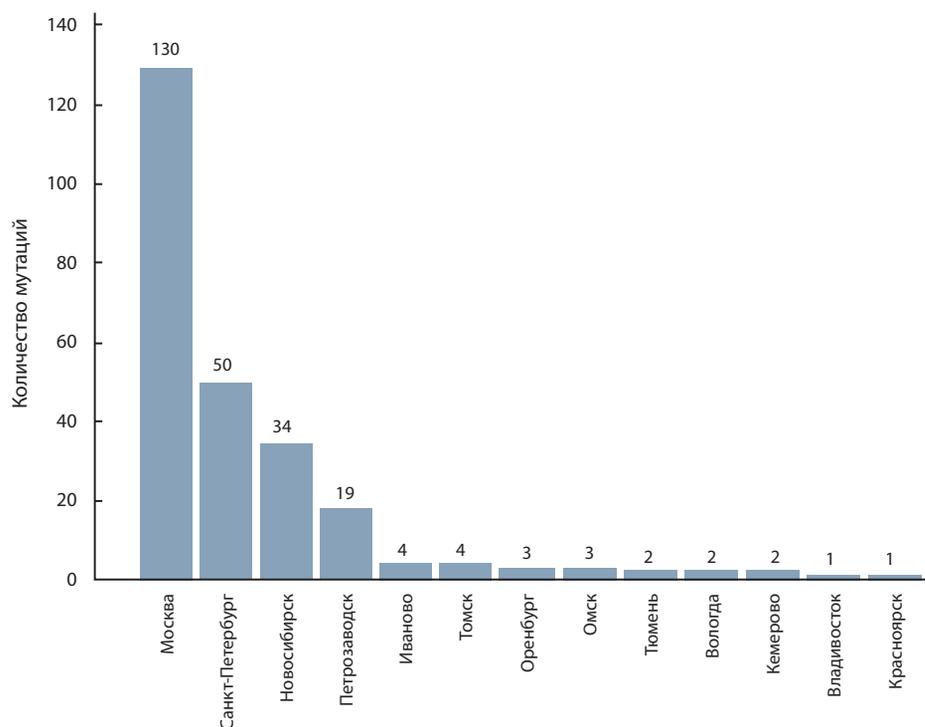


Рис. 1. Количество патогенных и вероятно патогенных вариантов в гене *LDLR*, обнаруженных в городах России с обследованными популяциями (без учета часто встречающихся полиморфизмов и доброкачественных вариантов).

Таблица 1. Анализ спектра патогенных и вероятно патогенных вариантов гена *LDLR* в России и в мире

Тип мутаций	Найденные патогенные варианты, число (%)			Доля мутаций этого вида в мире, %	
	Общее количество	Специфичные для России	Общие с другими популяциями мира	Defesche et al., 2017	Chora et al., 2018
Крупные делеции	10 (5)	6 (60)	4 (40)	8–10	9
Мутации сайтов сплайсинга	18 (9)	8 (44)	10 (56)	8–10	9
Делеции и инсерции в рамке считывания	7 (3.5)	2 (29)	5 (71)	15–20	4
Мутации со сдвигом рамки считывания	27 (13.5)	19 (70)	8 (30)		18
Нонсенс-мутации	20 (10)	2 (10)	18 (90)	12–15	9
Миссенс-мутации	121 (59)	43 (35)	78 (65)	40–50	46
Регуляторные мутации	Не найдены	–	–	Нет данных	2
Синонимичные замены	Не учитывались	–	–	Нет данных	1
Интронные мутации	Не учитывались	–	–	Нет данных	2
Итого	203 (100)	80 (39.4)	123 (60.6)		100

чество мутаций являются общими с другими регионами. Так, максимальное количество патогенных или вероятно патогенных вариантов в России (101) найдено только в Москве (Крапивнер и др., 2001; Мешков и др., 2004, 2009; Averkova et al., 2018; Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021a), 35 вариантов найдены только в Санкт-Петербурге (Mandelshtam et al., 1993; Захарова и др., 2001, 2007; Татищева и др., 2001; Zakharova et al., 2005), 23 – только

в Новосибирске (Воевода и др., 2008; Шахтшнейдер и др., 2017, 2019; Shakhtschneider et al., 2019), 11 – только в Петрозаводске (Комарова и др., 2013а, б; Komarova et al., 2013; Корнева и др., 2013, 2014, 2017; Korneva et al., 2017), 33 – в других регионах или в нескольких регионах одновременно (Meshkov et al., 2021b).

В настоящее время в России можно констатировать большое разнообразие мутаций, из которых свыше трети

Таблица 2. Патогенные варианты в гене *LDLR*, обнаруженные у пациентов с СГ из российской популяции в 10 семьях и более

Нуклеотидная замена по референсной последовательности NM_000527.5 (<i>LDLR</i>)	Предсказанное изменение в белке	Число семей	Номер замены по dbSNP	Популяции в России	Литературный источник для России	Другие страны мира
c.478T > G	p.(Cys160Gly)	10	rs879254540	Санкт-Петербург, Новосибирск, Москва	Chakir et al., 1998a; Мандельштам, Масленников, 2001; Мешков и др., 2004, 2009; Meshkov et al., 2021a	Нет
c.654_656delTTGG	p.(Gly219del)	14	rs121908027	Санкт-Петербург, Новосибирск, Москва	Mandelstam et al., 1998; Мандельштам, Масленников, 2001; Zakharova et al., 2005; Захарова и др., 2007; Meshkov et al., 2021a	Чешская Республика, Германия, Великобритания, Израиль, Нидерланды, Польша, ЮАР, США, в основном у евреев-ашкенази
c.986G > A	p.(Cys329Tyr)	13	rs761954844	Санкт-Петербург, Новосибирск, Москва, Петрозаводск	Zakharova et al., 2005; Захарова и др., 2007; Shakhtshneider et al., 2019; Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021a, b; Miroshnikova et al., 2021	Канада, Китай, Чешская Республика, Филиппины, Польша, Тайвань, Нидерланды
c.1202T > A	p.(Leu401His)	33	rs121908038	Санкт-Петербург, Новосибирск, Москва, Красноярск, Петрозаводск	Zakharova et al., 2005; Shakhtshneider et al., 2019; Meshkov et al., 2021a, b; Miroshnikova et al., 2021	Финляндия, Нидерланды, Бразилия, Мексика, Норвегия
c.1775G > A	p.(Gly592Glu)	43	rs137929307	Санкт-Петербург, Новосибирск, Москва	Захарова и др., 2001, 2007; Воевода и др., 2008; Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021a, b	Австрия, Бельгия, Бразилия, Греция, Канада, Германия, Чешская Республика, Италия, Нидерланды, Норвегия, Польша, Португалия, Испания, США и др.

Таблица 3. Встречаемость российских мутаций гена *LDLR* в других странах

Страна	Количество видов мутаций	Источник информации	Общие с Россией мутации
Польша	99	Chmara et al., 2010	19
Чешская Республика	129	Tichý et al., 2012; Chora et al., 2018	23
Нидерланды	306	Fouchier et al., 2005; Chora et al., 2018	36
Испания	205	Mozas et al., 2004; Chora et al., 2018	12
Италия	251	Bertolini et al., 2013; Pirillo et al., 2017; Chora et al., 2018	28

(39.4 %) специфичны для страны и нигде в мире до сих пор не найдены (табл. 1). Распределение мутаций по типам в России очень похоже на таковое в мире (см. табл. 1).

Из анализа табл. 1 следует, что заниженное количество протяженных делеций связано с тем, что таргетное секвенирование в России применяется недавно и целенаправленный поиск крупномасштабных перестроек гена не проводился: исследователи фокусировали внимание на скрининге экзонов, что определило несколько большую долю миссенс-мутаций, чем в мире в целом. Относительно недавно (Shakhtschneider et al., 2021) стали искать протяженные делеции в гене *LDLR* у тех пациентов с СГ, у которых высокопроизводительное таргетное секвенирование не выявило значимых мутаций в панели из 43 генов липидного обмена. Для этого использовали метод мультиплексной лигазо-зависимой полимеразной цепной реакции (multiplex ligase-dependent probe amplification, MLPA), который позволил в изученной выборке из 80 пациентов с СГ обнаружить две делеции гена *LDLR*.

Немногие варианты гена *LDLR* встречаются в нескольких семьях, в основном же преобладают уникальные мутации. В России патогенные мутации также преимущественно обнаруживаются в единичных семьях (142 из 203, или 70 %), и только 61 вид мутаций встречался в двух семьях или в нескольких родословных. В мире наибольшее число мутаций описано в четвертом экзоне гена, что связано не только с тем, что это крупнейший экзон в гене *LDLR*, но и с тем, что плотность мутаций в расчете на один нуклеотид в нем самая высокая и составляет 0.882 варианта на нуклеотид (Choga et al., 2018). Именно в этом экзоне обнаружено наибольшее число функционально охарактеризованных мутаций, и почти все имеют патогенный эффект. Наше исследование показало, что в российской популяции наибольшее число мутаций в гене

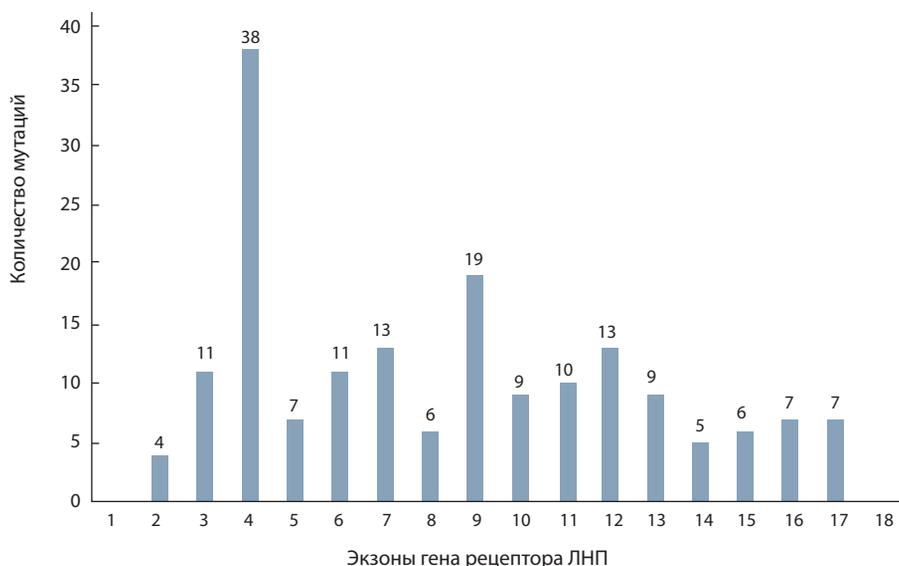


Рис. 2. Распределение патогенных и вероятно патогенных вариантов по экзонам в гене рецептора ЛНП у пациентов с СГ в России.

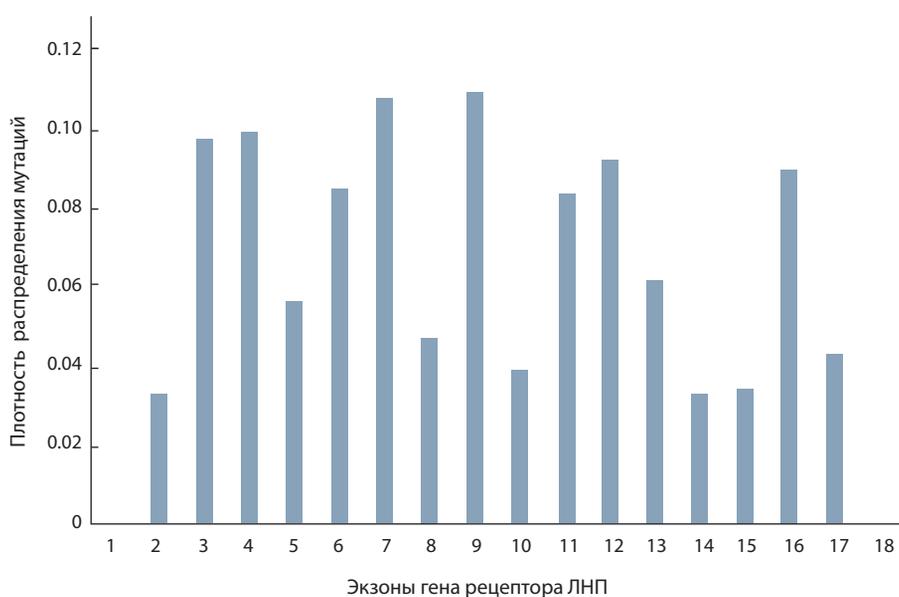


Рис. 3. Плотность распределения патогенных и вероятно патогенных мутаций в экзонах гена рецептора ЛНП в расчете на один нуклеотид у пациентов с СГ в России.

LDLR локализуется в самых крупных экзонах – четвертом и девятом (рис. 2). Учитывая доступные на сегодня сведения, следует заключить, что, по нашим данным, наивысшая плотность мутаций в расчете на один нуклеотид экзона (рис. 3) определяется в девятом, а не в четвертом экзоне, как в мировых базах данных (Choga et al., 2018).

К настоящему времени лишь пять патогенных вариантов гена *LDLR* в России можно отнести к мажорным, которые обнаружены в 10 семьях или более (табл. 2). Из них только один вариант специфичен для России, а остальные широко распространены в мире.

Наибольшее сходство в спектре мутаций в гене *LDLR* в России наблюдается с Польшей, Чешской Республикой, Нидерландами, Испанией и Италией, что отчасти определяется тем, что эти популяции максимально полно охарактеризованы (табл. 3). Это сходство, вероятно, обусловлено наличием широко распространенных в мире мутаций белой расы, а не миграцией или эффектом основателя.

Заключение

Таким образом, успех дальнейшего изучения мутационного спектра гена *LDLR* будет определяться, по нашему мнению, двумя факторами, один из которых – создание полного регистра пациентов с семейной гиперхолестеринемией в стране, а второй – внедрение таргетного секвенирования в широкую практику лабораторий.

Список литературы / References

- Воевода М.И., Куликов И.В., Шахтшнейдер Е.В., Максимов В.Н., Пилипенко И.В., Терещенко И.П., Кобзев Е.Ф., Ромащенко А.Г., Никитин Ю.П. Спектр мутаций гена рецептора липопротеинов низкой плотности в российской популяции. *Генетика*. 2008;44(10):1374-1378.
- [Voevoda M.I., Kulikov I.V., Shakhshneider E.V., Maksimov V.N., Pilipenko I.V., Tereschenko I.P., Kobzev E.F., Romaschenko A.G., Nikitin Yu.P. The spectrum of mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in the Russian population. *Russ. J. Genet.* 2008;44(10):1191-1194. DOI 10.1134/S1022795408100074.]
- Захарова Ф.М., Голубков В.И., Мандельштам М.Ю., Липовецкий Б.М., Гайцхоки В.С. Идентификация новой миссенс-мутации G571E, новой молчащей мутации H229H, nonsense-мутации C74X и четырех однонуклеотидных полиморфизмов в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией в Санкт-Петербурге. *Биоорганическая химия*. 2001;27(5):393-396.
- [Zakharova F.M., Golubkov V.I., Mandelshtam M.Yu., Lipovetskiy B.M., Gaitskhoki V.S. Identification of novel missense mutation G571E, novel silent mutation H229H, nonsense mutation C74X, and four single nucleotide polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia from St. Petersburg. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2001;27:349-351. DOI 10.1023/a:1012300632671.]
- Захарова Ф.М., Татищева Ю.А., Голубков В.И., Липовецкий Б.М., Константинов В.О., Денисенко А.Д., Фаергеман О., Васильев В.Б., Мандельштам М.Ю. Семейная гиперхолестеринемия в Санкт-Петербурге: разнообразие мутаций свидетельствует об отсутствии выраженного эффекта основателя. *Генетика*. 2007;43(9):1255-1262.
- [Zakharova F.M., Tatischeva Yu.A., Golubkov V.I., Lipovetsky B.M., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Faergeman O., Vasilyev V.B., Mandelshtam M.Yu. Familial hypercholesterolemia in St. Petersburg: diversity of mutations argues against a strong founder effect. *Russ. J. Genet.* 2007;43(9):1046-1052. DOI 10.1134/S1022795407090116.]
- Комарова Т.Ю., Головина А.С., Грудинина Н.А., Захарова Ф.М., Корнева В.А., Липовецкий Б.М., Серебренникова М.П., Константинов В.О., Васильев В.Б., Мандельштам М.Ю. Новые мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией из Петрозаводска. *Генетика*. 2013а;49(6):772-776.
- [Komarova T.Yu., Golovina A.S., Grudinina N.A., Zakharova F.M., Korneva V.A., Lipovetsky B.M., Serebrenitskaya M.P., Konstantinov V.O., Vasilyev V.B., Mandelshtam M.Yu. New mutations in low-density lipoprotein receptor gene in familial hypercholesterolemia patients from Petrozavodsk. *Russ. J. Genet.* 2013а;49(6):673-676. DOI 10.1134/S1022795413040066.]
- Комарова Т.Ю., Головина А.С., Грудинина Н.А., Захарова Ф.М., Корнева В.А., Липовецкий Б.М., Серебренникова М.П., Константинов В.О., Васильев В.Б., Мандельштам М.Ю. «Финские» мутации в гене рецептора липопротеинов низкой плотности – редкая причина семейной гиперхолестеринемии в Санкт-Петербурге и в Петрозаводске. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2013б;155(3):359-362.
- [Komarova T.Yu., Golovina A.S., Grudinina N.A., Zakharova F.M., Korneva V.A., Lipovetskiy B.M., Serebrenitskaya M.P., Konstantinov V.O., Vasilyev V.B., Mandelshtam M.Yu. "Finnish" mutations
- in LDL receptor gene: a rare cause of familial hypercholesterolemia in St. Petersburg and Petrozavodsk. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013б;155(3):380-383. DOI 10.1007/s10517-013-2159-4.]
- Корнева В.А., Богословская Т.Ю., Кузнецова Т.Ю., Мандельштам М.Ю., Васильев В.Б. Семейная гиперхолестеринемия, обусловленная новой мутацией гена рецептора липопротеинов низкой плотности человека. *Клин. медицина*. 2014;92(7):49-53.
- [Korneva V.A., Bogoslovskaya T.Yu., Kuznetsova T.Yu., Mandelshtam M.Yu., Vasiliev V.B. Familial hypercholesterolemia due to a new mutation in the low density lipoprotein receptor gene. *Klinicheskaya Meditsina = Clinical Medicine*. 2014;92(7):49-53. (in Russian)]
- Корнева В.А., Кузнецова Т.Ю., Богословская Т.Ю., Муртазина Р.З., Дидио А.В., Серебренникова М.П., Константинов В.О., Мандельштам М.Ю., Васильев В.Б. Клинический пример пациента с семейной гиперхолестеринемией, вызванной новой мутацией с.1859G>C (p.W620S) в гене рецептора липопротеинов низкой плотности человека. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2015;14(6):52-53. DOI 10.15829/1728-8800-2015-6-52-53.
- [Korneva V.A., Kuznetsova T.Yu., Bogoslovskaya T.Yu., Murtazina R.Z., Didio A.V., Serebrenitskaya M.P., Konstantinov V.O., Mandelshtam M.Yu., Vasilyev V.B. Clinical case of a patient with family hypercholesterolemia caused by mutation c.1859G>C (p.W620S) in the gene of human low density lipoproteins receptor. *Kardiovaskulyarnaya Terapiya i Profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2015;14(6):52-53. DOI 10.15829/1728-8800-2015-6-52-53. (in Russian)]
- Корнева В.А., Кузнецова Т.Ю., Богословская Т.Ю., Муртазина Р.З., Дидио А.В., Серебренникова М.П., Константинов В.О., Мандельштам М.Ю., Васильев В.Б. Современные возможности диагностики семейной гиперхолестеринемии до появления клинических проявлений атеросклероза. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2016;1:22-32.
- [Korneva V.A., Kuznetsova T.Yu., Bogoslovskaya T.Yu., Murtazina R.Z., Didio A.V., Serebrenitskaya M.P., Konstantinov V.O., Mandelshtam M.Yu., Vasilyev V.B. Modern diagnostic abilities of familial hypercholesterolemia before clinical features of atherosclerosis appearance. *Atherosclerosis i Dislipidemii = Journal of Atherosclerosis and Dyslipidemias*. 2016;1:22-32. (in Russian)]
- Корнева В.А., Кузнецова Т.Ю., Комарова Т.Ю., Головина А.С., Мандельштам М.Ю., Константинов В.О., Васильев В.Б. Случай семейной гиперхолестеринемии, вызванный новой мутацией p.FsS65:D129X в гене рецептора липопротеинов низкой плотности человека. *Кардиология*. 2013;53(5):50-54.
- [Korneva V.A., Kuznetsova T.Yu., Komarova T.Yu., Golovina A.S., Mandelshtam M.Yu., Konstantinov V.O., Vasilyev V.B. A case of familial hypercholesterolemia caused by a novel mutation p. FsS65:D129X of human low density lipoprotein receptor gene. *Kardiologiya = Cardiology*. 2013;53(5):50-54. (in Russian)]
- Корнева В.А., Кузнецова Т.Ю., Муртазина Р.З., Дидио А.В., Богословская Т.Ю., Мандельштам М.Ю., Васильев В.Б. Семейная гиперхолестеринемия, вызванная новой мутацией с.1327 T>C (p.W433R) в гене рецептора липопротеинов низкой плотности человека. *Кардиология*. 2017;57(2):12-16. DOI 10.18565/cardio.2017.2.12-16.
- [Korneva V.A., Kuznetsova T.Yu., Murtazina R.Z., Didio A.V., Bogoslovskaya T.Yu., Mandelshtam M.Yu., Vasilyev V.B. The familial hypercholesterolemia caused by a novel human low density lipoprotein receptor gene mutation c.1327 T>C (p.W433R). *Kardiologiya = Cardiology*. 2017;57(2):12-16. DOI 10.18565/cardio.2017.2.12-16. (in Russian)]
- Крапивнер С.Р., Малышев П.П., Полтараус А.Б., Кухарчук В.В., Бочков В.Н. Случай семейной гиперхолестеринемии, вызванный новой мутацией D461Y в гене рецептора липопротеидов низкой плотности. *Кардиология*. 2001;41(1):92-94.
- [Krapivner S.R., Malyshev P.P., Poltaraus A.B., Kukharchuk V.V., Bochkov V.N. A case of familial hypercholesterolemia caused by a novel mutation D461Y in the low density lipoprotein receptor gene. *Kardiologiya = Cardiology*. 2001;41(1):92-94. (in Russian)]

- Мандельштам М.Ю., Голубков В.И., Шур Ю.А., Липовецкий Б.М., Гайцхоки В.С. Новая мутация 347delGCC в гене рецептора липопротеинов низкой плотности человека. *Биоорганическая химия*. 1998;24(10):798-800.
[Mandelstam M.Ju., Golubkov V.I., Schur Yu.A., Lipovetsky B.M., Gaitskhoki V.S. A novel mutation 347delGCC in the human low density lipoprotein receptor gene. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 1998;24(10):710-711.]
- Мандельштам М.Ю., Масленников А.Б. Изучение молекулярной генетики семейной гиперхолестеринемии в России. В: Масленников А.Б. (ред.). Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск: Изд. дом «Манускрипт», 2001;58-64.
[Mandelstam M.Yu., Maslennikov A.B. Study of familial hypercholesterolemia molecular genetics in Russia. In: Maslennikov A.B. (Ed.) *Molecular Technologies in Practical Medicine*. Novosibirsk: Publ. House "Manuskript", 2001;58-64. (in Russian)]
- Мешков А.Н., Малышев П.П., Кухарчук В.В. Семейная гиперхолестеринемия в России: генетическая и фенотипическая характеристика. *Терапевт. архив*. 2009;81(9):23-28.
[Meshkov A.N., Malyshev P.P., Kukharchuk V.V. Familial hypercholesterolemia in Russia: genetic and phenotypic characteristics. *Terapevticheskiy Arkhiv = Therapeutic Archive*. 2009;81(9):23-28. (in Russian)]
- Мешков А.Н., Стамбольский Д.В., Крапивнер С.Р., Бочков В.Н., Кухарчук В.В., Малышев П.П. Мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с клиническим диагнозом семейной гиперхолестеринемии. *Кардиология*. 2004;44(9):58-61.
[Meshkov A.N., Stambolsky D.V., Krapivner S.R., Bochkov V.N., Kukharchuk V.V., Malyshev P.P. Low density lipoprotein receptor gene mutations in patients with clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Kardiologiya = Cardiology*. 2004;44(9):58-61. (in Russian)]
- Татищева Ю.А., Мандельштам М.Ю., Голубков В.И., Липовецкий Б.М., Гайцхоки В.С. Четыре новые мутации и полиморфные варианты гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с семейной гиперхолестеринемией Санкт-Петербурга. *Генетика*. 2001;37(9):1290-1295.
[Tatishcheva Yu.A., Mandelstam M.Yu., Golubkov V.I., Lipovetsky B.M., Gaitskhoki V.S. Four new mutations and two polymorphic variants of the low-density lipoprotein receptor gene in familial hypercholesterolemia patients from St. Petersburg. *Russ. J. Genet.* 2001;37(9):1082-1087. DOI 10.1023/A:1011973817437.]
- Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Макаренко К.В., Орлов П.С., Тимошенко О.В., Бажан С.С., Никитин Ю.П., Воевода М.И. Каскадный генетический скрининг в диагностике гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии: клинический случай. *Рос. кардиол. журн.* 2017;6(146):178-179. DOI 10.15829/1560-4071-2017-6-178-179.
[Shakhtshneider E.V., Ivanoshchuk D.E., Makarenkova K.V., Orlov P.S., Timoshchenko O.V., Bazhan S.S., Nikitin Y.P., Voevoda M.I. Cascade genetic screening in diagnostics of heterozygous familial hypercholesterolemia: clinical case. *Russian Journal of Cardiology*. 2017;6(146):178-179. DOI 10.15829/1560-4071-2017-6-178-179. (in Russian)]
- Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Фишман В.С., Белокопытова П.С., Орлов П.С., Тимошенко О.В., Воевода М.И. Таргетное секвенирование генов *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1* и генного кластера *APOA5-A4-C3-A1* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией. *Комплексные пробл. сердечно-сосудистых заболеваний*. 2019;8(S3-2):71.
[Shakhtshneider E.V., Ivanoshchuk D.E., Fishman V.S., Belokopytova P.S., Orlov P.S., Timoshchenko O.V., Voevoda M.I. Target sequencing of genes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1* and gene cluster *APOA5-A4-C3-A1* in patients with familial hypercholesterolemia. *Kompleksnyye Problemy Serdechno-sosydistykh Zabolevaniy = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2019;8(S3-2):71. (in Russian)]
- Averkova A.O., Brazhnik V.A., Sheshilov G.I., Rogozhina A.A., Koroleva O.S., Zubova E.A., Galyavich A.S., Tereshenko S.N., Boyeva O.I., Zateyshchikov D.A. Targeted sequencing in patients with clinically diagnosed hereditary lipid metabolism disorder and acute coronary syndrome. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2018;5:80-86. DOI 10.24075/brsmu.2018.061.
- Benn M., Watts C.F., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G. Familial hypercholesterolemia in the Danish general population: prevalence, coronary artery disease and cholesterol-lowering medication. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(11):3956-3964. DOI 10.1210/jc.2012-1563.
- Berberich A.J., Hegele R.A. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nat. Rev. Cardiol.* 2019;16(1):9-20. DOI 10.1038/s41569-018-0052-6.
- Bertolini S., Pisciotto L., Rabacchi C., Cefalù A.B., Noto D., Fasano T., Signori A., Fresa R., Averna M., Calandra S. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy. *Atherosclerosis*. 2013;227(2):342-348. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.007.
- Chakir Kh., Skobeleva N.A., Shevtsov S.P., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Schwartz E.I. Two novel slavic point mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia from St. Petersburg, Russia. *Mol. Genet. Metab.* 1998a;63(1):31-34. DOI 10.1006/mgme.1997.2614.
- Chakir K., Mandelstam M.Ju., Shevtsov S.P., Golubkov V.I., Skobeleva N.A., Shur Yu.A., Zakharova F.M., Lipovetsky B.M., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Gaitskhoki V.S., Schwartz E.I. Two novel low-density lipoprotein receptor gene mutations (E397X and 347delGCC) in St. Petersburg familial hypercholesterolemia. *Mol. Genet. Metab.* 1998b;65(4):311-314. DOI 10.1006/mgme.1998.2762.
- Chmara M., Wasag B., Zuk M., Kubalska J., Wegrzyn A., Bednarska-Makaruk M., Pronicka E., Wehr H., Defesche J.C., Rynkiewicz A., Limon J. Molecular characterization of Polish patients with familial hypercholesterolemia: novel and recurrent *LDLR* mutations. *J. Appl. Genet.* 2010;51(1):95-106. DOI 10.1007/BF03195716.
- Chora J.R., Medeiros A.M., Alves A.C., Bourbon M. Analysis of publicly available *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genet. Med.* 2018;20(6):591-598. DOI 10.1038/gim.2017.151.
- Defesche J.C., Gidding S.S., Harada-Shiba M., Hegele R.A., Santos R.D., Wierzbicki A.S. Familial hypercholesterolaemia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017;3:17093. DOI 10.1038/nrdp.2017.93.
- Ershova A.I., Meshkov A.N., Bazhan S.S., Storozhok M.A., Efano A.Y., Medvedeva I.V., Indukaeva E.V., Danilchenko Y.V., Kuzmina O.K., Barbarash O.L., Deev A.D., Shalnova S.A., Boytsov S.A. The prevalence of familial hypercholesterolemia in the West Siberian region of the Russian Federation: a substudy of the ESSE-RF. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181148. DOI 10.1371/journal.pone.0181148.
- Fouchier S.W., Kastelein J.J., Defesche J.C. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands. *Hum. Mutat.* 2005;26(6):550-556. DOI 10.1002/humu.20256.
- Iacocca M.A., Chora J.R., Carrié A., Freiberger T., Leigh S.E., Defesche J.C., Kurtz C.L., DiStefano M.T., Santos R.D., Humphries S.E., Mata P., Jannes C.E., Hooper A.J., Wilemon K.A., Benlian P., O'Connor R., Garcia J., Wand H., Tichy L., Sijbrands E.J., Hegele R.A., Bourbon M., Knowles J.W., ClinGen FH Variant Curation Expert Panel. ClinVar database of global familial hypercholesterolemia-associated DNA variants. *Hum. Mutat.* 2018;39(11):1631-1640. DOI 10.1002/humu.23634.
- Komarova T.Yu., Korneva V.A., Kuznetsova T.Yu., Golovina A.S., Vasilyev V.B., Mandelstam M.Yu. Familial hypercholesterolemia mutations in Petrozavodsk: no similarity to St. Petersburg mutation spectrum. *BMC Med. Genet.* 2013;14(1):128. DOI 10.1186/1471-2350-14-128.

- Korneva V.A., Kuznetsova T.Yu., Bogoslovskaya T.Yu., Polyakov D.S., Vasilyev V.B., Orlov A.V., Mandelshtam M.Yu. Cholesterol levels in genetically determined familial hypercholesterolemia in Russian Karelia. *Cholesterol*. 2017;2017:9375818. DOI 10.1155/2017/9375818.
- Landrum M.J., Lee J.M., Benson M., Brown G., Chao C., Chitipiralla S., Gu B., Hart J., Hoffman D., Hoover J., Jang W., Katz K., Ovetsky M., Riley G., Sethi A., Tully R., Villamarin-Salomon R., Rubinstein W., Maglott D.R. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D862-D868. DOI 10.1093/nar/gkv1222.
- Mandelshtam M., Chakir K., Shevtsov S., Golubkov V., Skobeleva N., Lipovetsky B., Konstantinov V., Denisenko A., Gaitskhoki V., Schwartz E. Prevalence of Lithuanian mutation among St. Petersburg Jews with familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat*. 1998;12(4):255-258. DOI 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:4<255::AID-HUMU6>3.0.CO;2-E.
- Mandelshtam M.Ju., Lipovetskiy B.M., Schwartzman A.L., Gaitskhoki V.S. A novel deletion in the low density lipoprotein receptor gene in a patient with familial hypercholesterolemia from Petersburg. *Hum. Mutat*. 1993;2(4):256-260. DOI 10.1002/humu.1380020404.
- Meshkov A., Ershova A., Kiseleva A., Zotova E., Sotnikova E., Petukhova A., Zharikova A., Malyshev P., Rozhkova T., Blokhina A., Limonova A., Ramenskiy V., Divashuk M., Khasanova Z., Bukaeva A., Kurilova O., Skirko O., Pokrovskaya M., Mikova V., Snigir E., Akinshina A., Mitrofanov S., Kashtanova D., Markarov V., Kukharchuk V., Boytsov S., Yudin S., Drapkina O. The *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* variants of index patients with familial hypercholesterolemia in Russia. *Genes*. 2021a;12(1):66. DOI 10.3390/genes12010066.
- Meshkov A.N., Ershova A.I., Kiseleva A.V., Shalnova S.A., Drapkina O.M., Boytsov S.A. On behalf of the FH-ESSE-RF Investigators. The prevalence of heterozygous familial hypercholesterolemia in selected regions of the Russian Federation: the FH-ESSE-RF study. *J. Pers. Med*. 2021b;11(6):464. DOI 10.3390/jpm11060464.
- Miroshnikova V.V., Romanova O.V., Ivanova O.N., Fedyakov M.A., Panteleeva A.A., Barbitoff Y.A., Muzalevskaya M.M., Urazgildeeva S.A., Gurevich V.S., Urazov S.P., Scherbak S.G., Sarana A.M., Semenova N.A., Anisimova I.V., Guseva D.M., Pchelina S.N., Glotov A.S., Zakharova E.Y., Glotov O.S. Identification of novel variants in the *LDLR* gene in Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted sequencing. *Biomed. Rep*. 2021;14(1):15. DOI 10.3892/br.2020.1391.
- Mozas P., Castillo S., Tejedor D., Reyes G., Alonso R., Franco M., Saenz P., Fuentes F., Almagro F., Mata P., Pocoví M. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in *LDLR*. *Hum. Mutat*. 2004;24(2):187. DOI 10.1002/humu.9264.
- Pirillo A., Garlaschelli K., Arca M., Averna M., Bertolini S., Calandra S., Tarugi P., Catapano A.L., LIPIGEN Group. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: new results from the LIPIGEN study. *Atheroscler. Suppl*. 2017;29:17-24. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2017.07.002.
- Semenova A.E., Sergienko I.V., García-Giustiniani D., Monserrat L., Popova A.B., Nozadze D.N., Ezhov M. Verification of underlying genetic cause in a cohort of Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted next generation sequencing. *J. Cardiovasc. Dev. Dis*. 2020;7(2):16. DOI 10.3390/jcdd7020016.
- Shakhtshneider E., Ivanoshchuk D., Orlov P., Timoshchenko O., Voevoda M. Analysis of the *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *LDLRAP1* genes variability in patients with familial hypercholesterolemia in West Siberia using targeted high throughput resequencing. *Atherosclerosis*. 2019;287:e285. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.883.
- Shakhtschneider E., Ivanoshchuk D., Timoshenko O., Orlov P., Semayev S., Valeev E., Goonko A., Ladygina N., Voevoda M. Analysis of rare variants in genes related to lipid metabolism in patients with familial hypercholesterolemia in Western Siberia (Russia). *J. Pers. Med*. 2021;11(11):1232. DOI 10.3390/jpm11111232.
- Tichý L., Freiburger T., Zapletalová P., Soška V., Ravčuková B., Fajkusová L. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Czech Republic: spectrum of *LDLR* mutations and genotype-phenotype correlations. *Atherosclerosis*. 2012;223(2):401-408. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.014.
- Vasilyev V., Zakharova F., Bogoslovskaya T., Mandelshtam M. Familial hypercholesterolemia in Russia: three decades of genetic studies. *Front. Genet*. 2020;11:550591. DOI 10.3389/fgene.2020.550591.
- Zakharova F.M., Damgaard D., Mandelshtam M.Y., Golubkov V.I., Nissen P.H., Nilsen G.G., Stenderup A., Lipovetsky B.M., Konstantinov V.O., Denisenko A.D., Vasilyev V.B., Faergeman O. Familial hypercholesterolemia in St.-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. *BMC Med. Genet*. 2005;6:6. DOI 10.1186/1471-2350-6-6.

ORCID ID

V.B. Vasilyev orcid.org/0000-0002-9707-262X
F.M. Zakharova orcid.org/0000-0002-9558-3979
T.Yu. Bogoslovskaya orcid.org/0000-0002-9480-1073
M.Yu. Mandelshtam orcid.org/0000-0002-7135-3239

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.11.2021. После доработки 14.12.2021. Принята к публикации 10.02.2022.

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

Разработка и создание кандидатных вакцин против COVID-19 на основе растительных систем экспрессии: состояние исследований и перспективы

Е.А. Уварова^{1#} , П.А. Белавин^{1#}, Е.В. Дейнеко^{1, 2}

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

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

 uvarova@bionet.nsc.ru

Аннотация. Вспышка нового варианта коронавирусной инфекции, известной как COVID-19, произошла в конце 2019 г. в Китае, в городе Ухань, и была вызвана вирусом SARS-CoV-2. Данный вариант вируса характеризуется высокой степенью изменчивости и, как показывает сложившаяся ситуация с его распространением по различным регионам земного шара, способен приводить к прогрессирующему распространению инфекции среди человеческой популяции и становится причиной возникновения пандемии. Мировое сообщество исследователей прилагает огромные усилия для разработки средств защиты, профилактики и лечения этого заболевания, основываясь на современных достижениях в области молекулярной биологии, иммунологии и вакцинологии. В предлагаемом обзоре суммирована информация о современном состоянии исследований в области создания вакцин против COVID-19 с акцентом на роль растений в решении этой сложной проблемы. Хотя растения издавна использовались человечеством в качестве источников различных лекарственных субстанций, в условиях пандемии растительные системы экспрессии становятся привлекательными в качестве биофабрик или биореакторов для наработки искусственно созданных белковых молекул, включающих протективные антигены для вакцины против вирусной инфекции. Дизайн и конструирование таких искусственных молекул лежат в основе создания рекомбинантных субъединичных вакцин, нацеленных на быстрое реагирование против распространения инфекций с высокой степенью изменчивости. В обзоре представлено состояние исследований, охватывающее период немногим более двух лет, т. е. с момента появления новой коронавирусной инфекции. Обсуждается важность быстрого реагирования исследовательских групп из разных научных областей в направлении использования уже существующих разработок для создания средств защиты против различных патогенов. На примере двух растительных систем экспрессии – стабильной и транзиторной – показано развитие работ по конструированию рекомбинантных субъединичных вакцин против COVID-19 в различных лабораториях и коммерческих компаниях. Подчеркнута перспективность использования растительных систем экспрессии для разработки не только средств защиты в условиях быстрого реагирования (субъединичные вакцины), но и терапевтических средств в виде моноклональных антител против COVID-19, синтезируемых в растительных клетках. Ключевые слова: растительные вакцины; системы экспрессии растений; вирусоподобные частицы; транзиторная экспрессия; стабильная экспрессия; рекомбинантные белки.

Для цитирования: Уварова Е.А., Белавин П.А., Дейнеко Е.В. Разработка и создание кандидатных вакцин против COVID-19 на основе растительных систем экспрессии: состояние исследований и перспективы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3):327-335. DOI 10.18699/VJGB-22-39

Design and assembly of plant-based COVID-19 candidate vaccines: recent development and future prospects

Е.А. Uvarova^{1#} , P.A. Belavin^{1#}, E.V. Deineko^{1, 2}

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

² Tomsk State University, Tomsk, Russia

 uvarova@bionet.nsc.ru

Abstract. An outbreak of a new variant of the coronavirus infection, known as COVID-19, occurred at the end of 2019 in China, in the city of Wuhan. It was caused by the SARS-CoV-2 virus. This variant of the virus is characterized by a high degree of variability and, as the current situation with its spread across different regions of the globe shows, it can lead to a progressive spread of infection among the human population and become the cause of a pandemic. The world scientific community is making tremendous efforts to develop means of protection,

prevention and treatment of this disease based on modern advances in molecular biology, immunology and vaccinology. This review provides information on the current state of research in the field of vaccine development against COVID-19 with an emphasis on the role of plants in solving this complex problem. Although plants have long been used by mankind as sources of various medicinal substances, in a pandemic, plant expression systems become attractive as biofactories or bioreactors for the production of artificially created protein molecules that include protective antigens against viral infection. The design and creation of such artificial molecules underlies the development of recombinant subunit vaccines aimed at a rapid response against the spread of infections with a high degree of variability. The review presents the state of research covering a period of just over two years, i.e. since the emergence of the new outbreak of coronavirus infection. The authors tried to emphasize the importance of rapid response of research groups from various scientific fields towards the use of existing developments to create means of protection against various pathogens. With two plant expression systems – stable and transient – as examples, the development of work on the creation of recombinant subunit vaccines against COVID-19 in various laboratories and commercial companies is shown. The authors emphasize that plant expression systems have promise for the development of not only protective means under conditions of rapid response (subunit vaccines), but also therapeutic agents in the form of monoclonal antibodies against COVID-19 synthesized in plant cells.

Key words: plant-based vaccines; plant expression systems; virus-like particles; transient expression; stable expression; recombinant proteins.

For citation: Uvarova E.A., Belavin P.A., Deineko E.V. Design and assembly of plant-based COVID-19 candidate vaccines: recent development and future prospects. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):327-335. DOI 10.18699/VJGB-22-39

Введение

Одним из наиболее эффективных методов борьбы с инфекционными заболеваниями является вакцинация. Вакцина – это препарат, стимулирующий организм на формирование защитной реакции против инфекционного агента. В основу вакцинации положено программирование специфических иммунологических механизмов на защиту от возбудителей различных инфекций. Именно благодаря вакцинации человечеству удалось избежать всплеск многих опасных инфекций, тем не менее имеющиеся в арсенале вакцины все еще далеки от «идеальных». Использование традиционных вакцин, производство которых основано на аттенуированных или инактивированных патогенах, иногда сопровождается сенсibilизацией организма, большой нагрузкой на иммунную систему, реактогенностью, токсичностью и др. (Francis, 2018).

Разработанные к настоящему времени методы и подходы в области молекулярной биологии, иммунологии, вакцинологии, клеточной и синтетической биологии, а также биоинформатики позволяют по-новому взглянуть на открывающиеся возможности создания более совершенных средств защиты от патогенов вирусного и бактериального происхождения, лишенных вышеперечисленных недостатков. Методы современной биологии дают возможность идентифицировать и изолировать биологические макромолекулы или их фрагменты, которые можно было бы использовать в качестве иммуногенных компонентов для активации иммунной системы в ответ на патоген. Такими компонентами могут выступать белки патогенов (например, белки оболочек возбудителей инфекции), являющиеся иммуногенами. С применением генно-инженерных технологий успешно развивается направление по разработке рекомбинантных субъединичных вакцин, включающих протективные антигены в сочетании с адьювантами и синтезируемых в различных системах экспрессии (Salazar-González et al., 2015; Demurtas et al.,

2016; Fischer, Buyel, 2020; McNulty et al., 2020; Rybicki, 2020).

Разработка рекомбинантных субъединичных вакцин наиболее актуальна для патогенов, характеризующихся высоким уровнем изменчивости. Это возбудители вирусных инфекций, вызывающие острые респираторные заболевания и грипп (Shoji et al., 2011; Ward et al., 2020). Данные патогены способны приводить к прогрессирующему распространению инфекции среди человеческой популяции и становиться причиной возникновения эпидемий и пандемий. Именно к таким патогенам относится новая разновидность коронавируса – SARS-CoV-2.

Доступность данных о структуре генома нового штамма вируса, выделенного с использованием классических методов вирусологии, электронной микроскопии и молекулярного анализа в конце 2019 г. (Zhu et al., 2020), открыла широкие возможности для применения уже разработанных и имеющихся в арсенале исследователей новых подходов к конструированию вакцин. Первые заявления о клинических испытаниях (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04283461>) появились уже через два месяца после опубликования первичной структуры генома этого вируса (Zhu et al., 2020). Данный факт свидетельствует о том, что имеющиеся разработки и понимание молекулярных механизмов формирования защитных реакций со стороны иммунной системы организма позволяют достаточно оперативно отреагировать на появление новых вариантов вирусной инфекции (Pogrebnyak et al., 2005). Однако для использования новой вакцины в целях профилактики населения необходимо оценить ее эффективность и влияние на организм человека, а также возможности ее промышленной наработки (Jiang, 2020).

В предлагаемом обзоре авторы сделали попытку проанализировать возможности применения растительных систем экспрессии, направленных на создание противовирусных субъединичных рекомбинантных вакцин, в частности кандидатных вакцин против COVID-19.

Растительные системы экспрессии

При разработке вакцин нового поколения, в том числе рекомбинантных, актуальным остается вопрос о поиске высокоэффективных и экономически выгодных систем их экспрессии. В настоящее время для этих целей чаще всего используют *Escherichia coli*, несколько видов *Saccharomyces* и клетки млекопитающих. Новые перспективы в наработке рекомбинантных белков открываются благодаря генетически модифицированным растениям (биофарминг), которые могли бы выступать в качестве растительных (съедобных) вакцин (Salazar-González et al., 2015). Растения, в тканях которых синтезируются и накапливаются рекомбинантные иммуногены, привлекательны для получения субстанций ветеринарного и медицинского назначения, в том числе субъединичных рекомбинантных противовирусных вакцин. Во многих ведущих биотехнологических лабораториях и коммерческих фирмах растительные клетки используются в качестве альтернативной системы экспрессии для получения рекомбинантных белков медицинского назначения (Fischer, Buvel, 2020; Rybicki, 2020).

Применяемые для синтеза рекомбинантных белков, в частности вакциногенных, растительные экспрессионные платформы основаны на стабильной экспрессии целевого гена при его доставке в ядерный или хлоропластный геном растения, а также на временной или транзientной его экспрессии. На рис. 1 представлены две основные платформы, развиваемые в ведущих биотехнологических центрах для производства рекомбинантных белков, в том числе медицинского назначения, с использованием синтетических возможностей транскрипционно-трансляционного аппарата растений. Общий принцип, положенный в основу этих платформ, состоит в следующем: методами генетической инженерии создается искусственная матрица с целевым геном, по которой синтезируется соответствующий белок, накапливаемый в тканях растений. Растительные ткани могут быть лиофильно высушены и инкапсулированы, либо из тканей может быть выделен и очищен непосредственно рекомбинантный белок. Как правило, в качестве целевого гена выбирают гены белков оболочек возбудителей инфекционных заболеваний, являющихся иммуногенами. В составе кассет экспрессии целевые гены могут быть интегрированы в геном растений (ядерный или хлоропластный), что обеспечит стабильную экспрессию целевого гена и накопление в тканях растения целевого продукта (см. рис. 1, а). Однако использование хлоропластного генома для этих целей хотя и представляется весьма перспективным, все еще далеко от практического применения в силу большого числа нерешенных проблем (Waheed et al., 2015; Yu Y. et al., 2020).

При транзientной системе экспрессии целевые гены доставляются в ткани растений с помощью специально созданных для этого вирусных векторов (Sainsbury et al., 2010), а также растения *Nicotiana benthamiana*, особенности строения листовой паренхимы которого оптимальны для проведения успешной агроинфильтрации (см. рис. 1, б). В компании IconGenetics (Германия) разработана и запатентована система «магнификации», с применением которой выход рекомбинантного белка при транзientной системе экспрессии может достигать 80 % от общего рас-

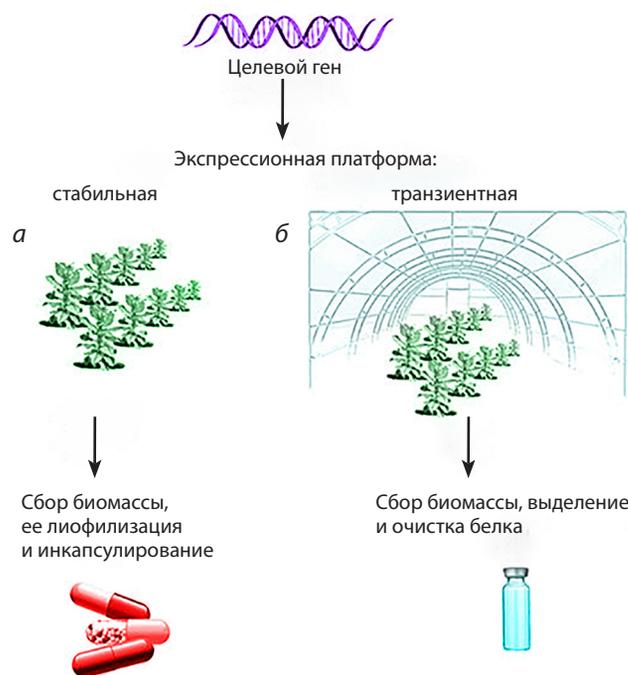


Рис. 1. Растительные экспрессионные платформы для получения рекомбинантных белков.

творимого белка (ОРБ) (Gleba et al., 2005). Несмотря на относительно низкий (немногим более 1 % ОРБ) выход рекомбинантного белка в растениях со стабильной системой экспрессии в случае ядерной трансформации, применение уже имеющихся агротехнологий выращивания трансгенных растений обеспечивает им неограниченную масштабируемость при минимальных затратах (Kermode, 2018). Таким образом, растительная платформа со стабильной экспрессией целевого гена перспективна для производства продуктов с большим объемом, например для получения вакцин для профилактики заболеваний, в особенности в развивающихся странах.

Трансгенные или транспластомные растения со стабильной экспрессией целевого гена используются для крупномасштабного производства рекомбинантных белков в течение длительного периода, тогда как особенности транзientной экспрессии позволяют получить необходимые количества рекомбинантного белка за короткий промежуток времени, что представляется чрезвычайно важным при необходимости экстренного реагирования на распространение патогена. Так, Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) на случай чрезвычайной ситуации был одобрен коктейль против вируса Эбола под названием ZMapp™, состоящий из трех моноклональных антител, транзientно синтезированных в растениях табака (Phoolcharoen et al., 2011).

Транзientная система экспрессии перспективна для развития мелкосерийного производства персонализированных лекарственных препаратов, таких как антиидиотипические антитела scFv для неходжкинской лимфомы, а также при необходимости массовой вакцинации на-

селения в случае вспышек сезонных вирусных заболеваний, вызываемых быстро мутирующими вирусами. В растениях *N. benthamiana* уже после трех недель с момента выделения вирусной последовательности были синтезированы достаточно большие количества антигенов из штаммов вируса гриппа H5N1 (птичий грипп) и H1N1 (свиной грипп) (Hodgins et al., 2019; Makarkov et al., 2019). Данные рекомбинантные белки, нарабатываемые в транзientной растительной системе экспрессии, рассматриваются в качестве кандидатных вакцин против вируса гриппа и завершили II фазу испытаний на людях (Pillet et al., 2019).

Американской компанией DowAgroSciences в качестве передовой платформы для производства рекомбинантного антигена против вируса ньюкаслской болезни (псевдожумы) домашней птицы разработана система культивирования растительных клеток Concert™. Несмотря на то что компанией не было запущено коммерческое производство данного рекомбинантного продукта, эта технология послужила основой для создания других коммерческих препаратов. Реальность и эффективность такого подхода многократно подтверждена исследователями ведущих биотехнологических лабораторий мира, а также деятельностью многочисленных компаний и фирм, специализирующихся на производстве одного или нескольких близкородственных продуктов на базе собственной экспрессионной платформы (Margolin et al., 2018; Rybicki, 2018).

Учитывая драматическое воздействие пандемии COVID-19, крайне важно рассмотреть все имеющиеся в распоряжении исследователей технологии, которые можно было бы применить для борьбы с возбудителем этого инфекционного заболевания – вирусом SARS-CoV-2. Поскольку технология производства растительных биофармацевтических препаратов в целом уже разработана, то в рамках пандемии она представляется весьма привлекательной с точки зрения наработки не только недорогих вакцин, но и антител, используемых для терапии, профилактики и диагностики. Производство антител, например анти-COVID-19, даже более перспективно, чем производство вакциногенных белков, так как рекомбинантные антитела растительного происхождения могут быть своевременно произведены и одобрены для применения на людях в более короткие сроки по сравнению с разработкой вакцин (Hiatt et al., 1989; Tian et al., 2020). Перспективность растительных систем экспрессии для применения в борьбе с COVID-19 обсуждается в обзорах (Rosales-Mendoza, 2020; Shanmugaraj et al., 2020b).

Общее представление об ответных иммунологических реакциях организма на заражение вирусными инфекциями

Возбудители респираторных заболеваний, к которым относятся и различные типы коронавируса, попадают в организм человека через слизистые верхних дыхательных путей. Вирусные частицы присоединяются к клеточным рецепторам, сливаются с клеточной мембраной и проникают внутрь клетки. Используя репликативный аппарат клетки, вирус размножается, и вирусные частицы выходят наружу, поражая соседние с ней клетки. В случае

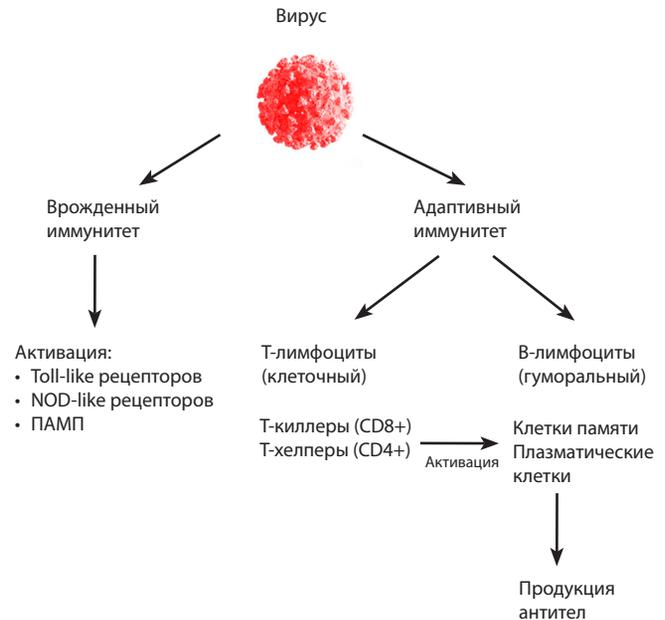


Рис. 2. Схема ответных иммунных реакций организма на вторжение вирусной инфекции.

с вирусом SARS-CoV-2 проникновение внутрь клетки обеспечивает белок S-2, являющийся одной из двух частей поверхностного вирусного S белка (spike-белок). Вторая часть этого белка – S-1 – обеспечивает связывание с ACE2-рецептором легочного эпителия. Оказавшись внутри клетки, вирусы становятся внутриклеточными паразитами, и борьба с ними со стороны иммунной системы хозяина становится непростой задачей.

В процессе эволюции сформировались две системы защиты организма от патогенов: наследственная, немедленно реагирующая на опасность, нацеленная на опознавание патогена в целом (врожденный иммунитет), и специфическая, нацеленная на опознавание огромного числа специфичностей (антигенов) у различных патогенов (приобретенный иммунитет, или адаптивный). Молекулярный механизм опознавания патогена основан на выявлении некоторых стандартных «молекулярных меток» или патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП). Общая схема развития ответных иммунных реакций организма на проникновение вируса представлена на рис. 2.

Реакции врожденного иммунитета запускаются на первом этапе взаимодействия организма с патогеном. Структуры патогена распознаются рецепторами фагоцитирующих клеток и натуральных киллеров, при взаимодействии с которыми запускаются каскады Т-клеточного иммунного ответа и координируется устранение патогенов и инфицированных клеток. Основную группу рецепторов при развитии неспецифической защиты составляют Toll-like и NOD-like рецепторы (Takeuchi, Akira, 2010; Channappanavar et al., 2014).

Необходимо подчеркнуть, что, защищаясь от вирусов, клетка использует как антитела (гуморальное звено иммунитета), так и стратегию уничтожения клеток, зараженных вирусом (клеточное звено иммунитета). Мембранные

белки большинства вирусов являются для клетки «опознавательными знаками» или мишенями, при опознавании которых В-лимфоциты, активированные Т-хелперами (CD4⁺), дифференцируются в плазматические клетки, синтезирующие антитела (см. рис. 2). Антитела способны связывать вирус, препятствуя тем самым прикреплению и проникновению вируса в клетку. Такая стратегия защиты эффективна на ранних стадиях развития инфекции, до тех пор пока вирус не проник в клетку. После заражения клетки включается другая стратегия, направленная на уничтожение вирусов, которая осуществляется натуральными киллерами и цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8⁺) (см. рис. 2). Важность формирования цитотоксических реакций в борьбе с коронавирусами подчеркивалась ранее (Channappanavar et al., 2014). Представленная на рис. 2 схема ответных иммунных реакций организма на вторжение вирусной инфекции предельно упрощена с целью привлечения внимания к ключевым моментам, важным для выбора стратегии при разработке вакцины.

Принципы разработки вакцин против COVID-19

Современные знания в области молекулярной биологии, иммунологии и вакцинологии предоставляют исследователям широкие наборы методов и подходов для конструирования вакцин нового поколения, основанных не только на данных об антигенной структуре патогена, но и на механизмах иммунного ответа организма на патоген и его компоненты.

На сайтах Национальной библиотеки по медицине и Банка генов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sars-cov-2/>) доступна информация о составе нуклеотидных последовательностей генома вируса SARS-CoV-2. По состоянию на середину июля 2021 г. в свободном доступе была информация о более чем 377 тысячах полностью прочитанных геномов данного вируса, а также более чем 526 тысячах частично прочитанных геномов. Поскольку вспышка новой коронавирусной инфекции COVID-19 произошла в конце 2019 г. в Китае, в городе Ухань, то в качестве референсной была условно выбрана нуклеотидная последовательность именно этого штамма вируса. Данные о референсной последовательности и всем секвенированным геномам доступны в генном банке по ссылке https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_045512.2.

Сейчас на сайте ВОЗ можно найти информацию о состоянии завершенных разработок по созданию вакцин против SARS-CoV-2 (https://cdn.who.int/media/docs/default-source/blue-print/15april2022-novel-covid-19-vaccine-tracker.zip?sfvrsn=225505e5_3&download=true). К настоящему времени в мире зарегистрировано 196 препаратов кандидатных вакцин на стадии доклинических исследований и 153 препарата на стадии клинических испытаний. На сайте ВОЗ по этой же ссылке можно найти информацию о производителях и о конкретных препаратах вакцин, находящихся на стадии клинических испытаний и получения одобрения в качестве вакцин со стороны ВОЗ (см. таблицу).

Анализируя состояние исследований в области разработки вакцин против COVID-19, следует отметить, что в качестве основы почти все разработчики выбирают иммуногенный белок S коронавируса, который представляется иммунной системе разными путями. Именно

этот белок вируса SARS-CoV-2 связывается с рецептором ACE2 клеток слизистого эпителия и обеспечивает его проникновение в клетки организма человека. Как видно из результатов анализа состояния вакцин, прошедших регистрацию и подготовленных разработчиками для использования (см. таблицу), современный рынок включает как классические вакцины против COVID-19, основанные на представлении иммунной системе антигенов инактивированных вирусов (Gao et al., 2020), так и мРНК-вакцины, в которых мРНК, кодирующая белок S, упакована в липидную оболочку. Попадая в клетки человека, такая мРНК является матрицей для синтеза белка S, который и опознается клетками иммунной системы как сигнал опасности (Pardi et al., 2018). РНК-вакцины продемонстрировали индукцию нейтрализующих антител с высокими титрами (Jackson et al., 2020). На таком же механизме представления антигена разрабатываются и ДНК-вакцины, которые включают фрагмент ДНК, кодирующий S белок, в векторы, например в плазмиды или аденовирусы (см. таблицу). В исследованиях на макаках-резус эти вакцины стимулировали образование высоких титров антител, а также образование цитотоксических лимфоцитов (Yu J. et al., 2020). Недостатком векторных вакцин является иммуногенность самих векторов.

Перспективными считаются вакцины на основе рекомбинантных белков или пептидов. В случае с SARS-CoV-2 в качестве кандидатов на антигены рассматриваются полно-размерные белки S, M и N или их домены, для повышения иммуногенности которых дополнительно используют эпитопы, распознаваемые Т- и В-клетками иммунной системы (Marfan, 2021). Такие искусственно созданные рекомбинантные белки при попадании в организм активируют клетки систем иммунной защиты, запускающие образование соответствующих субклеточных популяций, биосинтез антител и формирование «клеток памяти». Наиболее полно стратегии создания вакцин против SARS-CoV-2 и современное состояние исследований в этой области представлены в обзоре (Bakhiet, Taurin, 2021).

Следует подчеркнуть, что при разработке противовирусных вакцин, в том числе против COVID-19, условно можно выделить два важных этапа, первый из которых связан непосредственно с созданием самой вакцины, представляемой иммунной системе в виде большого числа антигенов (инактивированный вирус) или в виде доминирующего антигена (антигенов) – мРНК, ДНК, рекомбинантного белка или пептида. Важность второго этапа определяется надежными системами наработки либо самого вируса, либо его антигенов. Анализируя современное состояние исследований при разработке вакцин, и в особенности субъединичных вакцин нового поколения, необходимо отметить, что наряду с устоявшимися платформами, например клетками китайского хомячка (CHO), используемыми при наработке рекомбинантной вакцины Recombinant Novel Coronavirus Vaccine китайской фирмой Zhifei Longcom (см. таблицу), все большее внимание мирового сообщества привлекают растительные системы экспрессии (Fischer, Buyel, 2020; Kannan et al., 2020).

Информация о состоянии рынка вакцин, прошедших и проходящих регистрацию ВОЗ на 2 апреля 2022 г.

Платформа вакцины	Название вакцины	Фирма-изготовитель, страна	Стадия регистрации
Вирусный не реплицирующий вектор	AZD1222	AstraZeneca, Великобритания	*
	Ad26.COV2.S	Janssen Infectious Diseases & Vaccines (J&J), США	*
	Sputnik-V	Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Россия	**
	Ad5-nCoV	SanSinoBIO, Китай	**
	Covishield (ChAdOx1_nCoV-19)	Serum Institute of India, Индия	*
Инактивированный вирус	SARS-CoV-2 Vaccine, Inactivated (Vero Cell) CoronavacTM	IMBCAMS, Китай	*
	Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine (Vero Cell)	Sinopharm/WBIBP, Китай	**
	COVAXIN	Bharat Biotech, Индия	**
	SARS-CoV-2 Vaccine, Inactivated (Vero Cell)	IMBCAMS, Китай	**
	CovIran® vaccine	Иран	***
	SARS-CoV-2 Vaccine, Inactivated (Vero Cell)	IMBCAMS, Китай	***
РНК	BNT162b2/COMIRNATY	Pfizer, США	*
	mRNA-1273	Moderna, США	*
	Zovrecimeran	CureVac, Германия	***
Субъединичная, рекомбинантная	Recombinant Novel Coronavirus Vaccine (CHO Cell)	Zhifei Longcom, Китай	***
	NVX-CoV2373/Covovax	Novavax, США	**
	CoV2 preS dTM-AS03 vaccine	Sanofi, Франция	***
	SCB-2019	Clover Biopharmaceuticals, Китай	***
	Soberana 01, Soberana 02 Soberana Plus Abdala	BioCubaFarma, Куба	***
	Corbevax	Biological E, Индия	***
	GBP510	SK Bioscience, Южная Корея	***
Пептидный антиген	EpiVacCorona	ГНЦ ВБ «Вектор», Россия	***
На основе растительной платформы экспрессии	COVIFENZ®	Medicago Inc., Канада	***

Примечание. Информация взята с сайта https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_COVID_VAX_02April2022.pdf
Стадия регистрации вакцины: * зарегистрирована; ** окончание регистрации; *** подготовительные процедуры.

Состояние исследований в области разработки вакцин растительного происхождения против COVID-19

Несмотря на то что первая работа о привлекательности растительных систем экспрессии для биотехнологического производства вакциногенных белков против COVID-19 появилась сравнительно недавно (Rosales-Mendoza, 2020; Shanmugaraj et al., 2020a), к настоящему времени число таких публикаций заметно увеличилось (Capell et al., 2020; Dhama et al., 2020; Ma et al., 2020; Prasad et al., 2020;

Shanmugaraj et al., 2020a). Авторы всесторонне обсуждают возможности приложения уже существующих биотехнологических разработок для получения субъединичных вакцин на основе растительных систем экспрессии (Capell et al., 2020; Ma et al., 2020), а также особенности создания такого типа вакцин в случае необходимости быстрого реагирования на распространение патогена (Shanmugaraj et al., 2020a).

Имеющиеся у исследователей данные по созданию растительных вакцин против гриппа на основе виру-

соподобных частиц также легли в основу разработки вакцин против COVID-19 (Hodgins et al., 2019; Makarkov et al., 2019).

Более того, канадская фирма Medicago, которая использует растительные системы экспрессии для производства рекомбинантных белков медицинского назначения, применяет транзистентную систему экспрессии в растениях *N. benthamiana* для синтеза вакциногенного белка, включающего белок S-1 вируса SARS-CoV-2 (<https://www.medicago.com/en/covid-19-programs/>). Разработчики компании слили последовательность, кодирующую вирусный белок S-1, с последовательностью, обеспечивающей конформационные преобразования белковой молекулы, имитирующие поверхность вирусной частицы. Перспективность получения рекомбинантных белков, конформационно свернутых в виде вирусоподобных частиц, на поверхности которых представлены антигены в виде рекомбинантных полипептидов, отмечалась ранее (Baï et al., 2008). Фолдинг рекомбинантного белка в виде вирусоподобной частицы существенно повышает эффективность презентации антигенов клеткам иммунной системы организма (Rybicki, 2020). И хотя приготовленная на основе вирусоподобных частиц вакцина имитирует вирус, такой «искусственный вирус» лишен генетического аппарата (РНК или ДНК) и, соответственно, возможности реплицироваться при попадании в клетку. Ранее многочисленные исследования показали, что посттрансляционные преобразования белка в растительных системах экспрессии обеспечивают его сворачивание в вирусоподобную частицу (D'Aoust et al., 2010; Lua et al., 2014). Более того, растительные системы экспрессии поддерживают создание функциональных рекомбинантных белков, в том числе и таких сложных, как антитела (Diamos et al., 2020).

На сайте биотехнологической компании Medicago Inc. размещена информация об одобрении Канадским регулятором вакцины, представляющей собой рекомбинантный белок S вируса SARS-CoV-2, в виде вирусоподобных частиц, синтезируемых в растениях табака (*N. benthamiana*) (<https://medicago.com/app/uploads/2022/02/Covifenz-PM-en.pdf>). Выделенный и очищенный из растительной биомассы вакциногенный белок используется в испытаниях на добровольцах (в эксперименте участвовали около 30 тыс. человек). Следует подчеркнуть, что вакцина, полученная на основе растительной системы экспрессии, успешно прошла три фазы клинических испытаний на добровольцах (Pillet et al., 2019; Ward et al., 2021) и в настоящее время одобрена под коммерческим названием COVIFENZ® в Канаде. Компанией заявлено о формировании высоких титров антител у испытуемых. Medicago Inc. провела оценку своей вакцины-кандидата с пандемическим адьювантом GSK. Сейчас такие компании, как GlaxoSmithKlein (GSK, Великобритания), Seqirus (Великобритания) и Dynavax (США), разрабатывают создание лицензированных адьювантов (AS03, MF59 и CpG 1018 соответственно) для их использования с вакцинами против COVID-19. Применение адьюванта может иметь особое значение в ситуации пандемии, поскольку может снизить количество белка вакцины, требуемого на дозу, что позволяет производить больше доз вакцины и, следовательно, способствует защите большего числа

людей. Несмотря на то что точная дозировка вакцины для людей все еще не определена, компания оценивает потенциальные объемы производства с 2021 г. до 80 млн доз в год с увеличением производительности с 2023 г. до более 1 млрд доз вакцины против COVID-19 в год.

Заключение

Как показывает опыт ведущих биотехнологических компаний и лабораторий по оптимизации систем экспрессии для производства рекомбинантных белков, растительные системы экспрессии весьма привлекательны для этих целей и уже востребованы некоторыми крупными и средними биотехнологическими компаниями. Перспективность использования растительных клеток для разработки рекомбинантных белков, предназначенных для вакцинопрофилактики, основана также на возможности их перорального и интраназального применения и активации мукозальных ответных реакций.

Пероральная доставка фармацевтических белков представляется желанной целью биофармацевтической промышленности, так как обеспечивает более удобное введение лекарственного средства по сравнению с внутривенными, внутримышечными и подкожными инъекциями. Пероральная доставка приведет к лучшим результатам лечения пациентов наряду с повышением качества их жизни. Более того, привлекательность растительных систем экспрессии основывается на возможности быстрого реагирования на патогены с высокой степенью изменчивости. Приведенные в рамках данного обзора примеры успешного испытания растительной вакцины против COVID-19 и обеспечения больших объемов производства для наработки вакциногенного рекомбинантного белка подтверждают перспективность растительных систем экспрессии для получения рекомбинантных субъединичных вакцин.

Список литературы / References

- Bai B., Hu Q., Hu H., Zhou P., Shi Z., Meng J., Lu B., Huang Y., Mao P., Wang H. Virus-like particles of SARS-like coronavirus formed by membrane proteins from different origins demonstrate stimulating activity in human dendritic cells. *PLoS One*. 2008;3:e2685. DOI 10.1371/journal.pone.0002685.
- Bakhiet M., Taurin S. SARS-CoV-2: targeted managements and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2021;58:16-29. DOI 10.1016/j.cytogfr.2020.11.001.
- Capell T., Twyman R.M., Armario-Najera V., Ma J.K., Schillberg S., Christou P. Potential applications of plant biotechnology against SARS-CoV-2. *Trends Plant Sci*. 2020;25(7):635-643. DOI 10.1016/j.tplants.2020.04.009.
- Channappanavar R., Fett C., Zhao J., Meyerholz D.K., Perlman S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol*. 2014;88:11034-11044. DOI 10.1128/jvi.01505-14.
- D'Aoust M.A., Couture M.M., Charland N., Trepanier S., Landry N., Ors F., Vézina L.-P. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J*. 2010;8(5):607-619. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x.
- Demurtas O.C., Massa S., Illiano E., De Martinis D., Chan P.K., Di Bonito P., Franconi R. Antigen production in plant to tackle infectious diseases flare up: the case of SARS. *Front. Plant Sci*. 2016;7:1-12. DOI 10.3389/fpls.2016.00054.

- Dhama K., Natesan S., Yatoo M.I., Patel S.K., Tiwari R., Saxena S.K., Harapan H. Plant-based vaccines and antibodies to combat COVID-19: current status and prospects. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020;16(12):2913-2920. DOI 10.1080/21645515.2020.1842034.
- Diamos A.G., Hunter J.G.L., Pardhe M.D., Rosenthal S.H., Sun H., Foster B.C., DiPalma M.P., Chen Q., Mason H.S. High level production of monoclonal antibodies using an optimized plant expression system. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;7:472. DOI 10.3389/fbioe.2019.00472.
- Fischer R., Buyel J.F. Molecular farming – the slope of enlightenment. *Biotechnol. Adv.* 2020;40:107519. DOI 107519 10.1016/j.biotechadv.2020.107519.
- Francis M.J. Recent advances in vaccine technologies. *Vet. Clin. Small Anim.* 2018;48(2):231-241. DOI 10.1016/j.cvsm.2017.10.002.
- Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science.* 2020;369(6499):77-81. DOI 10.1126/science.abc1932.
- Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magnification: a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine.* 2005;23:2042-2048. DOI 10.1016/j.vaccine.2005.01.006.
- Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature.* 1989;342(6245):76-78. DOI 10.1038/342076a0.
- Hodgins B., Pillet S., Landry N., Ward B.J. Prime-pull vaccination with a plant-derived virus-like particle influenza vaccine elicits a broad immune response and protects aged mice from death and frailty after challenge. *Immun. Ageing.* 2019;16:27. DOI 10.1186/s12979-019-0167-6.
- Jackson L.A., Anderson E.J., Roupael N.G., Roberts P.C., Makhene M., Coler R.N., McCullough M.P., Chappell J.D., Denison M.R., Stevens L.J., Pruijssers A.J., McDermott A., Flach B., Doria-Rose N.A., Corbett K.S., Morabito K.M., O'Dell S., Schmidt S.D., Swanson P.A., Padilla M., Mascola J.R., Neuzil K.M., Bennett H., Sun W., Peters E., Makowski M., Albert J., Cross K., Buchanan W., Pikaart-Tautges R., Ledgerwood J.E., Graham B.S., Beigel J.H. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 – preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 2020;383:1920-1931. DOI 10.1056/nejmoa2022483.
- Jiang S. Don't rush to deploy COVID-19 vaccines and drugs without sufficient safety guarantees. *Nature.* 2020;579:321. DOI 10.1038/d41586-020-00751-9.
- Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A., Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – recent trends. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2020;24:2006-2011. DOI 10.26355/eurrev_202002_20378.
- Kermode A.R. Current Status and Perspectives of the Molecular Farming Landscape. In: Kermode A.R. (Ed.) *Molecular Pharming*, First Edition. John Wiley & Sons, 2018;3-25. DOI 10.1002/9781118801512.ch10.
- Lua L.H.L., Connors N.K., Sainsbury F., Chuan Y.P., Wibowo N., Middelberg A.P.J. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* 2014;111(3):425-440. DOI 10.1002/bit.25159.79.
- Ma C., Su S., Wang J., Wei L., Du L., Jiang S. From SARS-CoV to SARS-CoV-2: safety and broad-spectrum are important for coronavirus vaccine development. *Microbes Infect.* 2020;22(6-7):245-253. DOI 10.1016/j.micinf.2020.05.004.
- Makarkov A.I., Golizeh M., Ruiz-Lancheros E., Gopal A.A., Costas-Cancelas I.N., Chierzi S., Pillet S., Charland N., Landry N., Rouiller I., Wiseman P.W., Ndao M., Ward B.J. Plant-derived virus-like particle vaccines drive cross-presentation of influenza A hemagglutinin peptides by human monocyte-derived macrophages. *NPJ Vaccines.* 2019;4:1-13. DOI 10.1038/s41541-019-0111-y.
- Margolin E., Chapman R., Williamson A.L., Rybicki E.P., Meyers A.E. Production of complex viral glycoproteins in plants as vaccine immunogens. *Plant Biotechnol. J.* 2018;16(9):1531-1545. DOI 10.1111/pbi.12963.
- Marian A.J. Current state of vaccine development and targeted therapies for COVID-19: impact of basic science discoveries. *Cardiovasc. Pathol.* 2021;50:107278. DOI 10.1016/j.carpath.2020.107278.
- McNulty M.J., Gleba Y., Tusé D., Hahn-Löbmann S., Giritch A., Nandi S., McDonald K.A. Techno-economic analysis of a plant-based platform for manufacturing antimicrobial proteins for food safety. *Biotechnol. Prog.* 2020;36(1):e2896. DOI 10.1002/btpr.2896.
- Pardi N., Hogan M.J., Porter F.W., Weissman D. mRNA vaccines – a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018;17(4):261-279. DOI 10.1038/nrd.2017.243.
- Phoolcharoen W., Bhoo S.H., Lai H., Ma J., Arntzen C.J., Chen Q., Mason H.S. Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol. J.* 2011;9(7):807-816. DOI 10.1111/j.1467-7652.2011.00593.x.
- Pillet S., Couillard J., Trépanier S., Poulin J.F., Yassine-Diab B., Guy B., Ward B.J., Landry N. Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza vaccine candidate – two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and ≥ 50 years old adults. *PLoS One.* 2019;14(6):e0216533. DOI 10.1371/journal.pone.0216533.
- Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R., Koprowski H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(25):9062-9067. DOI 10.1073/pnas.0503760102.
- Prasad A., Muthamilarasan M., Prasad M. Synergistic antiviral effects against SARS-CoV-2 by plant-based molecules. *Plant Cell Rep.* 2020;39(9):1109-1114. DOI 10.1007/s00299-020-02560-w.
- Rosales-Mendoza S. Will plant-made biopharmaceuticals play a role in the fight against COVID-19? *Expert Opin. Biol. Ther.* 2020;20(6):545-548. DOI 10.1080/14712598.2020.1752177.
- Rybicki E. History and promise of plant-made vaccines for animals. In: MacDonald J. (Ed.) *Prospects of Plant-Based Vaccines in Veterinary Medicine*. Cham: Springer, 2018;1-22. DOI 10.1007/978-3-319-90137-4_1.
- Rybicki E.P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2020;12:1-22. DOI 10.1002/wnan.1587.
- Sainsbury F., Sack M., Stadlmann J., Quendler H., Fischer R., Lomonosoff G.P. Rapid transient production in plants by replicating and non-replicating vectors yields high quality functional anti-HIV antibody. *PLoS One.* 2010;5(11):e13976. DOI 10.1371/journal.pone.0013976.
- Salazar-González J.A., Bañuelos-Hernández B., Rosales-Mendoza S. Current status of viral expression systems in plants and perspectives for oral vaccines development. *Plant Mol. Biol.* 2015;87(3):203-217. DOI 10.1007/s11103-014-0279-5.
- Shanmugaraj B., Malla A., Phoolcharoen W. Emergence of Novel Coronavirus 2019-nCoV: need for rapid vaccine and biological development. *Pathogens.* 2020a;9(2):148. DOI 10.3390/pathogens9020148.
- Shanmugaraj B., Siriwananon K., Wangkanont K., Phoolcharoen W. Perspectives on monoclonal antibody therapy as potential therapeutic intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19). *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2020b;38(1):10-18. DOI 10.12932/AP-200220-0773.
- Shoji Y., Chichester J.A., Jones M., Manceva S.D., Damon E., Mett V., Musiychuk K., Bi H., Farrance C., Shamloul M., Kushnir N., Sharma S., Yusibov V. Plant-based rapid production of recombinant subunit hemagglutinin vaccines targeting H1N1 and H5N1 influenza. *Hum. Vaccine.* 2011;7(Suppl.):41. DOI 10.4161/hv.7.0.14561.
- Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-820. DOI 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tian X., Li C., Huang A., Xia S., Lu S., Shi Z., Lu L., Jiang S., Yang Z., Wu Y., Ying T. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg. Microbes Infect.* 2020;9(1):382-385. DOI 10.1080/22221751.2020.1729069.
- Waheed M.T., Ismail H., Gottschamel J., Mirza B., Lössl A.G. Plastids: the green frontiers for vaccine production. *Front. Plant Sci.* 2015;6:1-11. DOI 10.3389/fpls.2015.01005.

- Ward B.J., Gobeil P., Séguin A., Atkins J., Boulay I., Charbonneau P.Y., Couture M., D'Aoust M.A., Dhaliwall J., Finkle C., Hager K., Mahmood A., Makarkov A., Cheng M.P., Pillet S., Schimke P., St-Martin S., Trépanier S., Landry N. Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nat. Med.* 2021;27:1071-1078. DOI 10.1038/s41591-021-01370-1.
- Ward B.J., Makarkov A., Séguin A., Pillet S., Trépanier S., Dhaliwall J., Libman M.D., Vesikari T., Landry N. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials. *Lancet.* 2020;396(10261):1491-1503. DOI 10.1016/S0140-6736(20)32014-6.
- Yu J., Tostanosk L.H., Peter L., Mercad N.B., McMahan K., Mah-rokhia S.H., Nkolol J.P., Liu J., Li Z., Chandrashekar A., Martine D.R., Loos C., Atyeo C., Fischinger S., Burk J.S., Sleil M.D., Chen Y., Zuiani A., Lelis F.J.N., Travers M., Habibi S., Pessaint L., Van Ry A., Blade K., Brown R., Cook A., Finneyfrock B., Dodson A., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Bondzi E.A., Dagotto G., Gebr M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kirilova M., Kordana N., Lin Z., Maxfiel L.F., Nampanya F., Nityanandam R., Ventur J.D., Wan H., Cai Y., Chen B., Schmid A.G., Weseman D.R., Bari R.S., Alter G., Andersen H., Lewi M.G., Barou D.H. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science.* 2020;369(6505):806-811. DOI 10.1126/science.abc6284.
- Yu Y., Yu P.C., Chang W.J., Yu K., Lin C.S. Plastid transformation: how does it work? Can it be applied to crops? What can it offer? *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(14):4854. DOI 10.3390/ijms21144854.
- Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. *N. Engl. J. Med.* 2020;382:727-733. DOI 10.1056/NEJMoa2001017.

ORCID ID

E. Uvarova orcid.org/0000-0002-1490-4196

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования, грант № FWNR-2022-0022.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 22.07.2021. После доработки 08.11.2021. Принята к публикации 10.11.2021.

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 23.05.2022. Выход в свет 31.05.2022. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 13.25.

Уч.-изд. л. 15.5. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–40 экз.) Заказ № 196. Цена свободная.

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