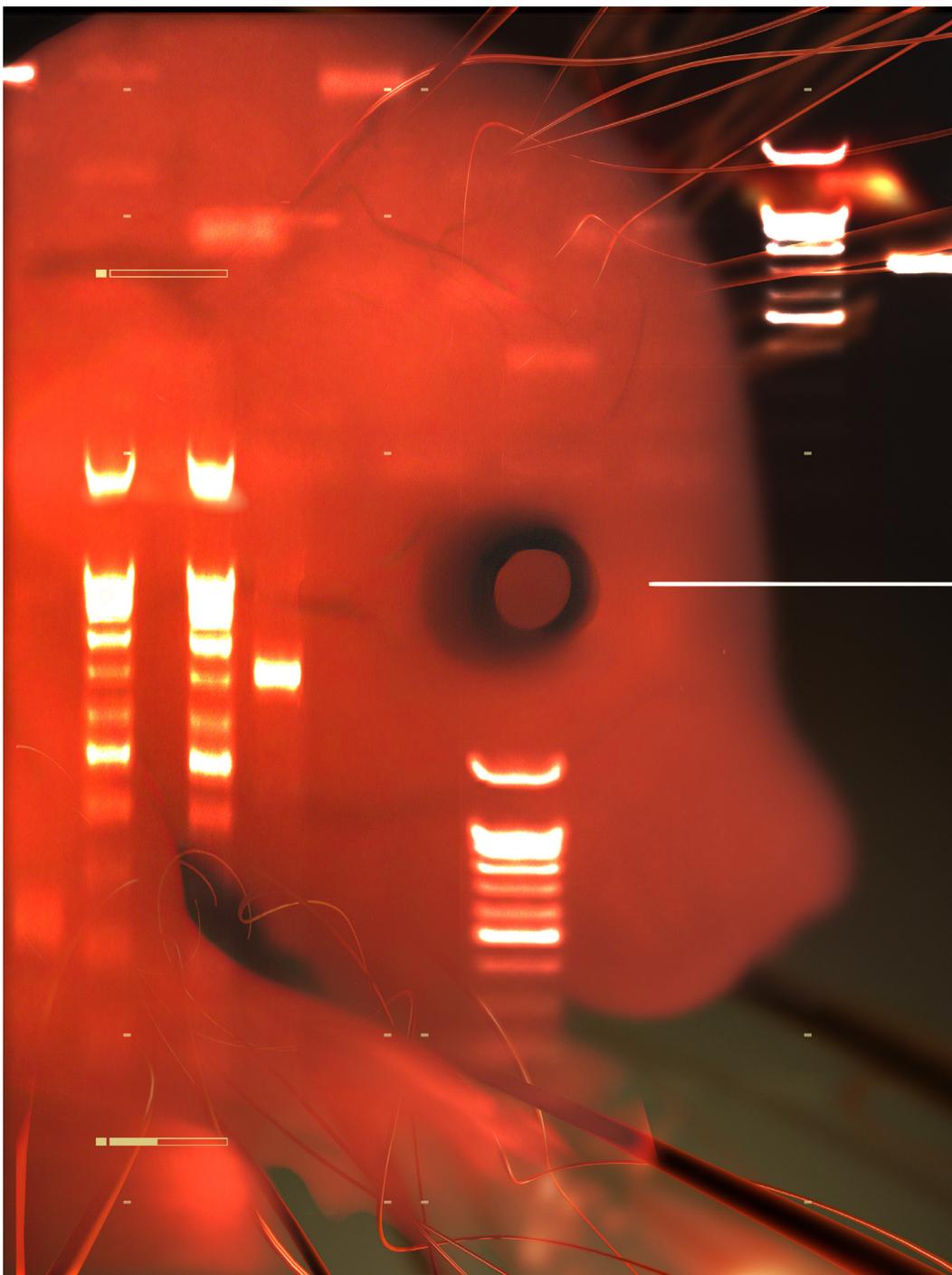


ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2025 • 29 • 1



Молекулярная и клеточная биология / Генетика и селекция растений / Симбиотические системы /
Генетика животных / Медицинская генетика / Биомедицина

Глубокоуважаемые коллеги!
Мы рады сообщить, что с 5 по 10 октября 2025 года состоится
Третий международный конгресс “CRISPR-2025”!

На этот раз организаторы конгресса встретят участников в гостеприимном солнечном Ереване (Армения).

Это событие станет площадкой для экспертного обсуждения последних достижений, вызовов и этических аспектов, связанных с использованием широчайшего спектра технологических подходов, направленных на редактирование геномов.

Организаторы:

- Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия),
- Институт химической биологии и фундаментальной медицины (Новосибирск, Россия),
- Российско-армянский университет (Ереван, Армения),
- Институт молекулярной биологии НАН РА (Ереван, Армения)
- Сургутский государственный университет (Сургут, Россия).

Партнеры: BIOCAD, Фонд научно-технологического развития Югры.

Предыдущие конгрессы, проведенные в 2018-м и 2023-м годах в Новосибирске, продемонстрировали востребованность и актуальность формата мероприятия.

Стремительно совершенствующиеся методы геномного редактирования, в том числе в области клинического применения CRISPR-систем, требуют всестороннего осмысления с учётом различных областей знаний.

Именно поэтому по сложившейся традиции мы предлагаем широкий спектр направлений, которые будут обсуждаться на конгрессе “CRISPR-2025”:

- Cell Technologies
- Regenerative Medicine
- Intelligent Data Science
- Synthetic Biology
- Postgenome
- Research & Development.

Традиционно участники конгресса представят передовые разработки и фундаментальные исследования в области CRISPR, их применение в медицине, сельском хозяйстве, эволюционной и палеобиологии.

Предстоящий конгресс станет пространством для взаимодействия учёных, врачей и представителей индустрии, обмена идеями и эффективного сотрудничества.

В программе

- пленарные и секционные выступления,
- конкурс молодых учёных,
- конкурс постерных докладов,
- панельная дискуссия «От предсказания лекарств с помощью искусственного интеллекта, точного редактирования генома до клеточной и генной терапии».

Для всех желающих познакомиться с армянскими традициями оргкомитет готовит интересную культурную программу.

Приглашаем постоянных и новых участников: учёных, врачей, студентов и представителей бизнеса.

Информационный сайт конгресса: <https://crispr2025.rau.am/>



Сетевое издание

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

doi 10.18699/vjgb-25-01

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

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

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

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

Д.А. Афонников – д-р биол. наук, доцент (Россия)

Л.И. Афтanas – 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. Рогозин – канд. биол. наук (США)

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

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Online edition

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

doi 10.18699/vjgb-25-01

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief*A.V. Kochetov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Deputy Editor-in-Chief***N.A. Kolchanov*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia*I.N. Leonova*, Dr. Sci. (Biology), Russia*N.B. Rubtsov*, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia*V.K. Shumny*, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia**Executive Secretary***G.V. Orlova*, Cand. Sci. (Biology), Russia**Editorial board***O.S. Afanasenko*, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia*D.A. Afonnikov*, Associate Professor, Dr. 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. Bepalova*, 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. Puzryev*, 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*, Full 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

- 7 **ОБЗОР**
Белки теплового шока в фолдинге и реактивации белков. Д. Малькеева, Е.В. Киселева, С.А. Фёдорова
- 15 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Создание и характеристика семи линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант с.1087G>T гена *LGR4*. В.С. Подвысоцкая, Е.В. Григорьева, А.А. Малахова, Ю.М. Минина, Ю.В. Вяткин, Е.А. Хабарова, Дж.А. Рзаев, С.П. Медведев, Л.В. Коваленко, С.М. Закиян
- 26 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Изучение конкатенации баркодированных трансгенов, линеаризованных Cas9. А.В. Смирнов, А.Н. Кораблев, И.А. Серова, А.М. Юнусова, А.А. Муравьёва, Е.С. Валеев, Н.Р. Баттулин (на англ. языке)

Генетика и селекция растений

- 35 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Взаимосвязи основных признаков качества семян люпина узколистного из коллекции ВИР. Т.В. Шеленга, А.В. Саликова, В.С. Попов, Г.П. Егорова, Л.Л. Малышев, М.А. Вишнякова
- 44 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Анализ сходств и различий образцов *Prunus domestica* L. и *P. insititia* L. по размерам эндокарпия и вариациям формы. Т. Милошевич, Н. Милошевич (на англ. языке)
- 55 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Циркадные колебания содержания растворимых сахаров и экспрессии генов инвертаз *TAI*, *LIN6* и транспортера сахаров *STP1* в листьях растения томата (*Solanum lycopersicum* L.). М.А. Филюшин, А.В. Щенникова, Е.З. Кочиева
- 61 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Разнообразие нута, обусловленное полиморфизмом вставок транспозонов. В.А. Станин, М.А. Дук, А.А. Канапин, А.А. Самсонова, С.Ю. Суркова, М.Г. Самсонова

Симбиотические системы

- 72 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Оценка биоразнообразия грибов арбускулярной микоризы при восстановительной сукцессии на песчаных карьерах. А.А. Крюков, А.П. Юрков, А.О. Горбунова, Т.Р. Кудряшова, А.И. Горенкова, Ю.В. Косульников, Ю.В. Лактионов
- 79 **ОБЗОР**
Симбиоз внутриклеточных бактерий *Wolbachia* с насекомыми: некоторые итоги ста лет изучения. О.Д. Шишкина, Н.Е. Грунтенко

Генетика животных

- 92 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Ось «печень-мозг» при хронической инфекции *Opisthorchis felineus* в сочетании с длительной алкоголизацией мышей. Д.Ф. Августиневич, И.В. Чадаева, А.В. Кизименко, А.В. Ковнер, Д.В. Базовкина, Д.В. Пономарёв, В.И. Евсеенко, В.А. Напримеров, М.Н. Львова (на англ. языке)
- 108 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Наименьшее число хромосом в семействе Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea): кариотип и другие генетические особенности *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875). В.Е. Гохман, А.С. Рябинин, Р.А. Быков, Ю.Ю. Илинский (на англ. языке)
- 113 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Генетическая характеристика лошадей местных пород по локусам микросателлитов ДНК. Н.В. Блохина, Л.А. Храброва
- 122 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Ассоциация двух миссенс-мутаций в генах *MSS51* и *KAT6B* с массой тела в разном возрасте у коров ярославской породы. А.В. Игошин, Н.С. Юдин, Д.М. Ларкин

Медицинская генетика

- 128 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Особенности полиморфизма генов толл-лайн рецепторов (*TLR-2*, *TLR-3*, *TLR-4* и *TLR-6*) при открытоугольной глаукоме. *А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, В.И. Коненков, В.В. Черных, А.Н. Трунов*
- 135 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Роль полиморфизма гена *SELE* при инфаркте миокарда с подъемом сегмента ST. *Н.П. Бабушкина, А.М. Николаева, А.Д. Долбня, В.Е. Шаврак, В.В. Рябов*
- 144 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Сравнительный анализ гаплотипов, несущих патогенные варианты с.1545T>G, с.2027T>A и с.919-2A>G гена *SLC26A4*, у пациентов с потерей слуха из Республики Тыва (Южная Сибирь). *В.Ю. Данильченко, М.В. Зыцарь, Е.А. Панина, К.Е. Орищенко, О.Л. Посух*

Биомедицина

- 153 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
База знаний MiceDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам мыши как модельного объекта биомедицинских исследований. *О.А. Подколотная, И.В. Чадаева, С.В. Филонов, Н.Л. Подколотный, Д.А. Рассказов, Н.Н. Твердохлеб, К.А. Золотарева, А.Г. Богомолов, Е.Ю. Кондратюк, Д.Ю. Ощепков, М.П. Пономаренко*
- 162 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Компьютерная реконструкция и анализ генных сетей, контролирующих уровень тревожности у лабораторных мышей и человека. *Е.Г. Вергунов, В.А. Савостьянов, А.А. Макарова, Е.И. Николаева, А.Н. Савостьянов*

Molecular and cell biology

- 7 **REVIEW**
Heat shock proteins in protein folding and reactivation. *D. Malkeyeva, E.V. Kiseleva, S.A. Fedorova*
- 15 **ORIGINAL ARTICLE**
Generation and characterisation of seven induced pluripotent stem cell lines from two patients with Parkinson's disease carrying the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene. *V.S. Podvysotskaya, E.V. Grigor'eva, A.A. Malakhova, J.M. Minina, Y.V. Vyatkin, E.A. Khabarova, J.A. Rzaev, S.P. Medvedev, L.V. Kovalenko, S.M. Zakian*
- 26 **ORIGINAL ARTICLE**
Studying concatenation of the Cas9-cleaved transgenes using barcodes. *A.V. Smirnov, A.N. Korablev, I.A. Serova, A.M. Yunusova, A.A. Muravyova, E.S. Valeev, N.R. Battulin*

Plant genetics and breeding

- 35 **ORIGINAL ARTICLE**
Interrelations between the main seed quality characteristics of narrowleaf lupine from the VIR collection. *T.V. Shelenga, A.V. Salikova, V.S. Popov, G.P. Egorova, L.L. Malyshev, M.A. Vishnyakova*
- 44 **ORIGINAL ARTICLE**
Analysis of similarities and differences of accessions belonging to *Prunus domestica* L. and *P. insititia* L. using endocarp dimensions and shape variations. *T. Milošević, N. Milošević*
- 55 **ORIGINAL ARTICLE**
Diurnal fluctuations in the content of soluble sugars and the expression of the *TAI* and *LIN6* invertase genes and the *STP1* sugar transporter gene in the leaves of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *M.A. Filyushin, A.V. Shchennikova, E.Z. Kochieva*
- 61 **ORIGINAL ARTICLE**
Chickpea diversity driven by transposon insertion polymorphism. *V.A. Stanin, M.A. Duk, A.A. Kanapin, A.A. Samsonova, S.Yu. Surkova, M.G. Samsonova*

Symbiotic systems

- 72 **ORIGINAL ARTICLE**
Evaluation of the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi during regenerative succession in quarries. *A.A. Kryukov, A.P. Yurkov, A.O. Gorbunova, T.R. Kudriashova, A.I. Gorenkova, Y.V. Kosulnikov, Y.V. Laktionov*
- 79 **REVIEW**
Symbiosis of intracellular bacteria *Wolbachia* with insects: a hundred years of study summarized. *O.D. Shishkina, N.E. Gruntenko*

Animal genetics

- 92 **ORIGINAL ARTICLE**
The liver-brain axis under the influence of chronic *Opisthorchis felineus* infection combined with prolonged alcoholization in mice. *D.F. Avgustinovich, I.V. Chadaeva, A.V. Kizimenko, A.V. Kovner, D.V. Bazovkina, D.V. Ponomarev, V.I. Evseenko, V.A. Naprimerov, M.N. Lvova*
- 108 **ORIGINAL ARTICLE**
The lowest chromosome number in the family Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea): the karyotype and other genetic features of *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875). *V.E. Gokhman, A.S. Ryabinin, R.A. Bykov, Yu.Yu. Ilinsky*
- 113 **ORIGINAL ARTICLE**
Genetic characteristics of local horse breeds by microsatellite DNA loci. *N.V. Blohina, L.A. Khrabrova*
- 122 **ORIGINAL ARTICLE**
Association of two missense mutations in the *MSS51* and *KAT6B* genes with body weight at different ages in cows of the Yaroslavl breed. *A.V. Igoshin, N.S. Yudin, D.M. Larkin*

Medical genetics

- 128 **ORIGINAL ARTICLE**
Features of toll-like receptor genes (*TLR-2*, *TLR-3*, *TLR-4* and *TLR-6*) polymorphism in open-angle glaucoma patients. *A.V. Shevchenko, V.F. Prokofiev, V.I. Konenkov, V.V. Chernykh, A.N. Trunov*
- 135 **ORIGINAL ARTICLE**
The role of *SELE* gene polymorphism in ST-elevation myocardial infarction. *N.P. Babushkina, A.M. Nikolaeva, A.D. Dolbnya, V.E. Shavrak, V.V. Ryabov*
- 144 **ORIGINAL ARTICLE**
Comparative analysis of haplotypes carrying pathogenic variants c.1545T>G, c.2027T>A and c.919-2A>G of the *SLC26A4* gene in patients with hearing loss from the Tyva Republic (Southern Siberia). *V.Yu. Danilchenko, M.V. Zytsar, E.A. Panina, K.E. Orishchenko, O.L. Posukh*

Biomedicine

- 153 **ORIGINAL ARTICLE**
MiceDEGdb: a knowledge base on differentially expressed mouse genes as a model object in biomedical research. *O.A. Podkolodnaya, I.V. Chadaeva, S.V. Filonov, N.L. Podkolodnyy, D.A. Rasskazov, N.N. Tverdokhleby, K.A. Zolotareva, A.G. Bogomolov, E.Yu. Kondratyuk, D.Yu. Oshchepkov, M.P. Ponomarenko*
- 162 **ORIGINAL ARTICLE**
Computer reconstruction of gene networks controlling anxiety levels in humans and laboratory mice. *E.G. Vergunov, V.A. Savostyanov, A.A. Makarova, E.I. Nikolaeva, A.N. Savostyanov*

doi 10.18699/vjgb-25-02

Белки теплового шока в фолдинге и реактивации белков

Д. Малькеева ¹, Е.В. Киселева ¹, С.А. Фёдорова  ^{1, 2}¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия fsveta@bionet.nsc.ru

Аннотация. В процессе жизнедеятельности в каждой клетке происходят синтез новых белков и удаление старых, денатурированных белков и нерастворимых белковых агрегатов. В поддержании протеостаза значительную роль играют шапероны, которые участвуют в придании правильной конформации (фолдинге) многих белков и способствуют деградации денатурированных или неправильно свернутых белков посредством протеаз или аутофагии. Несмотря на то что фолдинг белков – довольно точный процесс, с возрастом и под воздействием стресса накапливаются ошибки, приводящие к образованию нерастворимых белковых агрегатов, которые могут вызывать различные патологии. Воздействие стрессовых факторов, таких как повышенная температура и изменение кислотности среды, также может способствовать изменению нативной конформации белков, в результате чего они могут не только терять выполняемые в норме функции, но и приобретать новые цитотоксические свойства. В связи с увеличением средней продолжительности жизни человека в мире отмечается рост протеинопатий – заболеваний, связанных с нарушением протеостаза, к которым относятся, например, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона; поэтому выявление механизмов, препятствующих накоплению и способствующих удалению цитотоксичных агрегатов, стало актуальной задачей. Белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) – молекулярные шапероны, принимающие участие как в придании правильной конформации вновь синтезированному белкам, так и в рефолдинге денатурированных белков с их последующей реактивацией. HSP разнообразны по структуре и выполняемым функциям и встречаются у всех изученных про- и эукариотических организмов. HSP синтезируются в клетке постоянно. Выработка множества из них многократно усиливается при стрессах, включая тепловой (за что они и получили свое название) и метаболический стресс, возникающий из-за повышения количества неправильно свернутых белков. В настоящем обзоре описаны механизмы действия и функции представителей пяти семейств HSP в фолдинге и реактивации белков.

Ключевые слова: белки теплового шока; молекулярные шапероны; фолдинг белков; контроль качества белков; HSP.

Для цитирования: Малькеева Д., Киселева Е.В., Фёдорова С.А. Белки теплового шока в фолдинге и реактивации белков. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):7-14. doi 10.18699/vjgb-25-02

Финансирование. Работа Киселевой Е.В. и Фёдоровой С.А. поддержана программой фундаментальных научных исследований по проекту № FWNR-2022-0015.

Heat shock proteins in protein folding and reactivation

D. Malkeyeva ¹, E.V. Kiseleva ¹, S.A. Fedorova  ^{1, 2}¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia fsveta@bionet.nsc.ru

Abstract. Throughout their lives, cells synthesise new and dispose of the old, denatured proteins and insoluble protein aggregates. An important role in maintaining proteostasis is played by chaperones, which fold various proteins and promote degradation of denatured or misfolded proteins via proteasomes or autophagy. Despite protein folding being an accurate process, as organisms age and experience stress, errors accumulate, which leads to the formation of protein aggregates that can result in pathological changes. In addition, stress factors such as elevated temperature and altered pH can promote protein denaturation that can result in the proteins not only losing their native functions, but also gaining novel cytotoxic properties. With the increase of human average lifespan, more and more cases of proteinopathies – diseases caused by disruptions in proteostasis, e.g. Alzheimer’s disease, Huntington’s disease etc. – emerge. Therefore, identification of mechanisms preventing the formation of cytotoxic protein aggregates and promoting their clearance is of high importance. Heat shock proteins (HSPs) are the molecular chaperones involved in folding nascent proteins and refolding the denatured ones, leading to their reactivation. Heat shock proteins vary in structure and functions and are found in all prokaryotes and eukaryotes discovered to date. HSPs are constantly synthesised in cells under normal

conditions, and a multitude of them are dramatically up-regulated during stress, which includes heat shock (which earned them their name) and metabolic stress caused by the increased numbers of misfolded proteins. In this review, we describe mechanisms of action and functions of members of five heat shock protein families.

Key words: heat shock proteins; molecular chaperones; protein folding; protein quality control; HSP.

For citation: Malkeyeva D., Kiseleva E.V., Fedorova S.A. Heat shock proteins in protein folding and reactivation. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):7-14. doi 10.18699/vjgb-25-02

Введение

Белки теплового шока (молекулярные шапероны, heat shock proteins, HSP) – класс консервативных белков, основной функцией которых является контроль качества белков в клетках (van Leeuwen, Kampinga, 2018). Белки теплового шока были обнаружены у всех изученных про- и эукариот (Lindquist, 1986). Синтез множества представителей HSP осуществляется в нормальных условиях и усиливается в ответ на воздействие различных стрессоров, таких как повышенная и пониженная температура, гипоксия, окислительный стресс и присутствие инфекционных агентов (Sørensen et al., 2003; Kampinga et al., 2009; Sarkar et al., 2011). В нормальных условиях HSP обеспечивают правильную конформацию новосинтезированных пептидов, выполняя функцию «молекулярных шаперонов» (Ellis, 1987; Feder, Hofmann, 1999). Влияние неблагоприятных факторов среды проявляется на субклеточном уровне в изменении окислительно-восстановительного и водно-баланса, что приводит к нарушению конформации белков (Jolly, Morimoto, 2000). Неправильно свернутые белки способны приобретать несвойственные им вредные для клетки функции и имеют тенденцию к формированию нерастворимых агрегатов (Jolly, Morimoto, 2000). Усиление синтеза белков теплового шока позволяет клеткам поддерживать гомеостаз за счет того, что молекулярные шапероны придают нативную конформацию поврежденным белкам, предотвращают их агрегацию и разрушают уже сформировавшиеся белковые агрегаты (Jolly, Morimoto, 2000). Мутации в ряде HSP у человека приводят к развитию миопатий, нейропатий, заболеваний хрусталика глаза и сетчатки (Macario et al., 2005; Kakkar et al., 2014).

На основании структуры и выполняемых функций белки теплового шока разделяют на пять основных семейств, названия которых отражают массу шаперонов (в кДа): Hsp100 (или Hsp110), Hsp90, Hsp70, Hsp60 и малые HSP с массой до 43 кДа (Sarkar et al., 2011; Bar-Lavan et al., 2016). Работе HSP помогают кошапероны Hsp40, Hsp10 и NEF, иногда выделяемые в отдельные семейства. Для семейств HSP человека в 2009 г. профессором Н.Н. Kampinga с сотрудниками была предложена стандартная номенклатура: HSPH (Hsp110), HSPC (Hsp90), HSPA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), HSPB (малые HSP), и для семейства шаперонинов: HSPD/E (HSP60/HSP10) и CCT (TRiC) (Kampinga et al., 2009).

Семейство Hsp100

К белкам семейства Hsp100 (Clp у бактерий, HSPH у человека) относятся шапероны с молекулярной массой около 100–110 кДа, обладающие протеолитической активностью и способные разрушать белковые агрегаты (Sarkar et al., 2011; Mogk et al., 2015). Шапероны этого семейства широко распространены у прокариот, присутствуют у

одноклеточных эукариот (к примеру, Hsp104 и Hsp78 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*), у многоклеточных организмов обнаруживаются только в митохондриях (Sarkar et al., 2011). Hsp100 принадлежат к суперсемейству белков AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) и обладают характерным доменом AAA длиной около 230 аминокислот, имеющим мотивы Walker A, Walker B, sensor-1 и sensor-2, необходимые для связывания и гидролиза нуклеотидов, а также для олигомеризации пептидов Hsp100 с образованием кольцеобразных структур (Mogk et al., 2015; Mokry et al., 2015). На основании количества доменов AAA шапероны семейства Hsp100 относят к одному из двух классов: первому (с двумя нуклеотид-связывающими доменами) или второму (с одним доменом AAA) (Hodson et al., 2012; Mokry et al., 2015). К первому классу относятся, например, ClpA, ClpB (Hsp104) и ClpC, ко второму – ClpX и HslU (Hodson et al., 2012).

У всех представителей семейства Hsp100 присутствует N-концевой домен, обеспечивающий их связывание с белковыми агрегатами (Mokry et al., 2015). У некоторых шаперонов Hsp100 присутствует M-домен, расположенный внутри первого нуклеотид-связывающего домена. Подвижные M-домены обращены наружу кольца Hsp100 и играют важную роль во взаимодействии с субстратом и реактивации агрегированных белков (Mokry et al., 2015). В присутствии АТФ Hsp100 объединяются в кольцеобразные гомогексамеры с центральной порой диаметром около 15 Å, через которую протягивается разворачиваемый субстрат – белок, находящийся в составе агрегата (Hodson et al., 2012; Duran et al., 2017). Внутри канала обращены содержащие тирозин петли, связывающие гидрофобные участки агрегированных белков и проталкивающие субстрат сквозь пору в результате последовательного гребущего движения за счет гидролиза АТФ (Saibil, 2013). Субстрат вовлекается в пору Hsp100 не свободным концом, а петлей, так как внутренние сегменты агрегированных белков легче захватываются этими шаперонами (Avellaneda et al., 2020). Втягивание белка-субстрата в пору свободным концом, тем не менее, также возможно (Avellaneda et al., 2020).

Некоторые представители семейства Hsp100 ассоциированы с протеазами и по мере вытягивания субстрата из белкового агрегата транслоцируют его в протеазы для деградации (Hodson et al., 2012). К примеру, ClpA, ClpC и ClpX бактерий ассоциированы с протеазой ClpP, а шаперон HslU (ClpY) – с протеазой HslV (ClpQ) (Hodson et al., 2012). Шапероны ClpB бактерий, Hsp78 и Hsp104 дрожжей *S. cerevisiae* и Hsp101 растений не имеют связанных с ними протеаз и, таким образом, реактивируют агрегированные белки (Hodson et al., 2012).

Шапероны Hsp100 способны разрушать белковые агрегаты самостоятельно, однако эффективность их работы

значительно возрастает в присутствии системы шаперонов Hsp70/Hsp40/NEF (Mokry et al., 2015). Белки Hsp104 и ClpB практически не способны распознавать субстрат в отсутствие Hsp70 (Mogk et al., 2015). Шапероны Hsp70 присоединяются к пептидам в составе агрегатов и напрямую связываются с М-доменами Hsp100, предоставляя им субстрат, который продвигается в центральный канал Hsp100 и разворачивается (Mogk et al., 2015).

Семейство Hsp90

Белки семейства Hsp90 (HtpG у бактерий, HSPC у человека) являются одними из самых распространенных шаперонов, составляющих до 1–2 % от всех белков в клетках эукариот (Sarkar et al., 2011; Li, Buchner, 2013). Помимо фолдинга денатурированных белков, шапероны Hsp90 обеспечивают созревание множества новосинтезированных пептидов (Bar-Lavan et al., 2016). У бактерий имеется принадлежащий этому семейству белок, названный у *Escherichia coli* HtpG. У архей гены, кодирующие белки Hsp90, обнаружены не были (Li, Buchner, 2013). У дрожжей описаны два представителя семейства – Hsc82 и Hsp82, которые локализованы в цитозоле (Li, Buchner, 2013). В хлоропластах растений расположен ch-Hsp90 (Li, Buchner, 2013). Для плодовой мушки *Drosophila melanogaster* известен только один представитель семейства – Hsp83, ген которого является единственным среди генов HSP дрозофилы, в котором содержится интрон (Sarkar et al., 2011). У млекопитающих присутствуют четыре представителя Hsp90, из которых две изоформы Hsp90 (Hsp90 α и Hsp90 β) функционируют в цитозоле, Grp94 – в эндоплазматической сети, а Trap-1 – в митохондриях (Sarkar et al., 2011; Li, Buchner, 2013).

Hsp90 состоит из трех доменов: крайне консервативного N-концевого, который содержит АТФ-связывающий сайт и заряженный петлевой сегмент, М-домена, необходимого для связывания субстрата и регуляции гидролиза АТФ, и С-концевого, посредством которого осуществляется димеризация Hsp90 и взаимодействие с некоторыми кошаперонами (Bar-Lavan et al., 2016). В не связанном с АТФ состоянии гомодимер Hsp90 представляет собой V-образную структуру, называемую «открытой конформацией» (Li, Buchner, 2013). Связывание АТФ приводит к изменению ориентации доменов N и M и постепенному переходу гомодимера к «закрытой конформации» с димеризованными N-доменами (Li, Buchner, 2013). После гидролиза АТФ N-домены диссоциируют, и Hsp90 возвращается к «открытой конформации» (Li, Buchner, 2013). Переход между конформациями определяется взаимодействием с белками-клиентами и многочисленными кошаперонами Hsp90 (Li, Buchner, 2013; Bar-Lavan et al., 2016). Взаимодействие Hsp90 с кошаперонами и белком-субстратом происходит в «открытой конформации»; в процессе перехода гомодимера Hsp90 в «закрытую конформацию» происходит фолдинг субстрата; затем АДФ, фосфат, субстрат и кошапероны отсоединяются от Hsp90, и шаперон вновь приобретает «открытую конформацию» (Li, Buchner, 2013).

Регуляция кошаперонами является консервативной чертой системы Hsp90 эукариот. Сейчас известно более 20 кошаперонов Hsp90 (Li, Buchner, 2013). Они регули-

руют функционирование Hsp90 путем ингибирования и активации их АТФ-азной активности и привлечения специфических белков-клиентов. При этом различные кошапероны взаимодействуют друг с другом для облегчения созревания субстратов, и состав кошаперонных комплексов зависит от типа белка-клиента (Li, Buchner, 2013).

Функционально Hsp90 более специализированы по сравнению с другими белками теплового шока. Совместно со своими кошаперонами белки Hsp90 играют важную роль в фолдинге по крайней мере 200 различных пептидов в нормальных условиях, а также в рефолдинге денатурированных после стрессового воздействия белков (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013). К субстратам шаперонов семейства Hsp90 относятся сигнальные белки, участвующие в регуляции клеточного деления, киназы, рецепторы стероидных гормонов и супрессор опухолей p53 (Saibil, 2013).

Семейство Hsp70

Представители семейства Hsp70 (DnaK у прокариот, HSPA у человека) имеют молекулярную массу около 70 кДа и являются самыми консервативными из белков теплового шока. Последовательность их аминокислот совпадает приблизительно на 50 % у всех охарактеризованных видов живых организмов (Sarkar et al., 2011; Bar-Lavan et al., 2016). Отличительная черта их генов – наличие множества копий у большинства изученных видов (Sarkar et al., 2011). Так, у дрожжей *S. cerevisiae* присутствует 14 копий *Hsp70* (Sarkar et al., 2011); у *D. melanogaster* – 6 практически идентичных стресс-индуцируемых генов *Hsp70*, стресс-индуцируемый ген *Hsp68* и несколько экспрессирующихся на постоянной основе генов *Hsc70* (Heat shock cognate 70) (Tower, 2011; Xiao et al., 2019). У человека обнаружено 17 генов и 30 псевдогенов, кодирующих шапероны Hsp70, некоторые из которых имеют гомологию последовательностей до 90 % (Brocchieri et al., 2008; Radons, 2016).

У архей и эубактерий белки Hsp70 располагаются в цитозоле, у эукариот – в ядре, цитоплазме, митохондриях, хлоропластах и эндоплазматической сети (Sarkar et al., 2011; Rosenzweig et al., 2019). К их функциям относятся фолдинг полипептидов и высвобождение белков из агрегатов, поддержание склонных к агрегации белков в развернутом виде и участие в транслокации белков через мембраны органелл (Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016).

Шапероны Hsp70 состоят из консервативного N-концевого нуклеотид-связывающего домена массой около 44 кДа и менее консервативного субстрат-связывающего домена массой около 30 кДа, соединенных коротким консервативным гидрофобным линкером (Sarkar et al., 2011; Bar-Lavan et al., 2016; Larburu et al., 2020). Неструктурированный С-концевой участок Hsp70 имеет варьирующую длину. У расположенных в ядре и цитоплазме эукариот шаперонов Hsp70 этот участок часто содержит отрицательно заряженный мотив Glu-Glu-Val-Asp, который взаимодействует со специфическими кофакторами, включая кошапероны Hsp40 (Rosenzweig et al., 2019). Нуклеотид-связывающий домен состоит из четырех субдоменов, формирующих две доли с глубокой щелью между ними, в которой расположен каталитический центр, связывающий АТФ (Rosenzweig et al., 2019). Субстрат-связываю-

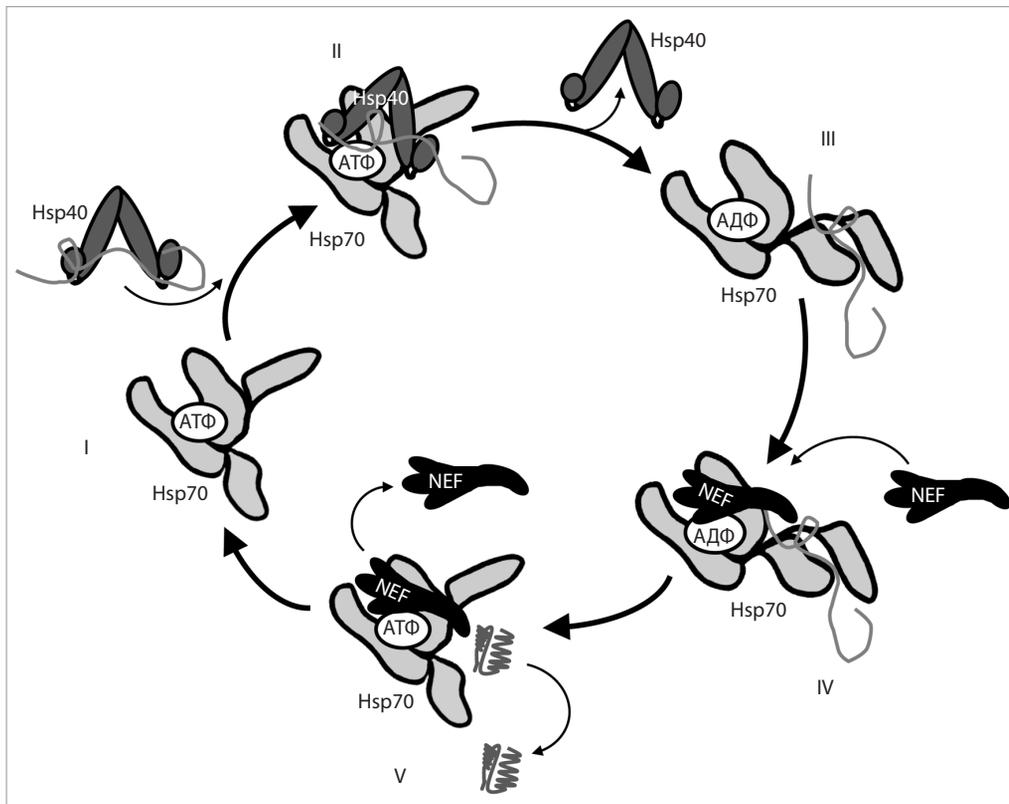


Рис. 1. Реакционный цикл шаперона Hsp70.

I – в присутствии АТФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70 белок-связывающий карман шаперона открыт и способен взаимодействовать с неправильно свернутыми белками. II – кошаперон Hsp40 подает белок-субстрат и способствует гидролизу АТФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70. III – гидролиз АТФ приводит к изменению конформации Hsp70, в результате чего субъединицы субстрат-связывающего домена отделяются от нуклеотид-связывающего домена и закрываются, зажимая белок-субстрат. IV – кошаперон NEF обменивает АДФ в нуклеотид-связывающем домене Hsp70 на АТФ. V – белок-связывающий карман Hsp70 открывается, высвобождая ренатурированный субстрат.

щий домен включает два субдомена – α и β (Larburu et al., 2020). Субдомен β состоит из β -складок и содержит гидрофобный карман, связывающий белки-субстраты. Субдомен α представлен α -спиралями и служит «крышкой», закрывающей белок-связывающий карман (Larburu et al., 2020).

Связывание и высвобождение субстрата регулируется присоединением и гидролизом АТФ, а скорость – кошаперонами Hsp40 (DnaJ у прокариот) и NEF (nucleotide exchange factor; GrpE у бактерий) (Saibil, 2013; Larburu et al., 2020). Реакционный цикл шаперона Hsp70 и его кошаперонов представлен на рис. 1. Присоединение молекулы АТФ к каталитическому центру нуклеотид-связывающего домена Hsp70 вызывает вращение долей нуклеотид-связывающего домена, в результате которого междоменный линкер и субдомены субстрат-связывающего домена прикрепляются к нуклеотид-связывающему домену, открывая карман для белка-субстрата (Rosenzweig et al., 2019). Субстрат-связывающий домен взаимодействует с коротким мотивом белка-субстрата, содержащим пять гидрофобных аминокислотных остатков, фланкированных заряженными аминокислотными остатками (Larburu et al., 2020). Этот мотив присутствует почти у всех белков, что обеспечивает гибкость в выборе субстрата шаперонами Hsp70 (Larburu et al., 2020).

Присоединение белка-субстрата вызывает гидролиз АТФ, в результате чего междоменный линкер и субдомены субстрат-связывающего домена отсоединяются от нуклеотид-связывающего домена, а субдомен α субстрат-связывающего домена закрывает субстрат-связывающий карман, запирая в нем белок-клиент (Rosenzweig et al., 2019; Larburu et al., 2020). Обычно гидролиз АТФ в каталитическом центре Hsp70 происходит со скоростью 1 молекула в 20–30 мин, однако присоединение к Hsp70 кошаперона Hsp40 вместе с субстратом ускоряет этот процесс более чем в 1000 раз (Bar-Lavan et al., 2016; Larburu et al., 2020). Замену АДФ на АТФ катализирует кошаперон NEF (Bar-Lavan et al., 2016). Этот процесс приводит к открыванию кармана с субстратом и его высвобождению (см. рис. 1) (Larburu et al., 2020).

Существуют разные гипотезы о том, как Hsp70 осуществляет фолдинг белков. В некоторых моделях связывание шаперонами Hsp70 гидрофобных участков денатурированных белков защищает их от агрегации, и в последующем освобожденный субстрат самостоятельно принимает правильную конформацию (Bar-Lavan et al., 2016). Другие модели предполагают, что «зажимание» денатурированных белков в субстрат-связывающем кармане одного или нескольких Hsp70 способствует их разворачиванию (Bar-Lavan et al., 2016). Поскольку шапероны Hsp70 не только

предотвращают агрегацию и способствуют фолдингу полипептидов, но и реактивируют агрегированные белки, более правдоподобными могут быть модели, указывающие главной функцией Hsp70 разворачивание белков (Bar-Lavan et al., 2016).

Семейство Hsp60

Белки семейства Hsp60 (GroEL у эубактерий, HSPD у человека), также называемые шаперонинами (Hemmingsen, 1992), необходимы большинству организмов не только при воздействии стресса, но и в нормальных условиях (Sarkar et al., 2011; Fan et al., 2020). В отличие от шаперонов Hsp70 и Hsp100, в основном исправляющих конформацию денатурированных белков и разрушающих белковые агрегаты, Hsp60 в первую очередь задействованы на ранних этапах фолдинга пептидов (Saibil, 2013). Известно, что около 30 % всех новосинтезированных пептидов *E. coli* приобретают правильную конформацию благодаря GroEL (Komoto et al., 2001).

Последовательность ДНК шаперонинов Hsp60 крайне консервативна, что позволяет использовать ее для филогенетического анализа и идентификации организмов (Sarkar et al., 2011). На основании схожести последовательностей генов Hsp60 и строения шаперонины делят на две группы (Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016). К группе I относят GroEL бактерий и его кошаперон GroES, Hsp60 митохондрий и его кошаперон Hsp10, Cpn60 хлоропластов с кошапероном Cpn20 (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013; Zhang et al., 2016). Группа II включает термосому архей и цитоплазматический белок CCT (chaperonin-containing TCP1, также известный как TriC) эукариот (Saibil, 2013). Шаперонины представляют собой симметричные структуры из двух колец, состоящих из 7 (группа I) или 8–9 (группа II) мономеров массой около 60 кДа (Lopez et al., 2015). Мономеры Hsp60 обеих групп имеют три домена: апикальный, экваториальный и промежуточный. Экваториальный домен содержит АТФ-связывающие сайты и участки, необходимые для взаимодействия колец; апикальный обеспечивает связывание субстрата, а у шаперонинов группы I – также взаимодействие с кошаперонами Hsp10 (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016).

Кошапероны Hsp10 представляют собой гомогептамеры, состоящие из субъединиц массой около 10 кДа, которые присоединяются к кольцам шаперонинов группы I, закрывая их полости подобно крышке (Saibil, 2013). Функцию кошаперонов Hsp10 у шаперонинов группы II выполняет дополнительный участок апикального домена (Saibil, 2013). Промежуточный домен мономеров Hsp60 связывает между собой апикальный и экваториальный домены и изменяет конформацию при связывании АТФ, что способствует переключению между «открытым» состоянием, при котором внутренняя поверхность полости образованной кольцом Hsp60, гидрофобна, и «закрытым», при котором внутренняя поверхность гидрофильна (Sarkar et al., 2011; Saibil, 2013; Bar-Lavan et al., 2016).

Реакционный цикл шаперонинов группы I GroEL/GroES описан на рис. 2. Цикл фолдинга белков шаперонинами группы II происходит по схожей схеме, за следующими исключениями: закрытие камеры Hsp60 осуществляется не

кошапероном, а дополнительными участками апикальных доменов мономеров Hsp60 в результате гидролиза АТФ; кольца шаперонинов группы II меняют состояние между «открытым» и «закрытым» синхронно, а не последовательно (Kumar et al., 2015; Lopez et al., 2015).

Субстратами Hsp60 являются пептиды молекулярной массой от 35 до 60 кДа. Максимальный размер субстрата определяется объемом полости колец Hsp60, который у GroEL составляет $\sim 175\,000 \text{ \AA}^3$ (Bar-Lavan et al., 2016). Шаперонины производят фолдинг важнейших для клеток белков, таких как актин и тубулин эукариот и субъединица RbcL фермента RuBisCO, являющегося участником цикла Кальвина (Sarkar et al., 2011; Hayer-Hartl, 2017).

Семейство малых HSP

Малые белки теплового шока (HSPB у человека) имеют массу от 12 до 43 кДа (Sarkar et al., 2011). У эукариот они встречаются в цитоплазме, ядре, митохондриях, хлоропластах и пероксисомах. Прокариоты и одноклеточные эукариоты обычно имеют один или два цитозольных малых HSP, однако у некоторых бактерий их может быть несколько. К примеру, у бактерий рода *Bradyrhizobium* может насчитываться до 8 генов малых HSP (Mogk et al., 2019). У многоклеточных эукариот количество генов, кодирующих малые HSP, варьирует от 10 у человека до 50 у высших растений (Mogk et al., 2019).

В отличие от представителей других семейств, малые белки теплового шока не обладают способностью к рефолдингу денатурированных и агрегированных белков и не осуществляют гидролиз АТФ при выполнении своих функций, основная из которых – предотвращение агрегации несвернутых и денатурированных белков (Bar-Lavan et al., 2016; Mogk et al., 2019). Помимо предотвращения агрегации белков, малые HSP вовлечены в ряд ключевых физиологических процессов, таких как клеточная дифференцировка и апоптоз (Fu, 2015).

Характерным признаком представителей семейства малых белков теплового шока является наличие консервативного α -кристаллинового домена, название которого произошло от белка хрусталика глаза позвоночных – α -кристаллина (Sarkar et al., 2011; Bar-Lavan et al., 2016; Paul et al., 2016; Mogk et al., 2019). Этот домен состоит из 90–100 аминокислотных остатков, формирующих β -сэндвич, содержащий 7–8 антипараллельных β -листов (Mogk et al., 2019). α -Кристаллиновый домен малых HSP окружен менее консервативными N- и C-концевыми доменами (Mogk et al., 2019). N-концевые домены особенно разнообразны по аминокислотному составу и длине и состоят из 24–247 аминокислотных остатков (в среднем из 56) (Mogk et al., 2019). C-концевые домены состоят менее чем из 20 аминокислотных остатков (в среднем из 10) и в 90 % случаев содержат консервативный мотив Pe-X-Pe/Val (IXI/V), играющий ключевую роль в олигомеризации малых HSP (Saji et al., 2008; Mogk et al., 2019).

Полюе и сферические олигомеры малых HSP включают 12–32 протомера (Saji et al., 2008; Mogk et al., 2019). Протомеры являются димерами малых HSP, а олигомеры могут быть представлены как одним видом малых HSP, так и несколькими (Mogk et al., 2019). Димеризация малых HSP происходит за счет взаимодействия α -кри-

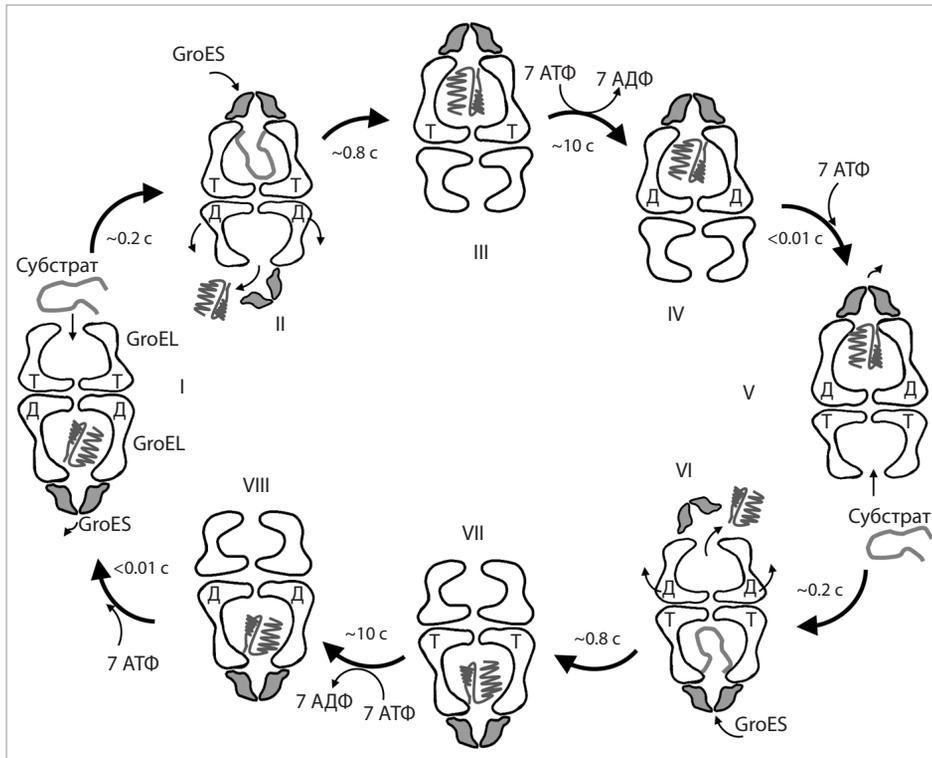


Рис. 2. Реакционный цикл Hsp60 на примере бактериального GroEL и его кошаперона GroES (гомогептамеры GroEL и GroES изображены в разрезе).

I – белок-субстрат с нарушенной конформацией взаимодействует своими гидрофобными участками с гидрофобной внутренней поверхностью апикальных доменов присоединившегося АТФ открытого кольца GroEL. II – полость GroEL очень быстро (в течение ~0.2 с (Horwich, 2011)) закрывается кошапероном GroES, и субстрат оказывается «запертым» в полости GroEL. III – присоединение GroES вызывает поворот апикальных доменов GroEL на 100° по часовой стрелке (Horwich, 2011; Clare et al., 2012), в результате которого внутренняя поверхность кольца GroEL становится гидрофильной, что способствует фолдингу субстрата. IV – приблизительно через 10 с происходит гидролиз АТФ в экваториальных доменах кольца с субстратом, что приводит к ослаблению связи между двумя кольцами, благодаря чему второе кольцо становится способным связать АТФ и начать цикл фолдинга (Horwich, 2011). V – кошаперон GroES отсоединяется от первого кольца GroEL; во втором кольце начинается цикл фолдинга нового белка-субстрата. VI – правильно свернутый (или все еще не свернутый) субстрат покидает открытую полость первого кольца; от экваториальных доменов первого кольца GroEL отсоединяются АДФ и фосфат. VII, VIII – первое кольцо не способно связывать АТФ и, соответственно, белок-субстрат, до тех пор, пока не произойдет гидролиз АТФ во втором кольце. Т – АТФ, Д – АДФ.

сталлиновых доменов, а олигомеризация – за счет элементов N- и C-концевых доменов (Mogk et al., 2019). Олигомеры малых HSP динамичны и постоянно обмениваются димерами (Żwirowski et al., 2017). Во время воздействия стрессовых факторов (например, изменения температуры, концентрации солей и pH) равновесие смещается в сторону формирования меньших олигомеров и распада на димеры, которые связываются с гидрофобными участками денатурированных белков (Żwirowski et al., 2017; Mogk et al., 2019).

Малые HSP обладают малой специфичностью и взаимодействуют с широким спектром различных белков-субстратов (Mogk et al., 2019). Связываясь с субстратами, малые HSP образуют с ними комплексы, состоящие из двух слоев: стабильного ядра, в состав которого входят малые HSP и неподвижные белки-субстраты, и динамичной оболочки из малых HSP, которые то связываются с комплексом, то отделяются от него (рис. 3) (Żwirowski et al., 2017). Размеры таких комплексов меньше, чем у сформированных денатурированными белками агрегатов, од-

нако их молекулярная масса обычно превышает 1 МДа (Żwirowski et al., 2017).

Размеры комплексов малых HSP с субстратами зависят от количественного соотношения малых HSP и белков-субстратов в них: чем выше доля малых HSP, тем меньше размеры комплексов; при достаточно высоком содержании малых HSP комплексы становятся растворимыми (Mogk et al., 2019). При небольшом содержании малых HSP субстраты формируют плотные нерастворимые комплексы, но в отличие от нерастворимых агрегатов, образованных исключительно денатурированными белками, субстраты поддерживаются в конформации, позволяющей шаперонам других семейств извлечь их из комплекса и произвести их реактивацию путем фолдинга (Mogk et al., 2019).

Реактивацию денатурированных белков, входящих в состав комплексов с малыми HSP, осуществляют шапероны Hsp70 (см. рис. 3) (Żwirowski et al., 2017). Путем конкурентного связывания субстрата Hsp70 вытесняют малые HSP из оболочки комплексов и производят фолдинг субстрата, иногда совместно с Hsp100 (Żwirowski et al., 2017).

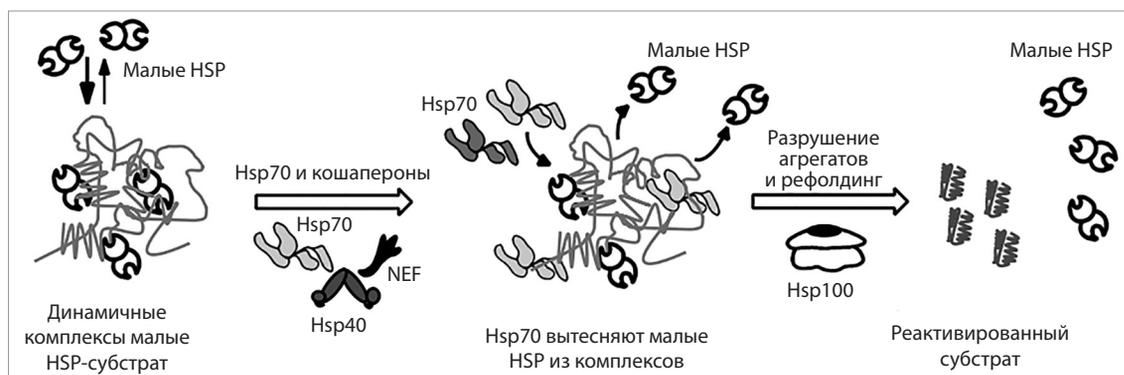


Рис. 3. Схема процесса высвобождения малых белков теплового шока из комплексов с белками-субстратами шаперонами Hsp70 и реактивации белков-субстратов шаперонами Hsp70 и Hsp100.

Комплексы малых HSP с субстратом состоят из стабильного ядра, представленного денатурированными белками и связанными с ними малыми HSP, и динамичной оболочки, на поверхности которой происходит присоединение малых HSP к комплексу и диссоциация из него (равновесие смещено в сторону присоединения). Шапероны Hsp70 вытесняют малые HSP из комплексов, высвобождая их, затем подают белки-субстраты шаперонам Hsp100, которые протягивают их через центральную пору и реактивируют.

Оболочка комплексов несет несколько важных физиологических функций: поддерживает размер и растворимость комплекса благодаря защите гидрофобных участков белков-субстратов от взаимодействия с другими денатурированными белками, предотвращая таким образом их агрегацию; образует селективный барьер, проницаемый лишь для шаперонов Hsp70; увеличивает потребность в шаперонах Hsp70 по сравнению с белковыми агрегатами (Żwirowski et al., 2017).

Таким образом, несмотря на то что малые HSP поддерживают склонные к агрегации белки в удобном для фолдинга состоянии, они замедляют реактивацию субстрата при недостаточных концентрациях Hsp70. Возможно, такой механизм действия позволяет изолировать денатурированные белки в неблагоприятных условиях, когда количество доступных шаперонов Hsp70 ограничено, к примеру при хроническом стрессе (Żwirowski et al., 2017). В то же время при низких концентрациях Hsp70 малые HSP могут способствовать формированию белковых агрегатов, так как они предотвращают убиквитинирование субстрата в комплексе и его деградацию (Mogk et al., 2019).

Заключение

Являясь молекулярными шаперонами, белки теплового шока играют центральную роль в белковом гомеостазе и жизненно необходимы для всех известных про- и эукариот. Представители разных семейств HSP выполняют различные функции: помогают придавать правильную конформацию полипептидам, предотвращают агрегацию денатурированных белков, осуществляют их рефолдинг или способствуют их деградации. Для выполнения всех этих функций молекулярные шапероны работают в tandem друг с другом и с многочисленными кошаперонами, поддерживая протеом клетки в рабочем состоянии. Таким образом, белки теплового шока служат «первой линией защиты» клеток от токсичного воздействия поврежденных и несвернутых белков как при нормальном функционировании клетки, так и при влиянии различных стрессовых факторов.

Список литературы / References

- Avellaneda M.J., Franke K.B., Sunderlikova V., Bukau B., Mogk A., Tans S.J. Processive extrusion of polypeptide loops by a Hsp100 disaggregase. *Nature*. 2020;578(7794):317-320. doi 10.1038/s41586-020-1964-y
- Bar-Lavan Y., Shemesh N., Ben-Zvi A. Chaperone families and interactions in metazoa. *Essays Biochem*. 2016;60(2):237-253. doi 10.1042/EBC20160004
- Brocchieri L., Conway de Macario E., Macario A.J. Hsp70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol Biol*. 2008;8(1):19. doi 10.1186/1471-2148-8-19
- Clare D.K., Vasishtan D., Stagg S., Quispe J., Farr G.W., Topf M., Horwich A.L., Saibil H.R. ATP-triggered conformational changes delineate substrate-binding and -folding mechanics of the GroEL chaperonin. *Cell*. 2012;149(1):113-123. doi 10.1016/j.cell.2012.02.047
- Duran E.C., Weaver C.L., Lucius A.L. Comparative analysis of the structure and function of AAA+ motors ClpA, ClpB, and Hsp104: common threads and disparate functions. *Front Mol Biosci*. 2017; 4:54. doi 10.3389/fmolb.2017.00054
- Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 1987;328(6129): 378-379. doi 10.1038/328378a0
- Fan F., Duan Y., Yang F., Trexler C., Wang H., Huang L., Li Y., Tang H., Wang G., Fang X., Liu J., Jia N., Chen J., Ouyang K. Deletion of heat shock protein 60 in adult mouse cardiomyocytes perturbs mitochondrial protein homeostasis and causes heart failure. *Cell Death Differ*. 2020;27(2):587-600. doi 10.1038/s41418-019-0374-x
- Feder M.E., Hofmann G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 1999;61(1):243-282. doi 10.1146/annurev.physiol. 61.1.243
- Fu X. Insights into how small heat shock proteins bind a great diversity of substrate proteins: a super-transformer model. In: Tanguay R.M., Hightower L.E. (Eds) *The Big Book on Small Heat Shock Proteins*. Cham: Springer Int. Pub., 2015;107-117. doi 10.1007/978-3-319-16077-1_4
- Hayer-Hartl M. From chaperonins to Rubisco assembly and metabolic repair. *Protein Sci*. 2017;26(12):2324-2333. doi 10.1002/pro.3309
- Hemmingsen S.M. What is a chaperonin? *Nature*. 1992;357(6380): 650-650. doi 10.1038/357650b0
- Hodson S., Marshall J.J.T., Burston S.G. Mapping the road to recovery: the ClpB/Hsp104 molecular chaperone. *J Struct Biol*. 2012;179(2): 161-171. doi 10.1016/j.jsb.2012.05.015
- Horwich A.L. Protein folding in the cell: an inside story. *Nat Med*. 2011;17(10):1211-1216. doi 10.1038/nm.2468

- Jolly C., Morimoto R.I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(19):1564-1572. doi 10.1093/jnci/92.19.1564
- Kakkar V., Meister-Broekema M., Minoia M., Carra S., Kampinga H.H. Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. *Dis Model Mech.* 2014;7(4):421-434. doi 10.1242/dmm.014563
- Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanguay R.M., Bruford E.A., Cheetham M.E., Chen B., Hightower L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14(1):105-111. doi 10.1007/s12192-008-0068-7
- Koumoto Y., Shimada T., Kondo M., Hara-Nishimura I., Nishimura M. Chloroplasts have a novel Cpn10 in addition to Cpn20 as co-chaperonins in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2001;276(32):29688-29694. doi 10.1074/jbc.M102330200
- Kumar C.M.S., Mande S.C., Mahajan G. Multiple chaperonins in bacteria-novel functions and non-canonical behaviors. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20(4):555-574. doi 10.1007/s12192-015-0598-8
- Larburu N., Adams C.J., Chen C.-S., Nowak P.R., Ali M.M.U. Mechanism of Hsp70 specialized interactions in protein translocation and the unfolded protein response. *Open Biol.* 2020;10(8):200089. doi 10.1098/rsob.200089
- Li J., Buchner J. Structure, function and regulation of the Hsp90 machinery. *Biomed J.* 2013;36(3):106-117. doi 10.4103/2319-4170.113230
- Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem.* 1986;55(1):1151-1191. doi 10.1146/annurev.bi.55.070186.005443
- Lopez T., Dalton K., Frydman J. The mechanism and function of group II chaperonins. *J Mol Biol.* 2015;427(18):2919-2930. doi 10.1016/j.jmb.2015.04.013
- Macario A.J.L., Grippo T.M., de Macario E.C. Genetic disorders involving molecular-chaperone genes: a perspective. *Genet Med.* 2005;7(1):3-12. doi 10.1097/01.GIM.0000151351.11876.C3
- Mogk A., Kummer E., Bukau B. Cooperation of Hsp70 and Hsp100 chaperone machines in protein disaggregation. *Front Mol Biosci.* 2015;2:22. doi 10.3389/fmolb.2015.00022
- Mogk A., Ruder-Herreros C., Bukau B. Cellular functions and mechanisms of action of small heat shock proteins. *Annu Rev Microbiol.* 2019;73(1):89-110. doi 10.1146/annurev-micro-020518-115515
- Mokry D.Z., Abrahão J., Ramos C.H.I. Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates. *An Acad Bras Cienc.* 2015;87(2 suppl):1273-1292. doi 10.1590/0001-3765201520140671
- Paul A., Rao S., Mathur S. The α -crystallin domain containing genes: identification, phylogeny and expression profiling in abiotic stress, phytohormone response and development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Front Plant Sci.* 2016;7:426. doi 10.3389/fpls.2016.00426
- Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones.* 2016;21(3):379-404. doi 10.1007/s12192-016-0676-6
- Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(11):665-680. doi 10.1038/s41580-019-0133-3
- Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(10):630-642. doi 10.1038/nrm3658
- Saji H., Iizuka R., Yoshida T., Abe T., Kidokoro S., Ishii N., Yohda M. Role of the IXI/V motif in oligomer assembly and function of StHsp14.0, a small heat shock protein from the acidothermophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Proteins Struct Funct Bioinform.* 2008;71(2):771-782. doi 10.1002/prot.21762
- Sarkar S., Singh M.D., Yadav R., Arunkumar K.P., Pittman G.W. Heat shock proteins: molecules with assorted functions. *Front Biol (Beijing).* 2011;6(4):312. doi 10.1007/s11515-011-1080-3
- Sørensen J.G., Kristensen T.N., Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett.* 2003;6(11):1025-1037. doi 10.1046/j.1461-0248.2003.00528
- Tower J. Heat shock proteins and *Drosophila* aging. *Exp Gerontol.* 2011;46(5):355-362. doi 10.1016/j.exger.2010.09.002
- van Leeuwen F.W., Kampinga H.H. Heat shock proteins and protein quality control in Alzheimer's disease. In: Wolfe M.S. (Ed.) *The Molecular and Cellular Basis of Neurodegenerative Diseases*. Academic Press, 2018;269-298. doi 10.1016/B978-0-12-811304-2.00010-9
- Xiao C., Hull D., Qiu S., Yeung J., Zheng J., Barwell T., Robertson R.M., Seroude L. Expression of heat shock protein 70 is insufficient to extend *Drosophila melanogaster* longevity. *G3 (Bethesda).* 2019;9(12):4197-4207. doi 10.1534/g3.119.400782
- Zhang S., Zhou H., Yu F., Bai C., Zhao Q., He J., Liu C. Structural insight into the cooperation of chloroplast chaperonin subunits. *BMC Biol.* 2016;14(1):29. doi 10.1186/s12915-016-0251-8
- Żwirowski S., Kłosowska A., Obuchowski I., Nillegoda N.B., Piróg A., Ziętkiewicz S., Bukau B., Mogk A., Liberek K. Hsp70 displaces small heat shock proteins from aggregates to initiate protein refolding. *EMBO J.* 2017;36(6):783-796. doi 10.15252/embj.201593378

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.07.2024. После доработки 22.09.2024. Принята к публикации 10.10.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-03

Создание и характеристика семи линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант с.1087G>T гена *LGR4*

В.С. Подвысоцкая^{1, 2} &, Е.В. Григорьева ^{1, 3} & , А.А. Малахова ^{1, 3}, Ю.М. Минина ¹, Ю.В. Вяткин⁴, Е.А. Хабарова^{1, 5}, Дж.А. Рзаев⁵, С.П. Медведев ^{1, 3}, Л.В. Коваленко ⁶, С.М. Закиян ^{1, 3}

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

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

⁴ ООО «Новые Программные Системы», Новосибирск, Россия

⁵ Федеральный центр нейрохирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

⁶ Сургутский государственный университет, Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, Россия

 evlena@bionet.nsc.ru

Аннотация. Болезнь Паркинсона – тяжелое нейродегенеративное заболевание, поражающее дофаминергические нейроны компактной части черной субстанции головного мозга. Известные патологические генетические варианты, ассоциированные с болезнью Паркинсона, объясняют причину всего 5 % случаев заболевания, поэтому исследования в этой области актуальны и активно продолжаются. В данной работе мы обнаружили двух пациентов с клиническим диагнозом «болезнь Паркинсона» с генетическим вариантом *LGR4*: с.1087G>T (p.Gly363Cys, rs117543292). Этот ген кодирует мембранный рецептор LGR4 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4), ассоциированный с G-белком, который участвует в регуляции функционирования сигнального пути WNT/β-катенин. Данный сигнальный путь необходим для пролиферации нейронов во время их дифференцировки, поэтому его дисфункция в результате гетерозиготной мутации с.1087G>T в гене *LGR4* нарушает дифференцировку дофаминергических нейронов, что может приводить к болезни Паркинсона. Идеальным инструментом для изучения связи этого генетического варианта с болезнью Паркинсона является клеточная модель на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и их дифференцированных производных – дофаминергических нейронов. В результате репрограммирования эписомными векторами, экспрессирующими белки OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и trp53DD, мононуклеарных клеток периферической крови двух пациентов с вариантом с.1087G>T гена *LGR4* нами были получены и детально охарактеризованы семь линий ИПСК. Данные ИПСК отвечают всем требованиям плюрипотентных клеток, а именно: стабильно пролиферируют, образуют колонии с характерной для плюрипотентных клеток человека морфологией, имеют нормальный диплоидный кариотип, экспрессируют щелочную фосфатазу и маркеры плюрипотентности (OCT4, NANOG, SSEA-4 и SOX2) и способны дифференцироваться в производные трех зародышевых листков – энто-, экто- и мезодерму. Полученные в работе линии ИПСК будут в дальнейшем использованы для создания релевантной модели, направленной на исследование эффекта варианта с.1087G>T гена *LGR4* на развитие патологического фенотипа дофаминергических нейронов.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; репрограммирование; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ген *LGR4*.

Для цитирования: Подвысоцкая В.С., Григорьева Е.В., Малахова А.А., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Коваленко Л.В., Закиян С.М. Создание и характеристика семи линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант с.1087G>T гена *LGR4*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):15-25. doi 10.18699/vjgb-25-03

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-573-05.

Благодарности. Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания препаратов и дифференциального окрашивания хромосом проводили с использованием ресурсов Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), поддержанного бюджетным проектом Института цитологии и генетики СО РАН (FWNR-2022-0015).

Generation and characterisation of seven induced pluripotent stem cell lines from two patients with Parkinson's disease carrying the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene

V.S. Podvysotskaya^{1, 2} &, E.V. Grigor'eva ^{1, 3} & , A.A. Malakhova ^{1, 3}, J.M. Minina ¹, Y.V. Vyatkin⁴, E.A. Khabarova^{1, 5}, J.A. Rzaev⁵, S.P. Medvedev ^{1, 3}, L.V. Kovalenko ⁶, S.M. Zakian ^{1, 3}

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

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

⁴ NOVEL Ltd., Novosibirsk, Russia

⁵ Federal Neurosurgical Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

⁶ Surgut State University, Surgut, Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Ugra, Russia

 evlena@bionet.nsc.ru

Abstract. Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder affecting dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta. The known pathological genetic variants may explain the cause of only 5 % of cases of the disease. In our study, we found two patients with a clinical diagnosis of Parkinson's disease with the genetic variant c.1087G>T (p.Gly363Cys) of the *LGR4* gene. The *LGR4* gene encodes the membrane receptor LGR4 (leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 4) associated with the G protein. We hypothesize that the *LGR4* gene may be either a direct cause or a risk factor for this disease, since it is one of the main participants of the WNT/ β -catenin signalling pathway. This signalling pathway is necessary for the proliferation of neurons during their differentiation, which may lead to Parkinson's disease. To study the relationship between this genetic variant and Parkinson's disease, an ideal tool is a cellular model based on induced pluripotent stem cells (iPSCs) and their differentiated derivatives, dopaminergic neurons. We reprogrammed the peripheral blood mononuclear cells of the two patients with the c.1087G>T variant of the *LGR4* gene with non-integrating episomal vectors expressing OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC and mp53DD proteins. The obtained seven lines of induced pluripotent stem cells were characterised in detail. The iPSCs lines obtained meet all the requirements of pluripotent cells, namely, they stably proliferate, form colonies with a morphology characteristic of human pluripotent cells, have a normal diploid karyotype, express endogenous alkaline phosphatase and pluripotency markers (OCT4, NANOG, SSEA-4 and SOX2) and are capable to differentiate into derivatives of the three germ layers. The iPSC lines obtained in this work can be used as a tool to generate a relevant model to study the effect of the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene on dopaminergic neuron differentiation.

Key words: Parkinson's disease; reprogramming; induced pluripotent stem cells; *LGR4* gene.

For citation: Podvysotskaya V.S., Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Kovalenko L.V., Zakian S.M. Generation and characterisation of seven induced pluripotent stem cell lines from two patients with Parkinson's disease carrying the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):15-25. doi 10.18699/vjgb-25-03

Введение

На сегодняшний день болезнь Паркинсона – второе по частоте встречаемости нейродегенеративное заболевание после болезни Альцгеймера (Wang et al., 2020). Поражая черную субстанцию головного мозга, а именно дофаминергические нейроны, которые являются важной частью регуляции движения, болезнь Паркинсона приводит к тремору, брадикинезии и ригидности. Разрушение дофаминергических нейронов может наблюдаться вследствие нескольких причин. Накопление в них белка альфа-синуклеина и образование телец Леви, дисфункция митохондрий и лизосом, проблемы синаптического транспорта или транспорта везикул – все факторы в совокупности приводят к ускоренной гибели нейронов. К одним из признаков болезни Паркинсона на клеточном уровне относятся оксидативный стресс, возникающий в результате дисфункции митохондрий (Niu et al., 2021), и стресс эндоплазматического ретикулума, являющийся результатом накопления большого количества неправильно свернутых белков (Fernandes et al., 2016; Marciniak et al., 2022).

В настоящее время известно более 20 генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона. К наиболее распространенным относятся мутации в генах *GBA1*, *LRRK2*,

PRKN и *PINK1* (Funayama et al., 2023). Однако всего около 5 % случаев болезни Паркинсона объясняется наследованием одного из генов, ассоциированных с болезнью. Еще 16–36 % проявляются в результате немонотонного наследования. Поэтому активно продолжается поиск генетических вариантов, ассоциированных с возникновением болезни Паркинсона.

Проанализировав результаты экзомного секвенирования более 70 пациентов с клиническим диагнозом «болезнь Паркинсона», наблюдающихся в ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Новосибирск), мы обнаружили двух пациентов разного пола, не являющихся родственниками, несущих вариант с.1087G>T гена *LGR4* (база данных SRA, проект PRJNA563295). В данном гене известно 48 однонуклеотидных замен, три из которых представляют собой патогенные миссенс-мутации с.2531A>G (p.Asp844Gly), с.286A>G (p.Ile96Val) и с.1087G>T (p.Gly363Cys) (Mancini et al., 2023).

LGR4 является G-сопряженным рецептором и играет роль в функционировании сигнальных путей WNT/ β -катенин и цАМФ/протеинкиназа А (Shi et al., 2021). Ранее было показано, что вариант с.1087G>T гена *LGR4* патоген-

ный и приводит к задержке полового развития вследствие нарушения работы сигнального пути WNT/ β -катенин (Mancini et al., 2023), который задействован также в эмбриогенезе в процессах развития таких тканей и органов, как гонады, почки, нервная система, печень и др. Стоит подчеркнуть, что данный сигнальный путь необходим и при развитии и дифференцировке дофаминергических нейронов (Marchetti et al., 2020). Именно благодаря этой связи и участию белка LGR4 в сигнальном пути WNT/ β -катенин мы предполагаем, что генетический вариант LGR4:c.1087G>T может вызвать дисфункцию или гибель дофаминергических нейронов, что потенциально может быть причиной болезни Паркинсона. Для того чтобы изучить взаимосвязь данного генетического варианта с патогенными процессами, вызывающими гибель дофаминергических нейронов, в первую очередь необходимо создать клеточную модель на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и релевантных типов клеток, дофаминергических нейронов, дифференцированных из них.

Поддержание плюрипотентного состояния ИПСК осуществляется благодаря добавлению в культуральную среду основного фактора роста фибробластов (FGF-basic/bFGF). Для подтверждения свойства плюрипотентности и самообновления клеток проводятся различные тесты (Grigor'eva et al., 2023), такие, например, как качественный (иммунофлуоресцентное окрашивание) и количественный (ПЦР в реальном времени) анализы на уровне экспрессии разных факторов плюрипотентности (NANOG, SSEA-4, OCT4, SOX2, TRA1-81, TRA1-60 и др.). Известно, что при продолжительном культивировании клеток *in vitro* возможны различные аномалии кариотипа (полиплоидизация, транслокации, делеции, анеуплоидии и др.), поэтому анализ кариотипа представляет собой один из ключевых тестов для характеристики полученных линий ИПСК. Основным тестом, свидетельствующем о плюрипотентности клеток, является спонтанная дифференцировка, необходимая для подтверждения способности ИПСК давать клеточные производные всех трех зародышевых листков (экто-, энто- и мезодермы). Более того, для характеристики полученных линий ИПСК проводят: STR-анализ, подтверждающий происхождение полученных линий ИПСК от донора мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови; тесты, свидетельствующие о наличии в ИПСК генетических вариантов донора МНК или подтверждающие наличие генетических модификаций в случае трансгенеза ИПСК; ПЦР на элиминацию экзогенной ДНК/эписом, обеспечивших репрограммирование соматических клеток; регулярные тесты на отсутствие внутрилабораторной контаминации.

Способность ИПСК при направленной дифференцировке давать производные практически любого типа клеток, например нейроны, кардиомиоциты, клетки печени, эндотелиальные и другие клетки, позволяет использовать их для создания клеточных моделей и изучения на релевантных типах клеток патогенеза различных наследственных заболеваний. Так, в результате репрограммирования МНК периферической крови, культивирования полученных ИПСК и дальнейшей дифференцировки их в нейроны, подобные дофаминергическим (Grigor'eva et al., 2023), и

астроциты (Yarkova et al., 2023) будет возможно создание *in vitro* модели болезни Паркинсона. Данная клеточная платформа позволит проанализировать вклад генетического варианта LGR4:c.1087G>T в развитие заболевания, изучить молекулярно-генетические основы патогенеза болезни Паркинсона, проводить поиск мишеней для создания новых лекарственных средств, участвующих в различных сигнальных путях и блокирующих запуск патогенных процессов, вызывающих гибель дофаминергических нейронов, а также тестировать потенциальные медицинские препараты.

Материалы и методы

Соблюдение этических норм. Исследование одобрено Комитетом по этике научных исследований ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Новосибирск), протокол № 1 от 14 марта 2017 г. Образцы периферической крови пациентов были предоставлены данным центром. Пациенты подписали информированное добровольное согласие и информационный лист.

Выделение в градиенте фикола МНК из периферической крови. МНК периферической крови выделяли в градиенте фикола и замораживали, как описано ранее (Григорьева и др., 2024).

Репрограммирование пациент-специфичных МНК. Репрограммирование МНК проводили методом нуклеофекции эписомными векторами, экспрессирующими факторы плюрипотентности: SOX2, OCT4, KLF4, L-MYC, LIN28, а также доминант-негативную форму белка p53 мыши – mp53DD (Addgene ID No. 41813–14, 41855–57) по ранее описанной методике (Grigor'eva et al., 2023). Нуклеофекцию выполняли на приборе Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific), программа: 1650 В, 10 мс, 3 раза. Первичные колонии ИПСК переносили в лунки площадью 1 см², предварительно покрытые эмбриональными фибробластами мыши (ЭФМ), инактивированные митомицином С (Sigma-Aldrich).

Культивирование пациент-специфичных ИПСК осуществляли на ЭФМ по ранее описанной методике (Yarkova et al., 2024). Дезагрегировали колонии ИПСК TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) и рассаживали один раз в 3–4 дня в соотношении 1:10 с добавлением ROCK ингибитора – 2 мкМ Thiazovivin (Sigma-Aldrich).

Гистохимическое выявление эндогенной щелочной фосфатазы. Щелочную фосфатазу выявляли с использованием набора SIGMAFAST™ BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich). Результат анализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon), используя программное обеспечение NIS Elements Advanced Research, версия 4.30.

Имунофлуоресцентное окрашивание проводили по ранее описанной методике (Grigor'eva et al., 2024). Препараты анализировали на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E, используя программное обеспечение NIS Elements Advanced Research, версия 4.30. Список используемых антител приведен в табл. 1.

Спонтанная дифференцировка ИПСК. Для определения потенциала полученных линий ИПСК проводили спонтанную дифференцировку через образование эмбрионных тел с последующей иммунофлуорес-

Таблица 1. Список антител, используемых в работе

Название	Разведение	Производитель, кат. №	RRID
Первичные антитела			
Маркеры плюрипотентности			
Mouse IgG2b anti-OCT-3/4	1:100	Santa cruz Biotechnology, sc-5279	RRID:AB_628051
Mouse IgG3 anti-SSEA-4	1:25	Abcam, ab16287	RRID:AB_778073
Mouse IgG1 anti-NANOG	1:50	Santa cruz Biotechnology, sc-293121	RRID:AB_2665475
Rabbit IgG anti-SOX2	1:400	Cell Signaling, 3579	RRID:AB_2195767
Маркеры мезодермы			
Mouse IgG2a anti-αSMA	1:200	Dako, M0851	RRID:AB_2223500
Mouse IgG1 anti-CD29	1:100	Thermo Fisher Scientific, 14-0299-82	RRID:AB_1210468
Маркеры энтодермы			
Mouse IgG2a anti-AFP	1:250	Sigma-Aldrich, A8452	RRID:AB_258392
Mouse IgG1 anti-Cytokeratin 18 (KRT18)	1:250	Abcam, ab668	RRID:AB_305647
Маркеры эктодермы			
Mouse IgG2a anti TUBB3	1:1000	BioLegend, 801201	RRID:AB_2313773
Chicken IgY anti-MAP2	1:1000	Abcam, ab5392	RRID:AB_2138153
Вторичные антитела			
Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific, A11011	RRID:AB_143157
Goat anti-Mouse IgG2b Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific, A21144	RRID:AB_2535780
Goat anti-Mouse IgG3 Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific, A21151	RRID:AB_2535784
Goat anti-Mouse IgG (H + L) Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific, A11008	RRID:AB_143165
Goat anti-Mouse IgG2a Alexa Fluor 568	1:400	Thermo Fisher Scientific, A21134	RRID:AB_2535773
Goat anti-Mouse IgG1 Alexa Fluor 488	1:400	Thermo Fisher Scientific, A-21121	RRID:AB_2535764
Goat anti-Chicken IgY (H + L) Alexa Fluor 488	1:400	Abcam, ab150173	RRID:AB_2827653

центной окраской. ИПСК наращивали на ЭФМ в чашках Петри (20 см²) до плотности 80–90 %, после чего клетки инкубировали 20–40 мин в 0.15 % коллагеназы IV типа (Thermo Fisher Scientific). Далее аккуратно пипетировали для отделения колоний ИПСК от клеток фидера, центрифугировали 5 мин при 100g, сливали супернатант, суспендировали в среде для культивирования ИПСК без bFGF и переносили колонии на покрытую 1 % агарозой чашку Петри (20 см²). Через 14 дней полученные из колоний эмбрионидные тельца распластывали на 8-ячеечные планшеты с ультратонким стеклом (Chambered Coverglass, Thermo Fisher Scientific), покрытые матригелем. Через 7–9 дней фиксировали 10 мин в 4 % параформальдегиде (Sigma-Aldrich) и проводили иммунофлуоресцентный анализ на маркеры трех зародышевых листков. Список антител представлен в табл. 1.

Кариотипирование линий ИПСК. Анализ кариотипа выполняли по ранее отработанной и описанной методике (Yarkova et al., 2023).

Выделение геномной ДНК и РНК. ДНК выделяли с помощью раствора для экстракции ДНК QuickExtract™ (Lucigen) по протоколу производителя. Для выделения РНК клетки наращивали на площади 8–12 см², лизировали в 0.5–1 мл TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) и

проводили выделение РНК по протоколу производителя. Определяли концентрацию РНК с помощью спектрофотометра EzDrop 1000C (Blue-Ray Biotech).

Выявление генетического варианта в МНК и ИПСК. Секвенирование экзотов пациентов проводили в ООО «Геноаналитика» (Москва). Геномную ДНК, выделенную из МНК периферической крови, фрагментировали ультразвуком на приборе Covaris S2 до фрагментов длиной 300 пар нуклеотидов. Геномная ДНК (800 нг) была использована для приготовления библиотеки с применением наборов реактивов NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) и Sure Select AllExome V7 (Agilent). Секвенирование библиотек осуществляли на приборе HiSeq 2500 (Illumina), парными чтениями по 150 нуклеотидов с обоих концов. Необработанные результаты секвенирования экзотов пациентов доступны в базе данных SRA (проект PRJNA563295, образцы SAMN42050732 (PD58), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/42050732> (PD58), SAMN42050755, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/42050755> (PD69)).

Наличие варианта с.1087G>T гена *LGR4* определяли с помощью секвенирования по Сэнгеру полученных линий ИПСК и МНК пациентов (PD58 и PD69), используя праймеры на ген *LGR4* (табл. 2). Контролем служила ДНК

Таблица 2. Список праймеров, используемых в работе

Применение	Ген/локус	Размер, п. н.	Праймеры: прямой/обратный
Детекция эписомных векторов	<i>oriP</i>	544	TTCCACGAGGGTAGTGAAC/ TCGGGGGTGTTAGAGACAAC
Ген домашнего хозяйства (OT-кПЦР)	<i>B2M</i>	90	TAGCTGTGCTCGCGCTACT/ TCTCTGCTGGATGACGTGAG
Маркеры плюрипотентности (OT-кПЦР)	<i>NANOG</i>	116	TTTGTGGCCTGAAGAAAAC/ AGGGCTGTCTGAATAAGCAG
	<i>OCT4</i>	94	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG/ GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
	<i>SOX2</i>	100	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC/ AACCCCAAGATGCACAACCTC
Детекция микоплазмы	Ген рибосомальной 16S РНК	280	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT/ TGCACCATCTGCTACTCTGTAAACCTC
Подтверждение мутации	<i>LGR4</i>	366	GCGTTTCATGGGATGCCTGATAG/ TCTTAGCTCTGCTTCAACGCTTC

условно здорового донора. Реакции проводили на T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) с набором BioMaster HS-Taq PCR-Color (2×) (BioLabs), программа: 95 °C в течение 3 мин; 35 циклов: 95 °C в течение 30 с; 65 °C – 30 с; 72 °C – 30 с; и 72 °C в течение 5 мин. Реакции секвенирования проводили с применением Big Dye Terminator V.3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) и анализировали на ABI 3130XL Genetic Analyser в ЦКП «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/sequet>).

ПЦР анализ на выявление микоплазмы и эписом, используемых для репрограммирования. ПЦР проводили с применением БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Программа: 95 °C в течение 5 мин; 35 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 20 с. В качестве позитивного контроля брали фрагменты ДНК *Mycoplasma spp.* из набора «БиоМастер Мусо-визор» для выявления микоплазмы методом ПЦР-РВ (Биолабмикс). Отрицательный контроль – H₂O. Праймеры представлены в табл. 2. После электрофореза результат визуализировали в ультрафиолетовом свете с помощью Gel Doc XR+ System (Bio-Rad).

Количественная ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности. РНК выделяли с помощью TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific). Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MuLV-RH (Биолабмикс). Количественную ПЦР (ОТ-кПЦР) выполняли в системе LightCycler 480 II (Roche) с BioMaster HS-qPCR SYBR Blue 2× (Биолабмикс), программа: 95 °C – 5 мин; 40 циклов: 95 °C – 10 с, 60 °C – 1 мин. В качестве положительного контроля на экспрессию маркеров плюрипотентности брали линию эмбриональных стволовых клеток HUES9 (HVRDe009-A) (Cowan et al., 2004). Праймеры на маркеры плюрипотентности приведены в табл. 2. Обработка результатов выполнена с помощью ΔΔCT-метода (Livak, Schmittgen, 2001).

STR-анализ. Генетический материал полученных линий ИПСК и МНК пациентов PD58 и PD69 отправляли в ООО «Геноаналитика» (Москва), где и проводили

STR-анализ по 26 локусам с помощью набора реагентов COrDIS ЭКСПЕРТ 26 (Россия).

Результаты и обсуждение

Получение и характеристика клеточной линии

В ходе анализа результатов экзомного секвенирования пациентов с болезнью Паркинсона Федерального центра нейрохирургии Министерства здравоохранения РФ (Новосибирск) были обнаружены пациенты с ранним началом болезни Паркинсона (женщина 37 лет (PD58) и мужчина 66 лет (PD69)), имеющие вариант *LGR4:c.1087G>T* (rs117543292).

Из периферической крови пациентов были выделены МНК, которые затем репрограммировали для возврата к состоянию плюрипотентности с помощью эписомных векторов, кодирующих факторы плюрипотентности OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC, а также доминант-негативную форму белка p53 мыши – mp53DD (Okita et al., 2013). В процессе выполнения работы были получены 21 линия клеток от PD58 и 10 линий от PD69. Первичный анализ на наличие/отсутствие эписомных векторов и кариотипирование позволили отобрать три линии от первого пациента (ICGi053-A/PD58-4, ICGi053-B/PD58-7 и ICGi053-C/PD58-14) и четыре линии от второго (ICGi054-A/PD69-1/1, ICGi054-B/PD69-2/1, ICGi054-C/PD69-4 и ICGi054-D/PD69-5). Все линии были зарегистрированы в Реестре плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSCreg, <https://hpscereg.eu>). Информацию о линиях можно найти в hPSCreg по ссылкам: <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-A>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-B>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-C>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-A>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-B>, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-C> и <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-D>.

Все линии обоих пациентов имеют морфологию, характерную для плюрипотентных клеток, плоские однослойные плотные колонии с большим ядерно-цитоплазматическим соотношением, экспрессирующие эндогенную щелочную фосфатазу (рис. 1, а, рис. 2, а).

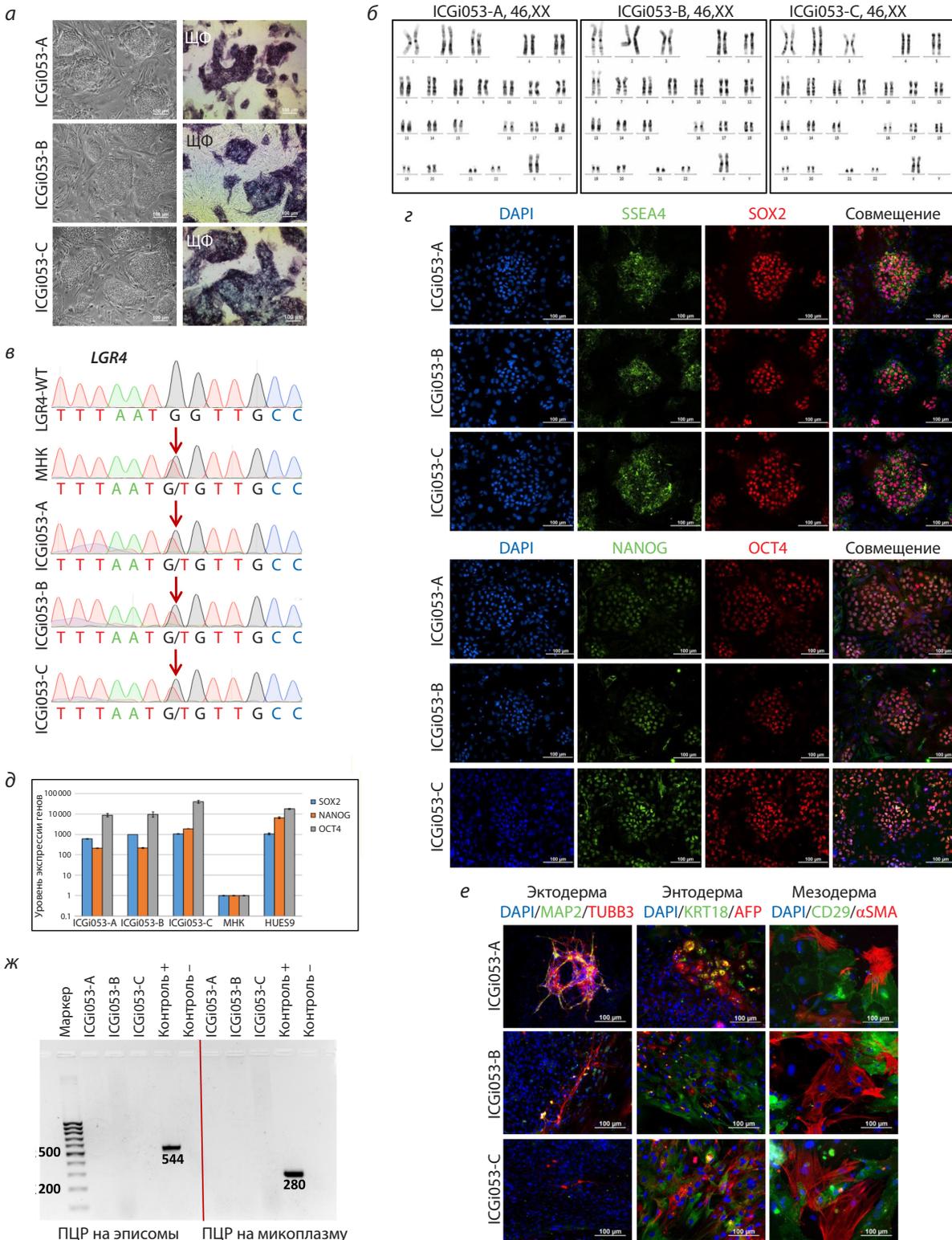


Рис. 1. Характеристика трех линий ИПСК ICGi053-A, ICGi053-B и ICGi053-C.

a – морфология колоний и выявление щелочной фосфатазы (ЩФ) в ИПСК; *б* – кариотипирование линий ИПСК с использованием DAPI-бэндинга; *в* – секвеннограммы ПЦР продуктов, полученных с геномной ДНК пациентки с ранним началом болезни Паркинсона PD58, здорового донора (LGR4-WT) и линий ИПСК, которые соответствуют позициям 27377174–27377186 на хромосоме 11 человека (сборка генома GRCh38). Позиция изучаемого варианта гена *LGR4* NC_000011.10:g.27377180C>A. Нуклеотидная замена *LGR4*:c.1087G>T обозначена красной стрелкой; *г* – иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры плюрипотентности: NANOG (зеленый), OCT4 (красный), SSEA-4 (зеленый), SOX2 (красный); ядра окрашены DAPI (синий); *д* – количественная ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG) полученных линий ИПСК, МНК пациента и линии эмбриональных стволовых клеток человека HUES9; *е* – иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, полученных при спонтанной дифференцировке, на маркеры эктодермы (TUBB3 (красный), MAP2 (зеленый)), энтодермы (кератин 18/KRT18 (зеленый), AFP (красный)) и мезодермы (αSMA (красный), CD29 (зеленый)); ядра окрашены DAPI (синий); *ж* – результат ПЦР анализа на элиминацию episomных векторов и контаминацию микоплазмой полученных клеток. Масштабные линейки – 100 мкм.

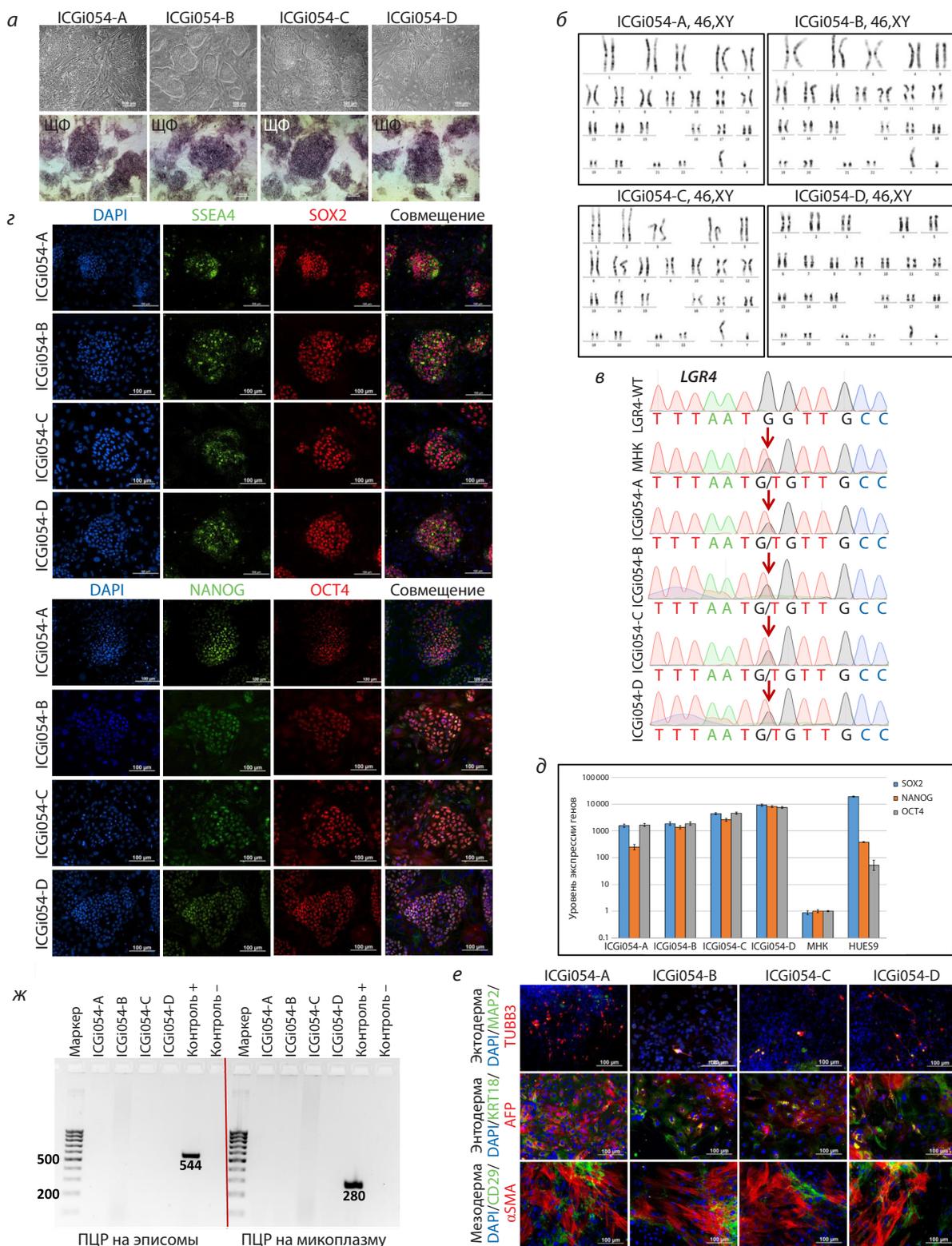


Рис. 2. Характеристика четырех пациент-специфичных линий ИПСК ICGi054-A, ICGi054-B, ICGi054-C и ICGi054-D.

а – морфология колоний и выявление щелочной фосфатазы (ЩФ) в ИПСК; **б** – кариотипирование линий ИПСК с использованием DAPI-бэндинга; **в** – секвеннограммы ПЦР продуктов, полученных с геномной ДНК пациента с ранним началом болезни Паркинсона PD69, здорового донора (LGR4-WT) и линий ИПСК, которые соответствуют позициям 27377174–27377186 на хромосоме 11 человека (сборка генома GRCh38). Позиция изучаемого варианта гена *LGR4* NC_000011.10:g.27377180C>A. Нуклеотидная замена *LGR4*:с.1087G>Т обозначена красной стрелкой; **г** – иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры плюрипотентности: NANOG (зеленый), OCT4 (красный), SSEA-4 (зеленый), SOX2 (красный); ядра окрашены DAPI (синий); **д** – количественная ОТ-ПЦР на маркеры плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG) полученных линий ИПСК, МНК пациента и линии эмбриональных стволовых клеток человека HUES9; **е** – иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, полученных при спонтанной дифференцировке, на маркеры эктодермы (TUBB3 (красный), MAP2 (зеленый)), энтодермы (кератин 18/KRT18 (зеленый), AFP (красный)) и мезодермы (α SMA (красный), CD29 (зеленый)); ядра окрашены DAPI (синий); **ж** – результат ПЦР анализа на элиминацию episomных векторов и контаминацию микоплазмой полученных клеток. Масштабные линейки – 100 мкм.

Таблица 3. Детальный анализ хромосомного состава метафазных пластинок полученных линий ИПСК

Название линии ИПСК	Число метафаз с различным количеством хромосом						Количество проанализированных метафаз	Кариотип диплоидных клеток
	42–44	45	46	47	48–50	80–92		
ICGi053-A	4	3	40	8	2	4	58	46,XX
ICGi053-B	9	3	37	4	0	5	58	46,XX
ICGi053-C	5	4	37	3	1	8	58	46,XX
ICGi054-A	4	8	37	5	2	4	60	46,XY
ICGi054-B	7	4	41	3	1	1	57	46,XY
ICGi054-C	15	5	37	6	1	2	60	46,XY
ICGi054-D	8	10	31	4	1	1	56	46,XY

При анализе кариотипа полученных линий ИПСК было проанализировано от 56 до 60 метафаз. Разложено на хромосомы от 6 до 12 метафаз, что соответствует рекомендациям, основанным на Европейских стандартах для цитогенетических и молекулярно-цитогенетических исследований конститутивных и приобретенных хромосомных аномалий (Hastings et al., 2012; ISCN, 2020). Возникновение клеток с количеством хромосом от 42 до 45 является результатом потери отдельных хромосом при приготовлении препаратов. Поскольку таких клеток было мало и они демонстрировали отсутствие разных хромосом, то мы не рассматривали их как образование новых субклонов. Известно, что культивируемым стволовым клеткам характерна анеуплоидия (Menzorov et al., 2016), однако моносомные клетки подвержены апоптозу или менее интенсивной пролиферации, поэтому для культур клеток принято за норму считать линии, у которых более 50 % метафаз имеют полный набор хромосом. Детальный анализ показал, что все линии имеют более 55 % клеток с нормальным диплоидным кариотипом – 46,XX для ICGi053 (см. рис. 1, б) и 46,XY для ICGi054 (см. рис. 2, б). Надо отметить, что при анализе семи полученных линий ИПСК не обнаружено метафазных пластинок со структурными перестройками. Подробная информация по составу проанализированных метафазных пластинок представлена в табл. 3.

Секвенирование по Сэнгеру показало наличие в полученных линиях клеток, так же как и в МНК, варианта *LGR4:c.1087G>T* в гетерозиготном состоянии (см. рис. 1, в, рис. 2, в, генетический вариант обозначен красной стрелкой). Иммунофлуоресцентный анализ линий ICGi053-A (27-й пассаж), ICGi053-B (26-й пассаж), ICGi053-C (27-й пассаж), ICGi054-A (26-й пассаж), ICGi054-B (22-й пассаж), ICGi054-C (25-й пассаж) и ICGi054-D (24-й пассаж) на маркеры плюрипотентности выявил наличие поверхностного антигена SSEA-4 и транскрипционных факторов NANOG, SOX2 и OCT4 (см. рис. 1, г, рис. 2, г). Количественная ПЦР в реальном времени (ОТ-кПЦР) МНК пациентов, полученных из них линий ИПСК, а также контрольной линии эмбриональных стволовых клеток HUES9 показала повышение уровня экспрессии генов *OCT4*, *NANOG* и *SOX2* в линиях ИПСК, сопоставимое с уровнем экспрессии в HUES9, по срав-

нению с МНК (см. рис. 1, д, рис. 2, д). Тест линий ИПСК на способность спонтанно дифференцироваться в производные трех зародышевых листков, являющийся основным подтверждением статуса плюрипотентности, и дальнейший иммунофлуоресцентный анализ показали наличие экспрессии маркеров эктодермы (тубулин β3 (TUBB3/TUJ1), ассоциированный с микротрубочками белок 2 (MAP2)), энтодермы (альфа-фетопротейн (AFP), кератин 18 (KRT18)) и мезодермы (α-актин гладких мышц (αSMA), поверхностный маркер CD29) (см. рис. 1, е, рис. 2, е). В процессе культивирования все линии проходили ПЦР тест на контаминацию микоплазмой и элиминацию эписомных векторов (см. рис. 1, ж, рис. 2, ж). STR-анализ тандемных повторов по 26 локусам показал идентичность полученных линий ИПСК МНК пациентов (данные доступны по запросу у авторов). Паспорта клеточных линий, полученных от пациентов PD58 и PD69, представлены в табл. 4 и 5.

Закключение

В результате репрограммирования МНК двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант *c.1087G>T* (rs117543292) гена *LGR4*, были созданы и охарактеризованы семь линий ИПСК – ICGi053-A, ICGi053-B, ICGi053-C, ICGi054-A, ICGi054-B, ICGi054-C и ICGi054-D. Полученные линии клеток соответствуют плюрипотентным клеткам человека: имеют характерную морфологию, нормальный кариотип, экспрессируют факторы плюрипотентности, способны спонтанно дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и имеют такой же генетический вариант *LGR4:c.1087G>T*, как и донорские МНК. Данная работа служит первым и необходимым этапом изучения влияния генетического варианта *LGR4:c.1087G>T* на проявление болезни Паркинсона. Полученные линии ИПСК и их дифференцированные производные являются уникальной клеточной платформой, на которой в дальнейшем возможно будет изучать на молекулярно-генетическом уровне ранние патологические процессы, запускающие каскад сигнальных путей, приводящих к гибели нейронов, проводить поиск мишеней, модулирующих эти сигнальные пути, а также осуществлять тестирование новых потенциальных лекарственных препаратов.

Таблица 4. Паспорт клеточных линий ICGi053-A, ICGi053-B, ICGi053-C

Уникальный идентификатор	ICGi053-A, ICGi053-B, ICGi053-C
Альтернативное название линий	PD58-4, PD58-7, PD58-14
Учреждение	ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 37 Пол: Ж Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2022 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и mp53DD
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Возраст начала симптомов	36 лет
Ген/локус	LGR4:c.1087G>T, rs117543292
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионидных телец
Кариотип	46,XX
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	На питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши
Среда культивирования	85 % KnockOut DMEM, 15 % KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркапто-этанол, 1 % пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-I (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ посева	TrypLE Express
Кратность посева	1:8–1:10
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-A https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-B https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi053-C
Дата паспортизации/депонирования	09.07.2024 (ICGi053-A) 18.07.2024 (ICGi053-B) 22.07.2024 (ICGi053-C)

Таблица 5. Паспорт клеточных линий ICGi054-A, ICGi054-B, ICGi054-C, ICGi054-D

Уникальный идентификатор	ICGi054-A, ICGi054-B, ICGi054-C, ICGi054-D
Альтернативное название линий	PD69-1/1, PD69-2/1, PD69-4, PD69-5
Учреждение	ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, протокол № 1 от 14.03.2017
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 66 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Мононуклеарные клетки периферической крови
Дата забора биоматериала	2022 г.
Способ репрограммирования	Неинтегрирующиеся эписомные плазмидные векторы
Репрограммирующие факторы	OCT4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC и mp53DD
Клональность	Клональные
Генетическая модификация	Нет
Вид генетической модификации	Нет
Подтверждение элиминации/замолкания репрограммирующих трансгенов	ПЦР, не детектируются
Заболевание	Болезнь Паркинсона
Возраст начала симптомов	41 год
Ген/локус	LGR4:c.1087G>T, rs117543292
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбрионных теллец
Кариотип	46,XY
Проверка контаминации	Бактерии, грибы и микоплазма не обнаружены
Область применения	<i>In vitro</i> модель болезни Паркинсона
Способ культивирования	На питающем слое митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши
Среда культивирования	85 % KnockOut DMEM, 15 % KnockOut Serum Replacement, 0.1 mM NEAA, 0.1 mM 2-меркапто-этанол, 1 % пенициллин-стрептомицин, GlutaMAX-1 (все Thermo Fisher Scientific), 10 нг/мл bFGF (SCI Store)
Температура, °C	37
Концентрация CO ₂ , %	5
Концентрация O ₂ , %	20
Способ пересева	TrypLE Express
Кратность пересева	1:8–1:10
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % DMSO
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-A https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-B https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-C https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi054-D
Дата паспортизации/депонирования	26.07.2024 (ICGi054-A) 26.07.2024 (ICGi054-B) 29.07.2024 (ICGi054-C) 09.08.2024 (ICGi054-D)

Список литературы / References

- Григорьева Е.В., Малахова А.А., Яркова Е.С., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Надточий Ю.А., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Закиян С.М. Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/vjgb-24-76 [Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Yarkova E.S., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Nadochy J.A., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant c.2013T>G in the *MAPT* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/vjgb-24-76]
- Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., Melton D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1353-1356. doi 10.1056/NEJMSr040330
- Fernandes H.J.R., Hartfield E.M., Christian H.C., Emmanouilidou E., Zheng Y., Booth H., Bogetoft H., Lang C., Ryan B.J., Sardi S.P., Badger J., Vowles J., Evetts S., Tofaris G.K., Vekrellis K., Talbot K., Hu M.T., James W., Cowley S.A., Wade-Martins R. ER stress and autophagic perturbations lead to elevated extracellular α -synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-derived dopamine neurons. *Stem Cell Rep*. 2016;6(3):342-356. doi 10.1016/j.stemcr.2016.01.013
- Funayama M., Nishioka K., Li Y., Hattori N. Molecular genetics of Parkinson's disease: contributions and global trends. *J Hum Genet*. 2023;68(3):125-130. doi 10.1038/s10038-022-01058-5
- Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanova T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2023;24:4437. doi 10.3390/ijms24054437
- Grigor'eva E.V., Karapetyan L.V., Malakhova A.A., Medvedev S.P., Minina J.M., Hayrapetyan V.H., Vardanyan V.S., Zakian S.M., Arakelyan A., Zakharyan R. Generation of iPSCs from a patient with the M694V mutation in the *MEFV* gene associated with Familial Mediterranean fever and their differentiation into macrophages. *Int J Mol Sci*. 2024;25:6102. doi 10.3390/ijms25116102
- Hastings R., Howell R., Bricarelli F.D., Kristoffersson U., Cavani S. General guidelines and quality assurance for cytogenetics. *Eur Cytogenet Assoc NewsL*. 2012;29:11-25
- ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. S. Karger AG, 2020. doi 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi 10.1006/meth.2001.1262
- Mancini A., Howard S.R., Marelli F., Cabrera C.P., Barnes M.R., Sternberg M.J.E., Leprovots M., Hadjidemetriou I., Monti E., David A., Wehkalampi K., Oleari R., Lettieri A., Vezzoli V., Vassart G., Cariboni A., Bonomi M., Garcia M.I., Guasti L., Dunkel L. LGR4 deficiency results in delayed puberty through impaired Wnt/ β -catenin signaling. *JCI Insight*. 2023;5(11):e133434. doi 10.1172/jci.insight.133434
- Marchetti B., Tirolo C., L'Episcopo F., Caniglia S., Testa N., Smith J.A., Pluchino S., Serapide M.F. Parkinson's disease, aging and adult neurogenesis: Wnt/ β -catenin signalling as the key to unlock the mystery of endogenous brain repair. *Aging Cell*. 2020;19(3):e13101. doi 10.1111/acel.13101
- Marciniak S.J., Chambers J.E., Ron D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2022;21(2):115-140. doi 10.1038/s41573-021-00320-3
- Menzorov A., Pristiyazhnyuk I., Kizilova H., Yunusova A., Battulin N., Zhelezova A., Golubitsa A., Serov O.L. Cytogenetic analysis and *Dkl1-Dio3* locus epigenetic status of mouse embryonic stem cells during early passages. *Cytotechnology*. 2016;68(1):61-71. doi 10.1007/s10616-014-9751-y
- Niu Y., Zhang J., Dong M. Nrf2 as a potential target for Parkinson's disease therapy. *J Mol Med (Berl)*. 2021;99(7):917-931. doi 10.1007/s00109-021-02071-5
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*. 2013;31(3):458-466. doi 10.1002/stem.1293
- Shi S., Li S., Zhang X., Wei Z., Fu W., He J., Hu Y., Li M., Zheng L., Zhang Z. *LGR4* gene polymorphisms are associated with bone and obesity phenotypes in Chinese female nuclear families. *Front Endocrinol*. 2021;12:656077. doi 10.3389/fendo.2021.656077
- Wang M., Ling K.-H., Tan J.J., Lu C.-B. Development and differentiation of midbrain dopaminergic neuron: from bench to bedside. *Cells*. 2020;9(6):1489. doi 10.3390/cells9061489
- Yarkova E.S., Grigor'eva E.V., Medvedev S.P., Pavlova S.V., Zakian S.M., Malakhova A.A. iPSC-derived astrocytes contribute to in vitro modeling of Parkinson's disease caused by the *GBA1* N370S mutation. *Int J Mol Sci*. 2023;25(1):327. doi 10.3390/ijms25010327
- Yarkova E.S., Grigor'eva E.V., Medvedev S.P., Tarasevich D.A., Pavlova S.V., Valetdinova K.R., Minina J.M., Zakian S.M., Malakhova A.A. Detection of ER stress in iPSC-derived neurons carrying the p.N370S mutation in the *GBA1* gene. *Biomedicines*. 2024;12:744. doi 10.3390/biomedicines12040744

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.09.2024. После доработки 20.11.2024. Принята к публикации 21.11.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-04

Studying concatenation of the Cas9-cleaved transgenes using barcodes

A.V. Smirnov ¹, A.N. Korablev¹, I.A. Serova¹, A.M. Yunusova ¹, A.A. Muravyova², E.S. Valeev¹, N.R. Battulin ^{1,2} ¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia battulin@gmail.com

Abstract. In pronuclear microinjection, the Cas9 endonuclease is employed to introduce *in vivo* DNA double-strand breaks at the genomic target locus or within the donor vector, thereby enhancing transgene integration. The manner by which Cas9 interacts with DNA repair factors during transgene end processing and integration is a topic of considerable interest and debate. In a previous study, we developed a barcode-based genetic system for the analysis of transgene recombination following pronuclear microinjection in mice. In this approach, the plasmid library is linearized with a restriction enzyme or a Cas9 RNP complex at the site between a pair of barcodes. A pool of barcoded molecules is injected into the pronucleus, resulting in the generation of multicopy concatemers. In the present report, we compared the effects of *in vivo* Cas9 cleavage (RNP+ experiment) and *in vitro* production of Cas9-linearized transgenes (RNP- experiment) on concatenation. In the RNP+ experiment, two transgenic single-copy embryos were identified. In the RNP- experiment, six positive embryos were identified, four of which exhibited low-copy concatemers. Next-generation sequencing (NGS) analysis of the barcodes revealed that 53 % of the barcoded ends had switched their initial library pairs, indicating the involvement of the homologous recombination pathway. Out of the 20 transgene-transgene junctions examined, 11 exhibited no mutations and were presumably generated through re-ligation of Cas9-induced blunt ends. The majority of mutated junctions harbored asymmetrical deletions of 2–4 nucleotides, which were attributed to Cas9 end trimming. These findings suggest that Cas9-bound DNA may present obstacles to concatenation. Conversely, clean DNA ends were observed to be joined in a manner similar to restriction-digested ends, albeit with distinctive asymmetry. Future experiments utilizing *in vivo* CRISPR/Cas cleavage will facilitate a deeper understanding of how CRISPR-endonucleases influence DNA repair processes.

Key words: CRISPR/Cas9; pronuclear microinjection; DNA barcoding; transgenic animals; DSB repair; concatemer; homologous recombination (HR); non-homologous end-joining, NHEJ; mouse embryos.

For citation: Smirnov A.V., Korablev A.N., Serova I.A., Yunusova A.M., Muravyova A.A., Valeev E.S., Battulin N.R. Studying concatenation of the Cas9-cleaved transgenes using barcodes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):26-34. doi 10.18699/vjgb-25-04

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 24-74-10013.

Acknowledgements. The experiments involving the visualization of fluorescent embryos were conducted with support from State Project FWNR-2022-0019 at the Institute of Cytology and Genetics SB RAS. The calculations were conducted using the computational resources of the Computational Center of the Novosibirsk State University.

Изучение конкатенации баркодированных трансгенов, линейризованных Cas9

A.V. Смирнов ¹, A.N. Кораблев¹, И.А.Серова¹, A.M. Юнусова ¹, A.A. Муравьева², E.C. Валеев¹, Н.Р. Баттулин ^{1,2} ¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия battulin@gmail.com

Аннотация. При пронуклеарной микроинъекции эндонуклеаза Cas9 используется для создания двуцепочечных разрывов ДНК *in vivo* в геномном целевом локусе или внутри донорского вектора для улучшения интеграции трансгена. Взаимодействие Cas9 с факторами репарации ДНК во время обработки концов трансгена и интеграции – актуальная тема. Ранее мы разработали генетическую систему на основе баркодов для анализа рекомбинации трансгенов после пронуклеарной микроинъекции у мышей. При этом подходе плазмидная библиотека линейризуется ферментом рестрикции или комплексом Cas9:gRNA на участке между парой баркодов. Пул баркодированных молекул вводится внутрь пронуклеуса, что приводит к образованию многокопийных конкатемеров. В представленной статье мы сравнили эффекты разрезания Cas9 в условиях *in vivo* (эксперимент RNP+) или для трансгенов, линейризованных *in vitro* и очищенных через агарозный гель (эксперимент RNP-). В эксперименте RNP+ было обнаружено два трансгенных однокопийных эмбриона. В экспе-

рименте RNP– было идентифицировано шесть положительных эмбрионов, четыре из них имели низкокопийные конкатемеры. Анализ баркодов методом NGS показал, что 53 % баркодированных концов поменяли свои исходные пары баркодов, что является признаком гомологичной рекомбинации между концами трансгенов. Из 20 слияний «трансген-трансген» 11 не имели мутаций и, по-видимому, были получены путем повторного лигирования тупых концов, полученных с помощью Cas9. Большинство мутировавших соединений содержало асимметричные делеции 2–4 нуклеотидов из-за специфического тримминга концов Cas9. Эти данные указывают на то, что связанная с Cas9 ДНК создает препятствия для конкатенации. В то же время свободные концы ДНК соединяются таким же образом, как и концы, обработанные рестриктазами, но с характерной асимметрией. Будущие эксперименты с пронуклеарными микроинъекциями CRISPR/Cas помогут понять, как CRISPR-нуклеазы влияют на репарацию ДНК.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; пронуклеарная микроинъекция; ДНК-баркодирование; трансгенные животные; репарация двуцепочечных разрывов ДНК; конкатемер; гомологичная рекомбинация; негомологичное соединение концов; эмбрионы мыши.

Introduction

Pronuclear microinjection is a common method for making transgenic animals. At present, CRISPR/Cas nucleases are successfully employed in pronuclear microinjections to produce site-specific knock-ins and mutations. The introduction of site-specific double-strand breaks (DSBs) has been demonstrated to enhance the frequency of editing when single-stranded oligonucleotides or long double-stranded donors are incorporated. Moreover, Cas9 can be utilized to cleave circular donor vectors *in vivo*, thereby providing double-stranded ends for repair (Abe et al., 2020). Approaches such as minicircles (Danner et al., 2021) or HITI/PiTCh (Sakuma et al., 2016; Suzuki et al., 2016) are based on non-homologous or microhomology-mediated end-joining (NHEJ, MMEJ) and have been reported to have a high editing frequency due to the fact that NHEJ/MMEJ is active throughout the cell cycle. In contrast to the predominantly utilized clean ends in classical transgenesis, Cas9-cleaved DNA engages with the cellular DNA repair apparatus in a distinctive manner. For example, the binding of the Cas9 complex to the target site results in the local denaturation of the DNA duplex and trimming of the cleaved ends, which then form single-stranded overhangs of varying lengths (Stephenson et al., 2018). Following DNA cleavage, Cas9 remains bound to the cut site for several hours, tethering the two ends together (Richardson et al., 2016). This prevents immediate end processing by DNA repair factors and necessitates the removal of Cas9 by cell factors to seal the break (Clarke et al., 2018; Reginato et al., 2024).

The majority of our knowledge regarding the Cas9 mode of action is derived from cell culture assays utilizing site-specific reporters (Schimmel et al., 2017) and next-generation indel sequencing (NGS) (Schimmel et al., 2017; Taheri-Ghahfarokhi et al., 2018). We elected to investigate the manner in which Cas9-cleaved ends engage with DSB repair systems, employing a novel assay based on molecular barcoding and concatenation in pronuclear microinjection. The concatenation of the injected transgenes into multicopy arrays is a well-documented aspect of transgenesis, occurring with high frequency in pronuclear microinjection. Molecular barcode evidence indicates that concatenation is facilitated by the combined action of homologous recombination (HR) (head-to-tail recombination) and NHEJ (random ligation and initial copy circularization) (Sмирнов et al., 2020). During the process of concatenation, the repair pathways leave specific signatures at the junctions between the transgenes and in the patterns of connection between the barcode and the transgenes. Therefore, the levels

of barcode recombination and terminal truncations may serve as indicators of the accessibility of DNA ends to DNA repair machinery in the presence of the Cas9 nuclease.

To ascertain the impact of Cas9-generated ends on concatenation, a barcoded plasmid library was subjected to Cas9 digestion, either *in vivo* or *in vitro*, and the resulting barcode information was obtained from transgenic embryos through Illumina NGS. Subsequently, an analysis was conducted on the data to evaluate barcode recombination (HR activity), estimate the average transgene copy number (CN), and assess end truncations and mutations at transgene-transgene junction sequences (MMEJ/NHEJ activity).

Materials and methods

Animal ethics statement. The animal housing was implemented with the assistance of the Center for Laboratory Animal Genetic Resources at the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, with support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (unique identifier of the project: RFMEFI62119X0023). The animals were maintained in a standard environment, with a temperature of 24 °C, relative air humidity of 40–50 %, and a 14-hour light/10-hour dark light cycle. The animals had access to food and water at all times. At the conclusion of the experiments, the remaining animals were euthanized via CO₂ asphyxiation. All procedures and technical manipulations involving animals were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and approved by the Bioethical Committee at the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Permission No. 45 from November 16, 2018).

DNA cloning. The pCAGGS-mCherry plasmid was a gift from Phil Sharp (Gurtan et al., 2012) (Addgene plasmid #41583). This vector was utilized for the insertion of paired barcodes. The barcoded plasmid library was constructed by assembling a linearized backbone, two barcoded oligonucleotides, and an AAVS1 PCR fragment using the NEBuilder® HiFi DNA Assembly mix (NEB). The sequences of the left and right barcodes were as follows: NNCGANNACTNNATGNNACGNNCTGNNTCANN (left) and NNCTCNGGAA NNCGTNNCTANNTCGNNGTANN (right).

To synthesize gRNA against the AAVS1 site, a PCR fragment was amplified from the gRNA_AAVS1-T2 plasmid using a primer with a T7 overhang and treated with the MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher, USA). The gRNA_AAVS1-T2 plasmid was a gift from George Church

(Addgene plasmid #41818) (Mali et al., 2013). The resulting gRNA was purified using the RNA Clean & Concentrator™ Kit (Zymo Research, USA).

To assess the *in vitro* activity of Cas9, 1 µg of a selected clone from the plasmid library was incubated with 50–250 nM of the Cas9 protein (Biolabmix, Russia) and an equimolar amount of gRNA in an incubation buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 125 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 6 mM MgCl₂, 7 % glycerol). The reaction was incubated at 37 °C for 30 minutes, heat-inactivated at 65 °C, and visualized on a 1 % agarose gel.

Animals. Four-week-old female F1 C57BL/6J×DBA2/J (B6D2F1) mice were utilized for superovulation and oocyte collection due to their high hybrid vigor, while three-month-old male C57BL/6J mice were employed for sperm collection. Two-month-old pseudopregnant female CD-1 mice were utilized for embryo transfer into the oviducts, with isoflurane anesthesia. *In vitro* fertilization and embryo collection were conducted in accordance with the established protocols (Takeo et al., 2008; Takeo, Nakagata, 2010, 2011).

Pronuclear microinjection. Two distinct versions of the DNA injection mixture were prepared and delivered into the pronuclei. The RNP+ mix consisted of 1.65 µM Cas9 (Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3, IDT, USA), 1.65 µM gRNA against AAVS1, and 8 ng/µl plasmid library diluted in TE buffer (0.01 M Tris–HCl, 0.25 mM EDTA, pH 7.4) (IDT). For the RNP-negative mix (RNP–), plasmid DNA was digested with the same RNP *in vitro* for one hour, gel-purified to remove Cas9, and diluted to 8 ng/µl with TE buffer. A quantity of DNA equivalent to one picoliter, comprising approximately 1,400 copies, was injected into the male pronuclei of *in vitro* fertilized zygotes. Subsequently, the microinjected zygotes were cultured in droplets of mHTF medium covered with mineral oil at 37 °C under 5 % CO₂ in air for approximately 20 hours until the two-cell embryo stage was reached. Two-cell stage embryos were transferred into the oviducts of pseudopregnant CD-1 females at 0.5 days *post-coitum*. Genomic DNA from 13–14-day embryos was subjected to conventional PCR with Q5 polymerase (NEB, USA) and a set of primers spanning the region around transgene-transgene junctions (Tables S1–S2)¹.

Illumina sequencing and data analysis. Two distinct types of PCR products were amplified from the genomes of embryos #31, #34, #35, and #37. To prepare the inverse PCR NGS library, genomic DNA from transgenic embryos was digested overnight with KpnI-HF (NEB), which cuts twice within the transgene-transgene junction. The digested DNA was purified using AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter, USA), and 300 ng of the digested DNA was ligated overnight at 16 °C in a large reaction volume (100 µl) to facilitate self-ligation of transgene copies. The terminal barcodes of the self-ligated DNA fragments were amplified via PCR using Q5 polymerase and primers that spanned the barcode pairs (Table S2). The following PCR program was employed: the temperature was set to 98 °C for 30 seconds, followed by 35 cycles of 98 °C for 15 seconds, 62 °C for 30 seconds, and 72 °C for 30 seconds, with a final extension at 72 °C for 2 minutes. To remove any remaining PCR fragments resulting from undigested DNA,

those of an appropriate size (216 bp) were excised from the agarose gel.

To prepare the PCR library corresponding to transgene-transgene junctions, the internal junctions were amplified with primers, one of which was in close proximity to the junction and the other of which was situated adjacent to the barcode (Tables S1 and S2). The PCR products were generated for both orientations and purified using AMPure XP magnetic beads. The PCR products were prepared with the KAPA HyperPrep Kit (Roche, Switzerland) using two amplification cycles, pooled together, and sequenced on the Illumina HiSeq 2500 platform (Illumina, USA). The quality of the libraries was evaluated using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA) and the Qubit dsDNA HS assay Kit (Life Technologies, USA).

The processing of NGS data (Table S3) was conducted in accordance with the methodology described in our previous report (Smirnov et al., 2020) with minor modifications. The analysis of NGS data comprises the following steps. Initially, the data were demultiplexed according to the samples. Metrics based on the Levenshtein distance were employed to identify primer sequences at the 3' and 5' ends of each read pair. Subsequently, barcodes were sought within read pairs exhibiting regular patterns (i. e., head barcode NNCGANN ACTNNATGNNACGNNCTGNNTCANN and tail barcode NNCTCNGAANNCGTNNCTANNTCGNNGTANN). Furthermore, the number and percentage of read pairs sharing identical barcodes and identical barcode pairs were calculated. The resulting set of barcode pairs was subjected to a filtration process to produce the final set of pairs. Finally, the barcode pairs were visualized using the Network module of the vis.js framework (<http://visjs.org/>). All of the aforementioned computations were conducted on a high-throughput computational cluster at Novosibirsk State University. The following Python modules were utilized: the Biopython v1.79 module (Cock et al., 2009, 2010) was utilized. Next-generation sequencing data processing (re v2.2.1) utilizes regular expressions (Levenshtein v0.12.1). The Levenshtein distance was calculated using the Pandas v1.3.3 module for processing table data, while the NetworkX 2.6.2 module was employed to determine the number of pairs.

Droplet digital PCR. The Droplet Digital PCR (ddPCR) method was employed to ascertain the transgene copy number in the embryos. The procedure was conducted using ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) and QX100 ddPCR Systems (Bio-Rad, USA), in accordance with the instructions provided by the manufacturer. First, 900 ng of genomic DNA was digested overnight with 20 U of BamHI-HF (NEB) in CutSmart buffer. One microliter of genomic DNA (30 ng) was added to the ddPCR mix (1× ddPCR Supermix, 900 nM primers, 250 nM probes), and the reactions were carried out according to the following program: the reaction was initiated at 95 °C for 10 minutes, followed by 41 cycles of 94 °C for 10 seconds and 61 °C for 1 minute. The final step was conducted at 98 °C for 7 minutes and 20 °C for 30 minutes. All the steps were conducted with a ramp rate of 2 °C/s. ddPCR was performed in two independent technical replicates. The sequences of the primers and probes are provided in Table S4. The data were subsequently analyzed using QuantaSoft (Bio-Rad). The threshold for both genes was set at 5,000.

¹ Supplementary Tables S1–S4 and Figures S1, S2 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx1.pdf>

Results

Generation of transgenic embryos by pronuclear microinjection

For the experiments, we used a barcoded plasmid library, which was based on the pCAGGS-mCherry vector (Fig. 1a, middle section). In brief, the vector contains a pair of 32-base pair barcodes (14 random positions) separated by filler DNA. In the present experiments, a fragment of the human AAVS1

site was utilized as filler DNA due to its well-characterized gRNA sites (Chr19:55115511-55115987, 477 bp) (Mali et al., 2013; Maggio et al., 2014). One of the gRNA sites (5'-GGGGCCACTAGGGACAGGAT-3') was employed as a Cas9 target to linearize plasmid DNA and generate transgenes with barcoded ends (Fig. 1a). *In vitro* tests with the Cas9 protein demonstrated that the synthesized gRNA exhibited robust performance against the plasmid (Fig. 2). To analyze the plasmid library, Illumina paired-end sequencing of the

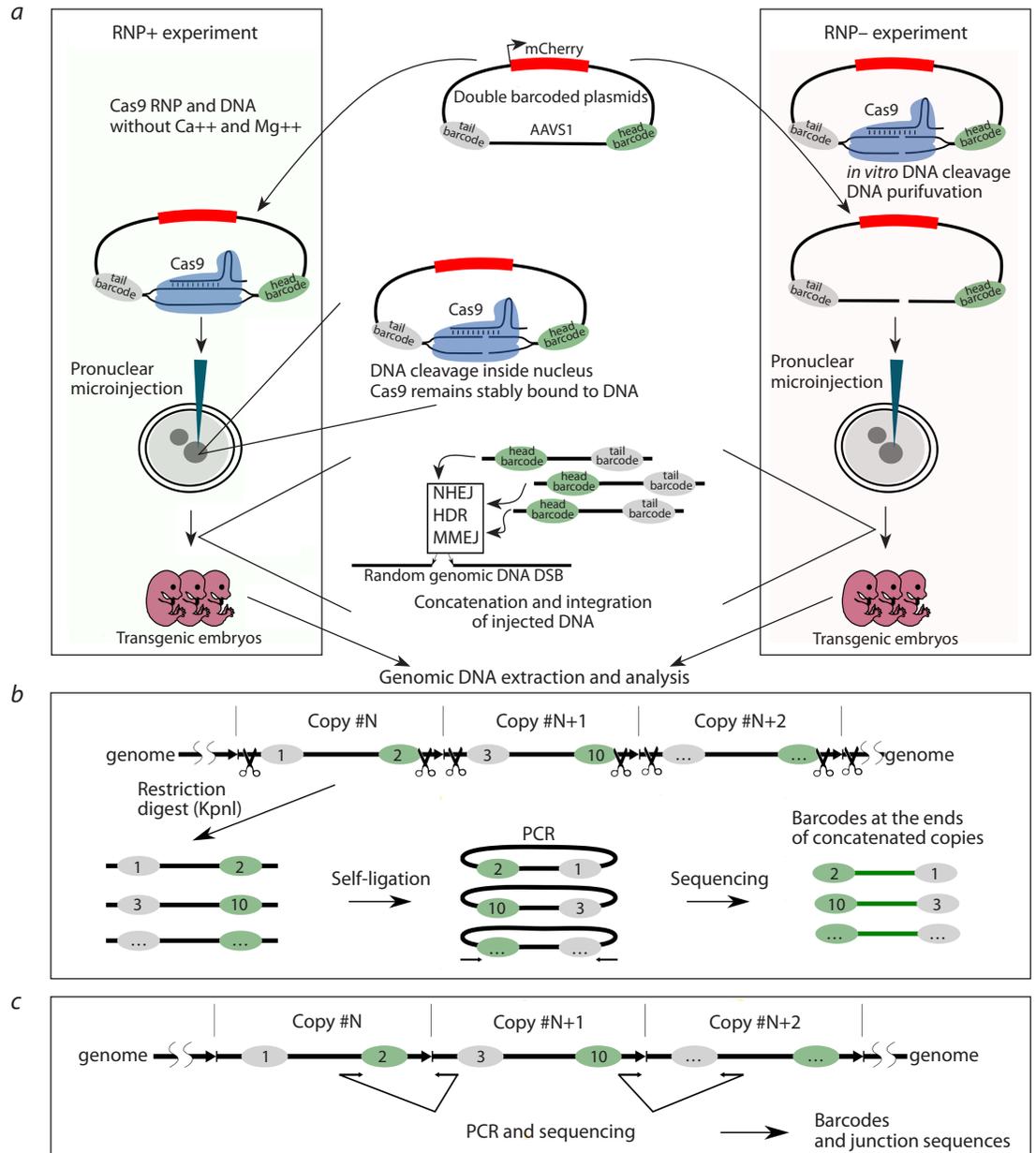


Fig. 1. Outline of the experimental approach.

a – the barcoded plasmid library was prepared for microinjections. A plasmid library comprising a pair of 32 bp barcodes separated by the human AAVS1 fragment was employed to prepare two experimental setups. In the RNP+ experiments, Cas9 and gRNA targeting AAVS1 were co-injected with the plasmid library into pronuclei. *In vivo*, plasmid linearization occurs within the pronucleus. The right-hand illustration depicts the second experimental setup. The plasmid library is digested with RNP *in vitro*, purified via gel electrophoresis, and injected as a purified, linear DNA construct (RNP-). Following the injection, the linear molecules undergo recombination, forming either concatemers or single copies, which are then detected through PCR genotyping; **b** – the barcodes present in the genomic DNA are subjected to analysis through the process of inverse PCR. The concatenated copies are then separated by KpnI (scissors) and re-ligated. PCR products from the newly formed junctions are then subjected to analysis by NGS; **c** – internal junctions between copies are subjected to PCR amplification and subsequent sequencing.

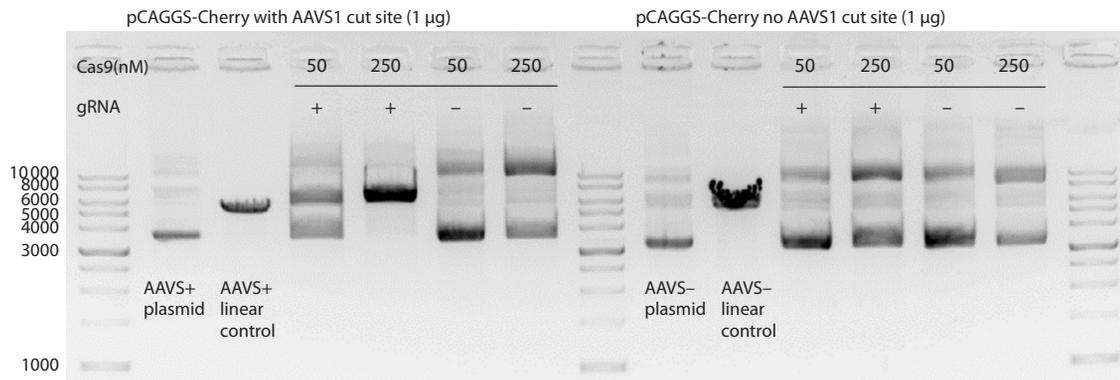


Fig. 2. Preparation of barcoded transgenes for microinjection. *In vitro* cleavage of barcoded plasmid using Cas9 RNP. The image on the left depicts a barcoded clone with an AAVS1 site, while the image on the right illustrates the original backbone without an AAVS1 site. The incubations were maintained at 37 °C for a period of 30 minutes.

barcodes was performed. The plasmid library was found to consist of 102,685 unique barcode pairs. In a typical pronuclear microinjection experiment, approximately one thousand molecules are introduced into the pronucleus. The diversity of the library, comprising approximately 100,000 unique sequences, allows for the injection of a vast number of molecules into a single pronucleus, with minimal likelihood of identical sequences being present.

To understand how the presence of Cas9 at the ends of molecules affects the DSB repair mechanisms involved in concatenation and integration of exogenous DNA, we conducted two experiments on DNA microinjection into pronuclei (Fig. 1a). In one variant, the original circular plasmid library was combined with the Cas9 protein and gRNA, which formed a ribonuclear protein complex (RNP) in standard TE buffer (Fig. 1a, left section, “RNP+”). The absence of Mg²⁺ ions in

the buffer precludes Cas9 endonuclease activity prior to pronuclear microinjection. The concentration of Cas9/gRNA RNP was increased to 1.65 µM, which is above the concentration typically used, in order to ensure robust plasmid linearization. In the second experiment, the DNA was subjected to *in vitro* digestion using Cas9 (Fig. 1a, right section). The linearized DNA was purified via gel electrophoresis and subsequently used for microinjection (henceforth referred to as “RNP-”). In both experiments, approximately 1,400 copies were injected per zygote.

Genomic DNA was extracted from the embryos at the 13–14-day (E13–14) developmental stage. A total of 27 embryos were collected from the RNP+ experiment, and 13 embryos were collected from the RNP- experiment (Fig. 3a). PCR genotyping with primers for the mCherry gene and transgene-transgene junctions revealed the presence of se-

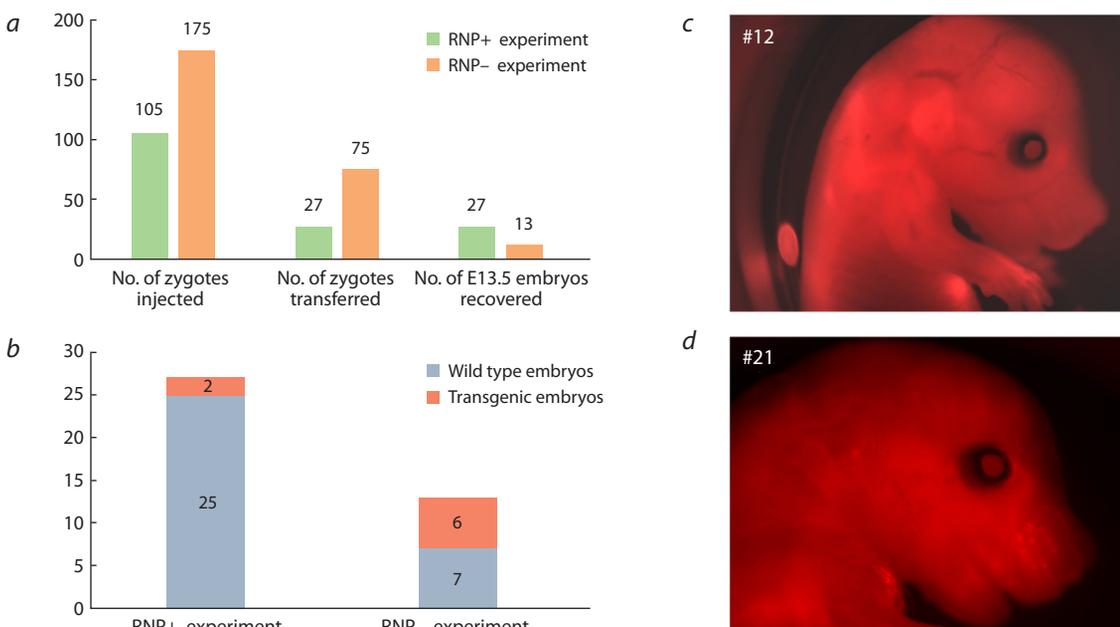


Fig. 3. Screening of the transgenic embryos. *a* – statistical analysis of pronuclear microinjection experiments; *b* – PCR analysis of E13–14 embryos; *c–d* – visualization of mCherry fluorescence through microscopic examination.

veral positive embryos, with 2/27 for RNP+ and 6/13 for RNP- (Fig. 3b). Embryos derived from the RNP- experiment exhibited positive results for transgene-transgene junctions, a hallmark of concatemers (Fig. S1). Of the transgenic embryos, only two exhibited mCherry fluorescence (Fig. 3c-d).

To ascertain the transgene copy number, droplet digital PCR was conducted using a probe directed against the mCherry region within the transgene (Fig. S2). Embryos from the RNP+ experiment exhibited low CN (0.07, 0.37), whereas embryos from the RNP- experiment demonstrated a higher number of copies on average (CN = 0.06, 0.89, 1.87, 2.8, 5.84, 6.38) (Fig. S2) (see realistic estimates below). It should be noted that in relation to ddPCR, CN < 1 or partial CN values indicate tissue mosaicism, whereby the transgene exists only in a portion of the embryo cells. This could reflect delayed DNA integration.

Barcode analysis

Barcodes derived from concatemers in embryos were sequenced using Illumina paired-end reads. Two types of PCR products were prepared for barcode sequencing, following the methodology described in our previous report (Fig. 1b-c) (Sмирнов et al., 2020). In summary, barcode pairs at the ends

of concatenated transgenes were amplified via PCR through self-molecular ligation (Fig. 1b). This method facilitates the excision and self-ligation of transgene molecules, which enables the reading of terminal barcodes in the copies. The KpnI sites utilized for the fragmentation of concatemers in inverse PCR are situated between barcodes and yield 216 bp PCR fragments subsequent to ligation (Fig. 4a). Additionally, internal junctions, defined as nucleotide sequences situated between the copies, were subjected to sequencing (Fig. 1c). In total, barcode data were obtained for four multicopy RNP embryos (via inverse PCR and junction PCR) and two single-copy RNP+ embryos (due to the lack of junctions, only inverse PCR was conducted). To investigate recombination of the barcode sequences, a comparison was made between the barcodes from the transgenic embryos and the list of barcodes from the original plasmid library.

First, we employed NGS barcode data to ascertain the actual CN in the embryos. It is established that the ddPCR results typically exhibit an understated CN due to the mosaic nature of transgenic embryos. By employing barcodes as unique copy identifiers, we were able to calculate the actual CN (Fig. 5). The CN data exhibited a strong correlation with the ddPCR data, with a slight tendency towards an increase

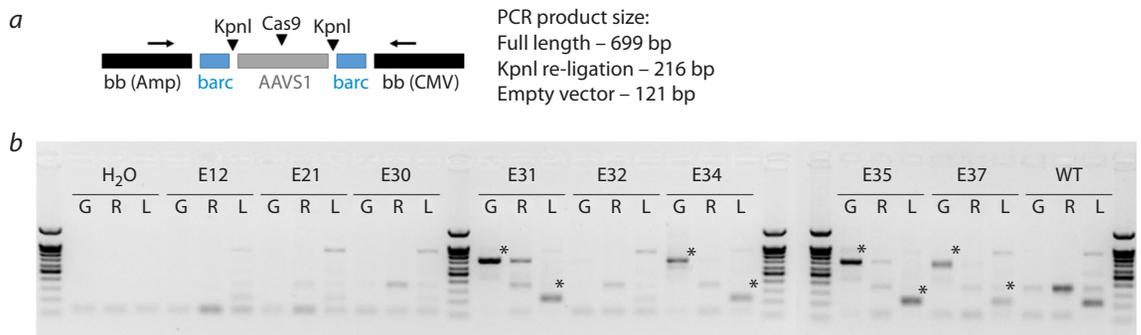


Fig. 4. Generation of PCR fragments for the barcode NGS analysis using inverse PCR.

a – the positions of the PCR primers (indicated by arrows) and the KpnI/Cas9 cut sites at the hypothetical transgene-transgene junction are shown. The empty vector is the original pCAGGS backbone devoid of the AAVS1 element; **b** – generation of PCR products for NGS. G: Untreated genomic DNA; R: Genomic DNA treated with KpnI; L: Genomic DNA after re-ligation for inverse PCR. Inverse PCR entails the digestion of genomic DNA with KpnI and subsequent re-ligation to create self-ligated ends. Consequently, the size of the PCR product is diminished from 699 base pairs to 216 base pairs. The intensity of the bands is proportional to the copy number. Legend: H₂O was used as the negative control, E12–E37 were the transgenic embryos, and WT was the wild-type control. The PCR products selected for NGS analysis are indicated by asterisks. The DNA length marker is 100 base pairs in length.

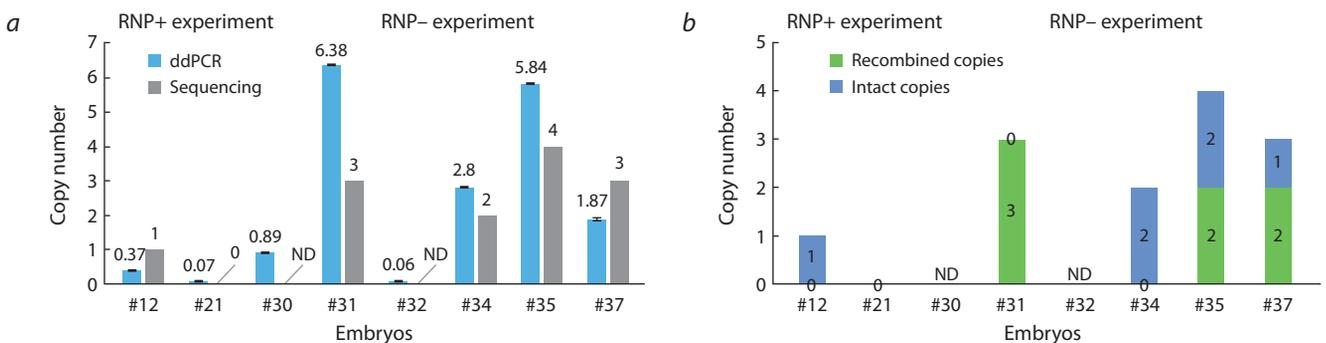


Fig. 5. A comparison of CN measurements derived from ddPCR and NGS barcode analysis.

a – CN estimates derived from ddPCR and NGS in transgenic embryos (#12–37). ND – no data available. A CN value of less than 1 is indicative of tissue mosaicism; **b** – estimation of the proportion of copies with barcode recombination (green).

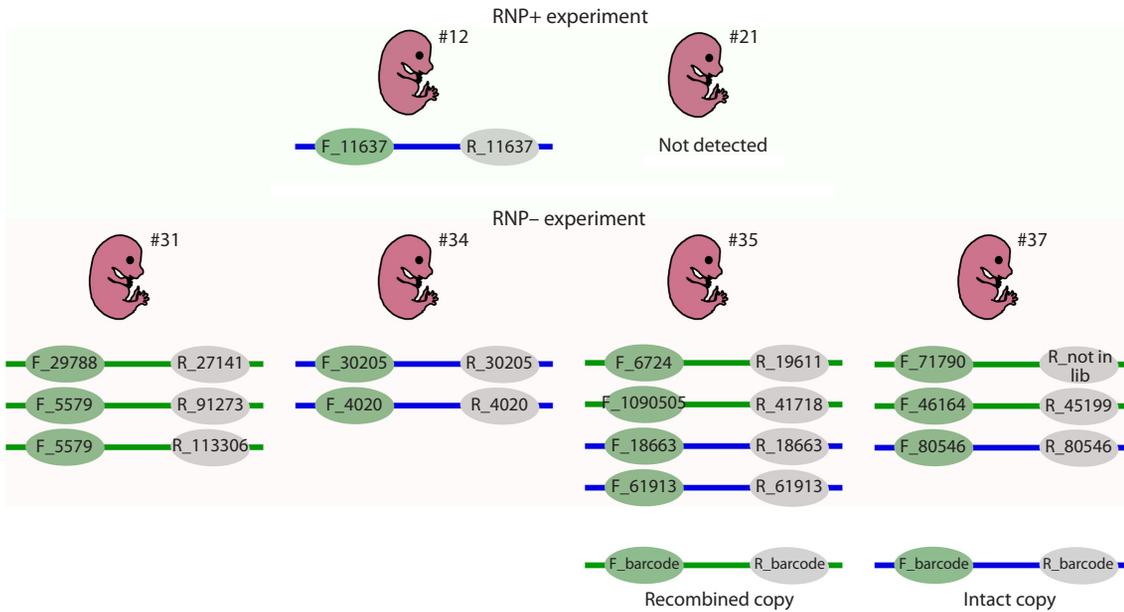


Fig. 6. The barcodes observed in four multicopy RNP- embryos (#31, #34, #35, #37) and one RNP+ embryo (#12). Barcoded transgenes are represented as colored lines with barcode numbers at the ends. Intact transgene copies are indicated in blue (representing the original barcode pairs from the library), while copies with recombined barcodes are shown in green. The top panel depicts embryos from the RNP+ experiment. The bottom panel depicts four RNP- embryos with their corresponding transgene copies. “R_not in lib” indicates that the barcode was not identified within the plasmid library.

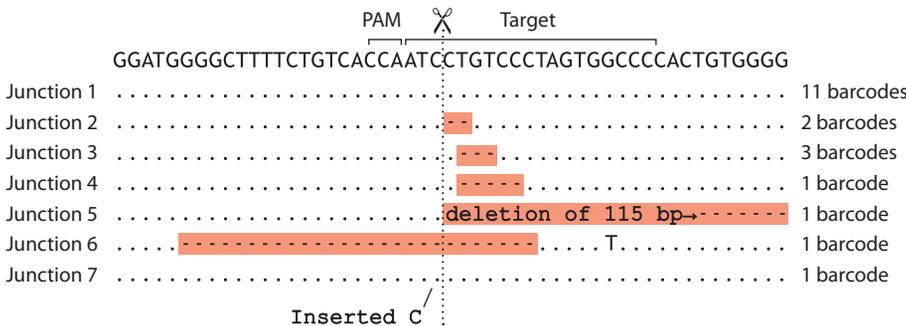


Fig. 7. Nucleotide sequences at the transgene-transgene junctions.

in CN. Embryos with a very low CN (0.06–0.89) as estimated by ddPCR, such as those designated #12/#21 from the RNP+ experiment or #30/#32 from the RNP- experiment, exhibited no transgene-transgene junctions, indicating that they possess a single or truncated copy. It is noteworthy that the truncation of transgene ends during concatenation has the potential to delete the site of a barcode and thereby obscure the calculation of a copy. Nevertheless, in our particular case, an examination of the PCR junctions did not reveal any evidence of terminal truncations, in addition to the presence of a typical transgene-transgene junction (Fig. S1b).

As anticipated, a substantial proportion (53 %) of barcode pairs in concatemers were observed to have undergone shuffling (Fig. 5b and 6). These barcode pairs were not initially present in the plasmid library and appear to have arisen from extrachromosomal end recombination between transgene copies (Smirnov et al., 2020). One barcode was observed to be linked with two distinct partners (Fig. 6, Embryo #31, F_5579), indicating that a single donor molecule was re-

plicated on at least two occasions during the recombination process (Smirnov et al., 2020). This evidence confirms that transgene copies prepared by *in vitro* Cas9 cleavage engage in HR pathways during concatenation, in contrast to the copies from the RNP+ experiment. An internal junction analysis revealed that 11 out of the 20 junctions attributed to specific barcodes did not contain any mutations (Fig. 7). The mutated junction sequences were found to comprise a variety of deletions. Two to five base pair deletions, a large 115 base pair end truncation, and a two-sided 27 base pair deletion (Fig. 7). It should be noted that the DNA ends in question were produced by Cas9 cleavage *in vitro* and were likely trimmed by Cas9 during the incubation period, prior to interaction with the DNA repair machinery.

Discussion

The improvement of efficiency in Cas9-assisted transgenesis will have a profound impact on experiments with a low baseline success rate, such as those involving > 2 kb donor

integration for humanization or genome modifications of farm animals with long reproductive cycles and a lack of scaling. The ability to leverage Cas9 activity hinges on a comprehensive understanding of its interactions with cellular DNA repair pathways. A number of studies have demonstrated that Cas9 forms an unusually stable nuclease-substrate complex and remains bound to the DSB it generates (Jinek et al., 2014; Nishimasu et al., 2014; Stephenson et al., 2018). The precise manner by which cellular repair systems recognize a DSB and the extent to which the Cas9 protein at the DSB influences the choice of repair pathway remain largely unknown. It has been demonstrated that the Cas9 complex can be dislodged from a double-stranded break by RNA polymerase, but only if the single-guide RNA (sgRNA) of Cas9 is annealed to the DNA strand that is used as the template by the RNA polymerase (Clarke et al., 2018).

New evidence indicates that Cas9 should be removed by HLTf to initiate end processing (Reginato et al., 2024), as post-cleavage Cas9 complexes have been shown to impede DNA from MRE11 (Maltseva et al., 2023; Reginato et al., 2024). Concatenation reporter used in the present study has some unique properties. It could be applied in pronuclear microinjection and allows to inspect many end-joining events at once. We utilized the reporter in combination with Cas9 to study three parameters: transgene CN (DNA end accessibility), barcode recombination (DNA end participation in HR), and internal junctions (NHEJ/MMEJ DNA end processing).

The evaluation of the transgene CN by ddPCR and NGS indicated the absence of concatemers in the RNP⁺ experiments (E12, E21). Two potential explanations for the absence of concatemers in RNP⁺ can be postulated. Firstly, it is possible that Cas9 may block cleaved ends from processing by DNA repair factors, thereby preventing end resection and concatenation, which represents the primary mechanism of CN increase (Smirnov et al., 2020). Secondly, it may be that Cas9 is less active in cutting plasmid libraries, which would result in a reduction in the number of linear copies that integrate rarely and/or late in the zygote division. However, the RNP concentration used for pronuclear microinjection was higher than the average recommended by D.W. Harms et al. (2014). This concentration should have been sufficient to linearize the library (1400 DNA copies), as most genome-editing experiments using a lesser amount of RNP generally show high rates of genomic modifications.

Given the overall low copy number of the generated concatemers, the barcode recombination assay was not particularly informative. It is noteworthy that some embryos that tested positive by PCR or mCherry fluorescence did not produce barcodes from the NGS analysis. This indicates that the integrated copy/copies are damaged. While the mCherry cassette is located in the middle of the transgene, the ends of the transgenes are more susceptible to truncations that result in the loss of one or both barcodes. Barcode switching was detected (Fig. 6) and a barcode copying event, which also serves as an indicator of HR activity, was observed. The result of barcode switching (53 %) was not significantly different from that of the previous report (80 % recombined copies) (Smirnov et al., 2020). In conclusion, the presented evidence suggests that transgene copies prepared by *in vitro* Cas9

cleavage may engage in HR pathways during concatenation, in contrast to the copies from the RNP⁺ experiment.

The analysis of internal junctions revealed a typical assortment of Cas9-generated deletions, with occasional instances of nucleotide insertions (Schimmel et al., 2017). It is established that Cas9 produces heterogeneous ends due to endonucleolytic degradation of the DNA by endonuclease domains, with higher activity towards the PAM distal fragment (Stephenson et al., 2018). This may explain the observed asymmetry in deletions at the junctions (Fig. 7, with the PAM distal fragment to the right). It is noteworthy that intact junctions were observed with considerable frequency among the variants. It was not possible to ascertain with certainty whether the junctions originated from undigested vector or *de novo* ligation of blunt DNA ends. However, given that *in vitro* digested DNA was gel-purified (Fig. 2, linear fragment) and should not contain a significant proportion of undigested circular form, it was assumed that the latter was the case. These junction signatures differ from those typically generated by restriction enzymes in standard pronuclear microinjection experiments (Rohan et al., 1990; Dai et al., 2010). For example, in our previous study, we selected the BsmBI enzyme to linearize the barcoded vector and create 4 nt incompatible protruding 5'-ends. Following concatenation, transgene molecules exhibited a loss of approximately 5–10 nucleotides at the junction sites, with no discernible asymmetry (Smirnov et al., 2020).

In comparison to the barcoded library previously described (Smirnov et al., 2020), the pCAGGS-Cherry-based reporter exhibited a tenfold increase in barcode diversity and an extended barcode length (32 bp vs 17 bp). This allows for unambiguous interpretation of complex barcode recombination patterns, including the copying of a single barcode to multiple copies (Fig. 6). Nevertheless, in theory, the relatively low overall CN compared to other experiments (Smirnov et al., 2020) may indicate that the linear copies are impeded in their end recombination. In this instance, the absence of concatemers may be attributed to the augmented barcode length, which impedes homology search and head-to-tail end joining.

Conclusion

In conclusion, our findings demonstrate that the DNA ends generated by Cas9 *in vivo* undergo a distinct processing pathway compared to the “clean” ends. The microinjection of the barcoded library in combination with CRISPR endonucleases represents a fruitful assay that can be augmented further. This could be achieved, for example, by chemical modifications of the DNA ends or by co-injection of the NHEJ/HR factors. It would be beneficial to gain a deeper understanding of how Cas9 affects end recombination during concatenation, with the aim of preventing unwanted concatenation of donor molecules or stimulating end processing at the genomic site in the future.

References

- Abe T., Inoue K., Furuta Y., Kiyonari H. Pronuclear microinjection during S-phase increases the efficiency of CRISPR-Cas9-assisted knockin of large DNA donors in mouse zygotes. *Cell Rep.* 2020; 31(7):107653. doi 10.1016/j.celrep.2020.107653
- Clarke R., Heler R., MacDougall M.S., Yeo N.C., Chavez A., Regan M., Hanakahi L., Church G.M., Marraffini L.A., Merrill B.J. Enhanced bacterial immunity and mammalian genome editing via

- RNA-polymerase-mediated dislodging of Cas9 from double-strand DNA breaks. *Mol Cell*. 2018;71(1):42-55.e8. doi 10.1016/j.molcel.2018.06.005
- Cock P.J.A., Antao T., Chang J.T., Chapman B.A., Cox C.J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., De Hoon M.J.L. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*. 2009;25(11):1422-1423. doi 10.1093/bioinformatics/btp163
- Cock P.J.A., Fields C.J., Goto N., Heuer M.L., Rice P.M. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(6):1767-1771. doi 10.1093/nar/gkp1137
- Dai J., Cui X., Zhu Z., Hu W. Non-homologous end joining plays a key role in transgene concatemer formation in transgenic zebrafish embryos. *Int J Biol Sci*. 2010;6(7):756-768. doi 10.7150/ijbs.6.756
- Danner E., Lebedin M., De La Rosa K., Kühn R. A homology independent sequence replacement strategy in human cells using a CRISPR nuclease. *Open Biol*. 2021;11(1):200283. doi 10.1098/rsob.200283
- Gurtan A.M., Lu V., Bhutkar A., Sharp P.A. *In vivo* structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA*. 2012;18(6):1116-1122. doi 10.1261/rna.032680.112
- Harms D.W., Quadros R.M., Seruggia D., Ohtsuka M., Takahashi G., Montoliu L., Gurumurthy C.B. Mouse genome editing using the CRISPR/Cas system. *Curr Protoc Hum Genet*. 2014;83:15.7.1-15.7.27. doi 10.1002/0471142905.hg1507s83
- Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 2014;343(6176):1247997. doi 10.1126/science.1247997
- Maggio I., Holkers M., Liu J., Janssen J.M., Chen X., Gonçalves M.A.F.V. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci Rep*. 2014;4(1):5105. doi 10.1038/srep05105
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-826. doi 10.1126/science.1232033
- Maltseva E.A., Vasil'eva I.A., Moor N.A., Kim D.V., Dyrkheeva N.S., Kutuzov M.M., Vokhtantsev I.P., Kulishova L.M., Zharkov D.O., Lavrik O.I. Cas9 is mostly orthogonal to human systems of DNA break sensing and repair. *PLoS One*. 2023;18(11):e0294683. doi 10.1371/journal.pone.0294683
- Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 2014;156(5):935-949. doi 10.1016/j.cell.2014.02.001
- Reginato G., Dello Stritto M.R., Wang Y., Hao J., Pavani R., Schmitz M., Halder S., Morin V., Cannavo E., Ceppi I., Braunschier S., Acharya A., Ropars V., Charbonnier J.-B., Jinek M., Nussenzweig A., Ha T., Cejka P. HLTf disrupts Cas9-DNA post-cleavage complexes to allow DNA break processing. *Nat Commun*. 2024;15(1):5789. doi 10.1038/s41467-024-50080-y
- Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., Curie G.L., Corn J.E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol*. 2016;34(3):339-344. doi 10.1038/nbt.3481
- Rohan R.M., King D., Frels W.I. Direct sequencing of PCR-amplified junction fragments from tandemly repeated transgenes. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(20):6089-6095. doi 10.1093/nar/18.20.6089
- Sakuma T., Nakade S., Sakane Y., Suzuki K.-I.T., Yamamoto T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc*. 2016;11(1):118-133. doi 10.1038/nprot.2015.140
- Schimmel J., Kool H., Van Schendel R., Tijsterman M. Mutational signatures of non-homologous and polymerase theta-mediated end-joining in embryonic stem cells. *EMBO J*. 2017;36(24):3634-3649. doi 10.15252/embj.201796948
- Smirnov A., Fishman V., Yunusova A., Korablev A., Serova I., Skryabin B.V., Rozhdestvensky T.S., Battulin N. DNA barcoding reveals that injected transgenes are predominantly processed by homologous recombination in mouse zygote. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(2):719-735. doi 10.1093/nar/gkz1085
- Stephenson A.A., Raper A.T., Suo Z. Bidirectional degradation of DNA cleavage products catalyzed by CRISPR/Cas9. *J Am Chem Soc*. 2018;140(10):3743-3750. doi 10.1021/jacs.7b13050
- Suzuki K., Tsunekawa Y., Hernandez-Benitez R., Wu J., Zhu J., Kim E.J., Hatanaka F., Yamamoto M., Araoka T., Li Z., Kurita M., Hishida T., Li M., Aizawa E., Guo S., Chen S., Goebel A., Soligalla R.D., Qu J., Jiang T., Fu X., Jafari M., Esteban C.R., Berggren W.T., Lajara J., Nuñez-Delgado E., Guillen P., Campistol J.M., Matsuzaki F., Liu G.-H., Magistretti P., Zhang K., Callaway E.M., Zhang K., Belmonte J.C.I. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*. 2016;540(7631):144-149. doi 10.1038/nature20565
- Taheri-Ghahfarokhi A., Taylor B.J.M., Nitsch R., Lundin A., Cavallo A.-L., Madeyski-Bengtson K., Karlsson F., Clausen M., Hicks R., Mayr L.M., Bohlooly-Y.M., Maresca M. Decoding non-random mutational signatures at Cas9 targeted sites. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(16):8417-8434. doi 10.1093/nar/gky653
- Takeo T., Nakagata N. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl- β -cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab Anim*. 2010;44(2):132-137. doi 10.1258/la.2009.009074
- Takeo T., Nakagata N. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biol Reprod*. 2011;85(5):1066-1072. doi 10.1095/biolreprod.111.092536
- Takeo T., Hoshii T., Kondo Y., Toyodome H., Arima H., Yamamura K., Irie T., Nakagata N. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod*. 2008;78(3):546-551. doi 10.1095/biolreprod.107.065359

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

Received October 8, 2024. Revised November 21, 2024. Accepted December 10, 2024.

doi 10.18699/vjgb-25-05

Взаимосвязи основных признаков качества семян люпина узколистного из коллекции ВИР

Т.В. Шеленга , А.В. Саликова , В.С. Попов  , Г.П. Егорова , Л.Л. Малышев , М.А. Вишнякова 

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

 popovitaly@yandex.ru

Аннотация. Широкое использование люпина узколистного (ЛУ) в качестве кормовой и продовольственной культуры возможно при наличии сортов с высоким качеством семян. Приоритетным признаком для отнесения сортов ЛУ к этой категории считается низкое содержание алкалоидов. Однако не менее важные показатели качества семян люпина – содержание белка, масла и влажность. Впервые в отечественном люпиноведении предпринята попытка изучения взаимосвязей между показателями всех перечисленных ингредиентов семян ЛУ в условиях Северо-Запада РФ (г. Пушкин). Шестьдесят два образца из коллекции ВИР были изучены в 2019, 2020 и 2022 гг. Изменчивость содержания белка составила 27.8–37.6 %, масла – 3.9–7.3 %, алкалоидов – 1.6–2017.4 мг/100 г сухого вещества (с.в.), влажности – 6.4–7.3 %. Достоверная отрицательная корреляция между содержанием масла и белка (–0.33) наблюдалась только в 2019 г. Значимых корреляций между содержанием белка и алкалоидов в изученной выборке не найдено. Достоверная отрицательная связь между содержанием масла и суммой алкалоидов установлена только в 2019 и 2020 гг. (–0.38 и –0.27 соответственно). В 2022 г. связь не обнаружена. Очевидно, что для выявления закономерностей, характеризующих эти связи, требуется проведение многолетних экспериментов с учетом погодных условий. Доказано влияние погоды на концентрацию алкалоидов в семенах. Средняя по выборке сумма алкалоидов в 2019 г. составила 504.2 ± 77.7 мг/100 г с.в., в 2020 г. – 263.7 ± 38.6 мг/100 г с.в. и в 2022 г. – 319.8 ± 51.4 мг/100 г с.в. Подтверждены данные, полученные авторами ранее: содержание алкалоидов в семенах значительно возрастает при дефиците осадков. Температурный режим не оказал влияния на этот показатель. Повышенная температура воздуха способствовала накоплению масла, а увеличение осадков – накоплению белка. Влажность семян оказалась наиболее стабильным показателем, не зависящим от условий среды. Выявлены образцы с оптимальным сочетанием основных биохимических показателей, определяющих качество семян, для региональной селекции сортов ЛУ кормового и продовольственного назначения, а также сидеральных сортов.

Ключевые слова: люпин узколистный; алкалоиды; белок; масло; влажность семян; погодные условия.

Для цитирования: Шеленга Т.В., Саликова А.В., Попов В.С., Егорова Г.П., Малышев Л.Л., Вишнякова М.А. Взаимосвязи основных признаков качества семян люпина узколистного из коллекции ВИР. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):35-43. doi 10.18699/vjgb-25-05

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № FGEM-2022-0002 «Выявление возможностей генофонда бобовых культур для оптимизации их селекции и диверсификации использования в различных отраслях народного хозяйства».

Interrelations between the main seed quality characteristics of narrowleaf lupine from the VIR collection

T.V. Shelenga , A.V. Salikova , V.S. Popov  , G.P. Egorova , L.L. Malyshev , M.A. Vishnyakova 

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

 popovitaly@yandex.ru

Abstract. The widespread use of narrowleaf lupine (NLL, *Lupinus angustifolius* L.) as a feed and food crop requires source material for breeding cultivars with high-quality seeds. The priority criterion for attributing NLL cultivars to the feed or food category is the content of alkaloids. At the same time, equally important seed quality indicators are the protein and oil content, as well as moisture content, which determines the possibility of long-term storage of seeds. For the first time in Russian lupine science, an attempt was made to study the relationships between all the listed characteristics of narrowleaf lupine seeds under the conditions of Northwest Russia (Pushkin town). Sixty-two accessions from the VIR collection were studied in 2019, 2020 and 2022. The range of variability of the studied characteristics was 27.8–37.6 % for protein, 3.9–7.3 % for oil, 1.6–2017.4 mg/100 g of dry matter (D.M.) for alkaloids, and 6.4–7.3 % for moisture. A significant negative correlation between the oil and protein content (–0.33) was observed only in 2019. No significant correlations between the protein and alkaloid content were found in the studied sample. Significant negative relation-

ships were identified between the content of oil and alkaloids only in 2019 and 2020 (–0.38 and –0.27, respectively). In 2022, no correlations were identified. Obviously, the identification of regularities in these correlations requires many years of research taking into account weather conditions. The influence of weather on the concentration of alkaloids in seeds has been proven. The average amount of alkaloids for the sample in 2019 was 504.2 ± 77.7 mg/100 g D.M., 263.7 ± 38.6 mg/100 g D.M. in 2020, and 319.8 ± 51.4 mg/100 g D.M. in 2022. It confirmed the data previously obtained by the authors that the content of alkaloids in seeds increases significantly along with the precipitation deficiency. The temperature regime during this research did not affect this indicator. An increased air temperature contributed to the accumulation of oil, and an increase in precipitation contributed to the accumulation of protein. The most stable indicator independent of environmental conditions was the seed moisture. Accessions with the optimal combination of the main biochemical parameters that determine seed quality have been identified for breeding narrowleaf lupine cultivars in the region in question for feed and food purposes, as well as for green manure.

Key words: narrowleaf lupine; alkaloids; protein; oil; seed moisture; weather conditions.

For citation: Shelenga T.V., Salikova A.V., Popov V.S., Egorova G.P., Malyshev L.L., Vishnyakova M.A. Interrelations between the main seed quality characteristics of narrowleaf lupine from the VIR collection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):35-43. doi 10.18699/vjgb-25-05

Введение

Люпин узколистый (ЛУ) (*Lupinus angustifolius* L.) – адаптированная к относительно северным районам зернобобовая культура, важный источник растительного белка и аминокислот, универсальный ингредиент кормов для сельскохозяйственных животных и перспективная составляющая рациона человека. Главный лимитирующий фактор использования ЛУ для этих целей – наличие в семенах и зеленой массе хинолизидиновых алкалоидов (ХА), придающих им горечь. В 1930-х гг., после открытия низкоалкалоидных мутантов (Sengbusch, 1931), было начато создание сортов с низким содержанием алкалоидов.

Эти сорта как ранее в СССР, так и сейчас в РФ создавались и создаются на основе образцов из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова, которые являются источниками ценных признаков. В настоящее время в нашей стране селекция ЛУ развивается достаточно активно (Егорова и др., 2017). В Государственный реестр селекционных достижений на 2023 г. включено 29 сортов, все они относятся к сортам отечественной селекции (Государственный реестр..., 2023). Селекция ведется по двум направлениям, связанным с кормовым и сидеральным использованием сортов. К примеру, в Ленинградском НИИСХ «Белогорка» на базе коллекции ВИР совместно с его сотрудниками созданы низкоалкалоидный сорт Белогорский 310 (кормовой) и высокоалкалоидный сорт Олигарх (сидеральный) (Егорова и др., 2017).

По стандартам, принятым в некоторых европейских странах и в Австралии, содержание алкалоидов в семенах (алкалоидность), предназначенных для пищевого и кормового назначения, не должно превышать 0.02 % их сухого веса (с. в.) (Frick et al., 2017). В РФ для сортов кормового люпина допустимый уровень содержания алкалоидов составляет 0.1–0.3 % с. в. (ГОСТ Р 54632-2011, 2013), а для продовольственного люпина по существующим техническим условиям, разработанным во ВНИИ люпина, – 0.04 % с. в. (ТУ-9716-004-0068502-2008). В повседневной практике содержание алкалоидов в семенах на уровне 0.05 % считают пограничным значением для отличия низко- и высокоалкалоидных форм (Lee et al., 2007).

Наряду с содержанием алкалоидов, качество семян ЛУ определяется и другими показателями, основные из которых – белок и масло. Содержание белка в семенах лю-

пина узколистого из коллекции ВИР зафиксировано на уровне 34–36 % (Егорова и др., 2019). Содержание масла в коллекции ЛУ варьирует в пределах 6.5–8.4 % (Бенкен и др., 1993).

Высокобелковые сорта с низким содержанием алкалоидов особенно ценны тем, что не только зерно, но и зеленая масса поедаются всеми видами сельскохозяйственных животных. Люпин употребляют свежескошенным, в виде комбикормов, силоса, сенажа, зерносенажа, дерти (Купцов, Такунов, 2006).

Масло люпина считается функциональным ингредиентом и ценным источником пищевых жиров. В его составе присутствует большое количество олеиновой, линолевой и линоленовой жирных кислот, токоферолов, каротиноидов, триглицеридов, триацилглицеролов. Масло горьких сортов содержит большое количество фенольных соединений, хотя и обладает более низкой антиоксидантной активностью по сравнению с маслом сладкого люпина (Siger et al., 2017).

Исходя из вышесказанного, чтобы рекомендовать образцы в качестве исходного материала для создания кормовых и продовольственных сортов, недостаточно оценивать коллекцию люпина только по содержанию алкалоидов. Необходимы образцы с сочетанием высокого содержания белка, масла и низкого содержания алкалоидов. Также важным признаком качества семян является их влажность, определяющая пригодность семян к хранению и переработке (ГОСТ Р 52325-2005; Wang et al., 2001).

Насколько сочетаемы в одном генотипе оптимальные значения этих признаков, какова закономерность связей между ними и их изменчивость в генофонде и насколько они зависимы от условий выращивания? К сожалению, ответы на эти вопросы в мировой научной литературе фрагментарны и неоднозначны. Целью данной статьи стало обобщение результатов биохимического анализа выборки образцов из коллекции ЛУ ВИР по комплексу признаков: содержанию белка, масла, алкалоидов и влажности в семенах растений, репродуцируемых в течение трех лет в г. Пушкин (Пушкинский район г. Санкт-Петербурга, Северо-Запад РФ), определение степени изменчивости исследуемых признаков, их зависимости от погодных условий региона репродукции и выявление исходного материала для селекции на высокое качество семян.

Материалы и методы

Растительный материал и условия его выращивания.

Объектом исследования служила выборка из 62 образцов ЛУ из коллекции ВИР, созданная по принципу репрезентативности селекционного статуса и алкалоидности. Образцы выращивали в 2019, 2020 и 2022 гг. на полях научно-производственной базы «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (г. Пушкин, Пушкинский район г. Санкт-Петербурга, 59°42'45.5"N 30°25'05.8"E) согласно методике, принятой для зернобобовых культур (Вишнякова и др., 2018). Район выращивания относится к атлантико-континентальной области умеренного климатического пояса.

Погодные условия в годы исследования сильно варьировали (рис. S1, а, б)¹. Наиболее холодным был 2020 г., однако температура в июне этого года несколько превышала средние многолетние значения. Среднемесячная температура воздуха в июне и августе 2022 г. значительно превышала средние многолетние данные. За годы изучения отмечалось неравномерное выпадение осадков. Количество осадков, выпавшее в июне 2019 г., было в 3 раза меньше, чем за этот же месяц в 2020 и 2022 гг., а в августе 2019 г. – меньше почти в 2 раза. Сумма осадков в июле и августе 2020 и 2022 гг. превышала средние многолетние значения. Наибольшее количество осадков за годы изучения отмечено в августе 2022 г. (см. рис. S1, а).

Методы. Содержание алкалоидов определяли на газовом хроматографе Agilent 6850, сопряженном с масс-спектрометром Agilent 5975 (Agilent Technologies, США), в экстрактах, полученных путем последовательного добавления этилацетата и водного раствора гидроксида натрия к образцам муки ЛУ. В качестве внутреннего стандарта применяли раствор кофеина (Kushnareva et al., 2020; Вишнякова и др., 2023). Содержание белка, масла и влажность в образцах муки семян ЛУ определяли по разработанным калибровочным моделям методом инфракрасной спектроскопии (ИК) ближнего диапазона на ИК-анализаторе Matrix-1 (Bruker, Германия) (Попов и др., 2024).

Для проведения статистической обработки результатов, полученных в 2019, 2020 и 2022 гг., выборки образцов были выровнены до 40 штук, образцы выбирали рандомизированно. Статистическая обработка была проведена с использованием пакета прикладных программ Statistica 12.0 (StatSoft, Inc. (2019), www.statsoft.com) и включала вычисление основных описательных статистик (среднее значение, ошибка среднего значения и коэффициент вариации); дисперсионный анализ для оценки достоверности различий между образцами разных лет репродукции с вычислением наименьшей существенной разницы при $p = 0.05$; вычисление коэффициентов ранговой корреляции между содержанием алкалоидов и других биохимических показателей в различные годы жизни для оценки стабильности проявления признаков у образцов; факторный анализ системы корреляции биохимических признаков.

Результаты

К полученным ранее результатам содержания алкалоидов в семенах изучаемой выборки ЛУ в 2019–2020 гг. в данном исследовании была добавлена оценка этого признака в 2022 г. (табл. S1). Поскольку этот признак очень зависит от погоды (Вишнякова и др., 2023), результаты третьего года изучения делают картину более объективной.

Качественный состав ХА, характерный для *L. angustifolius* и определенный для образцов изучаемой выборки ранее, стабилен. Доминирует алкалоид люпинин, далее в убывающей последовательности расположены 13-гидроксилупинин, спартеин, ангустифолин и изолупинин (Kushnareva et al., 2020). Средние многолетние значения содержания ХА составили (мг/100 г с. в.): для люпинина – 252.9, 13-гидроксилупинина – 40.3, спартеина – 27.8, ангустифолина – 4.6, изолупинина – 2.9, для суммы алкалоидов – 328.5 (см. табл. S1). Изменчивость (CV) содержания алкалоидов превышала 100 % (табл. S2).

Средняя по выборке сумма алкалоидов (мг/100 г с. в.) была максимальной в 2019 г. – 504.2 ± 77.7 , промежуточной в 2022 г. – 319.8 ± 51.4 и минимальной в 2020 г. – 263.7 ± 38.6 (см. табл. S2). В 2019 г. показатели для отдельных алкалоидов и их суммы превышали средние за три года, в 2020 и 2022 гг. они были ниже средних многолетних величин. Максимальное значение в 2019 г. составило 2017.4 мг/100 г с. в., минимальное в 2022 г. – 1.6 мг/100 г с. в. Коэффициенты варьирования содержания как индивидуальных алкалоидов, так и их суммы оказались очень высокими ($CV = 112.4–124.6$ % для суммы ХА). Аномальный разброс значений ($CV > 100$ %) свидетельствует о большом разнообразии изучаемых образцов по содержанию алкалоидов (рис. 1, а).

Колесание диапазонов изменчивости содержания отдельных алкалоидов в семенах ЛУ за годы изучения с учетом высокого CV дает возможность предположить значительное влияние на эти признаки погодных условий. Однако количественное соотношение отдельных алкалоидов сохранялось. В течение трех лет самые высокие показатели были у люпинина, средние – у 13-гидроксилупинина и спартеина, минимальные – у ангустифолина и изолупинина.

Средние показатели содержания белка, масла и влажности семян за три года составили 31.9, 5.2 и 6.9 % соответственно. Они оказались более стабильными по сравнению с ХА (табл. S3). Показатели белка и влажности семян люпина мало зависели от погодных условий и характеризовались низкой степенью изменчивости ($CV < 10$ %). Содержание масла в семенах ЛУ имело среднюю степень изменчивости ($10\% < CV \approx 20\%$). В 2019 г. при наиболее высоком содержании алкалоидов отмечались самые низкие значения белка и масла. В 2020 г. отмечены минимальные показатели для алкалоидов, максимальные – для белка и средние – для масла. В 2022 г. промежуточным значениям для алкалоидов соответствовали промежуточные значения для белка и максимальные – для масла. Видимых колебаний в содержании влаги в семенах ЛУ за период проведения опыта не выявлено (см. рис. 1, б, см. табл. S2).

¹ Рис. S1 и табл. S1–S4 см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx2.pdf>

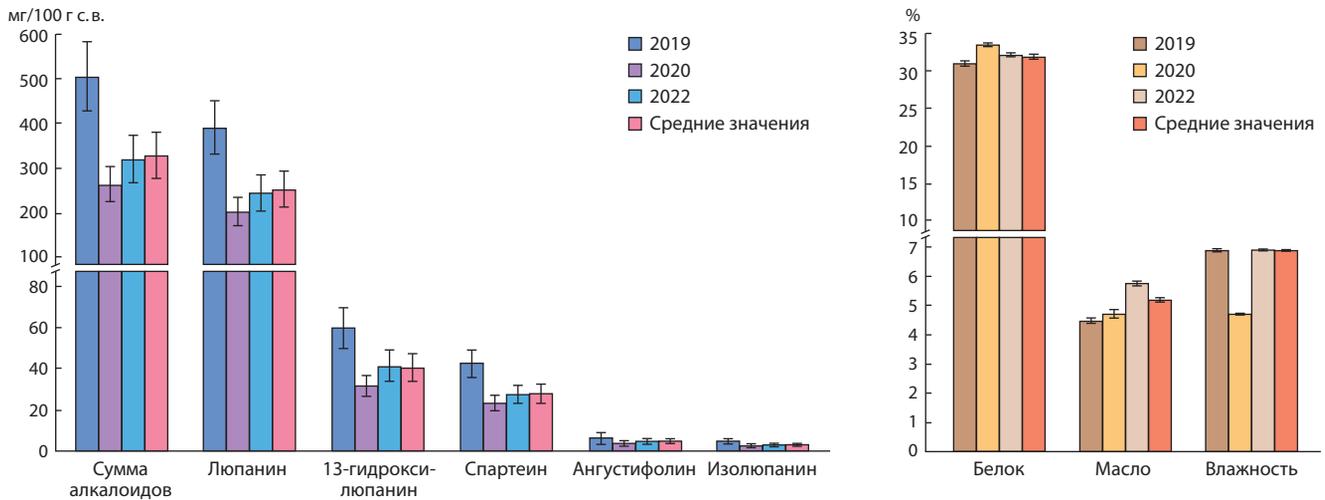


Рис. 1. Содержание в семенах люпина узколистного (а) алкалоидов; (б) белка, масла, влаги.

Представлены средние, минимальные, максимальные значения показателей за 2019, 2020 и 2022 гг. и средние показатели за три года. г. Пушкин, Пушкинский район г. Санкт-Петербурга.

Анализ полученных результатов показал, что семена образцов 2019, 2020, 2022 гг. репродукции достоверно отличаются по содержанию люпанина, спартеина, сумме всех алкалоидов, белка и масла. Разница, близкая к достоверной, наблюдалась для значений ангустифолина и изолүпанина. Отличия образцов ЛУ по содержанию 13-гидроксилүпанина и влаги оказались недостоверными. Коэффициент ранговой корреляции (табл. S4) показал достоверное совпадение степени алкалоидности образцов ЛУ разных лет репродукции с их алкалоидным статусом (низко- и высокоалкалоидные формы). Таким образом, можно утверждать, что показатели содержания отдельных алкалоидов и их сумма – это признаки, порядок величин которых определяется особенностями самого образца (генотипом), а сама величина – влиянием абиотических факторов.

Концентрация отдельных алкалоидов и их общее содержание в семенах ЛУ в 2019 г. было достоверно выше, чем в 2020 и 2022 гг. (см. рис. 1, а, табл. S4). Показатели белка были достоверно выше в 2020 г., а масла – в 2022 г. (см. рис. 1, б, табл. S4). Достоверных различий по содержанию влаги между репродукциями ЛУ разных лет не выявлено (см. рис. 1, б, табл. S4). Установлено, что показатели белка в 2020 г., белка и масла в 2022 г. были выше средних трехлетних значений, а масла в 2020 г., белка и масла в 2019 г. – ниже. Влажность семян за все годы изучения практически соответствовала средним многолетним данным.

В 2022 г. подтверждена тесная связь между содержанием отдельных алкалоидов, а также между содержанием отдельных алкалоидов и их суммой во все годы изучения (0.87 и более). Подобная зависимость была установлена нами ранее для 2019 и 2020 гг. (Вишнякова и др., 2023). В 2019 г. наблюдалась достоверная отрицательная связь средней силы между показателями масла и алкалоидов (от -0.35 до -0.42), масла и белка (-0.33). В 2020 г. направление связи между содержанием масла и алкалоидов, масла и белка сохранялось, но она стала слабее, ее до-

стоверность была подтверждена только для люпанина, спартеина и суммы алкалоидов, имеющих максимальные абсолютные значения концентрации. В 2022 г. обратная связь, близкая к достоверной, сохранилась только для люпанина (-0.23). Между влажностью семян и спартеином в 2019 г., между влажностью и содержанием белка и масла в 2020 г. наблюдалась прямая достоверная корреляция (0.27, 0.30, 0.29 соответственно). В 2019 г. выявлена достоверная отрицательная корреляция между содержанием влаги и люпанином, спартеином, суммой алкалоидов (-0.29 , -0.34 , -0.29 соответственно), отрицательная корреляция, близкая к достоверной, между влажностью и 13-гидроксилүпанином (-0.25). Между содержанием белка и показателями алкалоидов значимые корреляции отсутствуют (см. таблицу).

При анализе влияния погодных условий на биохимические характеристики семян ЛУ был подтвержден установленный нами ранее факт, что недостаточное количество осадков способствует накоплению основного алкалоида люпанина и суммы алкалоидов (Вишнякова и др., 2023). Эти два показателя связаны с общим количеством осадков, выпавших за вегетационный период, о чем свидетельствует достоверная отрицательная корреляция (-0.996 и -0.997 соответственно). Особенно ощутимый недостаток осадков наблюдался в июне и августе 2019 г. (58 и 25 мм соответственно). Экстремально малое для региона количество осадков в этот период (см. рис. S1, а) выразилось в максимальном накоплении люпанина и суммы алкалоидов в 2019 г. (см. рис. 1, а, табл. S2).

Повышенная температура воздуха благоприятствовала накоплению масла, увеличение осадков – накоплению белка в семенах ЛУ. Содержание масла и средние показатели температуры воздуха, содержание белка и количество осадков связаны достоверной положительной корреляцией (0.96).

Факторный анализ системы корреляций позволяет свести многомерное пространство признаков к пространству меньшей размерности, в котором оси координат (факторы)

Таблица. Корреляционная и факторная структура изменчивости биохимических показателей семян образцов люпина узколистного за 2019, 2020 и 2022 гг.

Показатель	Сокращенное название	Год	Л	Г	С	А	И	СА	Белок	Масло	Влажность
Люпанин	Л	2019	1.000	0.968	0.958	0.973	0.945	1.000	-0.064	-0.370	0.199
13-гидроксилупанин	Г		0.001	1.000	0.896	0.956	0.926	0.973	0.027	-0.422	0.193
Спартеин	С		0.001	0.001	1.000	0.939	0.876	0.960	-0.061	-0.354	0.271
Ангустифолин	А		0.001	0.001	0.001	1.000	0.908	0.975	-0.057	-0.376	0.196
Изолюпанин	И		0.001	0.001	0.001	0.001	1.000	0.944	0.083	-0.421	0.137
Сумма алкалоидов	СА		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	1.000	-0.051	-0.379	0.205
Белок			0.696	0.867	0.711	0.727	0.613	0.755	1.000	-0.335	-0.226
Масло		0.019	0.007	0.025	0.017	0.007	0.016	0.035	1.000	-0.154	
Влажность		0.219	0.232	0.091	0.225	0.399	0.204	0.161	0.341	1.000	
Люпанин	Л	2020	1.000	0.941	0.959	0.956	0.969	0.999	-0.118	-0.289	-0.177
13-гидроксилупанин	Г		0.001	1.000	0.874	0.936	0.938	0.955	-0.152	-0.177	-0.160
Спартеин	С		0.001	0.001	1.000	0.916	0.950	0.961	-0.055	-0.258	-0.183
Ангустифолин	А		0.001	0.001	0.001	1.000	0.960	0.962	-0.106	-0.152	-0.067
Изолюпанин	И		0.001	0.001	0.001	0.001	1.000	0.975	-0.083	-0.219	-0.130
Сумма алкалоидов	СА		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	1.000	-0.118	-0.271	-0.175
Белок			0.430	0.307	0.713	0.480	0.581	0.428	1.000	-0.066	0.303
Масло		0.049	0.233	0.080	0.308	0.138	0.066	0.662	1.000	0.289	
Влажность		0.235	0.282	0.219	0.653	0.384	0.241	0.038	0.049	1.000	
Люпанин	Л	2022	1.000	0.940	0.935	0.958	0.931	0.998	0.108	-0.229	-0.290
13-гидроксилупанин	Г		0.000	1.000	0.875	0.924	0.889	0.956	0.072	-0.143	-0.250
Спартеин	С		0.000	0.000	1.000	0.898	0.889	0.944	0.144	-0.187	-0.338
Ангустифолин	А		0.000	0.000	0.000	1.000	0.936	0.962	0.090	-0.193	-0.208
Изолюпанин	И		0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.935	0.135	-0.179	-0.220
Сумма алкалоидов	СА		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.107	-0.215	-0.290
Белок			0.430	0.599	0.290	0.510	0.323	0.433	1.000	-0.080	-0.189
Масло		0.090	0.292	0.168	0.154	0.187	0.112	0.559	1.000	0.057	
Влажность		0.030	0.063	0.011	0.125	0.104	0.030	0.162	0.677	1.000	
			Достоверная положительная связь								
			Близкая к достоверной отрицательная связь								
			Достоверная отрицательная связь								
			Диагональный элемент								

Примечание. Сверху от диагонального элемента приведены значения коэффициента корреляции r , снизу – уровень доверительной вероятности.

представляют собой центр сгущения коррелирующих между собой признаков. Факторы при этом являются скрытыми переменными, влияющими на наблюдаемые признаки. В структуре варьирования за три года изучения были выделены два фактора, которые в сумме описывали 77.7 % изменчивости. С первым фактором (*Factor 1*, дисперсия 65.2 %) связано варьирование показателей, характеризующих содержание алкалоидов. Со вторым фактором (*Factor 2*, дисперсия 12.5 %) отрицательно коррелирует содержание белка и положительно – влаги и масла в семенах ЛУ (рис. 2). В правой части графика

сгруппированы показатели алкалоидов: люпанина, 13-гидроксилупанина, спартеина, изолюпанина, ангустифолина и их суммарное содержание. Скорее всего, на такой характер группировки влияет единая сеть метаболических превращений данных соединений. Показатели содержания белка, масла и влаги, сосредоточенные в левой части рисунка, разбросаны довольно широко, что свидетельствует об отсутствии тесной связи между ними.

Вычисленные в ходе анализа собственные значения факторов для каждого образца ЛУ были использованы для описания общей картины изменчивости признаков

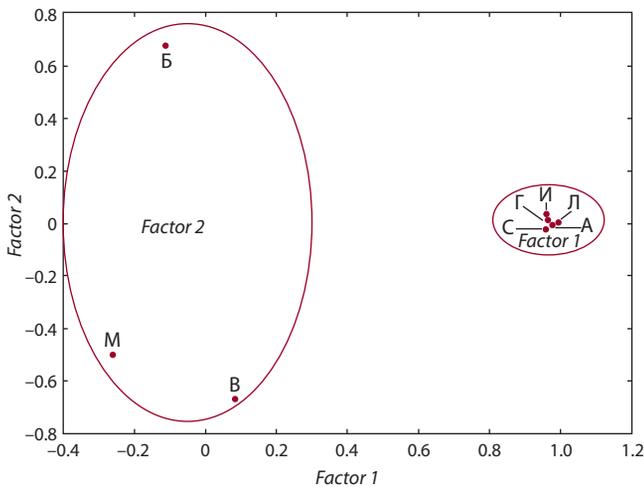


Рис. 2. Факторная структура изменчивости средних значений биохимических показателей, определяющих качество образцов семян ЛУ в 2019, 2020, 2022 гг.

Б – белок, М – масло, В – влажность, И – изолюпанин, Г – 13-гидроксилупанин, С – спартеин, Л – люпанин, А – ангустифолин.

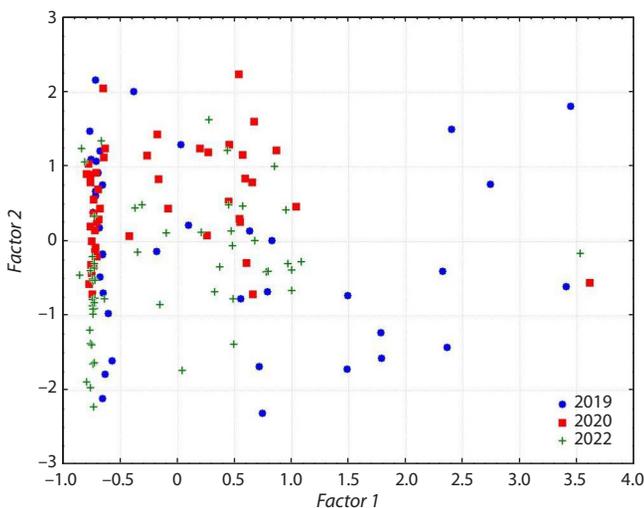


Рис. 3. Положение образцов ЛУ в пространстве выделенных факторов в 2019, 2020, 2022 гг.

за периоды исследования (рис. 3). В 2019 г. наблюдалась более высокая степень дисперсии как по первому (*Factor 1*), так и по второму (*Factor 2*) фактору. В 2020 и 2022 гг. разброс образцов в факторном пространстве уменьшился, они группировались в основном в левой верхней, средней и частично в левой нижней его части, что объясняется уменьшением показателей содержания алкалоидов, меньшим размахом их изменчивости и увеличением содержания белка и масла по сравнению с 2019 г.

Поскольку получение низкоалкалоидных форм уже давно стало приоритетным направлением селекции люпина, мы уделили особое внимание источникам этого признака в изученной выборке. Были отобраны 24 образца с концентрацией алкалоидов в семенах не более 20–40 мг/100 г с. в. и 7 образцов с содержанием алкалоидов не более 40 мг/100 г с. в. Из этих образцов 16 имели

высокое содержание белка (выше 30 %), 11 – высокое содержание масла (выше 5 %) (см. табл. S1). Сочетание в одном генотипе низкой концентрации алкалоидов и высокого содержания белка и масла характеризует его как источник высокого качества семян для селекции региональных сортов ЛУ как кормового, так и продовольственного назначения. В выделенную нами группу вошли отечественные и зарубежные сорта и линии ЛУ: к-3172 (ГЛ-396, Беларусь), 3329 (Линия 7, Россия), 3502 (L-155, Польша), 3503 (Мутант 2, Россия), 3563 (Rommel, ЮАР), 3627 (Дикаф-1, Россия), 3816 (Ладный 7, Россия), а также один дикорастущий образец ЛУ к-3457 (GRC-5008 А, Греция).

В качестве исходного материала для создания сидеральных сортов можно рекомендовать образцы ЛУ, в семенах которых сумма алкалоидов превышала 1000 мг/100 г с. в. (см. табл. S1). В эту группу вошли в основном зарубежные сорта и линии ЛУ: к-96 (местный, Украина), 1526 (местный, Украина), 2183 (IGRIS, Польша), 3562 (Slapska, Чехословакия), 3623 (18 86A250-2-4 EX LR2, Австралия), 3814 (Олигарх, Россия).

Высокоалкалоидный сорт Олигарх (к-3814) селекции Ленинградского НИИСХ «Белогорка» может быть использован в качестве сырья для производства лекарственных средств и создания новых фармакологически значимых сортов ЛУ. В нашем исследовании у него зафиксированы следующие максимальные значения содержания алкалоидов (мг/100 г с. в.): люпанина – 1487.3, 13-гидроксилупанина – 338.7, спартеина – 142.8, ангустифолина – 38.6, изолюпанина – 21.0 (см. табл. S1). Как известно, ЛУ может быть продуцентом алкалоидов для их применения в фармакологии и медицине (Vishnyakova et al., 2020).

Обсуждение

Результаты трехлетней оценки основных биохимических признаков, определяющих качество семян ЛУ, при выращивании образцов коллекции ВИР в условиях Северо-Запада РФ выявили значительную изменчивость в содержании алкалоидов. Это связано как с генетической детерминацией, так и с влиянием условий среды. Зависимость этого признака от погодных факторов была показана нами ранее (Вишнякова и др., 2023). В нашем опыте степень варибельности была низкой для белка и средней для масла. Влажность семян оказалась самым стабильным признаком. При уборке влажность семян составляет около 15 %. Перед закладкой на хранение ее значение, согласно ГОСТ Р 52325-2005 (2015), не должно превышать 10 %.

Полученные данные подтвердили сохранение алкалоидного статуса низко- и высокоалкалоидных форм для образцов ЛУ разных лет репродукции; значения содержания отдельных алкалоидов, их сумма и соотношение определяются генотипом, а их изменчивость – погодой в годы репродукции. Подтвержден факт повышения количества алкалоидов в семенах в засушливых условиях (Вишнякова и др., 2023). Установлена достоверная отрицательная корреляция между содержанием алкалоидов и количеством осадков.

Влияние погодных условий на содержание алкалоидов в семенах люпина отмечено в разных регионах. В РФ данный феномен наблюдали в Ярославской области

(Таран, Цвик, 2017) и Юго-Западной зоне Центрального региона (Агеева, Почутина, 2018). В условиях Дании при воздействии засухи на три сорта ЛУ количество алкалоидов в зеленой массе на вегетативной стадии растений (до цветения) однозначно повышалось, затем генотипы реагировали на засуху как повышением, так и понижением количества алкалоидов (Christiansen et al., 1997). Мы полагаем, что сравнение этих результатов может быть корректным только при оценке одних и тех же органов растений (вегетативная масса или семена), содержание алкалоидов в которых различно, а также стадий онтогенеза, на которых проводили исследование.

Принято считать, что синтез ХА у ЛУ происходит в хлоропластах молодых листьев (Wink, 1991, 1993; Wink et al., 1995). Наиболее активное их накопление начинается на стадии бутонизации (Maknickienė, Asakavičiūtė, 2008). Показано, что экспрессия известных к настоящему времени семи генов-кандидатов, участвующих в синтезе ХА, и самих алкалоидов определяется во всех тканях растений на стадии бутонизации (Czepiel et al., 2021). Однако наличие алкалоидов в тканях растений обнаруживается уже в молодых проростках, куда они попадают из прорастающих семян (De Cortes Sánchez et al., 2005), т.е. однозначного ответа о месте и времени начала синтеза алкалоидов у ЛУ пока нет. Очевидно, что подавляющая часть ХА образуется в зеленых тканях надземных органов (Frick et al., 2017) с небольшим вкладом корней (Lee et al., 2007). Ко времени формирования бобов алкалоиды по флоэме поступают в репродуктивные органы (Вишнякова, Крылова, 2022). Из этого следует, что начало многоэтапного синтеза ХА у люпина и время их накопления в семенах разделены в пространстве и времени. В этот процесс включены многочисленные ферменты, транспортеры, регуляторы. Однако в зрелых семенах, содержащих алкалоиды, экспрессия генов, вовлеченных в синтез алкалоидов, не наблюдается (Czepiel et al., 2021), т.е. в них происходит только процесс накопления. Поэтому очевидно, что наиболее уязвимые периоды для воздействия стрессоров на содержание алкалоидов – это их синтез и транспорт. Влияние ранней засухи на резкое увеличение алкалоидов у ЛУ уже хорошо доказано (Frick et al., 2018). В нашем исследовании наиболее засушливые условия в 2019 г. приходились на июнь (время бутонизации, синтез алкалоидов) и август (поступление алкалоидов в формирующиеся семена). В целом за период изучения нами была установлена достоверная отрицательная связь между количеством осадков за весь вегетативный период и содержанием основного алкалоида люпинина, а также суммой алкалоидов в семенах ЛУ (-0.996 , -0.997 соответственно).

Увеличение концентрации алкалоидов под воздействием засухи используют при их промышленном получении из растений-продуцентов, представителей рода *Nicotiana*, *Papaver somniferum* и *Catharanthus roseus* (Waller, Nowacki, 1978; Szabó et al., 2003; Jaleel et al., 2007; Amirjani, 2013). Растения специально подвергают этому стрессу для увеличения выхода алкалоидов (Kleinwächter, Selmar, 2015).

Следует отметить, что зафиксированное почти двукратное возрастание средней по выборке концентрации алка-

лоидов в 2019 г. по сравнению с 2020 г. характерно только для сильно- и среднеалкалоидных образцов. У образцов с содержанием алкалоидов меньше 0.05 % этот показатель менялся незначительно во все три года изучения. Низкоалкалоидные образцы были стабильны в проявлении признака и не переходили в статус высокоалкалоидных под влиянием погодных условий.

Температурный фактор не оказал влияния на содержание алкалоидов в семенах ЛУ в нашем исследовании, но повышенная температура воздуха способствовала накоплению масла, а осадки – накоплению белка.

В изученной нами выборке достоверная отрицательная корреляция между содержанием белка и содержанием масла (-0.33) наблюдалась только в 2019 г. Сильная отрицательная связь (-0.96 , $p < 0.01$) между содержанием этих метаболитов в семенах показана в работе австралийских ученых, изучавших шесть сортов ЛУ в условиях 55 локаций в Западной Австралии (Cowling, Tarr, 2004). Однако положительная связь между содержанием белка и масла была отмечена при изучении других видов люпина из коллекции ВИР, репродуцированных в условиях Северо-Запада РФ (Егорова и др., 2019). Можно предположить, что эти связи проявляются по-разному в зависимости от погодных условий.

Значимых корреляций между содержанием белка и алкалоидов в изученной нами выборке не обнаружено. Между тем у 126 образцов белого люпина (*L. albus* L.) из коллекции Pullman (Вашингтон, США), ранжированных на шесть классов по степени алкалоидности, установлено более высокое содержание белка в семенах из группы высокоалкалоидных образцов (Staples et al., 2017). Достоверная отрицательная связь между содержанием масла и алкалоидов в нашей работе выявлена только в 2019 и 2020 гг. (-0.38 и -0.27 соответственно). В 2022 г. связь не обнаружена. Полагаем, что для поиска закономерностей требуются многолетние исследования с учетом погодных условий. Влажность семян в нашем эксперименте оказалась наиболее стабильным показателем, не зависящим от условий среды.

Заключение

Впервые в условиях Северо-Запада РФ изучены взаимосвязи между основными показателями качества семян ЛУ (содержанием алкалоидов, белка, масла, уровнем влажности) и влиянием на них погодных условий. Установлены лимиты изменчивости этих признаков. Отмечено отсутствие значимых корреляций между содержанием белка и масла, белка и алкалоидов. Достоверная отрицательная связь между содержанием масла и алкалоидов выявлена только в 2019 и 2020 гг. Очевидно, что поиск закономерностей для этих связей требует многолетних экспериментов с учетом погодных условий. Доказано влияние погоды на концентрацию алкалоидов в семенах, а именно на значительное ее повышение в засушливых условиях. Температурный режим в нашем эксперименте на этот показатель не влиял. Повышенная температура воздуха способствовала накоплению масла, а увеличение осадков – накоплению белка. В исследуемой выборке выявлены образцы, сочетающие необходимые показате-

ли основных (белка и масла) и вторичных (алкалоидов) метаболитов, определяющих качество семян ЛУ, для использования в качестве исходного материала для получения новых районированных сортов пищевого, кормового, сидерального и фармацевтического назначения.

Список литературы / References

- Агеева П.А., Почутина Н.А. Результаты испытания сортов узколистного люпина. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2018; 27(3):77-81. doi 10.24411/2309-348X-2018-11037 [Ageeva P.A., Pochutina N.A. Results of the narrowleafed lupin variety testing. *Zernobobovye i Krupnye Kul'tury = Legumes and Groat Crops*. 2018;27(3):77-81. doi 10.24411/2309-348X-2018-11037 (in Russian)]
- Бенкен И.И., Курлович Б.С., Картузова Л.Т., Никишкина М.А., Власов В.А., Кутузова Е.А., Назарова Н.С., Пилипенко С.И., Рыбникова В.А. Люпин узколистный – *Lupinus angustifolius* L. (Биохимическая характеристика образцов). В: Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 637. СПб., 1993 [Benken I.I., Kurlovich B.S., Kartuzova L.T., Nikishkina M.A., Vlasov V.A., Kutuzova E.A., Nazarova N.S., Pilipenko S.I., Rybnikova V.A. Narrow-leaved lupine – *Lupinus angustifolius* L.: Biochemical characterization of specimens. In: VIR World Collection Catalog. Iss. 637. St. Petersburg, 1993 (in Russian)]
- Вишнякова М.А., Сеферова И.В., Буравцева Т.В., Бурляева М.О., Семенова Е.В., Филипенко Г.И., Александрова Т.Г., Егорова Г.П., Яньков И.И., Булынецов С.В., Герасимова Т.В., Другова Е.В. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение. Методические указания. СПб.: ВИР, 2018. doi 10.30901/978-5-905954-79-5 [Vishnyakova M.A., Seferova I.V., Buravtseva T.V., Burlyayeva M.O., Semenova E.V., Filipenko G.I., Aleksandrova T.G., Egorova G.P., Yankov I.I., Bulynstev S.V., Gerasimova T.V., Drugova E.V. VIR Global Collection of Grain Legume Crop Genetic Resources: Replenishment, Conservation and Studying. Methodological Guidelines. St. Petersburg: VIR, 2018. doi 10.30901/978-5-905954-79-5 (in Russian)]
- Вишнякова М.А., Крылова Е.А. Перспективы получения низкоалкалоидных и адаптивных форм люпина узколистного на основе геномных и транскриптомных ресурсов вида. *Биотехнология и селекция растений*. 2022;5(2):5-14. doi 10.30901/2658-6266-2022-2-01 [Vishnyakova M.A., Krylova E.A. Prospects for obtaining low-alkaloid and adaptive forms of narrow-leaved lupine based on the genome and transcriptome resources of the species. *Biotechnologiya i Seleksiya Rastenij = Plant Biotechnology and Breeding*. 2022;5(2):5-14. doi 10.30901/2658-6266-2022-2-01 (in Russian)]
- Вишнякова М.А., Саликова А.В., Шеленга Т.В., Егорова Г.П., Новикова Л.Ю. Изменчивость содержания алкалоидов в семенах люпина узколистного у образцов коллекции ВИР в условиях Северо-Запада Российской Федерации. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(2):119-128. doi 10.18699/VJGB-23-17 [Vishnyakova M.A., Salikova A.V., Shelenga T.V., Egorova G.P., Novikova L.Y. Alkaloid content variability in the seeds of narrow-leaved lupine accessions from the VIR collection under the conditions of the Russian Northwest. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(2):119. doi 10.18699/VJGB-23-17]
- ГОСТ Р 54632-2011. Люпин кормовой. Технические условия. 2013. Электронный ресурс: <https://docs.cntd.ru/document/1200093158?ysclid=14s80m228h216628534> (дата обращения 07.05.2024) [State Standard R 54632-2011. Fodder Lupine. Specification. 2013. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/1200093158?ysclid=14s80m228h216628534> (Accessed May 7, 2024) (in Russian)]
- ГОСТ Р 52325-2005. Семена сельскохозяйственных растений. Сортовые и посевные качества. Общие технические условия. Электронный ресурс: <https://internet-law.ru/gosts/gost/4709/?ysclid=1wgcrx2jpt453276006> (дата обращения 21.05.2024) [State Standard R 52325-2005. Seeds of Agricultural Plants. Varietal and Sowing Characteristics. General Specifications. Available at: <https://internet-law.ru/gosts/gost/4709/?ysclid=1wgcrx2jpt453276006> (Accessed May 21, 2024) (in Russian)]
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. Сорты растений (официальное издание). М., 2023 [State Register of Selection Achievements Authorized for Use for Production Purposes. Vol. 1. Plant Varieties (official publication). Moscow, 2023 (in Russian)]
- Егорова Г.П., Соловьева А.Е., Проскуракова Г.И. Генетические ресурсы коллекции люпина ВИР для селекции. В: Сб. тезисов междунар. науч.-практ. конф. «Новые сорта люпина, технология их выращивания и переработки, адаптация в системы земледелия и животноводство», 3–4 июля 2017. Брянск, 2017;13-23 [Egorova G.P., Solovyova A.E., Proskuryakova G.I. Genetic resources of the VIR lupine collection for breeding. In: Abstracts of the Int. Sci.-Pract. Conf. “New Varieties of Lupine, Technology for their Cultivation and Processing, Adaptation to Farming Systems and Livestock Breeding”, 3–4 July, 2017. Bryansk, Russia, 2017; 13-23 (in Russian)]
- Егорова Г.П., Шеленга Т.В., Проскуракова Г.И. Биохимическая характеристика семян люпина (*Lupinus* L.) из коллекции ВИР. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2019;31(3):79-87. doi 10.24411/2309-348X-2019-11118 [Egorova G.P., Shelenga T.V., Proskuryakova G.I. Biochemical characterization of of lupin (*Lupinus* L.) seeds from the VIR collection. *Zernobobovye i Krupnye Kul'tury = Legumes and Groat Crops*. 2019;31(3):79-87. doi 10.24411/2309-348X-2019-11118 (in Russian)]
- Купцов Н.С., Такунов И.П. Люпин: генетика, селекция, гетерогенные посевы. Брянск, 2006 [Kuptsov N.S., Takunov I.P. Lupine: Genetics, Breeding, Heterogeneous Cultivation. Bryansk, 2006 (in Russian)]
- Попов В.С., Саликова А.В., Перчук И.Н., Конькова Н.Г., Егорова Г.П., Вишнякова М.А., Шеленга Т.В. Экспресс-оценка основных показателей хозяйственной ценности в образцах муки люпина узколистного с помощью ИК-спектроскопии. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(1):99-108. doi 10.30901/2227-8834-2024-1-99-108 [Popov V.S., Salikova A.V., Perchuk I.N., Konkova N.G., Egorova G.P., Vishnyakova M.A., Shelenga T.V. Rapid assessment of the main economic value indicators in lupine flour samples using infrared spectroscopy. *Trudy po Prikladnoi Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024; 185(1):99-108. doi 10.30901/2227-8834-2024-1-99-108 (in Russian)]
- Таран Т.В., Цвик Г.С. Влияние условий выращивания на химический состав люпина узколистного. В: Сб. тезисов междунар. науч.-практ. конф. «Новые сорта люпина, технология их выращивания и переработки, адаптация в системы земледелия и животноводство», 3–4 июля 2017. Брянск, 2017;35-40 [Taran T.V., Tsvik G.S. The influence of growing conditions on the chemical composition of narrow-leaved lupine. In: Abstracts of the Int. Sci.-Pract. Conf. “New Varieties of Lupine, Technology for their Cultivation and Processing, Adaptation to Farming Systems and Livestock Breeding”, 3–4 July, 2017. Bryansk, Russia, 2017;35-40 (in Russian)]
- ТУ-9716-004-00668502-2008. Люпин продовольственный. Электронный ресурс: <https://e-ecolog.ru/crc/57.01.01.000.%D0%A2.000230.05.08?ysclid=14sa0dtvbn325210024> (дата обращения 24.06.2022) [Specification No. 9716-004-00668502-2008. Food Lupin. Available at: <https://e-ecolog.ru/crc/57.01.01.000.%D0%A2.000230.05.08?ysclid=14sa0dtvbn325210024> (Accessed June 24, 2022) (in Russian)]

- Amirjani M. Effects of drought stress on the alkaloid contents and growth parameters of *Catharanthus roseus*. *J Agric Biol Sci*. 2013; 8(11):745-750
- Christiansen J.L., Jørnsgård B., Buskov S., Olsen C. E. Effect of drought stress on content and composition of seed alkaloids in narrow-leaved lupin, *Lupinus angustifolius* L. *Eur J Agron*. 1997;7:307-314. doi 10.1016/S1161-0301(97)00017-8
- Cowling W., Tarr A. Effect of genotype and environment on seed quality in sweet narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Aust J Agric Res*. 2004;55(7):745-751. doi 10.1071/AR03223
- Czepiel K., Krajewski P., Wilczura P., Bielecka P., Świącicki W., Kroc M. Expression profiles of alkaloid-related genes across the organs of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) and in response to anthracnose infection. *Int J Mol Sci*. 2021;22:2676. doi 10.3390/ijms22052676
- De Cortes Sánchez M., Altares P., Pedrosa M.M., Burbano C., Cuadrado C., Goyoaga C., Muzquiz M., Jiménez-Martínez C., Dávila-Ortiz G. Alkaloid variation during germination in different lupin species. *Food Chem*. 2005;90(3):347-355. doi 10.1016/j.foodchem.2004.04.008
- Frick K., Kamphuis L., Siddique K., Singh K., Foley R. Quinolizidine alkaloid biosynthesis in lupins and prospects for grain quality improvement. *Front Plant Sci*. 2017;8:1-12. doi 10.3389/fpls.2017.00087
- Frick K., Foley R., Kamphuis L.G., Siddiqu K., Gar G., Singh K.B. Characterization of the genetic factors affecting quinolizidine alkaloid biosynthesis and its response to abiotic stress in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Plant Cell Environ*. 2018;41:2155-2168. doi 10.1111/pce.13172
- Jaleel C.A., Manivannan P., Kishorekumar A., Sankar B., Gopi R., Somasundaram R. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;59:150-157. doi 10.1016/j.colsurfb.2007.05.001
- Kleinwächter M., Selmar D. New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. *Agron Sustain Dev*. 2015;35(1):121-131. doi 10.1007/s13593-014-0260-3
- Kushnareva A.V., Shelenga T.V., Perchuk I.N., Egorova G.P., Malyshev L.L., Kerv Yu.A., Shavarda A.L., Vishnyakova M.A. Selection of an optimal method for screening the collection of narrow-leaved lupine held by the Vavilov Institute for the qualitative and quantitative composition of seed alkaloids. *Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(8):829-835. doi 10.18699/VJ20.680
- Lee M.J., Pate J.S., Harris D.J., Atkins C.A. Synthesis, transport and accumulation of quinolizidine alkaloids in *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L. *J Exp Bot*. 2007;58:935-946. doi 10.1093/jxb/erl254
- Maknickienė Z., Asakavičiūtė R. Alkaloid content variations in lupin (*Lupinus* L.) genotypes and vegetation periods. *Biologija*. 2008;54:112-115. doi 10.2478/v10054-008-0023-7
- Sengbusch R. Bitterstoffarme lupinen. II. *Züchter*. 1931;4:93-109
- Siger A., Grygier A., Czubinski J. Comprehensive characteristic of lipid fraction as a distinguishing factor of three lupin seed species. *J Food Compos Anal*. 2017;115:104945. doi 10.1016/j.jfca.2022.104945
- Staples K.D., Hamama A.A., Knight-Mason R., Bhardwaj H.L. Alkaloids in white lupin and their effects on symbiotic N fixation. *J Agric Sci*. 2017;9(6):13. doi 10.5539/jas.v9n6p13
- Szabó B., Tyihák E., Szabó G., Botz L. Mycotoxin and drought stress-induced change of alkaloid content of *Papaver somniferum* plants. *Acta Bot Hung*. 2003;45:409-417. doi 10.1556/ABot.45.2003.3-4.15
- Vishnyakova M.A., Kushnareva A.V., Shelenga T.V., Egorova G.P. Alkaloids of narrow-leaved lupine as a factor determining alternative ways of the crop's utilization and breeding. *Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(6):625-635. doi 10.18699/VJ20.656
- Waller G.R., Nowacki E.K. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. New York: Plenum Press, 1978. doi 10.1007/978-1-4684-0772-3
- Wang X.-F., Jing X.-M., Zheng G.-H. Effect of seed moisture content on seed storage longevity. *Acta Bot Sinica*. 2001;43:551-557
- Wink M. Plant breeding: Low or high alkaloid content. In: Proc. of the 6th Int. Lupin Conf. 25–30 Nov. 1990. Temuco-Pucón, Chile. Int. Lupin Association, 1991;326-334
- Wink M. Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. 1993;43:1-118. doi 10.1016/S0099-9598(08)60134-0
- Wink M., Meißner C., Witte L. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*. 1995;38:139-153. doi 10.1016/0031-9422(95)91890-d

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.05.2024. После доработки 03.09.2024. Принята к публикации 03.09.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-06

Analysis of similarities and differences of accessions belonging to *Prunus domestica* L. and *P. insititia* L. using endocarp dimensions and shape variations

T. Milošević ¹ , N. Milošević ²¹ Department of Fruit Growing and Viticulture, Faculty of Agronomy in Čačak, University of Kragujevac, Čačak, Republic of Serbia² Department of Pomology and Fruit Breeding, Fruit Research Institute, Čačak, Republic of Serbia tomomilosevic@kg.ac.rs

Abstract. The endocarp or stone is the most stable morphological feature of the genus *Prunus*. However, the identification of plum types, groups and/or genotypes based on endocarp is complicated because of a wide range of variation and morphological transitional states. From this point of view, knowledge on the degree of variability within and between plum species or cultivars is a *sine qua non* for taxonomists and also for pomologists. In this study, different endocarp morphological traits, such as SW, linear dimensions (L, W and T), D_a , D_g , S, V and shape indexes (ϕ , SI, E, RS, RO, DE and PI) were determined using analysis of variance and multivariate analysis (correlations and PCA). Results showed significant differences among accessions for all properties evaluated but with high overlaps in values. In most cases, the examined parameters were positively or negatively correlated with each other, indicating developmental relationships between them. Indeed, positive correlations were recorded for most variables, especially related to SW and endocarp linear dimensions. These results showed that the above properties could be a powerful indicator for selecting adequate endocarp size and shape in accessions, which may be used in taxonomic analysis. With an account of these correlations, PCA was employed to correctly estimate the endocarp size and shape and distribution, segregation and dispersion of accessions. All linear measurements and index values showed a normal or low variability at the individual level in most cases, with the exception of SW, V and PI in both European and Damson plums and S in Damson plums. Of the 15 examined parameters, European plum had significantly higher SW, L, T, D_a , D_g , S, E, RO and PI values than Damson plum. In contrast, Damson plum had higher SI, RS and DE values, while W, V and ϕ were similar.

Key words: endocarp; European and Damson plums; morphological properties; size; shape indexes.

For citation: Milošević T., Milošević N. Analysis of similarities and differences of accessions belonging to *Prunus domestica* L. and *P. insititia* L. using endocarp dimensions and shape variations. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):44-54. doi 10.18699/vjgb-25-06

Funding. Financial support for this research was provided by the Ministry of Science, Technological Development and Innovations of the Republic of Serbia (grants 451-03-66/2024-03/200088 and 451-03-66/2024-03/200215).

CRedit authorship contribution statement. Tomo Milošević: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. Nebojša Milošević: Data curation, Formal analysis, Investigation, Software, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Анализ сходств и различий образцов *Prunus domestica* L. и *P. insititia* L. по размерам эндокарпия и вариациям формы

Т. Милошевич ¹ , Н. Милошевич ²¹ Кафедра садоводства и виноградарства, Факультет агрономии в г. Чачак, Крагуевацкий университет, Чачак, Республика Сербия² Кафедра помологии и селекции фруктов, Научно-исследовательский институт фруктов, Чачак, Республика Сербия tomomilosevic@kg.ac.rs

Аннотация. Эндокарпий, или косточка, является наиболее стабильной морфологической особенностью рода *Prunus*. Однако идентификация типов, групп и/или генотипов сливы на основе эндокарпия осложнена из-за широкого спектра вариаций и морфологических переходных состояний. С этой точки зрения знание степени изменчивости внутри и между видами или сортами сливы является непременным условием для таксономистов и помологов. В нашем исследовании различные морфологические признаки эндокарпия, такие как SW, линейные размеры (L, W и T), D_a , D_g , S, V и индексы формы (ϕ , SI, E, RS, RO, DE и PI), были определены с помощью дисперсионного анализа и многомерного анализа (корреляции и PCA). В результате обнаружены значительные различия между образцами по всем оцененным свойствам, но с высоким перекрытием значений. В большинстве случаев исследованные параметры положительно или отрицательно коррелировали друг с другом, что указывало на связи развития между ними. Действительно, положительные корреляции были зарегистрированы для большинства переменных, особенно связанных с SW и линейными размерами эндокарпия. Эти результаты показали, что вышеперечисленные свойства могут служить мощным индикатором для выбора адекватного размера

и формы эндокарпия образцов, которые могут быть использованы в таксономическом анализе. Выявленные корреляции были использованы для проведения анализа методом главных компонент (PCA), что позволило правильно оценить не только размеры и форму эндокарпия, но и диапазоны варьирования признаков, включая дисперсию, а также распределение образцов по группам. Все линейные измерения и значения индекса показали нормальную или низкую изменчивость на индивидуальном уровне в большинстве случаев, за исключением SW, V и PI у европейской сливы и сливы Damson и S у сливы Damson. Из 15 исследованных параметров для европейской сливы были получены значительно более высокие значения SW, L, T, D_a, D_g, S, E, RO и PI по сравнению со сливой Damson. Напротив, слива Damson отличалась более высокими значениями SI, RS и DE, тогда как значения W, V и φ были схожими.

Ключевые слова: эндокарпий; слива европейская и чернослива; морфологические свойства; размер; индексы формы.

Introduction

Prunus spp. has been grown throughout the world for centuries. Among commercial species, the plum is the most commonly cultivated for its fruits (Milošević T., Milošević N., 2018). The genus originates from five centers in general: Europe for *Prunus domestica* L. (European plum), Western Asia for *P. insititia* L. (Damson plum), Western and Central Asia for *P. cerasifera* Ehrh. (cherry plum), North America for *P. americana* Marsh. (American plum) and China for *P. salicina* Lindl. (Japanese plum) (Watkins, 1976). Among them, genotypes belonging to *P. domestica* L. and *P. salicina* Lindl. are the most important. The evaluation of plum diversity may be essential; for example, for on-farm conservation schemes, utilization of genetic resources for sustainable agriculture and future breeding programs (Ropelewska, 2022). Also, cultivar differentiation is important for farming due to adaptation to climatic conditions and disease resistance, especially under global warming conditions (Milošević T., Milošević N., 2018).

Serbia is a small country on the Balkan Peninsula, but a major world producer of plums, as it ranks third or fourth in the world behind China, USA or Romania (FAOSTAT, 2024, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>). Apart from a large number of commercial cultivars, Serbia is known for growing autochthonous (primitive, folk) genotypes mostly originating from *P. domestica* L. (European plum) and *P. insititia* L. (Damson plum) (Milošević T., Milošević N., 2012). Their fruits are mainly used for the production of a traditional Serbian alcoholic drink known as “Šljivovica” or “Prepečenica”, which is included in the UNESCO representative list of the intangible cultural heritage of humanity as an element of the intangible cultural heritage of Serbia (Source: UNESCO Bulletin, 2022) (Milošević T. et al., 2023). We have earlier described the properties of their trees and fruits (Milošević T., Milošević N., 2012; Milošević N. et al., 2017). Also, a great diversity of types belong to *P. cerasifera* Ehrh. (cherry plum), and *P. spinosa* L. (sloe) can be found in this country. Along this line, it can be said that Serbia is a very rich source of the biological diversity of plums.

The fruit of representatives of the *Prunus* genus consists of an epicarp (outer layer), a mesocarp (flesh), and an endocarp (stone). The stone of a plum consists of the seed covered with a hull. When used fresh or during processing, the flesh and skin of plums are the main raw materials, and the stones are generated as by-products. The plum seed or kernel may be a source of useful substances for food, cosmetics (e. g. personal care products), pharmaceutical industries (González-García et al., 2014; Plainfossé et al., 2019). Also, the seeds can be used to obtain generative rootstocks in horticultural practice

Abbreviations

SW, stone (endocarp) weight
L, stone length
T, stone thickness
W, stone width
D_a, arithmetic mean diameter
D_g, geometric mean diameter
S, surface area
V, stone volume
φ, sphericity
SI, shape index
E, elongation
RS, relative slenderness
RO, roundness
DE, Behre's index
PI, Pollmann's index
PCA, principal component analysis

and in breeding programs (Milošević T., Milošević N., 2018). The endocarp is the innermost layer of the pericarp, which directly surrounds the seeds. It may be very hard and non-edible as in drupes (also called stone fruits) such as members of the *Prunus* genus, i. e. plums, peaches, apricots and cherries (Carrillo-López, Yahia, 2019).

In pomological research, the stone of the *Prunus* genus represents a very stable feature of plum genotypes and serves for the determination and classification of cultivars (Behre, 1978; Woldring, 2000; Milošević T., Milošević N., 2018). However, during the last 50 years, with a few exceptions, in very complex botanical studies, stone dimensions, size and shape in the plum and other members are a crucial component for classification of systematic categories due to taxonomic complexity of the *Prunus* taxa within the Rosaceae family (Depypere et al., 2007, 2009; Burger et al., 2012; Bawari et al., 2022; Ropelewska, 2022). Behre (1978) reported that endocarp dimensions are very useful for the identification of *P. domestica* L., *P. insititia* L. and *P. spinosa* L. In general, reliable discriminating characters for species and subspecies of *Prunus* taxa identification are missing (Nielsen, Olrik, 2001).

The aim of this study was to characterize and evaluate the diversity of endocarps (stones) within and among traditional European and Damson autochthonous plums that are cultivated in Serbia and other western Balkan countries using essential morphological data (weight, dimensions, size, shape) in

order to provide experimental evidence for the implementation of measures to safeguard this agricultural biodiversity. The secondary goal of this work was to reliably determine the degree of the possibility of identifying plum genotypes using the stone (endocarp) through multivariate statistical analysis.

Material and methods

Study area, plant material and measurements. Analysis was performed using a combination of weight, dimension and shape parameters of 5,500 endocarps (stones) belonging to two closely related Eurasian plum taxa (*P. domestica* L. and *P. insititia* L.). The analysis involved 55 genotypes i. e. accessions [43 accessions (78.18 %) belonging to *P. domestica* and 12 accessions (21.82 %) belonging to *P. insititia*]. Their name, series number and code were presented in Table 1.

Ripe fruit and stone samples (25 fruits or stones in 4 replicates, $n = 100$ per one accession) were taken from a private orchard in the Prislonica village (43°33' N, 16°21' E) near Čačak city (western Serbia) established in 1998. Whole ripe fruits of each accession were harvested individually, manually and randomly in 2007. After this, the fruits were cut in half to extract the stones (endocarps). The removed stones were washed and cleaned of their flesh. After air-drying for 40 days

at room temperature (20 °C in the shade), the undamaged and dry stones were placed in glass jars with hermetic closures and stored in a refrigerator at +4 °C. Stones (endocarps) were subjected to measuring in 2024.

The SW (g) was measured using MAULsteel 5000 G digital balance (Jakob Maul GmbH, Bad König, Germany). In order to determine the endocarp size, three major perpendicular dimensions i. e. L (mm), W (mm) and T (mm) were determined using a digital caliper Starrett 727 (Athol, NE, USA) with the accuracy of ± 0.01 mm. The position of the measurements for L, T and W proposed by Van Zeist, Woldring (2000) was illustrated in Figure 1.

Arithmetic mean diameter (D_a , mm) and geometric mean diameter (D_g , mm) were computed from geometrical dimensions by Eq. (1) and Eq. (2) (Mohsenin, 1986):

$$D_a = (L + T + W)/3, \quad (1)$$

$$D_g = \sqrt[3]{LWT}. \quad (2)$$

The S (cm²) is a measure of the total area that the surface of the object occupies and was determined by approximating its shape to a sphere with the same geometric mean diameter by using Eq. (3) (Mohsenin, 1986):

$$S = \pi D_g^2. \quad (3)$$

Table 1. Name and code of autochthonous plum accessions

Accession (local name)	Accession code	Accession (local name)	Accession code
1. Arapka	ARP	29. Piskavica	<i>PIS</i>
2. Bela Požegača	BPZ	30. Šarica	SAR
3. Belošljiva	BEL	31. Trnošljiva	<i>TRS</i>
4. Cerovački Piskavac	CPI	32. Turgonja	<i>TURa</i>
5. Crnošljiva	CRN	33. Dronga	<i>DRO</i>
6. Crvena Ranka*	CRB	34. Magareška Crna Šljiva	MCS
7. Crvena Ranka**	CRD	35. Beluvra	BEV
8. Čokešinka	COK	36. Trnošljiva – M	<i>TRA</i>
9. Kapavac	KAP	37. Magareška	MAG
10. Maričevka	MAR	38. Crna Petrovka	CPT
11. Metlaš	MET	39. Panadjurka	PAN
12. Mudara	MUD	40. Zimna	ZIM
13. Obični Piskavac	OPI	41. Modra Šljiva	MSI
14. Petrovača	PET	42. Gurgutka	GUR
15. Požegača	POZ	43. Banska Šljiva	BAS
16. Trnovača	<i>TRN</i>	44. Korajka	KOR
17. Turgulja	<i>TUR</i>	45. Bosanka	BOS
18. Moravka	<i>MOR</i>	46. Bilka Rana	BIR
19. Crnica	<i>CRI</i>	47. Julka	JUL
20. Plavoača	PLA	48. Dobojska Rana	DRA
21. Volujevača	<i>VOL</i>	49. Banjalučka Bjelica	BAB
22. Gorka Bula	GBU	50. Sitnica	SIT
23. Bjelica	BJL	51. Slatkulja	SLA
24. Bjelošljiva	BJS	52. Miškovačka Rana	MIR
25. Car Dušan	CDU	53. Kaurka	KAU
26. Durgulja	<i>DUR</i>	54. Ružica	RUZ
27. Mednica	MED	55. Podsedlinka	POD
28. Mudovalj	<i>MUV</i>		

Note. Accessions belonging to *P. insititia* L. are marked in bold-italic. * 'Crvena Ranka' var. 'Bardaklija' (*P. domestica* L.). ** 'Crvena Ranka' var. 'Derosavka' (*P. domestica* L.).

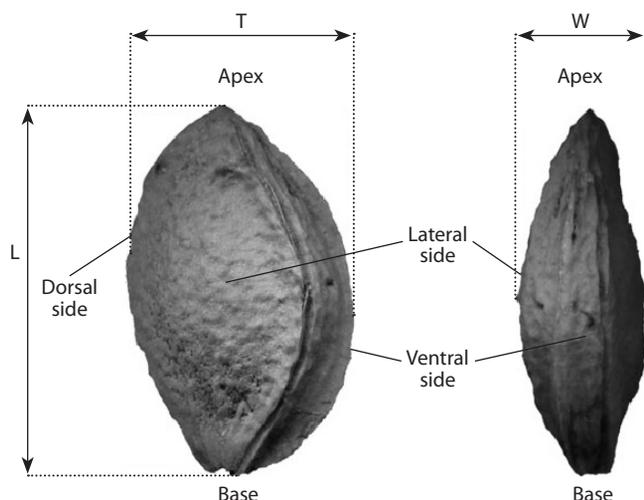


Fig. 1. Overview of basic linear endocarp measurements.
Left: lateral view; right: ventral view (Van Zeist, Woldring, 2000).

The volume (V , mm^3) of the endocarp was calculated by Eq. (4) (Mansouri et al., 2017), which is based on the assumption that plum endocarps are similar to a scalene ellipsoid where $L > T > W$ (Munder et al., 2017):

$$V = LWT\varphi. \quad (4)$$

Sphericity (φ) is defined as the ratio of the surface area of the sphere having an equivalent volume to that of the endocarp and the surface area of the endocarp. It is a measure of how spherical an object is. It was estimated based on the isoperimetric property of a sphere by Eq. (5) (de Figueiredo et al., 2011):

$$\varphi = D_g/L. \quad (5)$$

Shape index (SI) and elongation ratio (E) were calculated using Eqs. (6) (Mohsenin, 1986) and (7) (Firatligil-Durmuş et al., 2010):

$$SI = (W + T)/2L, \quad (6)$$

$$E = L/W. \quad (7)$$

Other indexes of endocarp shape were also calculated according to Behre (1978), Van Zeist, Woldring (2000) and Schmidt-Tauscher et al. (1996, cited in Pollmann et al., 2005). In order to have a more pronounced relationship between individual dimensions, the numbered values were multiplied by 100.

They can be represented as relative slenderness (RS) (Eq. (8)), roundness index (RO) (Eq. (9)) and Behre's index (DE) (Eq. (10)) proposed by Behre (1978) and modified by Van Zeist, Woldring (2000):

$$RS = 100 \times T/L, \quad (8)$$

$$RO = 100 \times T/W, \quad (9)$$

$$DE = 100 \times W/L. \quad (10)$$

Schmidt-Tauscher et al. (1996, cited in Pollmann et al., 2005) introduced a fourth index value which is calculated using Eq. (11). It was named Pollmann's index (PI) because Pollmann et al. (2005) demonstrated its usefulness in differentiating the stones of modern plum cultivars:

$$PI = L^2/(T + W). \quad (11)$$

Variation at different taxonomic levels was studied by analyzing the coefficients of variation (CV, %), which were interpreted following Rasch (1988, cited in Hübner and Wissemann, 2004), i.e. $CV < 10\%$, low variability; $10\% < CV < 20\%$, normal variability; $CV > 25\%$, high variability of the character studied.

Statistical analysis. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the Microsoft Office Excel software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) procedure followed by least significant difference (LSD) Fisher's test at $p \leq 0.05$ significance level. Pearson's rank correlation matrix ($\alpha = 0.05$) was performed using the R corrplot package version 4.0.2 (R Core Team, 2021). Principal components analysis (PCA) was performed and a biplot was designed using the XLSTAT v. 7.5 software package (Addinsoft, Paris, France).

Results and discussion

Evaluation of endocarp dimensions and shapes

Data in Table 2 showed that SW significantly varied among accessions. High intra- and inter-variability between plum types was observed. The highest and statistically similar values were observed in 'MUD' and 'CPT' (both belonging to *P. domestica*), and the lowest, in 'TRN' and 'CRI' (both belonging to *P. insititia*). Twelve accessions (21.82% of the total number) had $SW > 1$ g, whereas only four accessions (7.27% of the total number) had $SW < 0.5$ g. The most numerous (70.91%) were the accessions, the SW of which ranged between 0.5 and 1 g.

It is known that the former Yugoslavia, i.e. the Western Balkan region, is a very rich source of plum germplasm, especially that of European and Damson plums, cherry plums and sloes (Milošević T., Milošević N., 2012). Considering this, a large number of researchers highlight data related to their biological, agronomic and pomological characteristics (Milošević T. et al., 2023). Thus, Milošević N. et al. (2017) and Glišić et al. (2023) reported SW between 0.57 and 1.49 g or 0.57 and 2.39 g, respectively, for local genotypes belonging to European plum in the Čačak area (western Serbia). Drkenda, Kurtović (2012) reported values between 0.84 and 1.21 g for six local cultivars from Bosnia and Herzegovina. For accessions belonging to European and Damson plums from Montenegro, Jaćimović et al. (2011) and Šebek (2013) reported that SW varied from 0.46 to 2.20 g and 0.16 to 2.20 g, respectively. For nine domestic and local plums grown in Turkey, Gunes (2003) noted SW from 0.26 to 0.99 g. Our data for SW are within the limits of the results of the mentioned authors. However, in taxonomic description and morphometric analysis, SW is not a reliable indicator for the determination, systematization and segregation of members of the *Prunus* genus (Depypere et al., 2007; Mijnsbrugge et al., 2013; Sarigu et al., 2017; Heidari et al., 2022; Kosina, 2023) due to the negative "effect of controlled moisture" (Sheikh et al., 2021) and state of the seed (embryo or kernel) inside the endocarp (das Graças Souza et al., 2016; Sheikh et al., 2021). All of the above authors favored dimensional measurements of the endocarps.

The ANOVA showed significant differences among the accessions for endocarp L, T and W (Table 2). These data are in agreement with the results of Woldring (2000), Van Zeist, Woldring (2000), Depypere et al. (2007) and Heidari

Table 2. Stone weight, stone dimensions and size and shape indexes of plum accessions

Accession code	SW, g	L, mm	T, mm	W, mm	D _a , mm	D _{gr} , mm	S, cm ²	V, cm ³	φ	SI	E	RS	RO	DE	PI
ARP	0.60 q-v	21.20 e-n	10.80 tu	6.00 n-s	12.67 nop	11.12 vw	3.88 r-v	0.72 u-z	0.524 kl	0.396 z	3.53 f	50.94 stu	180.00 jik	28.30 E	6.94 c-f
BPZ	0.79 i-p	22.95 b-f	12.25 jik	6.60 i-q	13.93 h	12.29 k	4.74 ij	0.97 j-m	0.535 x-A	0.411 y	3.48 g	53.38 qrs	185.61 e-h	28.76 D	6.51 d-j
BEL	0.90 g-m	18.00 f-w	12.00 klim	6.90 h-n	12.30 qrs	11.42 pqr	4.10 o-s	0.78 q-v	0.635 fg	0.525 ef	2.61 x	66.67 de	173.91 lmn	38.33 k	3.91 u-x
CPI	0.37 xy	21.75 d-k	11.25 qrs	6.00 n-s	13.00 l	11.37 r	4.06 p-s	0.77 r-v	0.522 BCD	0.397 z	3.63 d	51.72 st	187.50 d-g	27.59 FG	7.01 cde
CRN	0.57 s-w	21.30 e-m	11.00 r-u	6.00 n-s	12.77 mn	11.20 tu	3.94 q-u	0.74 s-y	0.526 ABC	0.399 z	3.55 f	51.64 st	183.33 ghi	28.17 EF	6.87 def
CRB	0.75 l-s	24.30 abc	11.80 lmn	6.10 m-s	14.07 gh	12.05 l	4.56 jk	0.92 k-n	0.495 F	0.368 C	3.98 a	48.56 uvw	193.44 b	25.10 H	8.20 b
CRD	0.55 t-x	21.85 c-k	10.80 tu	6.60 i-q	13.08 kl	11.59 o	4.22 m-q	0.82 o-s	0.530 ZAB	0.398 z	3.31 m	49.43 tuv	163.64 rst	30.21 wx	6.70 d-h
COK	0.76 k-r	21.40 e-l	11.95 klim	5.90 o-s	13.08 kl	11.47 p	4.13 n-r	0.79 p-u	0.536 xyz	0.417 wx	3.63 d	55.84 n-q	202.54 a	27.57 G	6.49 d-j
KAP	0.42 v-y	17.80 s-w	10.70 uv	6.70 h-p	11.73 vwxyz	10.85 y	3.69 uvw	0.67 w-C	0.609 j	0.489 hi	2.66 w	60.11 gj	159.70 t-w	37.64 l	4.42 f-v
MAR	0.81 i-o	20.85 f-p	11.70 mno	6.80 h-o	13.12 kl	11.84 m	4.40 k-n	0.87 n-q	0.568 pqr	0.444 p	3.07 q	56.11 m-q	172.06 mno	32.61 r	5.46 k-q
MET	0.64 o-u	19.80 h-u	11.40 opq	6.00 n-s	12.40 q	11.06 w	3.84 s-v	0.71 u-z	0.559 rst	0.339 D	3.80 c	57.57 j-n	190.00 b-e	30.30 wx	5.73 f-o
MUD	1.90 a	19.00 l-w	14.00 c	9.50 a	14.17 fg	13.62 d	5.83 c	1.32 cd	0.717 a	0.618 a	2.00 E	73.68 ab	147.37 BC	50.00 b	2.71 z
OPI	0.61 q-u	19.60 h-w	11.80 lmn	7.05 g-m	12.82 m	11.77 n	4.35 k-o	0.85 n-r	0.500 F	0.481 jk	2.78 u	60.20 ghi	167.38 pqr	35.97 n	4.62 q-v
PET	1.01 e-h	17.00 w	12.00 klim	7.00 g-m	12.00 tu	11.26 st	3.98 p-t	0.75 s-x	0.662 d	0.559 d	2.43 z	70.59 c	170.93 nop	41.18 g	3.44 w-z
POZ	0.74 l-s	23.00 b-f	12.95 fg	6.80 h-o	14.25 ef	12.65 hi	5.75 cd	1.30 cde	0.550 tuv	0.429 st	3.38 jk	56.30 l-q	190.44 bcd	29.57 zA	6.01 f-m
TRN	0.13 z	14.20 x	10.40 v	6.20 l-s	10.27 A	9.71 F	2.96 zA	0.48 FG	0.684 c	0.584 c	2.29 B	73.24 abc	167.74 o-r	43.66 e	3.13 xyz
TUR	1.50 b	24.00 a-d	12.00 klim	7.00 g-m	14.33 de	12.63 i	5.01 ghi	1.06 hij	0.526 ABC	0.396 z	3.43 hi	50.00 tu	171.43 nop	29.17 BC	6.86 def
MOR	0.53 u-x	20.50 gr	11.60 nop	6.30 k-s	12.80 mn	11.44 pq	4.11 o-s	0.78 q-v	0.558 st	0.437 q	3.25 no	56.58 l-o	184.13 f-i	30.73 uv	5.75 h-o
CRI	0.31 yz	17.50 t-w	8.40 yz	5.50 s	10.47 z	9.32 G	2.73 A	0.42 G	0.532 yZA	0.397 z	3.18 p	48.00 uvw	152.73 zA	31.43 st	6.63 di
PLA	1.25 cd	21.08 e-o	13.80 c	7.50 d-i	14.46 d	13.17 e	5.07 fgh	1.24 def	0.597 k	0.482 jk	2.94 r	62.50 fg	184.00 f-i	33.97 q	4.71 p-u
VOL	0.66 o-u	17.41 u-w	10.50 v	5.70 qrs	11.20 y	10.14 D	3.62 vw	0.64 z-D	0.582 no	0.465 lm	3.05 q	60.31 ghi	184.21 f-i	32.74 r	5.06 m-s
GBU	0.58 r-v	19.45 j-w	9.38 w	5.95 n-s	11.59 x	10.28 C	3.32 xy	0.57 DEF	0.529 z-C	0.394 z	3.27 n	48.23 uvw	157.65 vwxyz	30.54 vw	6.78 d-g
BJL	0.95 g-j	19.53 l-w	12.18 jk	6.34 k-s	12.68 m-p	11.48 p	4.13 n-r	0.79 p-u	0.512 DE	0.374 B	3.08 q	62.37 fgh	192.11 bc	32.46 r	4.94 n-u
BJS	0.91 g-l	19.02 l-w	11.45 opq	7.25 f-k	12.57 p	11.64 o	4.26 l-p	0.83 n-s	0.591 k-n	0.492 h	2.62 x	60.20 ghi	157.93 u-x	38.12 k	4.36 f-w
CDU	1.04 efg	22.11 b-h	12.43 ij	8.13 c-f	14.22 efg	13.07 f	5.37 e	1.17 fg	0.543 vwxyz	0.465 lm	2.72 v	56.22 l-q	152.89 yZA	36.77 m	4.84 o-u
DUR	0.89 g-m	21.92 c-j	11.76 lmn	6.9 h-n	13.41 j	11.90 lm	4.45 klim	0.88 m-p	0.583 mno	0.417 vw	3.35 kl	53.65 o-s	179.82 jik	29.84 yz	6.25 e-k
MED	0.70 n-u	19.67 h-v	12.05 kl	6.46 j-r	12.70 mno	11.48 p	4.14 n-r	0.79 p-u	0.715 a	0.468 l	3.08 q	61.26 f-i	188.87 cde	32.44 r	7.84 bc
MUV	1.33 bc	19.99 h-t	15.16 a	9.63 a	14.93 c	14.29 b	6.41 b	1.53 b	0.503 EF	0.620 a	3.08 q	75.84 a	157.42 wxy	48.17 c	2.74 z

Table 2 (end)

Accession code	SW, g	L, mm	T, mm	W, mm	D _a , mm	D _g , mm	S, cm ²	V, cm ³	φ	SI	E	RS	RO	DE	PI
<i>PIS</i>	0.55 t-x	20.69 f-q	9.48 w	5.76 p-s	11.98 tu	10.41 B	3.41 x	0.59 B-E	0.547 uvw	0.368 C	3.59 e	45.82 wx	164.58 qrs	27.84 FG	4.43 f-v
<i>SAR</i>	0.95 g-j	21.18 e-n	11.22 qrs	6.56 f-q	12.99 j	11.59 o	4.51 jkl	0.90 l-o	0.609 j	0.420 uv	3.23 o	52.97 rs	171.04 nop	30.97 u	6.09 e-l
<i>TRs</i>	0.78 j-q	18.56 o-w	10.95 stu	7.1 g-l	12.20 s	11.30 s	4.01 p-t	0.76 r-w	0.586 lmn	0.486 ij	2.61 x	59.00 i-m	154.22 x-A	38.25 k	4.43 f-v
<i>TURa</i>	1.33 bc	23.52 e	13.45 d	8.28 cde	15.08 b	13.78 c	5.96 c	1.37 c	0.585 lmn	0.462 mn	2.84 t	57.19 k-n	162.44 stu	35.20 o	4.97 n-t
<i>DRO</i>	1.01 e-h	21.08 e-o	12.02 kl	7.4 e-j	13.50 j	12.33 k	4.77 ij	0.98 i-l	0.521 CD	0.461 mn	2.85 t	57.02 k-n	162.43 stu	35.10 o	5.00 n-s
<i>MCS</i>	0.62 p-u	19.90 h-u	9.59 w	5.81 p-s	11.77 vw	10.35 B	3.36 x	0.58 CDE	0.511 DE	0.387 A	3.42 hi	48.19 uvw	165.06 qrs	29.20 zBC	7.11 cde
<i>BEV</i>	0.97 f-i	21.21 e-n	11.06 rst	7.20 f-k	13.16 k	11.91 l	4.45 klm	0.88 m-p	0.705 b	0.430 rst	2.95 r	52.15 st	153.61 x-A	33.95 q	5.65 j-p
<i>TRA</i>	0.39 wxy	11.96 x	8.67 y	5.79 p-s	8.81 B	8.44 H	2.23 B	0.31 H	0.645 e	0.605 b	2.07 D	72.49 bc	149.74 AB	48.41 q	2.85 yz
<i>MAG</i>	1.47 b	19.98 h-t	12.77 gh	8.38 bcd	13.71 i	12.68 hi	5.21 efg	1.12 gh	0.583 mne	0.529 e	2.38 A	63.91 ef	152.39 zA	41.94 f	3.73 v-y
<i>CPT</i>	1.72 a	25.63 a	14.46 b	9.00 abc	16.36 a	14.94 a	7.01 a	1.75 a	0.513 D	0.458 ns	2.85 t	56.42 l-p	160.67 s-w	35.12 o	5.05 n-s
<i>PAN</i>	0.57 s-w	19.32 k-w	9.00 x	5.59 rs	11.30 y	9.91 E	3.08 yz	0.51 EFG	0.478 G	0.378 B	3.46 gh	46.58 vmx	161.00 s-v	28.93 CD	7.42 bcd
<i>ZIM</i>	0.59 r-v	22.04 c-i	9.35 w	5.69 qrs	12.36 qr	10.54 A	3.49 wx	0.61 A-D	0.498 F	0.341 D	3.87 b	42.42 y	164.32 qrs	25.72 H	9.17 a
<i>MSI</i>	0.52 u-x	18.77 m-w	7.90 A	5.50 s	12.72 mno	9.34 G	2.74 A	0.43 G	0.593 kl	0.357 C	3.41 ij	42.09 y	143.64 C	29.30 zB	8.11 b
<i>GUR</i>	0.85 h-n	18.84 l-w	11.41 opq	6.48 j-r	12.24 rs	11.17 uv	3.92 r-u	0.73 t-z	0.569 pq	0.425 tu	2.91 st	60.56 ghi	176.08 klm	34.39 p	4.80 o-u
<i>BAS</i>	0.69 n-u	20.07 h-s	11.87 lmn	6.24 l-s	12.73 mn	11.41 qr	4.09 o-s	0.78 q-v	0.569 pg	0.451 o	3.22 o	59.14 i-l	190.22 bcd	31.09 tu	5.44 k-q
<i>KOR</i>	0.85 h-n	24.50 ab	13.10 ef	7.20 f-k	14.93 c	13.22 e	5.49 de	1.21 efg	0.540 wxy	0.414 xy	3.40 jik	53.47 p-s	181.94 hij	29.39 zB	6.36 e-k
<i>BOS</i>	0.78 j-q	23.10 b-f	13.00 efg	7.30 f-j	14.47 d	12.99 g	5.30 ef	1.15 fgh	0.562 qrs	0.439 pq	3.16 p	56.28 l-q	178.08 jkl	31.60 s	5.62 j-p
<i>BIR</i>	0.69 n-u	18.50 p-w	11.00 rst	8.30 b-e	12.60 op	11.91 l	4.45 klm	0.88 mp	0.644 ef	0.522 f	2.23 C	59.46 h-k	132.53 D	44.86 d	3.75 v-y
<i>JUL</i>	1.14 def	21.00 e-p	11.60 no	7.90 d-g	13.50 j	12.44 j	3.67 uvw	0.66 x-D	0.592 klm	0.464 lm	2.66 w	55.24 n-r	146.84 BC	37.62 l	4.81 o-u
<i>DRA</i>	0.82 i-o	18.50 p-w	12.50 hi	6.80 h-o	12.60 op	11.63 o	4.24 l-p	0.82 o-s	0.629 gh	0.522 f	2.72 v	67.57 d	183.82 ghi	36.76 m	4.03 t-x
<i>BAB</i>	0.73 l-t	18.20 q-w	8.20 zA	9.20 ab	11.87 uv	11.11 vw	3.88 r-v	0.72 u-z	0.611 j	0.478 k	1.98 E	45.05 xy	89.13 F	50.55 a	4.39 f-w
<i>SIT</i>	0.78 j-q	18.00 r-w	11.00 r-u	7.10 g-l	12.03 t	11.20 tu	3.94 q-u	0.74 s-y	0.622 hi	0.503 g	2.54 y	61.11 f-i	154.93 xyz	39.44 i	4.15 s-w
<i>SLA</i>	1.16 cde	22.90 b-g	13.00 efg	6.90 h-n	14.27 ef	12.71 h	5.07 fgh	1.07 hi	0.555 stu	0.434 qrs	3.32 lm	56.77 k-n	188.41 c-f	30.13 xy	5.85 o-u
<i>MIR</i>	0.85 h-n	17.20 vw	11.30 pqr	6.70 h-p	11.73 vmx	10.92 x	3.74 t-w	0.68 v-B	0.635 fg	0.523 f	2.57 y	65.70 de	168.66 opq	38.96 j	3.91 u-x
<i>KAU</i>	0.72 m-t	18.70 n-w	8.70 xy	7.60 d-h	11.67 wx	10.73 z	3.62 vw	0.65 y-D	0.574 op	0.436 qr	2.46 z	46.52 vmx	114.47 E	40.64 h	5.29 l-r
<i>RUZ</i>	0.94 g-k	20.20 h-s	13.30 de	7.10 g-l	13.53 j	12.40 j	4.83 hij	1.00 ijk	0.614 ij	0.505 q	2.84 t	65.84 de	187.32 d-g	35.15 o	4.32 s-w
<i>POD</i>	0.85 h-n	21.10 e-n	11.00 r-u	7.20 f-k	13.10 kl	11.87 lm	3.76 t-w	0.69 v-A	0.562 qrs	0.410 rs	2.76 rs	45.90 st	126.62 zA	36.25 pq	6.01 jp

Note. Codes of members of *P. insititia* L. are marked in bold-italic. Mean values with different letters in a column differ significantly at $p \leq 0.05$ by LSD test. Means are initially designated by small letters and afterwards by capital letters due to great variation in means.

et al. (2022) who reported that all three linear dimensions of endocarps significantly varied among plum genotypes. The highest endocarp L was observed in 'CPT', 'KOR', 'CRB' (all belonging to European plum), 'TUR' and 'TURA' (both Damson plums) with no significant differences among them, whereas the lowest L was found in 'TRA' (Damson plum). Out of the total number of accessions, 50.91 % had $L > 20$ mm.

Regarding endocarp T, 'MUV' had the highest value, whereas the lowest was found in 'MSI'. In the case of endocarp W, a very high number of the largest and/or smallest values overlapped. The highest values were observed in the set of accessions such as 'MUV', 'MUD', 'BAB' and 'CPT' with no significant differences among them. In contrast, the lowest and similar values were found in 17 accessions (30.91 %) i. e. 'ARP', 'CPI', 'CRN', 'COK', 'MET', 'TRN', 'CRI', 'VOL', 'GBU', 'BJL', 'PIS', 'MCS', 'TRA', 'PAN', 'ZIM', 'MSI' and 'BAS'. Some of them, such as 'ARP', 'CPI', 'CRN' and 'MET', had identical mean W values.

Taking into account the absolute values of the three linear dimensions, the descending order was $L > T > W$, which is in accordance with the recommendations of morphometric analysis of plum endocarp proposed by Behre (1978) and Woldring (2000). Also, the values of endocarp dimensions obtained in our study were within the limits described by Van Zeist, Woldring (2000).

Following the procedure proposed by Caillavet and Souty (1950), values of all three dimensions (L, T and W) were transformed into the parameter denominated "size" or D_a and/or D_g . In the present study (Table 2), both D_a and D_g values significantly varied among accessions.

A similar finding applies to endocarp S and V, respectively. The lowest value for all four parameters was found at 'TRA' belonging to *P. insititia*. The highest endocarp "size", calculated as D_a and D_g , S and V, was observed in 'CPT' belonging to European plum. ANOVA results showed that the differences among accessions for these properties were clear and significant. Only two accessions (3.64 %) had endocarp S between 6 and 7 cm², whereas nine accessions (16.36 %) had S between 5 and 6 cm². Other accessions (80 %) had $S < 5$ cm². Otherwise, the knowledge of a specific surface area (S) could be a relevant tool to determine the shape. Other authors also report large variations in the endocarp size, S and V in plums (Sheikh et al., 2021), cherries (Pérez-Sánchez et al., 2010; Ganopoulos et al., 2015; Khadivi et al., 2022), peaches (das Graças Souza et al., 2016) and apricots (Gezer et al., 2002).

The fruit or stone (endocarp) shape is determined in terms of its ϕ . Moreover, ϕ is an expression of the shape of a solid related to that of a sphere of the same volume. In the current study, 'MUD' and 'MED' had similar and the highest ϕ values, whereas the lowest was observed in 'PAN' (Table 2).

In general, ϕ is used for determining the similarity of a fruit or a stone to a sphere. Hence, higher values of ϕ indicate the tendency of endocarps towards sphericity (Sheikh et al., 2021). The ϕ value more than 0.7 i. e. 70 % is assumed to be spherical (Garnayak et al., 2008). However, average ϕ values for accessions were much lower than 0.7 or 70 % with the exception of 'MUD', 'MED' and 'BEV'.

The shape parameters such as SI and E indicate the shape tendency of the endocarps. Both indexes in the present study showed high variability among accessions (Table 2). 'MUV'

and 'MUD' had the highest and similar SI values whereas the lowest were observed in 'MET'. The highest E value was in 'CRB', and the lowest, in 'BAB'. Lower values of these shape parameters indicate the tendency of endocarps to being flat and oblong in shape as previously reported by Sheikh et al. (2021) for plum kernels. Based on the values of the above endocarp shape indexes in this study and their comparison with the IBPGR recommendations on stone shapes (lateral view) (Cobianchi, Watkins, 1984), it can be said that elongated and ovate shapes dominate, and sporadically, rounded ones appear.

Endocarp shape indexes proposed by Behre (1978), Van Zeist, Woldring (2000) and Pollmann et al. (2005) of the evaluated plum accessions were presented in Table 2.

The ANOVA showed significant differences among accessions for all four indexes. The highest RS index (endocarps in lateral view) denominated as relative slenderness was found in 'MUD', 'MUV' and 'TRN' with no significant differences between them. The lowest and statistically similar values of this index were discovered in 'ZIM' and 'MSI', both belonging to *P. domestica*. Our values of this index for 45 accessions (81.82 %) were within the limits described previously (Van Zeist, Woldring, 2000; Pollmann et al., 2005), while 10 accessions (18.18 %) had slightly lower values than the minimum described by the above authors. Otherwise, the more slender the stone, the lower the index value (Depypere et al., 2007). The high variability of this index was previously described by Van Zeist, Woldring (2000).

With regard to RO index, which expresses the roundness of the endocarp in apical view, the highest value was observed in 'COK', and the lowest, in 'BAB', with 2.27-fold difference between them. The minimum and maximum values according to the descriptors proposed by Van Zeist, Woldring (2000) and Pollmann et al. (2005) for this index are 112.15 and 225.45, respectively, which was the case in our study with the exception of 'BAB' that had a much lower value than the minimum limit. In general, endocarps with strongly domed sides show a low RO value, while in rather flat stones, this value is relatively high and always more than 100 (Van Zeist, Woldring, 2000).

Similarly to previous indexes, DE index, which represents endocarps in ventral view, varied among and within accessions. It was the highest in 'BAB', and the lowest and statistically similar one was observed in 'ZIM' and 'CRB', all belonging to *P. domestica*. Our values were generally closer to the minimum values proposed by Van Zeist, Woldring (2000), which varied from 26.30 to 106.32.

PI significantly varied among and within accessions, 'ZIM' being the accession with the highest value, whereas the smallest value was found in 'MUD' with 3.38-fold difference between them. According to Pollmann et al. (2005), minimal and maximal values of this index ranged between 1.27 and 7.68, which was confirmed by our data. Depypere et al. (2007) reported that the PI index value was highly variable for *P. domestica* and *P. insititia*.

Evaluation of variability and mean values of properties between plum types

With regard to the variability of mean values of properties evaluated by means of the coefficients of variability (CV, %), the results showed that L, D_a , D_g and somewhat ϕ had a low

Table 3. Intraspecific variability for *P. domestica* and *P. insititia* expressed by means of the coefficients of variability (CV, %) and mean values for each property evaluated

Parameter	<i>P. domestica</i> L.		<i>P. insititia</i> L.	
	CV, %	Mean ± SE	CV, %	Mean ± SE
SW	36.61	0.84 ± 0.15 a	55.90	0.78 ± 0.22 b
L	9.88	20.48 ± 1.00 a	18.57	19.28 ± 1.79 b
T	12.88	11.49 ± 0.74 a	17.22	11.20 ± 0.96 b
W	13.80	6.92 ± 0.44 a	17.92	6.80 ± 0.50 a
D _a	8.04	13.01 ± 0.52 a	15.83	12.42 ± 0.98 b
D _g	8.88	11.71 ± 0.51 a	15.79	11.31 ± 0.89 b
S	18.77	4.32 ± 0.41 a	30.53	4.14 ± 0.63 b
V	29.37	0.86 ± 0.13 a	45.43	0.82 ± 0.19 a
φ	10.15	0.577 ± 0.03 a	9.22	0.571 ± 0.03 a
SI	13.64	0.45 ± 0.03 b	17.84	0.47 ± 0.04 a
E	16.18	3.03 ± 0.24 a	15.47	2.97 ± 0.23 b
RS	13.04	56.35 ± 3.67 b	16.82	59.09 ± 4.97 a
RO	13.14	167.87 ± 11.03 a	7.19	165.91 ± 5.96 b
DE	17.33	34.08 ± 2.95 b	20.20	35.88 ± 3.62 a
PI	25.99	5.56 ± 0.72 a	29.09	4.84 ± 0.70 b

Note. CV > 25 % indicates high variability; 10 % < CV < 20 % indicates normal variability; CV < 10 % indicates low variability (following Rasch, 1988; cited in Hübner, Wissemann, 2004). Mean values with different letters in a row differ significantly at $p \leq 0.05$ by LSD test.

variability (CV < 10 %) in *P. domestica*, and only φ and RO, in *P. insititia* (Table 3).

Parameters T, W, S, SI, E, RS, RO and DE in *P. domestica* and L, T, W, D_a, D_g, SI, E, RS and DE in *P. insititia* had a low-to-normal variability (10 % < CV < 20 %). Parameters SW, V and PI in both European and Damson plums, and S and DE in *P. insititia* were moderate to highly variable (CV > 25 %). It appears that the mean value of the coefficients of variation of all morphological levels for accessions belonging to *P. domestica* was significantly smaller (CV = 16.51 %) compared to the accessions belonging to *P. insititia* (CV = 22.20 %) (data not shown). Our results were in good agreement with the results found by Depypere et al. (2007) for several indexes such as W, T, DE, RS and PI.

Regarding mean values of properties evaluated for both European and Damson plums, the results from Table 2 showed that there were significant differences between them with the exception of W, V and φ. These three values were statistically similar for both plum types. Accessions belonging to *P. domestica* had higher mean values for SW, L, T, D_a, D_g, S, E, RO and PI than accessions belonging *P. insititia*. On the contrary, accessions belonging to *P. insititia* had higher SI, RS and DE mean values than representatives of European plum.

Correlations among variables and principal component analysis (PCA)

Relationships among 15 endocarp parameters were studied and Pearson's correlations were calculated and were presented graphically (Fig. 2). Significant correlations were found among most of the studied traits, but high values were noted only in some cases.

SW was significantly correlated with all parameters and indexes with the exception of RS and RO, indicating that accessions with a big stone tend to have greater endocarp dimensions and higher indexes values in general and *vice versa*. Hence, all parameters can be used to predict each other. Similar tendencies were observed in cherry plum (Heidari et al., 2022). However, the intensity of correlations between some parameters differed. Namely, strong positive correlations were observed between SW and T, W, D_a, D_g, S and V, whereas other correlations were weak, which shows that endocarps have some very similar properties and that their values are not greatly influenced by genotype. In addition, SW was negatively correlated with E and PI. These findings are in good agreement with the results obtained on hazelnut (Milošević T., Milošević N., 2017).

L, W and T were significantly correlated with endocarp indexes with the exception of L vs W, T vs E and/or DE. The absence of significant correlation between L and W is in agreement with the results of Kosina (2023) for *P. spinosa*. So, these traits were considered to be independent. Strong correlations were observed between L and D_a and between T and D_a, D_g, S and V, indicating that endocarps with higher L and T tend to have a greater endocarp size. Both D_a and D_g showed very strong mutual correlation, and also with endocarp S and V. However, relationships of D_a and D_g with other indexes were small and not significant. φ was strongly positively correlated with SI, RS and DE, but strongly negatively correlated with E and PI. Both S and V were significantly correlated with SW, endocarp dimensions and size parameters, whereas correlations with all indexes were minor and not significant.

There was an extremely strong mutual correlation between S and V indicating that an endocarp with higher S values tends

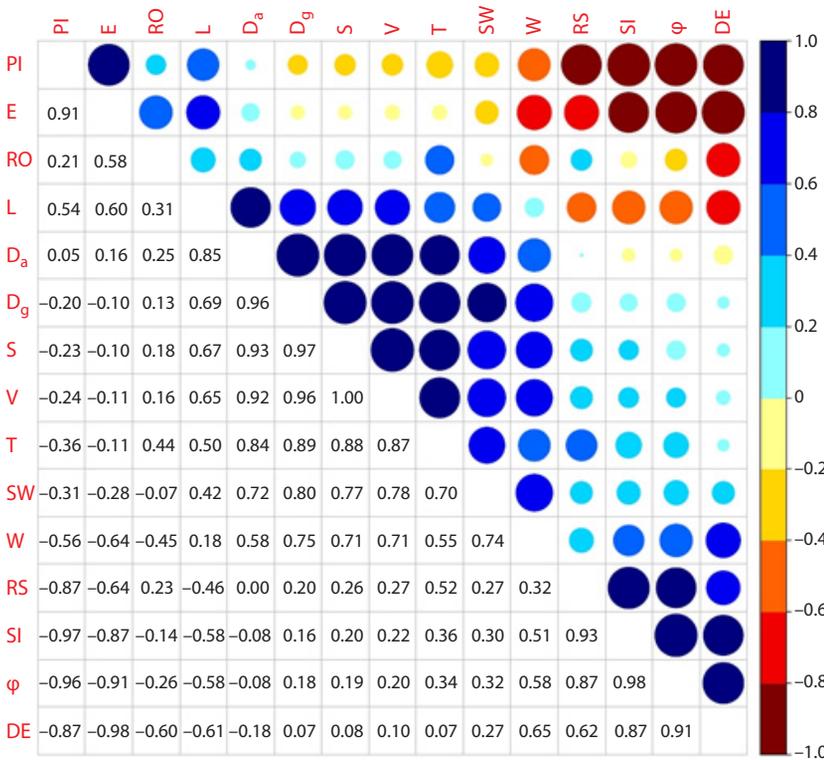


Fig. 2. Correlation matrix of Pearson's correlation coefficients (*r*) between the mean values of the endocarp parameters evaluated.

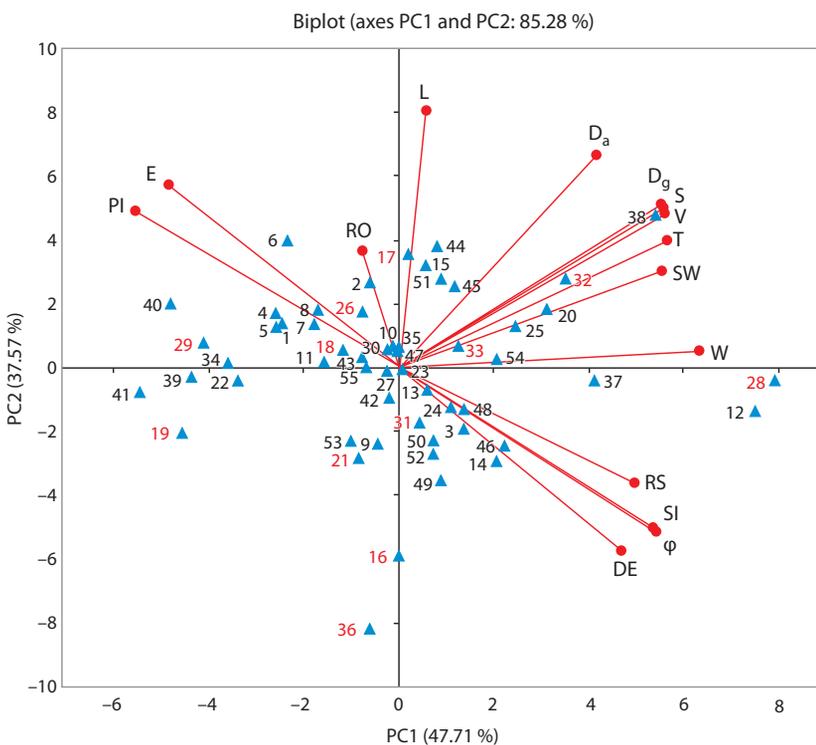


Fig. 3. Segregation of European and Damson plum accessions according to endocarp properties (linear dimensions, size and shapes) and their projections on the first (PC1) and second factors (PC2) of the component analysis.

See Table 1 for accession series numbers and accession codes; the series number in red represents accessions belonging to Damson plum.

to have higher V values and *vice versa*. On the other hand, there were no significant correlations between V and all shape indexes. SI was strongly negatively correlated with E and PI, and positively with RS and DE. Similar trends have been reported for European plum kernels (Sheikh et al., 2021). E vs RS and DE were negatively correlated, and positively correlated with RO and PI. RS showed negative correlations with PI, and positive with DE, whereas both RO and PI were negatively correlated with DE.

Principal component analysis (PCA), as a statistical tool, is performed to reduce the number of effective traits and to identify groups. In the current study, using the 15 analyzed parameters, the first three principal components accounted for 96.67 % of the total variance. PC1 explained 47.71 % of the total variation, while PC2 explained 37.57 % and PC3 explained 11.39 % (Fig. 3). According to the correspondence between the PCA and the original properties and eigenvectors, SW, T, D_g, φ, S, V, and SI made the largest contributions to PC1 with positive values, while PI had a negative contribution. As a result, genotypes such as ‘MUD’, ‘PLA’, ‘CDU’, ‘MUV’, ‘TURa’, ‘DRO’, ‘MAG’, ‘CPT’ and ‘RUZ’ tended to exhibit higher SW, T, D_g, φ, S, V, and SI values but lower PI values. In contrast, accessions like ‘ARP’, ‘CPI’, ‘CRN’, ‘CRD’, ‘MET’, ‘MOR’, ‘CRI’, ‘GBU’, ‘PIS’, ‘MCS’, ‘PAN’, ‘ZIM’ and ‘MSI’ displayed the opposite trend.

For PC2, positive values were associated with L, D_a, and E, whereas DE contributed negatively. This suggests that genotypes like ‘BPZ’, ‘CRB’, ‘COK’, ‘MAR’, ‘POZ’, ‘TUR’, ‘DUR’, ‘KOR’, ‘BOS’, and ‘SLA’ exhibited higher L, D_a, and E values, while accessions such as ‘BEL’, ‘KAP’, ‘OPI’, ‘PET’, ‘TRN’, ‘VOL’, ‘BJS’, ‘TRS’, ‘TRA’, ‘GUR’, ‘BIR’, ‘SIT’ and ‘MIR’ showed lower values of these parameters.

Finally, RS and RO contributed to the positive values of PC3, whereas W contributed negatively, indicating that genotypes such as ‘BJL’, ‘MED’, ‘BAS’, and ‘DRA’ were predisposed to higher RS and RO values, while accessions like ‘SAR’, ‘BEV’, ‘JUL’, ‘BAB’, ‘KAU’, and ‘POD’ tended to have lower W values.

Conclusions

The stones of accessions belonging to *P. domestica* L. and *P. insititia* L. showed characteristic differences in size and shape features, which greatly facilitate the identification of genotypes or accessions. Each of

them could be identified by means of dimensions and morphological features of the endocarps. In the present study, most endocarp parameters were found to be very useful for further taxonomic research, based on their low variability in both *P. domestica* and *P. insititia*. However, some parameters such as SW, V and PI exhibited a high variability and we suggest omitting their use for taxonomic purposes in some cases or for them to be used in a limited way. In general, the examined parameters varied less in accessions belonging to European plum compared to Damson plum genotypes. In addition, the mean values of SW, L, T, D_a, D_g, S, E, RO and PI were higher in *P. domestica* type compared to *P. insititia*, while the mean values of W, V and φ were similar. Others, such as SI, RS and DE were higher in Damson plum. However, due to overlapping ranges in most cases within and between plum types and accessions, the use of one or two endocarp parameters is not satisfactory for discrimination between Eurasian plum taxa. The multivariate analysis as a statistical tool can be useful for higher quality dispersion, segregation and determination of plum accessions, but in these analyses, the overlapping of values of endocarp morphological parameters also occurs. Finally, based on our results obtained on dry endocarps and the results of other researchers who experimented with fresh stones, we recommend full hydration of dried endocarps, as this restores the original dimensions and shape of the sampled endocarps.

References

- Bawari S., Sah A.N., Tewari D. Discovering the antiurolithiatic potential of wild Himalayan cherry through *in vitro* and preclinical investigations. *S Afr J Bot.* 2022;145:218-227. doi 10.1016/j.sajb.2021.01.020
- Behre E.-K. Formenkreise von *Prunus domestica* L. von der Wikingerzeit bis in die frühe Neuzeit nach Fruchtsteinen aus Haithabu und Alt-Schleswig. *Ber Deutsch Bot Ges.* 1978;91(1):161-179. doi 10.1111/j.1438-8677.1978.tb03640.x (in German)
- Burger P., Terral J.-F., Raus M.-P., Ivorra S., Picq S. Assessing past agrobiodiversity of *Prunus avium* L. (Rosaceae): a morphometric approach focused on the stones from the archaeological site Hôtel-Dieu (16th century, Tours, France). *Veget Hist Archaeobot.* 2012; 20(5):447-458. doi 10.1007/s00334-011-0310-6
- Caillavet H., Souty J. Monographie des principales variétés de pêcheurs. Bordeaux: Sté bordelaise d'imprimerie, 1950
- Carrillo-López A., Yahia E.M. Morphology and anatomy. In: Yahia E.M. (Ed.) Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. Woodhead Publishing; Elsevier, 2019;113-130. doi 10.1016/B978-0-12-813278-4.00006-3
- Cobianchi D., Watkins R. (Eds) Descriptor List for Plum and Allied Species. IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources), 1984
- das Graças Souza A., Smiderle O.J., Spinelli V.M., de Souza R.O., Bianchi V.J. Correlation of biometrical characteristics of fruit and seed with twinning and vigor of *Prunus persica* rootstocks. *J Seed Sci.* 2016;38(4):322-328. doi 10.1590/2317-1545v38n4164650
- de Figueiredo A.K., Bäumlér E., Riccobene C., Nolasco S.M. Moisture-dependent engineering properties of sunflower seeds with different structural characteristics. *J Food Eng.* 2011;102(1):58-65. doi 10.1016/j.jfoodeng.2010.08.003
- Depypere L., Chaerle P., Mijnsbrugge K.V., Goetghebeur P. Stony endocarp dimension and shape variation in *Prunus* section *Prunus*. *Ann Bot.* 2007;100(7):1585-1597. doi 10.1093/aob/mcm260
- Depypere L., Chaerle P., Mijnsbrugge K.V., Goetghebeur P. Classification trees and plant identification: a case study of European *Prunus* section *Prunus* taxa. *Belg J Bot.* 2009;142(2):163-176. doi 10.2307/41427184
- Drkenda P., Kurtović M. Pomological characteristics of autochthonous plum genotypes (*Prunus domestica*) from Bosnia and Herzegovina. *Acta Hort.* 2012;968:81-83. doi 10.17660/ActaHortic.2012.968.10
- Fıratlıgil-Durmuş E., Šárka E., Bubník Z., Schejbal M., Kadlec P. Size properties of legume seeds of different varieties using image analysis. *J Food Eng.* 2010;99(4):445-451. doi 10.1016/j.jfoodeng.2009.08.005
- Ganopoulos I., Moysiadias T., Xanthopoulou A., Ganopoulou M., Avramidou E., Aravanopoulos F.A., Tani E., Madesis P., Tsafaris A., Kazantzis K. Diversity of morpho-physiological traits in worldwide sweet cherry cultivars of GeneBank collection using multivariate analysis. *Sci Hort.* 2015;197:381-391. doi 10.1016/j.scienta.2015.09.061
- Garnayak D.K., Pradhan R.C., Nalk S.N., Bhatnagar N. Moisture-dependent physical properties of jatropha seed (*Jatropha curcas* L.). *Ind Crops Prod.* 2008;27(1):127-129. doi 10.1016/j.indcrop.2007.09.001
- Gezer İ., Haciseferoğulları H., Demir F. Some physical properties of Hacihaliloğlu apricot pit and its kernel. *J Food Eng.* 2002;56(1):49-57. doi 10.1016/S0260-8774(02)00147-4
- Glišić I., Milošević N., Tomić J., Milinković M., Đorđević M., Marić S., Radičević S., Popović B. Biological and pomological characteristics of autochthonous plum cultivars collected in western Serbia. *J Pomol.* 2023;57(215-216):7-16. doi 10.18485/pomology.2023.57.215_216.1
- González-García E., Marina M.L., García M.C. Plum (*Prunus domestica* L.) by-product as a new and cheap source of bioactive peptides: extraction method and peptides characterization. *J Funct Foods.* 2014;11:428-437. doi 10.1016/j.jff.2014.10.020
- Gunes M. Some local plum varieties grown in Tokat province. *Pak J Appl Sci.* 2003;3(5):291-295. doi 10.3923/jas.2003.291.295
- Heidari P., Sahebi M., Azadvari E., Lawson S., Rezaei M., Khadivi A. Morphological variability of indigenous cherry plum (*Prunus divaricata* Ledeb.) accessions. *Eur J Hort Sci.* 2022;87(1):1-8. doi 10.17660/eJHS.2022/002
- Hübner S., Wissemann V. Morphometrische Analysen zur Variabilität von *Prunus spinosa* L. – Populationen (*Prunoideae*, Rosaceae) im Mittleren Saaletal, Thüringen. *Forum Geobot.* 2004;1:19-51. doi 10.3264/FG.2004.1215 (in German)
- Jaćimović V., Božović Đ., Lazović B., Adakalić M., Ljutica S. Autochthonous plum cultivars grown in the region of Gornje Polimlje. *J Pomol.* 2011;45(175-176):109-115 (in Serbian with English abstract)
- Khadivi A., Mirheidari F., Moradi Y., Paryan S. Morphological and pomological diversity of wild *Prunus microcarpa* Boiss. germplasm. *BMC Plant Biol.* 2022;22(1):185. doi 10.1186/s12870-022-03572-2
- Kosina R. A contribution to the variability of *Prunus spinosa* L. in the vicinity of the mediaeval Castle Kolno, S-W Poland. *Biodiv Res Conserv.* 2023;70:13-18. doi 10.14746/biorc.2023.70.2
- Mansouri A., Mirzabe A.H., Ráufi A. Physical properties and mathematical modeling of melon (*Cucumis melo* L.) seeds and kernels. *J Saudi Soc Agric Sci.* 2017;16(3):218-226. doi 10.1016/j.jssas.2015.07.001
- Mijnsbrugge K.V., Depypere L., Chaerle P., Goetghebeur P., Breyne P. Genetic and morphological variability among autochthonous *Prunus spinosa* populations in Flanders (northern part of Belgium): implications for seed sourcing. *Plant Ecol Evol.* 2013;146(2):193-202. doi 10.5091/plecevo.2013.762
- Milošević N., Glišić I., Lukić M., Đorđević M. Biological and pomological characteristics of autochthonous plum cultivars in agroecological conditions of Čačak. In: Proceedings of 22nd Symposium on Biotechnology with International Participation, Faculty of Agronomy. Čačak, 2017;271-280 (in Serbian with English abstract)

- Milošević T., Milošević N. Phenotypic diversity of autochthonous European (*Prunus domestica* L.) and Damson (*Prunus insititia* L.) plum accessions based on multivariate analysis. *Hortic Sci.* 2012; 39(1):8-20. doi 10.17221/99/2011-HORTSCI
- Milošević T., Milošević N. Determination of size and shape features of hazelnuts using multivariate analysis. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus.* 2017;16(5):49-61. doi 10.24326/asphc.2017.5.6
- Milošević T., Milošević N. Plum (*Prunus* spp.) breeding. In: Al-Khayari J.M., Jain M.S., Johnson D.V. (Eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*. Springer International Publishing AG, 2018;165-215. doi 10.1007/978-3-319-91944-7_5
- Milošević T., Milošević N., Mladenović J. Diversity of plums belonging to *P. domestica* L., *P. insititia* L. and *Prunus* × *rossica* Erem. Tree vigour, yielding and fruit quality attributes. *Sci Hortic.* 2023;320:112220. doi 10.1016/j.scienta.2023.112220
- Mohsenin N.N. *Physical properties of plants and animal materials*. New York: Gordon & Breach Science Publishers, 1986;5-8;616-647
- Munder S., Argyropoulos D., Muller J. Class-based physical properties of air-classified sunflower seeds and kernels. *Biosyst Eng.* 2017; 164:124-134. doi 10.1016/j.biosystemseng.2017.10.005
- Nielsen J., Olrik D.C. A morphometric analysis of *Prunus spinosa*, *P. domestica* ssp. *insititia*, and their putative hybrids in Denmark. *Nord J Bot.* 2001;21(4):349-363. doi 10.1111/j.1756-1051.2001.tb00778.x
- Pérez-Sánchez R., Gómez-Sánchez M.A., Morales-Corts M.R. Description and quality evaluation of sweet cherries cultured in Spain. *J Food Qual.* 2010;33(4):490-506. doi 10.1111/j.1745-4557.2010.00339.x
- Plainfossé H., Burger P., Verger-Dubois G., Azoulay S., Fernandez X. Design methodology for the development of a new cosmetic active based on *Prunus domestica* L. leaves extract. *Cosmetics.* 2019;6:8. doi 10.3390/cosmetics6010008
- Pollmann B., Jacomet S., Schlumbaum A. Morphological and genetic studies of waterlogged *Prunus* species from the Roman vicus *Tasgetium* (Eschenz, Switzerland). *J Archaeol Sci.* 2005;32(10):1471-1480. doi 10.1016/j.jas.2005.04.002
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2021. Available at: <https://www.R-project.org/>. Accessed on June 13, 2024
- Ropelewska E. Diversity of plum stones based on image texture parameters and machine learning algorithms. *Agronomy.* 2022;12:762. doi 10.3390/agronomy12040762
- Sarigu M., Oscar G., Lo Bianco M., Uccesu M., d'Hallewin G., Loi M.C., Venora G., Bacchetta G. Phenotypic identification of plum varieties (*Prunus domestica* L.) by endocarps morpho-colorimetric and textural descriptors. *Comput Electron Agr.* 2017;136:25-30. doi 10.1016/j.compag.2017.02.009
- Šebek G. Selection of some autochthonous plum cultivars seedling rootstocks in the region of North Montenegro. *J Hyg Eng Des.* 2013;4:117-121
- Sheikh M.A., Saini C.S., Sharma H.K. Computation of design-related engineering properties and fracture resistance of plum (*Prunus domestica*) kernels to compressive loading. *J Agric Food Res.* 2021;3:100101. doi 10.1016/j.jafr.2021.100101
- Van Zeist W., Woldring H., Plum (*Prunus domestica* L.) varieties in late- and post-medieval Groningen: the archaeobotanical evidence. *Palaeohistoria.* 2000;39/40:563-576
- Watkins R. Cherry, plum, peach, apricot and almond. In: Simmonds N.W. (Ed.) *Evolution of Crop Plants*. London: Longman, 1976;242-247
- Woldring H. On the origin of plums: a study of sloe, damson, cherry plum, domestic plums and their intermediate forms. *Paleohistoria.* 2000;39/40:535-562

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

Received July 16, 2024. Revised October 10, 2024. Accepted October 14, 2024.

doi 10.18699/vjgb-25-07

Циркадные колебания содержания растворимых сахаров и экспрессии генов инвертаз *TAI*, *LIN6* и транспортера сахаров *STP1* в листьях растения томата (*Solanum lycopersicum* L.)

М.А. Филюшин  , А.В. Щенникова , Е.З. Кочиева 

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия
 michel7753@mail.ru

Аннотация. Содержание основных для плода томата (*Solanum lycopersicum* L.) гексоз (фруктозы, глюкозы) регулируется совместной активностью ферментов гидролиза сахарозы (включая инвертазы), ингибиторов инвертаз и транспортеров сахаров. Кроме вкусовых качеств, растворимые сахара тесно связаны со стрессоустойчивостью растений томата. В настоящей работе была определена суточная динамика содержания растворимых сахаров (сахарозы, фруктозы и глюкозы), а также экспрессия генов ферментов гидролиза сахарозы (вакуолярной инвертазы *TAI*, инвертазы клеточной стенки *LIN6*) и транспортера гексоз (*STP1*) в листьях растений томата сорта Корнеевский. Было показано, что количество сахаров и уровень транскриптов генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* зависят от циркадного ритма и соответствуют биологическим процессам, протекающим в растении в разное время суток. Содержание сахарозы и гексоз в течение суток изменяется сходным образом. В начале световой фазы концентрация сахаров минимальна, в конце – имеет наибольшие дневные значения; в начале темновой фазы демонстрирует остаточный рост и затем снижается к концу фазы. Анализ *in silico* органоспецифичной экспрессии *TAI*, *LIN6* и *STP1* у сорта Micro-Том *S. lycopersicum* показал наличие их транскриптов во всех тканях. Ген *TAI* экспрессировался наиболее активно в спелых плодах, тогда как уровень транскриптов *LIN6* и *STP1* в этих органах носил следовой характер. В листьях уровень мРНК *TAI* был выше, чем таковой *LIN6* и *STP1*, в ~2 и ~27 раз соответственно. Анализ с помощью ПЦР-РВ суточной динамики экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* в листьях растений сорта Корнеевский показал, что гены экспрессируются во всех проанализированных временных точках. Колебания уровня экспрессии генов происходят сходным образом: уровень мРНК достигает пиковых значений в середине световой и темновой фаз. Полученные результаты важны для понимания функций инвертаз и транспортеров сахаров в растении томата и могут быть использованы в селекции при прогнозировании стрессоустойчивости растений.

Ключевые слова: томат; *Solanum lycopersicum* L.; растворимые сахара; инвертазы; транспортер гексоз; экспрессия генов; циркадный ритм.

Для цитирования: Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З. Циркадные колебания содержания растворимых сахаров и экспрессии генов инвертаз *TAI*, *LIN6* и транспортера сахаров *STP1* в листьях растения томата (*Solanum lycopersicum* L.). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(1):55-60. doi 10.18699/vjgb-25-07

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 24-16-00043, биохимический и экспрессионный анализы) и Министерства образования и науки РФ (получение семенного материала и подготовка растений к анализу).

Diurnal fluctuations in the content of soluble sugars and the expression of the *TAI* and *LIN6* invertase genes and the *STP1* sugar transporter gene in the leaves of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.)

М.А. Filyushin  , A.V. Shchennikova , E.Z. Kochieva 

Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
 michel7753@mail.ru

Abstract. The content of hexoses (fructose, glucose) essential for the fruit of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is regulated by the joint activity of sucrose hydrolysis enzymes (including invertases), invertase inhibitors, and sugar transporters. In addition to fruit taste, soluble sugars are closely related to the stress resistance of the tomato plant. In this work, we determined the diurnal dynamics of the content of soluble sugars (sucrose, fructose and glucose) and the expression of genes for sucrose hydrolysis enzymes (vacuolar invertase *TAI*, cell wall invertase *LIN6*) and the hexose transporter (*STP1*) in the leaves of the tomato variety Korneevsky. It was shown that both the amount of sugars and the level of transcripts of the *TAI*, *LIN6* and *STP1* genes depend on the circadian rhythm and correspond to the biological processes occurring in the plant at

different periods of the day. The content of sucrose and hexoses changes in a similar way during the day. At the beginning of the light phase, the concentration of sugars is minimal, at the end it has the highest daily values; at the beginning of the dark phase, it shows a residual increase and then decreases towards the end of the phase. *In silico* analysis of organ-specific expression of *TAI*, *LIN6* and *STP1* in *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom showed the presence of mRNA of all three genes in all tissues. The *TAI* gene was expressed most strongly in ripe fruits, while the level of *LIN6* and *STP1* transcripts was extremely low. The level of *TAI* mRNA in the leaves was ~2 times higher than that of *LIN6* and ~27 times higher than that of *STP1*. Analysis using qRT-PCR of the diurnal dynamics of *TAI*, *LIN6* and *STP1* expression in the cv. Korneevsky leaves showed that all three genes were expressed at all points analyzed. Fluctuations in their expression levels occur in a similar manner: mRNA levels reach peak values in the middle of the light and dark phases. The results obtained are important for understanding the functions of invertases and sugar transporters in the tomato plant, and can be used in predicting the stress resistance of plants in tomato breeding.

Key words: tomato; *Solanum lycopersicum* L.; soluble sugars; invertases; hexose transporter; gene expression; circadian rhythm.

For citation: Filyushin M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Diurnal fluctuations in the content of soluble sugars and the expression of the *TAI* and *LIN6* invertase genes and the *STP1* sugar transporter gene in the leaves of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):55-60. doi 10.18699/vjgb-25-07

Введение

Благодаря фотосинтезу растение накапливает ассимиляты – жизненно важные органические соединения, утилизируемые для дыхания, поддержания клеточного метаболизма, роста и развития. Основная транспортная форма фотоассимилятов у растений представлена сахарозой (Lemoine et al., 2013). Сигналом к распределению фотоассимилятов служат молекулы сахарозы и глюкозы, количество которых влияет на регуляцию активности генов онтогенеза, включая гены фотосинтеза и углеводного обмена (Koch, 2004; González et al., 2005; Rolland et al., 2006).

После доставки в запасующие ткани (цветки, плоды, клубни и др.) сахароза расщепляется на глюкозу и фруктозу с помощью сахарозосинтаз (обратимый гидролиз) или инвертаз (необратимый гидролиз). Функции последних отличаются высокой вариабельностью и тесно связаны с локализацией в различных клеточных компартментах (Roitsch, González, 2004). Уровень экспрессии генов инвертаз зависит от типа ткани/органа, стадии развития растения и внешних стимулов, включая воздействие стрессовых факторов, фитогормонов, элиситоров и пр. (Koch, 2004; Roitsch, González, 2004; Proels, Roitsch, 2009). К распределению сахарозы по растительным тканям и органам и передаче сигнала имеют отношение инвертазы клеточной стенки, тогда как в накоплении сахаров и осморегуляции участвуют вакуолярные инвертазы (Roitsch, González, 2004; González et al., 2005). Образующиеся при гидролизе сахарозы гексозы попадают в клетки запасующих тканей с помощью транспортеров гексоз (Proels, Roitsch, 2009).

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) представляет собой одну из самых популярных в мире овощных культур. Плоды томата в процессе созревания накапливают глюкозу и фруктозу (Beckles et al., 2012), которые влияют на сладость плода. Количество этих гексоз регулируется совместной активностью сахарозосинтаз (обратимый гидролиз сахарозы), инвертаз (необратимый гидролиз сахарозы), ингибиторов инвертаз, а также транспортерами сахаров (Kawaguchi et al., 2021; Wang B. et al., 2021). Помимо определения вкуса плодов, растворимые сахара вносят значительный вклад в регуляцию стрессоустойчивости растения томата в процессе роста и развития (Proels, Roitsch, 2009). Повышенное привлечение углеводов к проблемному участку дает энергию для защитных реакций,

включая стимуляцию накопления углеводов и модуляцию экспрессии соответствующих генов, в том числе генов инвертаз и транспортеров сахаров (Proels, Roitsch, 2009). В условиях биотического стресса наблюдается скоординированная индукция экспрессии генов переносчика моносахаридов и инвертазы клеточной стенки (Fotopoulos et al., 2003; Voegelé et al., 2006), что подтверждает важную роль апопластного расщепления сахарозы в опосредовании защитных реакций. Независимо от процесса, и метаболизм, и распределение сахаров, а следовательно, и экспрессия задействованных генов контролируются циркадными ритмами, в частности суточными колебаниями интенсивности биологических процессов (González et al., 2005; Rolland et al., 2006).

Среди инвертаз томата наиболее значимую роль выполняют инвертаза клеточной стенки *LIN6* (*Wiv-1*) (Proels, Roitsch, 2009) и вакуолярная инвертаза *TAI* (другие названия *AI*, *PAIN1*) (Elliott et al., 1993). Фермент *LIN6*, участвующий в росте растения и в ответе на различные стрессовые факторы, находится под контролем ключевых факторов циркадианного осциллятора (Proels, Roitsch, 2009; Zhang et al., 2013). Активность *TAI* связывают преимущественно с гидролизом сахарозы в плоде томата (Slugina et al., 2017). Информации о возможной зависимости экспрессии гена *TAI* от циркадных ритмов в растениях томата в литературе не найдено. Однако можно предположить, что такая связь существует, основываясь на данных для вакуолярной инвертазы сахарной свеклы *Beta vulgaris* (González et al., 2005).

Среди транспортеров гексоз у томата наиболее известны белки *STP1* и *STP2*. Нокаут кодирующих их генов приводит к сокращению количества глюкозы и фруктозы в корнях, что снижает чувствительность растения к заражению нематодами (Warnock et al., 2016). Особенно выделяют ген *STP1*, который считается мишенью доместикации в геноме томата и отсутствие экспрессии которого приводит к снижению плодоношения и количества сахаров в плоде (Wang Y. et al., 2023). Свидетельств зависимости экспрессии гена от циркадианного осциллятора в литературе не имеется. Тем не менее, как и для инвертаз, подобная связь может иметь место.

В настоящей работе была определена зависимость динамики экспрессии генов вакуолярной инвертазы *TAI*,

инвертазы клеточной стенки *LIN6* и транспортера гексоз *STP1*, а также содержания растворимых сахаров (сахарозы, глюкозы, фруктозы) от суточного ритма в процессе роста растения томата. Полученные результаты важны для понимания функций инвертаз и транспортеров сахаров в растении томата.

Материалы и методы

Для исследования использовали растения томата *S. lycopersicum* сорта Корнеевский селекции Федерального научного центра овощеводства (ФНЦО, Московская область). Сорт среднеспелый, высокосахаристый, для закрытого грунта, устойчив к различным стрессовым факторам, включая колебания температуры и фотопериода (код сорта 8262334, <https://gossortrf.ru/registry/>).

Растения томата сорта Корнеевский были выращены до стадии плодоношения в 2023 г. в тепличных условиях ФНЦО. Собранные семена использовали в 2024 г. для получения растений в стадии 5–7 листьев (экспериментальная установка искусственного климата, ФИЦ Биотехнологии РАН) в условиях длинного фотопериода и оптимальной температуры (день/ночь – 16 ч/8 ч, 23 °C/21 °C; световая фаза с 7:00 до 23:00; освещенность 190 мкМ/(м²·с)). Листовые пробы (по два растения на каждую временную точку анализа) отбирали в течение суток в шести точках: 1 ч до (6:00) и после (8:00) наступления дневной фазы; середина дневной фазы (15:00); 1 ч до (22:00) и после (24:00) наступления темновой фазы; середина темновой фазы (3:00). Тканевый материал измельчали в жидком азоте и использовали для анализа содержания растворимых сахаров и уровня экспрессии генов инвертаз (*TAI*, Solyc03g083910; *LIN6*, Solyc10g083290) и транспортера гексоз (*STP1*, Solyc02g079220).

Концентрацию растворимых сахаров (сахароза, глюкоза, фруктоза) (мг/100 г сырой массы) определяли с помощью тестов Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose и Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-Biopharm AG, Германия).

Предварительный анализ профиля экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* в различных органах растения томата проводили *in silico* с использованием транскриптомных данных для сорта Micro-Tom *S. lycopersicum* (база данных TomExpress; <http://tomexpress.toulouse.inra.fr/login/>) (Zouine et al., 2017). Визуализацию данных осуществляли с помощью программы для построения тепловых карт (<http://www2.heatmapper.ca/expression/>) на основании значений ФРКМ (Fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments; TomExpress).

Для анализа экспрессии генов с помощью количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) суммарную РНК выделяли из 0.2–0.5 г собранного листового материала и очищали от примесей ДНК (RNeasy Plant Mini Kit, RNase-free DNase set, QIAGEN, Германия). Полученную РНК использовали для синтеза кДНК (GoScript Reverse Transcription System, Promega, США). Концентрацию препаратов РНК и кДНК определяли флуориметрически (Qubit® Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, США; Qubit RNA HS Assay Kit, Invitrogen, США). Подбор праймеров для ПЦР-РВ осуществляли посредством структурного анализа последовательностей анализируемых генов *S. lycopersicum*

persicum и их транскриптов (доступны в базах данных: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <https://solgenomics.net/>) с помощью NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Были подобраны праймеры для ПЦР-РВ к генам *LIN6* (5'-ttccgatgcctcaaggcaag-3', 5'-cacgttttctcctccagcacc-3') и *STP1* (5'-tgctcagaatgttctatgctc-3', 5'-gtgctcctctgtattgtatgg-3'). Для гена *TAI* использовали разработанные нами ранее последовательности праймеров (Slugina et al., 2017). Реакционная смесь для ПЦР-РВ включала 3 нг кДНК, специфичные праймеры и “2.5x Реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I и ROX” (ООО «Синтол», Россия). ПЦР-РВ ставили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США); программа: 5 мин при 95 °C, 40 циклов (15 с при 95 °C; 40 с при 60 °C). Данные нормализовали на экспрессию двух референсных генов *Expressed* (SGN-U346908) и *actin2/7* (NM_001330119.1) (Efremov et al., 2020). Анализ выполняли в двух биологических и трех технических повторах.

Результаты анализа содержания сахаров (мг/100 г сырой массы) и экспрессии генов статистически обрабатывали с помощью GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Значимость ($p < 0.05$) различий между значениями, полученными для временных точек, определяли, используя Two-way ANOVA (“multiple comparisons, corrected with Bonferroni test”).

Результаты

В данной работе на примере томата сорта Корнеевский (*S. lycopersicum*) было охарактеризовано суточное изменение содержания растворимых сахаров и профиля экспрессии генов двух ключевых инвертаз (вакуолярной, *TAI*; клеточной стенки, *LIN6*) и транспортера сахаров (*STP1*) в листьях растения, находящегося в активной стадии вегетативного роста и развития (5–7 листьев).

Поскольку растения *S. lycopersicum* нейтральны к фотопериоду (Lifschitz, Eshed, 2006), был использован характерный для летнего времени длинный фотопериод (16 ч день/8 ч ночь). Измерения проводили в шести временных точках: 1 ч до и 1 ч после наступления светового периода (6:00, 8:00); 1 ч до и 1 ч после наступления темнового периода (22:00, 24:00), в середину темнового (3:00) и светового (15:00) периодов.

В этих точках было измерено содержание растворимых сахаров (глюкозы, фруктозы и сахарозы) (рис. 1). Показано, что в начале светового периода количество всех анализируемых сахаров минимально. К середине дня (15:00) оно повышается в ~1.2–2.0 раза, а к концу (22:00) – резко увеличивается в ~15 раз (vs. 8:00), достигая дневного максимума. В начале темновой фазы (24:00) содержание гексоз продолжает расти в ~1.3–1.6 раза vs. 22:00, однако во второй половине темнового периода (3:00, 6:00) снижается в ~1.5–2.0 раза vs. 24:00. В начале светового периода (8:00) количество гексоз уменьшается еще более резко (в ~50–60 раз vs. 6:00) (см. рис. 1).

Содержание сахарозы в течение суток изменяется сходным с гексозами образом, за исключением точки 24:00 (снижение в ~2 раза vs. 22:00) и более плавного по срав-

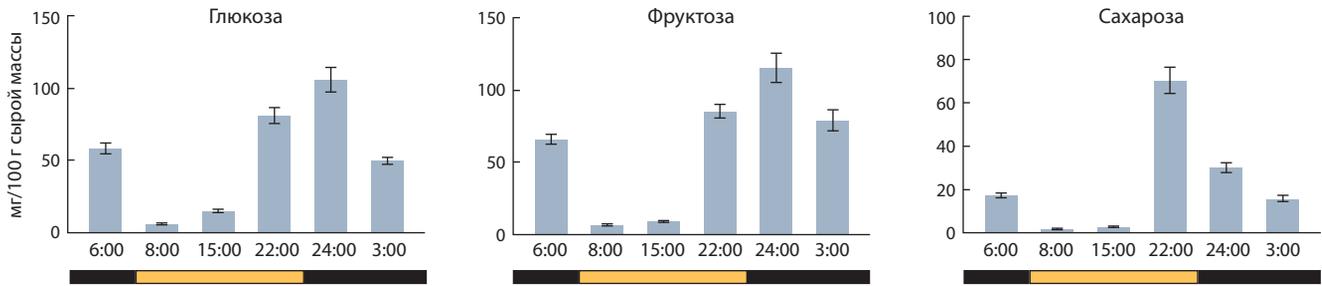


Рис. 1. Суточное изменение содержания глюкозы, фруктозы и сахарозы в листе растения томата сорта Корнеевский (*S. lycopersicum*).

Значения концентрации сахаров в разные временные точки различаются достоверно ($p < 0.05$), за исключением: глюкоза (6:00 vs. 3:00; 8:00 vs. 15:00); фруктоза (6:00 vs. 22:00; 8:00 vs. 15:00; 6:00 vs. 3:00; 22:00 vs. 3:00); сахароза (6:00 vs. 3:00; 8:00 vs. 15:00).

нению с гексозами уменьшения в точке 8:00 (в ~18 раз vs. 6:00) (см. рис. 1).

Таким образом, содержание анализируемых растворимых сахаров минимально в начале и максимально в конце светового периода, тогда как в темновой фазе их количество более постоянно.

Далее была охарактеризована экспрессия генов *LIN6*, *STP1* и *TAI*. Предварительно анализ органоспецифичной экспрессии этих генов *in silico* (рис. 2) показал, что мРНК всех трех генов присутствует в вегетативных тканях и в растущем плоде, включая стадию достижения финального размера плода и начала смены его окраски (Breaker, BR). В созревающем плоде (стадии оранжевой (Orange, OR) и красной (Red Ripe, RR) окраски) обнаруживались лишь следовые количества транскриптов генов *LIN6* и *STP1* (0.002–0.0129 FPKM).

В то же время ген *TAI* экспрессировался в данных тканях наиболее интенсивно. Пик экспрессии *TAI* (26.95–35.71 FPKM) соответствовал стадии OR созревания плода, на которой уровень транскриптов гена был примерно в 2 и 27–36 раз выше, чем в плоде на стадии RR (6.43–13.13 FPKM) и в вегетативных тканях/растущем плоде, включая стадию BR (0.20–1.15 FPKM), соответственно. В других репродуктивных тканях – бутонах, цветках и семенах плода RR – количество транскриптов *TAI* было выше примерно в 6–12, 20–40 и 50 раз соответственно, по сравнению с генами *LIN6* и *STP1* (см. рис. 2).

Несмотря на очевидную специфичность активности *TAI* к тканям спелого плода, уровень его экспрессии в вегетативных органах (0.20–1.15 FPKM) был в среднем выше, чем у *LIN6* (0.01–0.06 FPKM) и *STP1* (0.06–0.88 FPKM). В листе количество мРНК *TAI* было выше примерно в 2 и 27 раз, чем у *LIN6* и *STP1* соответственно. Уровень экспрессии *LIN6* в листе был самым низким: примерно в 12 раз ниже, чем у *STP1* (см. рис. 2).

Таким образом, *in silico* анализ профилей экспрессии генов показал, что по активности ген вакуолярной инвертазы *TAI* значительно превосходит гены инвертазы клеточной стенки *LIN6* и транспортера сахаров *STP1* во всех органах растения. Наиболее высокая экспрессия *TAI* была отмечена в репродуктивных органах, особенно в запасающих тканях спелого плода на стадиях OR и RR.

Последующий анализ был сфокусирован на определении уровня экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* методом ПЦР-РВ в шести временных точках в тех же образцах



Рис. 2. Графическая визуализация (в виде тепловой карты) данных экспрессии генов *LIN6*, *STP1* и *TAI* в растении томата сорта Micro-Tom (*S. lycopersicum*), построенная по транскриптомным данным TomExpress (Zouine et al., 2017).

Анализируемые органы: корень (1); лист (2); бутон (3); цветок на стадии антезиса (4); плод – 4 дня после антезиса (дпа) (5); мякоть (6) и кожица (7) плода (10 дпа); мякоть (8) и кожица (9) плода (35 дпа); мякоть (10) и кожица (11) плода (38 дпа, BR); мякоть (12) и кожица (13) плода (41 дпа, OR); мякоть (14) и кожица (15) плода (44 дпа, RR); зрелые семена (16). Значения FPKM округлены до второго знака после запятой.

листьев сорта Корнеевский, в которых ранее измерялось содержание растворимых сахаров. В результате показано, что все три гена экспрессируются во всех шести временных точках. Наиболее высокие относительные уровни транскриптов в среднем наблюдались для гена *LIN6*, наиболее низкие – для *STP1*. Для гена *TAI*, вопреки ожиданиям, основанным на *in silico* данных (см. рис. 2), получены значения, на порядок более низкие, чем для *LIN6*, и лишь в 3–4 раза более высокие, чем для *STP1* (рис. 3).

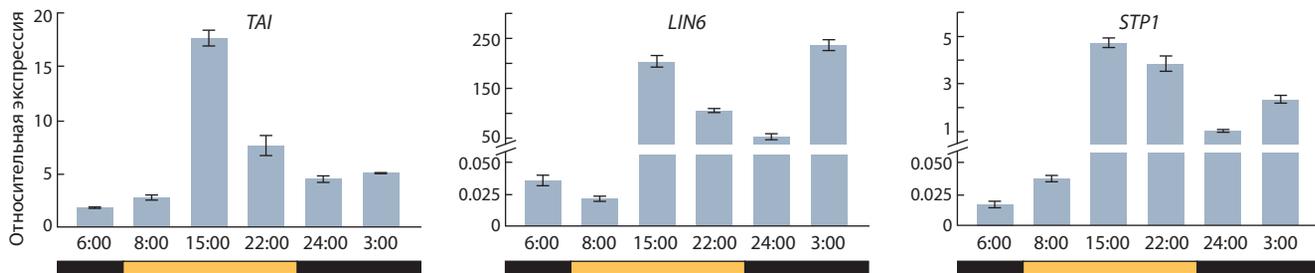


Рис. 3. Профиль экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* по данным ПЦР-РВ.

Значения уровней экспрессии по каждому из генов в анализируемых временных точках различаются достоверно ($p < 0.05$), за исключением: *TAI* (6:00 vs. 8:00; 24:00 vs. 3:00), *LIN6* (6:00 vs. 8:00), *STP1* (6:00 vs. 8:00).

В целом профиль экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* в течение суток оказался сходным. Уровень транскриптов значительно возрастал от начала (8:00) к середине (15:00) световой фазы: в ~ 7 раз для *TAI*, ~ 7000 раз для *LIN6* и ~ 128 раз для *STP1*. Затем он снижился в ~ 1.2 – 2.5 раза (22:00 vs. 15:00) к ее окончанию и в ~ 2 – 3.5 раза (24:00 vs. 22:00) в начале темновой фазы. К середине ночи уровень экспрессии генов повышался в ~ 2 – 5 раз (3:00 vs. 24:00) и к концу темновой фазы снижился в ~ 2.5 раза для *TAI*, ~ 7000 раз для *LIN6* и ~ 183 раза для *STP1* (6:00 vs. 3:00) (см. рис. 3).

Таким образом, динамика суточных колебаний уровня экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* была сходной, однако значительно более выраженной в случае *LIN6* и *STP1* по сравнению с *TAI*. Уровень экспрессии *LIN6* и *STP1* был следовым в предутренний период и в начале дня, а *TAI* — относительно постоянным и более существенным.

Обсуждение

Растворимые моно- и дисахариды оказывают значительное влияние на рост и развитие растений (Proels, Roitsch, 2009; Lemoine et al., 2013). Их содержание (помимо синтеза/распада гликанов) регулируется гидролизом сахарозы под действием сахарозосинтаз, инвертаз и ингибиторов инвертаз, а также переносом между тканями с помощью транспортеров (Kawaguchi et al., 2021; Wang B. et al., 2021).

Растворимые сахара играют важную роль во всех процессах онтогенеза растений, в том числе томата (Proels, Roitsch, 2009). Более того, при стрессах повышенный приток углеводов к проблемным участкам дает энергию для защитных реакций, включая скоординированную стимуляцию накопления углеводов и экспрессии генов инвертаз и транспортеров сахаров (Fotopoulos et al., 2003; Voegelé et al., 2006; Proels, Roitsch, 2009; Bolouri Moghaddam, Van den Ende, 2013).

В любом процессе, протекающем в растении при участии растворимых сахаров, и содержанию сахаров, и интенсивности экспрессии соответствующих генов присутствуют суточные синхронные циклические колебания под контролем циркадианного осциллятора (González et al., 2005; Rolland et al., 2006).

В нашем исследовании была проанализирована суточная динамика количества растворимых сахаров (сахарозы, глюкозы и фруктозы) в листьях растений томата сорта Корнеевский. Точки измерения охватывали пограничные периоды между темновой и световой фазами (6:00, 8:00,

22:00, 24:00) и середины фаз (15:00, 3:00). В этих же точках была определена экспрессия генов вакуолярной инвертазы (*TAI*), инвертазы клеточной стенки (*LIN6*) и транспортера гексоз (*STP1*), роль которых в метаболизме сахаров у томата особенно важна (Elliott et al., 1993; Proels, Roitsch, 2009; Warnock et al., 2016; Slugina et al., 2017).

Полученный суточный профиль содержания сахаров (см. рис. 1) находится в соответствии с активным синтезом сахарозы в дневной фазе фотосинтеза, а также с суточным циклом расходования/поступления сахаров за счет синтеза/распада транзитного крахмала днем/ночью (Haydon et al., 2011). В течение световой фазы происходит постепенное накопление сахарозы, глюкозы и фруктозы (см. рис. 1). Часть глюкозы, предположительно, расходуется на синтез транзитного крахмала. Одновременно из листьев как источников сахаров идет их отток в запасующие органы (в данном случае в корни растений). К концу дня количество сахаров достигает наивысших значений, а в темновой фазе снижается (не сразу) и поддерживается на относительно постоянном уровне (см. рис. 1) из-за остановки синтеза сахарозы и активации процесса распада транзитного крахмала (Koch, 2004; Haydon et al., 2011).

Основным результатом характеристики экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1*, проведенной *in silico* (см. рис. 2), стало подтверждение показанной ранее важной роли гена вакуолярной инвертазы *TAI* в гидролизе сахарозы в запасующей ткани спелого плода (Elliott et al., 1993; Slugina et al., 2017). Кроме того, более высокий уровень мРНК *TAI* в сравнении с *LIN6* позволил предположить и наибольшую важность *TAI* для процесса в вегетативной ткани. Существенное присутствие транскриптов гена инвертазы клеточной стенки *LIN6* в вегетативной ткани коррелирует с данными о значимости *LIN6* для вегетативного роста растения (Proels, Roitsch, 2009; Zhang et al., 2013). Также наличие мРНК *LIN6* и гена транспортера сахаров *STP1* в вегетативной ткани (см. рис. 2) согласуется с участием перечисленных генов в стрессовом ответе растения (Proels, Roitsch, 2009; Warnock et al., 2016). При этом следовые количества транскриптов *STP1* в спелом плоде сорта Микро-Том (см. рис. 2) с учетом его высокой сахаристости и показанной прямой ассоциации экспрессии *STP1* с количеством сахаров в плоде (Wang Y. et al., 2023) предполагают, что для реализации зависимости достаточно даже невысокой активности указанного гена.

Последующий анализ суточной динамики экспрессии генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* в листе томата сорта Корнеевский

показал, что активность всех трех генов изменяется сходным образом и связана с циркадным ритмом (см. рис. 3). Суточная динамика экспрессии *TAI* согласуется с показанной ранее суточной динамикой для гена вакуолярной инвертазы *B. vulgaris* (González et al., 2005): у обоих генов пик экспрессии приходится на середину световой фазы.

В отличие от *TAI*, ген инвертазы клеточной стенки *LIN6* имеет еще один максимум экспрессии – в середине ночи. Вопреки ожиданиям в соответствии с данными *in silico* (см. рис. 2), уровень транскриптов *LIN6* был на порядок выше, чем у *TAI* (см. рис. 3). Возможно, это объясняется тем, что в анализе *in silico* базы данных (Zouine et al., 2017) использовались более взрослые растения и, следовательно, более старые листья с крупными вакуолями в клетках. В нашем случае тестировались молодые растения в стадии 5–7 листьев, в клетках которых содержатся мелкие вакуоли, что позволяет предположить более активные апопластные процессы гидролиза сахарозы и транспорта сахаров. В пользу этого говорят и существенно более резкие (на порядок) суточные колебания экспрессии *LIN6* и *STP1* в сравнении с *TAI* (см. рис. 3).

Заключение

В нашей работе была определена суточная динамика содержания растворимых сахаров и экспрессии генов ферментов гидролиза сахарозы (инвертазы *TAI*, *LIN6*) и белков переноса сахаров (транспортер *STP1*) в растениях томата сорта Корнеевский. Показано, что как содержание сахаров, так и уровень транскриптов генов *TAI*, *LIN6* и *STP1* находятся в зависимости от циркадного ритма и соответствуют биологическим процессам, протекающим в растении в разные периоды суток. Полученные результаты важны для понимания функций инвертаз и транспортеров сахаров в растении томата и могут быть использованы при прогнозировании стрессоустойчивости растений в процессе селекции данной культуры.

Список литературы / References

Beckles D.M., Hong N., Stamova L., Luengwilai K. Biochemical factors contributing to tomato fruit sugar content: a review. *Fruits*. 2012;67:49-64. doi 10.1051/fruits/2011066

Bolouri Moghaddam M.R., Van den Ende W. Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *J. Exp. Bot.* 2013;64(6):1439-1449. doi 10.1093/jxb/ert046

Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Plants*. 2020;9:1169. doi 10.3390/plants9091169

Elliott K.J., Butler W.O., Dickinson C.D., Konno Y., Vedvick T.S., Fitzmaurice L., Mirkov T.E. Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 1993;21(3):515-524. doi 10.1007/BF00028808

Fotopoulos V., Gilbert M.J., Pittman J.K., Marvier A.C., Buchanan A.J., Sauer N., Hall J.L., Williams L.E. The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atβfruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* 2003;132(2):821-829. doi 10.1104/pp.103.021428

González M.C., Roitsch T., Cejudo F.J. Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar

beet plants. *Planta*. 2005;222(2):386-395. doi 10.1007/s00425-005-1542-4

Haydon M.J., Bell L.J., Webb A.A. Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *J. Exp. Bot.* 2011;62(7):2333-2348. doi 10.1093/jxb/err040

Kawaguchi K., Takei-Hoshi R., Yoshikawa I., Nishida K., Kobayashi M., Kusano M., Lu Y., Ariizumi T., Ezura H., Otagaki S., Matsumoto S., Shiratake K. Functional disruption of cell wall invertase inhibitor by genome editing increases sugar content of tomato fruit without decrease fruit weight. *Sci. Rep.* 2021;11(1):21534. doi 10.1038/s41598-021-00966-4

Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004;7:235-246. doi 10.1016/j.pbi.2004.03.014

Lemoine R., La Camera S., Atanassova R., Dédaldéchamp F., Allario T., Pourtau N., Bonnemain J.L., Laloi M., Coutos-Thévenot P., Maurousset L., Faucher M., Girousse C., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* 2013;4:272. doi 10.3389/fpls.2013.00272

Lifschitz E., Eshed Y. Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *J. Exp. Bot.* 2006;57(13):3405-3414. doi 10.1093/jxb/erl106

Proels R.K., Roitsch T. Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm. *J. Exp. Bot.* 2009;60(6):1555-1567. doi 10.1093/jxb/erp027

Roitsch T., González M.-C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 2004;9:606-613. doi 10.1016/j.tplants.2004.10.009

Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006;57:675-709. doi 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441

Slugina M.A., Shchennikova A.V., Kochieva E.Z. *TAI* vacuolar invertase orthologs: the interspecific variability in tomato plants (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Mol. Genet. Genomics*. 2017;292(5):1123-1138. doi 10.1007/s00438-017-1336-y

Voegele R.T., Wirsal S., Möll U., Lechner M., Mendgen K. Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006;19(6):625-634. doi 10.1094/MPMI-19-0625

Wang B., Li N., Huang S., Hu J., Wang Q., Tang Y., Yang T., Asmutola P., Wang J., Yu Q. Enhanced soluble sugar content in tomato fruit using CRISPR/Cas9-mediated *SIINVINH1* and *SIVPE5* gene editing. *PeerJ*. 2021;9:e12478. doi 10.7717/peerj.12478

Wang Y., Shi C., Ge P., Li F., Zhu L., Wang Y., Tao J., Zhang X., Dong H., Gai W., Wang F., Ye Z., Grierson D., Xu W., Zhang Y. A 21-bp InDel in the promoter of *STP1* selected during tomato improvement accounts for soluble solid content in fruits. *Hortic. Res.* 2023;10(3):uhad009. doi 10.1093/hr/uhad009

Warnock N.D., Wilson L., Canet-Perez J.V., Fleming T., Fleming C.C., Maule A.G., Dalzell J.J. Exogenous RNA interference exposes contrasting roles for sugar exudation in host-finding by plant pathogens. *Int. J. Parasitol.* 2016;46(8):473-477. doi 10.1016/j.ijpara.2016.02.005

Zhang Y.L., Zhang A.H., Jiang J. Gene expression patterns of invertase gene families and modulation of the inhibitor gene in tomato sucrose metabolism. *Genet. Mol. Res.* 2013;12(3):3412-3420. doi 10.4238/2013.January.24.1

Zouine M., Maza E., Djari A., Lauvernier M., Frasse P., Smouni A., Pirrello J., Bouzayen M. TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks. *Plant J.* 2017;92(4):727-735. doi 10.1111/tj.13711

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.07.2024. После доработки 17.09.2024. Принята к публикации 17.09.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-08

Разнообразие нута, обусловленное полиморфизмом вставок транспозонов

В.А. Станин¹, М.А. Дук ^{1, 2}, А.А. Канапин ¹, А.А. Самсонова ¹, С.Ю. Суркова¹, М.Г. Самсонова ¹ 

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

 m.g.samsonova@gmail.com

Аннотация. Нут – важная зернобобовая культура, которая используется народонаселением разных частей света в пищу в силу высокой ценности. Применение омиксных технологий позволило охарактеризовать генетическое разнообразие нута, обусловленное однонуклеотидными полиморфизмами, тогда как структурные варианты и инсерции транспозонов выпали из поля зрения исследователей. Поэтому характеристика состава мобилома индивидуальных сортов нута и оценка его влияния на фенотипическую изменчивость и адаптацию актуальны. В фокусе нашего внимания были староместные сорта, собранные до «зеленой революции», поскольку они служат ценным источником видового разнообразия и могут быть использованы для расширения генетической базы современных сортов. Проанализировав 190 геномов нута, мы обнаружили 42 324 сайта инсерции транспозонов 83 семейств. Большинство инсерций (67 %) вызвано мобилизацией ретротранспозонов. Из ДНК-транспозонов наибольшее число инсерций найдено для суперсемейств *MuDR*, *PIF*, *hAT*, *CMC* и *TcMar*. Продемонстрирована неравномерность распределения сайтов инсерции вдоль хромосом. Анализ локализации сайтов инсерции транспозонов относительно генов показал, что наибольшее количество вставок у всех суперсемейств транспозонов приходится на интроны, наименьшее – на экзоны. Мы также показали, что сайты встройки транспозонов, которые до недавнего времени находились вне поля зрения популяционной геномики, являются важным фактором, диверсифицирующим фенотипы, что позволяет использовать их в полногеномном поиске ассоциаций в качестве маркеров наряду с однонуклеотидными полиморфизмами. Сравнительный анализ мобиломов сортов из разных географических регионов выявил существенное отличие эфиопских образцов от образцов других групп, собранных в Индии, Узбекистане, Турции, Средиземноморье, на юге России и в Ливане. Совокупность полученных нами данных и результатов – ценный ресурс, который может быть использован в качестве отправной точки для селекции улучшенных сортов нута, адаптированных к различным климатическим условиям.

Ключевые слова: нут; транспозоны; полиморфизм; староместные сорта; GWAS; адаптация.

Для цитирования: Станин В.А., Дук М.А., Канапин А.А., Самсонова А.А., Суркова С.Ю., Самсонова М.Г. Разнообразие нута, обусловленное полиморфизмом вставок транспозонов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):61-71. doi 10.18699/vjgb-25-08

Финансирование. Работа поддержана грантом РНФ 22-46-02004.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Суперкомпьютерному центру Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (scc.spbstu.ru) за предоставление отличных вычислительных ресурсов и поддержку данного проекта.

Chickpea diversity driven by transposon insertion polymorphism

V.A. Stanin¹, M.A. Duk ^{1, 2}, A.A. Kanapin ¹, A.A. Samsonova ¹, S.Yu. Surkova¹, M.G. Samsonova ¹ 

¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

² Ioffe Institute of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

 m.g.samsonova@gmail.com

Abstract. Chickpea is the second most important legume crop, which is used as a food by people in different parts of the world due to its high nutritive value. Omics technologies have revolutionized the characterization of chickpea genetic diversity by considering single-nucleotide polymorphisms, while structural variants and transposons have been overlooked. The specific contribution of transposons to the phenotypic diversification of crop species is still poorly documented, therefore its characterization is important. We focused on landraces collected before the “green revolution”, as they are a valuable source of species diversity and can be used to broaden the genetic base of modern cultivars. Analyzing 190 chickpea genomes, we found 42,324 new transposon insertion sites from 83 families and showed that such sites are highly polymorphic. Most insertions were caused by mobilization of retrotransposons (67 % of insertions); among DNA transposons, the highest number of insertions was found for the superfamilies *MuDR*, *PIF*, *hAT*, *CMC*, and *TcMar*. We also demonstrated an uneven distribution of insertion sites along chromosomes. Analysis of the localization of transposon insertion sites relative to genes and their structural elements has shown that the largest number of insertions in all transposon superfamilies falls on introns and the smallest, on exons. We also showed that transposon

insertion sites, which until recently have been overlooked by population genomics, are an important factor that diversifies phenotypes and can be used in GWAS as markers replacing SNPs. Comparative analysis of landraces collected in different geographic regions showed that the Ethiopian accessions have many unique transposon insertion sites. Our results highlight the unique role of transposon mobilization in chickpea diversification and have important implications for breeding improved chickpea varieties adapted to global climate change.

Key words: chickpea; transposons; polymorphism; landraces; GWAS; adaptation.

For citation: Stanin V.A., Duk M.A., Kanapin A.A., Samsonova A.A., Surkova S.Yu., Samsonova M.G. Chickpea diversity driven by transposon insertion polymorphism. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1): 61-71. doi 10.18699/vjgb-25-08

Введение

Нут – одна из важнейших продовольственных бобовых культур, выращиваемых во многих частях света, включая Азию, Африку, Северную и Южную Америку и Европу. На его долю приходится 15 % мирового урожая бобовых (Abbo et al., 2003; Jain et al., 2013). Нут является важным компонентом рациона миллионов людей в мире, обеспечивая их белком, пищевыми волокнами, ненасыщенными жирными кислотами, витаминами, макро- и микроэлементами.

Выращивают нут в основном в засушливых и полузасушливых районах на бедных почвах (de la Peña, Pueyo, 2012). В этих регионах на продуктивность нута влияют различные абиотические стрессы, такие как нехватка воды, экстремальные температуры, короткий вегетационный период. Например, засуха снижает урожайность нута в мире на 50 %, а потери, вызванные экстремальными температурами, составляют до 20 % (Kaloki et al., 2019). При таком сценарии идентификация и/или создание высокопродуктивных генотипов является критически необходимой. Новые сорта нута должны быть устойчивы к изменению климата и адаптированы к меняющимся запросам потребителей, сельскохозяйственной практике и более широкому климатическому диапазону. Однако современные элитные сорта нута имеют небольшое генетическое разнообразие и не содержат полезных аллелей, связанных с устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам. Следовательно, для непрерывного производства новых сортов требуется более широкая генетическая база.

Ценным источником видового разнообразия сельскохозяйственных культур служат более примитивные староместные сорта, собранные до «зеленой революции». Их использование в селекции растений может привести к созданию устойчивых сортов со стабильными характеристиками в неблагоприятных условиях. В начале XX в. Н.И. Вавилов систематически собирал староместные сорта нута, которые в настоящее время хранятся во Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) в Санкт-Петербурге, Россия. Эта коллекция была исследована для выявления ассоциаций между SNP и признаками с помощью однолокусного полногеномного поиска ассоциаций (Sokolkova et al., 2020).

Хотя применение омиксных технологий позволило провести масштабную характеристику зародышевой плазмы, наше понимание механизмов, лежащих в основе разнообразия нута, по-прежнему ограничено. Такая ситуация отчасти объясняется тем, что до недавнего времени по техническим причинам подобные исследования фокусировались на функциональной роли однонуклеотидных полиморфизмов и коротких вставок/делеций (Varshney et al.,

2019), тогда как более крупные структурные варианты могут составлять значительную часть межсортных различий в последовательностях ДНК. Большинство структурных вариантов возникает в результате мобилизации транспозонов. Транспозоны составляют значительную часть генома растений (Quesneville, 2020; Mhiri et al., 2022), и их перемещение приводит к перестройке генома, эпигенетическому сайленсингу и перекоммутации генных сетей (Bourque et al., 2018). Более того, транспозоны распределены в геноме неслучайно и могут служить материалом для возникновения новых белок-кодирующих генов и некодирующих РНК (Pulido, Casacuberta, 2023).

Транспозоны представляют собой весьма гетерогенную группу, которую можно разделить на два основных класса в зависимости от способа транспозиции (Bourque et al., 2018; Quesneville, 2020). Транспозоны класса I (ретротранспозоны) распространяются через РНК-посредник, а их механизм транспозиции “copy-and-paste” приводит к удвоению копий элементов с каждым циклом транспозиции (Mhiri et al., 2022). В результате ретротранспозоны с длинными терминальными повторами (LTR) могут составлять до 80–90 % от общего содержания транспозонов и являются наиболее распространенными в геномах растений. Транспозоны класса II (ДНК-транспозоны) преимущественно мобилизуются по механизму “cut-and-paste”, что не приводит к увеличению числа копий транспозонов. Однако транспозоны типа *Helitron* и *MITE* могут достигать высокого числа копий в некоторых геномах.

Распространение и накопление транспозонов формируются под влиянием генетического дрейфа и отбора (Mhiri et al., 2022). Новые вставки обычно оказывают пагубное воздействие и удаляются из популяции. Также транспозоны могут подвергаться положительному отбору и способствовать адаптации (Niu et al., 2019). Пик транспозиций приходится на периоды стресса, что позволяет перестраивать и быстро диверсифицировать геномы (Schradler, Schmitz, 2019).

Хотя ассоциации транспозонов с многочисленными агрономическими признаками хорошо документированы (Catlin, Josephs, 2022), их вклад в фенотипическую вариабельность сельскохозяйственных культур остается малоизученным (Akakpo et al., 2020; Alioto et al., 2020). Здесь мы исследовали состав мобилома нута, изучив инсерции транспозонов в 190 геномах сортов нута из коллекции ВИР.

Материал и методы

Растительный материал. В работе использовано 190 образцов нута из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР,

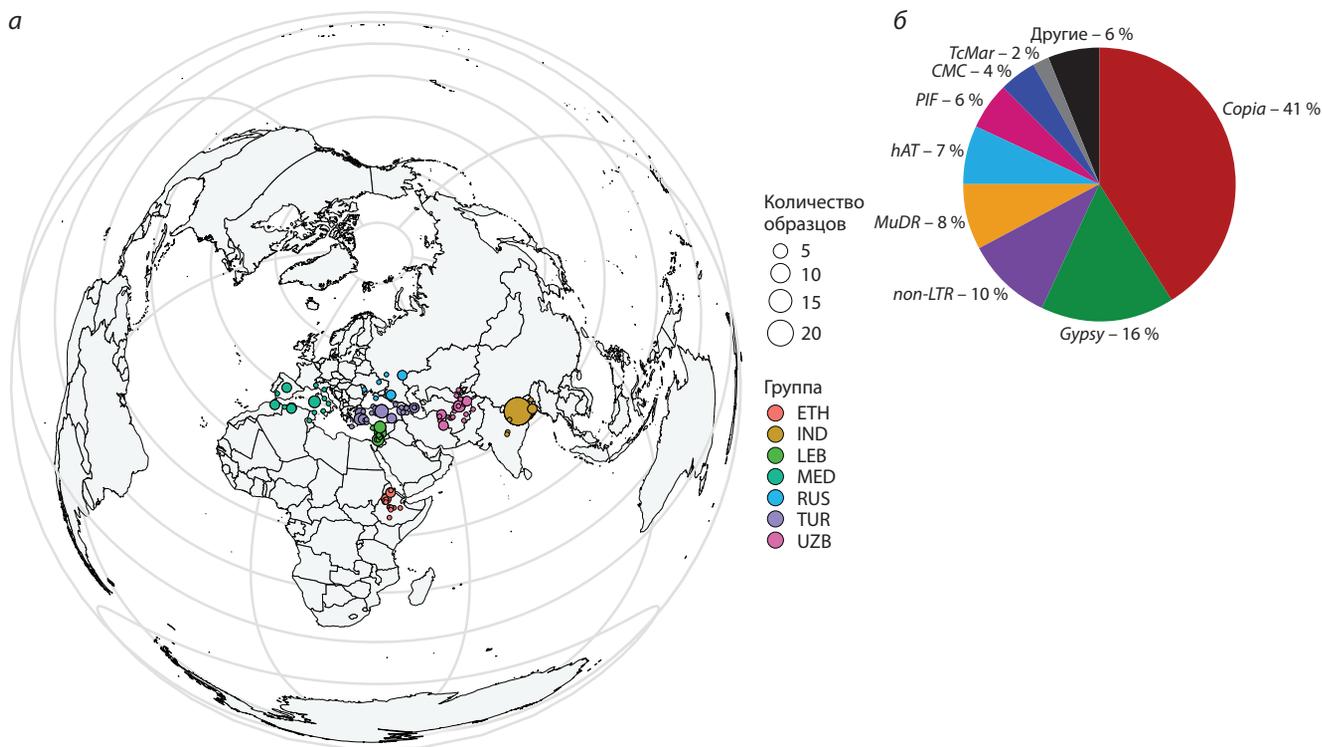


Рис. 1. Места сбора староместных образцов (а) и доля сайтов инсерции для наиболее представленных суперсемейств транспозонов (б).

Санкт-Петербург, Россия). Из них 22 образца были элитными сортами, а остальные образцы – староместными сортами, собранными Н.И. Вавиловым во время его экспедиций в 1920–1930-х гг. Исходя из географической близости мест сбора, староместные сорта были разнесены по семи группам: образцы, собранные в Средиземноморье (MED), Ливане (LEB), на юге России (RUS), в Турции (TUR), Узбекистане (UZB), Индии (IND) и Эфиопии (ETH) (рис. 1, а).

Биоклиматические переменные. Мы использовали координаты широты и долготы для регионов сбора сортов нута, чтобы получить значения девятнадцати биоклиматических переменных (Приложение, табл. S1)¹. Биоклиматические переменные представляют собой годовые, сезонные и месячные средние и экстремальные значения температуры и осадков и широко используются в биогеографическом анализе, исследованиях изменения климата и экологическом моделировании. Данные были загружены из базы данных WorldClim версии 1.4 (Hijmans et al., 2005), которая содержит информацию о климатических условиях, зарегистрированных в период с 1960 по 1990 г. Значения переменных извлечены с помощью пакета ‘raster’ в R (<https://rspatial.org/raster/>) с пространственным разрешением 30 угловых секунд, что соответствует примерно 1 км² на экваторе.

Секвенирование ДНК и поиск вставок транспозонов. Для выделения ДНК из собранных листьев использовали набор DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Джермантаун, Мэриленд, США). ДНК образцов секвенировали в Пе-

кинском институте геномики (BGI, Китай) по протоколу Illumina, генерируя парные чтения размером 150 п.н. Всего было получено 7700 Гбайт необработанных данных, включающих около 26 млрд чтений со средним 25-кратным покрытием, или около 37 Гбайт на образец. Чтения были обработаны и выровнены по референсной сборке генома нута ASM33114v1 (Varshney et al., 2013) с помощью программы bwa-mem с параметрами по умолчанию (Li H., Durbin, 2009). Поиск сайтов инсерции транспозонов и оценка их представленности выполнены программой PoPoolationTE2 (Kofler et al., 2011, 2016). Для работы PoPoolationTE2 необходимы чтения, откартированные на референсный геном с маскированными последовательностями транспозонов, и набор таких последовательностей. Последовательности транспозонов могут быть либо консенсусными последовательностями семейств (например, из RepBase), либо последовательностями, которые были маскированы в референсном геноме, либо тем и другим. При сопоставлении чтений с таким модифицированным геномом инсерции транспозонов приведут к появлению групп дискордантных концов парных фрагментов, где одно чтение сопоставляется с референсным геномом, а другое – с последовательностью транспозона, в то время как правильно сопоставленные парные фрагменты указывают на отсутствие инсерции. На основании положения сопоставленных концов парных фрагментов генерируется трек физических стопок (pile-up). Физические покрытия перекрывающихся парных концов суммируются, в результате чего получается трек физического покрытия, высота которого отражает количество парных концов, перекрывающихся с данной позицией. Сигнатуры вставок транс-

¹ Таблицы S1–S13 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx3.xlsx>

позонов определяются методом скользящего окна, путем сканирования пиков в физическом покрытии, подтверждающих наличие вставки.

В PoPoolationTE2 реализованы два принципиально разных режима анализа. В режиме раздельного анализа (separate mode) каждый образец/популяция обрабатывается отдельно. Это аналогично запуску конвейера PoPoolationTE2 несколько раз, для каждого bam-файла отдельно. При совместном анализе (joint mode) физические треки pileup разных образцов объединяются и создается общий трек pileup. На этом совместном pileup-треке выявляются сигнатуры инсерций транспозонов. При идентификации сигнатуры инсерций с помощью утилиты identifySignatures использовался параметр минимального среднего физического покрытия, равный трем. Далее в separate-анализе сигнатуры фильтровались по максимальной частоте других транспозонов в этом сайте и максимальной частоте структурных вариантов (перестроек) в сайте. Оба параметра были установлены равными нулю. В joint-анализе фильтрация производилась только по максимальной частоте других транспозонов в данном сайте, равной 0.05. Валидация ключевых инсерций выполнена с помощью программы Integrative Genomics Viewer, которая делает возможной визуализацию выравнивания ридов в месте инсерции.

Поиск «горячих точек» инсерций транспозонов выполнен в программе PrimatR (<https://github.com/daewoo000/primatR>). Была использована функция hotspotter, которая сравнивает (внутри окна в 50 т. п. н.) распределения плотности случайно разбросанных по геному точек в количестве, равном числу транспозонов и плотностей расположения транспозонов, полученных из эксперимента. Чем выше значение плотности расположения транспозонов в данной области, тем более оно экстремально для распределения «случайных» плотностей, а значит, тем меньше значение p -уровня значимости. Горячие точки определялись по значению p -уровня значимости меньше $1e^{-8}$.

Анализ генетических данных. Популяционную структуру данных оценивали с помощью программы ADMIXTURE v.1.3.0 (Alexander et al., 2009). Для сравнения групп применяли тест Манна–Уитни–Вилкоксона (Mann, Whitney, 1947).

Полногеномный поиск ассоциаций. Фенотипирование образцов нута проводилось на двух опытных станциях ВИР, на Кубани и в Астрахани, как описано ранее (Дук и др., 2024). Измеряли 12 фенологических и морфологических признаков: высоту растений (PH), высоту прикрепления первого боба (HFP), число ветвей первого порядка (NPB), число ветвей второго порядка (NSB), сухой вес растений с бобами (PWwP), вес бобов с одного растения (PoW), число бобов с одного растения (PoNP), массу 100 семян (100SW), размер листа (LS), дни от появления всходов до начала цветения (DFst), продолжительность цветения (DF), дни от появления всходов до полного созревания (Dmat) (табл. S2).

Фенотипические данные с двух опытных станций были квантильно нормированы. Анализ геномных ассоциаций проводили в программах FarmCPU, Blink, SUPER и MLMM пакета GAPIT3 для R с параметрами MAF =

= 0.05 и FDR = 0.9. Помимо этого, для поиска ассоциаций использовали также программу PiVmrMLM в режиме Single_env с параметрами svpal = 0.01 (Li M. et al., 2022a, b). Модель PiVmrMLM была разработана для устранения методологических недостатков в выявлении всех типов взаимодействий между аллелями, генами и средой, а также для несмещенной оценки их генетических эффектов. Как мультилокусная MLM-модель, PiVmrMLM оценивает эффекты всех генов и эффекты всех взаимодействий одновременно. Однако PiVmrMLM менее сложна в вычислительном плане, так как расчет большого числа компонент дисперсии был заменен расчетом всего трех сжатых оценок. Кроме того, все эффекты в PiVmrMLM оцениваются в рамках одной мультилокусной модели с помощью алгоритма Байеса с максимизацией ожидания, а все ненулевые эффекты далее оцениваются с помощью теста отношения правдоподобия на наличие значимых ассоциаций. Все это теоретически гарантирует точное обнаружение районов вставок, несмещенную оценку их эффектов и делает PiVmrMLM хорошим выбором для выявления ассоциаций между маркерами, признаками и средой.

Информация о координатах генов-кандидатов, содержащих маркеры в генах или в 1-килобайтных фланкирующих областях, была получена из GFF-файла версии 1 Cicer_arietinum_GA_v1.0.gene.gff, функциональное описание генов взято из базы данных Pulse Crop Database (<https://www.pulsedb.org/Analysis/1869759>).

Результаты

Состав мобилома нута

В референсном геноме нута аннотировано 105 семейств транспозонов (Varshney et al., 2013). Чтобы охарактеризовать новые инсерции транспозонов у индивидуальных сортов нута, мы проанализировали данные полногеномного секвенирования 190 сортов, представленных 22 культурными и 168 староместными сортами, которые в зависимости от места сбора образцов были разделены на семь групп (см. рис. 1). Всего нами идентифицировано 42324 новых сайта инсерции транспозонов, не представленных в референсном геноме, причем большинство сайтов были полиморфными и присутствовали во многих образцах.

Транспозоны полиморфных сайтов инсерций принадлежат к 83 семействам и, по всей видимости, составляют большую часть мобилома нута. Большинство инсерций вызвано мобилизацией ретротранспозонов *Copia* (41 %) и *Gypsy* (16 %) (см. рис. 1, б; Приложение, рис. S1a)², и 10 % приходится на вставки, обусловленные мобилизацией *non-LTR* ретротранспозонов. Пять групп семейств – *MuDR* (8 %), *PIF* (6 %), *hAT* (7 %), *CMC* (4 %) и *TcMar* (2 %) – вносят основной вклад в число вставок, обусловленных ДНК-транспозонами (рис. S1б–е, табл. S3).

Полиморфные сайты инсерции распределены неравномерно вдоль хромосом (рис. 2, а, табл. S4) и образуют 47 горячих точек, причем наименьшее число горячих точек обнаружено в хромосомах 5 и 8. Шестнадцать горячих точек содержат исключительно вставки ретротранспозо-

² Рис. S1–S4 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx4.pdf>

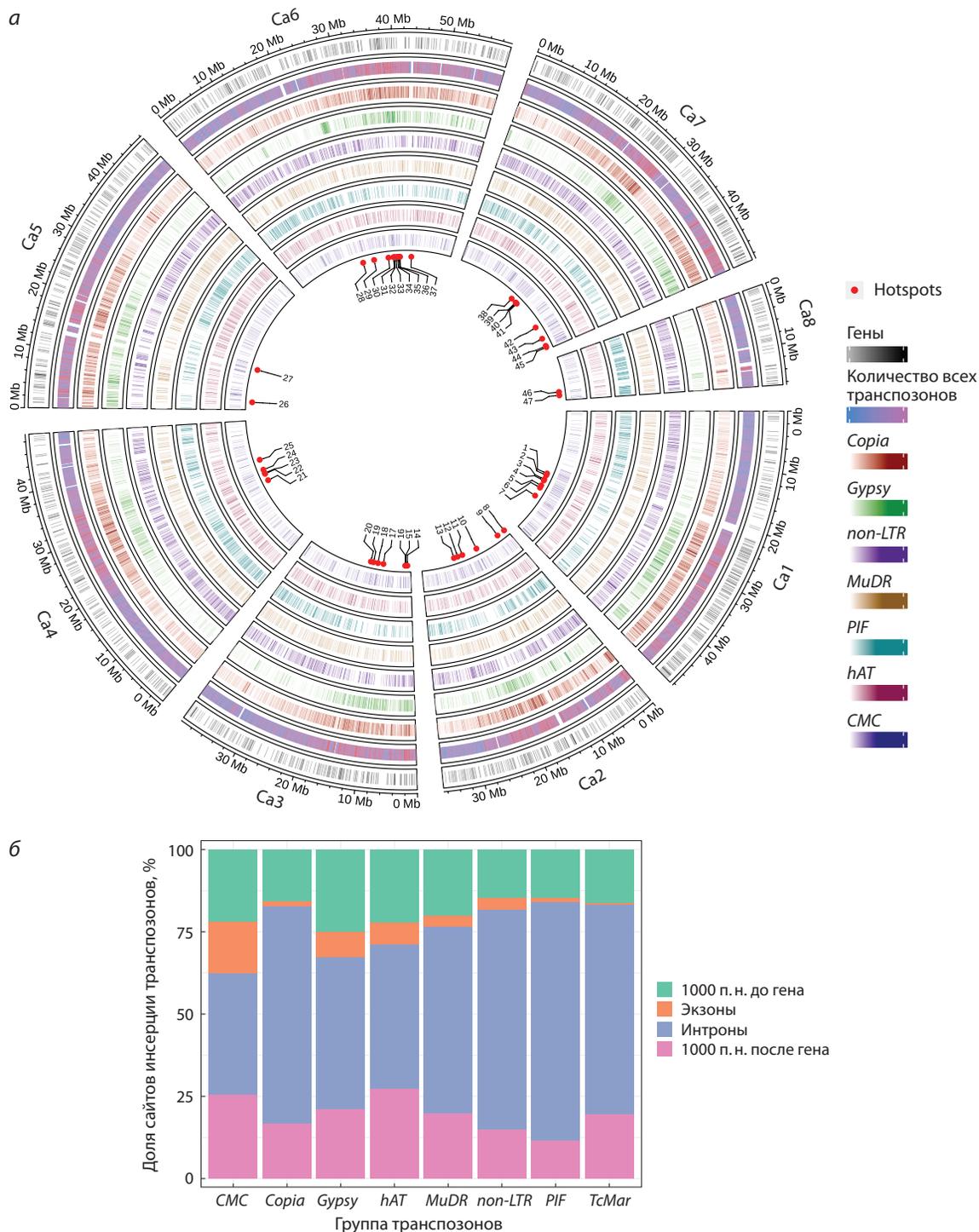


Рис. 2. Визуализация распределения сайтов инсерции транспозонов наиболее широко представленных суперсемейств и генов с помощью программы Circos (а); распределение сайтов инсерции транспозонов относительно генов и их структурных элементов (б).

нов. Вставки ретротранспозона *Copia* наблюдали во всех точках, а вставки ДНК-транспозонов *hAT*, *MuDR*, *PIF* и *CMC* – у 60, 53, 23 и 47 % точек.

Ландшафт мобилома нута

От 15 до 22 % сайтов инсерции элементов *Copia*, а также элементов суперсемейств *MuDR*, *CMC*, *hAT* находятся в генах или в пределах 1 т. п. н. – фланкирующих районов ге-

нов (см. рис. 2, б, табл. S5). У *non-LTR* ретротранспозонов такие вставки составляют примерно треть от общего числа (35.33 %), а у ДНК-транспозонов суперсемейств *TcMar* и *PIF* – половину от общего числа таких вставок (44.11 и 57.93 % соответственно) (см. табл. S5). Наибольшее количество вставок у всех суперсемейств транспозонов приходится на интроны (см. рис. 2, б), наименьшее – на экзоны. Самое большое превышение числа вставок в интронах

по сравнению с экзонными вставками наблюдалось для суперсемейств *Copia* и *PIF* (в 42 раза), наименьшее – для *Gypsy* (в 6 раз) и *СМС* (2.36 раза). У *TeMar* практически все геноспецифичные сайты инсерции попадают в интроны, а фланкирующие районы содержат в 30 раз меньше вставок по сравнению с интронами. Наибольшее превышение числа инсерций транспозонов во фланкирующих районах генов по сравнению с экзонами было замечено для элементов суперсемейств *Copia*, *MuDR* и *PIF* (в 10, 6 и 4 раза соответственно) (см. табл. S5).

Полиморфизм сайтов инсерции транспозонов как новый источник фенотипической изменчивости

Чтобы более систематически оценить, являются ли полиморфные сайты инсерции потенциально важным источником фенотипической вариабельности, мы использовали их в качестве маркеров при поиске ассоциаций с агрономически важными признаками, оцененными на двух опытных станциях (ОС) ВИР – в Астрахани и на Кубани в 2022 г. (Дук и др., 2024). GWAS был проведен в пакете GAPIT3 для R и программой ПIVmrMLM в режиме Single_env отдельно для каждого признака, измеренного на каждой опытной станции.

При использовании пакета GAPIT3 было найдено 12 ассоциаций с тремя фенотипическими признаками: продолжительностью цветения, количеством дней между всходами и полным созреванием, высотой прикрепления первого боба, причем одна ассоциация между продолжительностью цветения и вставкой транспозона *RTE-BovB* в позиции Ca3_23488685 была найдена двумя моделями (табл. S6). Сайты инсерции Ca3_1499163 и Ca6_24162635 транспозонов *Copia* и *RC Helitron*, ассоциированные с высотой прикрепления первого боба, локализируются в 5'-фланкирующих районах генов *Ca_19414* и *Ca_11043*. Эти гены кодируют рибосомный белок S29 и богатый белок позднего эмбриогенеза (late embryogenesis abundant protein) соответственно.

С помощью программы ПIVmrMLM были найдены 84 ассоциации с данными Астраханской ОС и 114 ассоциаций с данными Кубанской ОС (табл. S7). Три сайта инсерции транспозонов оказались плейотропными, в частности сайт Ca3_27767370 – встройка транспозона *PIF-Harbinger* в ген *Ca_08130* (табл. S8). Эта инсерция была ассоциирована с весом бобов с одного растения на Кубанской ОС и днями от появления всходов до полного созревания на Астраханской ОС. 47 сайтов инсерции транспозонов попали в тело генов или находились в их окрестности размером 1 т. п. н. Однако в большинстве случаев данные гены кодировали белки с неизвестными функциями, и только 28 генов были функционально аннотированы (табл. S9). Интересным примером является ассоциация транспозона *hAT_Charlie* в позиции Ca6_31416746 со временем созревания (рис. 3, а). Этот транспозон локализуется перед геном *Ca_15174*, кодирующим транскрипционный фактор семейства CCHC(Zn) (см. рис. 3, б). У люцерны *Medicago truncatula* делеция гена, кодирующего такой транскрипционный фактор, сильно уменьшает размер семян, длину стеблей и междоузлий (Radkova et al., 2019). У растений *Arabidopsis* транскрипционные факторы семейства CCHC(Zn) вовле-

чены в метаболизм РНК, элонгацию транскрипции, полиаденилирование, трансляцию, сплайсинг пре-мРНК, экспорт и деградацию РНК, биогенез микроРНК и рибосомальных РНК, посттранскрипционный сайленсинг генов. Встройка транспозона удлиняет время созревания бобов (Aceituno-Valenzuela et al., 2020) (см. рис. 3, в).

Высота прикрепления первого боба – важный признак для уменьшения потерь при уборке урожая. С этим признаком ассоциирован транспозон *PIF-Harbinger* в позиции Ca3_32351311 (см. рис. 3, г). Он локализуется в гене *Ca_11958*, который кодирует рецептор этилена 2 – фитогормона, регулирующего рост и развитие растения (см. рис. 3, е) (Binder, 2020). Было показано, что у риса мутации в гене, кодирующем рецептор этилена 2, влияют на время появления цветков (Wuriyangan et al., 2009). Другой *non-LTR* транспозон *L1* в позиции Ca7_12253349, тоже ассоциированный с этим признаком, расположен перед геном *Ca_09284*, кодирующим хлоропластную глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназу, которая участвует в окислительных процессах, влияющих на прорастание, обмене азота, ветвлении растений, а также в ответе на абиотический стресс (Jiang et al., 2022) (см. рис. 3, д). В обоих случаях у растений со встройкой транспозона высота прикрепления первого боба ниже, т. е. встройка транспозона оказывает неблагоприятное воздействие на признак (см. рис. 3, ж, з).

Сравнение результатов поиска ассоциаций пакетом GAPIT3 R и программой ПIVmrMLM показало, что четыре инсерции транспозонов детектируются обеими программами (табл. S10).

Полиморфизм сайтов инсерции транспозонов в группах староместных сортов нута из разных географических мест

Анализ ADMIXTURE на файлах plink, сделанных по данным о сайтах инсерции транспозонов у староместных сортов нута, показал, что наиболее предпочтительное количество популяций – пять, хотя CV-errog для четырех популяций практически не отличалась (рис. 4, а). Популяционная структура образцов из групп разной территориальной принадлежности (см. рис. 1) различалась. Образцы из Эфиопии (ETH) были контрастными по сравнению с остальными образцами. Картины примесей у индийских (IND) и среднеазиатских (UZB) образцов были похожи и отличались от картины примесей у турецких (TUR) и средиземноморских (MED) образцов. Можно также отметить, что по картине примесей ливанские (LEB) и эфиопские (ETH) образцы оказались наиболее однородными и сильно отличались друг от друга.

Количество полиморфных сайтов инсерции транспозонов, присутствующих в одной группе (уникальные сайты) или в нескольких, но не всех группах староместных сортов, различалось между группами (см. рис. 4, б, табл. S11). Наибольшее количество сайтов, присутствующих в нескольких группах, было у индийских и турецких образцов – 650 и 705 сайтов соответственно. В индийской группе было также больше всего чисто уникальных сайтов – 44. В группе RUS уникальных сайтов инсерции было меньше всего, что, по всей видимости, объясняется малым количеством образцов в группе. Группа эфиопских

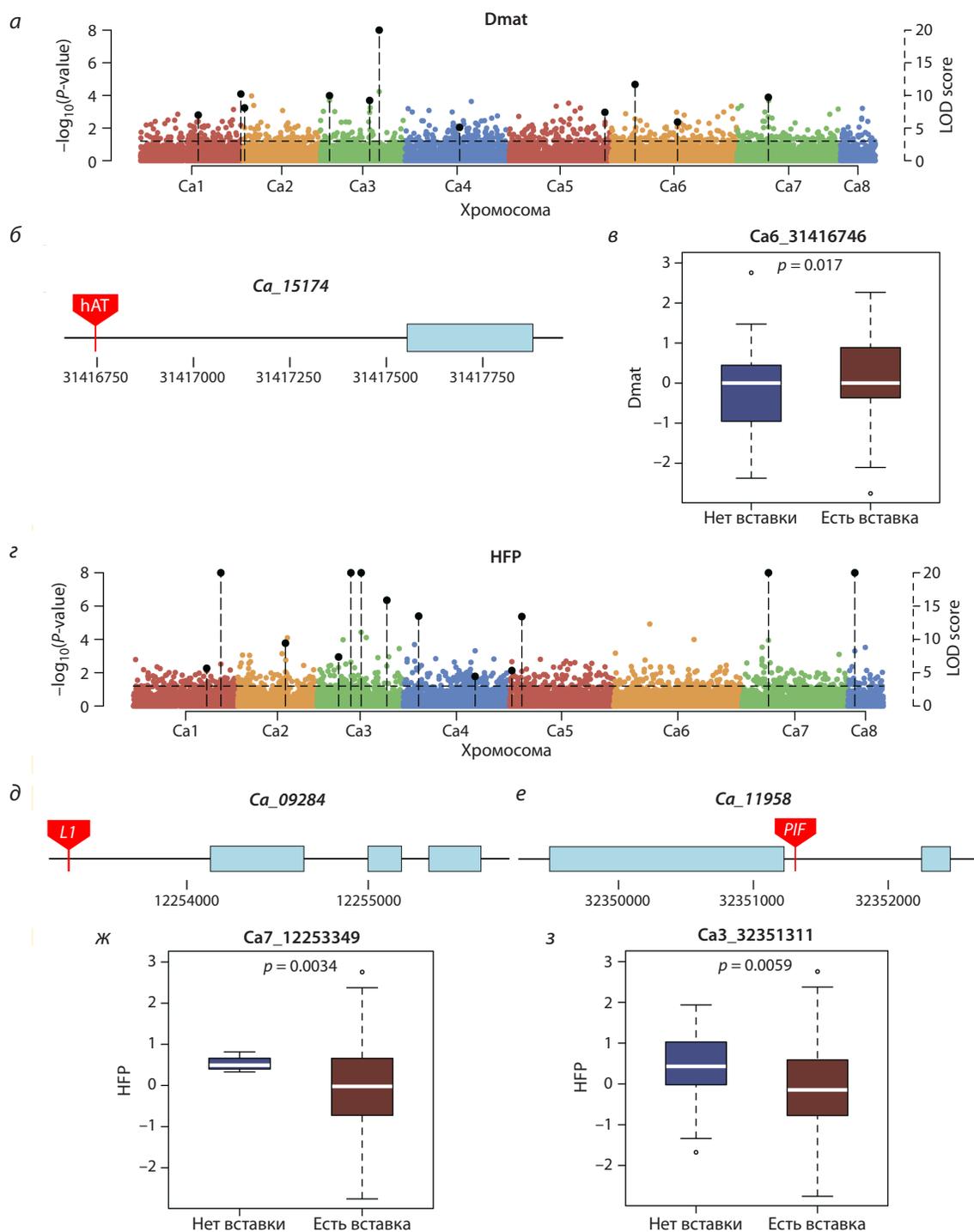


Рис. 3. Сайты инсерции TE как источник фенотипической изменчивости.

а – манхэттенский график ассоциации сайтов инсерции TE со временем созревания; *б* – организация генов *Ca_15174*; *в* – время созревания у растений выборки с инсерцией и без инсерции TE; *г* – манхэттенский график ассоциации сайтов инсерции TE с высотой прикрепления первого боба; *д*, *е* – организация генов *Ca_09284* (*д*) и *Ca_11958* (*е*); *ж*, *з* – высота прикрепления первого боба у растений выборки с инсерцией и без инсерции TE. Результат валидации инсерций транспозонов см. на рис. S2–S4 Приложения.

образцов выделялась из всех групп: она имела наибольшую пропорцию (0.125) уникальных сайтов среди сайтов, присутствующих в нескольких группах. Более детальный анализ с использованием критерия χ^2 выявил 514 сайтов инсерции, частота встречаемости которых в группах отличалась от теоретически ожидаемой, рассчитанной исходя

из предположения об отсутствии различий. Затем, чтобы исследовать группы на обогащенность сайтами инсерции, для каждого сайта с неслучайной частотой встречаемости мы вычислили две разности: между максимальным значением частоты и второй по величине частотой в группе, а также между минимальным значением частоты и второй

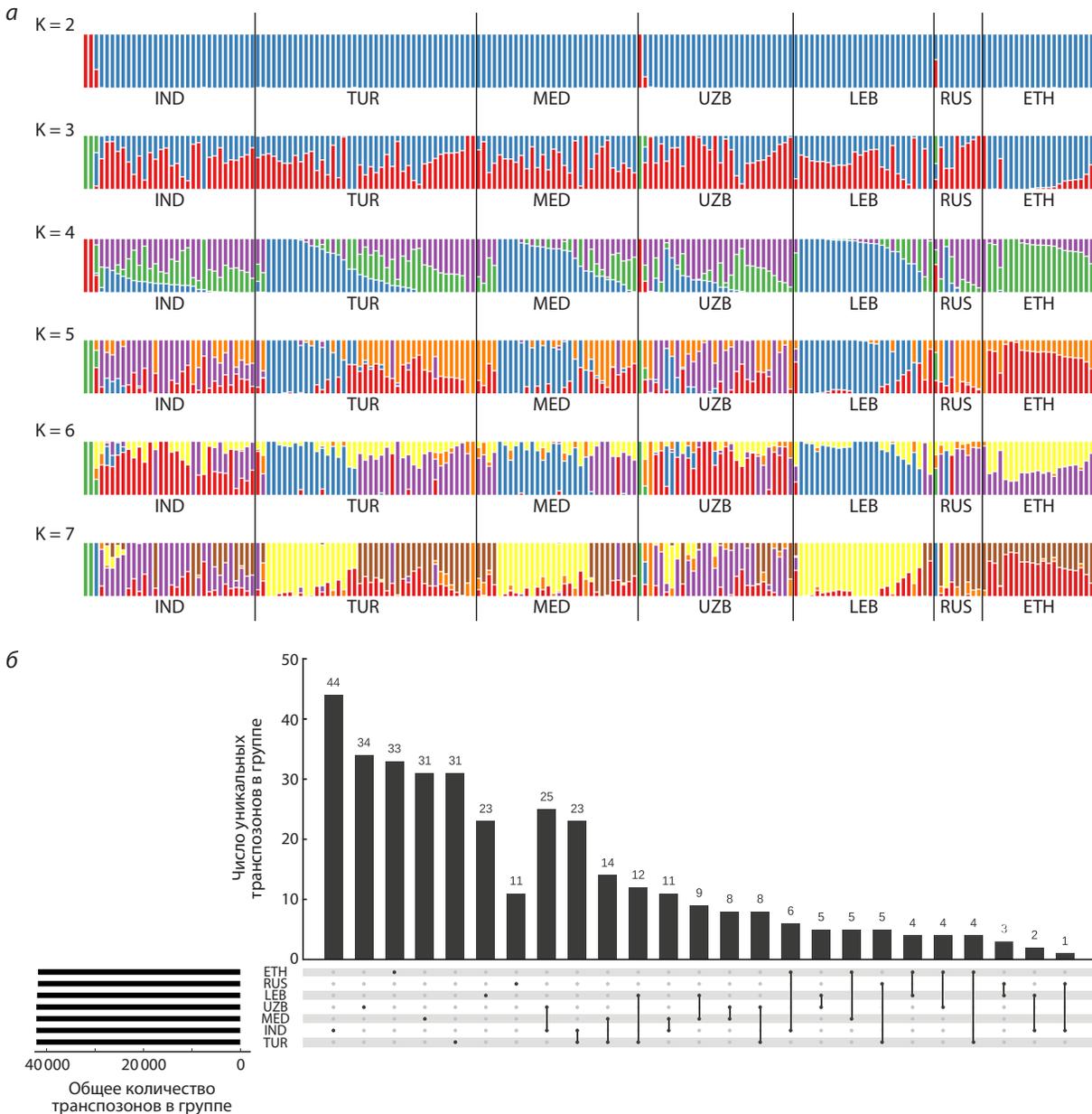


Рис. 4. Сайты инсерции трансозонов как источник диверсификации образцов из разных географических областей. *а* – популяционная структура староместных сортов; *б* – развертка (Upset plot) сайтов инсерции трансозонов. IND, MED, TUR, RUS, UZB, LEB, ETH – группы сортов разного происхождения.

с конца частотой (табл. S12). Такой анализ подтвердил, что эфиопская популяция обогащена сайтами инсерции трансозонов, встречающимися преимущественно в этой популяции, но содержит и редкие сайты, которые часто встречаются в других популяциях.

Отметим, что частота уникальных сайтов в группах за редким исключением не превышала 5 %, что указывает на их сравнительно недавнее возникновение. Очень высокую популяционную частоту (0.95) имел только один трансозон *PIF-Harbinger* в позиции *Ca6_2586225* у эфиопской группы образцов. Этот трансозон отстоит на 1979 п. н. от гена *Ca_10390*, кодирующего ROP-связывающую протеинкиназу RBK2 (рис. 5, *а*). Протеинкиназы RBK1/2 фосфорилируют малые G-белки растений ROP, а также взаи-

модействуют с митоген-активируемой протеинкиназой 1 (MPK1) из каскада МРК, реагирующего на ауксин (Weiß et al., 2022). Помимо этого, RBK1 участвует в формировании Каспариевой полосы, а также играет роль в ветвлении трихомов, стабилизации цитоскелета и контроле базальной устойчивости ячменя к мучнистой росе. Интересно, что позиция *Ca6_2586225* находится внутри района хромосомы 6 длиной около 100 т. п. н. (2494265–2598131), который практически не содержит SNP у всех образцов *C. arietinum*. Помимо гена *Ca_10390*, этот участок содержит еще 9 генов, кодирующих белки, участвующие в гормонально-опосредованном контроле элонгации клеток, росте растений, транспирации и формировании генеративных органов (табл. S13).

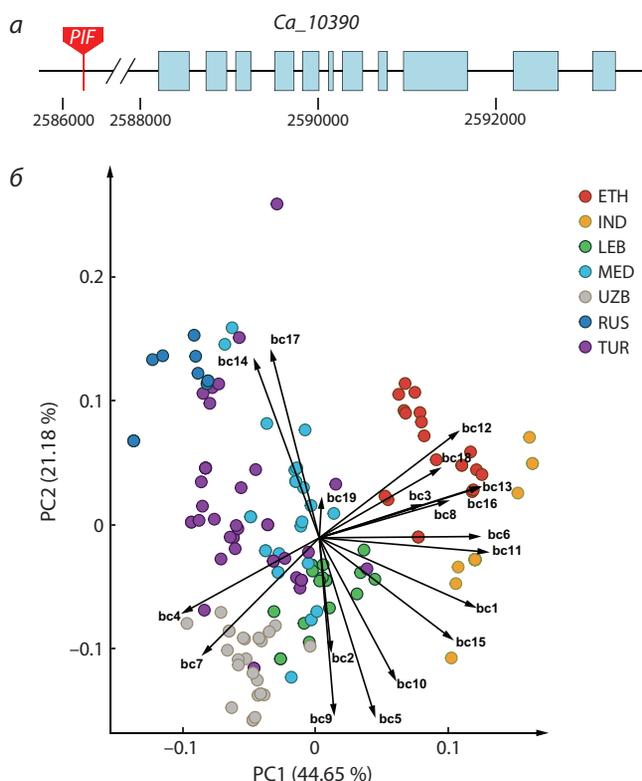


Рис. 5. Инсерция транспозона *PIF-Harbinger* у эфиопской группы образцов.

a – структура гена *Ca_10390* со вставкой транспозона; *b* – график главных компонент биоклиматических переменных из мест сбора образцов. Расшифровка обозначений биоклиматических переменных приведена в табл. S1.

Обсуждение

Как всякие повторяющиеся элементы, транспозоны характеризуются чрезвычайным разнообразием. Каждое семейство транспозонов представляет собой континуум более или менее дивергированных копий, состоящих как из автономных, так и из дефектных элементов. Эта особенность делает идентификацию и классификацию транспозонов сложной задачей, которая в последнее время находит постепенное решение благодаря высокопроизводительным методам секвенирования и разработке новых программ. Так, например, в использованной в данной работе программе PoPoolationTE2 (Kofler et al., 2016) реализована опция агрегирования в одну позицию сайтов инсерции TE, которые в силу неточности картирования из-за вырожденности последовательностей различаются на несколько нуклеотидов, что делает возможным сравнительный анализ встоек транспозонов между сортами.

Проанализировав 190 геномов нута, мы обнаружили 42324 сайта инсерции транспозонов из 83 семейств и показали, что большинство сайтов (70–80 %) присутствует почти во всех сортах. Наиболее распространенными суперсемействами оказались ретротранспозоны *Copia* (17408 сайтов), *Gypsy* (6813 сайтов) и ретротранспозоны *non-LTR*, представленные в основном *L1* и *RTE-BovB* (4245 сайтов) (см. рис. 1, б, рис. S1). Процентное содержание сайтов инсерции ДНК-транспозонов в сортах нута

значительно ниже; наиболее распространены суперсемейство *Mu*-подобных элементов *MuDR* (8 %), а также суперсемейства *PIF* (6 %), *hAT* (7 %), *СМС* (4 %, представлено в основном *СМС-EnSpm/CACTA*) и *TcMar* (2 %). Сайты инсерции суперсемейства *Copia* являются преобладающими и в геномах других растений (Domínguez et al., 2020; Cai et al., 2022). Наши данные в целом согласуются с результатами поиска интактных транспозонов в референсном геноме нута, которые тоже показали превышение частоты суперсемейства *Copia* над частотами *Gypsy* и *non-LTR* и наибольшую представленность суперсемейства *MuDR* (*Mu-like*) среди ДНК-транспозонов (Mokhtar et al., 2021).

Мы обнаружили 47 горячих точек вставок транспозонов, из которых 16 содержат исключительно вставки ретротранспозонов (см. рис. 2, а, табл. S4). Неслучайность расположения вставок транспозонов разных семейств продемонстрирована и в других геномах растений (Sultana et al., 2017). Так, у томата сайты инсерции *Gypsy* преимущественно располагаются в перичентромерных областях (Domínguez et al., 2020).

Вставки транспозонов могут влиять на экспрессию расположенных по соседству генов (Bourque et al., 2018), в силу чего представляет интерес анализ их расположения относительно генов и их фланкирующих районов. Оказалось, что у нута такие районы обогащены сайтами инсерции семейств транспозонов, что особенно заметно для вставок ретротранспозонов *non-LTR*, а также ДНК-транспозонов *TcMar* и *PIF* (см. табл. S5). Обогащенность геноспецифичных районов и их фланкирующих областей вставками транспозонов продемонстрирована у многих растений (Qiu et al., 2021; Zhao et al., 2022). В наших данных реже всего вставки транспозонов фиксировались в экзонах в силу их вредоносного эффекта и действия отрицательного отбора. Наибольшее количество вставок у всех суперсемейств транспозонов приходилось на интроны, что особенно было заметно на примере суперсемейств *Copia*, *PIF* и *TcMar*. У *Copia* и *PIF* количество вставок в интроны в 42 раза превышало количество экзонных вставок, а у *TcMar* практически все геноспецифичные сайты инсерции попадали в интроны. Наибольшее превышение числа инсерций транспозонов во фланкирующих районах генов по сравнению с экзонами замечено для элементов суперсемейств *Copia*, *MuDR* и *PIF* (см. табл. S5).

При совместном анализе (joint mode) сигнатуры транспозонных вставок надежно идентифицируются в индивидуальных сортах, что обуславливает возможность анализа вклада полиморфизма сайтов инсерции транспозонов в фенотипическую изменчивость. Мы показали, что сайты встройки транспозонов являются важным фактором, диверсифицирующим фенотипы, и могут быть успешно использованы при полногеномном поиске ассоциаций в качестве маркеров, замещающих одонуклеотидные полиморфизмы (см. табл. S6 и S7). При этом программа PiVmrMLM находит значительно больше ассоциаций между сайтами инсерции и признаком, чем GAPIT3 R. Отчасти это объясняется тем, что жесткий порог на значимость ассоциаций, реализованный в GAPIT3 R, исключает возможность идентификации маркеров с малыми эффектами. Возможность использования сайтов инсерции

транспозонов при полногеномном поиске ассоциаций была продемонстрирована также у риса и томата (Akakpo et al., 2020; Domínguez et al., 2020; Vourlaki et al., 2022; Yan et al., 2022).

Сайты инсерции транспозонов могли играть существенную роль в адаптации растений в процессе эволюции, поскольку такие изменения могут происходить быстро, что критично для приспособления организма к изменившимся условиям (Niu et al., 2019; Schrader, Schmitz, 2019; Zhao et al., 2022; Kang et al., 2023). Первичное окультуривание нута произошло в Плодородном полумесяце (современная Турция), после чего, в результате его распространения, возникли вторичные центры диверсификации в Индии, Эфиопии, Средней Азии и Средиземноморье (Igolkina et al., 2023). Благодаря усилиям Н.И. Вавилова в коллекции ВИР хранятся семена сортов из таких центров, что позволяет исследовать полиморфизм сайтов инсерции транспозонов в группах образцов из разных центров вторичной диверсификации. Оказалось, что каждая из групп образцов содержит большое число уникальных сайтов, однако частота их не превышала 5 %, что указывает на их сравнительно недавнее возникновение. Очень высокую популяционную частоту (0.95) имел только один транспозон *PIF-Harbinger* в позиции *Ca6_2586225* у эфиопской группы образцов. Отметим, что по картине примесей популяционная структура эфиопских сортов наиболее сильно отличалась от других групп (см. табл. S12). Транспозон *Ca6_2586225* встроен в 5'-фланкирующий район гена *Ca_10390*, кодирующего ROP-связывающую протеинкиназу RBK2 (см. рис. 5, а), которая участвует в формировании Каспариевой полосы, т.е. в регуляции водного баланса растения (Weiß et al., 2022). Как видно из анализа главных компонент биоклиматических переменных из мест сбора сортов (см. рис. 5, б), эфиопские сорта в наибольшей степени зависят от переменных, связанных с количеством осадков и влажностью. Этот факт может быть косвенным объяснением распространения транспозона *Ca6_2586225* в группе, поскольку такая вставка, при определяющей роли климатических переменных, связанных с осадками, может быть адаптивной и обеспечивать растениям селективное преимущество.

Транспозоны являются основным источником геномных мутаций (Bourque et al., 2018). В случае *Ca6_2586225*, вероятно, вставка транспозона привела к полезному изменению. Однако чаще всего вставки транспозонов оказывают вредоносное воздействие на признак, как видно на примере вставок транспозонов в позициях *Ca7_12253349*, *Ca3_32351311* и *Ca6_31416746* (см. рис. 3, б, д, е).

Выводы

В настоящей работе выполнен первичный анализ сайтов инсерции транспозонов у большой выборки образцов нута, представленных в основном староместными сортами. Мы обнаружили высокий полиморфизм таких сайтов, охарактеризовали представленность различных суперсемейств транспозонов, показали неравномерность распределения сайтов инсерции вдоль хромосом. Мы также показали, что сайты встройки транспозонов, которые до недавнего времени находились вне поля зрения популяционной геномики, являются важным фактором, диверси-

фицирующим фенотипы и обеспечивающим адаптацию растений к условиям выращивания. Совокупность полученных нами данных и результатов – ценный ресурс, который может быть использован в качестве отправной точки для более глубокого анализа эволюционной динамики транспозонов в геноме нута, их вклада в адаптацию при глобальном изменении климата, а также в селекции новых сортов.

Список литературы / References

- Дук М.А., Канапин А.А., Банкин М.П., Самсонова М.Г. Использование метода *PIVmrMLM* для подтверждения и поиска новых геномных ассоциаций у культурного нута. *Биофизика*. 2024; 69(6):1263-1278. doi 10.31857/S0006302924060126 [Duk M.A., Kanapin A.A., Bankin M.P., Samsonova M.G. Using the *PIVmrMLM* method to confirm and search new genome-wide associations in chickpea. *Biofizika = Biophysics*. 2024;69(6):1263-1278. doi 10.31857/S0006302924060126 (in Russian)]
- Abbo S., Berger J., Turner N.C. Viewpoint: Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Funct Plant Biol*. 2003;30(10):1081-1087. doi 10.1071/fp03084
- Aceituno-Valenzuela U., Micol-Ponce R., Ponce M.R. Genome-wide analysis of CCHC-type zinc finger (ZCCHC) proteins in yeast, Arabidopsis, and humans. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(20):3991-4014. doi 10.1007/s00018-020-03518-7
- Akakpo R., Carpentier M., Hsing Y.I., Panaud O. The impact of transposable elements on the structure, evolution and function of the rice genome. *New Phytol*. 2020;226(1):44-49. doi 10.1111/nph.16356
- Alexander D.H., Novembre J., Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res*. 2009;19(9):1655-1664. doi 10.1101/gr.094052.109
- Alioto T., Alexiou K.G., Bardil A., Barteri F., Castanera R., Cruz F., Dhingra A., Duval H., Fernández i Martí Á., Frias L., Galán B., García J.L., Howad W., Gómez-Garrido J., Gut M., Julca I., Morata J., Puigdomènech P., Ribeca P., Rubio Cabetas M.J., Vlasova A., Wirthensohn M., Garcia-Mas J., Gabaldón T., Casacuberta J.M., Arús P. Transposons played a major role in the diversification between the closely related almond and peach genomes: results from the almond genome sequence. *Plant J*. 2020;101(2):455-472. doi 10.1111/tpj.14538
- Binder B.M. Ethylene signaling in plants. *J Biol Chem*. 2020;295(22):7710-7725. doi 10.1074/jbc.rev120.010854
- 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(1):199. doi 10.1186/s13059-018-1577-z
- Cai X., Lin R., Liang J., King G.J., Wu J., Wang X. Transposable element insertion: a hidden major source of domesticated phenotypic variation in *Brassica rapa*. *Plant Biotechnol J*. 2022;20(7):1298-1310. doi 10.1111/pbi.13807
- Catlin N.S., Josephs E.B. The important contribution of transposable elements to phenotypic variation and evolution. *Curr Opin Plant Biol*. 2022;65:102140. doi 10.1016/j.pbi.2021.102140
- de la Peña T.C., Pueyo J.J. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agron Sustain Dev*. 2012;32:65-91. doi 10.1007/s13593-011-0024-2
- Domínguez M., Dugas E., Benchouaia M., Leduque B., Jiménez-Gómez J.M., Colot V., Quadrana L. The impact of transposable elements on tomato diversity. *Nat Commun*. 2020;11(1):4058. doi 10.1038/s41467-020-17874-2
- Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Clim*. 2005;25(15):1965-1978. doi 10.1002/joc.1276
- Igolkina A.A., Noujdina N.V., Vishnyakova M., Longcore T., von Wettberg E., Nuzhdin S.V., Samsonova M.G. Historical routes for

- diversification of domesticated chickpea inferred from landrace genomics. *Mol Biol Evol.* 2023;40:msad110. doi 10.1093/molbev/msad110
- Jain M., Misra G., Patel R.K., Priya P., Jhanwar S., Khan A.W., Shah N., Singh V.K., Garg R., Jeena G., Yadav M., Kant C., Sharma P., Yadav G., Bhatia S., Tyagi A.K., Chattopadhyay D. A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant J.* 2013;74(5):715-729. doi 10.1111/tpj.12173
- Jiang Z., Wang M., Nicolas M., Ogé L., Pérez-García M.-D., Crespel L., Li G., Ding Y., Le Gourrierec J., Grappin P., Sakr S. Glucose-6-phosphate dehydrogenases: the hidden players of plant physiology. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):16128. doi 10.3390/ijms232416128
- Kaloki P., Devasirvatham V., Tan D.K.Y. Chickpea abiotic stresses: combating drought, heat and cold. In: *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. IntechOpen, 2019. doi 10.5772/intechopen.83404
- Kang M., Wu H., Liu H., Liu W., Zhu M., Han Y., Liu W., Song C.C.Y., Tan L., Yin K., Zhao Y., Yan Z., Lou S., Zan Y., Liu J. The pan-genome and local adaptation of *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun.* 2023;14(1):6259. doi 10.1038/s41467-023-42029-4
- Kofler R., Pandey R.V., Schlotterer C. PoPoolation2: identifying differentiation between populations using sequencing of pooled DNA samples (Pool-Seq). *Bioinformatics.* 2011;27(24):3435-3436. doi 10.1093/bioinformatics/btr324
- Kofler R., Gómez-Sánchez D., Schlotterer C. PoPoolationTE2: comparative population genomics of transposable elements using Pool-Seq. *Mol Biol Evol.* 2016;33(10):2759-2764. doi 10.1093/molbev/msw137
- 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 M., Zhang Y.-W., Xiang Y., Liu M.-H., Zhang Y.-M. IIIVmrMLM: the R and C++ tools associated with 3VmrMLM, a comprehensive GWAS method for dissecting quantitative traits. *Mol Plant.* 2022a;15(8):1251-1253. doi 10.1016/j.molp.2022.06.002
- Li M., Zhang Y.-W., Zhang Z.-C., Xiang Y., Liu M.-H., Zhou Y.-H., Zuo J.-F., Zhang H.-Q., Chen Y., Zhang Y.-M. A compressed variance component mixed model for detecting QTNs and QTN-by-environment and QTN-by-QTN interactions in genome-wide association studies. *Mol Plant.* 2022b;15(4):630-650. doi 10.1016/j.molp.2022.02.012
- Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statistics.* 1947;18(1):50-60. doi 10.1214/aoms/1177730491
- Mhiri C., Borges F., Grandbastien M.-A. Specificities and dynamics of transposable elements in land plants. *Biology.* 2022;11(4):488. doi 10.3390/biology11040488
- Mokhtar M.M., Alsamman A.M., Abd-Elhalim H.M., Allali A.E. CicerSpTEdb: a web-based database for high-resolution genome-wide identification of transposable elements in *Cicer* species. *PLoS One.* 2021;16(11):e0259540. doi 10.1371/journal.pone.0259540
- Niu X.-M., Xu Y.-C., Li Z.-W., Bian Y.-T., Hou X.-H., Chen J.-F., Zou Y.-P., Jiang J., Wu Q., Ge S., Balasubramanian S., Guo Y.-L. Transposable elements drive rapid phenotypic variation in *Capsella rubella*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(14):6908-6913. doi 10.1073/pnas.1811498116
- Pulido M., Casacuberta J.M. Transposable element evolution in plant genome ecosystems. *Curr Opin Plant Biol.* 2023;75:102418. doi 10.1016/j.pbi.2023.102418
- Qiu Y., O'Connor C.H., Della Coletta R., Renk J.S., Monahan P.J., Noshay J.M., Liang Z., Gilbert A., Anderson S.N., McGaugh S.E., Springer N.M., Hirsch C.N. Whole-genome variation of transposable element insertions in a maize diversity panel. *G3 (Bethesda).* 2021;11(10):jkab238. doi 10.1093/g3journal/jkab238
- Quesneville H. Twenty years of transposable element analysis in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Mob DNA.* 2020;11:28. doi 10.1186/s13100-020-00223-x
- Radkova M., Revalska M., Kertikova D., Iantcheva A. Zinc finger CCHC-type protein related with seed size in model legume species *Medicago truncatula*. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2019;33(1):278-285. doi 10.1080/13102818.2019.1568914
- Schrader L., Schmitz J. The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Mol Ecol.* 2019;28(6):1537-1549. doi 10.1111/mec.14794
- Sokolova A., Bulyntsev S.V., Chang P.L., Carrasquilla-García N., Igolkina A.A., Noujdina N.V., von Wettberg E., Vishnyakova M.A., Cook D.R., Nuzhdin S.V., Samsonova M.G. Genomic analysis of Vavilov's historic chickpea landraces reveals footprints of environmental and human selection. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):3952. doi 10.3390/ijms21113952
- Sultana T., Zamborlini A., Cristofari G., Lesage P. Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nat Rev Genet.* 2017;18(5):292-308. doi 10.1038/nrg.2017.7
- Varshney R., Song C., Saxena R., Azam S., Yu S., Sharpe A.G., Cannon S., ... Singh K.B., Datta S.K., Jackson S.A., Wang J., Cook D.R. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nat Biotechnol.* 2013;31(3):240-246. doi 10.1038/nbt.2491
- Varshney R., Thudi M., Roorkiwal M., He W., Upadhyaya H.D., Yang W., Bajaj P., ... Sutton T., von Wettberg E., Vigouroux Y., Xu X., Liu X. Resequencing of 429 chickpea accessions from 45 countries provides insights into genome diversity, domestication and agronomic traits. *Nat Genet.* 2019;51(5):857-864. doi 10.1038/s41588-019-0401-3
- Vourlaki I.-T., Castanera R., Ramos-Onsins S.E., Casacuberta J.M., Pérez-Enciso M. Transposable element polymorphisms improve prediction of complex agronomic traits in rice. *Theor Appl Genet.* 2022;135(9):3211-3222. doi 10.1007/s00122-022-04180-2
- Weiß L., Gaelings L., Reiner T., Mergner J., Kuster B., Fehér A., Hensel G., Gahrtz M., Kumlehn J., Engelhardt S., Hüchelhoven R. Posttranslational modification of the RHO of plants protein RACB by phosphorylation and cross-kingdom conserved ubiquitination. *PLoS One.* 2022;17(3):e0258924. doi 10.1371/journal.pone.0258924
- Wuriyanghan H., Zhang B., Cao W.-H., Ma B., Lei G., Liu Y.-F., Wei W., Wu H.-J., Chen L.-J., Chen H.-W., Cao Y.-R., He S.-J., Zhang W.-K., Wang X.-J., Chen S.-Y., Zhang J.-S. The ethylene receptor ETR2 delays floral transition and affects starch accumulation in rice. *Plant Cell.* 2009;21(5):1473-1494. doi 10.1105/tpc.108.065391
- Yan H., Haak D.C., Li S., Huang L., Bombarely A. Exploring transposable element-based markers to identify allelic variations underlying agronomic traits in rice. *Plant Commun.* 2022;3(3):100270. doi 10.1016/j.xplc.2021.100270
- Zhao Y., Li X., Xie J., Xu W., Chen S., Zhang X., Liu S., Wu J., El-Kassaby Y.A., Zhang D. Transposable elements: distribution, polymorphism, and climate adaptation in populus. *Front Plant Sci.* 2022;13:814718. doi 10.3389/fpls.2022.814718

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.07.2024. После доработки 19.11.2024. Принята к публикации 26.11.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-09

Оценка биоразнообразия грибов арбускулярной микоризы при восстановительной сукцессии на песчаных карьерах

А.А. Крюков  , А.П. Юрков , А.О. Горбунова, Т.Р. Кудряшова , А.И. Горенкова ,
Ю.В. Косильников , Ю.В. Лактионов 

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия

 aa.krukov@arriam.ru

Аннотация. Грибы арбускулярной микоризы (АМГ) играют ключевую роль в восстановительных сукцессиях растительных сообществ после антропогенных нарушений, в частности на песчаных карьерах. АМГ помогают растениям в водном и минеральном питании, ускоряя восстановление растительного покрова. Целью исследования было изучить биоразнообразие АМГ молекулярно-генетическими методами на разных стадиях зарастания двух карьеров Ленинградской области. Молекулярно-генетическая идентификация грибов проводилась с использованием анализа Illumina MiSeq по регионам ITS1 и ITS2 в качестве баркода для поиска операционных таксономических единиц с идентификацией микроорганизмов до вида. Референтом служила адаптированная и проверенная на ошибки база генетических последовательностей АМГ из NCBI. В исследовании использовалась оптимизированная для песчаных почв методика выделения нуклеиновых кислот. Максимальное биоразнообразие АМГ наблюдалось на начальных стадиях зарастания – пионерной и злаковой. На кустарниковой стадии разнообразие снижалось в пять раз, а затем на лесной стадии восстанавливалось почти до уровня злаковой. Биоразнообразие и видовой состав АМГ могут значительно меняться между стадиями восстановительной сукцессии, что может в первую очередь зависеть от биоразнообразия трав, с которыми АМГ вступают в симбиотические отношения наиболее эффективно. Показана достоверная отрицательная корреляция между числом видов АМГ и числом видов древесных растений. Проведенное исследование может помочь в понимании того, как развивается растительно-грибной симбиоз в восстановительных сукцессиях и какие АМГ наиболее эффективно помогают в восстановлении растительного покрова.

Ключевые слова: грибы арбускулярной микоризы; биоразнообразие; восстановительная сукцессия; песчаный карьер; Illumina.

Для цитирования: Крюков А.А., Юрков А.П., Горбунова А.О., Кудряшова Т.Р., Горенкова А.И., Косильников Ю.В., Лактионов Ю.В. Оценка биоразнообразия грибов арбускулярной микоризы при восстановительной сукцессии на песчаных карьерах. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):72-78. doi 10.18699/vjgb-25-09

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-320 от 20.04.2022 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего». Работа проведена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ВНИИСХМ.

Evaluation of the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi during regenerative succession in quarries

A.A. Kryukov  , A.P. Yurkov , A.O. Gorbunova, T.R. Kudriashova , A.I. Gorenkova ,
Y.V. Kosulnikov , Y.V. Laktionov 

The All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Pushkin, St. Petersburg, Russia

 aa.krukov@arriam.ru

Abstract. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a key role in the regenerative successions of plant communities after anthropogenic disturbances, particularly in quarries. AMF help plants with water and mineral nutrition, contributing to the restoration rate of vegetation cover. The research is aimed to study the biodiversity of AMF using molecular genetic methods at different stages of overgrowth of two quarries in the Leningrad region. Molecular genetic identification of fungi was carried out using Illumina MiSeq analysis of the ITS1 and ITS2 regions as barcodes for the identification of operational taxonomic units (OTUs) with species-level identification. An adapted and error-checked AMF genetic sequence database from NCBI was used as a reference. The study applied an optimized nucleic acid isolation technique for sandy soils. The results showed maximum AMF biodiversity at the initial stages of overgrowth – pioneer and grass stages – with minimum diversity observed at the shrub stage, where it decreased by five times. At the forest stage, the biodiversity of AMF was almost restored to the level seen at the grass stage. It has been shown that

the biodiversity and species composition of AMF can vary greatly between the stages of regenerative succession and probably depends primarily on the biodiversity of grasses, with which AMF most effectively enter into symbiotic relationships. The analysis showed a reliable negative correlation between the number of AMF species and the number of woody plant species. Such studies can aid in understanding how plant-fungal symbiosis develops in regenerative successions and which AMF most effectively contribute to vegetation cover restoration.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi; biodiversity; regenerative succession; quarry; Illumina

For citation: Kryukov A.A., Yurkov A.P., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Gorenkova A.I., Kosulnikov Y.V., Laktionov Y.V. Evaluation of the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi during regenerative succession in quarries. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):72-78. doi 10.18699/vjgb-25-09

Введение

Большинство высших растений (более 90 % семейств) формируют арбускулярную микоризу с грибами (АМГ) подотдела Glomeromycotina отдела Mucoromycota (Spatofora et al., 2017). В симбиозе АМГ помогают растению с водным и минеральным питанием, взамен получая сложные органические вещества. При восстановительных сукцессиях микоризные взаимодействия повышают способность растений к конкуренции и преодолению неблагоприятных эдафических условий (van der Heijden et al., 1998; Lambers et al., 2008). Наличие микоризы может быть важным фактором, способствующим успешному освоению растениями свободных субстратов. Микоризные симбионты могут существенно улучшить условия роста растений-первопоселенцев. Наличие микоризы очень важно для адаптации растений к условиям недостатка азота, фосфора и других элементов минерального питания, неблагоприятного водного и воздушного режима, обедненности субстрата органическими формами углерода (Aikio, 2000). До сих пор получено очень мало прямых доказательств того, что АМГ могут способствовать развитию сукцессии (Smith, Read, 2008). Видовой состав сообществ АМГ оказывает большое влияние на продуктивность растений, структуру растительных сообществ, сукцессионные процессы и функционирование экосистем (Wu, 2017). Количественный и видовой состав микромицетов в значительной степени определяется характером растительности (Сумина и др., 2010). Разнообразие и активность микоризных грибов являются важным фактором, обуславливающим биоразнообразие и функционирование экосистемы, и наоборот, разнообразие и структура растительного покрова могут влиять на разнообразие популяций АМГ (Jeffries, Varea, 2001). Предполагается, что в субстрате песчаных карьеров разнообразие АМГ будет ниже, чем в зональных почвах. Это связано с низким содержанием почвенной влаги, которая имеет фундаментальное значение для выживания данных микроорганизмов (Ganugi et al., 2019).

Анализ биоразнообразия микроорганизмов в почвах в настоящее время проводится с помощью методов высокопроизводительного секвенирования, в первую очередь с помощью Illumina MiSeq. Для идентификации АМГ обычно используют область ITS (internal transcribed spacer) или фланкирующие ее участки SSU (Small SubUnit) и LSU (Large SubUnit) рибосомальных генов (Kryukov et al., 2020). Иногда используют другие гены или полногеномное секвенирование. Отсутствие консенсуса относительно маркера штрихкодирования у Glomeromycotina явно затрудняет как экологические, так и филогенетические исследования. Консервативные участки генов SSU и LSU

хорошо подходят для определения АМГ до рода, но из-за низкой вариабельности неэффективны для идентификации видов (Öpik et al., 2014). Для определения АМГ до вида лучше использовать вариабельные ITS, хотя при этом часто могут быть выявлены и виртуальные таксоны (Kryukov et al., 2020).

Целью исследования является оценка биоразнообразия АМГ молекулярно-генетическими методами на разных стадиях зарастания двух песчаных карьеров Ленинградской области.

Материалы и методы

Материал был собран в середине лета 2018 и 2019 гг. на двух разновозрастных песчаных карьерах, расположенных во Всеволожском районе Ленинградской области – Кузьмолово (60.116448N, 30.545006E) и Калелово (60.256590N, 29.971972E). На пионерной стадии сообщества были слабо сомкнуты, общее проективное покрытие не превышало 20 %. На злаковой стадии (дублируется на указанных карьерах) в сообществах, преимущественно образованных травами, господствовали злаки. На кустарниковой стадии верхний ярус сообществ был образован кустарниками и подростом деревьев. Лесная стадия была представлена молодняком растительности лесного типа. Для каждой стадии восстановительной сукцессии на карьерах были заложены пробные площадки 5 × 5 м (Горбунова, Сумина, 2021). Для генетического анализа состава АМГ пробы отбирали на 20 площадках, по 4 площадки для каждого номера сукцессии. Отбор проб почвы на каждой площадке проводили в 5-кратной повторности, по возможности с ризосферы пяти видов растений (*Agrostis capillaris*, *Artemisia vulgaris*, *Chamaenerion angustifolium*, *Deschampsia cespitosa*, *Tussilago farfara*) (всего до 25 образцов почвы с каждой площадки). Указанные виды растений образуют симбиоз с АМГ (Wang, Qiu, 2006; Akhmetzhanova et al., 2012). Ботаническое описание площадок и оценка уровня микоризации растений проведены ранее (Горбунова, Сумина, 2021).

Для молекулярно-генетической идентификации АМГ была использована оптимизированная методика с применением секвенирования Illumina MiSeq (Kryukov et al., 2020; Yurkov et al., 2024). Пробы брали из ризосферной почвы, содержащей мицелий и споры АМГ. Для выделения ДНК в пробирку объемом 2 мл помещали навеску 0.5 г замороженной почвы и 1 г гранатовой крошки для измельчения материала (Pinaev et al., 2022). Затем в подогретую пробирку с почвой добавляли 700 мкл СТАВ-буфера (2 % СТАВ, 1.4 М NaCl, 20 мМ EDTA, 100 мМ Tris-HCl pH = 8.0). Пробирки каждые 15 мин встряхивали

на вортексе по 1 мин и выдерживали до 2 ч при +65 °С. После термической, химической и механической обработки образцы центрифугировали 5 мин, супернатант переносили в новые пробирки. С остатков почвы проводили дополнительный смыв ДНК, встряхивая почву с 500 мкл воды в течение 5 мин, и после дополнительного центрифугирования второй супернатант объединяли с первым. Дополнительный смыв водой был необходим, поскольку ДНК имеет свойство адсорбироваться на частичках песчаной почвы. Очистку полученной ДНК от примесей проводили с помощью двукратной экстракции равным объемом хлороформа. Каждый раз после центрифугирования (10 мин при 14000 об/мин, Eppendorf, Германия) отбирали супернатант с ДНК и переносили его в новую пробирку. ДНК осаждали 2/3 объема изопропанола с 0.4 М NaCl, промывали 70 % этиловым спиртом, подсушивали 3 мин и далее растворяли в воде (Maniatis et al., 1982). Затем ДНК очищали с использованием магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter, США).

Очищенную ДНК использовали для раздельной ПЦР маркерных регионов ITS1 и ITS2 с универсальными праймерами. Праймеры для Illumina MiSeq с адаптерами 5'-TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' для прямых праймеров и 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' для обратных праймеров изготовлены в ЗАО «Евроген» (Россия). Прямой праймер ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') и модифицированный нами обратный праймер ITS-2RK (5'-CGTTCAAAGATTCGATGATTCAC-3') были использованы для амплификации ITS1 участка, прямой праймер ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') и обратный ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATGATATGC-3') – для амплификации ITS2 участка. После первого раунда ПЦР, включающего 20 циклов, продукт ПЦР разводили в 100 раз и проводили повторную амплификацию с 30 циклами. После амплификации и визуализации на агарозном геле продукт ПЦР по ITS1 и ITS2 объединяли для каждой пробы и очищали на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter, США).

Перед секвенированием очищенные ампликонные библиотеки по каждой площадке объединяли так, чтобы для каждой площадки было получено одно секвенирование, характеризующее видовой состав АМГ. Ампликонные библиотеки секвенировали на приборе Illumina MiSeq с использованием набора реактивов MiSeq® Reagent Kit v3 (600 циклов) с двусторонним чтением (2 × 300 н.) (Illumi-

na, Inc., США). Выявленные последовательности обрабатывали с помощью программного обеспечения Illumina (Illumina, Inc., США). В результате секвенирования на платформе Illumina MiSeq с прямого и обратного праймеров были получены последовательности в формате FASTQ. Данный формат включает в себя записи последовательностей и показатели качества прочтения (quality score) для каждой нуклеотидной позиции. Результаты секвенирования представлены в базе NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA997898/>, BioProject ID: PRJNA997898).

Методика биоинформатического анализа подробно описана ранее (Крыков et al., 2020). В нашем исследовании анализ проводился с использованием локальной базы данных референсных последовательностей. Взятые для основы последовательности из базы NCBI были отфильтрованы на ошибки. Для отсева ошибок анализировались авторство, год секвенирования, проводились ручной анализ выравнивания и филогенетический анализ. В настоящее время наша база содержит информацию по 33 родам и 176 видам АМГ.

Результаты

Для анализа биоразнообразия АМГ на четырех стадиях восстановительной сукцессии было проведено 20 секвенирований с глубиной до 100000 прочтений на образец (по 4 секвенирования для каждой стадии сукцессии для двух карьеров). Биоинформатическая обработка данных выполнена с использованием программного обеспечения USEARCH software (Edgar, 2010). Для полученных результатов посчитаны индексы биоразнообразия Маргаллефа, Шеннона и индекс полидоминантности Вильямса (табл. 1).

Произведен поиск операционных таксономических единиц (ОТЕ) для грибов различных отделов (табл. 2) по четырем стадиям сукцессии на двух карьерах. ОТЕ могут обозначать как реальные отдельные виды, так и виртуальные таксоны (не имеющие близкого референса в базе данных) различного таксономического уровня.

Наиболее низкое число ОТЕ АМГ (Mucoromycota (Glomeromycotina)) обнаружено для кустарниковой стадии (2), а самое высокое – для злаковой в Кузьмолово (11). Интересно, что для других отделов грибов (Ascomycota и Basidiomycota) наиболее высокое биоразнообразие отмечено на пионерной стадии восстановительной сукцессии.

Таблица 1. Индексы биоразнообразия и полидоминантности АМГ на площадках разных стадий сукцессии

№	Стадия сукцессии	Карьер	Индекс Маргаллефа, D_{Mg}	Индекс видового разнообразия Шеннона, H_N	Индекс полидоминантности Вильямса, D^{-1}
1	Пионерная	Калелово	1.33 ^{ab}	1.59 ^c	2.06 ^c
2a	Злаковая		0.89 ^c	0.92 ^d	1.46 ^d
2б	Злаковая	Кузьмолово	1.18 ^b	2.97 ^a	6.95 ^a
3	Кустарниковая		0.26 ^d	0.26 ^e	1.09 ^d
4	Лесная		1.51 ^a	2.07 ^b	3.58 ^b

Примечание. Индексы a–d указывают на достоверно различающиеся значения оцениваемого параметра ($p < 0.05$). Зеленый цвет – высокие значения, синий – низкие.

Таблица 2. Число выявленных ОТЕ грибов по отделам

Отдел (подотдел)	Номер сукцессии				
	1	2a	2б	3	4
Ascomycota	124	78	126	86	118
Zoopagomycota	1	0	2	2	1
Basidiomycota	106	52	82	68	96
Chytridiomycota	4	0	2	0	2
Mucoromycota (Glomeromycotina)	10	7	11	2	8
Mucoromycota (Mortierellomycotina)	6	1	11	7	15
Mucoromycota (Mucoromycotina)	3	1	11	1	9
Cryptomycota	4	2	5	1	17

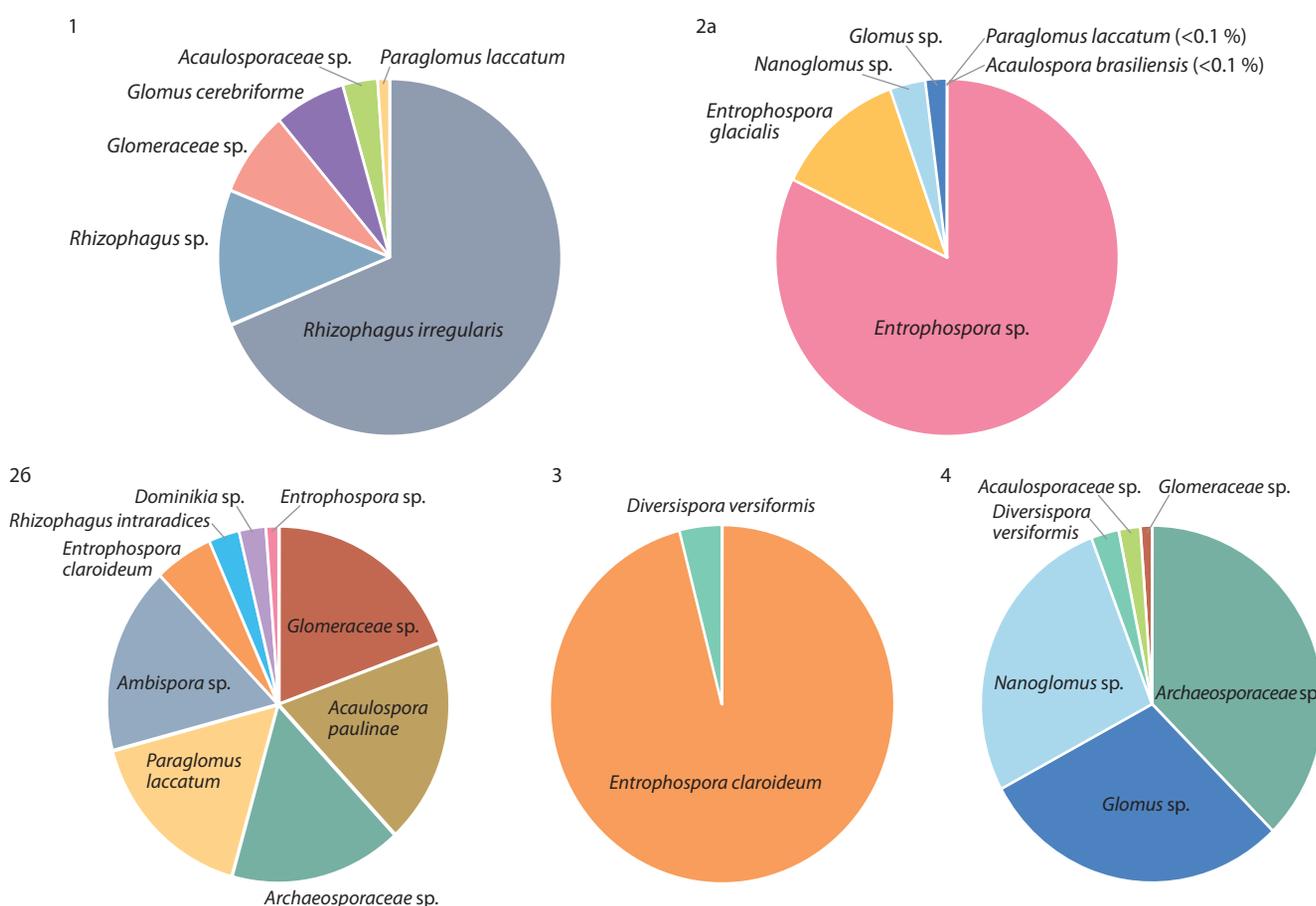


Рис. 1. Видовой состав и доля прочтений (в %) Glomeromycotina на разных стадиях восстановительной сукцессии. Номера стадий соответствуют табл. 1.

Около половины обнаруженных ОТЕ АМГ удалось идентифицировать до вида (рис. 1). Доля прочтений в секвенировании позволяет судить о встречаемости обнаруженных видов на каждой стадии сукцессии: 1 (пионерная стадия, Калелово) – *Rhizophagus irregularis* (68.9 %), *Rh. sp.* (12.2 %), *Glomeraceae sp.* (7.8 %), *Glomus cerebriforme* (6.7 %), *Acaulosporaceae sp.* (3.3 %), *Paraglomus laccatum* (1.1 %); 2a (злаковая стадия, Калелово) – *Entrophospora sp.* (81.2 %), *E. glacialis* (12.6 %), *Nanoglomus sp.*

(3.5 %), *Glomus sp.* (2.1 %), *Paraglomus laccatum* (0.1 %), *Acaulospora brasiliensis* (0.1 %); 2б (злаковая стадия, Кузьмолово) – *Glomeraceae sp.* (19.8 %), *Acaulospora paulinae* (18.0 %), *Archaeosporaceae sp.* (17.1 %), *Paraglomus laccatum* (16.1 %), *Ambispora sp.* (16.0 %), *Entrophospora claroideum* (5.6 %), *Rhizophagus intraradices* (3.2 %), *Dominikia sp.* (2.8 %), *Entrophospora sp.* (1.4 %); 3 (кустарниковая стадия, Кузьмолово) – *Entrophospora claroideum* (95.6 %), *Diversispora versiformis* (4.4 %); 4 (лесная стадия,

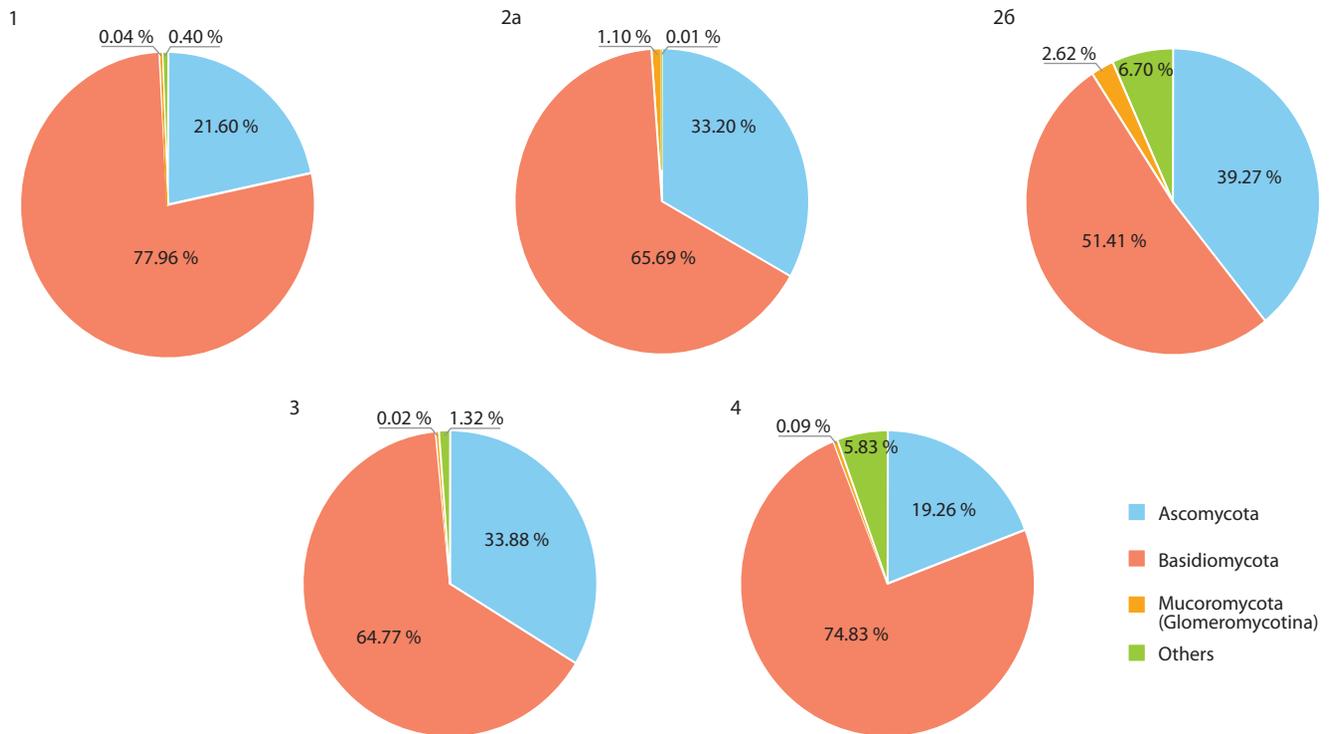


Рис. 2. Доля прочтений по результатам секвенирования Illumina MiSeq для представленных отделов царства грибов на разных стадиях восстановительной сукцессии.

Номера стадий соответствуют табл. 1.

Кузьмолово) – *Archaeosporaceae* sp. (37.7 %), *Glomus* sp. (29.3 %), *Nanoglomus* sp. (27.2 %), *Diversispora versiformis* (2.6 %); *Acaulosporaceae* sp. (2.1 %), *Glomeraceae* sp. (1.1 %). Интересно, что на пионерной стадии преимущественно распространен *R. irregularis*, который затем замещается другими АМГ.

Доля числа прочтений после секвенирования Illumina MiSeq для основных отделов грибов на двух карьерах для четырех стадий сукцессии представлена на рис. 2. На всех стадиях сукцессии преобладают грибы отдела Basidiomycota. Больше всего прочтений Basidiomycota на пионерной стадии, на злаковой стадии их доля падает, затем снова возрастает на кустарниковой и в большей степени на лесной стадии. Также значительна доля грибов отдела Ascomycota. Грибы других отделов в массе ДНК представлены слабо на всех стадиях восстановительной сукцессии. Следует отметить, что на злаковой стадии АМГ представлены максимальным числом видов и имеют наиболее высокое значение в общей доле прочтений на других стадиях. В целом доля прочтений АМГ невелика по сравнению с другими отделами грибов, что отмечалось и для других проведенных в природе исследований. Максимальная доля прочтений для АМГ по ITS с использованием универсальных праймеров составляет до 2 % (Senés-Guerrero, Schüßler, 2015).

По стадиям восстановительной сукцессии были подсчитаны корреляции между числом видов АМГ, числом видов других отделов грибов и различными показателями, взятыми из работы (Горбунова, Сумина, 2021), такими как число видов трав, мхов, древесных растений, общее

проективное покрытие растений и проективное покрытие по группам растений. Была обнаружена достоверная отрицательная корреляция (–0.85) между числом видов АМГ и числом видов древесных растений.

Обсуждение

Полученные результаты в целом соответствуют общему мировому тренду исследований АМГ. В нашей работе наибольшее биоразнообразие АМГ выявлено на злаковой стадии развития восстановительной сукцессии, наименьшее – на кустарниковой. На злаковой стадии развития восстановительной сукцессии наблюдается наибольшее разнообразие трав (до 32 видов на площадку) (Горбунова, Сумина, 2021), на лесной стадии их примерно такое же количество (до 26 видов). На пионерной и кустарниковой стадиях биоразнообразие трав минимально. Судя по всему, для АМГ наличие широкого видового разнообразия трав выгодно в связи с большим спектром доноров питательных веществ, что может принести пользу и грибам, и в итоге растениям (Kiers et al., 2011). Похожие результаты наблюдались при обследовании сукцессии грибного сообщества отступающего ледника в Каскадных горах (Jumpponen et al., 2012). Авторы отмечают, что при увеличении разнообразия микоризных грибов возрастают видовое разнообразие растений и первичная продукция растительного сообщества, что согласуется с более ранними исследованиями (van der Heijden et al., 1998). В нашей работе достоверная отрицательная корреляция (–0.85) была показана только при сравнении числа видов АМГ и числа видов древесных растений на кустарниковой

стадии: число видов деревьев было максимально при минимальном числе видов АМГ. Корреляции между числом видов травянистых растений и числом видов АМГ не обнаружено. Возможно, это связано с множеством независимых факторов, влияющих на растительность и АМГ (Горбунова, Сумина, 2021).

Основываясь на результатах по микроскопии проб (Горбунова, Сумина, 2021), мы заметили, что с ходом сукцессии количество грибных пропагул в почве и разнообразие видов микоризных грибов не возрастают, а на стадии кустарников даже снижаются. Это частично согласуется с полученными нами молекулярно-генетическими данными. Следует заметить, что количество АМГ, фиксируемых при микроскопии, почти всегда ниже, чем при молекулярно-генетических исследованиях (Kryukov et al., 2020).

Zobel и Örik (2014) сформулировали гипотезу среды обитания, чтобы выделить ситуацию, когда наблюдается корреляция между биоразнообразием АМГ и растений, но, в отличие от нулевой гипотезы об отсутствии корреляции («независимости»), нет прямой причинно-следственной связи. Например, во время первичной сукцессии растения обычно заселяют местообитание раньше АМГ, а затем действуют как потенциальный фильтр для АМГ, т. е. АМГ – это «пассажиры», поскольку они следуют за растениями. Однако ограниченное распространение АМГ в стабильном сообществе может привести к тому, что сообщество АМГ будет сильнее определять, какие растения будут закрепляться во время вторичной сукцессии. В этом случае сообщество АМГ становится движущей силой (Zobel, Örik, 2014).

Данные по биоразнообразию на двух карьерах, полученные в настоящем исследовании, различаются из-за разного возраста этих карьеров. Карьер Калелово относительно новый, площадки нарушены значительно, зарастают непродолжительное время, деревьев и кустарников почти нет, их возраст небольшой. Карьер Кузьмолово зарастает уже около тридцати лет. В основном там активно идет древесное возобновление, но есть места, еще не заросшие деревьями и кустарниками (Горбунова, Сумина, 2021). Наличие разных стадий на двух карьерах дает возможность более полно изучить изменение биоразнообразия в становлении восстановительной сукцессии. В ходе восстановления растительности (кустарниковая и лесная стадии) возрастает конкуренция между почвенной микробиотой, происходит экологическая фильтрация видов грибов, занесенных на первой стадии, видовой состав меняется и остаются АМГ, более приспособленные к симбиозу со злаками (Yurkov et al., 2024). Замечено, что *R. irregularis* исчезает на злаковой стадии и более характерен для нарушенной пионерной стадии. В ходе развития экосистемы он замещается другими видами АМГ. В то же время этот вид широко распространен в других регионах, что было показано в нашей работе по оценке биоразнообразия АМГ на Северном Кавказе (Yurkov et al., 2024). Биоразнообразие АМГ на песчаных карьерах Ленинградской области ниже, чем в различных пробах почвы с Кавказа, что согласуется с предположением о низком биоразнообразии АМГ в песчаных почвах (Ganugi et al., 2019).

На пионерной стадии отмечено довольно много видов АМГ, поскольку экологические ниши еще не заняты и ви-

довое разнообразие в большей мере зависит от случайных факторов, в основном от заноса грибов на площадку (van der Heijden et al., 2015). На злаковой стадии эффективность симбиоза между АМГ и растениями достигает максимальных значений, число видов АМГ также является максимальным. На кустарниковой стадии злаки замещаются кустарниками и подростом деревьев, ассоциированных с эктомикоризными грибами (осина, береза и др.); травы угнетены недостатком света и корнями древесных растений, что приводит к резкому снижению разнообразия АМГ. На лесной стадии видов трав становится несколько больше из-за присоединения типичных лесных видов, но конкуренция за свет и почвенные ресурсы остается высокой, что отражается в некотором увеличении разнообразия АМГ (Neuenkamp et al., 2021).

На распределение грибного биоразнообразия по таксономическим группам (см. рис. 2) влияют как случайные факторы (в основном пионерная стадия), так и конкурентный отбор (более поздние стадии). На пионерной стадии в пробах преимущественно определяются базидио- и аскомицеты, занесенные на площадку ветром, водой, человеком и животными, споры которых распространяются значительно легче, чем споры АМГ (Janowski, Leski, 2022). На злаковой стадии доля АМГ возрастает, так как появляется больше видов растений, с которыми занесенные ранее извне АМГ могут вступать в симбиоз. Максимальный процент АМГ объясняется их комплементацией с травами, большим числом видов травянистых растений и снижением конкуренции между АМГ. Почвы становятся более плодородными, условия – более благоприятными и для группы других грибов (см. рис. 2), доля которых максимальна на этой стадии сукцессии. В кустарниковом сообществе доля АМГ минимальна, как минимальны разнообразие и проективное покрытие трав-микоризообразователей. Здесь доминируют кустарники и подрост деревьев, которые активно образуют симбиоз с эктомикоризными грибами, к которым относятся многие базидиомицеты и в меньшей степени аскомицеты. На площадках лесной стадии похожая ситуация, только деревья развиты сильнее, что может влиять на возрастание доли базидиомицетов, и значительно присутствие других групп, так как в сообществе много древесного опада и почвы более развиты (Горбунова, Сумина, 2021).

Заключение

Восстановительная сукцессия на песчаных карьерах представлена четырьмя последовательными стадиями зарастания свободного субстрата и восстановления древесной растительности: пионерной, злаковой, кустарниковой и лесной. Биоразнообразие АМГ высоко на первых стадиях восстановительной сукцессии. Наибольшее разнообразие АМГ наблюдается на злаковой стадии развития сукцессии. В первую очередь это связано со значительным числом видов травянистых растений, с которыми АМГ более эффективно вступают в симбиотические отношения. Наименьшее биоразнообразие АМГ, наблюдаемое на кустарниковой стадии, связано с плохим ростом травянистых растений (в том числе злаков) в тени кустарников, что приводит к уменьшению числа видов АМГ и их обилия. Наиболее распространенным АМГ на пионерной стадии

является *R. irregularis*. Затем преимущество получают другие виды АМГ. Результаты показали, что биоразнообразие и видовой состав АМГ могут сильно меняться между стадиями восстановительной сукцессии и, вероятно, в первую очередь зависят от биоразнообразия трав. Хотя существуют разные гипотезы о первоочередной важности грибов или растений, наша работа показывает, что, скорее всего, именно растения определяют, какие АМГ будут жить рядом с ними, а не наоборот.

Список литературы / References

Горбунова А.О., Сумина О.И. Динамика микорризообразования у некоторых видов растений в ходе восстановительной сукцессии на песчаных карьерах (Ленинградская область). *Ботанический журнал*. 2021;106(1):22-42. doi 10.31857/S0006813621010051 [Gorbunova A.O., Sumina O.I. Dynamics of mycorrhization in some plant species during progressive succession on sand quarries (Leningrad region). *Botanicheskii Zhurnal = Botanical Journal*. 2021; 106(1):22-42. doi 10.31857/S0006813621010051 (in Russian)]

Сумина О.И., Власов Д.Ю., Долгова Л.Л., Сафронова Е.В. Особенности формирования сообществ микромицетов в зарастающих песчаных карьерах севера Западной Сибири. *Вестник СПбГУ. Серия 3. Биология*. 2010;2:84-90 [Sumina O.I., Vlasov D.Y., Dolgova L.L., Safronova E.V. Formation features of the micromycete communities in overgrown sand quarries of the North of Western Siberia. *Vestnik SPbGU. Seriya 3. Biologiya = Vestnik of Saint Petersburg University*. 2010;2:84-90 (in Russian)]

Aikio S. Plant Adaptive Strategies in Relation to Variable Resource Availability, Soil Microbial Processes and Ecosystem Development. Acad. diss. Oulu, 2000

Akhmetzhanova A.A., Soudzilovskaia N.A., Onipchenko V.G., Cornwell W.K., Agafonov V.A., Selivanov I.A., Cornelissen J.H.C. A rediscovered treasure: mycorrhizal intensity database for 3000 vascular plant species across the former Soviet Union. *Ecology*. 2012; 93(2):689-690. doi 10.1890/11-1749.1

Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010;26(19):2460-2461. doi 10.1093/bioinformatics/btq461

Ganugi P., Masoni A., Pietramellara G., Benedettelli S. A review of studies from the last twenty years on plant-arbuscular mycorrhizal fungi associations and their uses for wheat crops. *Agronomy*. 2019; 9(12):840. doi 10.3390/agronomy9120840

Janowski D., Leski T. Factors in the distribution of mycorrhizal and soil fungi. *Diversity*. 2022;14(12):1122. doi 10.3390/d14121122

Jeffries P., Barea J.M. Arbuscular mycorrhiza – a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: Hock B. (Ed.) *The Mycota*. Vol. 9. Berlin; Heidelberg: Springer, 2001;95-113. doi 10.1007/978-3-662-07334-6_6

Jumpponen A., Trappe J.M., Cazares E. Occurrence of ectomycorrhizal fungi on the forefront of retreating Lyman Glacier (Washington, USA) in relation to time since deglaciation. *Mycorrhiza*. 2012;12: 43-49. doi 10.1007/s00572-001-0152-7

Kiers E.T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J.A., Franken O., Verbruggen E., Fellbaum C.R., Kowalchuk G.A., Hart M.M., Bago A., Palmer T.M., West S.A., Vandenkoornhuysen P., Jansa J., Bucking H.

Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science*. 2011;333(6044):880-882. doi 10.1126/science.1208473

Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Machs E.M., Mikhaylova Y.V., Rodionov A.V., Zhurbenko P.M., Yurkov A.P. Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Vavilov J Genet Breed*. 2020;24(2):158-167. doi 10.18699/VJ19.38-o

Lambers H., Raven J.A., Shaver G.R., Smith S.E. Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends Ecol Evol*. 2008;23(2): 95-103. doi 10.1016/j.tree.2007.10.008

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982

Neuenkamp L., Zobel M., Koorem K., Jairus T., Davison J., Öpik M., Vasar M., Moora M. Light availability and light demand of plants shape the arbuscular mycorrhizal fungal communities in their roots. *Ecol Lett*. 2021;24(3):426-437. doi 10.1111/ele.13656

Öpik M., Davison J., Moora M., Zobel M. DNA based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany*. 2014;92(2):135-147. doi 10.1139/cjb-20130110

Pinaev A.G., Kichko A.A., Aksenova T.S., Safronova V.I., Kozhenkova E.V., Andronov E.E. RIAM: a universal accessible protocol for the isolation of high purity DNA from various soils and other humic substances. *Methods Protoc*. 2022;5(6):99. doi 10.3390/mps 5060099

Senés-Guerrero C., Schüßler A. A conserved arbuscular mycorrhizal fungal core-species community colonizes potato roots in the Andes. *Fungal Divers*. 2015;77(1):317-333. doi 10.1007/s13225-015-0328-7

Smith S.E., Read D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. Cambridge: Academic Press, 2008

Spatofora J.W., Chang Y., Benny G.L., Lazarus K., Smith M.E., Berbee M.L., Bonito G., Corradi N., Grigoriev I., Gryganskyi A., James T.Y., O'Donnell K., Roberson R.W., Taylor T.N., Uehling J., Vilgalys R., White M.M., Stajich J.E. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 2017;108(5):1028-1046. doi 10.3852/16-042

van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. 1998;396:72-75. doi 10.1038/23932

van der Heijden M.G.A., Martin F.M., Selosse M.-A., Sanders I.R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol*. 2015;205:1406-1423. doi 10.1111/nph.13288

Wang B., Qiu Y.L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 2006;16:299-363. doi 10.1007/s00572-005-0033-6

Wu Q.-S. (Ed.) *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*. Singapore: Springer, 2017. doi 10.1007/978-981-10-4115-0

Yurkov A.P., Kryukov A.A., Gorbunova A.O., Kudriashova T.R., Kovalchuk A.I., Gorenkova A.I., Bogdanova E.M., Laktionov Y.V., Zhurbenko P.M., Mikhaylova Y.V., Puzanskiy R.K., Bagrova T.N., Yakhin O.I., Rodionov A.V., Shishova M.F. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct ecosystems of the North Caucasus, a temperate biodiversity hotspot. *J Fungi*. 2024;10(1):11. doi 10.3390/jof10010011

Zobel M., Öpik M. Plant and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities – which drives which? *J Veg Sci*. 2014;25(5):1133-1140. doi 10.1111/jvs.12191

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.08.2024. После доработки 22.10.2024. Принята к публикации 30.10.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-10

Симбиоз внутриклеточных бактерий *Wolbachia* с насекомыми: некоторые итоги ста лет изучения

О.Д. Шишкина , Н.Е. Грунтенко 

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

 shishkinaod@bionet.nsc.ru

Аннотация. *Wolbachia pipientis* – α -протеобактерия, широко распространенный внутриклеточный симбионт у ряда видов Arthropoda и некоторых видов Nematoda. Вместе с насекомыми *W. pipientis* образует систему «симбионт–хозяин», характеризующуюся очень тесными взаимодействиями между ее компонентами. Влияния в обоих направлениях, которые оказывает как вольбахия на хозяина, так и хозяин на вольбахию, являются важными биотическими факторами для обеих составляющих этой симбиотической системы. Вольбахия способна оказывать воздействие как на размножение хозяина, так и на работу соматических органов. Благодаря своей распространенности среди насекомых и большому разнообразию как отрицательных (среди самых известных примеров – цитоплазматическая несовместимость и андрокцид), так и положительных эффектов (повышение устойчивости к биотическим и абиотическим факторам, обеспечение витаминами и метаболитами), оказываемых на организм хозяина, вольбахия вызывает огромный интерес у энтомологов и микробиологов. Разнообразие вызываемых вольбахией фенотипов хозяина обеспечивает широкий выбор эволюционных стратегий, таких как репродуктивный паразитизм или взаимовыгодные отношения между симбионтом и хозяином, которыми она пользуется. Влияние вольбахии необходимо учитывать при постановке любого эксперимента, проводимого на насекомых. Применение технологий секвенирования привело к появлению новых подходов для изучения существующих связей внутри системы «*Wolbachia*–насекомое», однако интерпретация полученных данных представляет определенную сложность. Тем не менее перспективы использования данных полногеномного анализа для изучения коэволюции *Wolbachia* и хозяина не вызывают сомнений. Активно осуществляются проекты по внедрению в популяции насекомых штаммов вольбахии, обеспечивающих противовирусную защиту хозяина, для контроля распространения РНК-вирусов, что может способствовать спасению многих человеческих жизней. Целью этого обзора стало обобщение данных, полученных учеными за прошедшие сто лет изучения *Wolbachia*, и современных представлений о ее генетическом разнообразии и механизмах взаимодействия с хозяином, в том числе основанных на данных транскриптомного анализа.

Ключевые слова: *Wolbachia*; насекомые; *Drosophila melanogaster*.

Для цитирования: Шишкина О.Д., Грунтенко Н.Е. Симбиоз внутриклеточных бактерий *Wolbachia* с насекомыми: некоторые итоги ста лет изучения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):79-91. doi 10.18699/vjgb-25-10

Финансирование. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0019.

Вклад авторов. О.Д. Шишкина – написание манускрипта, подготовка иллюстраций; Н.Е. Грунтенко – редактирование манускрипта.

Symbiosis of intracellular bacteria *Wolbachia* with insects: a hundred years of study summarized

O.D. Shishkina , N.E. Gruntenko 

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

 shishkinaod@bionet.nsc.ru

Abstract. *Wolbachia pipientis* is an α -proteobacterium, which is a widespread intracellular symbiont in a number of Arthropoda and some Nematoda species. With insects, *W. pipientis* forms a symbiont-host system characterized by very close interactions between its components. The mutual effects of *Wolbachia* on the host and the host on *Wolbachia* are important biotic factors for both components of this symbiotic system. *Wolbachia* is able to affect both host reproduction and somatic organ function. Due to its prevalence among insects and a wide variety of both negative (cytoplasmic incompatibility and androcyd are among the most well-known examples) and positive (increasing resistance to biotic and abiotic factors, providing vitamins and metabolites) effects on the host organism, *Wolbachia* is of great interest for both entomologists and microbiologists. The diversity of host phenotypes induced by *Wolbachia* provides a broad choice of evolutionary strategies (such as reproductive parasitism or mutually beneficial symbiont-host relationships) that it utilizes. The influence of *Wolbachia* is to be considered in the design of any experiment conducted on insects. The application of sequencing technologies has led to new approaches being created to study the existing relationships within the *Wolbachia*-insect system, but interpretation of the data obtained is challenging. Nevertheless, the prospects for the use of the whole-genome analysis

data to study *Wolbachia*-host coevolution are beyond doubt. Ongoing projects to introduce *Wolbachia* strains, which provide antiviral host defense, into insect populations to control the spread of RNA-viruses are actively pursued, which could result in saving many human lives. The aim of this brief review is to summarize the data collected by scientists over the past hundred years of *Wolbachia* studies and the current understanding of its genetic diversity and mechanisms of interaction with the host, including those based on transcriptome analysis.

Key words: *Wolbachia*; insects; *Drosophila melanogaster*.

For citation: Shishkina O.D., Gruntenko N.E. Symbiosis of intracellular bacteria *Wolbachia* with insects: a hundred years of study summarized. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):79-91. doi 10.18699/vjgb-25-10

Введение

Отношения в системе «эндосимбионт–хозяин» заслуживают пристального внимания в эволюционном аспекте, поскольку взаимные приспособления симбионта к хозяину и хозяина к симбионту направляют развитие обоих видов. При этом множество эффектов влияния симбионта на хозяина не сразу удалось связать с инфекционным статусом. Особенно хорошо задокументированы влияния внутриклеточной α -протеобактерии *Wolbachia* на насекомых-хозяев, однако и в этой симбиотической системе отношения все еще недостаточно изучены. В настоящее время с привлечением методов полногеномного секвенирования и транскриптомного анализа проводят многочисленные исследования конкретных штаммов вольбахии и их влияния на совершенно разные аспекты жизни видов-хозяев. Цель нашего обзора – обратить внимание на прогресс, который удалось достичь в области изучения симбиотической системы «*Wolbachia*–хозяин».

Возникновение и развитие интереса к *Wolbachia*

Род *Wolbachia* относится к семейству Anaplasmataceae, входящему в отряд Rickettsiales, класса α -протеобактерий (Hertig, Wolbach, 1924). *Wolbachia* является широко распространенной внутриклеточной бактерией-симбионтом ряда видов Arthropoda и некоторых видов Nematoda. Примерно 50 % всех видов насекомых инфицировано данной бактерией (Hilgenboecker et al., 2008; Zug, Hammerstein, 2012). Оценки разных групп исследователей различаются в силу сложностей проведения таких масштабных исследований и ограничений в размерах выборок. В разных географических точках наблюдаются различия в частотах инфицированности, и в некоторых из них инфекция встречается с очень низкой частотой, что повышает вероятность ложноотрицательного результата при тестировании на наличие *Wolbachia*, поскольку увеличивается возможность случайного отбора образца без вольбахии, хотя она встречается в популяции хозяина.

Несмотря на то что открытие этой бактерии произошло век назад (Hertig, Wolbach, 1924), даже определение количества видов в роде *Wolbachia* остается предметом споров на протяжении многих десятков лет. Дело в том, что отсутствует четкое понятие границ вида, применимое для эндосимбиотических бактерий. На сегодняшний день все обнаруженные варианты *Wolbachia* принято относить к одному виду – *Wolbachia pipientis*. В нашей работе, согласно традиции, эта бактерия будет упоминаться как *Wolbachia* (только родовое название) или *Wolbachia pipientis* (также оставшееся по традиции видовое название). Но следует отметить, что по вопросу таксономии этого рода до сих

пор нет устоявшегося общего мнения в сообществе исследователей (Lo et al., 2007).

Считается, что на обнаружение бактерии, которая была определена как «подобная риккетсии», М. Хертига и С. Вольбаха (Hertig, Wolbach, 1924) подтолкнула смертоносная эпидемия тифа (Porter, Sullivan, 2023). Сыпной тиф – болезнь, источником которой является бактерия риккетсия Провачека, переносимая преимущественно платяной вошью *Pediculus humanus corporis* (Linnaeus, 1758). В результате поиска потенциальных возбудителей риккетсиозов у ряда видов насекомых были обнаружены внутриклеточные бактерии, которые позже приобрели название *Wolbachia pipientis* (Porter, Sullivan, 2023). Хотя вольбахия не представляет угрозу для человека, стимулом для изучения этого рода бактерий, как и для многих открытий в биологии, послужила медицина.

После первого обнаружения этой бактерии и нескольких лет затишья следующим открытием, которое повысило интерес к вольбахии, стала условная стерильность некоторых насекомых, вызываемая некоторыми штаммами вольбахии. До сих пор этот эффект остается наиболее известным, когда речь заходит о данной бактерии (Бурдина, Груntenko, 2022). Лежащий в основе этого явления механизм называется цитоплазматической несовместимостью (ЦН) и проявляется в первом митотическом делении зиготы, позже изучено с цитологической точки зрения (Ryan, Saul, 1968). И только относительно недавно были обнаружены элементы, которые вызывают ЦН (Beckmann et al., 2017; LePage et al., 2017; Chen et al., 2019).

Современное представление о распространенности вольбахии среди насекомых было бы невозможно составить без ПЦР-идентификации ДНК-маркеров, специфичных для вольбахии. Даже при помощи новейших световых и флюоресцентных микроскопов повторить достижение М. Хертига и С. Вольбаха (Hertig, Wolbach, 1924) для других насекомых сложно, так как вольбахия по размеру (диаметр от 0.25 до 1.8 мкм) часто уступает даже митохондриям (Yu, Walker, 2006). Скрининг как можно большего числа видов насекомых посредством анализа цитологических препаратов, который на каждый вид хозяина требует получения нескольких образцов, изолированных из популяций (отдельных изолятов), – это почти невыполнимая задача, в то время как такой же объем изолятов, исследуемый посредством более чувствительного ПЦР-метода, требует меньше времени и усилий. Благодаря этому ключевому молекулярному методу современной биологии удалось выяснить, что вольбахия живет почти во всех насекомых на планете (Hilgenboecker et al., 2008).

Влияние *Wolbachia* на хозяина

Передача *Wolbachia* происходит вертикально – от матери к потомству с цитоплазмой яйцеклеток. Не всегда механизм передачи работает идеально, иногда возникает спонтанная потеря инфекции (Werren, 1997). Тем не менее *Wolbachia* стабильно обнаруживают в естественных и лабораторных популяциях насекомых. *Wolbachia* не имеет свободноживущих аналогов, все представители отряда Rickettsiales, к которому она относится, являются внутриклеточными организмами (Yu, Walker, 2006). Занимаемая вольбахией экологическая ниша – внутренняя среда ее животного-хозяина. Она растет в цитоплазме клетки своего хозяина в вакуоли, связанной мембраной (Yu, Walker, 2006). Поэтому у вольбахии с хозяином происходят тесные взаимодействия, которые носят как взаимовыгодный, так и паразитический характер (Бурдина, Грунтенко, 2022).

Наследование по материнской линии – общая черта для митохондрий и вольбахии. Кроме того, они наследуются связанно, а не независимо, от чего формируется определенный «цитотип» (Hinsky, 2013). С учетом внутриклеточной природы этой бактерии ее изучение затруднено; например, сложно изучать особенности ее метаболизма. Создание пересеваемых культур клеток насекомых-хозяев, содержащих *Wolbachia*, возможно, но также представляет большие сложности. Первая подобная клеточная линия была создана из клеток комара *Aedes albopictus* (O'Neill et al., 1997). Стабильные клеточные культуры могли бы стать важным инструментом для изучения этого рода, но это затрудняется часто происходящей в них спонтанной утратой инфекции.

Wolbachia способна жить только в симбиозе с хозяином, но большинство самих видов-хозяев могут жить и размножаться, будучи неинфицированными. Влияние *Wolbachia* на хозяев проявляется в ряде различных признаков, которые можно наблюдать при сравнении инфицированных особей-хозяев с неинфицированными, а также при сравнении особей, инфицированных разными штаммами (Бурдина, Грунтенко, 2022). Успешное распространение *Wolbachia* частично объясняется способностью этого организма вмешиваться в механизмы определения пола, изменять развитие и характер размножения хозяина себе на пользу.

Наиболее изучены многочисленные эффекты, которые *Wolbachia* оказывает на репродуктивную функцию хозяина:

- андрокцид – избирательная гибель самцов на стадии эмбриогенеза или личиночного развития,
- феминизация генетических самцов – инфицированные самцы приобретают черты фенотипа самок,
- стимуляция партеногенеза,
- цитоплазматическая несовместимость.

Особое внимание всегда уделялось феномену цитоплазматической несовместимости, вызываемой вольбахией. У насекомых ЦН заключается в том, что инфицированные самки могут размножаться, будучи оплодотворенными как неинфицированными, так и инфицированными самцами, в то время как неинфицированные самки не размножаются с инфицированными самцами (Kaur et al., 2021). Таким образом, инфицированные самки не испытывают негативных последствий ЦН и получают репродуктивное

преимущество. Так как *Wolbachia* наследуется по материнской линии вместе с цитоплазмой, этот механизм позволяет ей эффективно распространяться в популяциях насекомых (Lassy, Karr, 1996).

Молекулярные механизмы, отвечающие за возникновение ЦН, связаны с нарушением первого митотического деления зиготы (Poinsot et al., 2003). Показано, что в формировании явления ЦН принимают участие деубиквитилаза CidA, иницирующая ЦН у самцов, и белок CidB, позволяющий ее преодолеть, когда экспрессируется у самок (Beckmann et al., 2017). Это подтверждает ранее сформулированную гипотезу пары модификатор–спасатель, выдвинутую для объяснения феномена ЦН (Werren, 1997). Были обнаружены гены факторов ЦН, обозначенные как *cifA–cifB* пары, интегрированные из профага WO в геномы тех штаммов *Wolbachia*, которые вызывают ЦН у хозяина (LePage et al., 2017). В альтернативном механизме используются нуклеаза CinA и связывающий ее белок CinB (Chen et al., 2019), которые действуют по тому же принципу модификатор–спасатель. На сегодняшний день другие механизмы воздействия *Wolbachia* на хозяина не удалось описать настолько детально.

Вызываемые *Wolbachia* репродуктивные эффекты обнаружены у разных насекомых, но есть исключения, например они совсем не характерны или слабо выражены для большинства изученных линий *Drosophila melanogaster* (Fry et al., 2004; Илинский, Захаров, 2009).

Однако, помимо влияния *Wolbachia* на размножение, было открыто множество эффектов, которые она оказывает на соматические клетки хозяина. Это возможно, так как *Wolbachia* обнаруживают не только в репродуктивных органах самок, где это наиболее ожидаемо, исходя из механизма передачи этого симбионта потомству, но также в жировом теле, мальпигиевых сосудах, мышечных и нервных тканях (рис. 1, а) (Pietri et al., 2016). Вариант патогенного штамма *Wolbachia* wMelPop, инфицирующего *D. melanogaster* и известного тем, что он вызывает преждевременную гибель мух (Min, Benzer, 1997), wMelPop-CLA, влияет на поведение самцов, уменьшая их агрессивность за счет снижения выработки октопамина в мозге (Rohrscheib et al., 2015). Особи *D. melanogaster* с одинаковым ядерным генотипом, но инфицированные разными штаммами *Wolbachia*, имеют различные оптимальные температурные диапазоны (Truitt et al., 2019). Это может влиять на распространенность определенных штаммов в разных широтах.

Содержание эндосимбионта обычно связано с затратами хозяина в плане ресурсов, которые нужны как ему, так и бактерии. Часто более успешно отбираются эволюцией те симбионты, которые могут обеспечить хозяину большую выгоду. Это позволяет минимизировать эффект его затрат на содержание симбионта, и в системе устанавливаются взаимовыгодные отношения. Стратегия обеспечения выгоды за счет позитивного влияния на аспекты жизни хозяина может объяснить, почему *Wolbachia* настолько распространена среди видов, у которых слабо выражены ее манипуляции с репродуктивной системой хозяина.

Было показано увеличение срока жизни у инфицированных дрозофил (Maistrenko et al., 2016), а также что *Wolbachia* могут снабжать хозяев витаминами и незаме-

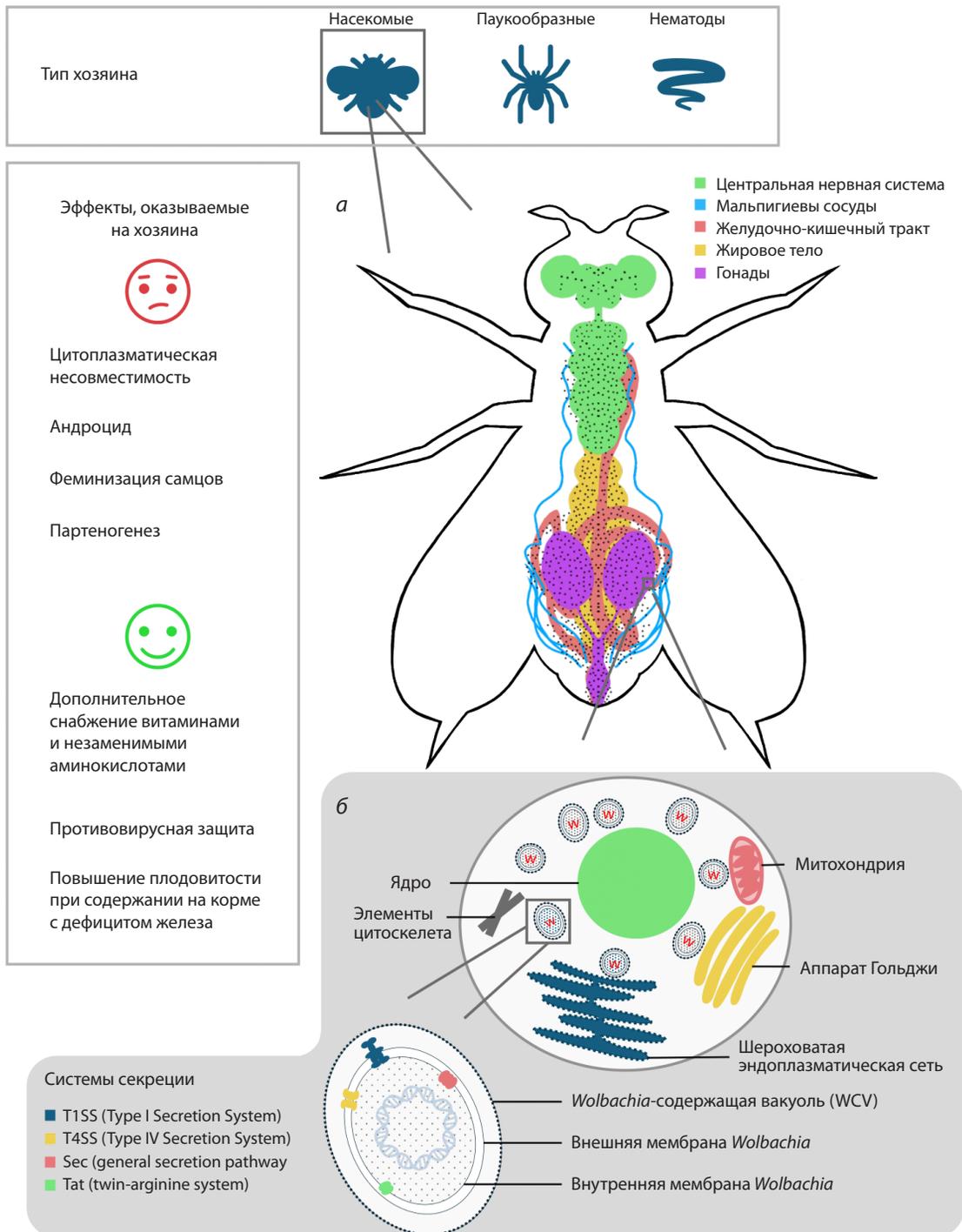


Рис. 1. Схема симбиотической системы «*Wolbachia*–насекомое» на разных уровнях организации.

a – локализация *Wolbachia* в органах *Drosophila*; *б* – локализация *Wolbachia* в клетке насекомого-хозяина и органеллы, которые взаимодействуют с *Wolbachia*. Внизу иллюстрации изображена *Wolbachia*-содержащая вакуоль.

ними аминокислотами. Так, штамм wC1e, инфицирующий постельного клопа *Cimex lectularius*, обеспечивает хозяина витамином B7 (биотином) (Newton, Rice, 2020). *Wolbachia* защищает клетки наездника *Asobara tabida* от избытка железа за счет экспрессии бактериоферритина (Kremer et al., 2009), а у *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia*, повышается плодовитость при содержании на корме с дефицитом железа (Brownlie et al., 2009).

Бактериоферритин связывает свободное двухвалентное железо и способствует всасыванию в кишечнике личинки мухи (Brownlie et al., 2009). Получены свидетельства того, что сигнальный каскад инсулина/инсулиноподобного фактора роста хозяина подавляется, а индуцируемый гипоксией сигнальный каскад HIF (hypoxia-inducible factor) активируется при заражении *Wolbachia* (Currin-Ross et al., 2021). Показано, что вольбахии необходимо получение

железа от хозяина, на основании чего эти исследователи предполагают, что железо является фундаментальным аспектом взаимодействия «*Wolbachia*–хозяин» (Currin-Ross et al., 2021).

Поскольку репродуктивные аномалии, вызываемые *Wolbachia*, не характерны для *D. melanogaster*, другие физиологические эффекты, наблюдаемые в этой симбиотической паре, получили больше внимания. Проведено значительное количество исследований влияния конкретных штаммов данной бактерии на разные линии этого вида-хозяина. Это делает симбиотическую систему «*Wolbachia*–*D. melanogaster*» одной из наиболее изученных с точки зрения генетического разнообразия как хозяина, так и бактерии, а также влияния комбинации их генотипов на жизнеспособность хозяина.

Так, у трех линий *D. simulans* различного происхождения, у инфицированных одним штаммом вольбахии, наблюдались разные эффекты симбионта на приспособленность хозяина: у одной из исследованных линий внесение вольбахии при помощи микроинъекции повышало приспособленность, оцениваемую в ящичном эксперименте, тогда как у двух других приспособленность не была подвержена влиянию бактерии (Dean, 2006). Различное влияние вольбахии на продолжительность жизни, плодовитость и скорость развития различных линий *D. melanogaster* было также обнаружено в работах A.J. Fry и D.M. Rand (2002) и N.V. Adonyeva с коллегами (2023).

С другой стороны, инфицирование одной линии *D. melanogaster* разными вариантами *Wolbachia* приводило к изменению метаболизма дофамина у мух, инфицированных *Wolbachia* генотипа wMelCS, но не генотипа wMel (Gruntenko et al., 2017; Burdina et al., 2021). Подобные различия во влиянии генотипа вольбахии на эффекты, оказываемые ею на физиологию хозяина, были показаны и для метаболизма ювенильного гормона (Gruntenko et al., 2019).

В то же время ряд воздействий *Wolbachia* на *D. melanogaster*, насколько это известно в настоящее время, не зависит от генотипа симбионта. Так, инфицирование одной линии *D. melanogaster* семью различными вариантами *Wolbachia* способствовало увеличению запасов липидов мухи-хозяина (Karpova et al., 2023). Общим для различных вариантов бактерии стало также повышение содержания глюкозы и триглицеридов у хозяина (Zhang et al., 2021; Karpova et al., 2023), однако уровень трегалозы остался неизменным во всех линиях по сравнению с неинфицированными мухами (Karpova et al., 2023). Эти линии отличались от неинфицированных повышенной выживаемостью при недостатке питания. Повышенный уровень глюкозо-6-фосфата также был отмечен у *Wolbachia*-инфицированных комаров *Aedes fluviatilis* (da Rocha Fernandes et al., 2014).

Исследование, проведенное на трансгенной линии *D. melanogaster* с нарушенной функцией инсулинового рецептора, показало, что присутствие вольбахии повышает приспособленность таких мутантов (Ikeya et al., 2009). Удаление вольбахии при помощи антибиотиков у таких мух приводило к усилению мутантного фенотипа, который проявляется в снижении роста и плодовитости.

T. Ikeya с коллегами (2009) предположили, что вольбахия активирует сигнальный каскад инсулина/инсулиноподобных факторов роста (И/ИФР). Однако более позднее исследование говорит об обратном. В работе (Currin-Ross et al., 2021) был рассмотрен метаболический ответ *D. melanogaster* на инфекционный статус и показано, что И/ИФР-опосредованный сигнальный путь подавляется вольбахией.

Известно, что часть штаммов *Wolbachia* способствует защите хозяина от ряда патогенов, так как они могут подавлять репликацию РНК-вирусов (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Moreira et al., 2009). Благодаря свойствам противовирусной защиты *Wolbachia* используют в целях биологического контроля (Hoffmann et al., 2011; LePage, Bordenstein, 2013). Ряд штаммов *Wolbachia*, естественным хозяином которых является *D. melanogaster*, был внесен при помощи микроинъекций в особей комара *Aedes aegypti* – распространителя вируса лихорадки Денге (dengue virus, DENV) (Hoffmann et al., 2011; Gu et al., 2022). Внесение инфицированных вольбахией особей в природные популяции за счет ЦН приводило к их успешному распространению (Hoffmann et al., 2011), что может снижать эффективность передачи вируса Денге, поскольку блокирование последнего вольбахиями у *Ae. aegypti* было продемонстрировано в лабораторных условиях (Gu et al., 2022).

Существует несколько предположений, как разные свойства штаммов *Wolbachia* могут влиять на противовирусную защиту; отбор наиболее эффективных штаммов – цель многих исследований. Так как ЦН способствует преимущественному распространению конкретного штамма (именно того, который вызывает эту аномалию у хозяина) в популяции, совместное наследование противовирусной защиты и способности вызывать ЦН делает такие штаммы более эффективными при использовании стратегии замещения. Отмечают, что штаммы, характеризующиеся повышенным содержанием вольбахии в клетках хозяина (такие как wMelPop), помогают хозяину более успешно бороться с вирусом. Исходя из этого, предполагают, что существует корреляция между эффективностью противовирусной защиты и высоким содержанием вольбахии в клетках (Chrostek et al., 2013; Gu et al., 2022). Однако нужно также учитывать оптимальный для штаммов *Wolbachia* диапазон температур на ареале обитания насекомых, в популяцию которых внедряется новый штамм *Wolbachia*. Предпринимались попытки применения *Wolbachia* и для контроля других арбовирусов, представляющих опасность для человека (Kametchum-Tatuene et al., 2017).

Адаптивность или вред некоторых эффектов *Wolbachia* сложно определить однозначно, но в целом понятно, что часть из них (например, манипулирование размножением хозяина) можно отнести к паразитическим воздействиям, тогда как другие эффекты, такие как повышенная устойчивость к вирусному заражению и голоду, предоставляют адаптивное преимущество не только эндосимбионтам в этой системе, но и насекомым-хозяевам. Весь широкий спектр влияния вольбахии на хозяина невозможно рассмотреть, не затронув тему многообразия штаммов этой бактерии, поскольку многие из оказываемых ею эффек-

тов специфичны для конкретного штамма вольбахии. Хотя геномы вольбахии имеют некий общий основной набор генов, разные штаммы значительно отличаются друг от друга.

Генетическое разнообразие *Wolbachia*

Поскольку принято считать, что существует всего один вид *Wolbachia* – *W. pipientis* (Hertig, Wolbach, 1924), то все разнообразие этих эндосимбионтов насекомых описывается разными штаммами, объединенными в супергруппы. Разделение на супергруппы основано на филогенетическом анализе последовательностей нескольких генов, используемых для мультилокусного типирования. Предложено несколько групп генов для мультилокусного типирования штаммов *Wolbachia*: *dnaA*, *16SrRNA*, *wsp*, *gltA* и *groEL*, *ftsZ* (Lo, Evans, 2007), *gatB*, *hcpA*, *fbpA*, *coxA* (Baldo et al., 2006b). Выделяют, по разным оценкам, от 10 до 13 супергрупп, обозначаемых латинскими буквами (A–F, N–M и S) (Kaur et al., 2021), классическая классификация включает семь супергрупп (A–F и H) (Ros et al., 2009; Augustinos et al., 2011).

Наиболее универсальная система генотипирования, процесса выявления генетических различий и сходств разных групп организмов, для штаммов *Wolbachia* на сегодняшний день – это мультилокусное генотипирование, в котором используют пять белок-кодирующих генов: *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* и *fbpA* (Baldo et al., 2006b). На основе анализа комбинации пяти или более полиморфных маркеров составляют профили ST (sequence type). Использование нескольких аллелей в качестве маркеров, нежели какого-то одного аллеля, дает более точную и полную информацию.

Геномы *Wolbachia* характеризуются широким разнообразием, которое также сформировалось за счет изоляции штаммов в силу наследования по материнской линии вместе с цитоплазмой. Несмотря на то что хозяева могут быть близкими видами, соответствующие им штаммы *Wolbachia* могут сильно отличаться на генетическом уровне. Последовательности из гипервариабельных локусов могут быть использованы для разделения не так давно разошедшихся штаммов, хотя необходимо учитывать возможность рекомбинации штаммов *Wolbachia*, которая была продемонстрирована экспериментально (Baldo et al., 2006a), и наличие большого числа повторов и мобильных элементов в геноме *Wolbachia* (Wu et al., 2004).

В огромном множестве комбинаций «хозяин–*Wolbachia*» каждая из них характеризуется своим уникальным набором приспособлений симбионта к хозяину и наоборот, что влияет на тип симбиотических отношений. Кроме того, новые штаммы этой бактерии обнаруживают и описывают почти каждый год, и, как правило, исследователи в своих работах сосредотачиваются на воздействии определенных штаммов *Wolbachia* на интересные их объекты (Burdina et al., 2021; Duarte et al., 2021; Ilinsky et al., 2022).

Рассмотрим более подробно разнообразие штаммов *Wolbachia*, обнаруженных у классического модельного объекта *D. melanogaster*. Инфекция *Wolbachia* у *D. melanogaster* была впервые выявлена в 1988 г. (Hoffmann, 1988),

но штамм wMel был описан только спустя 10 лет (Zhou et al., 1998). М. Riegler с коллегами (2005) выделили пять различных генотипов вольбахии у *D. melanogaster* на основе полиморфных маркеров. Предполагалось, что несколько различных линий произошло от одной предковой инфекции *Wolbachia* (Riegler et al., 2005; Hilgenboecker et al., 2008). Новые и впервые описанные варианты *Wolbachia* у *D. melanogaster* обычно называют в литературе штаммами (Lo et al., 2007). Часто в исследовании, позволяющем новый штамм, недостаточно информации, позволяющей отнести его к одному из известных генотипов.

В настоящее время описано шесть генотипов *W. pipientis*, встречающихся у *D. melanogaster* (рис. 2). Их разделяют на две группы: wMel (генотипы wMel, wMel2, wMel3, wMel4) и wMelCS (генотипы wMelCS и wMelCS2) (Riegler et al., 2005; Ilinsky, 2013). Секвенирование геномов *Wolbachia* показало наличие большого количества повторов, в том числе инсерционной последовательности (insertion sequences, IS) и тандемных повторов, вариативных по числу (variable number tandem repeats, VNTR). Генотипы различаются по полиморфизмам пяти маркеров генома: наличие инверсии в локусе WD0394–WD0541 (на рис. 2 направление фрагмента обозначено стрелкой); различающиеся в числе тандемных повторов маркеры VNTR-105, VNTR-141 (число повторов обозначено цифрами под ними); IS5 WD1310, IS5 WD0516/7 – локусы инсерции IS-элементов. Эти маркеры используют для генотипирования *Wolbachia* из изолятов естественных и лабораторных популяций *D. melanogaster* (Riegler et al., 2005; Ilinsky, 2013).

Следует отметить, что для генотипа wMelCS также описано два штамма, отличающихся по влиянию на хозяина и по генетической структуре, хотя эти отличия не детектируются при генотипировании по (Riegler et al., 2005). Первый из этих штаммов – это патогенный штамм wMelPop (от слова «попкорн»), вызывающий преждевременную гибель инфицированных им мух за счет своей неограниченной пролиферации, приводящей к переполнению и разрыву клеток хозяина (Min, Benzer, 1997), и имеющий повышенную копияность блока из восьми генов *Octomom*, с которой связывают вызываемую штаммом wMelPop патологию (Chrostek et al., 2013; Chrostek, Teixeira, 2015). Второй штамм, wMelPlus (от «плюс» в значении «позитивный»), не определяемый по М. Риглеру с коллегами, но отличающийся большой (примерно 1/6 генома) инверсией от других представителей генотипа wMelCS (Korenskaia et al., 2022), напротив, имеет позитивное влияние на жизнеспособность хозяина, повышая его устойчивость к тепловому стрессу (Burdina et al., 2021). Открытия этих штаммов были большой неожиданностью при исследовании фенотипических отличий линий *D. melanogaster*, несущих их, от линий с «нормальными» показателями. Был также обнаружен штамм, получивший название wMelM, который повышает устойчивость хозяина *D. melanogaster* к тепловому стрессу, однако не отличается по маркерам, по М. Риглеру с коллегами, от генотипа wMel (Gu et al., 2022). Эти три примера демонстрируют, что большое генетическое разнообразие может быть скрыто от исследователей за одинаковыми ярлыками генотипов.

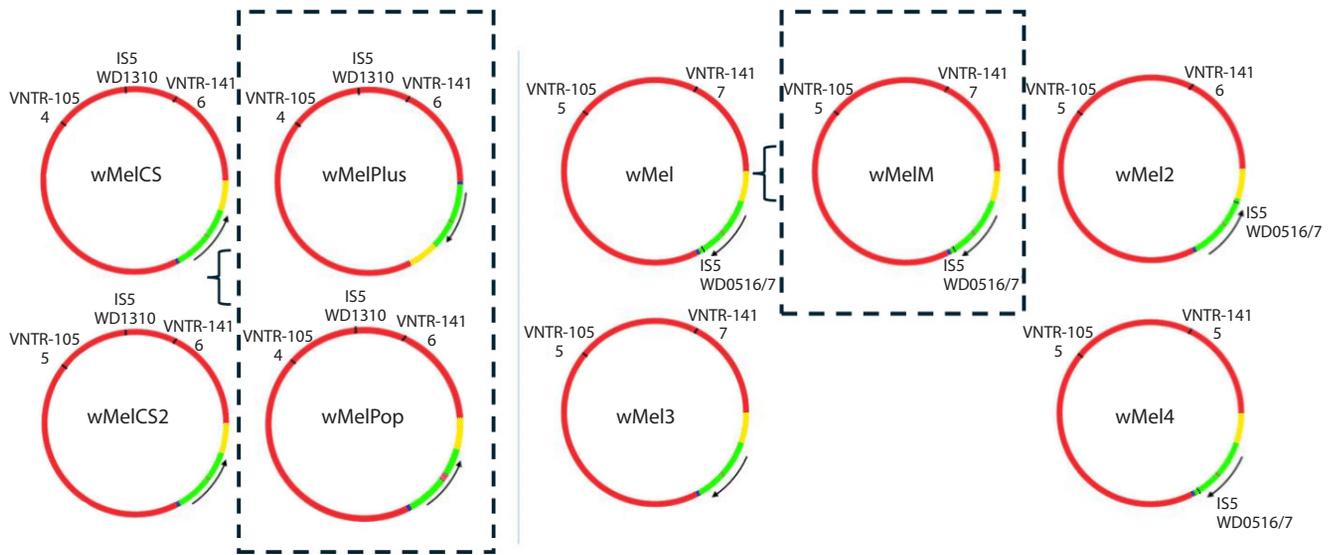


Рис. 2. Хромосомные карты шести различных генотипов *W. pipiensis*, выделенных из *D. melanogaster*, а также трех уникальных штаммов (wMelPlus и wMelPop, относящихся к генотипу wMelCS, и wMelM, относящегося к генотипу wMel).

Обозначены: зеленым цветом – инверсия, отличающая генотип wMel от wMelCS; желтыми и синими блоками – последовательности, входящие в инверсию у wMelPlus, но не затронутые инверсией у wMel-группы; малиновым блоком – последовательность Oostomom (Chrostek, Teixeira, 2018).

Для обнаружения подобных различий в геноме штаммов подходит полногеномное секвенирование. При этом нужно учитывать, что при сборке генома с опорой на референсный есть вероятность упустить наличие инверсий (возникают трудности за счет наличия в геноме повторов и короткой длины прочтений).

Ряд вопросов, относящихся к генотипам *Wolbachia*, которые инфицируют *D. melanogaster*, заслуживает отдельного рассмотрения. В природных популяциях *D. melanogaster* наиболее распространены генотипы wMel и wMelCS, при этом wMel значительно преобладает (Riegler et al., 2005; Nunes et al., 2008; Ilinsky, 2013). Существует гипотеза о том, что этот генотип постепенно вытеснил ранее преобладавший wMelCS (Riegler et al., 2005). Показано, что эффект смещения теплового предпочтения в сторону более низких температур у дрозофил, инфицированных *Wolbachia*, по сравнению с неинфицированными мухами сильнее всего проявляется у линий *D. melanogaster*, инфицированных штаммами *Wolbachia* группы wMelCS (Truit et al., 2019). С другой стороны, есть данные о низком генетическом полиморфизме генотипов группы wMelCS в Палеарктике, противоречащие гипотезе, что глобальная замена генотипов *Wolbachia* произошла недавно, и свидетельствующие о том, что в этой области еще много невыясненного (Вуков et al., 2019).

Первым штаммом с полностью прочитанным и аннотированным геномом бактерии *Wolbachia* является wMel (Wu et al., 2004). Размер генома этого штамма составляет 1267782 п. о. и включает в себя около 1270 белок-кодирующих генов (Porter, Sullivan, 2023). Значительных отличий по размеру и геномному составу от штаммов генотипа wMelCS, исключая уникальный штамм wMelPop, который имеет особую область генома, образованную повторами последовательности Oostomom (Duarte et al., 2021), не показано (Chrostek et al., 2013; Korenskaia et al., 2022).

Изучение механизмов взаимодействия в системе «*Wolbachia*–хозяин»

Предпринимались крупномасштабные поиски возможных молекул-эффекторов, при помощи которых *Wolbachia* может оказывать воздействие на организм хозяина (Ote et al., 2016; Sheehan et al., 2016; Rice et al., 2017). Для того чтобы бактерия могла влиять на процессы внутри эукариотических клеток хозяина, молекулы-эффекторы, вероятно, должны иметь гомологию с какими-либо молекулами, синтезируемыми в организме хозяина.

Бактериальный геном часто приобретает чужеродный генетический материал из эукариотических клеток, который сохраняет по крайней мере часть своей исходной активности, а продукты этих доменов выделяются в цитоплазму эукариотической клетки (De Felipe et al., 2005). Проведено исследование, в котором 163 гена-кандидата из генома штамма wMel были отобраны биоинформатическими методами, а затем было проанализировано влияние продуктов транскрипции 84 этих генов на дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Rice et al., 2017). В результате этого анализа отмечены дефекты роста дрожжей и выделены 14 генов наиболее вероятных эффекторов (Rice et al., 2017), три из которых содержат анкириновые повторы, что может свидетельствовать об их участии в белок-белковых взаимодействиях с их хозяевами-членистоногими.

Поскольку существует барьер между организмами эндосимбионта и хозяина, для выделения молекул-эффекторов за пределы бактерии необходимы специальные системы секреции. Секреторные системы бактерий состоят из белковых комплексов и отвечают за прохождение макромолекул через мембраны. У бактерий секреция необходима для приспособления к условиям среды и обеспечения патогенности некоторых из них. Так как *Wolbachia* – эндосимбионт, система секреции является важным инструментом взаимодействия с клетками хозяина.

Wolbachia использует систему секреции двух типов (см. рис. 1, б): I типа (type I secretion system, T1SS) и IV типа (type IV secretion system, T4SS) (Lindsey, 2020). Система секреции I типа состоит из трех белков: ABC-транспортера, который зависит от АТФ, MFP (membrane fusion protein) и OMP (outer membrane protein – белок внешней мембраны). Система секреции IV типа обычно состоит из 12 белковых компонентов: VirB1–VirB11 и VirD4 (Fronzes et al., 2009). Гены этой системы секреции расположены двумя кластерами в геноме *Wolbachia*: tandemно расположенные гены пяти белков (VirB8, VirB9, VirB10, VirB11, VirD4) и три белка (VirB3, VirB4, VirB6); в то время как гены *VirB1*, *VirB2*, *VirB5* и *VirB7* утрачены. Было показано, что последовательность и организация этих генов консервативны у 37 исследованных штаммов *Wolbachia* (Pichon et al., 2009). Эти две секреторные системы позволяют выделять широкий спектр субстратов, от отдельных белков до комплексов белок-белок и белок-ДНК (Backert, Meyer, 2006).

В геномах вольбахии присутствуют гены, кодирующие каналы систем Sec (основной секреторный путь, general secretion system) и Tat (твин-аргинин зависимый путь, twin-arginine translocation). Эти системы осуществляют транспорт белков через клеточную мембрану вольбахии в периплазматическое пространство: Sec транспортирует развернутые белки, а Tat – свернутые до третичной структуры (Lindsey, 2020).

Wolbachia-содержащие вакуоли имеют общее происхождение с аппаратом Гольджи и эндоплазматической сетью у насекомых (см. рис. 1, б, расположение везикул в клетке, в нижней части рисунка изображена такая вакуоль) (Cho et al., 2011). Предполагают, что полярные белки Van Gogh/Strabismus и Scribble могут отвечать за расположение таких вакуолей недалеко от места синтеза мембран (Cho et al., 2011). Для поддержания целостности и стабильности вакуолей *Wolbachia* взаимодействует с цитоскелетом клетки хозяина, так же как и бактериальные патогены, которые используют подобные вакуоли для защиты от иммунной системы хозяина (Ferree et al., 2005; Kumar, Valdivia, 2009; Creasey, Isberg, 2014).

Вольбахия нуждается в снабжении многими метаболитами со стороны хозяина (Jiménez et al., 2019; Newton, Rice, 2020). Выдвинуто предположение, что штамм wMel, обитающий в *D. melanogaster*, зависит от хозяина в метаболизме аланина, глицина и серина, а также в производстве липополисахаридов и биотина (Jiménez et al., 2019; Newton, Rice, 2020). *Wolbachia* полностью зависит от хозяина в снабжении железом (Gill et al., 2014; Jiménez et al., 2019). С другой стороны, для некоторых видов насекомых показана зависимость от веществ, поступающих от вольбахии. Так, клоп *S. lectularius* использует рибофлавин (Mogiya et al., 2015) и биотин (Nikoh et al., 2014), поступающие от бактерии.

Среди важных механизмов взаимодействия вольбахии с хозяином можно упомянуть ее действие на цитоскелет клеток хозяина. Взаимодействие с динеином и кинезином микротрубочек клеток хозяина обеспечивает вольбахии попадание в ооциты, а значит, и распространение среди следующего поколения (Ferree et al., 2005). Также *Wol-*

bachia находится в зависимости от клатрин/динамин-зависимого захвата клетками хозяина для транспорта из соматической клетки в половую (White et al., 2017).

Иногда наблюдают случаи спонтанной утраты *Wolbachia*, которые можно объяснить действием иммунной системы хозяина против этой бактерии. Поврежденные органеллы (например, митохондрии) представляют угрозу для клетки. При обнаружении таких повреждений органелла устраняется путем избирательной аутофагии. Недавно было продемонстрировано, что этот механизм применим и к вольбахии (Hargitai et al., 2022). Дегградация при помощи лизосом вакуолей, содержащих вольбахию, может быть основной причиной самоизлечения. Показано, что старение приводит к снижению эффективности удаления вольбахии из клеток, в результате чего вольбахия активно размножается и повышает свою плотность в клетках хозяина (Hargitai et al., 2022). На основании полученных данных авторы пришли к заключению, что аутофагия может быть механизмом контроля вирулентности вольбахии.

Логично предположить, что, если эндосимбионты наблюдаются у многих поколений одних и тех же хозяев, иммунный ответ хозяина на этот организм снижен. Так как *Wolbachia* является самым распространенным симбионтом беспозвоночных, то, вероятно, эти бактерии выработали эффективный механизм защиты против иммунитета хозяина, только иногда дающей сбой. Было выдвинуто предположение, что новое приобретение инфекции *Wolbachia* вызывает иммунный ответ и окислительный стресс у хозяина, в то время как при долго наблюдаемом факте симбиоза с конкретным штаммом (устойчивой ассоциации штамма бактерии и конкретной популяции насекомых) инфекция не связана с окислительным стрессом (Zug, Hammerstein, 2015).

Исследования, посвященные транскриптомному анализу взаимодействий в системе «*Wolbachia*–хозяин»

Современные подходы определения связей между *Wolbachia* и хозяином опираются на данные анализа секвенирования. Важно интерпретировать результаты исследований геномов штаммов вольбахии в тандеме с результатами исследований транскриптома хозяина.

Анализ транскриптомов линий *D. melanogaster*, инфицированных *Wolbachia*, наравне с геномными исследованиями, может пролить свет на молекулярные механизмы взаимодействия между этими частями системы. Однако у данного метода имеются недостатки, которые были неоднократно подчеркнуты в проведенных исследованиях. Количество материала хозяина всегда будет больше, чем количество материала эндосимбионта. Чтобы обойти это ограничение, было бы логично использовать не целое насекомое, а только те органы, которые богаты этой бактерией. Под это условие подходят репродуктивные органы насекомого; были осуществлены соответствующие исследования на яичниках (He et al., 2019; Frantz et al., 2023) и на семенниках (He et al., 2019; Detcharoen et al., 2021). Однако различия в уровнях экспрессии генов между независимыми образцами одного типа (одна линия, инфи-

цированная одним штаммом) часто оказываются такими же значимыми, как различия в уровнях экспрессии генов между разными типами (Detcharoen et al., 2021). Это, наиболее вероятно, объясняется вкладом других факторов, таких как нестабильные внешние условия на момент выделения РНК.

Анализ транскриптома у *D. melanogaster*, инфицированных вольбахией, проводили также с использованием девственных и оплодотворенных самок (Detcharoen et al., 2021; Lindsey et al., 2021; Gruntenko et al., 2023), эмбрионов (Mateos et al., 2019). При этом в последней работе не обнаружено существенных различий в составе мРНК между эмбрионами, зараженными вольбахией, и неинфицированными (Mateos et al., 2019), что, вероятно, также можно объяснить вкладом иных факторов.

Несмотря на указанные недостатки использования транскриптомного анализа для изучения влияния вольбахии, с его помощью удалось получить значимые результаты, касающиеся разных аспектов взаимодействия в паре *Wolbachia–Drosophila*. Далее мы рассмотрим несколько исследований, осущетвленных за последние пять лет.

В ходе изучения явления ЦН и ее механизмов были проанализированы сначала транскриптом яичников, а затем транскриптом семенников взрослых особей *D. melanogaster* (He et al., 2019). Сравнения были проведены между транскриптомами неинфицированных и инфицированных штаммом wMel насекомых. Были выделены следующие функциональные группы генов, которые потенциально восприимчивы к вольбахии: «метаболизм», «транспорт», «окислительно-восстановительные процессы», «иммунитет» и «индивидуальное развитие». Было предположено, что вольбахия обуславливает разнонаправленную регуляцию транскрипции ряда генов у самок и самцов дрозофилы. Согласно этому предположению, когда инфицированные самцы спариваются с неинфицированными самками, у образующихся эмбрионов нарушается баланс содержания компонентов восстановления фертильности, что и вызывает эффект цитоплазматической несовместимости (He et al., 2019). Эта популярная гипотеза возникновения ЦН называется моделью титрования-спасения (titration-restitution model) (Poinsot et al., 2003).

Имеются также полученные другой группой исследователей данные транскриптомов, посвященные теме цитоплазматической несовместимости. Проведена работа по изучению влияния различных эндосимбиотических бактерий на транскриптом ранних эмбрионов *D. melanogaster*, но эффекта использованного штамма *Wolbachia* wMel на транскриптом хозяина не обнаружено (Mateos et al., 2019). Исследователи пришли к выводу, что штамм wMel не изменяет материнские транскрипты и не приводит к их градации (Mateos et al., 2019).

Было изучено влияние вольбахии на различающиеся по генотипу линии *D. melanogaster* (Frantz et al., 2023). Ученые исследовали транскриптомы яичников восьми линий дрозофил: четырех генетически различающихся линий, несущих один генотип вольбахии, и четыре отводки этих линий, которые были избавлены от вольбахии в результате обработки тетрациклином. Генотип линий хозяина оказался более значимым фактором, влияющим на

транскриптом изученных линий, чем наличие или отсутствие в них вольбахии. Однако все же удалось обнаружить вызываемые вольбахией различия в экспрессии генов хозяина, вовлеченных в пути, связанные с контрольными точками клеточного цикла, трансляцией и метаболизмом, а также с делением клеток и процессами рекомбинации (Frantz et al., 2023).

Исследование, выполненное на семенниках двух видов дрозофил, было направлено на изучение различий во влиянии штамма wMel на исходный вид хозяина (*D. melanogaster*) и на новый вид хозяина (*D. nigrosparsa*), которому путем искусственной трансинфекции вольбахии внесли указанный штамм (Detcharoen et al., 2021). Обнаруженные различия затронули такие группы генов-ортологов, как «окислительно-восстановительные процессы», «связывание ионов железа», «активность потенциал-зависимых калиевых каналов» (Detcharoen et al., 2021).

Для изучения механизмов противовирусной защиты насекомых-хозяев, которую обеспечивает вольбахия, были проанализированы транскриптомы мух *D. melanogaster*, инфицированных штаммом *Wolbachia* wMel2 (Lindsey et al., 2021). В схеме эксперимента одновременно учитывалось два фактора: инфицированность вольбахией или ее отсутствие и инфицированность вирусом лихорадки Синдбис (Sindbis virus, SINV) или отсутствие вируса. Были получены четыре группы насекомых (со всеми возможными комбинациями этих двух факторов).

В результате проведенного анализа были выделены следующие функциональные группы генов, которые потенциально являются восприимчивыми к вольбахии: «ответ на стресс», «связывание и процессирование РНК», «метаболизм», «убиквитинирование» и «транскрипция и трансляция». Исследователям не удалось обнаружить конкретные гены, уровень экспрессии которых менялся бы в результате взаимодействия вольбахии и вируса. Однако они построили единую генную сеть, связывающую гены, реагирующие на вольбахию, гены, реагирующие на вирусы, и гены, чей ответ был вызван совместным влиянием вольбахии и вируса. В эту сеть оказались включены только те гены, которых можно отнести к группе «метаболизм» (в основном процессы метаболизма аминокислот и биосинтез пуринов). A.R. Lindsey с коллегами (2021) предположили, что обнаруженное ими влияние вольбахии на синтез нуклеотидов хозяина может быть причиной подавления репликации вируса.

В работе, посвященной изучению положительного влияния штамма вольбахии wMelPlus на стрессоустойчивость мух *D. melanogaster* (Gruntenko et al., 2023), были сравнены транскриптомы имаго самок трех линий мух с одинаковым ядерным генотипом, но различающихся по инфекционному статусу (неинфицированные, инфицированные штаммом wMelPlus, инфицированные штаммом wMelCS¹¹²). Оба штамма вольбахии вызывали изменения в уровнях экспрессии генов, которые входят в функциональные группы: «трансмембранный транспорт», «протеолиз», «транспорт и метаболизм углеводов», «окислительно-восстановительные процессы», «регуляция активности щелочной фосфатазы», «эмбриогенез», «ответ на стресс». Однако состав дифференциально экспрессиру-

щихся генов в группах частично отличался между линиями мух, инфицированных разными штаммами вольбахии (транскриптомы линий инфицированных мух попарно сравнивали с транскриптомами неинфицированных). Главное различие в экспрессии генов ответа на стресс заключалось в повышении уровня транскрипции гена коразонинового рецептора (*CrzR*) у мух, инфицированных штаммом wMelPlus. Также были обнаружены различия между линиями мух, инфицированных разными штаммами вольбахии, в экспрессии разных генов щелочных фосфатаз (играют роль в ответе на стресс, участвуют в каскаде синтеза дофамина) (Gruntenko et al., 2023).

Таким образом, можно заключить, что *Wolbachia* влияет на экспрессию сотен генов у мух рода *Drosophila*. Эти изменения затрагивают множество процессов, объединяемых в функциональные группы задействованных генов, набор которых различается в ряде проведенных исследований. В свою очередь, функциональные группы можно соотнести с известными эффектами вольбахии, которые влияют на наблюдаемый фенотип хозяина. Результаты проведенных масштабных исследований транскриптомов насекомых, инфицированных вольбахией, в будущем могут помочь задать направление для более точечно сфокусированных экспериментов для конкретизации механизмов в системе «*Wolbachia*–хозяин».

С развитием технологий секвенирования стали доступными новые инструменты. При помощи CappableSeq получилось собрать транскриптом вольбахии из нематод (Luck et al., 2017). Этот метод может оказаться очень перспективным и для изучения транскриптомов вольбахии насекомых, но пока не опубликовано результатов такого анализа.

Однако от результатов частных исследований сложно перейти к более глобальным выводам. Комплексный анализ данных нескольких экспериментов известен как метаанализ. Это направление научного поиска может в будущем оказаться наиболее перспективным при изучении влияния вольбахии на транскриптом хозяина.

Заключение

Система «*Wolbachia*–хозяин» является очень устойчивой. *Wolbachia* эволюционировала совместно с видами-хозяевами, а также была одним из факторов, направляющих их эволюцию. Эта связь настолько глубокая и древняя, что вольбахию сравнивают с органеллами клетки, которые находятся в цитоплазме, такими как митохондрии и хлоропласты. И хотя в этой области аккумулирован гигантский объем информации, очень многое еще неизвестно о механизмах поддержания данной системы.

Этой области биологии пока не хватает систематизации знаний, которая бы не вызывала противоречий, начиная от систематики рода и заканчивая схематизацией молекулярных механизмов воздействий. *Wolbachia* приобрела неоднозначную репутацию, выступая в одних случаях как паразитический организм, а в других как мутуалистический симбионт. За сто лет изучения этого объекта не сложилось целостной картины.

Поскольку вольбахия прославилась манипуляциями репродуктивной стратегии хозяина, большинство работ посвящено этой теме, и недостаточно внимания уделяется

другой немаловажной области – влиянию вольбахии на процессы, протекающие в соматических клетках. Вольбахия оказывает воздействие не только на размножение, но также на другие жизненно важные показатели у хозяина. Необходимо продолжать исследование менее популярных и изученных аспектов взаимодействий «*Wolbachia*–хозяин» с привлечением новых биоинформатических методов и технологий, позволяющих ставить принципиально новые эксперименты. Применение этих подходов определенно уже способствовало значительному прогрессу в данной области, но на этом развитие представлений об отношениях насекомых и эндосимбиотической бактерии *W. pipientis* еще не окончено.

Список литературы / References

- Бурдина Е.В., Груntenko Н.Е. Физиологические аспекты взаимоотношений *Wolbachia pipientis*–*Drosophila melanogaster*. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2022;58(2):71-83. doi 10.31857/S0044452922020024
- [Burdina E.V., Gruntenko N.E. Physiological aspects of *Wolbachia pipientis*–*Drosophila melanogaster* relationship. *J Evol Biochem Phys*. 2022;58(2):303-317. doi 10.1134/s0022093022020016]
- Илинский Ю.Ю., Захаров И.К. Цитоплазматическая несовместимость у *Drosophila melanogaster*, обусловленная различными генотипами *Wolbachia*. *Экологическая генетика*. 2009;7(2):1-18 [Ilinsky Y.Y., Zakharov I.K. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* is caused by different *Wolbachia* genotypes. *Russ J Genet Appl Res*. 2011;1(5):458-462. doi 10.1134/S2079059711020031]
- Adonyeva N.V., Efimov V.M., Gruntenko N.E. The effect of genotype combinations of *Wolbachia* and its *Drosophila melanogaster* host on fertility, developmental rate and heat stress resistance of flies. *Insects*. 2023;14(12):928. doi 10.3390/insects14120928
- Augustinos A.A., Santos-García D., Dionysopoulos E., Moreira M., Papapanagiotou A., Scarvelakis M., Doudoumis V., Ramos S., Aguiar A.F., Borges P.A.V., Khadem M., Latorre A., Tsiamis G., Bourtzis K. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of Aphids: is the hidden diversity fully unraveled? *PLoS One*. 2011;6(12):e28695. doi 10.1371/journal.pone.0028695
- Backert S., Meyer T.F. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(2):207-217. doi 10.1016/j.mib.2006.02.008
- Baldo L., Bordenstein S.R., Wernegreen J.J., Werren J.H. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol Biol Evol*. 2006a;23:437-449. doi 10.1093/molbev/msj049
- Baldo L., Hotopp J.C.D., Jolley K.A., Bordenstein S.R., Biber S.A., Choudhury R.R., Hayashi C., Maiden M.C.J., Tettelin H., Werren J.H. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol*. 2006b;72(11):7098-7110. doi 10.1128/AEM.00731-06
- Beckmann J.F., Ronau J.A., Hochstrasser M. A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nat Microbiol*. 2017;2:17007. doi 10.1038/nmicrobiol.2017.7
- Brownlie J.C., Cass B.N., Riegler M., Witsenburg J.J., Iturbe-Ormaetxe I., McGraw E.A., O'Neill S.L. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000368. doi 10.1371/journal.ppat.1000368
- Burdina E.V., Bykov R.A., Menshanov P.N., Ilinsky Y.Y., Gruntenko N. Unique *Wolbachia* strain wMelPlus increases heat stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2021; 106(4):e21776. doi 10.1002/arch.21776
- Bykov R.A., Yudina M.A., Gruntenko N.E., Zakharov I.K., Voloshina M.A., Melashchenko E.S., Danilova M.V., Mazunin I.O.,

- Ilinsky Y.Y. Prevalence and genetic diversity of *Wolbachia* endosymbiont and mtDNA in Palearctic populations of *Drosophila melanogaster*. *BMC Evol Biol.* 2019;19(Suppl. 1):48. doi 10.1186/s12862-019-1372-9
- Chen H., Ronau J.A., Beckmann J.F., Hochstrasser M. A *Wolbachia* nuclease and its binding partner provide a distinct mechanism for cytoplasmic incompatibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(44):22314-22321. doi 10.1073/pnas.1914571116
- Cho K.O., Kim G.W., Lee O.K. *Wolbachia* bacteria reside in host Golgi-related vesicles whose position is regulated by polarity proteins. *PLoS One.* 2011;6(7):e22703. doi 10.1371/journal.pone.0022703
- Chrostek E., Teixeira L. Mutualism breakdown by amplification of *Wolbachia* genes. *PLoS Biol.* 2015;13(2):e1002065. doi 10.1371/journal.pbio.1002065
- Chrostek E., Teixeira L. Within host selection for faster replicating bacterial symbionts. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191530. doi 10.1371/journal.pone.0191530
- Chrostek E., Marialva M.S.P., Esteves S.S., Weinert L.A., Martinez J., Jiggins F.M., Teixeira L. *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: A phenotypic and phylogenomic analysis. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003896. doi 10.1371/journal.pgen.1003896
- Creasey E.A., Isberg R.R. Maintenance of vacuole integrity by bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2014;17(1):46-52. doi 10.1016/j.mib.2013.11.005
- Currin-Ross D., Husdell L., Pierens G.K., Mok N.E., O'Neill S.L., Schirra H.J., Brownlie J.C. The metabolic response to infection with *Wolbachia* implicates the insulin/insulin-like-growth factor and hypoxia signaling pathways in *Drosophila melanogaster*. *Front Ecol Evol.* 2021;9:623561. doi 10.3389/fevo.2021.623561
- da Rocha Fernandes M., Martins R., Pessoa Costa E., Pacidônio E.C., Araujo de Abreu L., da Silva Vaz I. Jr., Moreira L.A., da Fonseca R.N., Logullo C. The modulation of the symbiont/host interaction between *Wolbachia pipiensis* and *Aedes fluviatilis* embryos by glycogen metabolism. *PLoS One.* 2014;9(6):e98966. doi 10.1371/journal.pone.0098966
- De Felipe K.S., Pampou S., Jovanovic O.S., Pericone C.D., Ye S.F., Kalachikov S., Shuman H.A. Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J Bacteriol.* 2005;187(22):7716-7726. doi 10.1128/JB.187.22.7716-7726.2005
- Dean M.D. A *Wolbachia*-associated fitness benefit depends on genetic background in *Drosophila simulans*. *Proc Biol Sci.* 2006;273(1592):1415-1420. doi 10.1098/rspb.2005.3453
- Detcharoen M., Schilling M.P., Arthofer W., Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M. Differential gene expression in *Drosophila melanogaster* and *D. nigrosarsa* infected with the same *Wolbachia* strain. *Sci Rep.* 2021;11(1):11336. doi 10.1038/s41598-021-90857-5
- Duarte E.H., Carvalho A., López-Madrigal S., Costa J., Teixeira L. Forward genetics in *Wolbachia*: regulation of *Wolbachia* proliferation by the amplification and deletion of an addictive genomic island. *PLoS Genet.* 2021;17(6):e1009612. doi 10.1371/journal.pgen.1009612
- Ferree P.M., Frydman H.M., Li J.M., Cao J., Wieschaus E., Sullivan W. *Wolbachia* utilizes host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* oocyte. *PLoS Pathog.* 2005;1(2):0111-0124. doi 10.1371/journal.ppat.0010014
- Frantz S.I., Small C.M., Cresko W.A., Singh N.D. Ovarian transcriptional response to *Wolbachia* infection in *D. melanogaster* in the context of between-genotype variation in gene expression. *G3.* 2023;13(5):jkad047. doi 10.1093/g3journal/jkad047
- Fronzes R., Christie P.J., Waksman G. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(10):703-714. doi 10.1038/nrmicro2218
- Fry A.J., Rand D.M. *Wolbachia* interactions that determine *Drosophila melanogaster* survival. *Evolution.* 2002;56(10):1976-1981. doi 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00123.x
- Fry A.J., Palmer M.R., Rand D.M. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity.* 2004;93(4):379-389. doi 10.1038/sj.hdy.6800514
- Gill A.C., Darby A.C., Makepeace B.L. Iron necessity: the secret of *Wolbachia*'s success? *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):e3224. doi 10.1371/journal.pntd.0003224
- Gruntenko N.E., Ilinsky Y.Y., Adonyeva N.V., Burdina E.V., Bykov R.A., Menshanov P.N., Rauschenbach I.Y. Various *Wolbachia* genotypes differently influence host *Drosophila* dopamine metabolism and survival under heat stress conditions. *BMC Evol Biol.* 2017;17:252. doi 10.1186/s12862-017-1104-y
- Gruntenko N.E., Karpova E.K., Adonyeva N.V., Andreenkova O.V., Burdina E.V., Ilinsky Y.Y., Bykov R.A., Menshanov P.N., Rauschenbach I.Y. *Drosophila* female fertility and juvenile hormone metabolism depends on the type of *Wolbachia* infection. *J Exp Biol.* 2019;222(Pt. 4):jeb195347. doi 10.1242/jeb.195347
- Gruntenko N.E., Deryuzhenko M.A., Andreenkova O.V., Shishkina O.D., Bobrovskikh M.A., Shatskaya N.V., Vasiliev G.V. *Drosophila melanogaster* transcriptome response to different *Wolbachia* strains. *Int J Mol Sci.* 2023;24(24):17411. doi 10.3390/ijms242417411
- Gu X., Ross P.A., Rodriguez-Andres J., Robinson K.L., Yang Q., Lau M.J., Hoffmann A.A. A wMel *Wolbachia* variant in *Aedes aegypti* from field-collected *Drosophila melanogaster* with increased phenotypic stability under heat stress. *Environ Microbiol.* 2022;24(4):2119-2135. doi 10.1111/1462-2920.15966
- Hargitai D., Kenéz L., Al-Lami M., Szenczi G., Lőrincz P., Juhász G. Autophagy controls *Wolbachia* infection upon bacterial damage and in aging *Drosophila*. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:976882. doi 10.3389/fcell.2022.976882
- He Z., Zheng Y., Yu W.J., Fang Y., Mao B., Wang Y.F. How do *Wolbachia* modify the *Drosophila* ovary? New evidences support the "titration-restitution" model for the mechanisms of *Wolbachia*-induced CI. *BMC Genomics.* 2019;20(1):608. doi 10.1186/s12864-019-5977-6
- Hedges L.M., Brownlie J.C., O'Neill S.L., Johnson K.N. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science.* 2008;322(5902):702. doi 10.1126/science.1162418
- Hertig M., Wolbach S.B. Studies on rickettsia-like micro-organisms in insects. *J Med Res.* 1924;44(3):329-374.7
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J.H. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;281(2):215-220. doi 10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x
- Hoffmann A.A. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Entomol Exp Appl.* 1988;48(1):61-67. doi 10.1111/j.1570-7458.1988.tb02299.x
- Hoffmann A.A., Montgomery B.L., Popovici J., Iturbe-Ormaetxe I., Johnson P.H., Muzzi F., Greenfield M., Durkan M., Leong Y.S., Dong Y., Cook H., Axford J., Callahan A.G., Kenny N., Omodei C., McGraw E.A., Ryan P.A., Ritchie S.A., Turelli M., O'Neill S.L. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature.* 2011;476(7361):454-459. doi 10.1038/nature10356
- Ikeya T., Broughton S., Alic N., Grandison R., Partridge L. The endosymbiont *Wolbachia* increases insulin/IGF-like signalling in *Drosophila*. *Proc Biol Sci.* 2009;276(1674):3799-3807. doi 10.1098/rspb.2009.0778
- Ilinsky Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes. *PLoS One.* 2013;8(1):e54373. doi 10.1371/journal.pone.0054373
- Ilinsky Y., Demenkova M., Bykov R., Bugrov A. Narrow genetic diversity of *Wolbachia* symbionts in acrididae grasshopper hosts (Insecta, Orthoptera). *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):853. doi 10.3390/ijms23020853
- Jiménez N.E., Gerdtsen Z.P., Olivera-Nappa Á., Salgado J.C., Conca C. A systems biology approach for studying *Wolbachia* metabolism re-

- veals points of interaction with its host in the context of arboviral infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(8):e0007678. doi 10.1371/journal.pntd.0007678
- Kamtchum-Tatuene J., Makepeace B.L., Benjamin L., Baylis M., Solomon T. The potential role of *Wolbachia* in controlling the transmission of emerging human arboviral infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2017;30(1):108-116. doi 10.1097/QCO.0000000000000342
- Karpova E.K., Bobrovskikh M.A., Deryuzhenko M.A., Shishkina O.D., Gruntenko N.E. *Wolbachia* effect on *Drosophila melanogaster* lipid and carbohydrate metabolism. *Insects*. 2023;14(4):357. doi 10.3390/insects14040357
- Kaur R., Shropshire J.D., Cross K.L., Leigh B., Mansueto A.J., Stewart V., Bordenstein S.R., Bordenstein S.R. Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: a centennial review. *Cell Host Microbe*. 2021;29(6):879-893. doi 10.1016/j.chom.2021.03.006
- Korenskaia A.E., Shishkina O.D., Klimenko A.I., Andreenkova O.V., Bobrovskikh M.A., Shatskaya N.V., Vasiliev G.V., Gruntenko N.E. New *Wolbachia pipientis* genotype increasing heat stress resistance of *Drosophila melanogaster* host is characterized by a large chromosomal inversion. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):16212. doi 10.3390/ijms232416212
- Kremer N., Voronin D., Charif D., Mavingui P., Mollereau B., Vavre F. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000630. doi 10.1371/journal.ppat.1000630
- Kumar Y., Valdivia R.H. Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe*. 2009;5(6):593-601. doi 10.1016/j.chom.2009.05.014
- Lassy C.W., Karr T.L. Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mech Dev*. 1996;57(1):47-58. doi 10.1016/0925-4773(96)00527-8
- Laven H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature*. 1967;216:383-384. doi 10.1038/216383a0
- LePage D., Bordenstein S.R. *Wolbachia*: can we save lives with a great pandemic? *Trends Parasitol*. 2013;29(8):385-393. doi 10.1016/j.pt.2013.06.003
- LePage D.P., Metcalf J.A., Bordenstein S.R., On J., Perlmutter J.I., Shropshire J.D., Layton E.M., Funkhouser-Jones L.J., Beckmann J.F., Bordenstein S.R. Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Nature*. 2017;543(7644):243-247. doi 10.1038/nature21391
- Lindsey A.R.I. Sensing, signaling, and secretion: a review and analysis of systems for regulating host interaction in *Wolbachia*. *Genes (Basel)*. 2020;11(7):813. doi 10.3390/genes11070813
- Lindsey A.R.I., Bhattacharya T., Hardy R.W., Newton I.L.G. *Wolbachia* and virus alter the host transcriptome at the interface of nucleotide metabolism pathways. *mBio*. 2021;12(1):e03472-20. doi 10.1128/mBio.03472-20
- Lo N., Evans T.A. Phylogenetic diversity of the intracellular symbiont *Wolbachia* in termites. *Mol Phylogenet Evol*. 2007;44(1):461-466. doi 10.1016/j.ympev.2006.10.028
- Lo N., Paraskevopoulos C., Bourtzis K., O'Neill S.L., Werren J.H., Bordenstein S.R., Bandi C. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57(3):654-657. doi 10.1099/ijss.0.64515-0
- Luck A.N., Slatko B.E., Foster J.M. Removing the needle from the haystack: enrichment of *Wolbachia* endosymbiont transcripts from host nematode RNA by Cappable-seqTM. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173186. doi 10.1371/journal.pone.0173186
- Maistrenko O.M., Serga S.V., Vaiserman A.M., Kozeretska I.A. Longevity-modulating effects of symbiosis: insights from *Drosophila-Wolbachia* interaction. *Biogerontology*. 2016;17(5-6):785-803. doi 10.1007/s10522-016-9653-9
- Mateos M., Silva N.O., Ramirez P., Higareda-Alvear V.M., Aramayo R., Erickson J.W. Effect of heritable symbionts on maternally-derived embryo transcripts. *Sci Rep*. 2019;9(1):8847. doi 10.1038/s41598-019-45371-0
- Min K.-T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(20):10792-10796. doi 10.1073/pnas.94.20.10792
- Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A., Lu G., Pyke A.T., Hedges L.M., Rocha B.C., Hall-Mendelin S., Day A., Riegler M., Hugo L.E., Johnson K.N., Kay B.H., McGraw E.A., van den Hurk A.F., Ryan P.A., O'Neill S.L. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*. 2009;139(7):1268-1278. doi 10.1016/j.cell.2009.11.042
- Moriyama M., Nikoh N., Hosokawa T., Fukatsu T. Riboflavin provisioning underlies *Wolbachia*'s fitness contribution to its insect host. *mBio*. 2015;6(6):e01732-15. doi 10.1128/mBio.01732-15
- Newton I.L.G., Rice D.W. The *Wolbachia* and Hyde symbiont: could *Wolbachia* be a nutritional mutualist? *J Bacteriol*. 2020;202(4):e00589-19. doi 10.1128/JB.00589-19
- Nikoh N., Hosokawa T., Moriyama M., Oshima K., Hattori M., Fukatsu T. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(28):10257-10262. doi 10.1073/pnas.1409284111
- Nunes M.D.S., Nolte V., Schlötterer C. Nonrandom *Wolbachia* infection status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes. *Mol Biol Evol*. 2008;25(11):2493-2498. doi 10.1093/molbev/msn199
- O'Neill S.L., Pettigrew M.M., Sinkins S.P., Braig H.R., Andreadis T.G., Tesh R.B. *In vitro* cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol*. 1997;6(1):33-39. doi 10.1046/j.1365-2583.1997.00157.x
- Ote M., Ueyama M., Yamamoto D. *Wolbachia* protein TomO targets *nanos* mRNA and restores germ stem cells in *Drosophila sex-lethal* mutants. *Curr Biol*. 2016;26(17):2223-2232. doi 10.1016/j.cub.2016.06.054
- Pichon S., Bouchon D., Cordaux R., Chen L., Garrett R.A., Grève P. Conservation of the Type IV secretion system throughout *Wolbachia* evolution. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(4):557-562. doi 10.1016/j.bbrc.2009.05.118
- Pietri J.E., DeBruhl H., Sullivan W. The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiologyopen*. 2016;5(6):923-936. doi 10.1002/mbo3.390
- Poinsot D., Charlat S., Mercot H. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. *BioEssays*. 2003;25(3):259-265. doi 10.1002/bies.10234
- Porter J., Sullivan W. The cellular lives of *Wolbachia*. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(11):750-766. doi 10.1038/s41579-023-00918-x
- Rice D.W., Sheehan K.B., Newton I.L.G. Large-scale identification of *Wolbachia pipientis* effectors. *Genome Biol Evol*. 2017;9(7):1925-1937. doi 10.1093/gbe/evx139
- Riegler M., Sidhu M., Miller W.J., O'Neill S.L. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*. 2005;15(15):1428-1433. doi 10.1016/j.cub.2005.06.069
- Rohrscheib C.E., Bondy E., Josh P., Riegler M., Eyles D., van Swinderen B., Weible M.W., Brownlie J.C. *Wolbachia* influences the production of octopamine and affects *Drosophila* male aggression. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(14):4573-4580. doi 10.1128/AEM.00573-15
- Ros V.I.D., Fleming V.M., Feil E.J., Breeuwer J.A.J. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(4):1036-1043. doi 10.1128/AEM.01109-08
- Ryan S.L., Saul G.B. 2nd. Post-fertilization effect of incompatibility factors in *Mormoniella*. *Mol Gen Genet*. 1968;103(1):29-36. doi 10.1007/BF00271154
- Sheehan K.B., Martin M., Lesser C.F., Isberg R.R., Newton I.L.G. Identification and characterization of a candidate *Wolbachia pipientis* type IV effector that interacts with the actin cytoskeleton. *mBio*. 2016;7(4):e00622-16. doi 10.1128/mBio.00622-16
- Teixeira L., Ferreira Á., Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila me-*

- lanogaster*. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2753-2763. doi 10.1371/journal.pbio.1000002
- Truitt A.M., Kapun M., Kaur R., Miller W.J. *Wolbachia* modifies thermal preference in *Drosophila melanogaster*. *Environ Microbiol.* 2019;21(9):3259-3268. doi 10.1111/1462-2920.14347
- Werren J.H. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol.* 1997;42:587-609. doi 10.1146/annurev.ento.42.1.587
- White P.M., Pietri J.E., Debec A., Russell S., Patel B., Sullivan W. Mechanisms of horizontal cell-to-cell transfer of *Wolbachia* spp. in *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(7):e03425-16. doi 10.1128/AEM.03425-16
- Wu M., Sun L.V., Vamathevan J., Riegler M., Deboy R., Brownlie J.C., McGraw E.A., Martin W., Esser C., Ahmadinejad N., Wiegand C., Madupu R., Beanan M.J., Brinkac L.M., Daugherty S.C., Durkin A.S., Kolonay J.F., Nelson W.C., Mohamoud Y., Lee P., Berry K., Young M.B., Utterback T., Weidman J., Nierman W.C., Paulsen I.T., Nelson K.E., Tettelin H., O'Neill S.L., Eisen J.A. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biol.* 2004;2(3):E69. doi 10.1371/journal.pbio.0020069
- Yu X.-J., Walker D.H. The Order Rickettsiales. In: *The Prokaryotes*. Springer, 2006;493-528. doi 10.1007/0-387-30745-1_20
- Zhang H., Id Z.C., Qiao J., Zhong Z., Pan C. Metabolomics provide new insights into mechanisms of *Wolbachia*-induced paternal defects in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 2021;17(8):e1009859. doi 10.1371/journal.ppat.1009859
- Zhou W., Rousset F., O'Neil S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc Biol Sci.* 1998;265(1395):509-515. doi 10.1098/rspb.1998.0324
- Zug R., Hammerstein P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40 % of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One.* 2012;7(6):e38544. doi 10.1371/journal.pone.0038544
- Zug R., Hammerstein P. *Wolbachia* and the insect immune system: what reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*-host interactions. *Front Microbiol.* 2015;6:1201. doi 10.3389/fmicb.2015.01201

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 20.11.2024. После доработки 25.12.2024. Принята к публикации 25.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-11

The liver-brain axis under the influence of chronic *Opisthorchis felineus* infection combined with prolonged alcoholization in mice

D.F. Avgustinovich ^{1,2} , I.V. Chadaeva ¹, A.V. Kizimenko ¹, A.V. Kovner ¹, D.V. Bazovkina ¹,
D.V. Ponomarev ¹, V.I. Evseenko ², V.A. Naprimerov^{1,3}, M.N. Lvova ¹

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

² Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

 avgust@bionet.nsc.ru

Abstract. Our purpose was to model a combination of a prolonged consumption of ethanol with *Opisthorchis felineus* infection in mice. Four groups of C57BL/6 mice were compiled: OF, mice infected with *O. felineus* for 6 months; Eth, mice consuming 20 % ethanol; Eth+OF, mice subjected to both adverse factors; and CON, control mice not exposed to these factors. In the experimental mice, especially in Eth+OF, each treatment caused well-pronounced periductal and cholangiofibrosis, proliferation of bile ducts, and enlargement of areas of inflammatory infiltration in the liver parenchyma. Simultaneously with liver disintegration, the infectious factor caused – in the frontal cerebral cortex – the growth of pericellular edema (OF mice), which was attenuated by the administration of ethanol (Eth+OF mice). Changes in the levels of some proteins (Iba1, IL-1 β , IL-6, and TNF) and in mRNA expression of genes *Aif1*, *Il1b*, *Il6*, and *Tnf* were found in the hippocampus and especially in the frontal cortex, implying region-specific neuroinflammation. Behavioral testing of mice showed that ethanol consumption influenced the behavior of Eth and Eth+OF mice in the forced swimming test and their startle reflex. In the open field test, more pronounced changes were observed in OF mice. In mice of all three experimental groups, especially in OF mice, a disturbance in the sense of smell was detected (fresh peppermint leaves). The results may reflect an abnormality of regulatory mechanisms of the central nervous system as a consequence of systemic inflammation under the combined action of prolonged alcohol consumption and helminth infection.

Key words: mice; *Opisthorchis felineus* infection; chronic ethanol consumption; liver; brain; microglia; proinflammatory cytokine; behavior.

For citation: Avgustinovich D.F., Chadaeva I.V., Kizimenko A.V., Kovner A.V., Bazovkina D.V., Ponomarev D.V., Evseenko V.I., Naprimerov V.A., Lvova M.N. The liver-brain axis under the influence of chronic *Opisthorchis felineus* infection combined with prolonged alcoholization in mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):92-107. doi 10.18699/vjgb-25-11

Funding. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 20-04-00139); by a government-funded project of the ICG SB RAS (grant No. FWNr-2022-0021); and in part by a state assignment for the Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS (project No. 121032500061-7).

Acknowledgements. The authors are grateful to the Multi-Access Center for Microscopic Analysis of Biological Objects at the ICG SB RAS (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) for the equipment as well as to the Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS), which is supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education (unique identifier of the project: RFMEFI62119X0023). The English language was corrected and certified by shevchuk-editing.com (language certificate of July 3, 2024).

Ось «печень–мозг» при хронической инфекции *Opisthorchis felineus* в сочетании с длительной алкоголизацией мышей

Д.Ф. Августинович ^{1,2} , И.В. Чадаева ¹, А.В. Кизименко ¹, А.В. Ковнер ¹, Д.В. Базовкина ¹,
Д.В. Пономарёв ¹, В.И. Евсеенко ², В.А. Напримеров^{1,3}, М.Н. Львова ¹

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

² Институт химии твёрдого тела и механохимии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

 avgust@bionet.nsc.ru

Аннотация. Описторхоз – паразитарное заболевание, вызываемое трематодами семейства Opisthorchiidae, к которому относится вид *Opisthorchis felineus*, максимально представленный у жителей Обь-Иртышского речного бассейна Западной Сибири. Хроническое употребление алкоголя влечет за собой неизлечимые заболевания пе-

чени, которые могут быть усугублены привнесением гельминтной инфекции. Хроническое воспаление на фоне двух воздействий может вызывать нарушения в других органах и системах, в том числе в центральной нервной системе. Сочетание длительного потребления 20 % этанола и инфекции *O. felineus* моделировали у мышей C57BL/6 с целью исследования изменений в мозге таких животных. Были сформированы четыре группы мышей: OF – мыши, инфицированные *O. felineus* в течение 6 мес; Eth – мыши, потребляющие 20 % этанол; Eth+OF – мыши с сочетанным действием двух факторов; CON – контрольные мыши, не испытывающие эти воздействия. Оба фактора вызвали у мышей, особенно в группе Eth+OF, выраженные перидуктальный фиброз и холангиофиброз, пролиферацию желчных протоков и увеличение участков воспалительной инфильтрации в паренхиме печени. Одновременно с нарушениями в печени, во фронтальной коре мозга инфекционный фактор обуславливал усиление перичеллюлярного отека (мыши OF), сдерживаемого введением этанола (мыши Eth+OF). Также обнаружены колебания уровней белка (Iba1, IL-1 β , IL-6, TNF) и экспрессии генов *Aif1*, *Il1b*, *Il6* и *Tnf* в гиппокампе и особенно во фронтальной коре, предполагающие регион-специфическое нейровоспаление. Поведенческое тестирование мышей показало, что потребление этанола влияло на поведение мышей Eth and Eth+OF в тесте принудительного плавания и на Startle-рефлекс. В тесте открытого поля более выраженные изменения происходили у мышей OF. У животных всех трех экспериментальных групп, но особенно у OF, выявлена аномалия обоняния (на свежие листья мяты перечной). Полученные данные могут отражать нарушение регуляторных механизмов в головном мозге вследствие системного воспаления при сочетанном действии длительного употребления алкоголя и гельминтной инфекции.

Ключевые слова: мыши; инфекция *Opisthorchis felineus*; хроническое потребление этанола; печень; мозг; микроглия; провоспалительные цитокины; поведение.

Introduction

The family Opisthorchiidae includes three species of trematodes: *Clonorchis sinensis*, most common in China, Korea, and the Far East of the Russian Federation (35 million people); *Opisthorchis viverrini*, widespread in Thailand and Laos (10 million people); and *Opisthorchis felineus*, manifesting the highest prevalence of infection among fish in water bodies of the Ob-Irtysh basin in Russia (1.2 million people) (Mordvinov, Furman, 2010; Petney et al., 2013; Saijuntha et al., 2021). The last two species cause opisthorchiasis when fish of the family Cyprinidae are eaten raw or undercooked. During prolonged helminth infection, mature worms parasitize not only bile ducts of the liver and the gall bladder of piscivorous mammals but also pancreatic ducts, as shown for *O. felineus* and *C. sinensis* (Bernstein et al., 1994; Mordvinov, Furman, 2010; Lvova et al., 2023), thereby causing complications such as various forms of pancreatitis (Gundamaraju, Vemuri, 2014). Given that opisthorchiasis upregulates proinflammatory cytokines and leukocytes in the blood (Sripa et al., 2012; Avgustinovich et al., 2022a), this disease is considered a systemic illness that provokes pathologies in other organs and systems of the body (Boonpucknavig et al., 1992; Akhmedov, Kritevich, 2009; Bychkov et al., 2011), including the central nervous system (CNS) (Lvova et al., 2020; Avgustinovich et al., 2016, 2022b). One can expect the development of neuroinflammation during opisthorchiasis, judging by tenets of the “liver–brain axis” paradigm (D’Mello, Swain, 2011). According to those authors, three proinflammatory cytokines – interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF) – in the blood are key promoters of central neural changes in chronic liver diseases. In addition, in the context of liver inflammation, activation of microglia takes place with subsequent recruitment of blood monocytes into the brain. All this strongly drives hepatic inflammation-associated sickness behavior.

The daily alcohol (ethanol) abuse/misuse is a major cause of inevitable damage to the liver (Collins, Neafsey, 2012). The progression of alcoholic liver disease induces cirrhosis, liver cancer, and acute and chronic liver failure and can be fatal (Stickel et al., 2017). As determined by the World Health Or-

ganization (WHO. Alcohol. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>), worldwide, 3 million deaths every year result from overconsumption of alcohol, and this figure represents 5.3 % of all deaths.

As with opisthorchiasis, excessive alcohol consumption entails pathological changes in other organs and systems of organs, for example, in the gut microbiota (Saltykova et al., 2016; Bishehsari et al., 2017; Bajaj, 2019; Ketpueak et al., 2020; Pakharukova et al., 2023; Yao et al., 2023). Aside from the direct negative effect on the intestines, alcohol disrupts bile acid synthesis in the liver during inflammation and impairs bile acid entry into the gallbladder for subsequent secretion into the small intestine. In this context, the reabsorption of bile by the liver is impeded, which under normal conditions is 95 %. Accordingly, in such patients, in addition to alcoholic liver diseases, microbial composition and functions of the intestine change, leading to functional alterations in the “gut–liver–brain axis” (Bishehsari et al., 2017). As a consequence, symptoms of hepatic encephalopathy are aggravated, which are associated with microglial activation and subsequent cognitive deficits (Bajaj, 2019).

On the other hand, alcohol can also have a direct impact on the CNS by inducing cerebral cortical edema and electrolyte (Na⁺ or K⁺) accumulation (Collins et al., 1998), and during chronic consumption, alcohol can cause neuronal loss in some brain structures (the cerebral cortex, hypothalamus, hippocampus, and cerebellum) (Harper, 1998; de la Monte, Kril, 2014; Fowler et al., 2014). These effects are attributable to activation of resident microglia and peripheral-macrophage infiltration of the CNS, particularly in the hippocampus, and the two processes together contribute to overexpression of proinflammatory markers in various regions of the brain, including the cortex and hippocampus (Yang et al., 2014; Henriques et al., 2018; Lowe et al., 2020). These phenomena negatively affect cognitive abilities, learning, and memory (Geil et al., 2014).

In humans, these two adverse factors (alcohol consumption and *O. felineus* infection) can often occur simultaneously. Unfortunately, a combination of ethanol consumption with chronic *O. felineus* infection can have irreversible consequences for humans, as previously shown in a model of such

a combination (Avgustinovich et al., 2022a). In that work, a more pronounced liver pathology was accompanied by splenomegaly due to structural changes in the spleen as well as elevated levels of IL-6 and higher leukocyte and monocyte counts in the blood. Taken together, they meant substantial whole-body inflammation. Considering these data as well as a known statement about possible brain disturbances during severe hepatic inflammation (D’Mello, Swain, 2011), the purpose of our current study was to investigate – by histological, immunohistochemical, and molecular methods – changes in inflammatory markers in the cerebral cortex and hippocampus, as assessed by determination of microglial activation and of expression of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF. Because any disturbances in the brain manifest themselves in behavior in mammals, behavioral patterns of mice were assessed here by the open field test (Ramos, Mormède, 1998) and forced swimming test (Porsolt et al., 1977), along with estimation of the startle reflex in response to acoustic signals (Paylor, Crawley, 1997).

Materials and methods

Animals. Male mice of inbred strain C57BL/6 were obtained from the multi-access center Vivarium of Conventional Animals of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS). All animals were maintained in standard cages (36 × 22 × 12 cm) at 2–5 individuals per cage, on a 12/12 h light/dark cycle, at 24 ± 1 °C with free access to pelleted feed and liquid. The study was conducted in accordance with Directives of the Council of the European Union (86/609/EEC) of November 24, 1986 and according to a decision of the Bioethics Commission of the ICG SB RAS (protocol No. 113 of December 9, 2021).

Obtaining of *O. felineus* metacercariae. Metacercariae of *O. felineus* were isolated from naturally infected fishes caught

in the Ob River (Novosibirsk Oblast) by a method described previously (Avgustinovich et al., 2016, 2021). Metacercariae of *O. felineus* were administered to mice intragastrically (100 larvae per mouse) using specialized probes (Braintree Scientific, Inc.).

The design of the experiment. As a result, four groups of mice were set up: CON ($n = 15$), not subjected to any pathogenic procedures; OF ($n = 15$), infected with *O. felineus* (duration of infection: 6 months); Eth ($n = 15$), consuming 20 % ethanol for 6 months; and Eth+OF ($n = 13$), subjected to both procedures (Fig. 1). Mice were trained to consume ethanol according to a protocol described before (Avgustinovich et al., 2022a). Five months after the infection initiation, the behavior of all mice was recorded in the open field test. By the end of 6 months, the startle response of mice to an acoustic signal (startle reflex) was evaluated. The animals were then housed individually in 28 × 14 × 10 cm cages to evaluate behavior in the forced swimming test. At the end of the experiment, the animals were killed by decapitation, and brain samples were collected for subsequent analyses. The hippocampus and frontal cortex were isolated on ice, placed in liquid nitrogen and then in a freezer at –70 °C until the expression of genes of interest was assayed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Brains from five animals in each group were put in 10 % formalin for subsequent histological and immunohistochemical examination. The liver of these animals was also placed in formalin for subsequent determination of pathomorphological structural alterations in this organ under the influence of the two tested adverse factors.

The open field test. This is one of the most popular tests in behavioral studies, which assesses effects of external factors on rodents (Ramos, Mormède, 1998). When animals are first exposed to an unfamiliar open space, behavioral responses are believed to be mediated by anxiety, whereas repeated

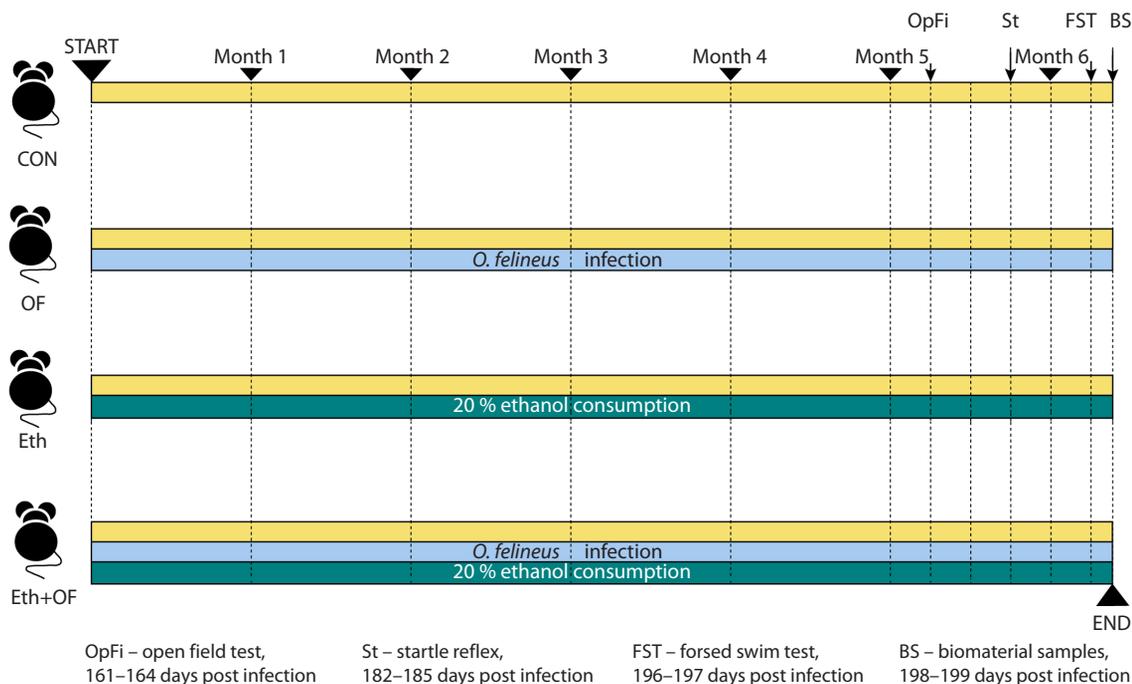


Fig. 1. Design of the experiment.

exposure can lead to exploration of new objects (or odors) by the animals in a nonthreatening familiar environment (Belzung, 1992; Choleris et al., 2001). For testing, a 40 × 40 cm field made of white plastic material was utilized, which was visibly subdivided into squares (4 × 4) with a side of 10 cm. The illumination at the field level was 320 lx. In the middle of one side of the field, an inverted office metallic tumbler for pencils (hereafter: tumbler) was placed. Five minutes before the testing, the animals were brought into the test room for activation, after which they were always placed in the middle of the wall opposite the wall with the tumbler. Each animal's behavior was recorded twice (for 3 min each time) using a video camera in the session with an empty tumbler and next with a tumbler containing fresh peppermint leaves. Further analysis of animal behavior was carried out in the Behavioral Observation Research Interactive Software (BORIS) (Friard, Gamba, 2016), in which we determined the number, time (duration), and latency of approaches and/or turns to the tumbler, the number of square crossings, and the number, time (duration), and latency of rearings near a wall.

Startle reflex testing. The startle reflex of humans and animals toward a sharp sound signal is an innate reflex and characterizes the CNS's ability to filter sensory information (Paylor, Crawley, 1997). The behavioral response of mice to an acoustic stimulus was measured using an SR-Pilot device (San-Diego Instruments, USA). Background white noise was set to 65 dB. Each animal was placed in the chamber, and after 3-min adaptation, 10 impulses (P) of 115 dB intensity and 40 ms duration were presented, alternating with 10 impulses preceded by weak (85 dB, 40 ms) prepulses (PP), which were presented 100 ms before the main impulse. The interval between stand-alone P impulses and the PP combination was 15 s. The size of the response of a mouse to the stimuli (amplitude) was displayed by the device's screen in relative units. Prepulse inhibition (PPI, %) was calculated (Paylor, Crawley, 1997) by means of the formula: $100 - [(PP/P) \times 100]$.

The forced swim test. This test is the most popular in research on depressive-like behavior in rodents because it is sensitive to the action of antidepressants (Porsolt et al., 1977). During the testing, transparent plastic cylinders 30 cm high and 9.5 cm in diameter were used, which were filled with water ($t = 25 \pm 1$ °C) to a level of 19 cm. Five minutes before the test, the mice were sequentially brought into the test room and then placed for 5 min into the cylinder filled with water; their behavior was recorded on a video camera. Further analysis was performed in the BORIS software (Friard, Gamba, 2016). The duration of active and passive swimming was assessed; the latter included drift (when the mouse made weak movements with one or two hind legs to keep the head above water) and a state of complete immobility.

RNA isolation for qPCR. To obtain RNA from mouse brain structures, the TRI reagent (Sigma-Aldrich, USA) was employed according to the protocol for samples with a high fat content, then the samples were purified on magnetic particles (Agencourt RNAClean XP Kit, Beckman). The concentration of the resulting RNA was determined using a Qubit™ 2.0 fluorimeter (Invitrogen/Life Technologies) with a kit (RNA High Sensitivity, Invitrogen). Next, the isolated RNA was treated with DNase using the DNase I, RNase-free kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Complementary DNA (cDNA) was

synthesized by means of a reverse-transcription kit (#OT-1, Syntol, Russia). All stages of RNA isolation and analysis and those of cDNA preparation were carried out according to the protocols of the manufacturers of the corresponding kits.

Using the PrimerBLAST web service, we designed oligonucleotide primers for qPCR. qPCR was conducted with the EVA Green I kit (#R-441, Syntol, Russia) according to the manufacturer's instructions, and amplification efficiency for each primer pair was 90–110 %. qPCR was carried out in three technical replicates on a CFX-96 thermal cycler (Bio-Rad, USA). qPCR efficiency was determined by means of serial dilutions of cDNA (standards); after completion of qPCR, melting curves of the products were constructed to monitor the specificity of the reaction. Expression levels of each analyzed gene were normalized to two reference genes, the expression stability of which was checked in both brain regions under study and in each of the four groups of mice. Based on literature data (Stephens et al., 2011), three reference genes were chosen: *Actb* (beta actin: a highly conserved protein that participates in cell motility, structure, and integrity), *B2m* (beta-2-microglobulin: a light-chain component of major histocompatibility complex class I), and *Hprt1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1: a eukaryotic enzyme of purine metabolism).

The genes of interest were selected taking into account their functional characteristics listed in the Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). The following genes were investigated in the experiment: *Aif1* (a marker of microglial activity) and *Il1b*, *Il6*, and *Tnf* (markers of inflammation).

Sequences of the chosen primers were as follows:

- 1 *Actb* (F) 5'-TATTGGCAACGAGCGGTTCC
(R) 5'-TGGCATAGAGGTCTTTACGG
- 2 *Aif1* (F) 5'-GGATTTGCAGGGAGGAAAA
(R) 5'-TGGGATCATCGAGGAATTG
- 3 *B2m* (F) 5'-CTGCTACGTAACACAGTTCACCC
(R) 5'-CATGATGCTTGATCACATGTCTCG
- 4 *Hprt1* (F) 5'-GAGGAGTCCTGTTGATGTTGCCAG
(R) 5'-GGCTGGCCTATAGGCTCATAGTGC
- 5 *Il1b* (F) 5'-ACACTCCTTAGTCTCGGCCA
(R) 5'-CCATCAGAGGCAAGGAGGAA
- 6 *Il6* (F) 5'-ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG
(R) 5'-ACGCACTAGGTTTGCCGAG
- 7 *Tnf* (F) 5'-AGCCGATGGGTTGTACCTTG
(R) 5'-GGTTGACTTTCTCCTGGTATGAGA

Histological examination of sections of the cerebral cortex and liver. After 10 days of fixation in a 10 % formaldehyde solution, the brain and liver of mice were sectioned for subsequent processing in an STP 120 carousel-type apparatus for automatic incubation in a graded series of ethanol and xylene (Thermo Fisher Scientific, USA). The frontal section separated the middle part of the brain, containing the hippocampus, at level 60–64 according to the Allen Mouse Brain Atlas (<http://mouse.brain-map.org/static/atlas>). Samples containing bile ducts and parenchyma and measuring 100 × 150 × 70 mm were dissected from the large lobe of the liver. After dehydration, the tissue samples were embedded in the HISTOMIX synthetic paraffin medium (Russia) by means of an EC-350 embedding

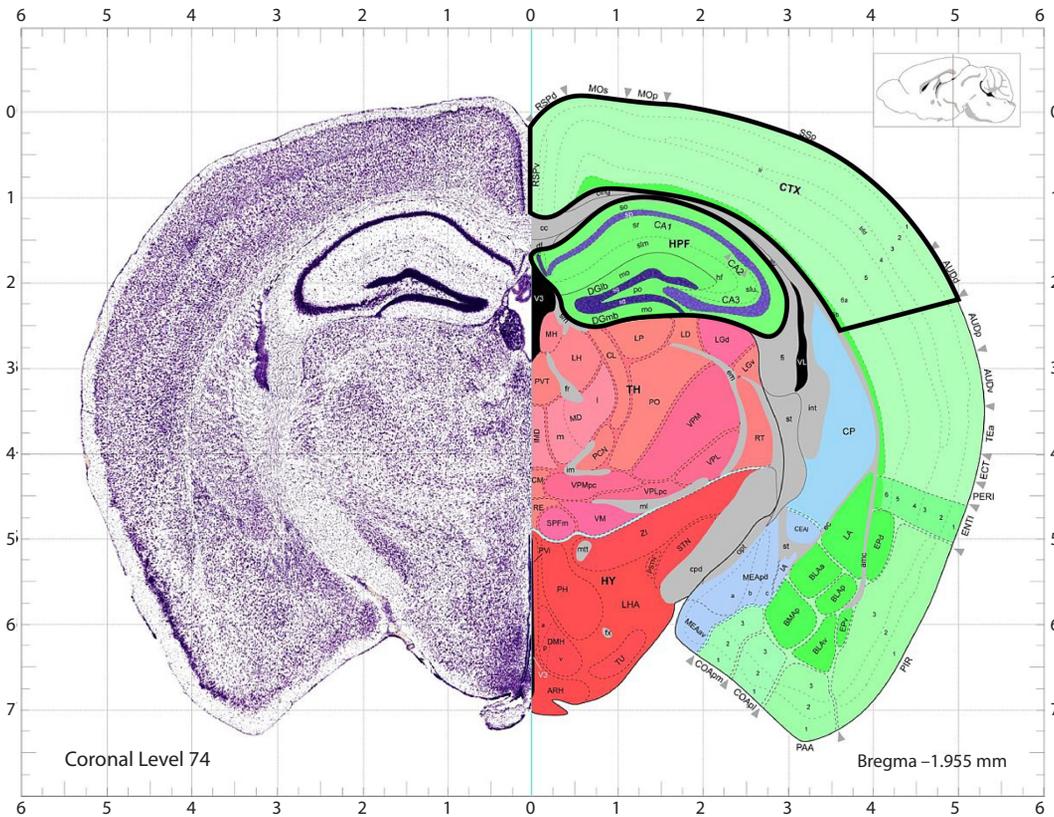


Fig. 2. Areas of the cerebral cortex and hippocampal formation (highlighted with a black line on the right) from the brain of C57BL/6 mice, after immunohistochemical analysis.

The image of the frontal brain section at levels 72–74 was borrowed from the Allen Mouse Brain Atlas (Allen Institute Publications for Brain Science; <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>).

station (Thermo Scientific, USA). Sections with a thickness of 3.5–4.0 μm were prepared on a Microm HM 355S rotary microtome (Thermo Fisher Scientific, USA). To study the cortex and hippocampus, brain samples were cut to levels 72–74 according to the brain atlas (Fig. 2). The obtained samples of the cortex and liver were subsequently stained by standard techniques: basic survey staining with hematoxylin and eosin and the Masson method (staining of connective tissue). After that, sections mounted in BioMount (BIO-OPTICA, Italy) were visualized under an Axioskop 2 plus microscope equipped with an AxioCam MRc camera (Carl Zeiss, Germany) and AxioVision software (release 4.12). Morphometry of structural changes in the cerebral cortex was performed using a closed test system targeting 100 points with an area of $3.64 \times 10^5 \mu\text{m}^2$. Meanwhile, numerical density of perivascular and pericellular edema and the total number of blood vessels were assessed. The scoring method for these measurement data had been described in detail earlier (Pakharukova et al., 2019). In the liver, the absence/presence of periductal fibrosis, cholangiofibrosis, and inflammatory infiltration and proliferation of bile ducts was recorded.

Immunohistochemical analysis of sections of the hippocampus and cerebral cortex. The hippocampus and cortex at levels 72–74 of frontal brain sections were examined on glass slides with an adhesive poly-L-lysine coating (BVS, Russia). To count activated brain microglia cells and cells synthesizing proinflammatory cytokines, we utilized an indirect biotin-

free peroxidase immunohistochemical technique for staining paraffin sections using a kit (SpringBioScience Kit HRP-125, Pleasanton, CA, USA) and primary antibodies specific to ionized calcium-binding adapter protein 1 (Iba1) (Abcam, cat. # ab5076, dilution 1:300), IL-6 (Abcam, ab6672, 1:100), TNF (Abcam, ab6671, 1:100), and IL-1 β (Abcam, ab9722, 1:100). According to this technique, after standard deparaffinization and dehydration, antigens were retrieved on the sections in citrate buffer (pH 6.0) in a microwave oven at 700 W for 5 min. After washing four times in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.6), endogenous peroxidase was blocked for 30 min with fresh 3 % H_2O_2 . Next, blocking with horse serum was carried out for 1.0–1.5 h with pre-washing in PBS. The duration and conditions of probing with primary antibodies were chosen according to the manufacturer’s instructions (sections with antibodies were incubated overnight at 4 °C). Next, after washing four times (PBS, pH 7.6), the tissue sections were incubated with secondary antibodies for 45 min, and then, after washing (PBS, pH 7.6), the tissue sections were incubated with diaminobenzidine as a substrate until a brown color appeared upon visual inspection. After that, the sections were counterstained with Mayer’s hematoxylin for 1 min, placed in tap water for 5 min, passed through a graded series of ethanol and xylenes, covered with the synthetic BioMount medium, and placed under a cover glass. Cells positive for staining with the above antibodies were counted in all subfields of view in the cortical and hippocampal areas highlighted with

a black line in Figure 2, by a previously described approach (Pakharukova et al., 2019).

Statistics. To compare groups, two-way ANOVA and three-way ANOVA were performed in the STATISTICA 6.0 software, followed by a *post hoc* comparison of groups by the least significant difference (LSD) test. The following factors were analyzed during the intergroup comparison: “infection” (*O. felineus* or no *O. felineus*) and “ethanol” (ethanol or no ethanol). In the open field test, an additional within-group factor was “peppermint”: the first or second 3 min of observation, i. e., in the absence or presence of peppermint in the tumbler, respectively. The difference in the startle amplitude between the first and 10th stimulus in each group of mice was assessed by the Wilcoxon matched-pairs test. In all analyses, data with a p -value ≤ 0.05 were considered statistically significant, and those with $0.05 < p < 0.1$ were regarded as an insignificant tendency. All data are given as means \pm SEM.

Results

Pathomorphological changes in the liver of mice of experimental groups

Control animals had normal liver architecture with well-defined portal triads (Fig. S1)¹. On liver sections of animals from groups OF and Eth+OF, bile ducts appeared dilated, helminths were present in some of them, and there was a noticeable number of proliferating bile ducts and considerable lymphocytic–monocytic inflammatory infiltration. The bile duct epithelium became stratified in OF and Eth+OF mice. In the liver of animals from group Eth, fatty dystrophy of hepatocytes was noted.

Masson staining of liver sections revealed expansion of connective tissue in OF and Eth+OF mice, both in the region of large bile ducts (periductal fibrosis) and in the region of proliferation of small bile ducts (cholangiofibrosis) (Fig. S2). It is noteworthy that the combination of the two adverse factors (infection and ethanol) featured a significantly aggravated course of opisthorchiasis, namely the severity of fibrosis and the size of infiltration loci; these signs were absent with each adverse factor applied alone. Additionally, in OF and Eth+OF animals, there was a change of epithelial cells consistent with intestinal metaplasia. Hemozoin granules were found in some mice, in agreement with what has been previously observed in *O. felineus*-infected Syrian hamsters (Lvova et al., 2016).

Histological analyses of the cerebral cortex

Histological examination of brain sections uncovered differences in the number of perivascular zones of edema (around the vessels) and pericellular zones of edema (around the cells) in the cerebral cortex. There was a somewhat greater number of perivascular edema zones in OF mice compared to Eth and Eth+OF mice (Fig. 3A); an effect of the ethanol factor on this parameter was detected. OF mice differed significantly from all other animals by having an increased number of pericellular edema zones (Fig. 3B); the effect of the infection factor was significant. Ethanol contributed to a decrease in this parameter, especially in mice from group Eth. Moreover, the ethanol factor had a >4 times more pronounced impact than the infection

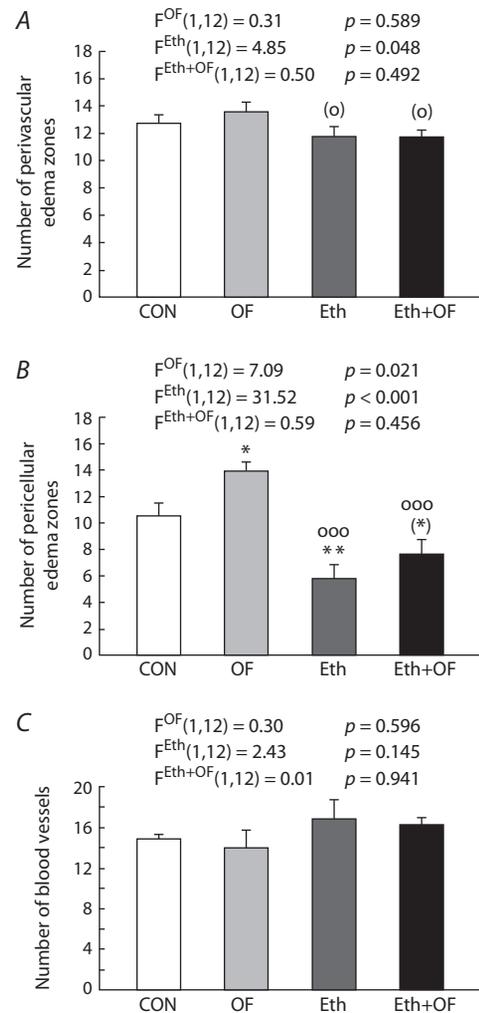


Fig. 3. Changes in the number of perivascular (A) and pericellular edema foci (B) and blood vessels (C) in the cerebral cortex of control mice (CON), *O. felineus*-infected mice (OF), mice consuming 20 % ethanol (Eth), and mice subjected to both procedures (Eth+OF).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (*) $0.05 < p < 0.1$ as compared with group CON; ooo $p < 0.001$; (o) $0.05 < p < 0.1$ as compared with OF mice. The values are presented as mean \pm SEM and were processed by two-way ANOVA followed by the LSD test.

factor did; in the absence of their interaction, this outcome contributed to a lower value of this parameter in Eth+OF mice. The mouse groups did not differ in the number of vessels in the cerebral cortex (Fig. 3C). The assessed parameters in mice of all the experimental groups are presented in photographs of histological sections of the cerebral cortex (Fig. S3).

Immunohistochemical analysis of hippocampus and cortex sections

Analysis of Iba1-positive cells in the hippocampus revealed no difference among the groups (Fig. 4A). In the cerebral cortex (Fig. 4B), this parameter was higher in mice consuming ethanol (group Eth). Nonetheless, with a statistically significant interaction between the two adverse factors, this parameter decreased to the control level in Eth+OF mice. The number of IL-1 β -positive cells was higher in both the hippocampus (Fig. 4C) and cortex (Fig. 4D) during combined treatments (Eth+OF). Although in the hippocampus, this phenomenon

¹ Supplementary Figures S1–S5 and Table S1 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx5.pdf>

was determined by the influence of the infection factor, in the cortex, in addition to infection, this outcome was facilitated by an even more significant influence of ethanol, and there was a synergistic interaction of the two factors.

A similar but even more pronounced pattern was documented for proinflammatory cytokine IL-6. In the hippocampus (Fig. 4E), infection to a greater extent and ethanol to a

lesser extent contributed to a higher value of this parameter in Eth+OF mice. In the cortex (Fig. 4F), on the contrary, ethanol exerted a greater effect on an increase in the number of IL-6-positive cells, and a statistically significant interaction of the adverse factors caused a significantly higher value of this parameter in Eth+OF animals compared to the other three groups of mice (CON, OF, and Eth). There was a pronounced

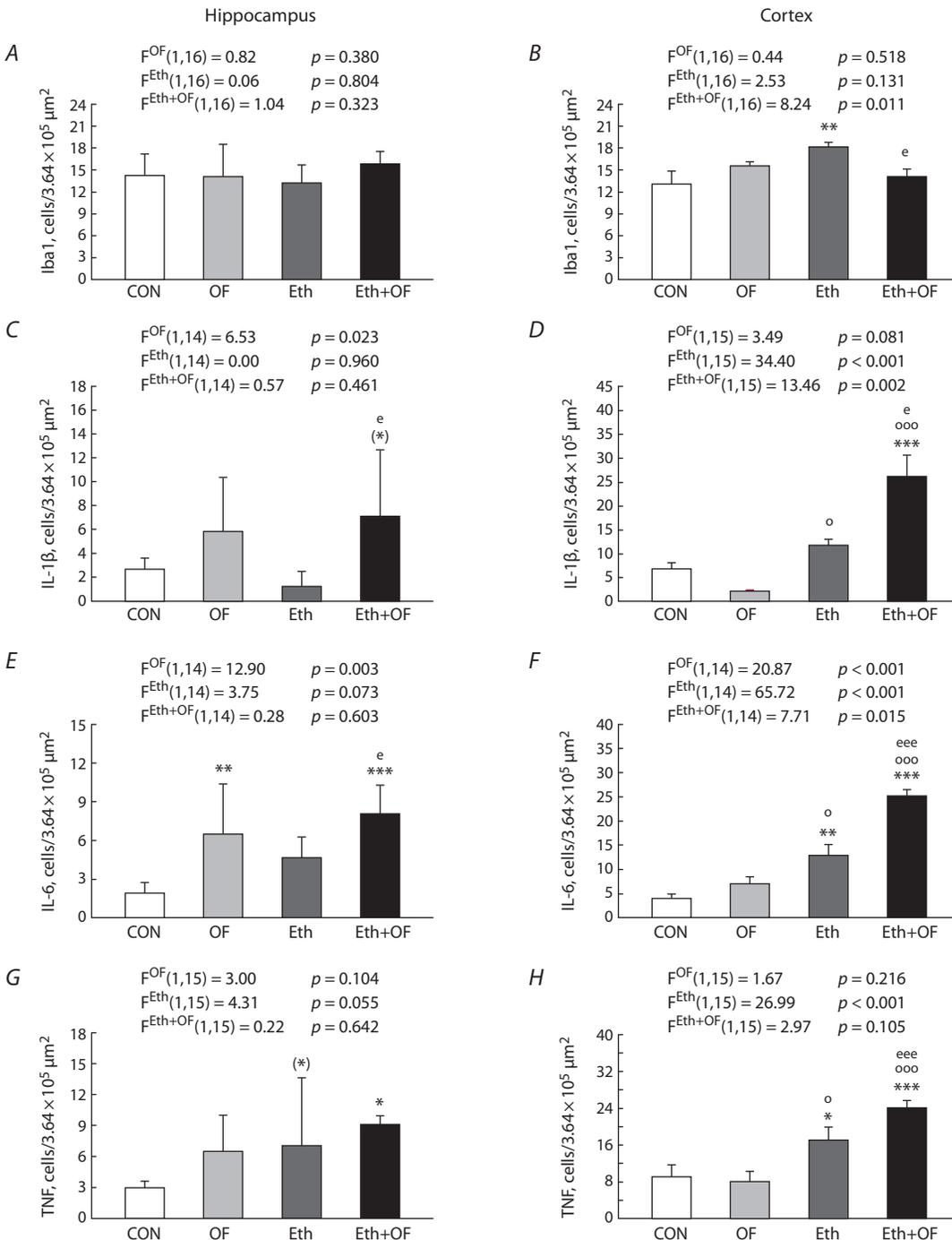


Fig. 4. Numerical density of brain cells in the hippocampus (A, C, E, G) and cortex (B, D, F, H) stained for Iba1, IL-1 β , IL-6, and TNF in the four mouse groups: control (CON), *O. felineus*-infected (OF), consuming 20 % ethanol (Eth), and subjected to both procedures (Eth+OF).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; (*) $0.05 < p < 0.1$ in comparison with group CON; ° $p < 0.05$ and °°° $p < 0.001$ in comparison with group OF; e $p < 0.05$ and eee $p < 0.001$ in comparison with group Eth. The values are presented as mean \pm SEM and were processed by two-way ANOVA followed by the LSD test.

effect of ethanol, but not infection, on the increase in the number of TNF-positive cells in the hippocampus (Fig. 4G) and especially in the cortex (Fig. 4H). As in the analyses of the other proinflammatory cytokines, a statistically significantly higher value of this parameter was found in the cortex of Eth+OF mice relative to the other groups. Examples of immunohistochemical staining of the analyzed brain sections from the four mouse groups are presented in Figures S4 and S5.

Gene expression analysis in the hippocampus and cortex

Our quantitative analysis (qPCR) detected a significant effect of both adverse factors on the expression of the *Aif1* gene in the two brain structures under study (Fig. 5A, B). In the hippocampus, ethanol consumption had a more pronounced effect, contributing to a 28-fold higher value of this parameter in Eth mice compared to CON mice and a 7–8-fold higher value compared to groups OF and Eth+OF. An interaction of

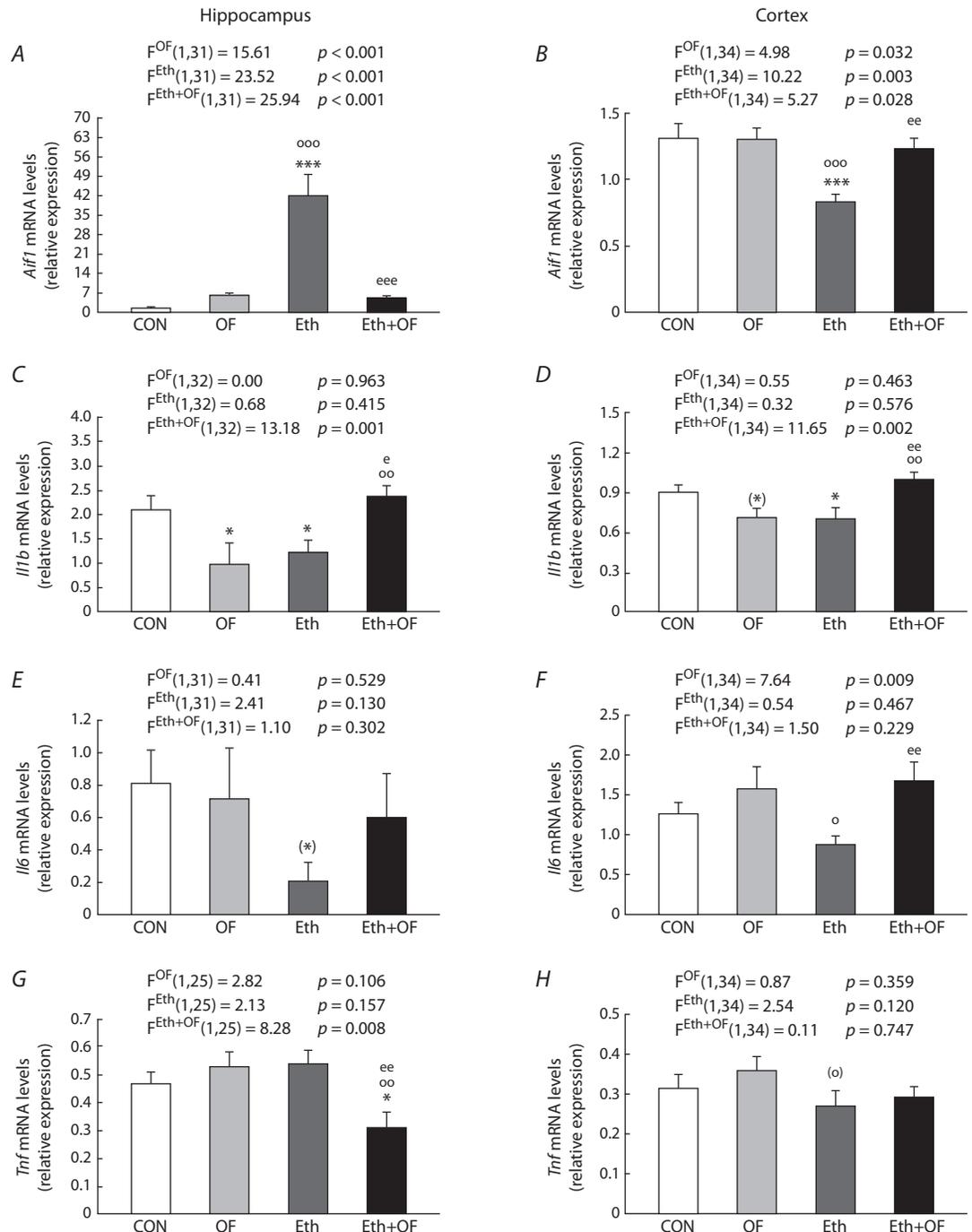


Fig. 5. Relative levels of mRNA expression of genes *Aif1*, *Il1b*, *Il6*, and *Tnf* in the hippocampus (A, C, E, G) and frontal cortex (B, D, F, H) of mice from the four groups: control (CON), *O. felineus*-infected (OF), consuming 20 % ethanol (Eth), and subjected to both procedures (Eth+OF).

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, (*) $0.05 < p < 0.1$ in comparison with group CON; ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$, (°) $0.05 < p < 0.1$ in comparison with group OF; °° $p < 0.05$, °°° $p < 0.001$ in comparison with group Eth.

the factors was noted to cause underexpression of the *Aif1* gene in Eth+OF mice. In the frontal cortex, on the contrary, ethanol consumption contributed to *Aif1* underexpression (the Eth group), and when the two adverse factors were combined, this parameter rose to the level of control mice.

When the expression of the *Il1b* gene was assessed in the hippocampus, no statistically significant effect of either factor alone was revealed, although a subsequent *post hoc* comparison of the groups detected a lower value of this parameter in mice from groups OF and Eth compared to CON mice. Nevertheless, a significant interaction of the two factors (Eth+OF mice; Fig. 5C) caused an increase in this parameter to the control level. A similar pattern was registered in the frontal cortex (Fig. 5D).

There was no statistically significant effect of each factor or of their interaction on the expression of the *Il6* gene in the hippocampus (Fig. 5E). The infection factor had a significant effect on the *Il6* expression in the frontal cortex (Fig. 5F), and this outcome contributed to an increase in the parameter in Eth+OF mice to the control level; this parameter was lower in Eth mice than in OF mice.

The combination of the two adverse factors caused down-regulation of the *Tnf* gene in the hippocampus of Eth+OF mice compared with the other groups of animals (CON, OF, and Eth) (Fig. 5G). In the frontal cortex of the brain, the expression of this gene was approximately the same in all four groups of animals (Fig. 5H); no statistically significant influence of each factor or of their interaction was detectable.

The startle reflex

Neither the prolonged consumption of ethanol nor chronic infection significantly affected PPI according to the evaluation of the startle response to acoustic stimuli (Fig. 6A). Nevertheless, the ethanol-drinking animals showed no habituation to the repetitive sound: in Eth mice, the startle response was the same for the 1st and 10th pulse with an intensity of 115 dB; the same was true for Eth+OF mice (Fig. 6B). Furthermore, in CON mice (statistically significantly) and in OF mice (insignificantly), the startle response to the sharp sound applied 10 times was found to decrease. It is noteworthy that in Eth+OF mice, the response to the first sound was the lowest when compared with the other groups, and there was a significant influence of ethanol [$F^{\text{Eth}}(1,51) = 8.10, p = 0.006$] and an insignificant influence of infection [$F^{\text{OF}}(1,51) = 3.09, p = 0.085$], but there was no interaction of the two factors [$F^{\text{Eth+OF}}(1,51) = 1.81, p = 0.185$]. The reaction of the mice to the 10th sound signal was the same among the four groups.

The open field test

In this test, intergroup differences were detected in the response of the mice to the odor of peppermint placed in the tumbler (Fig. 7A–C, Table S1). Even though the duration of staying near the tumbler with peppermint was approximately the same among all the groups, the number of approaches to it was lower in the second 3 min (i.e., when peppermint was present), especially in the CON group; the impact of the peppermint factor on this parameter was significant (Fig. 7A). An interaction of the ethanol and infection factors was detectable too (Table S1). Furthermore, CON and Eth mice sensed the peppermint smell faster than the other animals did because

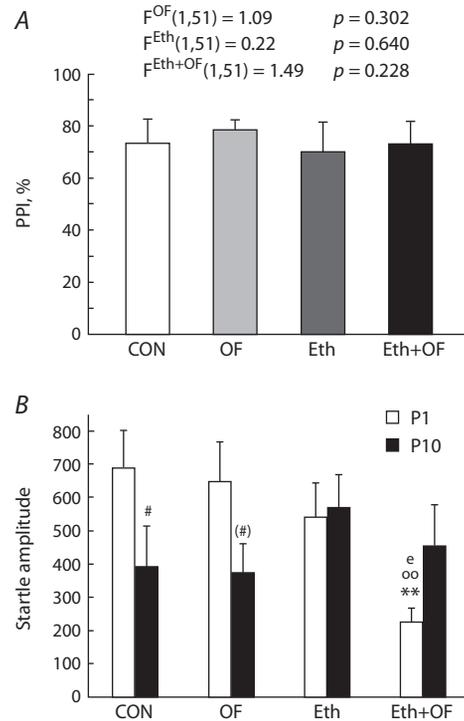


Fig. 6. Prepulse inhibition (PPI) (A) of the startle response to an acoustic stimulus and startle amplitude (B) in response to the first (P1) and 10th (P10) stimulus in control mice (CON), *O. felinus*-infected mice (OF), mice consuming 20 % ethanol (Eth), and mice subjected to both procedures (Eth+OF).

** $p < 0.01$ in comparison with group CON; °° $p < 0.01$ in comparison with OF mice; ° $p < 0.05$ in comparison with group Eth; # $p < 0.05$ and (#) $0.05 < p < 0.1$ in comparison with the P1 data. The values are presented as mean \pm SEM. Two-way ANOVA was used followed by the LSD test (A) and the Wilcoxon matched-pairs test (B).

the latency period of the first approach to the tumbler with peppermint was significantly shorter in groups CON and Eth (Fig. 7C). In OF mice, this parameter did not differ from the latency period of approaching the empty tumbler, whereas in group Eth+OF, there was an insignificant decrease from the first 3 min to the second 3 min. This finding may reflect impairment of olfactory sensitivity in the course of prolonged parasitosis.

In the first 3 min of the test, the number of crossed squares (reflecting locomotor activity of the animals) was lower in the OF group than in groups CON and Eth (Fig. 7D); the effect of infection was statistically significant (Table S1). With a change in the motivation of mice after peppermint was placed in the tumbler, this parameter markedly diminished in all four groups of mice (Fig. 7D), and a significant impact of the peppermint factor was registered (Table S1).

Exploratory activity, assessed by means of the number and duration of rearings, was influenced by the infection and peppermint factors (Fig. 7E, F; Table S1). In the first 3 min of the test, these parameters were lower in OF mice than in CON mice. As compared to the first 3 min, the number of rearings in the second 3 min was significantly lower in CON mice and insignificantly so in group Eth+OF, whereas the duration of rearing stayed approximately the same in all

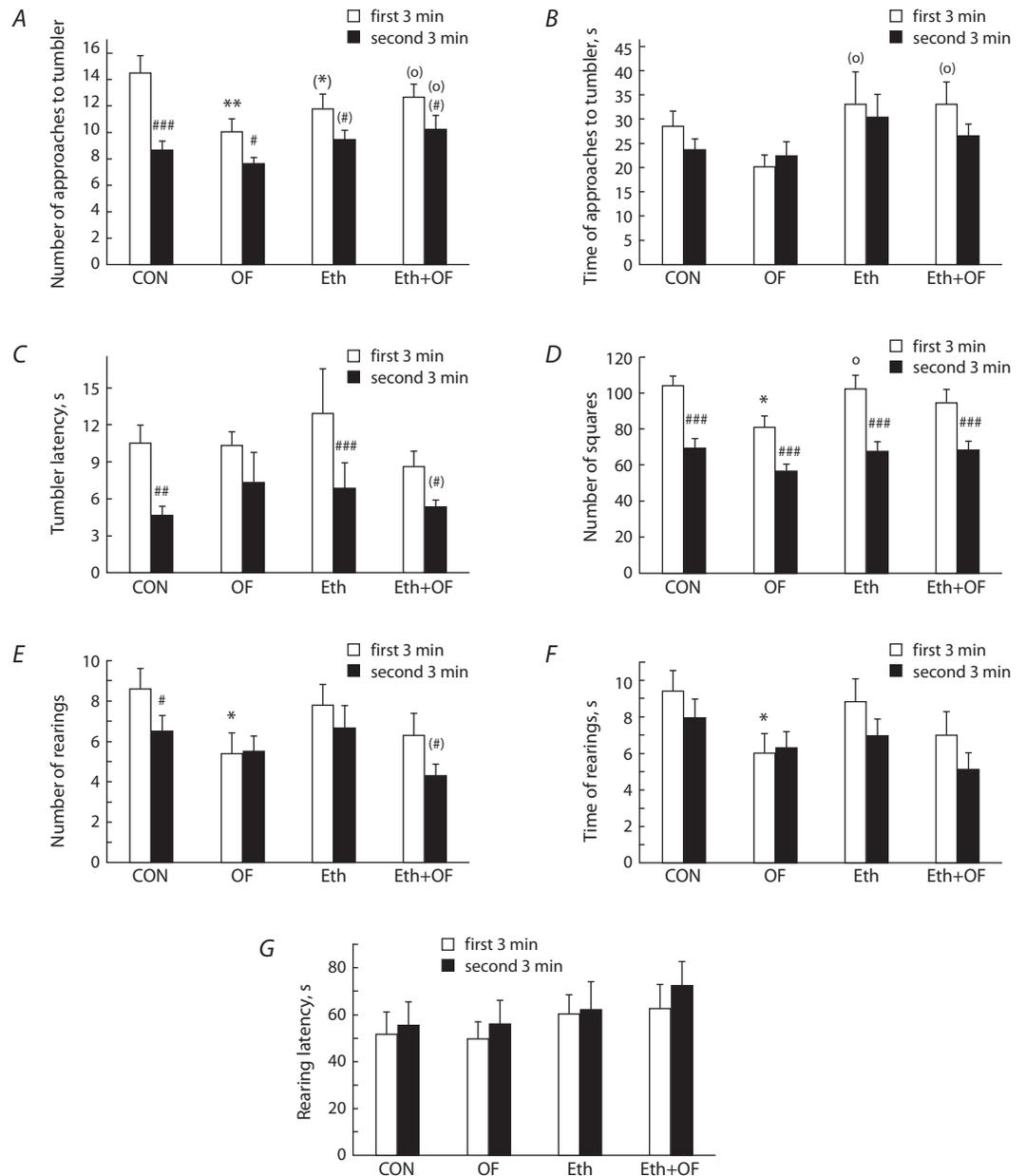


Fig. 7. Behavioral parameters of control mice (CON), *O. felineus*-infected mice (OF), mice consuming 20 % ethanol (Eth), and mice subjected to both procedures (Eth+OF) in the open field test with an empty tumbler (the first 3 min) and a tumbler filled with peppermint leaves (the second 3 min). The number (A), time (duration) (B), and latency (C) of approaches to the tumbler, the number of square crossings (D), and the number (E), time (duration) (F), and latency (G) of rearings near a wall were determined.

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, and (#) $0.05 < p < 0.1$ as compared with the first 3 min of the test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and (*) $0.05 < p < 0.1$ as compared with the corresponding time slot in group CON. ^o $p < 0.05$ and ^(o) $0.05 < p < 0.1$ as compared with the corresponding time slot in group OF. The values are presented as mean \pm SEM. Three-way ANOVA followed by the LSD test.

groups. There was no influence of factors or of their interaction and no differences among the four groups in the latency of rearings either in the first or in the second 3 min of the test (Fig. 7G; Table S1).

The forced swimming test

Prolonged consumption of ethanol had a significant effect on the behavior of mice in the forced swimming test. Active-swimming duration was longer (Fig. 8A), and passive-

swimming duration was shorter (Fig. 8B), especially in mice of the Eth group and, to a lesser extent, in Eth+OF mice, both in comparison with CON and with OF mice.

Discussion

This is the first study on the states of the liver and brain during exposure of mice to a combination of two adverse factors: infection (*O. felineus* helminths) and a toxic chemical (ethanol). Influence of each factor and of their combined action on the

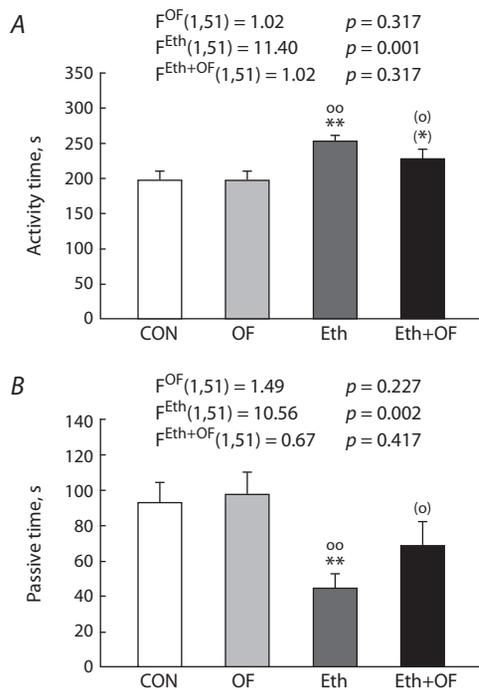


Fig. 8. The duration of active (A) and passive swimming (B) in control mice (CON), *O. felineus*-infected mice (OF), mice consuming 20 % ethanol (Eth), and mice subjected to both procedures (Eth+OF) in the forced swimming test.

** $p < 0.01$ and (*) $0.05 < p < 0.1$ as compared with group CON. oo $p < 0.01$ and (o) $0.05 < p < 0.1$ as compared with group OF. The values are presented as mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by the LSD test.

cortex and hippocampus was found in the brain of mice, as determined not only by molecular and histological methods but also at the level of behavior, which is considered a marker of functional changes in the brain.

First of all, as previously (Avgustinovich et al., 2022a), it was shown here that both adverse factors, especially their combination, cause hepatic inflammation. In mice subjected to the combination of the factors, there was not only a bile duct pathology caused by the infection (cholangio- and periductal fibrosis and inflammatory infiltration) but also hepatocyte dystrophy induced by ethanol. These data – just as previously detected elevated blood levels of leukocytes (especially stab neutrophils and monocytes) and of IL-6 (Avgustinovich et al., 2022a) – point to substantial inflammation in the body. It is known that virus- and alcohol-induced liver diseases are accompanied by inflammation and fibrosis associated with the suppression of activation of NF- κ B in hepatocytes: a transcription factor that is a key regulator of inflammation and cell death in the liver (Seki, Schwabe, 2015). In this context, Kupffer cells increase their production of proinflammatory cytokines, including TNF, IL-1 β , and IL-6 (Bilzer et al., 2006), with their subsequent traffic to the brain, where monocytes are also attracted from the bloodstream (D’Mello, Swain, 2011). As other researchers believe (Yang et al., 2014; Simon et al., 2019), these events are followed by activation of resident and recruited microglial cells, contributing to the development of neuroinflammation due to the production of inflammation mediators.

One of important indicators of inflammation in the brain is edema, the pathogenesis of which involves many factors, including liver failure (Adeva et al., 2012). In acute liver failure, edema is initially localized to the perivascular space and a zone of large swollen astrocytes. In our study, the experimental groups of mice did not differ from controls in perivascular edema, although in the animals consuming ethanol (groups Eth and Eth+OF), this parameter was somewhat less pronounced than that in OF mice. It is thought that when a pathological process in the liver is prolonged, structural changes occur in blood–brain barrier components (capillary endothelium, basal membrane, and astrocyte vascular peduncles), and these alterations reduce its protective function (Mishchenko et al., 1993). Blood–brain barrier destabilization facilitates penetration of “noxious agents” [e. g., ammonia, cytokines, or bacterial cell wall endotoxins: lipopolysaccharides (LPSs)] (Jayakumar et al., 2012) into the brain, with consequent pericellular edema due to the accumulation of fluid in the intracellular space, as demonstrated by magnetic resonance imaging in humans (Chavarria et al., 2011). We noticed significant predominance of pericellular edema in OF animals. At the same time, in the Eth+OF group of mice, ethanol “corrected” the number of edema foci, thereby reducing this parameter below the control value. Therefore, the actions of the two factors had opposite directions.

We assume that the increase in the number of pericellular edema zones during the helminth infection may proceed according to the hepatic-encephalopathy scenario, associated not only with upregulation of inflammatory cytokines (TNF, IL-1 β , IL-6, and IFN- γ) in the blood but also with elevated blood and brain ammonia levels, as shown in acute and chronic liver failure (Butterworth, 2003; Rama Rao et al., 2014; Upadhyay, 2017). Ammonia is extremely toxic to the brain and leads to hepatic coma. Considering the evidence from other researchers that alcohol promotes edema in the brain (Collins et al., 1998; Collins, Neafsey, 2012; de la Monte, Kril, 2014), the decrease in the number of pericellular edema zones in mice consuming ethanol in our experiment remains unexplained. It can be hypothesized that aquaporins (AQPs) are involved, which are water-selective plasma membrane channels that enhance water permeability of cells (Huber et al., 2007), because there are reports confirming that ethanol can diminish swelling in the cortex after brain injury and that this phenomenon is associated with underexpression of AQP4 and AQP9 simultaneously with an improvement of cognitive and motor functions in animals (Wang et al., 2013). Because it is known that aquaporins are enriched within brain astroglia (Huber et al., 2007; Collins, Neafsey, 2012), the decrease in pericellular edema during prolonged ethanol consumption in our experiment may be related to its degenerative effect on astrocytes (de la Monte, Kril, 2014). As demonstrated by the optical fractionation technique, in severely ill alcoholics, there is a loss of 37 % of glial cells in the hippocampus, primarily astrocytes and oligodendrocytes and to a lesser extent microglial cells, without a loss of neurons (Korbo, 1999). Apparently, our data require further research.

It is known that brain microglia, when responding to any pathological stimulus coming from the periphery (an LPS challenge, vaccination, or alcohol), begin to produce proinflammatory cytokines with subsequent stimulation of a release

of cytokines and chemokines from neurons and astrocytes (Miller et al., 2009; Yang et al., 2014; Norden et al., 2016; Henriques et al., 2018).

According to our findings, there are brain region-specific changes in the expression of the *Aif1* gene, reflecting the activity of microglia, during the exposure to the two adverse factors. In the hippocampus, where microglial density is reported to be the highest (Silvin, Ginhoux, 2018; Tan et al., 2020), a statistically significant influence of both factors and of their interaction was documented in our work. Chronic consumption of 20 % ethanol contributed to a significant increase in this parameter; the impact of the infectious factor was less pronounced but statistically significant, as found previously (Avgustinovich et al., 2022a). It is important that when the two factors acted together, *Aif1* expression in the hippocampus was low. Apparently, in this situation, activation of microglia cells in the hippocampus is so substantial that the activated microglia can be driven into apoptosis, in order to prevent the brain from entering a state of chronic inflammation. Currently, the mechanisms controlling microglial apoptosis are characterized incompletely, but the possibility of a chain of events (in the brain) proceeding from the stage of activated microglia to their apoptosis has been examined by other researchers (Fu et al., 2015). Further microscopic research on phenotypic alterations in microglial cells is necessary to identify their transformation from a resting state (ramified morphology) to active status (amoeboid morphology) (Tan et al., 2020).

In the frontal cortex, a significant influence of each adverse factor and of their statistically significant interaction on the expression of the *Aif1* gene was noted too. In contrast to the hippocampus, in this brain structure, ethanol reduced this parameter, and the combination of the two factors contributed to its increase to the level of control individuals. Evidently, the infectious factor has an effect opposite to that of ethanol, thus increasing the expression of this gene. Immunohistochemistry revealed a statistically significantly greater number of Iba1-positive cells in the cortex in a more distant frontal section (level 74) as compared to the prefrontal region of the brain. Therefore, we can theorize that the observed downregulation of *Aif1* in Eth mice is a compensatory reaction of genes to the large protein amount.

Thus, in our paper, region-specific changes in microglial activity were established in terms of the expression of the *Aif1* gene and of a protein (Iba1) in response to the infectious factor (*O. felineus*), and especially to the toxic factor (ethanol). This result can be explained in accordance with the current understanding of the heterogeneity of microglia in the cell number, morphomolecular signatures, and homeostatic functions in different anatomical structures of the healthy CNS (Tan et al., 2020) and during alcoholic pathologies (He, Crews, 2008). In this regard, our data indicate a possible modifying effect of helminth infection on the expression of the *Aif1* gene, but not its protein, in the hippocampus and cortex. Ethanol had a more pronounced effect on this parameter in both brain structures. Taking into account the interaction of the two factors, we can say that their effects have different directions. Activation of microglia in the cortex under the influence of ethanol was also recorded in terms of the level of the Iba1 protein.

It has been reported that peripheral insults (an LPS or bacterial challenge or ethanol) that cause microglial activa-

tion induce upregulation of proinflammatory cytokines (TNF, IL-1 β , and IL-6) at the protein and/or mRNA level along with engagement of Toll-like receptors (TLR-2 and TLR-4) (Collins, Neafsey, 2012; Fernandez-Lizarbe et al., 2013; Yang et al., 2014; Hoogland et al., 2015). As reported by C. D’Mello and M.G. Swain (2011), cytokines TNF, IL-1 β , and IL-6 are likely to be key promoters of central neural alterations in chronic liver diseases. Accordingly, we next examined changes in expression of three proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF) in response to the adverse factors.

The expression of the *Il1b* gene in the two brain structures under study did not reflect a statistically significant effect of each factor alone, but there was a significant effect when they were combined: the weak expression of this gene in groups OF and Eth increased in Eth+OF mice to the control level. Immunohistochemical analysis of sections of the hippocampus, and especially that of the cerebral cortex, pointed to high levels of this proinflammatory cytokine in mice during the exposure to the two factors, thereby implying neuroinflammation.

We believe that our results on protein and mRNA levels of *Il6* in the hippocampus reflect a variable process associated with the duration of the adverse factors: a change in the amount of the proinflammatory protein was followed by a change in mRNA expression, and these processes seem to be somewhat separated in time. In the cerebral cortex of Eth+OF mice, there was the highest level of IL-6 among all groups of mice, which is explained by the synergy of the two adverse factors. Nonetheless, there were no pronounced differences between the groups in *Il6* expression within this brain structure, and this outcome may be ascribed to regulation by a negative feedback mechanism. Similar dynamics of expression (from unchanged to increased/decreased) of genes responsible for levels of IL-6, IL-1 β , and TNF in the three structures of the rat brain were recorded by other researchers after forced consumption of ethanol by rats (for 6 months) (Nunes et al., 2019). Those authors proposed that the upregulation of some cytokines may mean infiltration of immune cells (T cells in particular) into the brain, and these phenomena are indicative of a severe impairment of the blood-brain barrier especially during the synergism of the two adverse factors. Under such conditions, the delayed changes in the genes’ expression may have a protective/compensatory effect against expansion of neuroinflammatory-cytokine expression in the brain.

In contrast to the other two genes, the combination of the helminth infection and the prolonged ethanol consumption caused underexpression of *Tnf* in the hippocampus of Eth+OF mice; this phenomenon may be a compensatory reaction to the elevated amount of the TNF protein in this brain structure. An even higher level of this protein was detected in the cortex at level 74 of the frontal brain section during ethanol administration, but the *Tnf* mRNA level in the frontal cortex was the same among all the groups of mice.

Thus, three proinflammatory cytokines were found to differ in mRNA or protein expression depending not only on the nature of the adverse factor(s) but also on localization in the brain. The most pronounced variations of the parameters were noticed in the frontal cortex, especially during prolonged ethanol consumption, and to a lesser extent in the hippocampus. It is known that both brain structures in question, especially frontal lobes of the cerebral cortex, are sensitive to alcohol-induced

damage (Fowler et al., 2014). In this regard, the pathogenic effect of alcohol is associated with white matter atrophy, neuroinflammation, and synaptogenesis disturbances, leading to emotional instability and cognitive impairment (Harper, 2009; de la Monte, Kril, 2014). The outcomes observed here – just as previously obtained evidence that inflammation in the liver during the action of the two adverse factors is accompanied by an increase in blood concentrations of monocytes and proinflammatory cytokines (Avgustinovich et al., 2022a) – are thought to contribute to neuroinflammation and may induce changes in central neurotransmission that are manifested in the behavior of animals (D’Mello, Swain, 2011). That is why we performed an extensive analysis of murine behavior, which reflects disturbances in the brain.

Even though PPI was the same among our groups of mice, the animals in the groups consuming 20 % ethanol for a long time (Eth and Eth+OF) did not get accustomed to the administered signals: startle amplitudes of the 1st and 10th signals were the same. In addition, the mice subjected to both adverse factors (Eth+OF) showed the weakest reaction to the first sharp sound signal, but the response increased by the 10th signal. These results mean that the brain of mice consuming ethanol is always ready to respond strongly to repeated harsh sound signals. Considering that the startle reflex is regarded as a behavioral indicator of CNS excitability (Blendov et al., 2019), we can assume permanent high excitability of brain neurons in mice consuming 20 % ethanol.

Throughout almost the whole forced swimming test (on average 252 out of 300 s), mice of the Eth group tried to actively get out of the water, and passive swimming was shorter. In Eth+OF mice, the changes in these parameters were smaller: the differences from groups CON and OF were insignificant. The duration of immobility in this test is regarded as an indicator of depressive-like behavior in rodents and is reduced by known antidepressants (Lucki, 2001). Nonetheless, we believe that the prolonged consumption of 20 % ethanol did not have an antidepressant effect but rather promoted CNS hyperexcitability, which involves an imbalance in the activities of the glutamatergic and GABAergic systems of the brain. It is known that chronic alcohol consumption leads to hyperexcitation of neurons because of downregulation of GABAergic functions as a consequence of pseudo-immaturity in the hippocampus and prefrontal cortex (Murano et al., 2017). A blockade of NMDA receptors and of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway may be involved in the antidepressant-like effect of ethanol in mice (Khan et al., 2021).

The open field test in its various modifications is utilized by researchers to assess many behavioral parameters in rodents: locomotor and exploratory activities, emotionality and anxiety, and a reaction to an unfamiliar object when re-tested (Choleris et al., 2001). Because our aim was, first of all, to assess the sense of smell in the four groups of mice, the unfamiliar smell of peppermint was presented to the mice during the second part of the test, after they were familiarized with the test arena in the first 3 min. New odors are often aversive to rodents, for example, rats avoid the peppermint smell at first exposure (Brown, Willner, 1983). On the other hand, in some studies on mice, investigators have described repeated use of peppermint for treating olfactory impairment (Kim et al., 2019).

In our experiments, mice subjected to prolonged ethanol consumption (group Eth), just as CON mice, quickly identified the unfamiliar odor because their latency period for approaching the tumbler with peppermint diminished. The infectious factor did not affect this parameter in OF mice and had a weak effect on Eth+OF mice, implying disturbances of the sense of smell in these mice. Besides, although the control mice exhibited a pronounced avoidance reaction toward the tumbler with peppermint (as evidenced by the number of approaches or turns to the tumbler), in the other groups of mice, this parameter was less pronounced. This result also points to some anomalies in the sense of smell in mice of the three experimental groups [subjected to an adverse factor(s)]. We believe that the changes in the sense of smell resulting from liver fluke infection and consumption of 20 % ethanol may be associated with aberrations in the CNS. In any case, hyposmia is considered an early symptom of Parkinson’s disease (Chen et al., 2012), which is also associated with neuroinflammation.

During the evaluation of other patterns of behavior in the open field test, it was found here that the 6-month consumption of 20 % ethanol did not have a significant effect on the locomotor and exploratory activities of mice, as evaluated via the number of squares crossed and rearing parameters in the first 3 min of the test. By contrast, these parameters were lower in OF mice. A decrease in these parameters, according to other articles (Henderson et al., 2004; Seibenhener, Wooten, 2015), can be viewed as a manifestation of anxious behavior. Taking this into account, we could say that there is a likely pro-anxiety effect of prolonged *O. felineus* infection on animals.

Conclusion

The presented data are an experimental model of situations often occurring in human society: people with chronic opisthorchiasis – perhaps being unaware of the infection – abuse alcohol or, conversely, by relying on disinfecting properties of ethanol, begin to drink it, sometimes in large amounts, when there is a threat of this infection. Nonetheless, our experimental data indicate that under such circumstances, the liver is not the only organ that receives a double “blow” (the toxic injury plus the infectious one). When chronic alcoholization is combined with prolonged *O. felineus* infection, the brain also receives a double impact: aside from direct entry of ethanol into the CNS through the blood–brain barrier, according to D’Mello and Swain (2011), peripheral proinflammatory signals begin to arrive with the blood, primarily IL-1 β , IL-6, TNF, and monocytes.

Under these conditions, as revealed by two-way ANOVA, there are statistically significant effects of interaction of the two adverse factors on histological and molecular characteristics of microglia and on proinflammatory cytokines, and these effects are brain region-specific. For instance, in the hippocampus, the infectious factor attenuated ethanol-induced *Aif1* overexpression, which reflects the activation of microglia. By contrast, in the frontal cortex, the expression of this gene was low during the prolonged alcoholization and increased to control values in the mice subjected to both factors. During a statistically significant interaction of the factors, this finding indicates that directions of the two impacts are different. It is possible that helminths exert a “corrective” effect here that is designed to preserve the health of the host (at whose expense

they live and reproduce) because excessive activation of microglia can have irreversible neurodegenerative consequences and may ultimately kill the host. Identical directions of the effects of the two factors were noted during quantification of the expression of the *Il1b* gene (in the cortex and hippocampus) and of the *Tnf* gene (in the hippocampus): these effects promoted an increase in the former parameter and a decrease in the latter and may be attributed to the proteins' levels at this stage of the pathology.

In the cortex, high concentrations of cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF were found at levels 72–74 of the frontal brain slices in mice subjected to both factors; this finding implies that the alterations induced in the prefrontal region of the cerebral cortex might be similar. Together with an increase in these parameters in the hippocampus, this finding indicates the development of neuroinflammation.

We believe that the obtained results indicate a variable process that is largely explained by the duration of the stimuli: a change in the amounts of proinflammatory proteins is followed by a change in mRNA expression. Furthermore, these processes are brain region-specific and seem to be somewhat separated temporally. This is because these processes not only are regulated by the activity of brain cells but also depend on the arrival of peripheral proinflammatory signals into the brain. This phenomenon in turn affects the behavior of the animals. Behavioral testing of our mice revealed that ethanol has a stimulatory effect, which manifested itself in two tests reflecting alterations in the regulatory mechanisms of the CNS. In our mice, the behavioral pathology associated with *O. felineus* infection is suggestive of the development of anxiety. It should be pointed out that both factors altered the mice's sense of smell (the infection did so to a greater extent). Mechanisms that counteract these adverse effects remain to be explored. At this stage of the project, we can state only that the combination of the two factors – in addition to the destructive effects on the liver – can affect the brain too, by contributing to the development of neuroinflammation.

References

Adeva M.M., Souto G., Donapetry C., Portals M., Rodriguez A., Lamas D. Brain edema in diseases of different etiology. *Neurochem Int.* 2012;61(2):166-174. doi 10.1016/j.neuint.2012.05.007

Akhmedov V.A., Kritevich M.A. Chronic opisthorchiasis is a multiple-organ pathology. *Vestnik NGU. Seriya: Biologiya, Klinicheskaya Meditsina = Vestnik NSU. Series: Biology and Clinical Medicine.* 2009;7(1):118-121. [https://nsu.ru/xmlui/bitstream/handle/nsu/4344/21.pdf] (in Russian)

Avgustinovich D.F., Marenina M.K., Zhanaeva S.Y., Tenditnik M.V., Katokhin A.V., Pavlov K.S., Sivkov A.Y., Vishnivetskaya G.B., Lvova M.N., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A. Combined effects of social stress and liver fluke infection in a mouse model. *Brain Behav Immun.* 2016;53:262-272. doi 10.1016/j.bbi.2016.01.012

Avgustinovich D., Kovner A., Kashina E., Shatskaya N., Vishnivetskaya G., Bondar N., Lvova M. The pathogenic potential of the combined action of chronic *Opisthorchis felineus* infection and repeated social defeat stress in C57BL/6 mice. *Int J Parasit.* 2021;51:353-363. doi 10.1016/j.ijpara.2020.10.003

Avgustinovich D., Kizimlenko A., Marenina M., Lvova M., Kovner A., Orlovskaya I., Toporkova L., Goiman E., Tsyganov M., Ponomarev D. Prolonged liver fluke infection combined with alcoholization: an experimental mouse model. *Exp Parasitol.* 2022a;242:108399. doi 10.1016/j.exppara.2022.108399

Avgustinovich D.F., Tenditnik M.V., Bondar N.P., Marenina M.K., Zhanaeva S.Y., Lvova M.N., Katokhin A.V., Pavlov K.S., Evseenko V.I., Tolstikova T.G. Behavioral effects and inflammatory markers in the brain and periphery after repeated social defeat stress burdened by *Opisthorchis felineus* infection in mice. *Physiol Behav.* 2022b;252:113846. doi 10.1016/j.physbeh.2022.113846

Bajaj J.S. Alcohol, liver disease and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(4):235-246. doi 10.1038/s41575-018-0099-1

Belzung C. Hippocampal mossy fibres: implication in novelty reactions or in anxiety behaviours? *Behav Brain Res.* 1992;51(2):149-155. doi 10.1016/s0166-4328(05)80208-6

Bernstein D.E., Dickinson G.M., Kim K.-J., Al Karawi M.A., Barkin J.S. Parasitic causes of pancreatic and biliary tract disease: a growing concern in a highly mobile population. *Mil Med.* 1994;159(4):331-338. doi 10.1093/milmed/159.4.331

Bilzer M., Roggel F., Gerbes A.L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006;26(10):1175-1186. doi 10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x

Bishehsari F., Magno E., Swanson G., Desai V., Voigt R.M., Forsyth C.B., Keshavarzian A. Alcohol and gut-derived inflammation. *Alcohol Res.* 2017;38(2):163-171

Blednov Y.A., Bajo M., Roberts A.J., Da Costa A.J., Black M., Edmunds S., Mayfield J., Roberto M., Homanics G.E., Lasek A.W., Hitzemann R.J., Harris R.A. *Scn4b* regulates the hypnotic effects of ethanol and other sedative drugs. *Genes Brain Behav.* 2019;18(6):e12562. doi 10.1111/gbb.12562

Boonpucknavig S., Boonpucknavig V., Tanvanich S., Dounghawee G., Thamavit W. Development of immune-complex glomerulonephritis and amyloidosis in Syrian golden hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *J Med Assoc Thai.* 1992;75(Suppl.1):7-19

Brown R.E., Willner J.A. Establishing an "affective scale" for odor preferences of infant rats. *Behav Neural Biol.* 1983;38(2):251-260. doi 10.1016/s0163-1047(83)90254-6

Butterworth R.F. Role of circulating neurotoxins in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: potential for improvement following their removal by liver assist devices. *Liver Int.* 2003;23(Suppl.3):5-9. doi 10.1034/j.1478-3231.23.s.3.1.x

Bychkov V.G., Solov'eva O.G., Khadieva E.D., Ivanova L.A., Kulikova S.V., Garchuk I.V., Orlov S.A., Sabirov A.Kh., Shilin K.O., Beliaeva M.I. Morphogenesis of the structural changes of the internal organs in superinvasive opisthorchiasis. *Morfologiya = Morphology.* 2011;140(5):22-27 (in Russian)

Chavarria L., Alonso J., Rovira A., Córdoba J. Neuroimaging in acute liver failure. *Neurochem Int.* 2011;59(8):1175-1180. doi 10.1016/j.neuint.2011.09.003

Chen W., Chen S., Kang W.Y., Li B., Xu Z.M., Xiao Q., Liu J., Wang Y., Wang G., Chen S.D. Application of odor identification test in Parkinson's disease in China: a matched case-control study. *J Neurol Sci.* 2012;316(1-2):47-50. doi 10.1016/j.jns.2012.01.033

Choleris E., Thomas A.W., Kavaliers M., Prato F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobeh Rev.* 2001;25(3):235-260. doi 10.1016/s0149-7634(01)00011-2

Collins M.A., Neafsey E.J. Neuroinflammatory pathways in binge alcohol-induced neuronal degeneration: oxidative stress cascade involving aquaporin, brain edema, and phospholipase A2 activation. *Neurotox Res.* 2012;21:70-78. doi 10.1007/s12640-011-9276-5

Collins M.A., Zou J.-Y., Neafsey E.J. Brain damage due to episodic alcohol exposure *in vivo* and *in vitro*: furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism. *FASEB J.* 1998;12(2):221-230. doi 10.1096/fasebj.12.2.221

de la Monte S.M., Kril J.J. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol.* 2014;127(1):71-90. doi 10.1007/s00401-013-1233-3

D'Mello C., Swain M.G. Liver-brain inflammation axis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(5):G749-G761. doi 10.1152/ajpgi.00184.2011

- Fernandez-Lizarbe S., Montesinos J., Guerri C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem*. 2013;126(2):261-273. doi 10.1111/jnc.12276
- Fowler A.K., Thompson J., Chen L., Dagda M., Dertien J., Dossou K.S., Moaddel R., Bergeson S.E., Kruman I.I. Differential sensitivity of prefrontal cortex and hippocampus to alcohol-induced toxicity. *PLoS One*. 2014;9(9):e106945. doi 10.1371/journal.pone.0106945
- Friard O., Gamba M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol Evol*. 2016;7:1325-1330. doi 10.1111/2041-210X.12584
- Fu Y., Yang M.-S., Jiang J., Ganesh T., Joe E., Dingleline R. EP2 receptor signaling regulates microglia death. *Mol Pharmacol*. 2015; 88(1):161-170. doi 10.1124/mol.115.098202
- Geil C.R., Hayes D.M., McClain J.A., Liput D.J., Marshall S.A., Chen K.Y., Nixon K. Alcohol and adult hippocampal neurogenesis: promiscuous drug, wanton effects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014;54:103-113. doi 10.1016/j.pnpbp.2014.05.003
- Gundamaraju R., Vemuri R.C. *Opisthorchis viverrini* (liver fluke) as the lot of baleful parasite of tropical region-A replete synopsis. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014;4(1):61-66. doi 10.1016/S2222-1808(14) 60316-9
- Harper C. The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain? *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998; 57(2):101-110. doi 10.1097/00005072-199802000-00001
- Harper C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol*. 2009;44(2):136-140. doi 10.1093/alcal/agn102
- He J., Crews F.T. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol*. 2008;210(2):349-358. doi 10.1016/j.expneurol.2007.11.017
- Henderson N.D., Turri M.G., DeFries J.C., Flint J. QTL analysis of multiple behavioral measures of anxiety in mice. *Behav Genet*. 2004;34(3):267-293. doi 10.1023/B:BEGE.0000017872.25069.44
- Henriques J.F., Portugal C.C., Canedo T., Relvas J.B., Summavielle T., Socodato R. Microglia and alcohol meet at the crossroads: microglia as critical modulators of alcohol neurotoxicity. *Toxicol Lett*. 2018;283:21-31. doi 10.1016/j.toxlet.2017.11.002
- Hoogland I.C., Houbolt C., van Westerloo D.J., van Gool W.A., van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*. 2015; 12:114. doi 10.1186/s12974-015-0332-6
- Huber V.J., Tsujita M., Yamazaki M., Sakimura K., Nakada T. Identification of arylsulfonamides as Aquaporin 4 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17(5):1270-1273. doi 10.1016/j.bmcl.2006.12.010
- Jayakumar A.R., Tong X.Y., Ospel J., Norenberg M.D. Role of cerebral endothelial cells in the astrocyte swelling and brain edema associated with acute hepatic encephalopathy. *Neuroscience*. 2012;218: 305-316. doi 10.1016/j.neuroscience.2012.05.006
- Ketpueak T., Thiennimitr P., Apaijai N., Chattipakorn S.C., Chattipakorn N. Association of chronic opisthorchis infestation and microbiota alteration on tumorigenesis in cholangiocarcinoma. *Clin Transl Gastroenterol*. 2020;12(1):e00292. doi 10.14309/ctg.00000000000 00292
- Khan M.I., Nikoui V., Naveed A., Mumtaz F., Zaman H., Haider A., Aman W., Wahab A., Khan S.N., Ullah N., Dehpour A.R. Antidepressant-like effect of ethanol in mice forced swimming test is mediated via inhibition of NMDA/nitric oxide/cGMP signaling pathway. *Alcohol*. 2021;92:53-63. doi 10.1016/j.alcohol.2021.01.005
- Kim B.Y., Park J.Y., Kim E.J., Kim B.G., Kim S.W., Kim S.W. The neuroplastic effect of olfactory training to the recovery of olfactory system in mouse model. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(7):715-723. doi 10.1002/alr.22320
- Korbo L. Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999;23(1):164-168. doi 10.1111/j.1530-0277.1999. tb04039.x
- Lowe P.P., Morel C., Ambade A., Iracheta-Vellve A., Kwiatkowski E., Satishchandran A., Furi I., Cho Y., Gyongyosi B., Catalano D., Lefebvre E., Fischer L., Seyedkazemi S., Schafer D.P., Szabo G. Chronic alcohol-induced neuroinflammation involves CCR2/5-dependent peripheral macrophage infiltration and microglia alterations. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):296. doi 10.1186/s12974-020-01972-5
- Lucki I. A prescription to resist proscriptions for murine models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;153(3):395-398. doi 10.1007/s002130000561
- Lvova M., Zhukova M., Kiseleva E., Mayboroda O., Hensbergen P., Kizilova E., Ogienko A., Besprozvannykh V., Sripa B., Katokhin A., Mordvinov V. Hemozoin is a product of heme detoxification in the gut of the most medically important species of the family Opisthorchiidae. *Int J Parasitol*. 2016;46(3):147-156. doi 10.1016/j.ijpara. 2015.12.003
- Lvova M.N., Shevelev O.B., Serdobintseva V.V., Kalinin D.V., Starostenko D.A., Zavjalov E.L., Krivoschapkin A.L., Logachev P.V., Mordvinov V.A., Avgustinovich D.F. Effect of silicon dioxide nanoparticles on Syrian hamsters infected by *Opisthorchis felineus*: ¹H MRS study of the brain. *Dokl Biochem Biophys*. 2020;495(1): 319-324. doi 10.1134/S1607672920060095
- Lvova M.N., Ponomarev D.V., Tarasenko A.A., Kovner A.V., Minkova G.A., Tsyganov M.A., Li M., Lou Y., Evseenko V.I., Dushkin A.V., Sorokina I.V., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A., Avgustinovich D.F. Curcumin and its supramolecular complex with disodium glycyrrhizinate as potential drugs for the liver fluke infection caused by *Opisthorchis felineus*. *Pathogens*. 2023;12(6):819. doi 10.3390/pathogens12060819
- Miller A.H., Maletic V., Raison C.L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*. 2009;65(9):732-741. doi 10.1016/j.biopsych.2008. 11.029
- Mishchenko V.A., Goryukhina O.A., Ilyuk R.D. Changes in the blood-brain barrier during experimental cirrhosis of the liver. *Bull Exp Biol Med*. 1993;116:1547-1550. doi 10.1007/BF00785497
- Mordvinov V.A., Furman D.P. The digenea parasite *Opisthorchis felineus*: a target for the discovery and development of novel drugs. *Infect Disord Drug Targets*. 2010;10(5):385-401. doi 10.2174/1871 52610793180858
- Murano T., Koshimizu H., Hagihara H., Miyakawa T. Transcriptomic immaturity of the hippocampus and prefrontal cortex in patients with alcoholism. *Sci Rep*. 2017;7:44531. doi 10.1038/srep44531
- Norden D.M., Trojanowski P.J., Villanueva E., Navarro E., Godbout J.P. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*. 2016;64(2):300-316. doi 10.1002/glia.22930
- Nunes P.T., Vedder L.C., Deak T., Savage L.M. A pivotal role for thiamine deficiency in the expression of neuroinflammation markers in models of alcohol-related brain damage. *Alcohol Clin Exp Res*. 2019;43(3):425-438. doi 10.1111/acer.13946
- Pakharukova M.Y., Zapparina O.G., Kovner A.V., Mordvinov V.A. Inhibition of *Opisthorchis felineus* glutathione-dependent prostaglandin synthase by resveratrol correlates with attenuation of cholangiocyte neoplasia in a hamster model of opisthorchiasis. *Int J Parasitol*. 2019;49(12):963-973. doi 10.1016/j.ijpara.2019.07.002
- Pakharukova M.Y., Lishai E.A., Zapparina O., Baginskaya N.V., Hong S.J., Sripa B., Mordvinov V.A. *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis felineus* liver flukes affect mammalian host microbiome in a species-specific manner. *Cell Mol Life Sci*. 2023;17(2):e0011111. doi 10.1371/journal.pntd.0011111
- Paylor R., Crawley J.N. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. *Psychopharmacology*. 1997;132:169-180. doi 10.1007/s002130050333
- Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini*. *Int J Parasitol*. 2013;43(12-13):1031-1046. doi 10.1016/j.ijpara.2013.07.007
- Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977;229:327-336

- Rama Rao K.V., Jayakumar A.R., Norenberg M.D. Brain edema in acute liver failure: mechanisms and concepts. *Metab Brain Dis.* 2014;29(4):927-936. doi 10.1007/s11011-014-9502-y
- Ramos A., Mormède P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobeh Rev.* 1998;22(1):33-57. doi 10.1016/s0149-7634(97)00001-8
- Saijuntha W., Sithithaworn P., Petney T.N., Andrews R.H. Foodborne zoonotic parasites of the family Opisthorchiidae. *Res Vet Sci.* 2021; 135:404-411. doi 10.1016/j.rvsc.2020.10.024
- Saltykova I.V., Petrov V.A., Logacheva M.D., Ivanova P.G., Merzlikin N.V., Sazonov A.E., Ogorodova L.M., Brindley P.J. Biliary microbiota, gallstone disease and infection with *Opisthorchis felineus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(7):e0004809. doi 10.1371/journal.pntd.0004809
- Seibenhener M.L., Wooten M.C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015; (96):e52434. doi 10.3791/52434
- Seki E., Schwabe R.F. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology.* 2015;61(3):1066-1079. doi 10.1002/hep.27332
- Silvin A., Ginhoux F. Microglia heterogeneity along a spatio-temporal axis: more questions than answers. *Glia.* 2018;66(10):2045-2057. doi 10.1002/glia.23458
- Simon E., Obst J., Gomez-Nicola D. The evolving dialogue of microglia and neurons in Alzheimer's disease: microglia as necessary transducers of pathology. *Neuroscience.* 2019;405:24-34. doi 10.1016/j.neuroscience.2018.01.059
- Sripa B., Thinkhamrop B., Mairiang E., Laha T., Kaewkes S., Sithithaworn P., Periago M.V., Bhudhisawasdi V., Yonglithipagon P., Mulvenna J., Brindley P.J., Loukas A., Bethony J.M. Elevated plasma IL-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1654. doi 10.1371/journal.pntd.0001654
- Stephens A.S., Stephens S.R., Morrison N.A. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC Res Notes.* 2011;4:410. doi 10.1186/1756-0500-4-410
- Stickel F., Datz C., Hampe J., Bataller R. Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: update 2016. *Gut Liver.* 2017;11(2): 173-188. doi 10.5009/gnl16477
- Tan Y.L., Yuan Y., Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry.* 2020;25:351-367. doi 10.1038/s41380-019-0609-8
- Upadhyay R.K. Stem cell therapeutics of acute liver diseases, transplantation, and regeneration. *J Cell Sci Ther.* 2017;8(4):1000275. doi 10.4172/2157-7013
- Wang T., Chou D.Y., Ding J.Y., Fredrickson V., Peng C., Schafer S., Guthikonda M., Kreipke C., Rafols J.A., Ding Y. Reduction of brain edema and expression of aquaporins with acute ethanol treatment after traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2013;118(2):390-396. doi 10.3171/2012.8.JNS12736
- Yang J.Y., Xue X., Tian H., Wang X.X., Dong Y.X., Wang F., Zhao Y.N., Yao X.C., Cui W., Wu C.F. Role of microglia in ethanol-induced neurodegenerative disease: pathological and behavioral dysfunction at different developmental stages. *Pharmacol Ther.* 2014;144(3): 321-337. doi 10.1016/j.pharmthera.2014.07.002
- Yao H., Zhang D., Yu H., Yuan H., Shen H., Lan X., Liu H., Chen X., Meng F., Wu X., Zhang G., Wang X. Gut microbiota regulates chronic ethanol exposure-induced depressive-like behavior through hippocampal NLRP3-mediated neuroinflammation. *Mol Psychiatry.* 2023;28(2):919-930. doi 10.1038/s41380-022-01841-y

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

Received March 22, 2024. Revised July 22, 2024. Accepted September 2, 2024.

doi 10.18699/vjgb-25-12

The lowest chromosome number in the family Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea): the karyotype and other genetic features of *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875)

V.E. Gokhman ¹ , A.S. Ryabinin ², R.A. Bykov ², Yu.Yu. Ilinsky ^{2,3}

¹ Russian Entomological Society, Moscow, Russia

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

³ Center for Immunology and Cell Biology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

 vegokhman@hotmail.com

Abstract. Various genetic features of the *hitman* strain of the widespread parasitoid of Drosophilidae (Diptera), *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875) (Pteromalidae, Pachyneurinae) were studied. This strain was established and is maintained at the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia). An analysis of air-dried chromosome preparations from prepupae of this parasitoid showed that it has $n = 4$ and $2n = 8$ in males and females, respectively, which is the lowest known chromosome number in the family Pteromalidae. All chromosomes in the karyotype of this species are metacentric. The first and second chromosomes are of similar size, the remaining ones are substantially shorter. The same results were obtained for an additional strain of this species kept at the Moscow State University (Moscow, Russia). A comparison of the DNA sequence of the barcoding region of the mitochondrial cytochrome c oxidase (*COI*) gene of the *hitman* strain of *P. vindemmiae* with those available from the GenBank and BoLD databases demonstrated that this strain clustered together with conspecifics originating from China, Turkey and Italy. Despite certain endosymbionts being previously reported for the genus *Pachycrepoideus* Ashmead, 1904 as well as for *P. vindemmiae* itself, the *hitman* strain turned out to be free of endosymbiotic bacteria in the genera *Arsenophonus* Gherna et al., 1991, *Cardinium* Zchori-Fein et al., 2004, *Rickettsia* da Rocha-Lima, 1916, *Spiroplasma* Saglio et al., 1973 and *Wolbachia* Hertig, 1936. The above-mentioned results improve our knowledge of various genetic features of parasitoids of the family Pteromalidae and those of *P. vindemmiae* in particular.

Key words: Hymenoptera; Pteromalidae; parasitoids; chromosomes; karyotype; DNA barcoding; endosymbionts.

For citation: Gokhman V.E., Ryabinin A.S., Bykov R.A., Ilinsky Yu.Yu. The lowest chromosome number in the family Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea): the karyotype and other genetic features of *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(1):108-112. doi 10.18699/vjgb-25-12

Acknowledgements. The authors are grateful to Ivan V. Zenin (Department of Evolutionary Theory, Moscow State University) for providing additional living material for the present study, as well as to Ekaterina V. Tselikh (Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia) for identifying the parasitoids. We thank the Insect Collection of the Federal Research Center "Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences" (supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education, project FWNR-2022-0019), which hosts the *hitman* strain of *P. vindemmiae*.

Наименьшее число хромосом в семействе Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea): кариотип и другие генетические особенности *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875)

В.Е. Гохман ¹ , А.С. Рябинин ², Р.А. Быков ², Ю.Ю. Илинский ^{2,3}

¹ Русское энтомологическое общество, Москва, Россия

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

³ Центр иммунологии и клеточной биологии, Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия

 vegokhman@hotmail.com

Аннотация. Изучены различные генетические особенности культуры *hitman* широко распространенного паразитоида Drosophilidae (Diptera) *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875) (Pteromalidae, Pachyneurinae), созданной и поддерживаемой в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск, Россия). Анализ высушенных на воздухе хромосомных препаратов, полученных из предкуколки, показывает, что число хромосом для самцов и самок этого наездника составляет $n = 4$ и $2n = 8$ соответственно; это наименьшее из известных для семейства Pteromalidae. Все хромосомы в кариотипе данного вида являются метацентриками. Первая и вторая хромосомы близки по размерам, остальные существенно короче. Такие же ре-

зультаты получены еще для одной культуры этого вида, содержащейся в Московском государственном университете (Россия). Сравнение последовательности ДНК баркодинг-участка, т. е. митохондриального гена цитохром с-оксидазы (*COI*) культуры *hitman P. vindemmiae*, с информацией, доступной в базах данных GenBank и BoLD, показало, что эта культура кластеризуется с конспецифичными особями, происходящими из Китая, Турции и Италии. Хотя некоторые эндосимбионты ранее указывались как для рода *Pachycrepoideus* Ashmead, 1904, так и для самого *P. vindemmiae*, оказалось, что культура *hitman* свободна от эндосимбиотических бактерий, принадлежащих к родам *Arsenophonus* Gherna et al., 1991, *Cardinium* Zchori-Fein et al., 2004, *Rickettsia* da Rocha-Lima, 1916, *Spiroplasma* Saglio et al., 1973 и *Wolbachia* Hertig, 1936. Вышеприведенные данные пополняют наши знания о различных генетических особенностях наездников семейства Pteromalidae, и в частности *P. vindemmiae*.

Ключевые слова: Hymenoptera; Pteromalidae; наездники; хромосомы; кариотип; ДНК-баркодинг; эндосимбионты.

Introduction

Parasitoid Hymenoptera are one of the most species-rich, taxonomically complicated and economically important groups of insects (Bebber et al., 2014; Forbes et al., 2018). In particular, the superfamily Chalcidoidea, with its exceptionally high morphological and ecological diversity, contains more than 27 thousand known species (Cruaud et al., 2024). Until recently, Pteromalidae represented the second largest family of Chalcidoidea with about four thousand members, but now it is subdivided into several smaller families (Huber, 2017; Burks et al., 2022). Nevertheless, karyotypes of less than twenty species of Pteromalidae s. l. have been studied up to now (Gokhman, 2024), as opposed to about 230 members of other Chalcidoidea (Gokhman, 2009, 2020). Among other Pteromalidae s. str. (hence Pteromalidae), we have recently studied the karyotype of a widespread parasitoid of Drosophilidae (Diptera), *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875), using routine staining and morphometric analysis of chromosomes.

To ensure the precise identification of this species, which is of considerable interest as an effective agent of biological control (see, e. g., Bezerra Da Silva et al., 2019), we sequenced the barcoding region of the mitochondrial cytochrome c oxidase (*COI*) gene of the same strain. In addition, many chalcids harbor maternally inherited bacterial endosymbionts that can cause various cytogenetic effects, for example, diploid thelytoky (Werren et al., 2008; Gokhman, Kuznetsova, 2018), which, in turn, can promote rapid fixation of chromosomal mutations. Specifically, these endosymbionts belong to the genera *Arsenophonus* Gherna et al., 1991, *Cardinium* Zchori-Fein et al., 2004, *Rickettsia* da Rocha-Lima, 1916, *Spiroplasma* Saglio et al., 1973 and *Wolbachia* Hertig, 1936 (Gavotte et al., 2007; Werren et al., 2008; Duron et al., 2010; Pilgrim et al., 2021; Nadal-Jimenez et al., 2023). Since the karyotype discovered in *P. vindemmiae* turned to be fairly aberrant for Pteromalidae (Gokhman, 2024) (see below), we have therefore conducted an additional study aimed at testing for the presence of various endosymbionts in the above-mentioned strain.

Material and methods

Origin of insects. The *hitman* strain of *P. vindemmiae* has been maintained in the Laboratory of Molecular Genetics of Insects (Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia) since 2018. It is reared on *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae) under 19–22 °C and 60 ± 10 % humidity. The founder specimens of the strain were

isolated by Dr. Sophia N. Panteleeva (Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia) from *D. melanogaster* pupae that were exposed at the Novosibirsk Arboretum in 2018. This strain can also be developed in the laboratory on *Drosophila virilis* Sturtevant, 1916 and *D. mercatorum* Patterson et Wheeler, 1942. For the karyotypic study, a few additional individuals were used from the laboratory stock kept at the Department of Evolutionary Theory (Moscow State University, Russia).

Karyotypic study. Chromosomal preparations were obtained from cerebral ganglia of seven male and four female parasitoid prepupae generally following the protocol developed by Imai et al. (1988) with certain modifications. Ganglia were extracted from insects dissected in 0.5 % hypotonic sodium citrate solution containing 0.005 % colchicine. The extracted ganglia were then transferred to a fresh portion of hypotonic solution and incubated for 30 min at room temperature. The material was transferred onto a pre-cleaned microscope slide using a Pasteur pipette and then gently flushed with Fixative I (glacial acetic acid : absolute ethanol : distilled water 3:3:4). The tissues were disrupted using dissecting needles in an additional drop of Fixative I. A drop of Fixative II (glacial acetic acid : absolute ethanol 1:1) was applied to the center of the area, and the more aqueous phase was blotted off the edges of the slide. The same procedure was performed with Fixative III (glacial acetic acid). The slides were then dried for approximately half an hour and stored at room temperature. Chromosome preparations were stained overnight with freshly prepared 3 % Giemsa solution.

Metaphase plates were analyzed under a Zeiss Axioskop 40 FL epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany). Images of chromosomes from 21 haploid and 31 diploid mitotic divisions were taken with Zeiss AxioCam 208 digital camera using ZEN software version 3.0. To prepare illustrations, the resulting images were arranged and enhanced with GIMP 2.10. KaryoType software version 2.0 was also used for taking chromosome measurements from five diploid metaphase plates of good quality. The chromosomes were classified following the guidelines provided by Levan et al. (1964).

Molecular study. For barcoding and screening for endosymbionts, DNA was extracted from at least five pooled specimens. During 2018–2024, the *hitman* strain was tested four times for maternally inherited endosymbionts in conjunction with replacements of the host strains.

Parasitoid specimens were homogenized in 200 µl extraction buffer (0.1M NaCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.0), 25 mM

Table 1. Primers used in this study

Primers	Target genes	Sequences (5'–3')	References
LCO1490	<i>COI</i>	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al., 1994
HCO2198		TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	
ArsF1	<i>Arsenophonus</i> , 16S rDNA	GGGTGTAAAGTACTTTTCAGTCGT	Duron et al., 2008
ArsR2		GTAGCCCTCTCGTAAGGGCC	
Car281F	<i>Cardinium</i> , 16S rDNA	GGTAGGGGTTCTTAGTGGAAG	Brown et al., 2018
Car269R		TGCTCCCCACGCTTTCGTG	
gyrB859F	<i>Cardinium</i> , <i>gyrB</i>	ATGCAYGTAACGGGDTTTAAAAG	Tarlachkov et al., 2023
gyrB1498R		CATAATYACAATTTTATGGTAMCG	
glt1	<i>Rickettsia</i> , <i>gltA</i> (1st round)	GATTGCTTTACTTACGACCC	Igolkina et al., 2015
glt2		TGCATTTCTTCCATTGTGC	
glt3	<i>Rickettsia</i> , <i>gltA</i> (2nd round)	TATAGACGGTGATAAAGGAATC	
glt4		CAGAACTACCGATTCTTTAAGC	
SpiF1	<i>Spiroplasma</i> , 16S rDNA	GGGTGAGTAACACGTATCT	Sanada-Morimura et al., 2013
SpiR3		CCTTCCTCTAGCTTACACTA	
ftsZunif1	<i>Wolbachia</i> , <i>ftsZ</i> (1st round)	GGYAARGGTGCRGCAGAAGA	Lo et al., 2002
ftsZunif2		ATCRATRCCAGTTGCAAG	
ftsZ_F1	<i>Wolbachia</i> , <i>ftsZ</i> (2nd round)	TYATGGARCATATAAARGATAG	Baldo et al., 2006
ftsZ_R1		TCRAGYAATGGATTRGATAT	

EDTA, 0.5 % SDS) and incubated at 56 °C for an hour. DNA was then salted out with 100 µl 5M potassium acetate/3M acetic acid with further precipitation and dissolution in 100 µl double-distilled water. All PCRs were carried out in 20 µl mix containing chemicals from the Biomaster HS-Taq PCR kit (Biolabmix, Russia), together with a specific primer set and genomic DNA, with the following cycling conditions: an initial denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles at 95 °C – 15 sec, 53 °C – 1 min for *COI* and *Spiroplasma*, 55 °C – 30 sec for *Cardinium* and 40 sec for *Arsenophonus* and nested PCRs followed by elongation at 72 °C – 40 sec, and a final elongation at 72 °C for 2 min. The presence of *Rickettsia* and *Wolbachia* was checked by nested PCR, with 15 cycles for the first round and 25 cycles for the second round; 1 µl of the reaction volume from the first round was used in the second one. Primers used in this study are listed in Table 1. The amplicon was purified with exonuclease (ExoI) (New England Biolabs, USA), and sequenced using the BrilliantDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (NimaGen, The Netherlands). The sequence of the *COI* gene was deposited in GenBank under accession number PP727399.

We retrieved all sequences of the barcoding fragment of the *COI* gene deposited under the name of *P. vindemmiae* in the Barcode of Life Database (BoLD) (Ratnasingham, Hebert, 2007) and GenBank. Using BLAST nucleotide search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), we also found *COI* gene sequences for a few other species with the highest similarity with those of *P. vindemmiae*. These sequences were also included into the analysis. The maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of the *COI* gene was reconstructed using MEGA6 software (Tamura et al., 2013) under the General Time Reversible model as the best fit and bootstrapping at 1,000 iterations.

Results

The haploid karyotype of *P. vindemmiae* harbors four meta-centric chromosomes ($n = 4$), although the first chromosome is close to a submetacentric one (Fig. 1a, Table 2). The second metacentric chromosome is similar in length to the first one, the remaining chromosomes are distinctly shorter. Conse-



Fig. 1. Karyograms of *P. vindemmiae*: a – male (haploid), b – female (diploid).

Bar = 10 µm.

Table 2. Relative lengths (RLs) and centromeric indices (CIs) of *P. vindemmiae* chromosomes (mean ± SD)

Chromosome no.	RL	CI
1	29.77 ± 0.48	41.07 ± 3.94
2	28.52 ± 0.87	41.76 ± 3.40
3	22.86 ± 0.37	40.94 ± 1.37
4	18.85 ± 0.77	44.11 ± 2.81

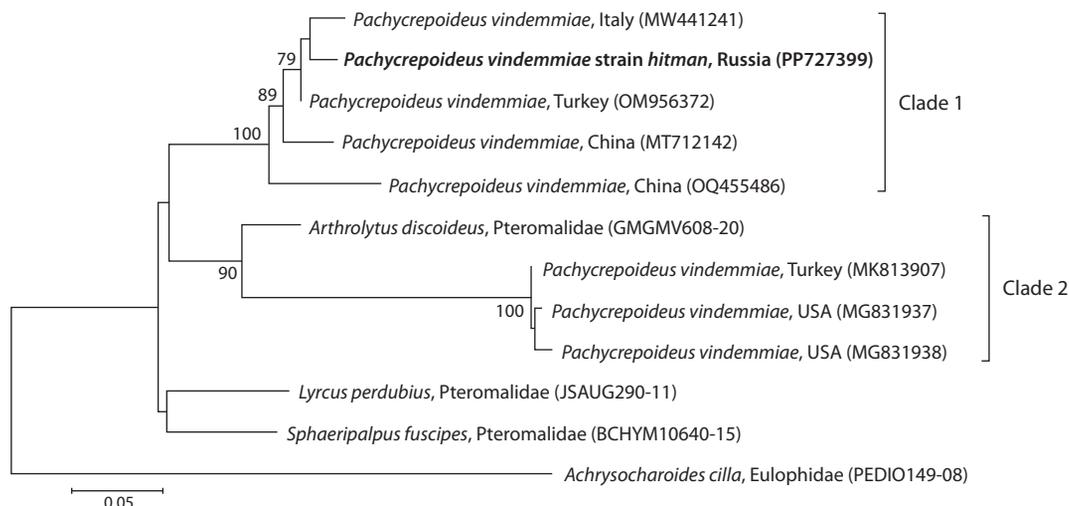


Fig. 2. The maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of *Pachycrepoideus COI* mitochondrial DNA sequences (577 bp region) reconstructed with the GTR+G model.

GenBank and/or BoLD accession numbers as well as origins of samples are indicated. The *hitman* strain indicated in bold. *COI* sequences of *Arthrolytus discoideus* (Nees, 1834) (Pteromalidae), *Achrysocharoides cilla* (Walker, 1839) (Eulophidae), as well as *Lycrus perdubius* (Girault, 1916) and *Sphaeripalpus fuscipes* (Walker, 1833) (Pteromalidae) were used as outgroups. Bootstrap values higher than 75 (1,000 iterations) are indicated. The scale bar denotes the number of substitutions per site.

quently, the diploid karyotype of this species contains eight chromosomes ($2n = 8$) (Fig. 1b). No obvious chromosomal difference was detected between the strains from Novosibirsk and Moscow.

We sequenced 652 bp of the mitochondrial *COI* gene of the *hitman* strain and reconstructed the ML phylogenetic tree, which included all annotated sequences available for *P. vindemmiae* (Fig. 2). There are two clades on the ML phylogenetic tree, in which the *hitman* strain is clustered with conspecifics from China, Turkey and Italy (Clade 1), while another cluster is formed by two strains from the USA as well as by another one from Turkey (Clade 2). However, the latter clade also turned out to include *Arthrolytus discoideus* (Nees, 1834) (Pteromalidae, Pteromalinae). We did not find any molecular evidence for the presence of any checked endosymbiont, i. e., *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* and *Wolbachia*.

Discussion

Among other members of Pteromalidae s. l., $n = 4$ was reported only for *Spalangia endius* Walker, 1839 (Spalangiidae) from Thailand (Kitthawee, Vasinpiyamongkol, 2002). However, the same chromosome number found in *P. vindemmiae* represents the lowest n value known for the family Pteromalidae (Gokhman, 2024), with other members of the family having $n = 5-7$. The most frequent chromosome number, which is characteristic of most species of Pteromalidae, is $n = 5$ (Gokhman, 2024). Although it is unclear at present which n value can be considered ancestral for the family, this is almost certainly not $n = 4$, i. e., the chromosome number found in *P. vindemmiae*. Moreover, the latter species and all other Pteromalidae with known karyotypes belong to the subfamilies Pachyneurinae and Pteromalinae respectively (Burks et al., 2022). It is therefore not surprising that *P. vindemmiae* demonstrates deviating chromosomal characters. Moreover, strong behavioral and molecular differences between this

species and many other Pteromalidae were already noted by previous authors (van den Assem, 1974; Huang et al., 2023).

Taking into account the large genetic distance between Clades 1 and 2, we suggest that the latter clade does not actually belong to *P. vindemmiae*. Indeed, according to the available data, studied samples of *P. vindemmiae* that belong to the second clade appear to be more closely related to *Arthrolytus discoideus* than to the strains of Clade 1 of *P. vindemmiae* (Fig. 2). However, the pteromalid genera *Arthrolytus* Thomson, 1878 and *Pachycrepoideus* Ashmead, 1904 belong to different subfamilies (see above), and therefore identifications of these samples of *P. vindemmiae* may well be wrong.

Maternally inherited endosymbionts are constantly transferred to the offspring, and therefore they can be effectively considered facultative components of the host genome. Currently, *Arsenophonus* remains the only endosymbiont genus detected in *P. vindemmiae* (Duron et al., 2010; Nadal-Jimenez et al., 2023). Moreover, *Wolbachia* and *Rickettsia* were also previously reported for the genus *Pachycrepoideus* (Gavotte et al., 2007; Pilgrim et al., 2021). However, the *hitman* strain appears to be free from all these endosymbionts. Since we have recurrently checked this strain for any endosymbiotic microorganisms for a few years starting from 2018 (see above), we can assume that the *hitman* strain was neither initially infected with these endosymbionts nor obtained them via different hosts in the process of rearing.

Conclusions

Chromosome preparations from prepupae of *Pachycrepoideus vindemmiae* showed that it has $n = 4$ and $2n = 8$ in males and females, respectively, which are the lowest known chromosome numbers in the family Pteromalidae. A comparison of the DNA sequence of the *COI* barcoding region of the *hitman* strain of *P. vindemmiae* demonstrated that this strain clustered together with conspecifics originating from China, Turkey and Italy. The *hitman* strain turned out to be free of endosymbiotic

bacteria in the genera *Arsenophonus*, *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* and *Wolbachia*. These results improve our knowledge of various genetic features of parasitoids of the family Pteromalidae and those of *P. vindemmiae* in particular.

References

- Baldo L., Dunning Hotopp J.C., Jolley K.A., Bordenstein S.R., Biber S.A., Choudhury R.R., Hayashi C., Martin M.C.J., Tettelin H., Werren J.H. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(11):7098-7110. doi 10.1128/aem.00731-06
- Bebber D.P., Polaszek A., Wood J.R.I., Barker C., Scotland R.W. Taxonomic capacity and author inflation. *New Phytol.* 2014;202:741-742. doi 10.1111/nph.12745
- Bezerra Da Silva C.S., Price B.E., Soohoo-Hui A., Walton V.M. Factors affecting the biology of *Pachycrepoideus vindemmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of spotted-wing drosophila (*Drosophila suzukii*). *PLoS One.* 2019;14(7). doi 10.1371/journal.pone.0218301
- Brown A.M.V., Wasala S.K., Howe D.K., Peetz A.B., Zasada I.A., Denver D.R. Comparative genomics of *Wolbachia-Cardinium* dual endosymbiosis in a plant-parasitic nematode. *Front Microbiol.* 2018;9. doi 10.3389/fmicb.2018.02482
- Burks R., Mitroiu M.-D., Fusu L., Heraty J.M., Janšta P., Heydon S., Dale-Skey Papilloud N., Peters R.S., Tselikh E.V., Woolley J.B., van Noort S., Baur H., Cruaud A., Darling C., Haas M., Hanson P., Krogmann L., Rasplus J.Y. From hell's heart I stab at thee! A determined approach towards a monophyletic Pteromalidae and reclassification of Chalcidoidea (Hymenoptera). *J Hymenopt Res.* 2022;94:13-88. doi 10.3897/jhr.94.94263
- Cruaud A., Rasplus J.-Y., Zhang J., Burks R., Delvare G., Fusu L., Gumbovsky A., Huber J.T., Janšta P., Mitroiu M.-D., Noyes J.S., van Noort S., Baker A., Böhmová J., Baur H., Blaimer B.B., Brady S.G., Bubeniková K., Charois M., Copeland R.S., Dale-Skey Papilloud N., Dal Molin A., Dominguez C., Gebiola M., Guerrieri E., Kresslein R.L., Krogmann L., Lemmon E., Murray E.A., Nidelet S., Nieves-Aldrey J.L., Perry R.K., Peters R.S., Polaszek A., Sauné L., Torrén J., Triapitsyn S., Tselikh E.V., Yoder M., Lemmon A.R., Woolley J.B., Heraty J.M. The Chalcidoidea bush of life: evolutionary history of a massive radiation of minute wasps. *Cladistics.* 2024;40:34-63. doi 10.1111/cla.12561
- Duron O., Bouchon D., Boutin S., Bellamy L., Zhou L., Engelstädter J., Hurst G.D. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.* 2008;6:27. doi 10.1186/1741-7007-6-27
- Duron O., Wilkes T.E., Hurst G.D. Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale. *Ecol Lett.* 2010;13(9): 1139-1148. doi 10.1111/j.1461-0248.2010.01502.x
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994;3(5):294-299.
- Forbes A.A., Bagley R.K., Beer M.A., Hippee A.C., Widmayer H.A. Quantifying the unquantifiable: why Hymenoptera, not Coleoptera, is the most speciose animal order. *BMC Ecol.* 2018;18:21. doi 10.1186/s12898-018-0176-x
- Gavotte L., Henr H., Stouthamer R., Charif D., Charlat S., Boulétreau M., Vavre F. A survey of the bacteriophage WO in the endosymbiotic bacteria *Wolbachia*. *Mol Biol Evol.* 2007;24(2):427-435. doi 10.1093/molbev/msl171
- Gokhman V.E. Karyotypes of Parasitic Hymenoptera. Dordrecht: Springer, 2009. doi 10.1007/978-1-4020-9807-9
- Gokhman V.E. Chromosomes of parasitic wasps of the superfamily Chalcidoidea (Hymenoptera): an overview. *Comp Cytogenet.* 2020; 14:399-416. doi 10.3897/compcytogen.v14i3.56535
- Gokhman V.E. Comparative cytogenetics of the families Pteromalidae and Spalangidae – a review. *Entomol Exp Appl.* 2024;172:467-471. doi 10.1111/eea.13406
- Gokhman V.E., Kuznetsova V.G. Parthenogenesis in Hexapoda: holometabolous insects. *J Zool Syst Evol Res.* 2018;56(1):23-34. doi 10.1111/jzs.12183
- Huang Y., Yang Y., Qi L., Hu H., Rasplus J.-Y., Wang X. Novel gene rearrangement pattern in *Pachycrepoideus vindemmiae* mitochondrial genome: new gene order in Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Animals.* 2023;13(12):1985. doi 10.3390/ani13121985
- Huber J.T. Biodiversity of Hymenoptera. Footitt R.G., Adler P.H. (Eds) Insect Biodiversity: Science and Society. 2nd ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2017;419-461
- Igolkina Y.P., Rar V.A., Yakimenko V.V., Malkova M.G., Tancev A.K., Tikunov A.Y., Epikhina T.I., Tikunova N.V. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus/Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: identification of a new *Candidatus Rickettsia* species. *Infect Genet Evol.* 2015;34:88-93. doi 10.1016/j.meegid.2015.07.015
- Imai H.T., Taylor R.W., Crosland M.W.J., Crozier R.H. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Jpn J Genet.* 1988;63:159-185. doi 10.1266/jgg.63.159
- Kitthawee S., Vasinpiyamongkol L. Mitotic karyotype of *Spalangia endius* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae), a pupal parasitoid of tephritid flies (Diptera: Tephritidae) in Thailand. *Cytologia.* 2002; 67:435-438. doi 10.1508/cytologia.67.435
- Levan A., Fredga K., Sandberg A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.* 1964;52:201-220. doi 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Lo N., Casiraghi M., Salati E., Bazzocchi C., Bandi C. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol.* 2002;19(3):341-346. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004087
- Nadal-Jimenez P., Parratt S.R., Siozios S., Hurst G.D. Isolation, culture and characterization of *Arsenophonus* symbionts from two insect species reveal loss of infectious transmission and extended host range. *Front Microbiol.* 2023;14:1089143. doi 10.3389/fmicb.2023.1089143
- Pilgrim J., Thongpreem P., Davison H.R., Siozios S., Baylis M., Zakharov E.V., Ratnasingham S., deWaard J.R., Macadam C.R., Smith M.A., Hurst G.D. *Torix Rickettsia* are widespread in arthropods and reflect a neglected symbiosis. *GigaScience.* 2021;10(3):giab021. doi 10.1093/gigascience/giab021
- Ratnasingham S., Hebert P.D. BoLD: the barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes.* 2007;7(3):355-364. doi 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x
- Sanada-Morimura S., Matsumura M., Noda H. Male killing caused by a *Spiroplasma* symbiont in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *J Hered.* 2013;104(6):821-829. doi 10.1093/jhered/est052
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-2729. doi 10.1093/molbev/mst197
- Tarlachkov S.V., Efeykin B.D., Castillo P., Evtushenko L.I., Subbotin S.A. Distribution of bacterial endosymbionts of the *Cardinium* clade in plant-parasitic nematodes. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3): ijms24032905. doi 10.3390/ijms24032905
- van den Assem J. Male courtship patterns and female receptivity signal of Pteromalinae (Hym., Pteromalidae), with a consideration of some evolutionary trends and a comment on the taxonomic position of *Pachycrepoideus vindemmiae*. *Neth J Zool.* 1974;24:253-278. doi 10.1163/002829674x00066
- Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(10):741-751. doi 10.1038/nrmicro1969

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

Received June 28, 2024. Revised October 2, 2024. Accepted October 3, 2024.

doi 10.18699/vjgb-25-13

Генетическая характеристика лошадей местных пород по локусам микросателлитов ДНК

Н.В. Блохина  , Л.А. Храброва 

Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства, пос. Дивово, Рыбновский район, Рязанская область, Россия

 nbloh16@yandex.ru

Аннотация. Россия обладает значительным породным разнообразием конских пород с уникальными генофондами, которые хорошо адаптированы к самым разнообразным суровым природно-климатическим условиям, характеризуются универсальной работоспособностью, высокими продуктивными качествами и представляют существенный интерес для мирового коневодства. Генетические исследования популяционного разнообразия в коневодстве являются весьма актуальными, так как многие отечественные породы лошадей находятся под угрозой исчезновения. Для исследований были отобраны биоматериалы (волосы, кровь, сперма) от лошадей 15 местных пород, разводимых в России и сопредельных странах. Выборка включала 2193 лошади алтайской ($n = 48$), башкирской ($n = 130$), бурятской ($n = 30$), вятской ($n = 220$), забайкальской ($n = 34$), кыргызской ($n = 100$), мезенской ($n = 148$), мугалжарской ($n = 109$), новоалтайской ($n = 514$), печорской ($n = 31$), шетлендских пони ($n = 47$), приобской ($n = 85$), тувинской ($n = 600$), хакасской ($n = 47$) и якутской ($n = 50$) пород. При проведении генетико-популяционного анализа использовали следующие показатели: общее количество вариантов аллелей (N_a) в 17 микросателлитных локусах, уровень полиморфности (A_e), среднее число аллелей на локус (N_v), наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность, коэффициенты генетического сходства и генетических дистанций, коэффициент внутривидового инбридинга (F_{is}). Современные местные породы лошадей даже при сравнительно небольшой численности имеют высокий уровень биоразнообразия и своеобразную генетическую структуру, часто с наличием частных аллелей, которая сохраняется несмотря на периодическое скрещивание с заводскими породами разной специализации. Установлено, что лошади местных пород обладают рядом уникальных аллелей, включая *ASB2T*, *HMS7S*, *HMS6J*, *HMS6H*, *HMS2T*, *HMS1O*, *HTG7L*, *HTG6L*, *HTG6H*, *VHL20S*, *ASB17Z*, *ASB17X*, *ASB17U*, *LEX3S*, *LEX3R* и *CA425E*, которые не выявлены у представителей заводских пород в изученных европейских популяциях. Для большинства изученных пород было характерно отрицательное значение F_{is} и отсутствие внутривидового инбридинга. Коэффициенты генетического сходства местных пород менялись в сравнительно широком диапазоне (0.828–0.973) и свидетельствовали об уникальности генофондов большинства местных конских пород в России, а также подтверждали общность происхождения кыргызской лошади с популяциями лошадей Южной Сибири.

Ключевые слова: *Equus caballus*; генетическое разнообразие; микросателлиты ДНК; местные породы; лошадь.

Для цитирования: Блохина Н.В., Храброва Л.А. Генетическая характеристика лошадей местных пород по локусам микросателлитов ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):113-121. doi 10.18699/vjgb-25-13

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1037 (внутренний № 15.БПК.21.0001).

Благодарности. Авторы выражают глубокую благодарность и признательность сотрудникам лаборатории генетики и отдела селекции ВНИИ коневодства, а также регистраторам пород и специалистам по коневодству разных хозяйств.

Genetic characteristics of local horse breeds by microsatellite DNA loci

N.V. Blohina  , L.A. Khrabrova 

All-Russian Research Institute of Horse Breeding, Divovo, Rybnovsky district, Rязан region, Russia

 nbloh16@yandex.ru

Abstract. Russia has a significant pedigree diversity of horse breeds with unique gene pools that are well adapted to a wide variety of harsh natural and climatic conditions, are characterized by universal performance and high productive qualities, and are of significant interest to the world horse breeding. Genetic studies of population diversity in horse breeding are very relevant, since many domestic horse breeds are under threat of extinction. Biomaterials (hair, blood, semen) from horses of 15 local breeds bred in the Russian Federation and neighboring countries (CIS) were selected for

the research. The sample included 2,193 horses, including: Altaiskaya ($n = 48$), Bashkirskaya ($n = 130$), Buryatskaya ($n = 30$), Vyatskaya ($n = 220$), Zabaikalskaya ($n = 34$), Kyrgyzskaya ($n = 100$), Mezenskaya ($n = 148$), Mugalzharskaya ($n = 109$), Novoaltaiskaya ($n = 514$), Pechorskaya ($n = 31$), Shetland pony ($n = 47$), Priobskaya ($n = 85$), Tuvinskaya ($n = 600$), Khakas-kaya ($n = 47$) and Yakutskaya ($n = 50$) breeds. The following indicators were used in the genetic and population analysis: the total number of allele variants (N_a) in 17 microsatellite loci, the level of polymorphism (A_e), the average number of alleles per locus (N_v), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, coefficients of genetic similarity and genetic distances, as well as the coefficient of intrapopulation inbreeding (F_{is}). Modern local horse breeds, even relatively small in number, have a high level of biodiversity and a peculiar genetic structure, often with the presence of private alleles, which persists despite periodic crossing with stud breeds of different specializations. It was found that horses of local breeds possess a number of unique alleles, including *ASB2T*, *HMS7S*, *HMS6J*, *HMS6H*, *HMS2T*, *HMS1O*, *HTG7L*, *HTG6L*, *HTG6H*, *VHL20S*, *ASB17Z*, *ASB17X*, *ASB17U*, *LEX3S*, *LEX3R* and *CA425E*, which were not detected in representatives of stud breeds in the studied European populations. The majority of the studied breeds were characterized by a negative F_{is} value and the absence of inbreeding. The coefficients of genetic similarity of local breeds varied in a relatively wide range (0.828–0.973) and testified to the uniqueness of the gene pools of most local horse breeds of the Russian Federation, as well as confirmed the common origin of the Kyrgyzskaya horse with the horse populations of Southern Siberia.

Key words: *Equus caballus*; genetic diversity; DNA microsatellites; local breeds; horse.

For citation: Blohina N.V., Khrabrova L.A. Genetic characteristics of local horse breeds by microsatellite DNA loci. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):113-121. doi 10.18699/vjgb-25-13

Введение

До начала прошлого века коневодство занимало особое место в экономике и сельскохозяйственном производстве России и многих других государств. Лошадь не только была символом мощи и престижа страны, но и спасала народы в трудные времена истории. Однако в середине XX в. с развитием механизации в сельском хозяйстве, транспорте, армии и индустрии подход к использованию лошадей изменился и численность лошадей резко сократилась, но затем стабилизировалась и даже начала возрастать во многих странах. Сейчас лошади играют важную роль в туризме, спорте, ипподромном бизнесе, а также в производстве продуктов питания (молоко, кумыс, мясо). Наблюдаемая обобщенная тенденция увеличения производства конины (Askarov et al., 2020) объясняется высокими диетическими свойствами мяса лошадей. Конина легко усваивается, практически не содержит аллергических аминокислот и поэтому считается ценным диетическим продуктом (Stanislawczyk et al., 2020).

Мировая практика показывает, что при сокращении затрат на племенную работу продуктивность скота снижается, и в конечном счете разведение животных становится убыточным. Оценка генетического разнообразия внутри отдельных породных популяций и целых пород позволяет создавать и совершенствовать как селекционные планы, так и программы по сохранению генофонда этих пород (Марзанов и др., 2010; Калашникова и др., 2022). В нашей стране местные породы лошадей составляют более 50 % всего конского поголовья. Их разведение обеспечивает занятость населения, производство животноводческой продукции, сохранение культурных традиций и освоение новых территорий.

В настоящее время в реестр селекционных достижений России включены 47 пород лошадей, в том числе 20 местных и созданных на их основе продуктивных пород, которые распространены преимущественно в регионах с суровыми климатическими условиями (рис. 1).

Эволюция местных пород лошадей происходила в основном под воздействием естественного отбора с использованием методов народной селекции, что сформировало

высокую приспособленность животных к условиям окружающей среды. Значительную часть аборигенных пород систематически улучшали скрещиванием с различными заводскими породами с целью получения более крупных особей для сельского хозяйства и увеличения производства конины. В наши дни ценность местных пород возрастает, так как они являются основой отрасли продуктивного коневодства (Askarov et al., 2020). В результате скрещивания лошадей местных пород с заводскими, в основном тяжелоупряжными, удалось добиться увеличения крупности аборигенных лошадей при сохранении их типа и хозяйственно полезных качеств. Однако начиная с конца прошлого века и по настоящее время целенаправленная племенная работа со многими местными породами отсутствует, племенной учет налажен практически только для мезенской, вятской, башкирской и калмыцкой пород.

Бесконтрольное скрещивание ведет к изменению типа и чистых исходных аборигенных форм лошадей большинства местных пород, что в дальнейшем может привести к исчезновению самих пород. Из 40 аборигенных пород лошадей, описанных иппологами на рубеже XIX–XX вв., до наших дней сохранилось лишь 16. При этом сведения о современном состоянии печорской, чумышской, кузнецкой и верхнеенисейской пород, включенных в Госреестр селекционных достижений России, фактически отсутствуют (Белоусова, 2018).

Сведения о количестве протестированных лошадей и численности маток изученных местных пород приведены в табл. 1. Данные свидетельствуют о критически низкой численности поголовья в вятской, мезенской, печорской и приобской породах, которые остро нуждаются в мерах по сохранению. Это указывает на необходимость создания комплексной программы по сохранению малочисленных конских пород, являющихся национальным достижением России, которая будет включать генетические исследования по изучению и оценке уникального отечественного генофонда.

При контроле происхождения животных, изучении филогенетических связей и микроэволюции пород, для совершенствования генотипической оценки животных



Рис. 1. Распространение лошадей местных пород на территории Российской Федерации.

Таблица 1. Общая численность поголовья
и число взятых образцов от лошадей местных пород

Порода	Число взятых образцов	Общая численность маток
Алтайская	48	500*
Башкирская	130	2400*
Бурятская	30	1000*
Вятская	220	230*
Забайкальская	34	1500*
Кыргызская	100	64500
Мезенская	148	171*
Мугалжарская	109	5200
Новоалтайская	514	3245
Печорская	31	100*
Шетлендские пони	47	396
Приобская	85	200*
Тувинская	600	1200*
Хакасская	47	5500*
Якутская	50	51800*

* Данные Н.Ф. Белоусова (2018).

на индивидуальном и популяционном уровнях, а также в геномных исследованиях широко используются ДНК-технологии (Марзанов и др., 2010; Roh et al., 2020; Nwachukwu et al., 2022; Pozharskiy et al., 2023).

Микросателлиты – наиболее популярные маркеры в исследованиях генетических характеристик сельскохозяй-

ственных животных (Эрнст, Зиновьева, 2008; Глазко и др., 2023), они просты в применении и высокоинформативны. Микросателлиты интересны тем, что они подвержены более высокому уровню мутирования по сравнению с остальной частью генома (Глазко и др., 2023). Исследования генетической структуры лошадей разной специализации с использованием ДНК-маркеров (Калашников и др., 2011; Блохина и др., 2018; Гавриличева, 2019; Khaudov et al., 2019) показали высокий уровень аллельной вариабельности в изучаемых популяциях и подтвердили наличие генетической специфики аллелофонда большинства пород лошадей, часто имеющих ограниченный ареал разведения (Вдовина, Юрьева, 2021; Храброва и др., 2022). Микросателлиты являются эффективным средством для изучения особенностей генофонда, генетического полиморфизма, филогенеза, получения данных о пороодообразовании и эволюции животных (R2D2 Consortium et al., 2021).

Цель нашей работы – изучение аллелофонда и генетического разнообразия STR локусов в геномах лошадей 15 аборигенных пород, разводимых на территории России и сопредельных стран, и исследование филогенетических связей между ними.

Материалы и методы

Материалы для проведения данных исследований были отобраны у представителей местных пород, обитающих на территории РФ. Выборка включала 2193 лошади 15 местных пород: хакасской ($n = 47$), якутской ($n = 50$), бурятской ($n = 30$), башкирской ($n = 130$), забайкальской ($n = 34$), вятской ($n = 220$), кыргызской ($n = 100$), мезенской ($n = 148$), приобской ($n = 85$), печорской ($n = 31$), новоалтайской ($n = 514$), мугалжарской ($n = 109$), тувинской ($n = 600$), шетлендских пони ($n = 47$) и алтайской ($n = 48$).

Исследования проводились в сертифицированной лаборатории генетики ВНИИ коневодства по 17 STR локусам ДНК: *HMS2*, *HMS3*, *HMS1*, *AHT4*, *VHL20*, *AHT5*, *HTG7*, *HTG6*, *HTG4*, *HTG10*, *HMS7*, *HMS6*, *ASB23*, *ASB2*, *ASB17*, *LEX3* и *CA425*, с использованием стандартизированных методик и рекомендованных ISAG.

Выделение ДНК из биоматериалов (волос, крови, спермы и др.) проводили с использованием реагентов COrDIS SPRINT (Россия). Для амплификации полученной ДНК использовали 17-плексный набор праймеров COrDIS Horse (Россия) для генотипирования лошадей. Разделение и детекцию продуктов амплификации осуществляли методом капиллярного электрофореза на автоматическом 4-капиллярном генетическом анализаторе НАНАФОР 05 (Россия). После регистрации данных электрофореза размеры амплифицированных фрагментов ДНК рассчитывали с помощью программы GeneMapper™ V.4.0. Результаты трактовали на основе профиля контрольной ДНК от известного генотипа и данных международных сравнительных испытаний (Horse Comparison Tests), проведенных ISAG в 2008–2020 гг. Для обозначения аллелей использовали международный алфавитный код. Анализ генетико-популяционных параметров пород и графическую визуализацию проводили в программе R Studio 1.3.1093 с использованием пакетов *diveRsity* и *POPHELPER* (Francis, 2017). Значения гетерозиготности, ожидаемые (*Ho*) и наблюдаемые (*He*), рассчитывали при помощи программных пакетов *PLINK 1.9* (Chang et al., 2015). В рас-

четах использовали MS Excel 2010, Statistics 12 (<https://statsoft-statistica.ru/>) и GenAlEx (ver.6.5.1) (<https://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>). Построение филогенетического дерева по алгоритму «сети соседей» (Neighbor-Net) проводили в программе SplitsTree4 4.14.5 (https://www.advanceduninstaller.com/SplitsTree4-4_14_5-72c0418345e4a971ba5b353bfae970d6-application.htm).

При характеристике пород рассчитывали следующие показатели: общее число аллелей в 17 STR локусах (*Na*), среднее число аллелей на локус (*Nv*), уровень полиморфности (*Ae*), наблюдаемую (*Ho*) и ожидаемую (*He*) гетерозиготность, коэффициент внутрипопуляционного инбридинга (*Fis*), генетическое родство и генетические дистанции.

Результаты

При генотипировании 2193 лошадей 15 местных пород по 17 STR локусам был обнаружен 521 аллель с большими колебаниями по числу аллелей в локусах. Наименьшее число аллелей найдено для локуса *HTG6* печорской породы (3). Наибольшее число аллелей – для локуса *ASB17* тувинской породы (21).

Сравнительный анализ обобщающих показателей демонстрирует наиболее богатый спектр аллелей у лошадей тувинской (170), новоалтайской (158) и мугалжарской (154) пород. У лошадей бурятской породы было минимальное число аллелей – 117 (табл. 2).

Лидерство по уровню полиморфности продемонстрировала тувинская порода (*Ae* = 5.186). Близкие показате-

Таблица 2. Характеристика лошадей аборигенных пород (*n* = 2193) по 17 STR маркерам ДНК

Порода	<i>n</i>	<i>Na</i>	<i>Nv</i>	<i>Ae</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Fis</i>	<i>HWE</i>
Алтайская	48	134	7.880	4.761	0.784±0.025	0.759±0.024	-0.038	***
Башкирская	130	153	9.001	4.837	0.778±0.023	0.774±0.018	-0.005	ns
Бурятская	30	117	6.883	4.420	0.740±0.025	0.750±0.017	0.012	***
Вятская	220	129	7.588	4.101	0.738±0.028	0.723±0.027	-0.022	ns
Забайкальская	34	129	7.588	4.579	0.747±0.024	0.763±0.020	0.015	**
Кыргызская	100	153	9.000	5.080	0.766±0.020	0.781±0.019	0.016	**
Мезенская	148	132	7.764	4.197	0.736±0.033	0.723±0.032	-0.021	ns
Мугалжарская	109	154	9.060	5.051	0.801±0.022	0.781±0.019	-0.025	ns
Новоалтайская	514	158	9.294	4.923	0.752±0.031	0.757±0.029	0.006	ns
Печорская	31	121	7.117	4.580	0.755±0.035	0.755±0.023	-0.006	**
Шетлендские пони	47	131	7.705	4.337	0.714±0.024	0.748±0.020	0.046	***
Приобская	85	147	8.647	4.661	0.702±0.026	0.752±0.027	0.058	**
Тувинская	600	170	10.000	5.186	0.754±0.025	0.782±0.021	0.028	ns
Хакасская	47	123	7.235	4.299	0.729±0.031	0.745±0.020	0.025	ns
Якутская	50	128	7.529	4.307	0.693±0.032	0.740±0.025	0.055	**
Русская тяжеловозная*	615	138	8.117	3.667	0.674±0.030	0.689±0.030	0.015	ns
Советская тяжеловозная*	286	129	7.587	3.871	0.694±0.043	0.697±0.042	0.004	ns

Примечание. *n* – количество лошадей; *Na* – общее число аллелей в 17 микросателлитных локусах; *Nv* – среднее число аллелей на локус; *Ae* – уровень полиморфности; *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность; *He* – ожидаемая гетерозиготность; *Fis* – коэффициент внутрипопуляционного инбридинга. *HWE* – отклонение от равновесия Харди–Вайнберга (ns – не значимо, ** – значимо при *p* < 0.001, *** – значимо при *p* < 0.0001), * – породы, участвующие в качестве улучшателей местных лошадей.

тели были у киргизской ($A_e = 5.080$) и мугалжарской ($A_e = 5.051$) пород. Наименьший уровень полиморфности зафиксирован у хакасской ($A_e = 4.299$) и якутской ($A_e = 4.307$) пород. Наибольшие показатели фактической гетерозиготности определены у мугалжарской ($H_o = 0.801$), алтайской ($H_o = 0.784$), башкирской ($H_o = 0.778$) и киргизской ($H_o = 0.766$) пород, наименьший – у якутской ($H_o = 0.693$).

Преобладание гетерозиготных генотипов и отсутствие внутрипопуляционного инбридинга наблюдали у алтайской, башкирской, вятской, мезенской и мугалжарской пород. Незначительное смещение генетического баланса в сторону избытка гомозигот по коэффициенту F_{is} было отмечено у забайкальской, киргизской, новоалтайской, приобской, тувинской, хакасской и якутской пород. В большинстве субпопуляций и пород лошадей мы наблюдали отклонения от равновесия Харди–Вайнберга, значимые при $p < 0.001$ или $p < 0.0001$ по всем изученным локусам. У башкирской, вятской, мезенской, мугалжарской, новоалтайской, тувинской, хакасской пород наблюдалось сохранение равновесия Харди–Вайнберга ($p > 0.05$).

Результаты анализа генофонда лошадей аборигенных пород свидетельствуют о том, что каждая из проанализированных групп отличается спектром, частотой встречаемости и набором аллелей. Необходимо отметить, что при проведении сравнительного анализа 17 STR локусов у лошадей местных пород было обнаружено 16 новых аллелей, которые отсутствовали в стандартизированной номенклатуре ISAG (Van de Goor et al., 2010): *HMS7S*, *HMS6J*, *HMS6H*, *HMS2T*, *HMS1O*, *ASB2T*, *HTG7L*, *HTG6L*, *HTG6H*, *ASB17Z*, *ASB17X*, *ASB17U*, *VHL20S*, *LEX3S*, *LEX3R* и *CA425E*.

У лошадей мезенской породы, разводимых в Архангельской области, было обнаружено сразу пять уникальных аллелей: *HMS6J* (0.003), *ASB17Y* (0.019), *ASB17X* (0.010), *LEX3S* (0.039) и *LEX3R* (0.016). Наибольшую частоту в этой северной лесной породе имели аллели *HMS7L* (0.685), *HMS3M* (0.432), *AHT4O* (0.417), *HTG7O* (0.437), *HTG7K* (0.425), *HTG6O* (0.799), *HTG4M* (0.419) и *LEX3M* (0.535).

В генетической структуре башкирских лошадей наблюдается высокая частота встречаемости аллелей *HTG10O* (0.447), *HTG6O* (0.508), *HTG4M* (0.589) и *HMS7L* (0.487) и наличие редко встречающегося аллеля *ASB17U* (0.041), обнаруженного и у лошадей тувинской породы.

Два аллеля оказались уникальными для лошадей вятской породы: *HTG6L* (0.004) и *AHT5P* (0.009), а типичными оказались *HMS7L* (0.470), *HMS2H* (0.457), *HMS1M* (0.468), *AHT5J* (0.427), *HTG7* (0.576), *HTG6O* (0.712) и *HTG4M* (0.689).

Местные породы лошадей Сибири заметно отличались от европейских популяций по всем генетическим параметрам. Высокие значения всех базовых популяционных параметров наблюдались у киргизской и тувинской пород, ранее имевших соприкасающиеся ареалы. У этих пород также были определены высокие частоты встречаемости аллелей *HTG6O* (0.548; 0.530), *HTG4M* (0.632; 0.597), *HMS7L* (0.420; 0.400). У тувинских лошадей редко встречались аллели *HMS6H* (0.001), *HMS3L* (0.004), *VHL20K* (0.002), *ASB23N* (0.001), *ASB17Z* (0.002), *LEX3J* (0.054)

и *LEX3I* (0.024). В киргизской породе были выявлены два уникальных аллеля: *HTG4J* (0.005) и *HTG7Q* (0.009), отсутствующие у других изучаемых пород в рамках исследованных групп.

Аллель *HTG6R* обнаружен только у четырех пород: киргизской (0.005), мугалжарской (0.007), приобской (0.023) и тувинской (0.006). В локусе *VHL20* аллель *S* встречался у мугалжарской (0.046), новоалтайской (0.005) и тувинской (0.002) пород.

В локусе *LEX3*, локализованном в X-хромосоме, у местных лошадей было выявлено 12 аллелей, три из которых (*F*, *L*, *M*) встречались во всех исследуемых породах (рис. 2).

Для представителей тувинской и алтайской пород характерно наличие редкого аллеля *LEX3J* (0.019; 0.056), отсутствующего у других исследуемых в данной работе групп. Только у лошадей местных пород, разводимых в Южной и Западной Сибири, таких как киргизская, новоалтайская, мугалжарская и тувинская, был обнаружен аллель *LEX3G*, который встречался с низкой частотой.

В генотипах лошадей мезенской породы были найдены редкие аллели *LEX3S* (0.045) и *LEX3R* (0.017), отсутствующие у других популяций (см. рис. 2).

Для лошадей местных пород характерно наличие аллелей *I*, *J*, *L*, *M* и *N* в локусе *CA425*. Максимальная частота встречаемости аллеля *CA425M* характерна для тувинской и хакасской популяций. Аллель *CA425N* присутствовал у бурятской (0.511), алтайской (0.463), мугалжарской (0.408) и новоалтайской (0.435) пород. Новый аллель *CA425E* (0.009) обнаружен только у лошадей мугалжарской породы, разводимых в Казахстане. У шетлендских пони, башкирских и хакасских лошадей был определен уникальный аллель *CA425P*, который отсутствовал у других исследованных нами пород.

Показатели уровня полиморфности и степени гетерозиготности у местных пород были высокими при низких значениях F_{is} , что свидетельствует о генетическом балансе в исследуемых популяциях. Основываясь на полученных результатах, можно отметить, что самые высокие показатели генетического разнообразия были выявлены у лошадей тувинской породы при сравнении с другими анализируемыми в рамках представленного исследования породами. Самый низкий уровень генетического разнообразия наблюдается у лошадей вятской породы.

Коэффициенты генетического родства между местными породами лошадей варьировали в интервале 0.828–0.973 (табл. 3). Самые высокие коэффициенты генетического родства были определены у киргизской породы с тувинской (0.973), башкирской (0.939), алтайской (0.938), забайкальской (0.934) и хакасской (0.926). Самый низкий уровень – с шетлендскими пони. Генетические различия между изученными породами по микросателлитным маркерам подтверждают значения генетических расстояний, которые варьировали в диапазоне 0.027–0.331. Самое близкое генетическое расстояние имеют лошади тувинской и киргизской пород (0.027).

На филогенетическом дереве исследованные породы лошадей формируют три независимых кластера (рис. 3). В первый кластер вошли киргизская и тувинская породы, характеризующиеся общностью происхождения.

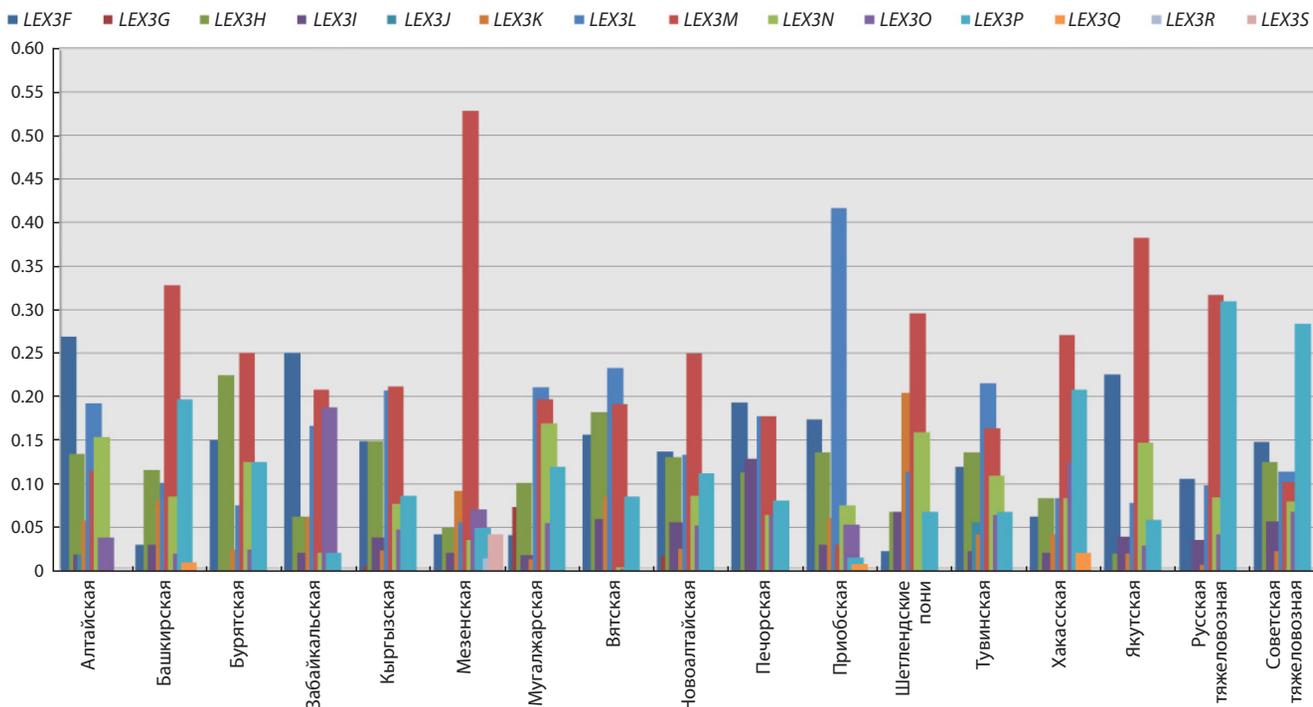


Рис. 2. Гистограмма частот встречаемости аллелей в локусе *LEX3* у лошадей местных пород.

Таблица 3. Коэффициенты генетического родства и генетических расстояний у лошадей местных пород

Генетическое расстояние	Генетическое родство															
	Алтайская	Башкирская	Бурятская	Забайкальская	Кыргызская	Мезенская	Мугалжарская	Вятская	Новоалтайская	Печорская	Приобская	Шетлендские пони	Тувинская	Хакасская	Якутская	Орловская рысистая
Алтайская	x	0.886	0.862	0.911	0.938	0.805	0.878	0.872	0.901	0.866	0.852	0.777	0.924	0.870	0.844	0.829
Башкирская	0.114	x	0.869	0.903	0.939	0.840	0.890	0.817	0.886	0.856	0.841	0.814	0.945	0.915	0.864	0.800
Бурятская	0.138	0.131	x	0.872	0.914	0.836	0.851	0.821	0.883	0.831	0.810	0.779	0.887	0.865	0.833	0.744
Забайкальская	0.089	0.097	0.128	x	0.934	0.816	0.876	0.842	0.899	0.858	0.874	0.789	0.929	0.874	0.865	0.779
Кыргызская	0.062	0.061	0.086	0.066	x	0.850	0.909	0.864	0.916	0.888	0.871	0.828	0.973	0.926	0.871	0.833
Мезенская	0.195	0.160	0.164	0.184	0.150	x	0.760	0.781	0.838	0.831	0.777	0.805	0.856	0.823	0.799	0.701
Мугалжарская	0.122	0.110	0.149	0.124	0.091	0.240	x	0.782	0.885	0.787	0.819	0.768	0.913	0.867	0.855	0.788
Вятская	0.128	0.183	0.179	0.158	0.136	0.219	0.218	x	0.873	0.816	0.829	0.711	0.844	0.822	0.775	0.732
Новоалтайская	0.099	0.114	0.117	0.101	0.084	0.162	0.115	0.127	x	0.879	0.888	0.775	0.911	0.914	0.846	0.820
Печорская	0.134	0.144	0.169	0.142	0.112	0.169	0.213	0.184	0.121	x	0.820	0.811	0.889	0.844	0.833	0.748
Приобская	0.148	0.159	0.190	0.126	0.129	0.223	0.181	0.171	0.112	0.180	x	0.752	0.881	0.829	0.789	0.768
Шетлендские пони	0.223	0.186	0.221	0.211	0.172	0.195	0.232	0.289	0.225	0.189	0.248	x	0.851	0.767	0.806	0.669
Тувинская	0.076	0.055	0.113	0.071	0.027	0.144	0.087	0.156	0.089	0.111	0.119	0.149	x	0.915	0.894	0.818
Хакасская	0.130	0.085	0.135	0.126	0.074	0.177	0.133	0.178	0.086	0.156	0.171	0.233	0.085	x	0.820	0.847
Якутская	0.156	0.136	0.167	0.135	0.129	0.201	0.145	0.225	0.154	0.167	0.211	0.194	0.106	0.180	x	0.701
Орловская рысистая	0.171	0.200	0.256	0.221	0.167	0.299	0.212	0.268	0.180	0.252	0.232	0.331	0.182	0.153	0.299	x

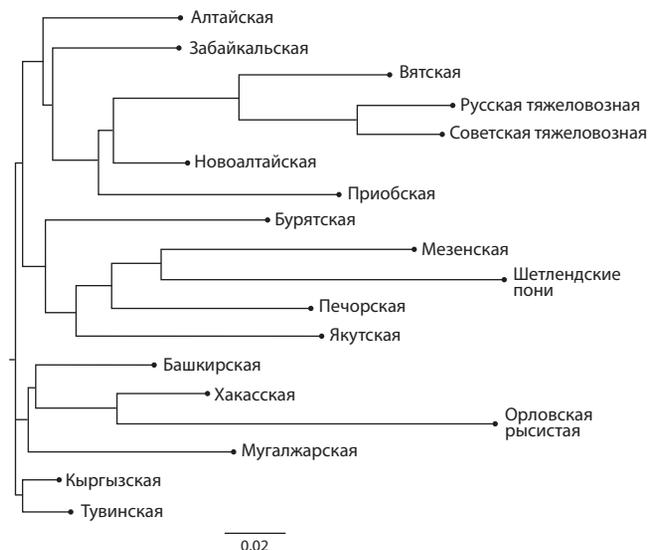


Рис. 3. Дендрограмма генетических расстояний между аборигенными породами лошадей, построенная по методу Neighbor-Net.

Этносы активно кочевали на лошадях по всей Восточной, Западной и Центральной Сибири, что явилось причиной генетического родства популяций.

Второй кластер образуют лошади башкирской, хакасской, мугалжарской и орловской рысистой пород. На первый взгляд, включение орловского рысака в группу местных степных пород несколько неожиданно, но, скорее всего, оно обусловлено периодическим использованием этой рысистой породы для улучшения хозяйственно полезных качеств лошадей местных популяций. В этом субкластере несколько выделяется ветвь географически обособленной мугалжарской породы, обладающей рядом уникальных аллелей.

Самый обширный третий кластер включает большинство исследуемых аборигенных пород лошадей лесной и лесостепной зоны, а также породы отечественных тяжелоупряжных лошадей, которые использовались ранее для улучшения местного поголовья. Дендрограмма генетических дистанций наглядно отражает заметное влияние жеребцов русской тяжелоупряжной породы на формирование вятской лошади на протяжении последних десятилетий ее развития.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что на формирование генетических профилей аборигенных пород, их уровней полиморфности, различий в структуре локусов, генетико-популяционных характеристик и общности оказывают влияние две группы значимых разновекторных факторов: природно-географическая изоляция животных и происхождение от общих предков. Проведенный нами молекулярно-генетический анализ 15 аборигенных пород показал, что все группы животных характеризуются высоким генетическим разнообразием.

Обсуждение

Россия обладает уникальными генетическими ресурсами коневодства, изучение биологических особенностей ко-

торых является основой для программ по их сохранению и совершенствованию.

Практически у всех изученных аборигенных пород были определены высокие значения показателей уровня полиморфности STR маркеров ($A_e = 4.101-5.186$). Полученные данные указывают на сложную и разнообразную систему скрещивания и пороодообразования в изучаемых группах, а также на наличие генетического разнообразия, связанного с адаптационными качествами лошадей и их способностью приспосабливаться к экстремальным условиям окружающей среды в эволюционном контексте.

В дополнение к стандартизированной номенклатуре (Van de Goor et al., 2010) у лошадей местных пород были обнаружены 16 новых аллелей, которые могли остаться в очагах одомашнивания древних лошадей на территории, а также появиться в результате геномных мутаций или интродукции генов от лошадей кочевников из разных регионов Азии. Ученые из Китая (Ling et al., 2011) подтвердили этот факт собственными исследованиями местных китайских лошадей, у которых был определен широкий спектр аллелей микросателлитных маркеров восточного происхождения.

Проведенный анализ позволил установить значительные различия по основным генетическим параметрам (A_e , N_v , H_o , H_e , F_{is}). Помимо высокой степени генетической вариативности, характерной особенностью местных пород оказалось наличие ряда уникальных для отечественных пород аллелей: *ASB2T*, *HMS7S*, *HMS6J*, *HMS6H*, *HMS2T*, *HMS1O*, *HTG7L*, *HTG6L*, *HTG6H*, *VHL20S*, *ASB17Z*, *ASB17X*, *ASB17U*, *LEX3S*, *LEX3R* и *CA425E*, которые не встречались у лошадей заводских пород и в изученных европейских популяциях (Seo et al., 2016; Vaena et al., 2020).

Лошади аборигенных пород обладают уникальными аллелями: тувинская – *HTG6L*, *VHL20S*, *HMS6H*, *ASB17X*, *ASB17U*, *ASB17Z*; башкирская – *ASB17U*; алтайская – *HMS2T*; бурятская – *HTG6L*, *HTG6H*; вятская – *AHT5P*, *HTG6L*; мезенская – *ASB17Y*, *ASB17X*, *HMS6J*, *LEX3R*, *LEX3S*. Современные аборигенные породы лошадей, даже при общности происхождения от монгольских корней (Yun et al., 2022), имеют свою характерную генетическую структуру с наличием приватных аллелей, несмотря на периодическое скрещивание с заводскими породами верхового, рысистого и тяжелоупряжного направлений.

Полученные нами результаты подтверждают данные зарубежных ученых (Lippold et al., 2011; Librado et al., 2021) о том, что ареал одомашнивания лошади занимал значительную часть территории современной России, которая благодаря своему географическому положению была историческим перекрестком маршрутов многих кочевых народов Евразии, что способствовало интенсивному процессу формирования лошадей новых пород.

Заключение

Проведенные исследования показали, что отечественные породы лошадей обладают самобытной генетической структурой, уникальным аллелофондом и характеризуются высоким уровнем генетического разнообразия. У лошадей аборигенных пород выявлены приватные ал-

лели, которые необходимо учитывать при контроле происхождения и оценке популяционного разнообразия, а также при проведении генетического мониторинга и планировании программ по сохранению и разведению лошадей местных пород.

Согласно результатам построенного филогенетического дерева, местные породы лошадей, разводимые на территориях соседствующих регионов, имеют наибольшую степень генетического сходства. Кластерный анализ объединил породы лошадей в три группы в соответствии с генетической структурой, определенной по локусам микросателлитов ДНК, которые подтвердили свою пригодность использования в качестве маркеров филогенетического родства популяций. Полученные коэффициенты генетического сходства достаточно адекватно отражают родственные связи между местными породами лошадей в соответствии с историей их формирования.

Изучение особенностей генетической структуры и филогенетических связей отечественных аборигенных пород лошадей по 17 STR маркерам представляет несомненный интерес с теоретической и практической точек зрения. Генетические методы селекции позволяют не только оценивать степень генетического разнообразия пород, но и контролировать уровень внутривидового инбридинга и на основании этого формировать стратегию селекционных программ.

Список литературы / References

- Белуосова Н.Ф. Местные (аборигенные) породы лошадей России. Дивово: ВНИИ коневодства, 2018
[Belousova N.F. Local (aboriginal) Horse Breeds in Russia. Divovo: Publishing House of the All-Russia Research Institute of Horse Breeding, 2018 (in Russian)]
- Блохина Н.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М., Гавриличева И.С. Оценка генетического разнообразия микросателлитных локусов у лошадей тяжелоупряжных пород. *Генетика и разведение животных*. 2018;2:39-44. doi 10.31043/2410-2733-2018-2-39-44 [Blohina N.V., Khrabrova L.A., Zaitsev A.M., Gavrilicheva I.S. Assessment of the genetic diversity of microsatellite loci in horses of heavydraft breeds. *Genetika i Razvedenie Zhivotnykh = Animal Genetics and Breeding*. 2018;2:39-44. doi 10.31043/2410-2733-2018-2-39-44 (in Russian)]
- Вдовина Н.В., Юрьева И.Б. Мониторинг генетической структуры мезенской породы лошадей по микросателлитам ДНК. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):202-207. doi 10.18699/VJ21.024 [Vdovina N.V., Yuryeva I.B. Monitoring for the genetic structure of Mezen breed of horses in terms of DNA microsatellites. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2021;25(2): 202-207. doi 10.18699/VJ21.024]
- Гавриличева И.С. Генетико-популяционная характеристика русской рысистой породы лошадей по локусам микросателлитов ДНК. *АгроЗооТехника*. 2019;2(3):2. doi 10.15838/alt.2019.2.3.2 [Gavrilicheva I.S. Genetic and population characteristics of Russian trotting horse breed by DNA microsatellite loci. *AgroZooTehnika = Agricultural and Livestock Technology*. 2019;2(3):2. doi 10.15838/alt.2019.2.3.2 (in Russian)]
- Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Глазко Т.Т., Федорова Л.М. ДНК маркеры и «микросателлитный код» (обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2023;58(2):223-248. doi 10.15389/agrobio.2023.2.223rus [Glazko V.I., Kosovsky G.Yu., Glazko T.T., Fedorova L.M. DNA markers and "microsatellite code" (review). *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agric Biol*. 2023;58(2):223-248. doi 10.15389/agrobio.2023.2.223eng]
- Калашников В.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М., Зайцева М.А., Калинин Л.В. Полиморфизм микросателлитной ДНК у лошадей заводских и локальных пород. *Сельскохозяйственная биология*. 2011;46(2):41-45 [Kalashnikov V.V., Khrabrova L.A., Zaitsev A.M., Zaitseva M.A., Kalinkova L.V. Polymorphism of microsatellite DNA in horses of stud and local breeds. *Sel'skokhozyaystvennaya Biologiya = Agric Biol*. 2011;46(2):41-45 (in Russian)]
- Калашникова Л.А., Новиков А.А., Семак М.С. Развитие генетической экспертизы племенной продукции в животноводстве. *Зоотехния*. 2022;11:25-28. doi 10.25708/ZT.2022.19.42.008 [Kalashnikova L.A., Novikov A.A., Semak M.S. Development of the genetic testing of breeding products in animal husbandry. *Zootekhnika = Zootechniya*. 2022;11:25-28. doi 10.25708/ZT.2022.19.42.008 (in Russian)]
- Марзанов Н.С., Насибов М.Г., Марзанова Л.К., Озеров М.Ю., Кантанен Ю., Лобков В.Ю. Генетические маркеры в теории и практике разведения овец. М.: Пионер, 2010 [Marzanov N.S., Nasibov M.G., Marzanova L.K., Ozerov M.Yu., Kantanen Yu., Lobkov V.Yu. Genetic Markers in the Theory and Practice of Sheep Breeding. Moscow: Pioneer Publ., 2010 (in Russian)]
- Храброва Л.А., Блохина Н.В., Белоусова Н.Ф., Котран Е.Г. Оценка генеалогической структуры вятской породы лошадей (*Equus ferus caballus*) с использованием анализа ДНК. *Генетика*. 2022;58(4):457-462. doi 10.31857/S0016675822040063 [Khrabrova L.A., Blohina N.V., Belousova N.F., Kotran E.G. Estimation of the genealogical structure of Vyatka horse breed (*Equus ferus caballus*) using DNA analysis. *Russ J Genet*. 2022;58(4):462-466. doi 10.1134/S1022795422040068]
- Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. Биологические проблемы животноводства в XXI веке. М.: ПАСХН, 2008 [Ernst L.K., Zinovieva N.A. Biological Issues of Animal Husbandry in the XXI Century. Moscow, 2008 (in Russian)]
- Askarov A., Kuznetsova A., Gusmanov R., Askarova A., Kovshov V. Cost-effective horse breeding in the Republic of Bashkortostan, Russia. *Vet World*. 2020;13(10):2039-2045. doi 10.14202/vetworld.2020.2039-2045
- Baena M.M., Diaz S., Moura R.S., Meirelles S.L.C. Genetic characterization of Mangalarga Marchador breed horses based on microsatellite molecular markers. *J Equine Vet Sci*. 2020;95:103231. doi 10.1016/j.jevs.2020.103231
- Chang C.C., Chow C.C., Tellier L.C.A.M., Vattikuti S., Purcell S.M., Lee J.J. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*. 2015;4:7. doi 10.1186/s13742-015-0047-8
- Francis R.M. POPHELPER: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Mol Ecol Resour*. 2017;17(1):27-32. doi 10.1111/1755-0998
- Khaudov A.D., Duduev A.S., Kokov Z.A. Diversity of Kabardian horses and their genetic relationships with selected breeds in the Russian Federation based on 17 microsatellite loci. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*. 2019;341:012072. doi 10.1088/1755-1315/341/1/012072
- Librado P., Khan N., Fages A. The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature*. 2021;598:634-640. doi 10.1038/s41586-021-04018-9
- Ling Y.H., Ma Y.H., Guan W.J., Cheng Y.J., Wang Y.P., Han J.L., Mang L., Zhao Q.J., He X.H., Pu Y.B., Fu B.L. Evaluation of the genetic diversity and population structure of Chinese indigenous horse breeds using 27 microsatellite markers. *Anim Genet*. 2011;42(1): 56-65. doi 10.1111/j.1365-2052.2010.02067.x
- Lippold S., Matzke N.J., Reissmann M., Hofreiter M. Whole mitochondrial genome sequencing of domestic horses reveals incorporation of extensive wild horse diversity during domestication. *BMC Evol Biol*. 2011;11:328. doi 10.1186/1471-2148-11-328

- Nwachukwu E.N., Kalla D.J.U., Ukwu H.O., Ogbu C.C., Ezea J., Udoh U.H., Ekumankama O.O. Genetic diversity and population structure of four Nigerian indigenous cattle breeds. *Trop Anim Health Prod.* 2022;54(2):132. doi 10.1007/s11250-022-03132-8
- Pozharskiy A., Abdrakhmanova A., Beishova I., Shamshidin A., Namevtov A., Ulyanova T., Bekova G., Kikebayev N., Kovalchuk A., Ulyanov V., Turabayev A., Khusnitdinova M., Zhambakin K., Sapakhova Z., Shamekova M., Gritsenko D. Genetic structure and genome-wide association study of the traditional Kazakh horses. *Animal.* 2023;17(9):100926. doi 10.1016/j.animal.2023.100926
- R2D2 Consortium; Fugeray-Scarbel A., Bastien C., Dupont-Nivet M., Lemarié S. Why and how to switch to genomic selection: lessons from plant and animal breeding experience. *Front Genet.* 2021;12:629737. doi 10.3389/fgene.2021.629737
- Roh H.J., Kim S.C., Cho C.Y., Lee J., Jeon D., Kim D.K., Kim K.W., Afrin F., Ko Y.G., Lee J.H., Batsaikhan S., Susanti T., Hegay S., Kongvongxay S., Gorkhali N.A., Thi L.A.N., Thao T.T.T., Manikku L. Estimating genetic diversity and population structure of 22 chicken breeds in Asia using microsatellite markers. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2020;33(12):1896-1904. doi 10.5713/ajas.19.0958
- Seo J.H., Park K.D., Lee H.K., Kong H.S. Genetic diversity of Halla horses using microsatellite markers. *J Anim Sci Technol.* 2016; 58:40. doi 10.1186/s40781-016-0120-6
- Stanislawczyk R., Rudy M., Gil M. Quality characteristics of horse meat as influence by the age of horse. *Int J Food Prop.* 2020;23(1): 864-877. doi 10.1080/10942912.2020.1764579
- Van de Goor L.H., Panneman H., Van Haeringen W.A. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci. *Anim Genet.* 2010;41(2):122-127. doi 10.1111/j.1365-2052.2009.01975.x
- Yun J., Oyungerel B., Kong H.S. Genetic diversity and population structure of Mongolian regional horses with 14 microsatellite markers. *Anim Biosci.* 2022;35(8):1121-1128. doi 10.5713/ab.21.0497

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.03.2024. После доработки 22.08.2024. Принята к публикации 27.09.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-14

Ассоциация двух миссенс-мутаций в генах *MSS51* и *KAT6B* с массой тела в разном возрасте у коров ярославской породы

А.В. Игошин ¹ , Н.С. Юдин ¹, Д.М. Ларкин ² 

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

² Королевский ветеринарный колледж, Лондон, Великобритания

 igoshin@bionet.nsc.ru; dmlarkin@gmail.com

Аннотация. Ярославская порода крупного рогатого скота – отечественная порода молочного направления продуктивности, выведенная в XIX в. на основе северного великорусского скота, адаптированного к суровому климату и скудному рациону. Ранее у животных этой породы мы обнаружили две высокочастотные почти породоспецифичные миссенс-мутации в генах *MSS51* (Ala415Glu) и *KAT6B* (Val105Met), которые имели отрицательную связь с массой тела на выборке из 30 животных. Целью работы было подтверждение ассоциации миссенс-мутаций в генах *MSS51* и *KAT6B*, а также мутантного гаплотипа, содержащего обе мутации, с живой массой в разном возрасте у коров ярославской породы на расширенной выборке животных. Мы генотипировали 113 коров по вышеупомянутым миссенс-вариантам и на объединенной с предыдущими данными выборке в 143 животных провели анализ ассоциаций с живой массой в возрасте 0, 6, 10, 12, 15 и 18 мес. с использованием линейной регрессии и однофакторного дисперсионного анализа. С помощью линейной регрессии для мутации в гене *KAT6B* были выявлены значимые ассоциации с живой массой в возрасте 6, 12 и 18 мес. Мутация в гене *MSS51* была ассоциирована с живой массой в возрасте 6, 12, 15 и 18 мес. Гаплотип с обеими мутациями был ассоциирован с живой массой во всех возрастах, от 6 до 18 мес. включительно. По результатам однофакторного дисперсионного анализа значимые ассоциации живой массы с генотипами по мутации в гене *KAT6B* были обнаружены только в возрасте 6 мес. Для мутации в гене *MSS51*, как и для мутантного гаплотипа, ассоциации имелись в возрасте 6, 12, 15 и 18 мес. В обоих статистических тестах наибольшей значимости достигла ассоциация не с отдельными вариантами, а с мутантным гаплотипом. Полученные данные могут быть использованы при селекции для производства говядины за счет откормочного контингента молодняка, а также помесей ярославской породы с быками мясных пород.

Ключевые слова: ярославская порода; живая масса; возраст; ген *KAT6B*; ген *MSS51*; миссенс-мутация; гаплотип; селекция.

Для цитирования: Игошин А.В., Юдин Н.С., Ларкин Д.М. Ассоциация двух миссенс-мутаций в генах *MSS51* и *KAT6B* с массой тела в разном возрасте у коров ярославской породы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025; 29(1):122-127. doi 10.18699/vjgb-25-14

Финансирование. Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2024-0012.

Association of two missense mutations in the *MSS51* and *KAT6B* genes with body weight at different ages in cows of the Yaroslavl breed

A.V. Igoshin ¹ , N.S. Yudin ¹, D.M. Larkin ² 

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

² Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

 igoshin@bionet.nsc.ru; dmlarkin@gmail.com

Abstract. The Yaroslavl cattle is a native Russian dairy breed developed in the 19th century from the Northern Great Russian cattle, which were adapted to withstand harsh climates and poor forage conditions. Previous studies identified two breed-specific missense mutations in the *MSS51* (Ala415Glu) and *KAT6B* (Val105Met) genes that negatively impact the body weight of the animals. This study aimed to confirm the association of these missense mutations in the *MSS51* and *KAT6B* genes, along with the mutant haplotype containing both mutations, with live weight at various ages in the Yaroslavl breed using an expanded sample set. We genotyped 113 cows for these missense variants and analyzed their associations with live weight at birth, as well as at 6, 10, 12, 15, and 18 months in a combined sample of 143 animals, which includes earlier data. We employed linear regression and one-way ANOVA for statistical analysis. The results from linear regression indicated significant associations with live weight at 6, 12, and 18 months for the mutation in the *KAT6B* gene. The *MSS51* gene mutation was associated with live weight at 6, 12, 15, and 18 months. Notably, the

mutant haplotype was linked to live weight across all ages from 6 to 18 months. One-way ANOVA revealed significant associations of live weight with *KAT6B* genotypes only at 6 months. For the *MSS51* gene mutation and the mutant haplotype, significant associations were found at 6, 12, 15, and 18 months. In both statistical tests, the most significant association was observed for the mutant haplotype rather than for the individual variants. These findings could be instrumental in enhancing the live weight of beef hybrids utilising the Yaroslavl cattle breed.

Key words: Yaroslavl breed; live weight; age; *KAT6B* gene; *MSS51* gene; missense mutation; haplotype; selection.

For citation: Igoshin A.V., Yudin N.S., Larkin D.M. Association of two missense mutations in the *MSS51* and *KAT6B* genes with body weight at different ages in cows of the Yaroslavl breed. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):122-127. doi 10.18699/vjgb-25-14

Введение

В настоящее время в мире насчитывается более тысячи официально признанных пород крупного рогатого скота (КРС) (FAO, 2024). Значительную часть из них можно отнести к так называемым локальным породам (аборигенным, исконным), которые, как правило, уступают в продуктивности коммерческим породам с широким ареалом разведения, однако хорошо адаптированы к местным природно-климатическим факторам, патогенам и особенностям содержания (Cugone et al., 2019). Локальные породы представляют собой ценный резервуар генетического разнообразия, который может быть использован для совершенствования адаптивных и продуктивных качеств КРС ввиду происходящих в мире климатических изменений (Юдин, Ларкин, 2019; Colombi et al., 2024).

Ярославская порода КРС молочного направления продуктивности была выведена в XIX в. на территории бывшей Ярославской губернии в ходе «народной селекции» путем разведения «в себе» северного великорусского скота, который имел невысокую продуктивность, был низкорослым, но хорошо адаптированным к суровому климату и скудному рациону (Dmitriev, Ernst, 1989).

Животные ярославской породы в основном черной масти. Голова белая, с характерными черными отметинами («очками») вокруг глаз. Брюхо и нижняя часть конечностей, а также кончик хвоста – белые (Моноенков, 1974). До начала 1880-х годов в Ярославскую губернию в небольшом числе ввозили животных голландской, тирольской, ангельнской, симментальской, альгаузской и холмогорской пород. Однако, по-видимому, они не оказали большого влияния на ярославскую породу, поскольку она сохранила свой специфический экстерьер (Dmitriev, Ernst, 1989). С целью повышения молочной продуктивности в СССР проводили скрещивание коров ярославской породы с животными остфризской и голландской (с 1937 г.), а также голштинской (с 1978 г.) пород (Моноенков, 1974; Тамарова, 2009). Тем не менее исследования на базе данных полногеномного генотипирования (Iso-Touru et al., 2016; Yurchenko et al., 2018) и микросателлитного анализа (Abdelmanova et al., 2020) показали, что ярославская порода в основном сохранила свою уникальную генетику, отличающуюся от других отечественных и зарубежных пород крупного рогатого скота.

Ранее нами было проведено исследование по поиску следов отбора в геномах животных ярославской породы, в котором на хромосоме 28 были идентифицированы две почти породоспецифические высокочастотные миссенс-мутации в генах *MSS51* (Ala145Glu) и *KAT6B* (Val105Met), составляющие единый гаплотип (Ruvinskiy et al., 2022).

Генотипирование этих мутаций, осуществленное на выборке 30 коров, и последующий анализ ассоциаций выявили отрицательную связь мутантного гаплотипа с живой массой животных, а также с высотой в холке и обхватом груди. Мы предположили, что мутантный гаплотип, будучи ассоциированным с меньшей массой тела животных, имел преимущества в условиях холодного климата и скудной кормовой базы и поэтому подвергался отбору в предковых популяциях ярославской породы.

Цель настоящей работы – подтверждение ассоциации миссенс-мутаций в генах *MSS51* и *KAT6B*, а также мутантного гаплотипа с живой массой в разном возрасте у коров ярославской породы на расширенной выборке.

Материалы и методы

В работе использовали образцы крови от 113 коров ярославской породы из двух хозяйств Ярославской области. Информация по живой массе в возрасте 0, 6, 10, 12, 15 и 18 мес. была взята из карточек зоотехнического учета. Выделение ДНК из образцов крови выполняли путем клеточного лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией (Sambrook, Russell, 2006). Генотипирование миссенс-мутаций в генах *KAT6B* и *MSS51* проводили с помощью метода ПЦР-ПДРФ (Ota et al., 2007). Подбор праймеров осуществляли с использованием пакета Vector NTI (Lu, Moriyama, 2004). Специфичность для подобранных пар праймеров проверяли с помощью программы Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Последовательности праймеров, эндонуклеазы рестрикции и условия ПЦР приведены в табл. 1. К данным генотипирования 113 животных была добавлена информация по 30 ранее исследованным индивидам (Ruvinskiy et al., 2022). Таким образом, совокупная выборка составила 143 животных. Для обеих мутаций с помощью программы PLINK v.1.9 (Purcell et al., 2007) был проведен тест на отклонение от равновесия Харди–Вайнберга (опция --hardy) и оценено неравновесие по сцеплению (опция --ld). Предварительно данные генотипирования были преобразованы в red-формат.

Для статистического анализа использованы линейная регрессия и однофакторный дисперсионный анализ, реализованные в функциях “lm” и “aov” среды R соответственно. При использовании линейной регрессии генотипы по каждой мутации кодировали значениями 0, 1 и 2 согласно дозе мутантного аллеля. Кроме ассоциаций с генотипами, мы также тестировали связь массы тела животных с дозой гаплотипа, включающего обе мутации. Дигомозигот по мутантным аллелям учитывали как носителей двух доз мутантного гаплотипа. Животных, имеющих мутацию по одному гену в гомозиготе, а по дру-

Таблица 1. Праймеры, условия ПЦР и эндонуклеазы рестрикции для генотипирования миссенс-вариантов в генах *MSS51* и *KAT6B*

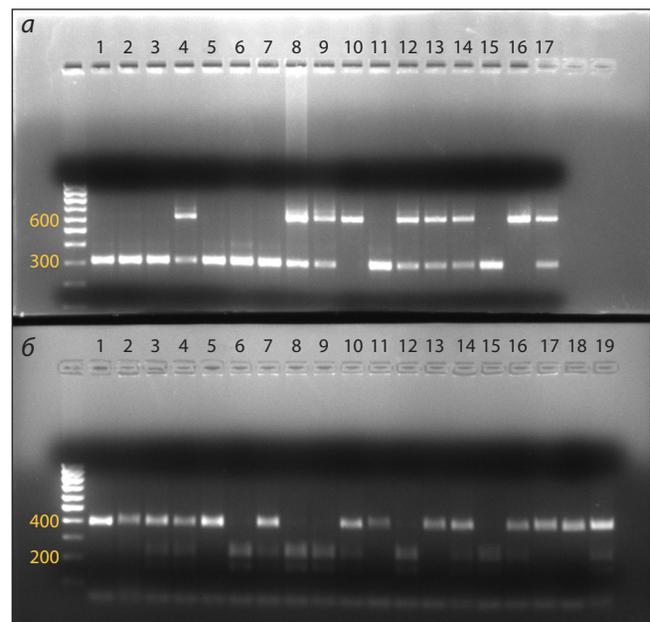
Ген, замена	Прямой, обратный праймер	Условия ПЦР	Эндонуклеаза рестрикции	Размеры фрагментов
<i>KAT6B</i> , G>A (Val105Met)	АСТТГСАААСССАСТТТАТАСАГАГТГГ, СТГАТСТТТСТСГТГГГГТАГААГГ	1 цикл: 95 °С – 3 мин 35 циклов: 95 °С – 1 мин; 60 °С – 1 мин; 72 °С – 55 с	HpySE526 I, разрезание в присутствии предкового аллеля G	613 п.о., после разрезания: 303 и 310 п.о.
<i>MSS51</i> , G>T (Ala415Glu)	СТТГГСТТТСТТАТСССТТCAAAGTGC, АТССАГТКАТГАТСТГГСТСАГС	1 цикл: 95 °С – 3 мин 35 циклов: 95 °С – 1 мин; 58 °С – 1 мин; 72 °С – 45 с	HinfI, разрезание в присутствии мутантного аллеля Т	390 п.о., после разрезания: 224 и 166 п.о.

гому – в гетерозиготе, учитывали как носителей одной дозы. Дигетерозигот также рассматривали как носителей одной дозы. На наш взгляд, это допущение справедливо, поскольку, по результатам генотипирования, мутации в обоих генах оказались в сильном неравновесии по сцеплению. Это означает, что большинство дигетерозиготных носителей имеет мутантные аллели в цис-положении (т. е. на одной и той же гомеологической хромосоме).

Результаты

Для обеих мутаций были амплифицированы целевые фрагменты и успешно генотипированы все исследуемые образцы (см. рисунок). Распределения частот генотипов для обеих мутаций значимо не отличались от ожидаемых при равновесии Харди–Вайнберга. Частоты мутантных аллелей для генов *KAT6B* и *MSS51* составили 0.455 и 0.434 соответственно. Для доли носителей мутантного аллеля в выборке соответствующие значения были 0.72 и 0.699 (табл. 2). Коэффициент неравновесия по сцеплению между двумя локусами $r^2 = 0.891$.

С помощью линейной регрессии для мутации в гене *KAT6B* были выявлены значимые ($p < 0.05$) ассоциации с живой массой в возрасте 6, 12 и 18 мес. (табл. 3). Мутация в гене *MSS51* была ассоциирована с живой массой в возрасте 6, 12, 15 и 18 мес. При этом доза мутантного гаплотипа была ассоциирована с живой массой во всех возрастах, от 6 до 18 мес. включительно. По результатам однофакторного дисперсионного анализа, значимые ассоциации живой массы с генотипами по мутации в гене *KAT6B* были обнаружены только в возрасте 6 мес. Для мутации в гене *MSS51*, как и для мутантного гаплотипа, ассоциации имелись в возрасте 6, 12, 15 и 18 мес. Ассоциация с живой массой при рождении не зафиксирована ни в одном из тестов.



Примеры электрофореграмм ПЦР-ПДРФ анализа для миссенс-мутаций в исследуемых генах.

a – генотипы по гену *KAT6B*: GG – дорожки 1, 2, 3, 5, 6, 7, 11 и 15; GA – 4, 8, 9, 12, 13, 14 и 17; AA – 10 и 16; *b* – генотипы по гену *MSS51*: GG – дорожки 1, 2, 5, 11, 13, 17 и 18; GT – 3, 4, 7, 10, 14, 16 и 19; TT – 6, 8, 9, 12 и 15.

Обсуждение

Результаты, полученные в настоящей работе, подтверждают выявленные нами ранее ассоциации мутаций в генах *MSS51* и *KAT6B*, а также содержащего оба варианта мутантного гаплотипа, с живой массой коров в разном возрасте (Ruvinskiy et al., 2022). При использовании линейной

Таблица 2. Характеристики генотипированных миссенс-мутаций в выборке ярославских коров

Ген	Позиция (ARS-UCD1.2)	Замена	Генотип	Частота генотипа	Аллель	Частота аллеля
<i>KAT6B</i>	BTA28:30646253	G>A (Val105Met)	GG	0.28	G	0.545
			GA	0.531	A	0.455
			AA	0.189		
<i>MSS51</i>	BTA28:29414270	G>T (Ala415Glu)	GG	0.301	G	0.566
			GT	0.531	T	0.434
			TT	0.168		

Таблица 3. Ассоциации исследованных мутаций и мутантного гаплотипа с живой массой коров в разном возрасте

Ген/ гаплотип	Генотип/доза гаплотипа (число носителей)	Живая масса (кг) в возрасте					
		0 мес.	6 мес.	10 мес.	12 мес.	15 мес.	18 мес.
<i>KAT6B</i>	GG (40)	30.5±4.2	146.2±22.1	214.8±28.3	252.1±31.7	302.1±37.7	352.7±34.3
	GA (76)	29.4±4.4	136±18.3	209.3±25.8	246.3±28.9	300.7±36.9	344.3±42.8
	AA (27)	30.2±3.9	134.4±13.9	205.4±18.3	237±29.3	284.4±31.7	329.5±34.9
	<i>p</i> -значение (lm)	0.6081	0.0074	0.1241	0.0457	0.0734	0.021
	<i>p</i> -значение (aov)	0.3583	0.0113	0.302	0.1289	0.0972	0.0627
<i>MSS51</i>	GG (43)	30.6±4.4	146±20.9	215.8±28.6	252.8±31.6	302.7±38.1	351.7±34
	GT (76)	29.3±4.3	135.8±18.5	208.8±24.9	246.2±28.4	300.9±36.1	345.1±42.6
	TT (24)	30.2±4	134±14.5	203.9±18.7	234±29.5	280.3±31.1	325.7±34.9
	<i>p</i> -значение (lm)	0.5283	0.0051	0.0519	0.0161	0.0322	0.0145
	<i>p</i> -значение (aov)	0.3016	0.0084	0.1479	0.0482	0.0325	0.0324
Гаплотип	0 (44)	30.7±4.5	146.8±21.4	217.1±29.5	254.3±32.8	304.2±38.9	352.9±34.5
	1 (75)	29.2±4.2	135.1±17.9	208±24	245.2±27.3	300±35.5	344.3±42.4
	2 (24)	30.2±4	134±14.5	203.9±18.7	234±29.5	280.3±31.1	325.7±34.9
	<i>p</i> -значение (lm)	0.4048	0.0022	0.0251	0.007	0.0177	0.0089
	<i>p</i> -значение (aov)	0.1797	0.0024	0.0691	0.0261	0.0278	0.0248

Примечание. Данные приведены как среднее ± стандартное отклонение. lm – линейная регрессия; aov – однофакторный дисперсионный анализ. Жирным шрифтом выделены *p*-значения, достигающие статистической значимости.

регрессии как для отдельных мутаций, так и для гаплотипа достигается большая значимость ассоциации в большинстве возрастов по сравнению с однофакторным дисперсионным анализом. По-видимому, это свидетельствует об аддитивном эффекте мутантных аллелей/гаплотипа. Действительно, во всех возрастах, от 6 до 18 мес. включительно, можно наблюдать большее снижение массы у носителей двух копий мутантного аллеля/гаплотипа, по сравнению с носителями одной копии. При этом, поскольку обе мутации находятся в сильном неравновесии по сцеплению, сложно определить, какая из них каузативная, т. е. непосредственно влияет на фенотип. Проведенный в предыдущей работе *in silico* анализ эффекта аминокислотной замены предсказал значительное нарушение функции именно для мутации в *KAT6B* (Ruvinskiy et al., 2022). В то же время для миссенс-варианта в гене *MSS51* ассоциации с живой массой оказались более значимыми, по сравнению с геном *KAT6B*. Возможно, что для проявления влияния на массу тела важно одновременное наличие обеих мутаций. В пользу этого предположения говорит то, что наибольшей значимости ассоциации достигают именно с дозой мутантного гаплотипа.

Ген *MSS51* кодирует митохондриальный активатор трансляции, преимущественно экспрессирующийся в мышечной ткани и вовлеченный в различные метаболические процессы, такие как окисление жирных кислот, окислительное фосфорилирование и гликолиз (Moyer, Wagner, 2015). Показано, что мыши, нокаутные по *MSS51*, имеют пониженную массу тела по сравнению с нормой. Однако снижение веса у них происходило за счет жировой, а не мышечной ткани (Gonzalez et al., 2019). S. Chen с коллегами (2024) на модели мышей продемонстрировали участие гена *MSS51* в возрастной потере мышечной массы. При этом добавление к рациону животных бетаина, подав-

ляющего экспрессию мРНК *MSS51*, замедляло снижение мышечной массы и других функциональных показателей мышц с возрастом.

Ген *KAT6B* кодирует лизин-ацетилтрансферазу 6В, участвующую в модификации гистонов, а именно – ацетилировании H3K9 и H3K23, что повышает доступность хроматина в районах целевых генов и, соответственно, увеличивает их экспрессию (Bergamasco et al., 2024a). В связи с этим можно предположить, что мутация в *KAT6B* оказывает модифицирующее действие на активность *MSS51*. У человека мутации в гене *KAT6B* вызывают задержку роста и развития (Zhang et al., 2020; Zhu et al., 2020). Следует отметить исследование, в котором было показано, что мыши, гетерозиготные по делеции в гене *KAT6B*, демонстрируют значимое снижение массы тела, по сравнению с нормальными гомозиготами. При этом гомозиготы по делеции были нежизнеспособны (Bergamasco et al., 2024b). В совокупности биологические функции обоих генов свидетельствуют в пользу того, что каузативными могут быть оба миссенс-варианта одновременно, и их влияние на массу тела животных, вероятно, реализуется только при сочетании этих вариантов в гаплотипе.

Ограничением настоящей работы является тот факт, что исследуемая выборка представлена животными одного пола. Однако можно предположить, что обнаруженная нами связь массы тела с мутациями в генах *MSS51* и *KAT6B* будет иметь место и у быков. Так, в работе Е.М.М. van der Heide с коллегами (2016) для породы ангус было продемонстрировано, что показатели наследуемости массы тела в разных возрастах существенно не различаются между полами.

Отдельно нужно отметить, что живая масса животных ярославской породы за историю ее разведения существенно увеличилась. Так, в 1973 г. в племенных хозяйствах

Ярославской области средний вес телок в возрасте 0, 6, 12 и 18 мес. был 28, 134, 224 и 294 кг соответственно (Моноенков, 1974). В нашей выборке средний вес таких животных составляет 30, 139, 246 и 344 кг соответственно. В СССР важным селекционным признаком ярославского скота наряду с удоем была живая масса, поскольку при промышленной технологии более эффективны крупные животные, способные потреблять много корма и давать больше продукции с одного скотоместа (Моноенков, 1974).

Селекция на повышение живой массы была продолжена и в постсоветский период. Так, в большинстве хозяйств Ярославской области за период с 2000 по 2012 г. зафиксирован существенный прирост живой массы коров ярославской породы (Коренев и др., 2013). Этим можно объяснить факт, что частота мутантных аллелей в популяциях ярославского скота далека от фиксации. Можно предположить, что в ранний период формирования ярославской породы в процессе «народной селекции» шел отбор в пользу мутантного гаплотипа. Однако впоследствии в ходе селекционно-племенной работы, направленной в том числе на увеличение живой массы животных, частота этого гаплотипа в породе стала снижаться.

Ярославская порода КРС – порода молочного направления продуктивности. Однако, как было сказано выше, живая масса также является ее важным селекционным признаком. Кроме того, в России производство говядины в основном идет за счет откормочного контингента молодняка молочных пород, а также их помесей с мясными породами (Кочетков, 2011). В частности, есть успешный опыт создания гибридов ярославской породы с лимузинской (Кочетков, 2011) и галловейской (Бурмистров и др., 2013) породами. Полученные нами результаты могут быть использованы при маркер-ориентированной и геномной селекции на увеличение веса животных ярославской породы и ее гибридов.

Заключение

В настоящей работе мы подтвердили выявленные ранее ассоциации мутаций в генах *MSS51* и *KAT6B*, а также мутантного гаплотипа с живой массой у коров ярославской породы в разном возрасте. Полученные данные могут быть использованы для селекции на повышение живой массы животных в мясном скотоводстве.

Список литературы / References

Бурмистров В.А., Погосян Г.А., Асянин В., Голубева А.И. Чистопородные галловейские быки улучшают мясные качества ярославского скота при скрещивании. *Молочное и мясное скотоводство*. 2013;7:17-19.
[Burmistrov V.A., Pogosyan G.A., Asyanin V., Golubeva A.I. Crossbreeding to thorough-bred Galloway bulls improves beef-making qualities of cattle bred in the Yaroslavl region. *Molochnoye i Myasnoye Skotovodstvo = Dairy and Meat Cattle Breed*. 2013;7:17-19 (in Russian)]
Коренев М.М., Фураева Н.С., Хрусталева В.И., Урсол А.Ю., Воробьева С.С., Коновалов А.В., Косяченко Н.М., Ильина А.В., Муратова Н.С., Гвазава Д.Г., Тарасенкова Н.А., Малокова М.А. Селекционно-племенные мероприятия по сохранению и совершенствованию ярославской породы крупного рогатого скота на 2013–2020 годы. Ярославль: Канцлер, 2013

[Korenev M.M., Furaeva N.S., Khrustaleva V.I., Ursol A.Yu., Vorobyova S.S., Kononov A.V., Kosyachenko N.M., Ilyina A.V., Muratova N.S., Gvazava D.G., Tarasenkova N.A., Malyukova M.A. Breeding Measures for the Preservation and Improvement of the Yaroslavl Cattle Breed for 2013–2020. Yaroslavl: Kantsler Publ., 2013 (in Russian)]
Кочетков А.А. Использование мировых и отечественных породных ресурсов мясного скота для увеличения производства высококачественной говядины в условиях Северного Кавказа и Центральной зоны России: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. п. Лесные Поляны Московской обл.: ФГБНУ ВНИИплем, 2011 [Kochetkov A.A. Use of world and Russian breed resources of beef cattle to increase the production of high-quality meat in the North Caucasus and the central zone of Russia: Dr. (Agricultural Sci.) Dissertation. 2011 (in Russian)]
Моноенков М.И. Ярославская порода скота. Ярославль: Верхне-Волжское книжное издательство, 1974 [Monoenkov M.I. Yaroslavl Breed of Cattle. Yaroslavl, 1974 (in Russian)]
Тамарова Р.В. Сохраним ли мы нашу ярославскую кормилицу? К 140-летию создания ярославской породы. *Вестник АПК Верхневолжья*. 2009;3(7):20-23
[Tamarova R.V. Will we save our Yaroslavl wet nurse? On the 140th anniversary of the creation of the Yaroslavl breed. *Vestnik APK Verkhnevolzh'ya = Agroindustrial Complex of Upper Volga Region Herald*. 2009;3(7):20-23 (in Russian)]
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 J Genet Breed*. 2019;23(5):559-568. doi 10.18699/VJ19.525 (in Russian)]
Abdelmanova A.S., Kharzinova V.R., Volkova V.V., Mishina A.I., Dotsev A.V., Sermyagin A.A., Boronetskaya O.I., Petrikeeva L.V., Chinarov R.Y., Brem G., Zinovieva N.A. Genetic diversity of historical and modern populations of Russian cattle breeds revealed by microsatellite analysis. *Genes (Basel)*. 2020;11(8):940. doi 10.3390/genes11080940
Bergamasco M.I., Abeyssekera W., Garnham A.L., Hu Y., Li-Wai-Suen C.S.N., Sheikh B.N., Smyth G.K., Thomas T., Voss A.K. *KAT6B* is required for histone 3 lysine 9 acetylation and *SOX* gene expression in the developing brain. *Life Sci Alliance*. 2024a;8(2):e202402969. doi 10.26508/lsa.202402969
Bergamasco M.I., Vanyai H.K., Garnham A.L., Geoghegan N.D., Vogel A.P., Eccles S., Rogers K.L., Smyth G.K., Blewitt M.E., Hannan A.J., Thomas T., Voss A.K. Increasing histone acetylation improves sociability and restores learning and memory in *KAT6B*-haploinsufficient mice. *J Clin Invest*. 2024b;134(7):e167672. doi 10.1172/JCI167672
Chen S., He T., Chen J., Wen D., Wang C., Huang W., Yang Z., Yang M., Li M., Huang S., Huang Z., Zhu H. Betaine delays age-related muscle loss by mitigating *Mss51*-induced impairment in mitochondrial respiration via Yin Yang 1. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2024;15(5):2104-2117. doi 10.1002/jcsm.13558
Colombi D., Perini F., Bettini S., Mastrangelo S., Abeni F., Conte G., Marletta D., Cassandro M., Bernabucci U., Ciampolini R., Lasagna E. Genomic responses to climatic challenges in beef cattle: a review. *Anim Genet*. 2024;55(6):854-870. doi 10.1111/age.13474
Curone G., Filipe J., Cremonesi P., Piccioli-Cappelli F., Trevisi E., Amadori M. Relevance of the dairy cow biodiversity in the development of a profitable and environmentally sustainable livestock. *CABI Rev*. 2019;14:1-11. doi 10.1079/PAVSNNR201914024
Dmitriev N.G., Ernst L.K. Animal Genetics Resources of the USSR. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1989

- FAO. Status and Trends of Animal Genetic Resources. Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, 2024
- Gonzalez Y.I.R., Moyer A.L., LeTexier N.J., Bratti A.D., Feng S., Sun C., Liu T., Mula J., Jha P., Iyer S.R., Lovering R.M., O'Rourke B., Noh H.L., Suk S., Kim J.K., Essien Umanah G.K., Wagner K.R. *Mss51* deletion enhances muscle metabolism and glucose homeostasis in mice. *JCI Insight*. 2019;4(20):e122247. doi 10.1172/jci.insight.122247
- Iso-Touru T., Tapio M., Vilkki J., Kiseleva T., Ammosov I., Ivanova Z., Popov R., Ozerov M., Kantanen J. Genetic diversity and genomic signatures of selection among cattle breeds from Siberia, eastern and northern Europe. *Anim Genet*. 2016;47(6):647-657. doi 10.1111/age.12473
- Lu G., Moriyama E.N. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform*. 2004;5(4):378-388. doi 10.1093/bib/5.4.378
- Moyer A.L., Wagner K.R. Mammalian *Mss51* is a skeletal muscle-specific gene modulating cellular metabolism. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(4):371-385. doi 10.3233/JND-150119
- Ota M., Fukushima H., Kulski J.K., Inoko H. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc*. 2007;2(11):2857-2864. doi 10.1038/nprot.2007.407
- 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
- Ruvinskiy D., Igoshin A., Yurchenko A., Ilina A.V., Larkin D.M. Resequencing the Yaroslavl cattle genomes reveals signatures of selection and a rare haplotype on BTA28 likely to be related to breed phenotypes. *Anim Genet*. 2022;53(5):680-684. doi 10.1111/age.13230
- Sambrook J., Russell D.W. The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 2006
- van der Heide E.M.M., Lourenco D.A.L., Chen C.Y., Herring W.O., Sapp R.L., Moser D.W., Tsuruta S., Masuda Y., Ducro B.J., Misztal I. Sexual dimorphism in livestock species selected for economically important traits. *J Anim Sci*. 2016;94(9):3684-3692. doi 10.2527/jas.2016-0393
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:134. doi 10.1186/1471-2105-13-134
- 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
- Zhang L.X., Lemire G., Gonzaga-Jauregui C., Molidperee S., Galaz-Montoya C., Liu D.S., Verloes A., ... Bamshad M.J., Lee B.H., Yang X.-J., Lupski J.R., Campeau P.M. Further delineation of the clinical spectrum of *KAT6B* disorders and allelic series of pathogenic variants. *Genet Med*. 2020;22(8):1338-1347. doi 10.1038/s41436-020-0811-8
- Zhu L., Lv L., Wu D., Shao J. *KAT6B* genetic variant identified in a short stature chinese infant: a report of physical growth in clinical spectrum of *KAT6B*-related disorders. *Front Pediatr*. 2020;8:124. doi 10.3389/fped.2020.00124

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.12.2024. После доработки 25.12.2024. Принята к публикации 27.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-15

Особенности полиморфизма генов толл-лайк рецепторов (*TLR-2*, *TLR-3*, *TLR-4* и *TLR-6*) при открытоугольной глаукоме

А.В. Шевченко , В.Ф. Прокофьев , В.И. Коненков , В.В. Черных , А.Н. Трунов 

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

² Новосибирский филиал Национального медицинского исследовательского центра «МНТК «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

 shalla64@mail.ru

Аннотация. Современные исследования показывают, что в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) важную роль играет врожденный иммунитет. Выявлено повышение содержания толл-лайк рецепторов (TLR) в глаукоматозной сетчатке глаза человека. TLR могут модулировать иммунный ответ при глаукоме, обеспечивают раннее распознавание повреждающих агентов, активацию сигнальных путей и эффекторных механизмов системы неспецифической иммунной защиты, направленных на восстановление гомеостаза. Полиморфизм кодирующих *TLR* генов влияет на аминокислотную структуру рецепторов, приводя к изменению лигандсвязывающей и корцепторной функции, транспортировку и передачу сигналов. Целью работы был анализ ассоциированности полиморфизма генов *TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs5743810) с первичной открытоугольной глаукомой у пациентов Западной Сибири. Обследовано 99 пациентов (52 мужчины и 47 женщин) с диагнозом первичной открытоугольной глаукомы. Группу сравнения составили 100 человек (81 женщина и 19 мужчин). Полиморфизм генов *TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs5743810) анализировали методом РТ-ПЦР с использованием коммерческих тест-систем с интеркалирующим красителем Syber Green (Lytech, Россия). Статистический анализ проводился с использованием программного пакета SPSS 23.0 и Arlequin 3.5.2.2. Показано, что распределение полиморфных маркеров в группе пациентов и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Их частоты между двумя анализируемыми группами достоверно не различались. Частота *TLR2-753 ArgArg:TLR6-249 ProPro* была повышена в группе пациентов с ПОУГ. Выявлено неравновесное сцепление между двумя полиморфными позициям гена *TLR4*. Кроме того, выявлено нарушение равновесия между парами генов *TLR2-TLR6* для группы с глаукомой и контрольной группы. Повышение определенных генотипов в группе пациентов относительно контрольной группы может косвенно свидетельствовать об участии инфекционных факторов в инициации ПОУГ. Однако связь полиморфизма *TLR* генов, несмотря на доказанную значимость участия их белковых продуктов в патогенезе глаукомы, требует дополнительных исследований с учетом этнических особенностей пациентов и межгенных взаимодействий для лучшего понимания сложных механизмов развития заболевания. Это поможет проводить раннюю диагностику и разрабатывать необходимую терапевтическую стратегию.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома; ПОУГ; полиморфизм генов толл-лайк рецепторов; TLR; неравновесное сцепление.

Для цитирования: Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Черных В.В., Трунов А.Н. Особенности полиморфизма генов толл-лайк рецепторов (*TLR-2*, *TLR-3*, *TLR-4* и *TLR-6*) при открытоугольной глаукоме. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):128-134. doi 10.18699/vjgb-25-15

Features of toll-like receptor genes (*TLR-2*, *TLR-3*, *TLR-4* and *TLR-6*) polymorphism in open-angle glaucoma patients

A.V. Shevchenko , V.F. Prokofiev , V.I. Konenkov , V.V. Chernykh , A.N. Trunov 

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk Branch of the S.N. Fedorov National Medical Research Center “MNTK “Eye Microsurgery” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

 shalla64@mail.ru

Abstract. Modern research shows that innate immunity plays an important role in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma (POAG). An increase in the content of toll-like receptors (TLR) in the glaucomatous retina of the human eye was revealed. TLRs can modulate the immune response in glaucoma; provide early recognition of damaging agents, activation of signaling pathways and effector mechanisms of the nonspecific immune defense system aimed at restoring homeostasis. The *TLR*-encoding genes' polymorphism alters the amino acid structure of the recep-

tors, which leads to changes in their immune functions: expression level, ligand-binding and coreceptor functions, transport and signal transmission. The aim was to analyze the association of the *TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791) and *TLR6* (rs5743810) polymorphisms with primary open-angle glaucoma in patients of Western Siberia. Methods: 99 patients (52 men and 47 women) with a diagnosis of primary open-angle glaucoma were examined. The comparison group consisted of 100 people (81 women and 19 men). *TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791) and *TLR6* (rs5743810) polymorphisms were analyzed by RT-PCR using test systems with Syber Green (Lytx, Russia). Statistical analysis was performed using the software package SPSS 23.0 and Arlequin 3.5.2.2. Results: the distribution of genotypes in the patient group and in the control group corresponded to the Hardy–Weinberg equilibrium. The genotype frequencies did not significantly differ between the two analyzed groups. The frequency of *TLR2-753* ArgArg:*TLR6-249* ProPro was increased in the group of patients with POAG. The linkage disequilibrium between two polymorphic positions of the *TLR4* gene was revealed. In addition, the linkage disequilibrium between *TLR2-TLR6* gene for the glaucoma group and the control group was revealed. Conclusion: an increase in certain genotypes in the patient group relative to the control group may indirectly indicate the involvement of infectious factors in the initiation of POAG. However, despite the proven importance of the participation of their protein products in the pathogenesis of glaucoma, the relationship of *TLR* polymorphism requires additional research taking into account the ethnic characteristics of patients and intergenic interactions for a better understanding of the complex mechanisms of disease development. This will help carry out early diagnosis and develop the necessary therapeutic strategy.

Key words: primary open-angle glaucoma; POAG; polymorphism of toll-like receptor genes; TLR; linkage disequilibrium.

For citation: Shevchenko A.V., Prokofiev V.F., Konenkov V.I., Chernykh V.V., Trunov A.N. Features of toll-like receptor genes (*TLR-2*, *TLR-3*, *TLR-4* and *TLR-6*) polymorphism in open-angle glaucoma patients. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):128-134. doi 10.18699/vjgb-25-15

Ведение

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – многофакторное заболевание, приводящее к прогрессирующей и необратимой потере зрения, – на сегодняшний день является серьезной медицинской проблемой, в том числе из-за недостаточно изученных механизмов повреждения зрительного нерва и гибели ганглиозных клеток сетчатки (Baudouin et al., 2021; Tezel, 2022). Современные исследования показывают, что в патогенезе ПОУГ важную роль играет врожденный иммунитет. Установлено, что индукторами воспаления на клеточном уровне при глаукоме являются молекулярные структуры DAMP (damage associated molecular patterns), высвобождающиеся из тканевых оболочек глаза при их повреждении, в том числе образующиеся в результате повышения уровня внутриглазного давления (Tezel, 2022). Избыточное накопление DAMP идентифицируется клеточными паттерн-распознающими рецепторами (PRR), которые расположены на эндосомальных мембранах и в цитоплазме. Было показано, что при развитии ПОУГ PRR обеспечивают раннее распознавание повреждающих агентов, активацию сигнальных путей и эффекторных механизмов системы неспецифической иммунной защиты, направленных на восстановление гомеостаза (Luo et al., 2010).

Наиболее хорошо изученным семейством PRR являются Toll-подобные рецепторы (TLR), экспрессия которых была выявлена во всех мембранах человеческого глаза (Stewart et al., 2015). Протеомные и иммуногистохимические исследования показали увеличение уровня экспрессии TLR в глаукоматозной сетчатке глаза человека, что указывает на то, что TLR могут модулировать иммунный ответ при глаукоме (Luo et al., 2010; Titi-Lartey et al., 2022). На сегодняшний день у человека идентифицировано две группы функционально различающихся TLR: трансмембранные, к которым относятся TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR11, и внутриклеточные – TLR3,

TLR7, TLR8, TLR9. Показано, что полиморфизм кодирующих TLR генов влияет на аминокислотную структуру рецепторов, лиганд-связывающую и корецепторную функции, транспортировку и передачу сигналов. Кроме того, особенности функций связаны с местоположением полиморфного сайта *TLR*. Полиморфизм локусов, кодирующих внеклеточный домен рецептора, может дополнительно внести к изменению аффинности связывания и последующему иммунному ответу, тогда как мутации в цитоплазматическом домене TLR могут привести к изменению нижестоящей передачи сигналов, несмотря на нормальное связывание (Törmänen et al., 2017; Macedo et al., 2019; Zhang et al., 2021). Цель нашего исследования – анализ ассоциированности полиморфных маркеров *TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs5743810) с первичной открытоугольной глаукомой у пациентов Западной Сибири.

Материалы и методы

Пациенты. Обследовано 99 пациентов с диагнозом II стадии первичной открытоугольной глаукомы – 52 (52.53 %) мужчины и 47 (47.47 %) женщины. Средний возраст пациентов составил 62.8 ± 4.3 года. Диагноз был установлен на основании офтальмологического обследования (определение остроты зрения, бинокулярная офтальмоскопия, сферопериметрия, эхофтальмография, оптическая когерентная томография, измерение внутриглазного давления). Критериями постановки диагноза служили выраженное изменение поля зрения в парацентральной области; сужение поля зрения со стороны носа в верхнем или нижнем носовом сегменте более чем на 10° относительно нормальных значений, но не менее 15° от точки фиксации; краевой характер углубления зрительного нерва. Пациенты основной группы имели компенсированное (<22 мм рт. ст. на фоне медикаментозной терапии) или умеренно повышенное (<33 мм рт. ст.) внутриглазное давление. В группу

сравнения вошли 100 человек – 81 женщина и 19 мужчин. Средний возраст составил 63.5 ± 0.4 года. Критерием включения в группу сравнения было отсутствие диагноза глаукомы у испытуемых.

Обе группы пациентов достоверно не различались по возрастным характеристикам. Пациентами обеих групп были представители фенотипически европеоидного населения России, родившиеся на этой территории, идентифицирующие себя и своих предков как «русских». Критериями исключения для обеих групп были: острые или обострения хронических воспалительных заболеваний органа зрения, наличие диабетической ретинопатии, неоваскулярной глаукомы, увеитов различной этиологии и локализации, гемофтальма, аутоиммунных и опухолевых процессов любой локализации, сахарного диабета без офтальмологических проявлений. Исследование было одобрено комитетами по биомедицинской этике НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (протокол № 177 от 02.02.2003) и Новосибирского филиала Национального медицинского исследовательского центра МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Министерства здравоохранения РФ (протокол № 2 от 02.09.2018). От всех пациентов было получено информированное согласие на забор крови и на использование данных исследования в научных целях.

Выделение ДНК и генотипирование. Цельную кровь пациентов забирали утром натощак в вакутейнер с ЭДТА. Геномную ДНК выделяли с использованием фенолхлороформного метода. Однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP) генов *TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs5743810) выявляли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПТ-ПЦР) с

использованием коммерческих тест-систем с интеркалирующим красителем Syber Green (Lytech, Россия) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Статистический анализ. В исследовании использована схема «случай-контроль». Распределение полиморфных маркеров в группе пациентов и контрольной группе было проверено на соответствие равновесию Харди–Вайнберга с использованием критерия хи-квадрат. Различия в частотах определены с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым. Если нулевые гипотезы не подтверждались при заданном уровне значимости $\alpha = 0.05$, то в случаях множественных сравнений проводилось определение скорректированного значения $p_{\text{сог}}$ с использованием поправки Бонферрони, рассчитанной одношаговым методом (Наркевич и др., 2020). Отношения шансов (OR) рассчитывали с 95 % доверительным интервалом. Анализ неравновесного сцепления проведен методом анализа максимального правдоподобия. Для статистики использовали программный пакет SPSS 23.0 и Arlequin 3.5.2.2.

Результаты

Нами проведен анализ полиморфных вариантов кодирующих регионов генов *TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs5743810) в группе пациентов с первичной открытоугольной глаукомой II (развитой) стадии относительно контрольной группы. Распределение полиморфных маркеров в группе пациентов и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (табл. 1).

Распределение частот генотипов в анализируемых нами позициях между двумя группами достоверно не различалось (табл. 2). Предполагая, что наличие особенностей сложных сетевых взаимодействий белковых про-

Таблица 1. Соответствие частот полиморфных маркеров равновесию Харди–Вайнберга у больных глаукомой и в контрольной группе

Полиморфная позиция	Аминокислота (генотип)	Пациенты с глаукомой				Контрольная группа			
		Частоты		χ^2	p	Частоты		χ^2	p
		наблюдаемые	ожидаемые			наблюдаемые	ожидаемые		
<i>TLR2-753</i> (rs5743708)	ArgArg (GG)	91.92	90.20	3.39	0.18	86.0	86.49	0.57	0.75
	ArgGln (GA)	7.07	8.59			14.0	13.02		
	GlnGln (AA)	1.01	0.20			0.0	0.49		
<i>TLR3-412</i> (rs3775291)	LeuLeu (AA)	52.53	48.79	2.38	0.31	49.0	46.24	1.61	0.45
	LeuPhe (AG)	35.35	41.42			38.0	43.52		
	PhePhe (GG)	12.12	8.79			13.0	10.24		
<i>TLR4-299</i> (rs4986790)	AspAsp (AA)	80.81	80.01	0.00	1.00	82.0	81.00	1.25	0.54
	AspGly (AG)	18.18	17.98			16.0	18.00		
	GlyGly (GG)	1.01	1.01			2.0	1.00		
<i>TLR4-399</i> (rs4986791)	ThrThr (CC)	82.83	81.82	0.05	0.98	88.0	88.36	0.41	0.82
	ThrIle (CT)	16.16	16.36			12.0	11.28		
	IleIle (CC)	1.01	0.82			0.0	0.36		
<i>TLR6-249</i> (rs5743810)	ProPro (CC)	47.47	42.68	3.71	0.16	36.0	36.60	0.06	0.97
	ProSer (CT)	36.36	44.65			49.0	47.80		
	SerSer (TT)	16.17	11.68			15.0	15.60		

Таблица 2. Анализ полиморфных маркеров у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой и в контрольной группе

Полиморфная позиция	Аминокислота (генотип)	Пациенты с ПОУГ N (%)	Контрольная группа N (%)	OR	OR_CI95	p*
<i>TLR2-753</i> (rs5743708)	ArgArg (GG)	91 (91.9)	86 (86.0)	1.85	0.74–4.63	0.258
	ArgGln (GA)	7 (7.1)	14 (14.0)	0.47	0.18–1.21	0.165
	GlnGln (AA)	1 (1.0)	0 (0.0)	2.04	0.18–22.86	0.497
<i>TLR3-412</i> (rs3775291)	LeuLeu (AA)	52 (52.5)	48 (48.5)	1.18	0.67–2.05	0.670
	LeuPhe (AG)	35 (35.3)	38 (38.4)	0.88	0.49–1.56	0.768
	PhePhe (GG)	12 (12.1)	13 (13.1)	0.91	0.39–2.11	1.000
<i>TLR4-299</i> (rs4986790)	AspAsp (AA)	80 (80.8)	82 (82.0)	0.92	0.45–1.89	0.857
	AspGly (AG)	18 (18.2)	16 (16.0)	1.17	0.56–2.44	0.710
	GlyGly (GG)	1 (1.0)	2 (2.0)	0.50	0.04–5.60	1.000
<i>TLR4-399</i> (rs4986791)	ThrThr (CC)	82 (82.8)	88 (88.0)	0.66	0.30–1.46	0.322
	ThrIle (CT)	16 (16.2)	12 (12.0)	1.41	0.63–3.17	0.422
	IleIle (CC)	1 (1.0)	0 (0.0)	2.04	0.18–22.86	0.497
<i>TLR6-249</i> (rs5743810)	ProPro (CC)	47 (47.5)	36 (36.0)	1.61	0.91–2.83	0.115
	ProSer (CT)	36 (36.4)	49 (49.0)	0.59	0.34–1.05	0.086
	SerSer (TT)	16 (16.2)	15 (15.0)	1.09	0.51–2.35	0.847
<i>TLR2-753:TLR6-249</i>	ArgArg:ProPro (GG:CC)	46 (46.5)	32 (32.0)	1.84	1.04–3.28	0.042

Примечание. OR_CI95 – 95 % доверительный интервал для OR, p* – уровень статистической значимости различий по точному методу Фишера (двусторонний).

Таблица 3. Характеристика однонуклеотидных замен в анализируемых позициях

SNP	Аллели анализируемого гена (основной/минорный)	Позиция на хромосоме, п. о.	Частота минорного аллеля		p
			Пациенты с глаукомой	Контрольная группа	
rs5743708	<i>TLR2</i> (G/A)	Chr4:153705165	0.045	0.071	0.39
rs3775291	<i>TLR3</i> (A/G)	Chr4:186082920	0.298	0.323	0.66
rs4986790	<i>TLR4</i> (A/G)	Chr9:117713024	0.101	0.100	1.00
rs4986791	<i>TLR4</i> (C/T)	Chr9:117713324	0.091	0.060	0.26
rs5743810	<i>TLR6</i> (C/T)	Chr4:38828729	0.343	0.395	0.30

Примечание. Позиция – расстояние от теломеры короткого плеча хромосомы, п. о. – пары оснований.

дуктов исследуемых нами генов является отражением их генетической структуры, мы проанализировали различия комплексов генотипов в двух группах. Нами выявлен единственный комплекс *TLR2-753* ArgArg:*TLR6-249* ProPro, частота которого повышена в группе пациентов с ПОУГ (OR = 1.84, p = 0.042, p_{cor} = 0.297).

Поскольку анализируемые нами полиморфные позиции *TLR4* расположены в одном экзоне гена, а полиморфные локусы генов *TLR2*, *TLR3*, *TLR6* – на одной хромосоме, мы провели анализ неравновесного сцепления (LD) указанных позиций. Характеристика анализируемых однонуклеотидных замен генов *TLR* дана в табл. 3. Частота минорного аллеля в большинстве анализируемых нами локусов составляла более 5 %, за исключением rs5743708 гена *TLR2*.

Нами выявлено неравновесие по сцеплению между двумя полиморфными позициям гена *TLR4* (табл. 4). Анализ множественных SNP показал, что для обеих групп наиболее распространенным гаплотипом для SNP rs4986790 и

rs4986791 *TLR4* является A/C; гаплотип A/T полностью отсутствует в группе сравнения. Значения D' (коэффициент Левонтина) между SNP rs4986790 и rs4986791 составляют 0.8146 в группе пациентов и 1.0000 в группе сравнения. Кроме того, наблюдается нарушение равновесия между парами генов *TLR2-TLR6* (D' = 0.6615 и 0.5277 для группы с глаукомой и контрольной группы соответственно) и слабое неравновесие для пары *TLR3-TLR6* (D' = 0.1997 и 0.2008 в группе с глаукомой и в контрольной группе соответственно). При этом анализ частот гаплотипов между группами не выявил значимых различий.

Обсуждение

Открытоугольная глаукома считается многофакторным заболеванием с убедительными доказательствами участия в ее развитии генетической компоненты. Исследования генетических ассоциаций на сегодняшний день выявили множество локусов, которые способствуют генетическому риску развития ПОУГ. TLR являются важными фактора-

Таблица 4. Частоты гаплотипов и параметры неравновесного сцепления между анализируемыми полиморфными локусами

Полиморфная позиция	Гаплотип	Пациенты с глаукомой, N = 99		Контрольная группа, N = 100		p
		Частота	Параметры сцепления	Частота	Параметры сцепления	
TLR4 (rs4986790), TLR4 (rs4986791)	A/C	0.884	$\chi^2 = 116.94$	0.900	$\chi^2 = 114.89$	1.00
	A/T	0.015	$p = 0.000$	0.000	$p = 0.000$	0.12
	G/C	0.025	$df = 1$	0.040	$r^2 = 0.574$	0.57
	G/T	0.076	$r^2 = 0.591$	0.060	$r^2 = 0.574$	0.56
TLR2 (rs5743708)/ TLR3 (rs3775291)	G/A	0.677	$\chi^2 = 0.97$	0.641	$\chi^2 = 2.15$	0.46
	G/G	0.278	$p = 0.325$	0.288	$p = 0.142$	0.82
	A/A	0.025	$df = 1$	0.035	$df = 1$	0.58
	A/G	0.020	$r^2 = 0.005$	0.035	$r^2 = 0.011$	0.38
TLR2 (rs5743708)/ TLR6 (rs5743810)	A/C	0.646	$\chi^2 = 7.89$	0.585	$\chi^2 = 6.42$	0.22
	A/T	0.308	$p = 0.005$	0.345	$p = 0.011$	0.46
	G/C	0.010	$df = 1$	0.020	$df = 1$	0.69
	G/T	0.035	$r^2 = 0.040$	0.050	$r^2 = 0.032$	0.62
TLR3 (rs3775291)/ TLR6 (rs5743810)	A/C	0.500	$\chi^2 = 6.41$	0.449	$\chi^2 = 5.87$	0.32
	A/T	0.202	$p = 0.011$	0.227	$p = 0.015$	0.54
	G/C	0.157	$df = 1$	0.157	$df = 1$	1.00
	G/T	0.141	$r^2 = 0.032$	0.167	$r^2 = 0.030$	0.49

Примечание. df – степень свободы, r^2 – коэффициент корреляции Пирсона.

ми врожденной иммунной системы, однако результаты исследования, касающиеся связи *TLR* полиморфизма с заболеванием, достаточно противоречивы.

Известно, что *TLR2* является медиатором дегенерации сетчатки в ответ на окислительный стресс, функционирует как «мост» между окислительным повреждением и комплемент-опосредованной патологией сетчатки и связан с развитием ряда офтальмопатологий (Mulfaul et al., 2020; Titi-Lartey et al., 2022). Показано, что миссенс-мутация p.Arg753Gln приводит к дефициту передачи сигналов *TLR2* за счет нарушения гетеродимеризации *TLR2-TLR6*, фосфорилирования тирозина и дальнейшего каскада, не влияя при этом на экспрессию *TLR2* (Xiong et al., 2012). Мы, однако, не выявили ассоциированности полиморфизма *TLR2* и *TLR6* в анализируемых нами позициях с развитием ПОУГ. Аналогичные результаты показаны японскими исследователями для *TLR2* (Nakamura et al., 2009). Данные о полиморфизме гена *TLR6* при глаукоме в литературе нами не обнаружены. При этом при построении трехмерной модели для *TLR6* выявлены конформационные изменения в структуре белка при наличии Pro249Ser, предположительно влияющие на связывание лигандов и рецепторов. У дикого типа карманы связывания вблизи пролина (Pro) – большого объема, тогда как у мутантного типа стенки карманов расположены близко друг к другу. Это существенно влияет на способность мутантного белка вступать в значимые взаимодействия, поскольку большинство областей связывания и активных сайтов расположены в наибольшей полости карманов. Кроме того, белок дикого типа, будучи более гибким, имеет больше возможностей для движений, индуцированных лигандом, в то время как в мутантном движении, индуцированном лигандом, ограничено только перегруппиров-

ками боковой цепи. К тому же мутантный белок менее стабилен. Все это подтверждает, что полиморфизм *TLR6* влияет на структуру и функциональность белка (Hamann et al., 2013; Semlali et al., 2018). Учитывая, что *TLR2* и *TLR6* функционируют при образовании гетеродимера, мы провели анализ их комплексного полиморфизма при развитии ПОУГ и выявили, что у носителей гомозиготного генотипа дикого типа *TLR2-753 ArgArg:TLR6-249 ProPro* отношения шансов развития заболевания выше, что может объясняться именно особенностями совместного функционирования при распознавании лигандов и стимулировании дальнейшего иммунного каскада. Поскольку гены *TLR2* и *TLR6* расположены в одной хромосоме, мы провели анализ неравновесного сцепления и показали нарушение LD анализируемых позиций генов *TLR2-TLR6*. Это означает, что определенные аллели двух генов могут появляться в едином гаплотипе чаще, чем можно ожидать при случайном сочетании. При этом мы не выявили различий в частотах гаплотипов. Нарушение по сцеплению для данных полиморфных позиций было показано и в другом исследовании (Сташкевич и др., 2022).

Связь полиморфизма гена *TLR3* в анализируемой нами позиции наблюдается при ряде офтальмопатологий (Titi-Lartey et al., 2022). Стратификационный анализ по этнической принадлежности указывает на связь rs3775291 со всеми формами макулярной дегенерации только у европеоидов, но не у выходцев из Восточной Азии (Ma et al., 2016). Полиморфизм Leu412Phe влияет на нормальную димеризацию *TLR3*, что приводит к изменению активности белка, необходимой для правильной передачи сигналов (Ranjith-Kumar et al., 2007). Показано, что при глаукоме *TLR3* и *TLR4* инициируют некроптоз-регулируемую провоспалительную литическую форму некротической

гибели клеток, характеризующуюся набуханием клеток с последующим разрывом плазматической мембраны и высвобождением клеточного содержимого (Basavarajappa et al., 2023). Активность *TLR3*, участвующего в распознавании нуклеиновых кислот, высвобождаемых из поврежденных клеток, связывают в основном с ранней стадией глаукомы (Soto, Howell, 2014). Однако ассоциация полиморфизма этого гена с глаукомой вызывает дискуссию в литературе. Несколько исследований локуса *WDR36* гена *TLR3*, содержащего SNP rs3775291, продемонстрировали его роль в качестве гена-модификатора при ПОУГ за связь с клинической тяжестью протекания процесса (Hauser et al., 2006; Meer et al., 2021). Однако проведенный мета-анализ 122 публикаций не подтвердил значительную роль данной полиморфной позиции в генетической предрасположенности к ПОУГ или ее подтипам (Liu et al., 2017). Авторы склоняются к необходимости дальнейших исследований в конкретных популяциях.

Полиморфизмы rs4986790 и rs4986791 в третьем экзоне гена *TLR4* являются одними из наиболее известных и часто изучаемых SNP. Полиморфизм в данных позициях приводит к изменению полипептидных цепей экстрацеллюлярного домена рецептора и влияет на связывание с корецептором, что приводит к гипореактивности рецептора. Это может вызывать дисфункцию молекулы *TLR4* и нарушать работу иммунной системы (Arbour et al., 2000; Jahantigh et al., 2013; Lin et al., 2019). В настоящее время результаты проведенных метаанализов ассоциированности этих SNP с ПОУГ свидетельствуют о том, что данные в разных этнических группах различаются и необходимы дальнейшие исследования (Chaiwiang, Poyomtip, 2019; Lin et al., 2019). При этом практически во всех работах показано неравновесное сцепление полиморфных локусов *TLR4* (rs4986790) и *TLR4* (rs4986791) (Guimarães et al., 2018; Kania et al., 2022), что подтверждается и в нашем исследовании. Это свидетельствует о том, что рекомбинации участков хромосомы, на которой расположены данные полиморфные маркеры, наследуются единым блоком. Существует мнение, что при наличии высокой степени мультилокусного LD именно анализ гаплотипов может существенно увеличить статистическую значимость исследования (Jiang et al., 2014). Однако нами не выявлено достоверных различий анализируемых частот гаплотипов гена *TLR4*.

Поскольку рецепторы *TLR1*, 2, 4, 5, 6 и 10 относятся к поверхностным мембранным рецепторам, распознающим в основном липидные компоненты бактериальных структур, а *TLR3*, 7, 8 и 9 экспрессируются на мембранах внутриклеточных органелл, лигандами для которых являются компоненты нуклеиновых кислот вирусов (Akira et al., 2001; Sameer, Nissar, 2021), повышение частоты ряда генотипов генов *TLR* в группе пациентов может косвенно свидетельствовать об участии инфекционных факторов в инициации ПОУГ.

Заключение

Таким образом, связь полиморфизма *TLR* генов с ПОУГ, несмотря на доказанную значимость участия их белковых продуктов в патогенезе, требует дополнительных исследований с учетом этнических особенностей пациентов. Кро-

ме того, необходимо учитывать взаимодействия ген-ген для лучшего понимания сложных механизмов развития заболевания, что будет способствовать ранней диагностике ПОУГ и разработке необходимой терапевтической стратегии.

Список литературы / References

- Наркевич А.Н., Виноградов К.А., Гржибовский А.М. Множественные сравнения в биомедицинских исследованиях: проблема и способы решения. *Экология человека*. 2020;27(10):55-64. doi 10.33396/1728-0869-2020-10-55-64
- [Narkevich A.N., Vinogradov K.A., Grjibovski A.M. Multiple comparisons in biomedical research: the problem and its solutions. *Ekologiya Cheloveka = Human Ecology*. 2020;27(10):55-64. doi 10.33396/1728-0869-2020-10-55-64 (in Russian)]
- Сташкевич Д.С., Беляева С.В., Евдокимов А.В. Сравнительная оценка генетического полиморфизма Toll-подобных рецепторов 2 и 6 в ассоциации с предрасположенностью к неспецифическому язвенному колиту и синдрому раздраженного кишечника у русских Челябинской области. *Российский иммунологический журнал*. 2022;25(3):327-332. doi 10.46235/1028-7221-1139-CAO [Stashkevich D.S., Belyaeva S.V., Evdokimov A.V. Comparative assessment of genetic polymorphism of Toll-like 2 and 6 receptors predisposing for non-specific ulcerative colitis and irritable bowel syndrome in Russians from Chelyabinsk Region. *Rossiiskii Immunologicheskii Zhurnal = Russ J Immunol*. 2022;25(3):327-332. doi 10.46235/1028-7221-1139-CAO (in Russian)]
- Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2:675-680. doi 10.1038/90609
- Arbour N.C., Lorenz E., Schutte B.C., Zabner J., Kline J.N., Jones M., Frees K., Watt J.L., Schwartz D.A. *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000; 25(2):187-191. doi 10.1038/76048
- Basavarajappa D., Galindo-Romero C., Gupta V., Agudo-Barriuso M., Gupta V.B., Graham S.L., Chitranshi N. Signalling pathways and cell death mechanisms in glaucoma: insights into the molecular pathophysiology. *Mol Aspects Med*. 2023;94:101216. doi 10.1016/j.mam.2023.101216
- Baudouin C., Kolko M., Melik-Parsadaniantz S., Messmer E.M. Inflammation in glaucoma: from the back to the front of the eye, and beyond. *Prog Retin Eye Res*. 2021;83:100916. doi 10.1016/j.preteyeres.2020.100916
- Chaiwiang N., Poyomtip T. The association of toll-like receptor 4 gene polymorphisms with primary open angle glaucoma susceptibility: a meta-analysis. *Biosci Rep*. 2019;39(4):BSR20190029. doi 10.1042/BSR20190029
- Guimarães L.O., Bajayb M.M., Monteiro E.F., Wunderliche G., Santosd S.E., Kirchgatter K. Genetic ancestry effects on the distribution of toll-like receptors (TLRs) gene polymorphisms in a population of the Atlantic Forest, São Paulo, Brazil. *Hum Immunol*. 2018; 79(2):101-108. doi 10.1016/j.humimm.2017.11.007
- Hamann L., Koch A., Sur S., Hoefler N., Glaeser C., Schulz S., Gross M., Franke A., Nöthlings U., Zacharowski K., Schumann R.R. Association of a common *TLR-6* polymorphism with coronary artery disease – implications for healthy ageing? *Immun Ageing*. 2013;10(1):43. doi 10.1186/1742-4933-10-43
- Hauser M.A., Allingham R.R., Linkroum K., Wang J., LaRocque-Abramson K., Figueiredo D., Santiago-Turla C., del Bono E.A., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Wiggs J.L. Distribution of *WDR36* DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(6):2542-2546. doi 10.1167/iovs.05-1476
- Jahantigh D., Salimi S., Alavi-Naini R., Emamdadi A., Osqee H.O., Mashhadi F.F. Association between *TLR4* and *TLR9* gene polymorphisms with development of pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeastern Iran. *Sci World J*. 2013;2013:534053. doi 10.1155/2013/534053

- Jiang D., Ma G., Yang R., Li K., Fang M. Bayesian model selection for multiple QTLs mapping combining linkage disequilibrium and linkage. *Genet Res.* 2014;96:e10. doi 10.1017/S0016672314000135
- Kania K.D., Hareža D., Wilczyński J.R., Wilczyński M., Jarych D., Malinowski A., Paradowska E. The Toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly is associated with an increased risk of ovarian cancer. *Cells.* 2022;11(19):3137. doi 10.3390/cells11193137
- Lin Z., Huang S., Sun J., Xie B., Zhong Y. Associations between TLR4 polymorphisms and open angle glaucoma: a meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2019;2019:6707650. doi 10.1155/2019/6707650
- Liu K., Wenling H., Jun Z., Yingxia Z., Hongbo C. Association of WDR36 polymorphisms with primary open angle glaucoma. A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017;96:e7291. doi 10.1097/MD.00000000000007291
- Luo C., Yang X., Kain A.D., Powell D.W., Kuehn M.H., Tezel G. Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial Toll-like receptor signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(11):5697-5707. doi 10.1167/iovs.10-5407
- Ma L., Tang F., Chu W., Young A., Brelen M., Pang C., Chen L. Association of toll-like receptor 3 polymorphism rs3775291 with age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:19718. doi 10.1038/srep19718
- Macedo A.B., Novis C.L., Bosque A. Targeting cellular and tissue HIV reservoirs with Toll-like receptor agonists. *Front Immunol.* 2019;10:2450. doi 10.3389/fimmu.2019.02450
- Meer E., Aleman T.S., Ross A.G. WDR36-associated neurodegeneration: a case report highlights possible mechanisms of normal tension glaucoma. *Genes.* 2021;12:1624. doi 10.3390/genes12101624
- Mulfaul K., Ozaki E., Fernando N., Brennan K., Chirco K., Connolly E., Greene C., Maminishkis A., Salomon R., Linetsky M., Natoli R., Mullins R., Campbell M., Doyle S. Toll-like receptor 2 facilitates oxidative damage-induced retinal degeneration. *Cell Rep.* 2020;30(7):2209-2224.e5. doi 10.1016/j.celrep.2020.01.064
- Nakamura J., Meguro A., Ota M., Nomura E., Nishide T., Kashiwagi K., Mabuchi F., Iijima H., Kawase K., Yamamoto T., Nakamura M., Negi A., Sagara T., Nishida T., Inatani M., Tanihara H., Aihara M., Araie M., Fukuchi T., Abe H., Higashide T., Sugiyama K., Kanamoto T., Kiuchi Y., Iwase A., Ohno S., Inoko H., Mizuki N. Association of toll-like receptor 2 gene polymorphisms with normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 2009;15:2905-2910
- Ranjith-Kumar C.T., Miller W., Sun J., Xiong J., Santos J., Yarbrough I., Lamb R.J., Mills J., Duffy K., Hoose S., Cunningham M., Holzenburg A., Mbow M., Sarisky R., Kao C. Effects of single nucleotide polymorphisms on Toll-like receptor 3 activity and expression in cultured cells. *J Biol Chem.* 2007;282(24):17696-17705. doi 10.1074/jbc.M700209200
- Sameer A.S., Nissar S. Toll-like receptors (TLRs): structure, functions, signaling, and role of their polymorphisms in colorectal cancer susceptibility. *Biomed Res Int.* 2021;2021:1157023. doi 10.1155/2021/1157023
- Semlali A., Almutairi M., Rouabhia M., Reddy Parine N., Al Amri A., Al-Numair N.S., Hawsawi Y.M., Saud Alanazi M. Novel sequence variants in the *TLR6* gene associated with advanced breast cancer risk in the Saudi Arabian population. *PLoS One.* 2018;13(11):e0203376. doi 10.1371/journal.pone.0203376
- Soto I., Howell G.R. The complex role of neuroinflammation in glaucoma. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(8):a017269. doi 10.1101/cshperspect.a017269
- Stewart E.A., Wei R., Branch M.J., Sidney L.E., Amoaku W.M. Expression of Toll-like receptors in human retinal and choroidal vascular endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2015;138:114-123. doi 10.1016/j.exer.2015.06.012
- Tezel G. Molecular regulation of neuroinflammation in glaucoma: current knowledge and the ongoing search for new treatment targets. *Prog Retin Eye Res.* 2022;87:100998. doi 10.1016/j.preteyeres.2021.100998
- Titi-Lartey O., Mohammed I., Amoaku W.M. Toll-like receptor signaling pathways and the pathogenesis of retinal diseases. *Front Ophthalmol.* 2022;2:850394. doi 10.3389/fopht.2022.850394
- Törmänen S., Korppi M., Teräsjarvi J., Vononvirta J., Koponen P., Helminen M., He Q., Nuolivirta K. Polymorphism in the gene encoding toll-like receptor 10 may be associated with asthma after bronchiolitis. *Sci Rep.* 2017;7:2956. doi 10.1038/s41598-017-03429-x
- Xiong Y., Song C., Snyder G.A., Sundberg E.J., Medvedev A.E. R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88. *J Biol Chem.* 2012;287(45):38327-38337. doi 10.1074/jbc.M112.375493
- Zhang Y., Liu J., Wang C., Liu J., Lu W. Toll-Like receptors gene polymorphisms in autoimmune disease. *Front Immunol.* 2021;12:672346. doi 10.3389/fimmu.2021.672346

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.04.2024. После доработки 12.08.2024. Принята к публикации 24.10.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-16

Роль полиморфизма гена *SELE* при инфаркте миокарда с подъемом сегмента ST

Н.П. Бабушкина ¹ , А.М. Николаева ², А.Д. Долбня³, В.Е. Шаврак⁴, В.В. Рябов^{2, 3, 4}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

² Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

⁴ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

 nad.babushkina@medgenetics.ru

Аннотация. Ишемическая болезнь сердца представляет собой важную медико-социальную проблему. Наиболее тяжелой формой заболевания, с поражением всех слоев сердечной мышцы, считается инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST (ИМпST). Одним из диагностических критериев дисфункции эндотелия при инфаркте миокарда является уровень sE-селектина – молекулы клеточной адгезии, осуществляющей рекрутинг нейтрофилов и индукцию нейтрофильного воспаления. В настоящем исследовании изучен интронный полиморфизм (rs5353, rs3917412, rs1534904) гена *SELE*, кодирующего E-селектин, у пациентов с ИМпST. Проанализированы две выборки: пациенты с ИМпST ($n = 74$) и популяционная выборка г. Томска ($n = 136$). По частотам генотипов rs5353 в гене *SELE* зарегистрированы статистически значимые различия между пациентами и контрольной выборкой ($p = 0.004$). Генотип CC является рискованным по отношению к ИМпST (OR = 6.93, CI:95 % (1.84–26.04), $\chi^2 = 8.69$, $p = 0.002$). Проанализированные маркеры не изучались ранее при сердечно-сосудистых заболеваниях и вообще редко привлекались к ассоциативным исследованиям; в ведущих базах данных отсутствует информация об ассоциациях этих маркеров с заболеваниями. Вместе с тем все три варианта по классификации RegulomeDB относятся к функциональному классу 1f и, соответственно, с высокой вероятностью обладают регуляторным потенциалом относительно не только гена *SELE*, но и других генов близлежащего региона. Анализ функциональной значимости изученных маркеров показал наличие более обширного, чем один ген, региона, корегулируемого данными нуклеотидными заменами. Выявленная в настоящем исследовании ассоциация rs5353 с ИМпST еще раз подтверждает вовлеченность гена *SELE* в развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Не исключено, что опосредованно (через системы воспаления, иммунного ответа и репарации ДНК) весь этот регион генома может быть вовлечен в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST; ИМпST; ген *SELE*; SNP.

Для цитирования: Бабушкина Н.П., Николаева А.М., Долбня А.Д., Шаврак В.Е., Рябов В.В. Роль полиморфизма гена *SELE* при инфаркте миокарда с подъемом сегмента ST. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1): 135-143. doi 10.18699/vjgb-25-16

Финансирование. Работа выполнена при частичном финансировании государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 122020300041-7 и 122020300043-1).

Благодарности. Молекулярно-генетическое исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН.

The role of *SELE* gene polymorphism in ST-elevation myocardial infarction

N.P. Babushkina ¹ , A.M. Nikolaeva ², A.D. Dolbnya³, V.E. Shavrak⁴, V.V. Ryabov^{2, 3, 4}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

³ Siberian State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Tomsk, Russia

⁴ Tomsk State University, Tomsk, Russia

 nad.babushkina@medgenetics.ru

Abstract. Ischemic heart disease (IHD) is an important medical and social problem. ST-elevation myocardial infarction (STEMI) is the most severe form of IHD, affecting all layers of the heart muscle. One of the diagnostic criteria for endothelial dysfunction in myocardial infarction is the level of sE-selectin, a cell adhesion molecule that recruits neutrophils and induces neutrophil inflammation. The aim of this study is to investigate intronic polymorphisms rs5353, rs3917412 and

rs1534904 of the E-selectin coding gene *SELE* in patients with STEMI. We have analyzed a group of patients with STEMI ($n = 74$) and a population sample of Tomsk ($n = 136$) as the control group. The frequencies of the rs5353 genotypes in the *SELE* gene have shown statistically significant differences between patients and the control sample ($p = 0.004$). The CC genotype is a predisposing factor to STEMI (OR = 6.93, CI:95 % (1.84–26.04), $\chi^2 = 8.69$, $p = 0.002$). The analyzed markers were not studied previously in cardiovascular diseases (CVDs) and were rarely involved in association studies at all; there is no information on these SNPs in the leading databases. At the same time, all three variants, according to the RegulomeDB classification, belong to the functional class 1f, and are highly likely to have regulatory potential relative not only to the *SELE* gene, but also to other genes in the nearby region. The analysis of the functional significance of the studied markers has shown the presence of a region more extensive than one gene, which is co-regulated by the studied nucleotide substitutions. The association of rs5353 with STEMI identified in this study once again confirms the involvement of the *SELE* gene in the pathogenesis of CVDs. It is possible that this entire region of the genome may be involved indirectly in the pathogenesis of CVD through the systems of inflammation, immune response and DNA repair.

Key words: ST-elevation myocardial infarction; STEMI; *SELE* gene; SNP.

For citation: Babushkina N.P., Nikolaeva A.M., Dolbnya A.D., Shavrak V.E., Ryabov V.V. The role of *SELE* gene polymorphism in ST-elevation myocardial infarction. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1): 135-143. doi 10.18699/vjgb-25-16

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) представляет собой важную медико-социальную проблему и занимает ведущее место в структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Наиболее жизнеугрожающим состоянием считается острая форма ишемии – инфаркт миокарда. Инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST (ИМпST) – особенно тяжелая форма, с поражением всех слоев сердечной мышцы (Острый инфаркт миокарда..., 2020). Воспаление является одним из ведущих звеньев как патогенеза, так и течения и прогноза инфаркта миокарда (Качковский, Рагозина, 2013; Калинин и др., 2022; Zhang N. et al., 2022). Воспалительную реакцию инициирует дисфункция эндотелия, связанная с дисбалансом продукции эндотелиальных медиаторов и приводящая к сверхэкспрессии молекул адгезии (Качковский, Рагозина, 2013; Nabas, Shang, 2018; Mathur et al., 2023).

Е-селектин – поверхностный гликопротеин, относится к классу молекул клеточной адгезии, экспрессируется только эндотелиальными клетками. Существует в виде двух форм – трансмембранный гликопротеин и сывороточный sE-селектин. В нормально функционирующем эндотелии его количество незначительно. Е-селектин участвует в адгезии нейтрофилов из циркулирующей крови к пораженной сосудистой стенке, а также способствует миграции моноцитов в субэндотелиальное пространство (Lorenzon et al., 1998; Vestweber, Blanks, 1999; Cid et al., 2000; Blankenberg et al., 2003; Calder et al., 2013; McEver, 2015). Помимо этого, показан механизм активации нейтрофильного воспаления, индуцируемый Е-селектином (через активацию NLRP3-инфламмосом) (Prunster et al., 2023). С учетом того, что первыми клетками, проникающими при инфаркте миокарда в очаг повреждения, являются нейтрофилы (Калинин и др., 2022), патогенетическая роль Е-селектина, играющего двойную роль в ответе на повреждение (рекрутинг нейтрофилов, индукция нейтрофильного воспаления), представляется еще более значимой.

После стимуляции провоспалительными цитокинами (ФНО- α , ИЛ-1), эндотоксином или под воздействием напряжения сдвига в эндотелии начинается *de novo* синтез

Е-селектина. Повышение уровня белка происходит в течение 4–6 ч после первого воздействия стимула, через 1–2 сут его экспрессия снижается. Таким образом, экспрессия Е-селектина может быть отражением острой фазы воспаления (Калинин и др., 2022; Uy et al., 2024). Селектины в целом, и в частности Е-селектин, являются общепризнанными маркерами эндотелиальной дисфункции (Silva et al., 2018; Mangoni, Zinellu, 2024; Wang K. et al., 2024). Уровни sE-селектина используются в целях диагностики эндотелиальной дисфункции у пациентов с сердечной недостаточностью, атеросклерозом, глаукомами, СД2, артериальной гипертензией, ОКС, служат индикатором повреждения миокарда у детей с микоплазменной пневмонией, COVID-19 и др. (Wang N. et al., 2001; Ueno, 2012; Sandoval-Pinto et al., 2014; Srivastava et al., 2018; Lampsas et al., 2022; Mathur et al., 2023). Есть свидетельства в пользу того, что уровень Е-селектина ассоциирован с атеросклеротическим поражением сосудов, как коронарных, так и периферических (Жито и др., 2019; Калинин и др., 2022; Mathur et al., 2023), что, вероятно, является отражением системного воспаления, характерного для атеросклероза.

Роль селективных в патогенезе ИБС неоднозначна. Как и в случае многих ассоциативных исследований, накопленные данные противоречивы (Жито и др., 2019): одни авторы указывают на статистически значимое повышение уровня Е-селектина при стабильной ИБС, другие – на отсутствие значимых различий. Такие результаты объясняются небольшими размерами выборок, неоднородностью по полу, возрасту, наличию сопутствующих патологий, получаемому пациентами лечению (Жито и др., 2019).

Несмотря на большой массив информации, посвященной Е-селектину, фокус существенно смещен на биохимию: при различных патологических состояниях анализируется уровень белка и подробно обсуждается его роль в качестве диагностического критерия. Тем не менее в ряде исследований показаны ассоциации трех полиморфных вариантов (single nucleotide polymorphism, SNP) в гене *SELE* (G98T (rs1805193) в 5'UTR, A561C (rs5361), C1880T (rs5355) в экзонах 4 и 10 соответственно) с тяжелым и субклиническим атеросклерозом, коронарной болезнью сердца, ишемической болезнью сердца, инфарктом мио-

карда, ишемическим инсультом, болезнью Kawasaki и артериальной гипертензией (Wenzel et al., 1994; Zheng et al., 2001; Yoshida et al., 2003; Zak et al., 2008; Mallik, Majumder, 2011; Shirakawa et al., 2012; Wang Z. et al., 2012; Zhao et al., 2012; Wang X. et al., 2013; Qin et al., 2015; Liao B. et al., 2016; Deng et al., 2017; Vargas-Alarcon et al., 2019; Ding et al., 2021). Таким образом, показаны ассоциации экзонного и промоторного полиморфизма гена *SELE* с сердечно-сосудистой патологией.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении ассоциаций интронных функционально значимых полиморфных вариантов гена *SELE* с развитием инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST.

Материалы и методы

В исследование включено 74 пациента, госпитализированных в отделение неотложной кардиологии НИИ кардиологии Томского НИМЦ с 2019 по 2021 г. с первичным ИМпСТ. Диагноз устанавливали в соответствии с четвертым универсальным определением ИМ (Thygesen et al., 2018). Критерии включения в исследование: верифицированный диагноз первичного ИМпСТ, возраст старше 18 лет и постоянное проживание на территории Томской области. Критерии исключения: кардиогенный шок, аутоиммунные, онкологические заболевания, терминальная хроническая болезнь почек, фибрилляции/трепетания предсердий, гемодинамически значимые клапанные пороки сердца, выраженные когнитивные дисфункции. Протокол исследования отвечал требованиям Хельсинкской декларации и был одобрен локальным этическим комитетом НИИ кардиологии. В качестве контроля привлечена популяционная выборка русских г. Томска (136 индивидов), сформированная из образцов ДНК «Биобанка населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Группы пациентов и контрольной выборки сопоставимы по полу и возрасту. Все обследованные индивиды этнически однородны и представлены преимущественно русскими (>95 %) г. Томска, у всех получено информированное согласие.

В обеих исследованных группах преобладают мужчины. Соотношение мужчин к женщинам составило 2.1 в группе ИМпСТ и 1.5 в группе контроля, статистически значимые различия между группами отсутствуют. Средний возраст в группе ИМпСТ составил 61 ± 10 лет (медиана 62.5, межквартильный размах [55.0–69.0]), в группе контроля – 62.1 ± 7 лет (медиана 63.0, межквартильный размах [57.0–68.0]); статистически значимые различия между группами отсутствуют.

ДНК из венозной периферической крови выделена стандартным фенол-хлороформным методом (Sambrook, Russell, 2006). Генотипирование осуществлялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (real-time PCR) с помощью набора для проведения ПЦР БиоМастер HS-qPCR (2×) («БиоЛабМикс», Новосибирск), с использованием специфических для целевых регионов праймеров и TaqMan-зондов (производство ООО «ДНК-Синтез», Москва) (табл. 1).

Для анализа выбраны полиморфные варианты в гене *SELE*, являющиеся eQTL-вариантами для своего или близлежащих генов (с использованием информации из GTExPortal, <https://www.gtexportal.org/home/>), потенциально обладающие функциональной значимостью (согласно RegulomeDB, <https://regulomedb.org/regulome-search/>), находящиеся в некодирующих регионах гена, с частотой минорного аллеля у европеоидов не менее 25 % (данные проекта «1000 геномов», Ensemble, <https://www.ensembl.org/index.html>). В результате были проанализированы три интронных маркера (см. табл. 1).

Анализ ассоциаций проведен с применением общепринятых методов статистического анализа (χ^2 , OR с 95 % CI). Статистически значимыми различия между сравниваемыми группами считались при $p < 0.05$. Для изучения модели наследования привлечен метод логистической регрессии. Анализ сцепления, в том числе расчет коэффициента неравновесия по сцеплению (D'), выполнен в программе Haploview 4.2 (Barrett et al., 2005).

Функциональная аннотация вариантов проведена с использованием ресурса VannoPortal (<http://www.mulinlab>).

Таблица 1. Условия генотипирования маркеров в гене *SELE*

SNP	Праймеры и TaqMan-зонды*	Температура отжига, °C
rs3917412	F: TGTAATTCTGTGCCCTGCG R: GGCTCATAGGTACACACTGGAA 5'-FAM-TCATTTCAATCAAGCGACTTGCTCCAT-BHQ1-3' 5'-HEX-TCATTTCAATCAAGTACTTGCTCCAT-BHQ1-3'	55
rs1534904	F: TACACTGAAGGCTCTGGGCTC R: AGACCACTCAGCATAGGCAAAG 5'-FAM-AACCACTGAGGATTTGAAAGAGCACCAT-BHQ1-3' 5'-HEX-AACCACTGAGGATTTTAAAGAGCACCAT-BHQ1-3'	57
rs5353	F: AAGAAGGAAATCGTGGGTAGC R: TTCCAAAACGGTAAGTGC 5'-FAM-TAAGACTTTCATCATTTAGGTCAAAGAGAAA-BHQ1-3' 5'-HEX-TAAGACTTTCATTTAGGTCAAAGAGAAA-BHQ1-3'	60

* Праймеры и пробы подобраны с помощью программы Vector NTI (<http://www.informaxinc.com>).

org/vportal/index.html/). В частности, для оценки эволюционной консервативности приведены показатели PhyloP, GerpN и GerpS. Показатель PhyloP позволяет оценить эволюционную консервативность на основании межвидовых сравнений, за исключением человека (приставки обозначают классификационные ранги, в данном случае: pri – приматы) (Pollard et al., 2010; Caron et al., 2019). Оценки GerpN и GerpS основаны на анализе отдельных нуклеотидов: анализ гомологии локуса у разных видов (GerpN); анализ дефицита/избыточности замен в локусе (GerpS) (Zerbino et al., 2018; Caron et al., 2019). Phred Score – показатель качества полученной оценки (значение 20 соответствует вероятности ошибки 1 %, 10 – вероятности ошибки 10 %). Для оценки действия отбора приведены данные CLR-теста (Composite Likelihood rate, Neilsen's CLR test) – метода комбинированного правдоподобия, позволяющего определить силу положительного отбора (Yu, Kim, 2015).

Межбелковые взаимодействия оценивали с помощью ресурса BioGrid (<https://thebiogrid.org/>) (Oughtred et al., 2021). Анализ функционального обогащения проводили с помощью веб-инструментария WebGestalt (Gene Set AnaLysis Toolkit) (<https://www.webgestalt.org/>) (Liao Y. et al., 2019).

Результаты

В популяционной выборке г. Томска и в группе больных ИМПСТ было проведено генотипирование трех интронных вариантов (rs5353, rs1534904, rs3917412) в гене *SELE*.

Сцепление и ассоциативный анализ

Выявляется полное сцепление маркера rs5353 с двумя другими изученными SNP ($D' = 1$ и у пациентов, и в контрольной выборке). В свою очередь rs3917412 и rs1534904 сцеплены тесно, но не полностью (D' составляет 0.916 в группе пациентов и 0.976 в популяционной выборке). Ана-

лиз сцепления изученных маркеров позволяет говорить о том, что замена rs5353 произошла на фоне гаплотипа по референсным аллелям rs3917412 и rs1534904. В результате этого ожидается разнонаправленный эффект изученных нуклеотидных замен (с одной стороны – rs5353, с другой – rs3917412 и rs1534904) на проявление патологических признаков.

По частотам генотипов rs5353 в гене *SELE* зарегистрированы статистически значимые различия между пациентами и контрольной выборкой ($p = 0.004$) (табл. 2). Согласно логистической регрессии (табл. 3), статистически значимы две модели – кодоминантная и рецессивная. Однако информационные критерии (Акаике и байесовский) имеют наименьшие значения для рецессивной модели, что определяет ее как наилучшую. Таким образом, генотип CC является рисковым по отношению к инфаркту миокарда, встречаясь в 6 раз чаще в группе больных (OR = 6.93, CI:95 % (1.84–26.04), $\chi^2 = 8.69$, $p = 0.002$) (см. табл. 2 и 3).

По сочетанию генотипов изученные выборки тоже статистически значимо различаются ($\chi^2 = 22.76$, $df = 8$, $p = 0.004$). Различия обусловлены главным образом двумя сочетаниями генотипов (по rs5353/rs1534904/rs3917412): CC/GG/CC предрасполагает к развитию инфаркта миокарда (OR = 6.93, CI:95 % (1.68–32.98), $\chi^2 = 8.69$, $p = 0.003$), в то время как сочетание TC/GG/CC является протективным (OR = 0.38, CI:95 % (0.16–0.90), $\chi^2 = 5.01$, $p = 0.02$). Соответственно, гаплотип CGC чаще встречается у пациентов, чем в контроле (27.7 и 20.5 %), а гаплотип TGC – в контроле (40.4 % у пациентов и 49.2 % в контрольной группе), однако эти различия статистически незначимы.

По rs5353 в выборке больных выявлено отклонение от равновесия Харди–Вайнберга ($p = 0.012$). При этом наблюдается недостаток гетерозигот и гомозигот по частоту аллелю, но избыточное количество редких гомозигот. Контроль качества генотипирования (100 % перегенотипирование выборки пациентов) подтвердил коррект-

Таблица 2. Частоты аллелей и генотипов маркеров в гене *SELE* в сравниваемых группах

SNP	Генотипы и редкий аллель	Частоты генотипов и редкого аллеля, % (n)		χ^2, p
		у пациентов	в контрольной выборке	
rs5353	T/T	58.11 (43)	61.76 (84)	$\chi^2 = 10.85, p = 0.004$
	T/C	28.38 (21)	36.03 (49)	
	C/C	13.51 (10)	2.21 (3)	
	Аллель C	27.27 (41)	20.22 (55)	
rs1534904	G/G	45.95 (34)	50.74 (69)	$\chi^2 = 1.315, p = 0.518$
	G/T	47.30 (35)	39.71 (54)	
	T/T	6.76 (5)	9.56 (13)	
	Аллель T	30.41 (45)	29.41 (80)	
rs3917412	C/C	55.41 (41)	58.09 (79)	$\chi^2 = 0.196, p = 0.907$
	C/T	39.19 (29)	37.50 (51)	
	T/T	5.41 (4)	4.41 (6)	
	Аллель T	25.00 (37)	23.16 (63)	

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Таблица 3. Модели наследования предрасполагающего эффекта rs5353 гена *SELE*

Модель	Генотип	Контроль	ИМпСТ	OR (95 % CI)	Уровень значимости, <i>p</i>	AIC	BIC
Кодоминантная	T/T	84 (61.8 %)	43 (58.1 %)	1.00	0.006	268.1	278.2
	T/C	49 (36 %)	21 (28.4 %)	0.84 (0.45–1.57)			
	C/C	3 (2.2 %)	10 (13.5 %)	6.51 (1.70–24.91)			
Доминантная	T/T	84 (61.8 %)	43 (58.1 %)	1.00	0.610	276.3	283.0
	T/C-C/C	52 (38.2 %)	31 (41.9 %)	1.16 (0.65–2.07)			
Рецессивная	T/T-T/C	133 (97.8 %)	64 (86.5 %)	1.00	0.002	266.5	273.2
	C/C	3 (2.2 %)	10 (13.5 %)	6.93 (1.84–26.04)			
Сверхдоминирование	T/T-C/C	87 (64 %)	53 (71.6 %)	1.00	0.206	275.3	282.0
	T/C	49 (36 %)	21 (28.4 %)	0.70 (0.38–1.30)			

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

ность эксперимента. Можно заключить, что в данном случае имеется биологическая причина отклонения от равновесия Харди–Вайнберга, поскольку выборка пациентов априори является смещенной, а ассоциированный с патологией генотип – избыточным. С другой стороны, изученная выборка больных невелика, поэтому полученные результаты требуют валидации на выборках большего размера.

Функциональный анализ изученных маркеров

Изученные маркеры расположены в интроне 1 (rs5353), 4 (rs1534904) и 5 (rs3917412) гена *SELE*. Интересно, что оценка консервативности исследованных маркеров сильно различается. Так, rs5353 консервативен только у приматов (Phred Score = 11.93 для priPhyloP); rs1534904, вероятно, консервативен не только у приматов (Phred Score = 16.10 для priPhyloP), но и в целом у различных видов (Phred Score = 16.58 и 11.11 для GerpN и GerpS соответственно); rs3917412 не является консервативным, согласно информации ресурса VannoPortal. Все они находятся под положительным отбором (Nei's CLR test) (согласно информации ресурса VannoPortal).

Все три рассмотренных маркера по классификации RegulomeDB относятся к функциональному классу 1f, т. е. являются eQTL-вариантами в мотиве связывания транскрипционных факторов (ТФ) или в регионе гиперчувствительности к ДНКазе. Действительно, изучаемые замены теоретически, т. е. согласно биоинформатическому анализу, могут изменять аффинность ряда ТФ (информация ресурса VannoPortal). Так, для rs5353 определяется 24 сайта связывания ТФ, из них 17 теряются при наличии альтернативного аллеля (но физических взаимодействий этих ТФ с ДНК в данном регионе в изученных на данный момент тканях пока не обнаружено – результаты экспериментальных исследований). Еще семь приводят к образованию новых сайтов связывания факторов транскрипции (ATF1, CEBPA, HOXA1, JUND, REST, JUNB) (табл. 4). Для rs1534904 теоретически изменяющихся сайтов 11, из них четыре при наличии альтернативного аллеля теряются (реально не обнаружены), но образуют-

Таблица 4. Транскрипционные факторы, для которых появляются сайты связывания при наличии редких аллелей исследованных маркеров

SNP, аллель	Транскрипционные факторы
rs5353, C	ATF1, CEBPA, HOXA1, JUND, REST, JUNB
rs1534904, T	PRDM1, RORC, IRF5, ZNF143, NCOR1, ZEB1, POU2F2
rs3917412, T	CHD2, PAX1

Примечание. Жирным шрифтом выделены ТФ, экспрессирующиеся в стенках сосудов (составлено по данным ресурсов VannoPortal и GTEx Portal).

ся семь новых (PRDM1, RORC, IRF5, ZNF143, NCOR1, ZEB1, POU2F2) (см. табл. 4). Для rs3917412 теоретические расчеты показывают наличие 16 сайтов связывания ТФ; альтернативный аллель приводит к появлению двух новых сайтов (CHD2, PAX1) (см. табл. 4), исчезновению десяти сайтов и к снижению аффинности четырех ТФ. Как и в предыдущих случаях, физически обнаруженные взаимодействия не входят в список теоретически изменяемых ТФ (согласно информации ресурса VannoPortal).

В качестве eQTL-вариантов проанализированные маркеры ассоциированы с изменениями уровней экспрессии *SELE* и близлежащих генов (см. рисунок). Кроме того, rs1534904 меняет сайт сплайсинга гена *C1orf112 (FIRRM)*. Таким образом, эффект изученных нуклеотидных замен может реализовываться не только через биохимические пути, в которых задействован E-селектин, но и через пути, в которых участвуют другие регулируемые гены. К настоящему времени выявлено по шесть регулируемых генов для rs5353 и rs3917412 и пять – для rs1534904; всего девять генов: *FIRRM, KIFAP3, METTL18, RN7SL333P, RPI-206D15.6, RPI-117P20.3, SCYL3, SELE, SELL* (GTEx Portal). Наиболее интересными представляются гены *FIRRM* и *KIFAP3*, поскольку эффект анализируемых замен в гене *SELE* на их экспрессию согласуется с результатами

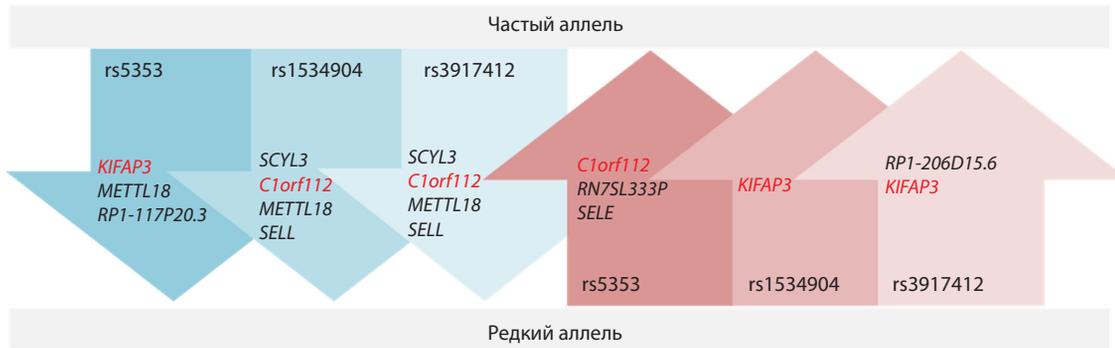


Схема изменений уровня экспрессии ряда генов в зависимости от rs5353, rs1534904, rs3917412 гена *SELE*.

Составлено по данным ресурса GTEx Portal.

сцепления: экспрессия *KIFAP3* ниже у гомозигот по редкому аллелю rs5353 и выше у гомозигот по производным аллелям rs1534904 и rs3917412. И наоборот: экспрессия *FIRRM* у носителей производных аллелей по rs1534904 и rs3917412 ниже, но при этом выше у носителей редкого аллеля по rs5353 (см. рисунок).

Соответственно, три белка представляются наиболее перспективными с точки зрения реализации функционального эффекта изученных замен. Для E-селектина выявляется небольшое число взаимодействующих молекул (интеракторов) – всего 19, в том числе 2 химических соединения и 17 белков (согласно данным ресурса BioGRID). Анализ обогащения (WebGestalt) показывает, что наиболее значимыми процессами с максимальным количеством вовлеченных белков-интеракторов являются гемостаз (10 белков, $p_{adj} = 6.4E^{-7}$), активация тромбоцитов, передача сигналов и агрегация (6 белков, $p_{adj} = 3.6E^{-4}$), взаимодействие клеточной поверхности с сосудистой стенкой (5 белков, $p_{adj} = 3.6E^{-4}$), что в целом полностью отражает известные биохимические функции E-селектина. Для FIGNL1-взаимодействующего регулятора рекомбинации и митоза, кодируемого геном *FIRRM* (*C1orf112*), выявляется 60 белков-интеракторов (согласно данным ресурса BioGRID). Самые значимые процессы с наибольшим количеством вовлеченных интеракторов включают связывание лигандов серпантинных рецепторов (19 белков, $p_{adj} = 3.8E^{-13}$) и разные варианты сигналинга через эти рецепторы (по 16–20 белков, $p_{adj} = 4.5E^{-12}$ – $4.2E^{-7}$) (по WebGestalt). Белковый продукт гена *FIRRM* пока изучен недостаточно, но известно, что помимо его первоначально описанной роли кинетохорного белка (Xu et al., 2021), он участвует в процессах репарации ДНК (Mazouzi et al., 2023; Pinedo-Carpio et al., 2023; Tischler et al., 2024). Для продукта гена *KIFAP3* (кинезин-2 ассоциированный протенин) выявляется 105 белков-интеракторов (согласно данным ресурса BioGRID). Анализ обогащения в качестве наиболее значимых процессов с самым большим количеством вовлеченных интеракторов показывает адаптивный иммунный ответ (16 белков, $p_{adj} = 6.2E^{-3}$), разные пути процессинга мРНК (7–9 белков, $p_{adj} = 6.2E^{-3}$ – $6.4E^{-3}$), презентацию антигенов главного комплекса гистосовместимости второго класса (7 белков, $p_{adj} = 6.2E^{-3}$) (по WebGestalt).

Обсуждение

Таким образом, все три белка, кодируемые генами *SELE*, *FIRRM*, *KIFAP3* (корегулируемыми исследованными интронными вариантами), напрямую не задействованы в развитии сердечно-сосудистых событий, но опосредованно, через системы воспаления, иммунного ответа и репарации ДНК, могут быть вовлечены в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний.

Из девяти корегулируемых изученными маркерами генов для четырех при проведении GWAS не выявлено ассоциаций ни с патологиями, ни с количественными признаками. Три из них не кодируют белки – два гена длинных некодирующих РНК (*RPI-206D15.6*, *RPI-117P20.3*) и псевдоген (*RN7SL333P*), и один, *METTL18*, кодирует метилтрансферазу. Для остальных пяти генов в GWAS показаны многочисленные ассоциации (см. Приложение, составлено по GWAS catalog)¹. Три из них (*FIRRM*, *KIFAP3*, *SELE*) подробно рассмотрены выше; ген *SELL* кодирует L-селектин, способствующий, как и E-селектин, роллингу лейкоцитов (GeneCard, <https://www.genecards.org/>); ген *SCYL3* кодирует псевдокиназу, тоже играющую роль в адгезии и миграции клеток (GeneCard, <https://www.genecards.org/>). Ассоциации маркеров в регионе локализации этих пяти генов выявлены с различными биохимическими показателями крови, клеточным составом крови (*FIRRM*, *KIFAP3*, *SCYL3*, *SELE*, *SELL*), а также с боковым амиотрофическим склерозом и венозной тромбоэмболией (*FIRRM*, *KIFAP3*), сахарным диабетом 2-го типа (*FIRRM*, *SELL*) (см. Приложение). Хотелось подчеркнуть, что среди 64 SNP, ассоциированных по результатам GWAS с различными патологиями либо количественными признаками, не фигурируют ни маркеры, рассматриваемые в настоящем исследовании (rs5353, rs1534904, rs3917412), ни SNP, по результатам более ранних исследований ассоциированные с сердечно-сосудистыми заболеваниями (rs1805193, rs5361, rs5355).

Следует отметить, что проанализированные нами полиморфные варианты не изучались ранее при сердечно-сосудистых заболеваниях и вообще редко привлекались к ассоциативным исследованиям (отсутствует информация по этим маркерам в базах данных PubMed, DisGeNet,

¹ Приложение см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx6.pdf>

GWAS Catalog). В доступной литературе найдено только одно исследование, в котором показан рискованный эффект генотипа GG rs3917412 по отношению к развитию рака толстой кишки (Custodio et al., 2014). В то же время, согласно геномным оценкам патогенности, которая отражает вероятность вовлеченности маркера в развитие многофакторной патологии (оценено по regBase (Zhang S. et al., 2019)), анализируемые варианты могут быть вовлечены в патологические процессы. Оценки онкогенности также указывают на вероятность «драйверного» эффекта (likely cancer driver) данных нуклеотидных замен для развития онкопатологии (информация ресурса VannoPortal).

Заключение

Механизм вовлеченности E-селектина в патогенез ИМпСТ не до конца понятен. С одной стороны, много биохимических данных указывает на его вовлеченность в развитие сердечно-сосудистых заболеваний (Liao B. et al., 2016; Deng et al., 2017; Vargas-Alarcon et al., 2019; Ding et al., 2021), и прежде всего в развитие таких факторов риска ИБС, как атеросклероз и СД2 (Roldán et al., 2003; McEver, 2015; Qiu et al., 2019; Mathur et al., 2023). С другой стороны, вовлеченность белка в воспалительный ответ предполагает его участие в первую очередь в процессах восстановления после сердечно-сосудистого события и лишь опосредованно – в развитие предрасположенности к инфаркту миокарда (Ueno, 2012; Sandoval-Pinto et al., 2014; Srivastava et al., 2018). Выявленная в настоящем исследовании ассоциация rs5353 с ИМпСТ еще раз подтверждает вовлеченность гена *SELE* в развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, проведенный анализ показывает наличие более обширного, чем один ген, региона, корегулируемого изученными нуклеотидными заменами. Не исключено, что опосредованно (через системы воспаления, иммунного ответа и репарации ДНК) весь этот регион генома может быть вовлечен в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний.

Список литературы / References

Жито А.В., Юсупова А.О., Привалова Е.В., Хабарова Н.В., Беленков Ю.Н. Маркеры эндотелиальной дисфункции: E-селектин, эндотелин-1 и фактор фон Виллебранда у пациентов с ишемической болезнью сердца, в том числе, в сочетании с сахарным диабетом 2 типа. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2019;15(6):892-899. doi 10.20996/1819-6446-2019-15-6-892-899 [Zhito A.V., Iusupova A.O., Privalova E.V., Khabarova N.V., Belenkov Y.N. Markers of endothelial dysfunction: E-selectin, endothelin-1 and von Willebrand factor in patients with coronary heart disease, including in combination with type 2 diabetes mellitus. *Ratsionalnaya Farmakoterapia v Kardiologii = Ration Pharmacother Cardiol*. 2019;15(6):892-899. doi 10.20996/1819-6446-2019-15-6-892-899 (in Russian)]

Калинин Р.Е., Короткова Н.В., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Рябов А.Н. Селектины и их участие в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. *Казанский медицинский журнал*. 2022;103(4):617-627. doi 10.17816/KMJ2022-617 [Kalinin R.E., Korotkova N.V., Suchkov I.A., Mzhavanadze N.D., Ryabkov A.N. Selectins and their involvement in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Kazan Med J*. 2022;103(4):617-627. doi 10.17816/KMJ2022-617]

Качковский М.А., Рагозина Е.Ю. Оценка системной воспалительной реакции при остром инфаркте миокарда: современное со-

стояние проблемы. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2013;9(6):690-697

[Kachkovsky M.A., Ragozina E.Yu. Assessment of systemic inflammatory reaction in acute myocardial infarction: status update on the problem. *Ratsionalnaya Farmakoterapia v Kardiologii = Ration Pharmacother Cardiol*. 2013;9(6):690-697 (in Russian)]

Острый инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST электрокардиограммы. Клинические рекомендации 2020. *Российский кардиологический журнал*. 2020;25(11):251-310. doi 10.15829/1560-4071-2020-4103

[2020 Clinical practice guidelines for Acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Rossiskiy Kardiologicheskij Zhurnal = Russ J Cardiol*. 2020;25(11):251-310. doi 10.15829/1560-4071-2020-4103 (in Russian)]

Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-265. doi 10.1093/bioinformatics/bth457

Blankenberg S., Barbaux S., Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003;170(2):191-203. doi 10.1016/s0021-9150(03)00097-2

Calder P.C., Ahluwalia N., Albers R., Bosco N., Bourdet-Sicard R., Haller D., Holgate S.T., Jönsson L.S., Latulippe M.E., Marcos A., Moreines J., M'Rini C., Müller M., Pawelec G., van Neerven R.J., Watzl B., Zhao J. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr*. 2013;109(Suppl.1):S1-S34. doi 10.1017/S0007114512005119

Caron B., Luo Y., Rausell A. NCBoost classifies pathogenic non-coding variants in Mendelian diseases through supervised learning on purifying selection signals in humans. *Genome Biol*. 2019;20(1):32. doi 10.1186/s13059-019-1634-2

Cid M.C., Cebrián M., FontC., Coll-Vinent B., Hernández-Rodríguez J., Esparza J., Urbano-Márquez A., Grau J.M. Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis: inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte-endothelial cell interactions. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):184-194. doi 10.1002/1529-0131(200001)43:1<184::AID-ANR23>3.0.CO;2-N

Custodio A., Moreno-Rubio J., Aparicio J., Gallego-Plazas J., Yaya R., Maurel J., Rodríguez-Salas N., Burgos E., Ramos D., Calatrava A., Andrada E., Díaz-López E., Sánchez A., Madero R., Cejas P., Feliu J. Pharmacogenetic predictors of outcome in patients with stage II and III colon cancer treated with oxaliplatin and fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(9):2226-2237. doi 10.1158/1535-7163.MCT-13-1109

Deng M.H., Lin C.W., Sun Y.N., Zeng X.L., Wen F. Role of E-selectin for diagnosing myocardial injury in paediatric patients with mycoplasma pneumoniae pneumonia. *Ann Clin Biochem*. 2017;54(1):49-54. doi 10.1177/0004563216631570

Ding G., Wang J., Liu K., Huang B., Deng W., He T. Association of E-selectin gene rs5361 polymorphism with ischemic stroke susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Int J Neurosci*. 2021;131(5):511-517. doi 10.1080/00207454.2020.1750385

Habas K., Shang L. Alterations in intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human endothelial cells. *Tissue Cell*. 2018;54:139-143. doi 10.1016/j.tice.2018.09.002

Lampsas S., Tsaplaris P., Pantelidis P., Oikonomou E., Marinos G., Charalambous G., Souvaliotis N., Mystakidi V.C., Goliopoulou A., Katsianos E., Siasos G., Vavuranakis M.A., Tsioufis C., Vavuranakis M., Tousoulis D. The role of endothelial related circulating biomarkers in COVID-19. A systematic review and meta-analysis. *Curr Med Chem*. 2022;29(21):3790-3805. doi 10.2174/0929867328666211026124033

Liao B., Chen K., Xiong W., Chen R., Mai A., Xu Z., Dong S. Relationship of *SELE* A561C and G98T variants with the susceptibility to CAD. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(8):e1255. doi 10.1097/MD.0000000000001255

- Liao Y., Wang J., Jaehnig E.J., Shi Z., Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W199-W205. doi 10.1093/nar/gkz401
- Lorenzon P., Vecile E., Nardon E., Ferrero E., Harlan J.M., Tedesco F., Dobrina A. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol.* 1998; 142(5):1381-1391. doi 10.1083/jcb.142.5.1381
- Mallik S., Majumder P.P. A two-step genetic study on quantitative precursors of coronary artery disease in a homogeneous Indian population: case-control association discovery and validation by transmission-disequilibrium test. *J Biosci.* 2011;36(5):857-868. doi 10.1007/s12038-011-9148-4
- Mangoni A.A., Zinellu A. A systematic review and meta-analysis of circulating adhesion molecules in rheumatoid arthritis. *Inflamm Res.* 2024;73(3):305-327. doi 10.1007/s00011-023-01837-6
- Mathur R., Ahmid Z., Ashor A.W., Shannon O., Stephan B.C.M., Siervo M. Effects of dietary-based weight loss interventions on biomarkers of endothelial function: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr.* 2023;77(10):927-940. doi 10.1038/s41430-023-01307-6
- Mazouzi A., Moser S.C., Abascal F., van den Broek B., Del Castillo Velasco-Herrera M., van der Heijden I., Hekkelman M., Drenth A.P., van der Burg E., Kroese L.J., Jalink K., Adams D.J., Jonkers J., Brummelkamp T.R. FRRM/C1orf112 mediates resolution of homologous recombination intermediates in response to DNA interstrand crosslinks. *Sci Adv.* 2023;9(22):eadf4409. doi 10.1126/sciadv.adf4409
- McEver R.P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res.* 2015;107(3):331-339. doi 10.1093/cvr/cvv154
- Oughtred R., Rust J., Chang C., Breikreutz B.J., Stark C., Willems A., Boucher L., Leung G., Kolas N., Zhang F., Dolma S., Coulomb-Huntington J., Chatr-Aryamontri A., Dolinski K., Tyers M. The BioGRID database: a comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci.* 2021; 30(1):187-200. doi 10.1002/pro.3978
- Pinedo-Carpio E., Dessapt J., Beneyton A., Sacre L., Bérubé M.A., Vil- lot R., Lavoie E.G., Coulombe Y., Blondeau A., Boulais J., Malina A., Luo V.M., Lazaratos A.M., Côté J.F., Mallette F.A., Guarné A., Masson J.Y., Fradet-Turcotte A., Orthwein A. FRRM cooperates with FIGNL1 to promote RAD51 disassembly during DNA repair. *Sci Adv.* 2023;9(32):eadf4082. doi 10.1126/sciadv.adf4082
- Pollard K.S., Hubisz M.J., Rosenbloom K.R., Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 2010;20(1):110-121. doi 10.1101/gr.097857.109
- Pruenster M., Immler R., Roth J., Kuchler T., Bromberger T., Napoli M., Nussbaumer K., Rohwedder I., Wackerbarth L.M., Piantoni C., Hennis K., Fink D., Kallabis S., Schroll T., Masgrau-Alsina S., Budke A., Liu W., Vestweber D., Wahl-Schott C., Roth J., Meissner F., Moser M., Vogl T., Hornung V., Broz P., Sperandio M. E-selectin-mediated rapid NLRP3 inflammasome activation regulates S100A8/S100A9 release from neutrophils via transient gasdermin D pore formation. *Nat Immunol.* 2023;24(12):2021-2031. doi 10.1038/s41590-023-01656-1
- Qin L., Zhao P., Liu Z., Chang P. Associations SELE gene haplotype variant and hypertension in Mongolian and Han populations. *Intern Med.* 2015;54(3):287-293. doi 10.2169/internalmedicine.54.2797
- Qiu S., Cai X., Liu J., Yang B., Zügel M., Steinacker J.M., Sun Z., Schumann U. Association between circulating cell adhesion molecules and risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2019;287:147-154. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.908
- Roldán V., Marín F., Lip G.Y., Blann A.D. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb Haemost.* 2003;90(6):1007-1020. doi 10.1160/TH02-09-0083
- Sambrook J., Russell D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2006; 2006(1):pdb.prot4455. doi 10.1101/pdb.prot4455
- Sandoval-Pinto E., Padilla-Gutiérrez J.R., Valdes-Alvarado E., Garcia-González I.J., Valdez-Haro A., Muñoz-Valle J.F., Flores-Salinas H.E., Rivas F., Valle Y. Assessment of the E-selectin rs5361 (561A>C) polymorphism and soluble protein concentration in acute coronary syndrome: association with circulating levels. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:158367. doi 10.1155/2014/158367
- Shirakawa T., Ikeda K., Nishimura S., Kuniba H., Nakashima K., Motomura H., Mizuno Y., Zaito M., Nakazato M., Maeda T., Hama-saki Y., Hara T., Moriuchi H. Lack of an association between E-selectin gene polymorphisms and risk of Kawasaki disease. *Pediatr Int.* 2012;54(4):455-460. doi 10.1111/j.1442-200X.2012.03608.x
- Silva M., Videira P.A., Sackstein R. E-selectin ligands in the human mononuclear phagocyte system: implications for infection, inflammation, and immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;8:1878. doi 10.3389/fimmu.2017.01878
- Srivastava K., Chandra S., Narang R., Bhatia J., Saluja D. E-selectin gene in essential hypertension: a case-control study. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(1):e12868. doi 10.1111/eci.12868
- Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Chaitman B.R., Bax J.J., Morrow D.A., White H.D.; Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(18):2231-2264. doi 10.1016/j.jacc.2018.08.1038
- Tischler J.D., Tsuchida H., Bosire R., Oda T.T., Park A., Adeyemi R.O. FLIP(C1orf112)-FIGNL1 complex regulates RAD51 chromatin association to promote viability after replication stress. *Nat Commun.* 2024;15(1):866. doi 10.1038/s41467-024-45139-9
- Ueno T. E-selectin gene and essential hypertension. *Hypertens Res.* 2012;35(4):380. doi 10.1038/hr.2011.223
- Uy G.L., DeAngelo D.J., Lozier J.N., Fisher D.M., Jonas B.A., Mag-nani J.L., Becker P.S., Lazarus H.M., Winkler I.G. Targeting hematologic malignancies by inhibiting E-selectin: a sweet spot for AML therapy? *Blood Rev.* 2024;65:101184. doi 10.1016/j.blre.2024.101184
- Vargas-Alarcon G., Perez-Mendez O., Herrera-Maya G., Posadas-Romero J., Posadas-Sanchez R., Ramirez-Bello J., Escobedo G., Fragoso C.M. The rs1805193, rs5361, and rs5355 single nucleotide polymorphisms in the *E-selectin* gene (*SEL-E*) are associated with subclinical atherosclerosis: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican study. *Immunobiology.* 2019;224(1):10-14. doi 10.1016/j.imbio.2018.11.003
- Vestweber D., Blanks J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999;79(1):181-213. doi 10.1152/physrev.1999.79.1.181
- Vy H.M., Kim Y. A composite-likelihood method for detecting incomplete selective sweep from population genomic data. *Genetics.* 2015;200(2):633-649. doi 10.1534/genetics.115.175380
- Wang K., Lei L., Li G., Lan Y., Wang W., Zhu J., Liu Q., Ren L., Wu S. Association between ambient particulate air pollution and soluble biomarkers of endothelial function: a meta-analysis. *Toxics.* 2024; 12(1):76. doi 10.3390/toxics12010076
- Wang N., Chintala S.K., Fini M.E., Schuman J.S. Activation of a tissue-specific stress response in the aqueous outflow pathway of the eye defines the glaucoma disease phenotype. *Nat Med.* 2001;7(3):304-309. doi 10.1038/85446
- Wang X., Zhang J., Du X., Song M., Jia C., Liu H. Association of A561C and G98T polymorphisms in E-selectin gene with coronary artery disease: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(11):e79301. doi 10.1371/journal.pone.0079301
- Wang Z., Xu Y., Chen S., Wang L., Ding H., Lu G., Wang D., Zhai Z., Duan J., Zhang W. A common missense single nucleotide polymorphism in the E-selectin gene is significantly associated with essential hypertension in the Han population but only weakly associated in the Uygur population. *Hypertens Res.* 2012;35(4):413-417. doi 10.1038/hr.2011.204

- Wenzel K., Felix S., Kleber F.X., Brachold R., Menke T., Schattke S., Schulte K.L., Gläser C., Rohde K., Baumann G., Speer A. E-selectin polymorphism and atherosclerosis: an association study. *Hum Mol Genet.* 1994;3(11):1935-1937. doi 10.1093/hmg/3.11.1935
- Xu L., Ali M., Duan W., Yuan X., Garba F., Mullen M., Sun B., Poser I., Duan H., Lu J., Tian R., Ge Y., Chu L., Pan W., Wang D., Hyman A., Green H., Li L., Dou Z., Liu D., Liu X., Yao X. Feedback control of PLK1 by Apol1 ensures accurate chromosome segregation. *Cell Rep.* 2021;36(2):109343. doi 10.1016/j.celrep.2021.109343
- Yoshida M., Takano Y., Sasaoka T., Izumi T., Kimura A. E-selectin polymorphism associated with myocardial infarction causes enhanced leukocyte-endothelial interactions under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(5):783-788. doi 10.1161/01.ATV.0000067427.40133.59
- Zak I., Sarecka B., Krauze J. Synergistic effects between 561A > C and 98G > T polymorphisms of E-selectin gene and hypercholesterolemia in determining the susceptibility to coronary artery disease. *Heart Vessels.* 2008;23(4):257-263. doi 10.1007/s00380-008-1040-2
- Zerbino D.R., Achuthan P., Akanni W., Amode M.R., Barrell D., Bhai J., Billis K., ... Trevanion S.J., Aken B.L., Cunningham F., Yates A., Flicek P. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D754-D761. doi 10.1093/nar/gkx1098
- Zhang N., Aiyasiding X., Li W.J., Liao H.H., Tang Q.Z. Neutrophil degranulation and myocardial infarction. *Cell Commun Signal.* 2022; 20(1):50. doi 10.1186/s12964-022-00824-4
- Zhang S., He Y., Liu H., Zhai H., Huang D., Yi X., Dong X., Wang Z., Zhao K., Zhou Y., Wang J., Yao H., Xu H., Yang Z., Sham P.C., Chen K., Li M.J. regBase: whole genome base-wise aggregation and functional prediction for human non-coding regulatory variants. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(21):e134. doi 10.1093/nar/gkz774
- Zhao D.X., Feng J., Cong S.Y., Zhang W. Association of E-selectin gene polymorphisms with ischemic stroke in a Chinese Han population. *J Neurosci Res.* 2012;90(9):1782-1787. doi 10.1002/jnr.23075
- Zheng F., Chevalier J.A., Zhang L.Q., Virgil D., Ye S.Q., Kwitovich P.O. An HphI polymorphism in the E-selectin gene is associated with premature coronary artery disease. *Clin Genet.* 2001; 59(1):58-64. doi 10.1034/j.1399-0004.2001.590110.x

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.08.2024. После доработки 18.10.2024. Принята к публикации 21.10.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-17

Сравнительный анализ гаплотипов, несущих патогенные варианты с.1545Т>G, с.2027Т>А и с.919-2А>G гена *SLC26A4*, у пациентов с потерей слуха из Республики Тыва (Южная Сибирь)

В.Ю. Данильченко ^{1,2}, М.В. Зыцарь ^{1,2}, Е.А. Панина ^{1,2}, К.Е. Орищенко ^{1,2}, О.Л. Посух ^{1,2} 

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 posukh@bionet.nsc.ru

Аннотация. Патогенные варианты в гене *SLC26A4* (OMIM #605646), приводящие к несиндромальной рецессивно наследуемой потере слуха 4-го типа (DFNB4) и синдрому Пендреда, вносят весомый вклад в этиологию потери слуха во многих популяциях мира. Спектр и распространенность различных патогенных вариантов гена *SLC26A4* характеризуются широкой этногеографической вариабельностью. Высокая частота некоторых из них в отдельных регионах мира может свидетельствовать об их независимом возникновении или же быть следствием эффекта основателя. Доля *SLC26A4*-ассоциированной потери слуха у тувинских пациентов (Республика Тыва, Южная Сибирь) является одной из самых высоких в мире (28.2%). Подавляющее большинство мутантных *SLC26A4*-аллелей представлено тремя патогенными вариантами – с.919-2А>G, с.2027Т>А и с.1545Т>G (69.3, 17.5 и 8.0% соответственно). Суммарная частота их гетерозиготного носительства в тувинской популяции достигает 7.1%. Накопление этих вариантов у тувинских пациентов позволяет предположить роль эффекта основателя в их распространенности на территории Тувы, что может быть подтверждено общностью генетического окружения (гаплотипов) для каждого из них. Для реконструкции гаплотипов у носителей вариантов с.1545Т>G и с.2027Т>А были использованы данные генотипирования панели полиморфных генетических маркеров: пяти STR-маркеров (четыре из них фланкируют на разном расстоянии ген *SLC26A4* и один является внутригенным) и девяти внутригенных SNP-маркеров. Сравнительный анализ реконструированных гаплотипов для с.1545Т>G и с.2027Т>А с ранее полученными данными о гаплотипах для с.919-2А>G показал, что каждый из анализируемых вариантов имеет особое и сходное для всех носителей того или иного варианта генетическое окружение, по-видимому, унаследованное от различных «предков-основателей». Эти данные подтверждают роль кумулятивного эффекта основателя в распространенности патогенных вариантов с.1545Т>G, с.2027Т>А и с.919-2А>G гена *SLC26A4* у коренного населения Республики Тыва. Полученные данные актуальны как для прогнозирования распространенности *SLC26A4*-обусловленной потери слуха, так и для создания регион-специфичной ДНК-диагностики наследуемой потери слуха в Республике Тыва.

Ключевые слова: потеря слуха; *SLC26A4*; патогенные варианты; STR; SNP; гаплотипы; эффект основателя; популяции Сибири.

Для цитирования: Данильченко В.Ю., Зыцарь М.В., Панина Е.А., Орищенко К.Е., Посух О.Л. Сравнительный анализ гаплотипов, несущих патогенные варианты с.1545Т>G, с.2027Т>А и с.919-2А>G гена *SLC26A4*, у пациентов с потерей слуха из Республики Тыва (Южная Сибирь). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):144-152. doi 10.18699/vjgb-25-17

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0021 Института цитологии и генетики СО РАН и гранта Министерства науки и высшего образования РФ FSUS-2024-0018.

Comparative analysis of haplotypes carrying pathogenic variants с.1545Т>G, с.2027Т>А and с.919-2А>G of the *SLC26A4* gene in patients with hearing loss from the Tyva Republic (Southern Siberia)

V.Yu. Danilchenko ^{1,2}, M.V. Zytsar ^{1,2}, E.A. Panina ^{1,2}, K.E. Orishchenko ^{1,2}, O.L. Posukh ^{1,2} 

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

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 posukh@bionet.nsc.ru

Abstract. Pathogenic variants in the *SLC26A4* gene (OMIM #605646), leading to non-syndromic recessive hearing loss type 4 (DFNB4) and Pendred syndrome, significantly contribute to the etiology of hearing loss in many populations of the world. The spectrum and prevalence of different pathogenic *SLC26A4* variants are characterized by wide ethnogeographical variability. A high frequency of some of them in certain regions of the world may indicate either their independent origin or be a consequence of the founder effect. The proportion of *SLC26A4*-associated hearing loss in Tuvian patients (the Tyva Republic, Southern Siberia) is one of the highest in the world (28.2 %) and the vast majority of mutant *SLC26A4* alleles are represented by three pathogenic variants c.919-2A>G, c.2027T>A and c.1545T>G (69.3, 17.5 and 8.0 %, respectively). Their overall carrier frequency in the Tuvian population reaches 7.1 %. The accumulation of these variants in Tuvian patients suggests a role of the founder effect in their prevalence in Tuva, which can be confirmed by the common genetic background (haplotypes) for each of them. For reconstruction of haplotypes in the carriers of variants c.1545T>G and c.2027T>A, the genotyping data of a panel of polymorphic genetic markers were used: five STRs (four of them flank the *SLC26A4* gene at different distances and one is intragenic) and nine intragenic SNPs. Comparative analysis of the reconstructed haplotypes for c.1545T>G and c.2027T>A with previously obtained data on haplotypes for the c.919-2A>G variant showed that each of the analyzed variants has a specific (similar for all carriers of a particular variant) genetic background, apparently inherited from different "founder ancestors". These data confirm the cumulative founder effect in the prevalence of pathogenic variants c.1545T>G, c.2027T>A, and c.919-2A>G of the *SLC26A4* gene in the indigenous population of the Tyva Republic. The obtained data are relevant both for predicting the prevalence of *SLC26A4*-caused hearing loss and for development of region-specific DNA diagnostics of inherited hearing loss in the Tyva Republic.

Key words: hearing loss; *SLC26A4*; pathogenic variants; STRs; SNPs; haplotypes; founder effect; Siberian populations.

For citation: Danilchenko V.Yu., Zytsar M.V., Panina E.A., Orishchenko K.E., Posukh O.L. Comparative analysis of haplotypes carrying pathogenic variants c.1545T>G, c.2027T>A and c.919-2A>G of the *SLC26A4* gene in patients with hearing loss from the Tyva Republic (Southern Siberia). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025; 29(1):144-152. doi 10.18699/vjgb-25-17

Введение

В настоящее время более 5 % населения мира имеют тяжелую или глубокую потерю слуха, вызываемую как средовыми, так и генетическими факторами (World Health Organization, <https://www.who.int/ru>). Генетические факторы лежат в основе более половины всех случаев врожденной патологии слуховой функции или раннего ее проявления. Наследственная потеря слуха может быть одним из клинических признаков множества (около 400) синдромов или же изолированной (несиндромальной) патологией, которая характеризуется уникальной генетической гетерогенностью: уже картировано около 200 локусов и идентифицировано не менее 150 генов, ассоциированных с потерей слуха (Hereditary Hearing Loss Homepage, <https://hereditaryhearingloss.org>, апрель 2024 г.).

Известна широкая этногеографическая вариабельность в распространенности различных форм наследуемой потери слуха, обусловленных патогенными вариантами в разных «генах глухоты». «Накопление» некоторых форм наследственной потери слуха в той или иной популяции, как и ряда других моногенных заболеваний, может определяться этническим составом населения, изоляцией, особенностями брачной структуры, эффектами основателя и «бутылочного горлышка», а также возможным селективным преимуществом гетерозигот (Scott et al., 1995; Ben Arab et al., 2004; Common et al., 2004; Zlotogora, 2007; Chong et al., 2012; Razdan et al., 2012). Важную роль в распространенности наследственных форм глухоты, вероятно, играл и такой социальный фактор, как долговременная традиция заключения ассортативных браков между глухими людьми, основанная на их лингвистической гомогамии (жестовый язык), приведшая к росту социальной адаптации и биологической приспособленности (genetic fitness) глухих людей (Nance et al., 2000; Nance, Kearsley, 2004).

Актуальной задачей для оценки генетического риска и медико-генетического консультированияотягощенных семей и для разработки наиболее эффективных методов молекулярной диагностики этой патологии стало выявление наиболее частых (мажорных) мутаций в генах, вовлеченных в потерю слуха. Высокая частота некоторых мутаций в отдельных регионах мира может свидетельствовать об их независимом возникновении (mutational "hot spot") или же быть следствием эффекта основателя (founder mutation). Роль эффекта основателя в распространенности мутаций может быть подтверждена общностью их генетического окружения (гаплотипов). Реконструкция гаплотипов выполняется на основе анализа высокополиморфных генетических маркеров: STR (short tandem repeats) и SNP (single nucleotide polymorphisms). При анализе гаплотипов, несущих ту или иную мутацию, с помощью подхода «молекулярных часов» могут быть получены оценки «возраста» (времени возникновения) мутации и в ряде случаев, с привлечением исторических сведений о той или иной популяции, определены потенциальные регионы ее происхождения.

Наиболее значимый вклад в этиологию потери слуха во многих популяциях мира вносят патогенные варианты в гене *GJB2* (OMIM #121011). Вторым по значимости, по крайней мере для азиатских популяций, является ген *SLC26A4* (solute carrier family 26, member 4, 7q22.3, OMIM #605646). Этот ген кодирует трансмембранный транспортный белок пендрин, который в основном экспрессируется в тканях внутреннего уха, щитовидной железы и почек и участвует в транспорте различных ионов. Патогенные варианты в гене *SLC26A4* приводят к несиндромальной рецессивно наследуемой потере слуха (тип DFNB4) и синдрому Пендреда (Pendred Syndrome, OMIM #274600) – рецессивному заболеванию, определяемому потерей слуха и развитием зоба. У пациентов с *SLC26A4*-обусловленной потерей слуха часто наблюдаются аномалии костно-

го лабиринта внутреннего уха: расширенный водопровод преддверия, дисплазия Мондини. В многочисленных исследованиях было обнаружено, что распространенность *SLC26A4*-ассоциированной потери слуха и спектр патогенных вариантов этого гена значительно варьируют в разных регионах мира. В настоящее время стало очевидным, что спектр патогенных вариантов гена *SLC26A4*, обнаруженный в азиатских популяциях, существенно отличается от такового в популяциях европейского происхождения (Park et al., 2003; Albert et al., 2006; Du et al., 2013; Lu et al., 2015; Tsukada et al., 2015).

При анализе гена *SLC26A4* в ходе многолетних исследований наследуемой глухоты у тувинцев, коренного населения Республики Тыва (Южная Сибирь), было показано, что доля *SLC26A4*-ассоциированной потери слуха у тувинских пациентов является одной из самых высоких в мире (28.2 %) (Danilchenko et al., 2021). У них был обнаружен специфический спектр вариаций последовательности гена *SLC26A4*, включающий как известные патогенные варианты, так и ряд новых вариантов этого гена с пока неопределенным клиническим значением. Большинство мутантных *SLC26A4*-аллелей, выявленных у пациентов, было представлено тремя патогенными вариантами: c.919-2A>G, c.2027T>A и c.1545T>G (69.3, 17.5 и 8.0 % соответственно), суммарная частота гетерозиготного носительства которых в контрольной выборке тувинцев достигала 7.1 % (Danilchenko et al., 2021). Преобладание варианта c.919-2A>G позволило предположить роль эффекта основателя в его накоплении у тувинцев. В нашем недавнем исследовании (Danilchenko et al., 2023) мы выявили общность STR- и SNP-гаплотипов у всех носителей варианта c.919-2A>G, что убедительно указывает на его происхождение от общего предка, тем самым подтверждая решающую роль эффекта основателя в распространенности этого патогенного варианта гена *SLC26A4* у коренного населения Республики Тыва.

Целью данного исследования был сравнительный анализ генетического окружения патогенных вариантов c.1545T>G, c.2027T>A и c.919-2A>G гена *SLC26A4*, выявленных с высокой частотой у коренного населения Республики Тыва.

Материал и методы

Анализируемые выборки. Генотипирование генетических маркеров (STR и SNP) для анализа гаплотипов участка хромосомы 7, включающего ген *SLC26A4*, проведено на выборке тувинских пациентов, имеющих вариант c.2027T>A гена *SLC26A4* в гомозиготном ($n = 4$) или компаунд-гетерозиготном состоянии ($n = 15$), а также носителей варианта c.1545T>G гена *SLC26A4* в компаунд-гетерозиготном состоянии ($n = 15$). Для сравнительного анализа были использованы полученные ранее данные о структуре гаплотипов у тувинских пациентов, гомозиготных по варианту c.919-2A>G ($n = 23$), и индивидуумов из контрольной выборки, представленной не связанными родственниками тувинцами ($n = 63$) (Danilchenko et al., 2023). У всех участников исследования забор венозной крови из локтевой вены для выделения образцов ДНК осуществлен после письменного информированного согласия на обследование (у детей – после письменного информиро-

ванного согласия родителей или опекунов). Исследование одобрено комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Исторические сведения о популяции тувинцев. Тувинцы общей численностью около 300 тыс. человек (по данным Всероссийской переписи 2021 г.) проживают в настоящее время преимущественно в Республике Тыва, граничащей на юге и востоке с Монголией. Помимо Республики Тыва и ряда других регионов России, относительно небольшие группы тувинцев проживают в северной части Монголии и в Синьцзян-Уйгурском автономном районе Китая (Mongush, 1996; Chen et al., 2011).

Тувинцы – один из древнейших тюркоязычных народов, населяющих Центральную Азию и Саяно-Алтайский регион. В разное время Тува находилась на периферии могущественного государства гуннов (II в. до н.э. – I в. н.э.), входила в состав Древнетюркского (VI–VIII вв.), Уйгурского (VIII–IX вв.), Енисейского кыргызского (IX–XII вв.) каганатов, а также Монгольской империи чингизидов (XIII–XIV вв.). Эти исторические события и длительные связи с населением соседних регионов (тюрко-, монголо-, кетоязычные и самодийские племена) оказали определенное влияние на формирование тувинского этноса (История Тувы, 2001; Маннай-Оол, 2004) и особенностей популяционно-генетической структуры тувинского населения.

Экспериментальные методы. Для анализа гаплотипов, несущих варианты c.1545T>G и c.2027T>A гена *SLC26A4*, проведено генотипирование генетических маркеров (STR и SNP), ранее использованных в нашем исследовании при изучении структуры гаплотипов для варианта c.919-2A>G (Danilchenko et al., 2023): пяти STR (D7S2420, D7S496, D7S2456, D7S525, фланкирующие на разном расстоянии ген *SLC26A4*, и внутригенный D7S2459), а также девяти внутригенных SNP (rs2248464, rs2248465, rs3801943, rs2712212, rs2395911, rs2712211, rs3801940, rs2072064, rs2072065) (рис. 1).

Генотипирование STR-маркеров (фрагментный анализ) и SNP-маркеров (секвенирование по Сэнгеру) выполнено на генетическом анализаторе ABI 3130XL (Applied Biosystems, США) в ЦКП ИХБФМ СО РАН «Геномика» (Новосибирск). Детали экспериментальных методов генотипирования представлены в работе (Danilchenko et al., 2023).

Статистические методы. Для статистического анализа различий в частотах аллелей генетических маркеров и гаплотипов между анализируемыми группами применяли односторонний точный метод Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Неравновесие по сцеплению между аллелями STR-маркеров хромосомы 7 и аллелями с вариантами c.1545T>G или c.2027T>A гена *SLC26A4* рассчитывали по формуле $\delta = (Pd - Pn)/(1 - Pn)$, где δ – мера неравновесия по сцеплению; Pd – частота ассоциированного аллеля среди хромосом с вариантами c.1545T>G или c.2027T>A в выборках пациентов; Pn – частота этого же аллеля среди хромосом без этих вариантов в контрольной выборке (Bengtsson, Thomson, 1981).

Реконструкция гаплотипов на основе обнаруженных аллелей STR- и SNP-маркеров в выборках носителей ва-

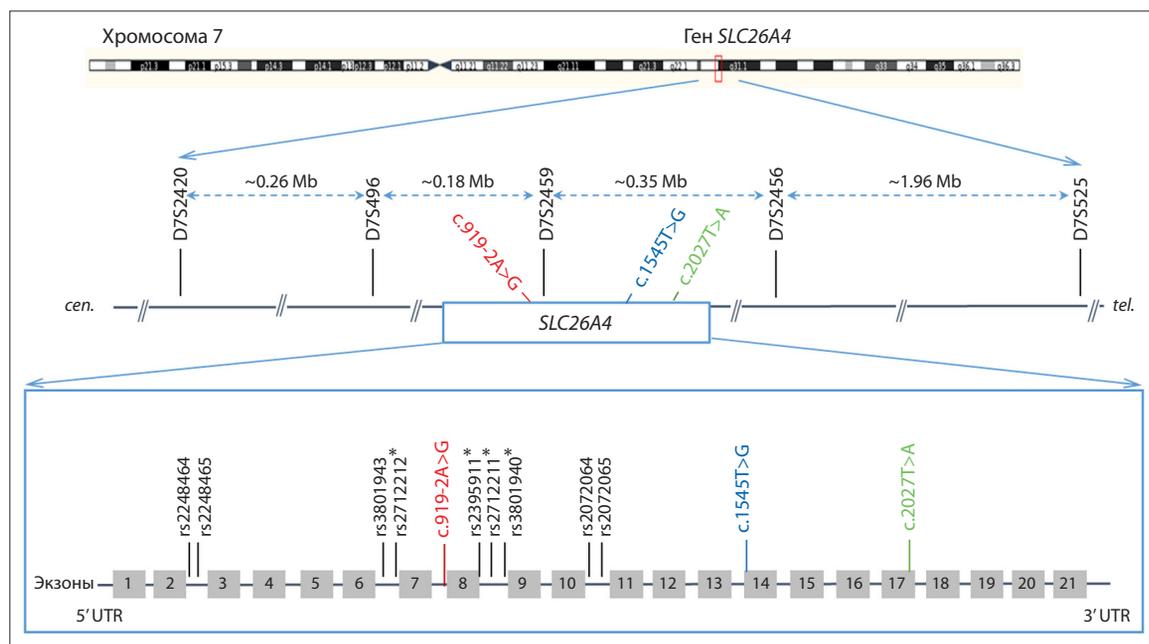


Рис. 1. Схематическая структура гена *SLC26A4* и расположение генетических маркеров (пяти STR и девяти SNP), которые были использованы для реконструкции гаплотипов.

Патогенные варианты с.919-2A>G, с.1545T>G и с.2027T>A гена *SLC26A4* выделены цветом. Расстояния между STR-маркерами (п. н.) указаны в мегабазисах (Mb). Звездочкой отмечены четыре SNP-маркера из работы (Wu et al., 2005), использованные для сравнительного анализа. *cen.* – центромера, *tel.* – теломера. Рисунок модифицирован из (Danilchenko et al., 2023).

риантов с.1545T>G или с.2027T>A проводилась вручную, с использованием данных анализа генетических маркеров у их родственников (когда это было возможно). Данные о реконструкции гаплотипов и их частотное распределение в контрольной выборке тувинцев получены нами ранее с использованием пакета программ Arlequin v.3.5.1.2 (<https://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3512/>, алгоритм Expectation-Maximization) (Danilchenko et al., 2023).

Оценка «возраста» вариантов гена *SLC26A4*. Оценка «возраста» мутации основана на ожидаемой потере сцепления между мутацией и аллелями окружающих генетических маркеров в течение времени вследствие рекомбинации (концепция «молекулярных часов»). Для оценки «возраста» анализируемых вариантов были применены два метода: «метод одного маркера», основанный на аллельной вариации одного маркера (Risch et al., 1995; Slatkin, Rannala, 2000), и метод, базирующийся на данных о гаплотипах, реализуемый с помощью программы DMLE+v.2.3 (Disequilibrium Mapping and Likelihood Estimation, DMLE+v.2.3: <http://dmle.org/>) (детали используемых методов приведены в Приложении 1)¹. «Возраст» варианта определялся путем оценки числа поколений (g) и лет (в предположении, что $g = 25$ лет), прошедших с момента его возникновения.

Результаты

В нашем недавнем исследовании (Danilchenko et al., 2021) мы провели анализ гена *SLC26A4* методом секвенирования по Сэнгеру у пациентов с потерей слуха, принадлежащих к

тувинцам – коренному сибирскому тюркоязычному народу (Республика Тыва, Южная Сибирь). У 28.2 % (62 из 220) включенных в исследование пациентов были выявлены биаллельные патогенные варианты гена *SLC26A4*. Уровень *SLC26A4*-ассоциированной потери слуха оказался одним из самых высоких среди всех популяций в мире. Подавляющее большинство обнаруженных мутантных *SLC26A4*-аллелей представлено тремя патогенными вариантами – с.919-2A>G, с.2027T>A и с.1545T>G.

Вариант с.919-2A>G

Большинство тувинских пациентов были гомозиготными или компаунд-гетерозиготными по патогенному варианту с.919-2A>G. Доля с.919-2A>G составила 69.3 % среди всех мутантных *SLC26A4*-аллелей, выявленных у тувинских больных, а частота его гетерозиготного носительства в тувинской популяции – 5.1 % (Danilchenko et al., 2021). Вариант с.919-2A>G находится в каноническом (-2) 3'-акцепторном сайте сплайсинга в интронной области между экзонами 7 и 8 и приводит к нарушениям процесса сплайсинга (Yang J.J. et al., 2005; Lu et al., 2011; Wasano et al., 2020).

В многочисленных исследованиях было показано, что вариант с.919-2A>G широко распространен у пациентов из азиатских регионов (материковый Китай, Тайвань, Монголия, Корея и Япония) и встречается с наибольшей частотой в Китае и Монголии, тогда как в других регионах мира этот вариант крайне редок или отсутствует (Park et al., 2003; Wu et al., 2005; Albert et al., 2006; Dai et al., 2008; Du et al., 2013; Yang X.L. et al., 2013; Lu et al., 2015; Tsukada et al., 2015; Erdenechuluun et al., 2018).

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx7.pdf>

Вариант c.2027T>A

Вариант c.2027T>A (p.Leu676Gln) гена *SLC26A4* обнаружен в гомозиготном состоянии или в компаунд-гетерозиготном состоянии у 19 тувинских пациентов. В общем числе мутантных вариантов гена *SLC26A4*, выявленных у тувинских пациентов, c.2027T>A занимает второе место (17.5 %) после варианта c.919-2A>G (69.3 %) (Danilchenko et al., 2021).

Вариант c.2027T>A приводит к замене лейцина на глутамин в аминокислотной позиции 676 (p.Leu676Gln) в высококонсервативной области STAS-домена в COOH-концевой части белковой молекулы пендрин. Экспериментальные исследования показали, что этот вариант вызывает задержку мутантного белка во внутриклеточном пространстве и нарушение его функции (Gillam et al., 2004; Yoon et al., 2008). Вариант c.2027T>A обнаруживался с невысокой частотой (только у единичных пациентов и только в компаунд-гетерозиготном или гетерозиготном состоянии) в Китае, Корее и Монголии (Park et al., 2003; Choi et al., 2009; Huang et al., 2011; Chai et al., 2013; Erdechuluun et al., 2018).

Вариант c.1545T>G

Этот новый, не описанный ранее миссенс-вариант в экзоне 14 гена *SLC26A4*, который, по-видимому, приводит к замене фенилаланина на лейцин в аминокислотной позиции 515 (p.Phe515Leu), был обнаружен в компаунд-гетерозиготном состоянии у 15 тувинских пациентов, происходящих из десяти не связанных родством семей. Частота гетерозиготного носительства c.1545T>G в контрольной выборке тувинцев составила 2.0 %. Сегрегация c.1545T>G с потерей слуха в родословных пациентах, значимое превышение его частоты в выборке больных по сравнению с контрольной выборкой ($p = 0.03391$), результаты предсказательных компьютерных программ и отсутствие этого варианта в мировых базах геномных данных человека свидетельствуют в пользу его патогенной значимости (Danilchenko et al., 2021).

Реконструкция STR-гаплотипов для вариантов c.1545T>G и c.2027T>A гена *SLC26A4*

Для реконструкции гаплотипов участка хромосомы 7, несущих патогенные варианты c.1545T>G и c.2027T>A гена *SLC26A4*, у неродственных носителей этих вариантов было генотипировано пять STR (D7S2420, D7S496, D7S2459, D7S2456, D7S525) (см. рис. 1). Ранее эти STR использовались при анализе гаплотипов, несущих патогенный вариант c.919-2A>G (Danilchenko et al., 2023). Результаты генотипирования STR-маркеров в сравнении с данными, полученными нами на контрольной выборке тувинцев, представлены в Приложении 2 (табл. S1 и S2). Установлено, что в контрольной выборке все STR были высокополиморфными: D7S2420 – 10 аллелей, D7S496 – 10 аллелей, D7S2459 – 7 аллелей, D7S2456 – 5 аллелей, D7S525 – 8 аллелей (Danilchenko et al., 2023). У носителей варианта c.1545T>G все STR оказались мономорфными (только один аллель по каждому STR-маркеру) (см. табл. S1). У носителей варианта c.2027T>A мономорфными оказались четыре STR – D7S2420, D7S496, D7S2459, D7S2456, но по дистальному маркеру D7S525

было выявлено три разных аллеля (221, 227, 231 с частотами 0.4000, 0.1333 и 0.4667 соответственно) (см. табл. S2). Сравнительный анализ частот аллелей D7S525 в выборке носителей c.2027T>A и в контрольной выборке выявил статистически значимые различия ($p < 0.05$) в частотах аллелей 227 и 231 (см. табл. S2).

Генотипирование STR у носителей варианта c.1545T>G показало полное сцепление этого варианта с аллелями 286 (D7S2420), 118 (D7S496), 147 (D7S2459), 244 (D7S2456), 229 (D7S525). Таким образом, вариант c.1545T>G характеризуется единственным гаплотипом 286-118-147-c.1545T>G-244-229, размер которого, определяемый дистальными маркерами D7S2420 и D7S525, составляет ~2.75 Mb. Анализ STR у носителей варианта c.2027T>A показал полное сцепление этого варианта с аллелями 280 (D7S2420), 118 (D7S496), 141 (D7S2459), 244 (D7S2456), но присутствие трех различных аллелей (221, 227, 231) у дистального маркера D7S525 предполагает наличие трех разных гаплотипов для варианта c.2027T>A.

STR-гаплотипы, реконструированные для вариантов c.1545T>G и c.2027T>A, в сравнении с STR-гаплотипами для варианта c.919-2A>G представлены на рис. 2.

Мы сопоставили структуру и частоту STR-гаплотипов, обнаруженных для вариантов c.1545T>G и c.2027T>A, с STR-гаплотипами, выявленными нами ранее для варианта c.919-2A>G (Danilchenko et al., 2023) (табл. 1). Можно заметить, что STR-гаплотипы, обнаруженные для всех трех вариантов, различаются по аллельному составу, что говорит о выраженной специфичности генетическо-

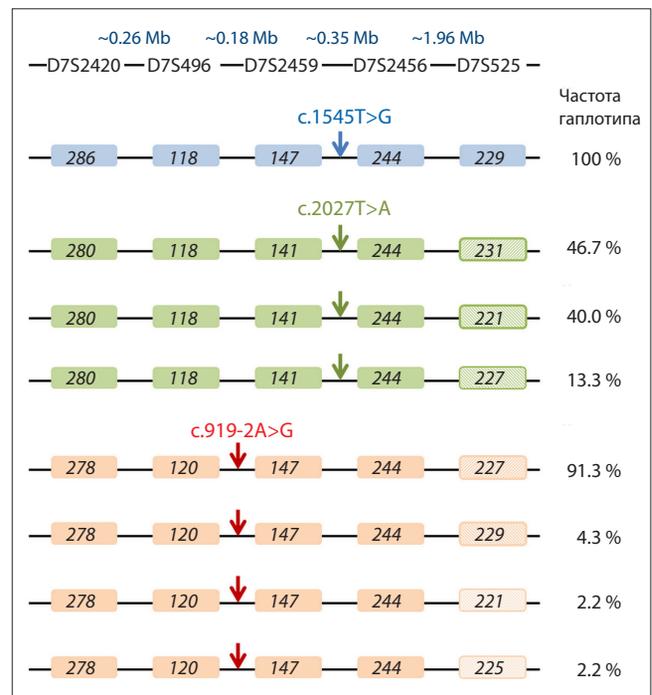


Рис. 2. Схематическое изображение STR-гаплотипов у носителей вариантов c.1545T>G или c.2027T>A в сравнении с STR-гаплотипами для варианта c.919-2A>G (Danilchenko et al., 2023).

Локализация каждого из анализируемых вариантов показана стрелкой.

Таблица 1. Частоты STR-гаплотипов, обнаруженных на мутантных хромосомах, несущих патогенные варианты с.919-2А>G, с.1545Т>G или с.2027Т>А гена *SLC26A4*, по сравнению с нормальными хромосомами

STR-гаплотипы D7S2420-D7S496-D7S2459-D7S2456-D7S525 (~2.75 Mb)	Частота гаплотипов, %		χ^2	p	Источник
	Мутантные хромосомы	Нормальные хромосомы			
D7S2420-D7S496-D7S2459-<i>/с.1545Т>G</i>-D7S2456-D7S525					
286-118-147-244-229	1.0	0.0079	110	<10 ⁻¹³	Данное исследование
Другие гаплотипы	0.0	0.9921	–	–	
D7S2420-D7S496-D7S2459-<i>/с.2027Т>А</i>-D7S2456-D7S525					
280-118-141-244-231	0.4667	0.0	52	<10 ⁻⁷	Данное исследование
280-118-141-244-221	0.4000	0.0079	36	<10 ⁻⁵	
280-118-141-244-227	0.1333	0.0159	3.1	0.0561	
Другие гаплотипы	0.0	0.9762	–	–	
D7S2420-D7S496-<i>/с.919-2А>G</i>-D7S2459-D7S2456-D7S525					
278-120-147-244-227	0.9130	0.0	150	<10 ⁻³⁵	Danilchenko et al., 2023
278-120-147-244-229	0.0435	0.0	2.4	0.0704	
278-120-147-244-221	0.0217	0.0	0.28	0.2674	
278-120-147-244-225	0.0217	0.0	0.28	0.2674	
Другие гаплотипы	0.0	1.0	–	–	

Примечание. Обозначения STR-аллелей, входящих в гаплотипы, соответствуют размеру продуктов ПЦР (в нуклеотидах). Наиболее распространенные STR-гаплотипы и статистически значимые (p < 0.05) различия в частотах гаплотипов выделены жирным шрифтом.

го окружения для каждого из них. Кроме того, сравнение частоты встречаемости основных STR-гаплотипов в выборках носителей вариантов с.1545Т>G, с.2027Т>А, с.919-2А>G (группы тувинских пациентов с потерей слуха) и в контрольной выборке тувинцев выявило статистически значимые отличия (см. табл. 1).

Реконструкция SNP-гаплотипов для вариантов с.1545Т>G и с.2027Т>А гена *SLC26A4*

Для изучения тонкой структуры гаплотипов, включающих варианты с.1545Т>G или с.2027Т>А гена *SLC26A4*, у носителей этих вариантов было генотипировано девять внутригенных SNP (rs2248464, rs2248465, rs3801943, rs2712212, rs2395911, rs2712211, rs3801940, rs2072064, rs2072065), которые ранее анализировались для реконструкции генетического окружения (гаплотипов) варианта с.919-2А>G у его гомозиготных носителей (Danilchenko et al., 2023). Четыре из них (rs2712212, rs2395911, rs2712211 и rs3801940) были включены для проведения сравнительного анализа с данными из работы (Wu et al., 2005), где они использовались для установления структуры гаплотипов, несущих вариант с.919-2А>G у тайваньских пациентов с нарушением слуха (см. рис. 1). Структура SNP-гаплотипов для вариантов с.1545Т>G и с.2027Т>А представлена на рис. 3 в сравнении с SNP-гаплотипом для варианта с.919-2А>G (Danilchenko et al., 2023).

У всех носителей варианта с.1545Т>G обнаружен единственный SNP-гаплотип А-С-Т-Г-Т-С-Г-Т-Т (100%), в то время как частота этого гаплотипа в контрольной выборке тувинцев составила 3.8% (данные не показаны). У всех носителей варианта с.2027Т>А тоже был найден единственный SNP-гаплотип Т-С-Т-А-Т-С-С-Т-С (100%),

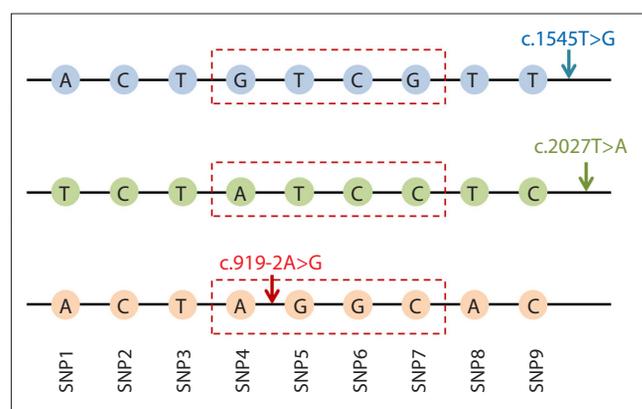


Рис. 3. Схематическое изображение SNP-гаплотипов у носителей вариантов с.1545Т>G или с.2027Т>А в сравнении с SNP-гаплотипами для варианта с.919-2А>G (Danilchenko et al., 2023).

Обозначения SNP-маркеров: SNP1 – rs2248464, SNP2 – rs2248465, SNP3 – rs3801943, SNP4 – rs2712212, SNP5 – rs2395911, SNP6 – rs2712211, SNP7 – rs3801940, SNP8 – rs2072064, SNP9 – rs2072065. Красными штриховыми линиями выделены четыре SNP-маркера, анализируемые у носителей варианта с.919-2А>G на Тайване (Wu et al., 2005). Локализация каждого из анализируемых вариантов показана стрелкой.

частота которого в контрольной выборке составила 1.7% (данные не показаны). У носителей варианта с.919-2А>G ранее также был выявлен единственный гаплотип А-С-Т-А-Г-С-Г-А-С (100%) с частотой 2.8% в контрольной выборке (Danilchenko et al., 2023). Кроме того, ранее нами была установлена идентичность небольшого (~4.5 kb) «внутреннего» SNP-гаплотипа А-Г-Г-С, образованного SNP rs2712212, rs2395911, rs2712211 и rs3801940 у но-

сителей варианта c.919-2A>G – тувинцев (Danilchenko et al., 2023) и китайцев хань из Тайваня (Wu et al., 2005), что предполагает их общее происхождение. Но этот SNP-гаплотип не обнаружен у носителей вариантов c.1545T>G и c.2027T>A (см. рис. 3). Таким образом, можно заключить, что гаплотипы, образованные аллелями SNP-маркеров для каждого из трех анализируемых патогенных вариантов гена *SLC26A4*, являются высокоспецифичными.

Оценка «возраста» вариантов c.1545T>G и c.2027T>A гена *SLC26A4*

В работе (Danilchenko et al., 2023) для оценки «возраста» патогенного варианта c.919-2A>G гена *SLC26A4* использовались два метода: «метод одного маркера», который предполагает анализ аллелей наиболее дистальных маркеров, проявляющих значительное неравновесие по сцеплению, и метод с помощью программы DMLE+v.2.3, в котором оценка «возраста» варианта производится на основе реконструированных гаплотипов. В данном исследовании мы применили эти методы для оценки «возраста» вариантов c.1545T>G и c.2027T>A гена *SLC26A4* (табл. 2).

У всех носителей варианта c.1545T>G был выявлен идентичный STR-гаплотип 286-118-147-с.1545T>G-244-229. Для варианта c.2027T>A наиболее частыми оказались два гаплотипа, 280-118-141-с.2027T>A-244-231 и 280-118-141-с.2027T>A-244-221, обнаруженные со схожими частотами (0.4667 и 0.4000 соответственно), структурные различия которых определяются присутствием разных аллелей (231 и 221) дистального STR-маркера D7S525. Полученные данные позволяют предположительно оценить время возникновения вариантов c.1545T>G и c.2027T>A у тувинцев, коренного населения Республики Тыва. Мы не смогли провести оценку «возраста» варианта c.1545T>G «методом одного маркера» из-за отсутствия рекомбинации во всех проанализированных STR-маркерах, но с помощью программы DMLE+v.2.3 такие оценки были получены (см. табл. 2). Для оценки «возраста» варианта c.2027T>A «методом одного маркера» использовался аллель 231 дистального STR-маркера D7S525 (~2.32 Mb от c.2027T>A), обнаруженный в значительном неравновесии по сцеплению с c.2027T>A (см. табл. S2).

Методы, выбранные для оценки «возраста» мутаций, чувствительны к демографическим параметрам популяции, в частности к темпам роста популяции на различных исторических этапах ее развития. Поскольку точные данные об изменении численности коренного населения Тувы (тувинцев) на ранних этапах его становления отсутствуют, для расчетов мы применили три разных коэффициента прироста популяции ($d = 0.05, 0.10$ и 0.20) (см. табл. 2). Следует отметить, что данные о «возрасте» вариантов c.2027T>A и c.919-2A>G, полученные «методом одного маркера», отличаются от временных диапазонов, рассчитанных с помощью программы DMLE+v.2.3, по-видимому, «занижая» его при всех трех коэффициентах прироста популяции ($d = 0.05, 0.10, 0.20$). Кроме того, наблюдаемое пересечение временных интервалов, определенных с помощью программы DMLE+ v.2.3 для каждого из анализируемых вариантов при всех коэффициентах прироста популяции ($d = 0.05, 0.10, 0.20$), не позволяет сделать вывод о том, какой из вариантов является более «старым».

Обсуждение

В настоящей работе получены данные о структуре гаплотипов для патогенных вариантов c.1545T>G и c.2027T>A гена *SLC26A4*, наиболее частых у коренного населения Республики Тыва. Вариант c.1545T>G был впервые обнаружен нами при изучении наследственной глухоты у тувинцев, коренного населения Республики Тыва (Южная Сибирь) (Danilchenko et al., 2021), в других регионах мира этот вариант не зафиксирован. У всех носителей варианта c.1545T>G выявлены высокоспецифичные STR- и SNP-гаплотипы: STR-гаплотип 286-118-147-с.1545T>G-244-229 (100 %) и SNP-гаплотип А-С-Т-Г-Т-С-Г-Т-Т-с.1545T>G (100 %), частота которых в контрольной выборке тувинцев составляет менее 1 и 3.8 % соответственно. Эти данные убедительно свидетельствуют о едином происхождении варианта c.1545T>G и роли эффекта основателя в его распространенности у коренного населения Тувы. Вариант c.2027T>A является вторым по частоте среди всех патогенных вариантов гена *SLC26A4*, обнаруженных у тувинских пациентов, в то время как

Таблица 2. Сравнительная оценка «возраста» вариантов c.1545T>G, c.2027T>A и c.919-2A>G гена *SLC26A4* на основе STR-маркеров

Вариант гена <i>SLC26A4</i>	d	«Метод одного маркера»		Расчет с помощью DMLE+ v.2.3		Источник
		g	«Возраст», лет	95 % ДИ для g	95 % ДИ для «возраста», лет	
c.1545T>G	0.05	–	–	76–163	1900–4075	Данное исследование
	0.10			48–95	1200–2375	
	0.20			27–52	675–1300	
c.2027T>A	0.05	51	1275	65–140	1625–3500	Данное исследование
	0.10	50	1250	38–83	950–2075	
	0.20	47	1175	24–48	600–1200	
c.919-2A>G	0.05	22	550	103–198	2575–4950	Danilchenko et al., 2023
	0.10	21	525	63–107	1575–2675	
	0.20	17	425	35–59	875–1475	

Примечание. Для оценки «возраста» вариантов c.2027T>A и c.919-2A>G «методом одного маркера» использовались аллели дистального STR-маркера D7S525, а для оценки с помощью программы DMLE+ v.2.3 – STR-гаплотипы. d – различные (0.05, 0.10 или 0.20) темпы прироста численности популяции; g – число поколений; «возраст» – $g \times 25$ лет; ДИ – доверительный интервал.

данный вариант зафиксирован только у единичных пациентов из Китая, Кореи и Монголии (Park et al., 2003; Choi et al., 2009; Chai et al., 2013; Erdenechuluun et al., 2018; Kun et al., 2024). Кроме того, в нашем недавнем исследовании мы также нашли этот вариант у единичных пациентов из Республики Алтай, граничащей с Республикой Тыва (Danilchenko et al., 2021). В отличие от варианта с.1545Т>G, у носителей с.2027Т>A было выявлено три STR-гаплотипа – 280-118-141-с.2027Т>A-244-231 (46.7 %), 280-118-141-с.2027Т>A-244-221 (40.0 %) и 280-118-141-с.2027Т>A-244-227 (13.3 %), которые различаются только аллелями дистального STR-маркера D7S525.

Использование набора полиморфных генетических маркеров, идентичного тому, что был применен нами ранее при изучении гаплотипов патогенного варианта с.919-2A>G гена *SLC26A4*, наиболее частого у тувинских пациентов (Danilchenko et al., 2023), позволило провести корректное сравнение структуры STR- и SNP-гаплотипов для всех трех патогенных вариантов (с.1545Т>G, с.2027Т>A и с.919-2A>G). Сравнительный анализ показал, что состав аллелей генетических маркеров, входящих в гаплотипы, различен и высокоспецифичен для каждого из них. Таким образом, можно заключить, что каждый из анализируемых вариантов имеет особое (сходное для всех носителей того или иного варианта) генетическое окружение, по-видимому, унаследованное от различных «предков-основателей».

Мы провели грубую оценку «возраста» вариантов с.1545Т>G, с.2027Т>A и с.919-2A>G, но, в связи с ограниченностью информации о демографических изменениях популяции тувинцев на протяжении ее истории, полученные временные интервалы возникновения этих вариантов у коренного населения Тувы следует рассматривать только как ориентировочные. Тем не менее с осторожностью можно заключить, что варианты с.1545Т>G, с.2027Т>A и с.919-2A>G не являются «молодыми» (недавно возникшими) мутациями, а широкие временные интервалы их возникновения пересекаются практически при всех коэффициентах прироста популяции ($d = 0.05, 0.10$ и 0.20) (см. табл. 2).

Данные о структуре гаплотипов для варианта с.1545Т>G и его распространенность, ограниченная только территорией Тувы, а также исторические сведения об этапах этногенеза коренного населения Тувы позволяют предположить, что этот вариант мог возникнуть в результате уникального мутационного события, произошедшего уже после основного формирования тувинского этноса в конце XIII–XIV вв. Сложнее сделать вывод о происхождении варианта с.2027Т>A у тувинцев. Этот вариант с небольшой частотой встречается у пациентов из сопредельной Монголии и Китая, но, к сожалению, данные о структуре генетического окружения у носителей с.2027Т>A из этих регионов отсутствуют, что исключает проведение сравнительного анализа. Что же касается наиболее частого у тувинцев варианта с.919-2A>G, то ранее (Danilchenko et al., 2023) мы выявили идентичность «внутреннего» SNP-гаплотипа A-G-G-C (см. рис. 3), обнаруженного у тувинских пациентов, гомозиготных по с.919-2A>G, и гаплотипа, образованного теми же SNP, у носителей

с.919-2A>G из Тайваня (китайцы хань) (Wu et al., 2005). Эти данные свидетельствуют в пользу общего предка для «тувинских» и «китайских» хромосом-основателей с.919-2A>G. Учитывая полученные результаты, а также территориальное распространение варианта с.919-2A>G, с максимумом частоты встречаемости у тувинцев (Южная Сибирь) и у китайцев и монголов (Восточная и Центральная Азия), мы предположили, что вариант с.919-2A>G мог возникнуть на географически близких территориях этих регионов и впоследствии распространиться на другие регионы Азии (Danilchenko et al., 2023).

Заключение

Мы проанализировали структуру гаплотипов для патогенных вариантов с.1545Т>G и с.2027Т>A гена *SLC26A4*, обнаруженных с высокой частотой у тувинских пациентов с потерей слуха (Республика Тыва, Южная Сибирь). Сравнительный анализ реконструированных гаплотипов для с.1545Т>G и с.2027Т>A с ранее полученными данными о гаплотипах для варианта с.919-2A>G показал, что каждый из анализируемых вариантов имеет особое и сходное для всех носителей того или иного варианта генетическое окружение, по-видимому, унаследованное от различных «предков-основателей». Таким образом, получены свидетельства роли кумулятивного эффекта основателя в распространенности этих патогенных вариантов гена *SLC26A4* у коренного населения Республики Тыва. Полученные данные актуальны как для прогнозирования распространенности *SLC26A4*-обусловленной потери слуха, так и для создания регион-специфичной ДНК-диагностики наследуемой потери слуха в Республике Тыва.

Список литературы / References

- История Тувы. Т. 1. Под ред. С.И. Вайнштейна, М.Х. Маннай-оола. Новосибирск: Наука, 2001
[Vainshtein S.I., Mannay-Ool M.H. (Eds) History of Tyva. Vol. 1. Novosibirsk: Nauka Publ., 2001 (in Russian)]
Маннай-оол М.Х. Тувинцы. Происхождение и формирование этноса. Новосибирск: Наука, 2004
[Mannai-ool M.Kh. Tuva People. The Origin and Formation of the Ethnos. Novosibirsk: Nauka Publ., 2004 (in Russian)]
Albert S., Blons H., Jonard L., Feldmann D., Chauvin P., Loundon N., Sergent-Allaoui A., Houang M., Joannard A., Schmerber S., Delobel B., Leman J., Journel H., Catros H., Dollfus H., Eliot M.M., David A., Calais C., Drouin-Garraud V., Obstoy M.F., Tran Ba Huy P., Lacombe D., Duriez F., Francannet C., Bitoun P., Petit C., Garabédian E.N., Couderc R., Marlin S., Denoyelle F. *SLC26A4* gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(6):773-779. doi 10.1038/sj.ejhg.5201611
Ben Arab S., Masmoudi S., Beltaief N., Hachicha S., Ayadi H. Consanguinity and endogamy in Northern Tunisia and its impact on non-syndromic deafness. *Genet Epidemiol.* 2004;27(1):74-79. doi 10.1002/gepi.10321
Bengtsson B.O., Thomson G. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens.* 1981;18(5):356-363. doi 10.1111/j.1399-0039.1981.tb01404.x
Chai Y., Huang Z., Tao Z., Li X., Li L., Li Y., Wu H., Yang T. Molecular etiology of hearing impairment associated with nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct in East China. *Am J Med Genet A.* 2013;161A(9):2226-2233. doi 10.1002/ajmg.a.36068
Chen Z., Zhang Y., Fan A., Zhang Y., Wu Y., Zhao Q., Zhou Y., Zhou C., Bawudong M., Mao X., Ma Y., Yang L., Ding Y., Wang X., Rao S. Brief communication: Y-chromosome haplogroup analysis

- indicates that Chinese Tuvans share distinctive affinity with Siberian Tuvans. *Am J Phys Anthropol.* 2011;144(3):492-497. doi 10.1002/ajpa.21453
- Choi B.Y., Stewart A.K., Nishimura K.K., Cha W.J., Seong M.W., Park S.S., Kim S.W., Chun Y.S., Chung J.W., Park S.N., Chang S.O., Kim C.S., Alper S.L., Griffith A.J., Oh S.H. Efficient molecular genetic diagnosis of enlarged vestibular aqueducts in East Asians. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13(5):679-687. doi 10.1089/gtmb.2009.0054
- Chong J.X., Ouwenga R., Anderson R.L., Waggoner D.J., Ober C. A population-based study of autosomal-recessive disease-causing mutations in a founder population. *Am J Hum Genet.* 2012;91(4):608-620. doi 10.1016/j.ajhg.2012.08.007
- Common J.E., Di W.L., Davies D., Kelsell D.P. Further evidence for heterozygote advantage of *GJB2* deafness mutations: a link with cell survival. *J Med Genet.* 2004;41(7):573-575. doi 10.1136/jmg.2003.017632
- Dai P., Li Q., Huang D., Yuan Y., Kang D., Miller D.T., Shao H., Zhu Q., He J., Yu F., Liu X., Han B., Yuan H., Platt O.S., Han D., Wu B.L. *SLC26A4* c.919-2A>G varies among Chinese ethnic groups as a cause of hearing loss. *Genet Med.* 2008;10(8):586-592. doi 10.1097/gim.0b013e31817d2ef1
- Danilchenko V.Y., Zysar M.V., Maslova E.A., Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. Different rates of the *SLC26A4*-related hearing loss in two indigenous peoples of southern Siberia (Russia). *Diagnostics (Basel).* 2021;11(12):2378. doi 10.3390/diagnostics11122378
- Danilchenko V.Y., Zysar M.V., Maslova E.A., Orishchenko K.E., Posukh O.L. Insight into the natural history of pathogenic variant c.919-2A>G in the *SLC26A4* gene involved in hearing loss: the evidence for its common origin in southern Siberia (Russia). *Genes (Basel).* 2023;14(4):928. doi 10.3390/genes14040928
- Du W., Guo Y., Wang C., Wang Y., Liu X. A systematic review and meta-analysis of common mutations of *SLC26A4* gene in Asian populations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2013;77(10):1670-1676. doi 10.1016/j.ijporl.2013.07.023
- Erdenechuluun J., Lin Y.H., Ganbat K., Bataakhuu D., Makhbal Z., Tsai C.Y., Lin Y.H., Chan Y.H., Hsu C.J., Hsu W.C., Chen P.L., Wu C.C. Unique spectra of deafness-associated mutations in Mongolians provide insights into the genetic relationships among Eurasian populations. *PLoS One.* 2018;13(12):e0209797. doi 10.1371/journal.pone.0209797
- Gillam M.P., Sidhaye A.R., Lee E.J., Rutishauser J., Stephan C.W., Kopp P. Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem.* 2004;279(13):13004-13010. doi 10.1074/jbc.M313648200
- Huang S., Han D., Yuan Y., Wang G., Kang D., Zhang X., Yan X., Meng X., Dong M., Dai P. Extremely discrepant mutation spectrum of *SLC26A4* between Chinese patients with isolated Mondini deformity and enlarged vestibular aqueduct. *J Transl Med.* 2011;9:167. doi 10.1186/1479-5876-9-167
- Kun L., Jiexiang H., Hua L., Junlin H., Yijun R., Lixian Z., Mingqiao C. Genetic screening of 15 hearing loss variants in 77,647 neonates with clinical follow-up. *Mol Genet Genomic Med.* 2024;12(1):e2324. doi 10.1002/mgg3.2324
- Lu Y.C., Wu C.C., Shen W.S., Yang T.H., Yeh T.H., Chen P.J., Yu I.S., Lin S.W., Wong J.M., Chang Q., Lin X., Hsu C.J. Establishment of a knock-in mouse model with the *SLC26A4* c.919-2A>G mutation and characterization of its pathology. *PLoS One.* 2011;6(7):e22150. doi 10.1371/journal.pone.0022150
- Lu Y.J., Yao J., Wei Q.J., Xing G.Q., Cao X. Diagnostic value of *SLC26A4* mutation status in hereditary hearing loss with EVA: a PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(50):e2248. doi 10.1097/MD.0000000000002248
- Mongush M.V. Tuvans of Mongolia and China. *Int J Cent Asian Stud.* 1996;1:225-243
- Nance W.E., Kearsey M.J. Relevance of connexin deafness (DFNB1) to human evolution. *Am J Hum Genet.* 2004;74(6):1081-1087. doi 10.1086/420979
- Nance W.E., Liu X.Z., Pandya A. Relation between choice of partner and high frequency of connexin-26 deafness. *Lancet.* 2000;356(9228):500-501. doi 10.1016/S0140-6736(00)02565-4
- Park H.J., Shaikat S., Liu X.Z., Hahn S.H., Naz S., Ghosh M., Kim H.N., Moon S.K., Abe S., Tukamoto K., Riazuddin S., Kabra M., Erdenetungalag R., Radnaabazar J., Khan S., Pandya A., Usami S.I., Nance W.E., Wilcox E.R., Riazuddin S., Griffith A.J. Origins and frequencies of *SLC26A4* (*PDS*) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet.* 2003;40(4):242-248. doi 10.1136/jmg.40.4.242
- Razdan S., Raina S.K., Pandita K.K., Razdan S., Nanda R., Kaul R., Dogra S. Inbreeding as a cause for deafness: Dadhakai study. *Indian J Hum Genet.* 2012;18(1):71-74. doi 10.4103/0971-6866.96655
- Risch N., de Leon D., Ozelius L., Kramer P., Almasy L., Singer B., Fahn S., Breakefield X., Bressman S. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population. *Nat Genet.* 1995;9(2):152-159. doi 10.1038/ng0295-152
- Scott D.A., Carmi R., Elbedour K., Duyk G.M., Stone E.M., Sheffield V.C. Nonsyndromic autosomal recessive deafness is linked to the DFNB1 locus in a large inbred Bedouin family from Israel. *Am J Hum Genet.* 1995;57(4):965-968.
- Slatkin M., Rannala B. Estimating allele age. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000;1:225-249. doi 10.1146/annurev.genom.1.1.225
- Tsukada K., Nishio S.Y., Hattori M., Usami S. Ethnic-specific spectrum of *GJB2* and *SLC26A4* mutations: their origin and a literature review. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2015;124(1):61S-76S. doi 10.1177/0003489415575060
- Wasano K., Takahashi S., Rosenberg S.K., Kojima T., Mutai H., Matsunaga T., Ogawa K., Homma K. Systematic quantification of the anion transport function of pendrin (*SLC26A4*) and its disease-associated variants. *Hum Mutat.* 2020;41(1):316-331. doi 10.1002/humu.23930
- Wu C.C., Yeh T.H., Chen P.J., Hsu C.J. Prevalent *SLC26A4* mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct and/or Mondini dysplasia: a unique spectrum of mutations in Taiwan, including a frequent founder mutation. *Laryngoscope.* 2005;115(6):1060-1064. doi 10.1097/01.MLG.0000163339.61909.D0
- Yang J.J., Tsai C.C., Hsu H.M., Shiao J.Y., Su C.C., Li S.Y. Hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct and Mondini dysplasia is caused by splice-site mutation in the *PDS* gene. *Hear Res.* 2005;199(1-2):22-30. doi 10.1016/j.heares.2004.08.007
- Yang X.L., Bai-Cheng X., Chen X.J., Pan-Pan B., Jian-Li M., Xiao-Wen L., Zhang Z.W., Wan D., Zhu Y.M., Guo Y.F. Common molecular etiology of patients with nonsyndromic hearing loss in Tibetan, Tu nationality, and Mongolian patients in the northwest of China. *Acta Otolaryngol.* 2013;133(9):930-934. doi 10.3109/00016489.2013.795288
- Yoon J.S., Park H.J., Yoo S.Y., Namkung W., Jo M.J., Koo S.K., Park H.Y., Lee W.S., Kim K.H., Lee M.G. Heterogeneity in the processing defect of *SLC26A4* mutants. *J Med Genet.* 2008;45(7):411-419. doi 10.1136/jmg.2007.054635
- Zlotogora J. Multiple mutations responsible for frequent genetic diseases in isolated populations. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(3):272-278. doi 10.1038/sj.ejhg.5201760

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 15.08.2024. После доработки 07.11.2024. Принята к публикации 08.11.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-18

База знаний MiceDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам мыши как модельного объекта биомедицинских исследований

О.А. Подколотная ¹, И.В. Чадаева ^{1,2}, С.В. Филонов¹, Н.Л. Подколотный ^{1,3}, Д.А. Рассказов ¹, Н.Н. Твердохлеб¹, К.А. Золотарева ¹, А.Г. Богомолов ^{1,4}, Е.Ю. Кондратюк ^{1,5}, Д.Ю. Ощепков ^{1,2,4}, М.П. Пономаренко ^{1,2} 

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

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Институт вычислительной математики и математической геофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁵ Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, р. п. Краснообск, Новосибирская область, Россия

 pon@bionet.nsc.ru

Аннотация. Фундаментальное понимание многих биологических процессов, происходящих в организме человека, стало возможным благодаря экспериментальным исследованиям на животных моделях. Основным стержнем современных биомедицинских исследований является использование мышинных моделей для изучения важных патофизиологических механизмов, оценки новых терапевтических подходов и принятия решений о переходе или отказе от новых кандидатов на препараты в доклинических испытаниях. Преимущество задействования мышей заключается в их небольших размерах, простых условиях содержания и относительно легкой генетической модификации. В настоящее время более 90 % грызунов, используемых для фармацевтических исследований, – мыши. В представленной работе создана пилотная версия базы знаний MiceDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам (ДЭГ) мыши как модельного объекта в биомедицинских исследованиях. Она представляет собой коллекцию опубликованных данных по экспрессии генов у мышей разных линий, предназначенных для изучения возрастных заболеваний: гипертонии, пародонтита, хрупкости кости, фиброза почки, ремоделирования гладких мышц, сердечной недостаточности, нарушения циркадного ритма. Пилотный выпуск базы знаний MiceDEGdb содержит 21 754 ДЭГ, представляющих 9769 уникальных генов *Mus musculus*, у которых изменяется уровень транскрипции в 25 экспериментах по технологии RNA-seq с использованием восьми тканей (десна, кость, почка, правый желудочек сердца, дуга аорты, гиппокамп, скелетная мышца и матка) в шести генетических линиях мышей, C57BL/6J, Ren1cCre|ZsGreen, B6.129S7(Cg)-Polgtm1Prol/J, BPN/3J, BPH/2J и Kunming, в качестве моделей восьми заболеваний человека согласно 10 оригинальным статьям. Новшеством MiceDEGdb в сравнении с другими базами данных о ДЭГ мышей является курируемая аннотация отклонений ДЭГ мыши от соответствующей нормы с помощью независимых биомедицинских публикаций о сопоставленных изменениях экспрессии гомологичных генов человека у пациентов с теми или иными заболеваниями относительно условно здоровых добровольцев. В пилотном выпуске MiceDEGdb документировано 85 092 таких аннотаций для 318 генов человека при 895 заболеваниях согласно 912 научным статьям, цитируемым с помощью их идентификаторов PubMed ID. Информационное содержание MiceDEGdb может быть интересным для генетиков, молекулярных биологов, биоинформатиков, клиницистов, фармацевтов и генетических консультантов по персонализированной медицине. База знаний MiceDEGdb находится в свободном доступе по гиперссылке: <https://www.sysbio.ru/MiceDEGdb>.

Ключевые слова: база знаний; ДЭГ; мышь, *Mus musculus*; мышинные модели заболеваний; возрастные расстройства; инфекционные заболевания; циркадный ритм; RNA-seq.

Для цитирования: Подколотная О.А., Чадаева И.В., Филонов С.В., Подколотный Н.Л., Рассказов Д.А., Твердохлеб Н.Н., Золотарева К.А., Богомолов А.Г., Кондратюк Е.Ю., Ощепков Д.Ю., Пономаренко М.П. База знаний MiceDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам мыши как модельного объекта биомедицинских исследований. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):153-161. doi 10.18699/vjgb-25-18

Финансирование. Работа выполнена при поддержке бюджетных проектов FWNR-2022-0020 и FWNM-2025-0005.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Биоинформатика» за предоставление вычислительных ресурсов.

MiceDEGdb: a knowledge base on differentially expressed mouse genes as a model object in biomedical research

О.А. Podkolodnaya ¹, I.V. Chadaeva ^{1,2}, S.V. Filonov¹, N.L. Podkolodnyy ^{1,3}, D.A. Rasskazov ¹, N.N. Tverdokhlebl¹, K.A. Zolotareva ¹, A.G. Bogomolov ^{1,4}, E.Yu. Kondratyuk ^{1,5}, D.Yu. Oshchepkov ^{1,2,4}, M.P. Ponomarenko ^{1,2} 

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

² Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁵ Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

 pon@bionet.nsc.ru

© Подколотная О.А., Чадаева И.В., Филонов С.В., Подколотный Н.Л., Рассказов Д.А., Твердохлеб Н.Н., Золотарева К.А., Богомолов А.Г., Кондратюк Е.Ю., Ощепков Д.Ю., Пономаренко М.П., 2025

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. The fundamental understanding of many biological processes that unfold in a human body has become possible due to experimental studies on animal models. The backbone of modern biomedical research is the use of mouse models for studying important pathophysiological mechanisms, assessing new therapeutic approaches and making decisions on acceptance or rejection of new candidate medicines in preclinical trials. The use of mice is advantageous because they have small size, are easy to keep and to genetically modify. Mice make up more than 90 % of the rodents used for pharmaceutical research. We present the pilot version of MiceDEGdb, a knowledge base on the genes that are differentially expressed in the mouse used as a model object in biomedical research. MiceDEGdb is a collection of published data on gene expression in mouse strains used for studying age-related diseases, such as hypertension, periodontal disease, bone fragility, renal fibrosis, smooth muscle remodeling, heart failure and circadian rhythm disorder. The pilot release of MiceDEGdb contains 21,754 DEGs representing 9,769 unique *Mus musculus* genes the transcription levels whereof were found as being changed in 25 RNA-seq experiments involving eight tissues – gum, bone, kidney, right ventricle, aortic arch, hippocampus, skeletal muscle and uterus – in six genetic mouse strains (C57BL/6J, Ren1cCre|ZsGreen, B6.129S7(Cg)-Polgtm1Pro|J, BPN/3J, BPH/2J and Kunming) used as models of eight human diseases – all these data were based on information in 10 original articles. MiceDEGdb is novel in that it features a curated annotation of changes in the expression levels of mouse DEGs using independent biomedical publications about same-direction changes in the expression levels of human homologs in patients with one disease or the other. In its pilot release, MiceDEGdb documented 85,092 such annotations for 318 human genes in 895 diseases, as suggest to 912 scientific articles referenced by their PubMed ID. The information contained in MiceDEGdb may be of interest to geneticists, molecular biologists, bioinformatics scientists, clinicians, pharmacologists and genetic advisors in personalized medicine. MiceDEGdb is freely available at <https://www.sysbio.ru/MiceDEGdb>.

Key words: knowledge base; DEG; mouse *Mus musculus*; mouse models of disease; age frustration; infectious diseases; circadian rhythm; RNA-seq.

For citation: Podkolodnaya O.A., Chadaeva I.V., Filonov S.V., Podkolodnyy N.L., Rasskazov D.A., Tverdokhle N.N., Zolotareva K.A., Bogomolov A.G., Kondratyuk E.Yu., Oshchepkov D.Yu., Ponomarenko M.P. MiceDEGdb: a knowledge base on differentially expressed mouse genes as a model object in biomedical research. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):153-161. doi 10.18699/vjgb-25-18

Введение

Использование животных – неотъемлемая особенность биомедицинских исследований при изучении биологических процессов (Lukacs et al., 1996), патогенеза заболеваний (Conti et al., 2006) и терапевтических вмешательств (Chuang et al., 2002), а также в оценке безопасности, токсичности и канцерогенности кандидатов в медикаментозные препараты (Segalat, 2007). При этом степень адекватности модели заболеваний с использованием животных определяется согласно строгим критериям соответствия между исследуемыми состояниями этих животных и симптомами пациентов с изучаемым заболеванием (Gryksa et al., 2023). Интерпретация наблюдений в рамках модели заболеваний человека с использованием животных требует не только знания изучаемых процессов и патофизиологии, но и распознавания спонтанных, фоновых и сочетанных состояний, которые могут повлиять на результаты исследования или исказить их (White et al., 2016).

В настоящее время более 90 % фармацевтических исследований проводится именно на лабораторных линиях мышей (Vandamme, 2014). При этом низкая стоимость содержания мышей по сравнению, например, с приматами, и способность давать потомство каждые два месяца определяют популярность этого объекта для исследований (Girard et al., 2009).

Хотя модели животных продолжают играть большую роль в оценке эффективности и безопасности новых вмешательств в лечении рака, их применению часто препятствуют генетические, молекулярные и физиологические ограничения. Несмотря на успешное доклиническое тестирование, 85 % первых этапов клинических испытаний новых препаратов терпят неудачу: из тех, которые доходят до III фазы, только половина в конечном итоге получает лицензию для клинического применения. Использование

мышей в качестве модельных организмов для биомедицинских исследований принято считать перспективным из-за близкого генетического и физиологического сходства с человеком (Swindell et al., 2012), а также ввиду относительной легкости манипуляций их геномом (Monteiro et al., 2023). Последнее преимущество становится более актуальным по мере развития экспериментальных методов геномного редактирования (Bruter et al., 2024).

Исследовательские работы все чаще переходят на платформу «гуманизированной мыши», которая позволяет изучать механизмы физиологических процессов (Yong et al., 2018) и является необходимой для понимания патогенеза инфекционных (Yajima et al., 2008; Frias-Staheli et al., 2014; Amaladoss et al., 2015; Keng et al., 2016), аутоиммунных (Zayoud et al., 2013; Viehmann Milam et al., 2014; Gunawan et al., 2017) и онкологических заболеваний (Chuprin et al., 2023; Liu L. et al., 2024), а также для разработок противораковой терапии (Petrova et al., 2022). В ряде случаев, например в исследованиях микробиома, более корректно использование диких, а не лабораторных мышей, у которых продолжительная искусственная селекция на способность размножаться при клеточном содержании и диете *ad libitum* может исказить результаты исследования (Hild et al., 2021).

Наконец, в постгеномную эру наук о жизни все большую ценность приобретают так называемые Большие Данные (Big Data) по дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) в определенных тканях мыши при патологиях в сравнении с нормой, многомерность которых требует их систематизации, анализа и поиска закономерностей биоинформатическими методами (Liu B. et al., 2024). Важнейшими для постгеномных медицины и фармакологии становятся два источника информации: 1) клинические данные о пациентах в сравнении с условно здоровыми

добровольцами и 2) экспериментальные данные о животных в качестве моделей заболеваний человека (Krause et al., 2023), что требует создания информационно-вычислительных ресурсов, интегрирующих данные из этих источников в одно целое.

В предыдущей работе мы создали свободно доступную базу знаний RatDEGdb (Чадаева и др., 2023) по дифференциально экспрессирующимся генам крысы как модельного объекта биомедицинских исследований. В качестве следующего шага в естественном развитии этой серии информационных ресурсов целью настоящей работы стало создание аналогичной базы знаний MiceDEGdb по ДЭГ мышей различных линий, созданных в ряде научных организаций и используемых как биомедицинские модели. MiceDEGdb является свободно доступной (<https://www.sysbio.ru/MiceDEGdb>).

Материалы и методы

Поиск в базе данных PubMed дифференциально экспрессирующихся генов мыши. Экспериментально идентифицированные дифференциально экспрессирующиеся гены нескольких лабораторных линий мышей, используе-

мых в качестве биомедицинских моделей заболеваний, брали в том виде, как их опубликовали авторы оригинальных статей, которые мы нашли с помощью текстового запроса ["mice" "RNA-seq" "disease"] в базе данных PubMed (Lu, 2011).

База знаний MiceDEGdb. Созданная в рамках настоящей работы база знаний MiceDEGdb включает три таблицы (см. схему данных на рис. 1). Найденная в соответствии с описанным в предыдущем подразделе информация о ДЭГ мыши была представлена в виде реляционной таблицы. Затем из нашей базы данных Human_SNP_TATAdb (Филонов и др., 2023) заимствовали реляционную таблицу HumanDisorder, которая охарактеризована на рис. 1 (внизу справа).

Далее мы связали между собой две реляционные таблицы, MiceDEGs и HumanDisorder, с помощью уникальной реляционной таблицы HumanMiceHomolog базы знаний MiceDEGdb, составленной на основе данных раздела "Paralogs" свободно доступной базы данных GeneCards (Stelzer et al., 2016). Наконец, с использованием свободно доступной системы управления базами данных с открытым исходным кодом MariaDB 10.2.12 (MariaDB

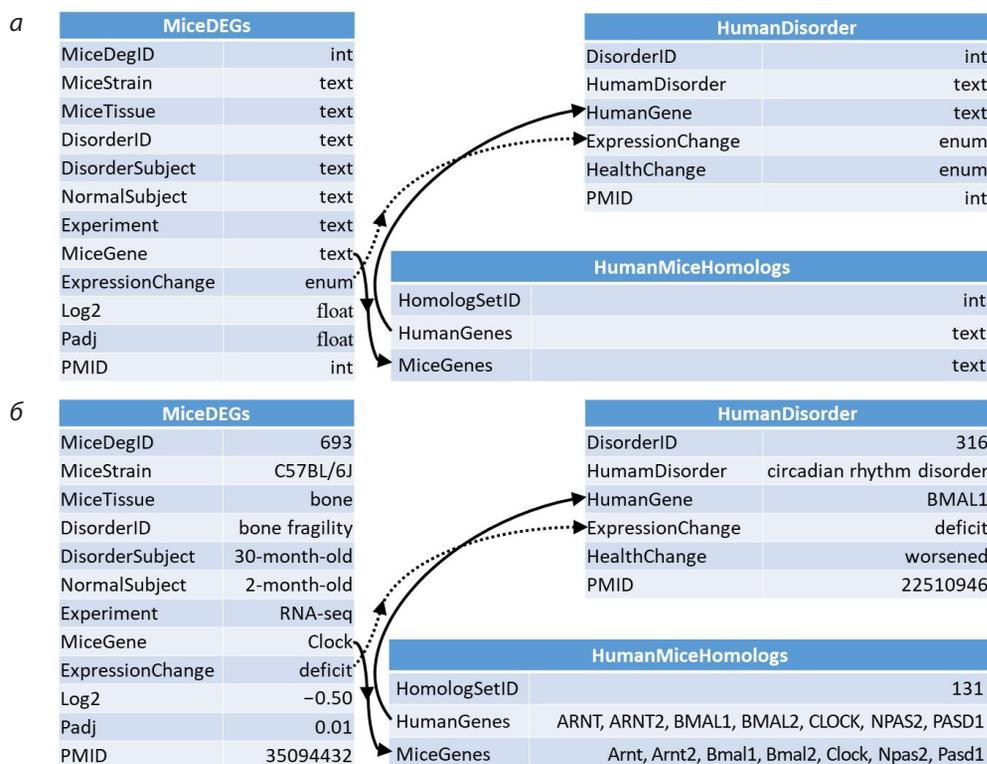


Рис. 1. База знаний MiceDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам мыши в качестве модельного объекта для биомедицинских исследований заболеваний человека.

а – структурная схема; **б** – примеры записей. Обозначения: MiceDEGs, HumanDisorder и HumanMiceHomologs – три уникальные реляционные таблицы базы знаний MiceDEGdb. В таблицах: левая колонка представляет наименования полей, такие как «ген мыши», «линия мыши», «ткань», «заболевание» и «идентификатор PMID статьи как первоисточника экспериментальных данных», которые были найдены в реферативной системе PubMed (Lu, 2011); правая колонка – типы данных, такие как целое число (int), вещественное число (float), бинарный индикатор (enum) или строка символов (text). Стрелками показаны реляционные ссылки (сплошные стрелки) между экспериментальными данными о ДЭГ мыши в качестве биомедицинской модели определенного заболевания человека, с одной стороны, и, с другой стороны, сопоставленными изменениями экспрессии (пунктирные стрелки) гомологичных ДЭГ человека, по которым пациенты с теми или иными заболеваниями отличаются от условно здоровых добровольцев, согласно оригинальным статьям, найденным в PubMed (Lu, 2011) и цитируемым по их PMID.

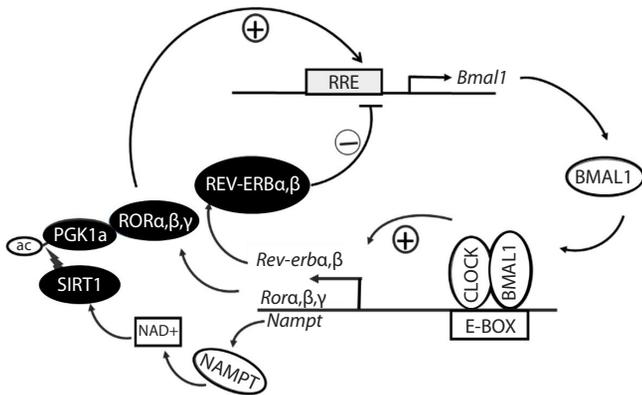


Рис. 2. Генная сеть влияния деацетилазы SIRT1 на активацию транскрипции гена *Bmal1* и ингибирование функции комплекса CLOCK/BMAL1.

Представлена осцилляторная петля усиления экспрессии *Bmal1* и мишень транскрипционного фактора CLOCK/BMAL1, учет которой является отличительной конструктивной особенностью математической модели возрастных изменений функционирования ядра циркадного осциллятора (Подколотный и др., 2016), используемой в этой работе.

Corp AB, Финляндия) мы преобразовали MiceDEGs, HumanMiceHomolog, HumanDisorder и связи между ними, показанные стрелками на рис. 1), в базу знаний MiceDEGdb. Она является свободно доступной (<https://www.sysbio.ru/MiceDEGdb>).

Модель оценки влияния нарушений циркадного ритма на здоровье человека. В настоящей работе оценивали возрастные изменения уровней экспрессии генов ядра циркадного осциллятора млекопитающих с использованием ранее созданной нами математической модели, детальное описание которой вместе с результатами ее верификации можно найти в нашей статье (Подколотный и др., 2016). Отличительной особенностью этой модели является учет взаимодействия ядра циркадного осциллятора с системой NAD⁺/SIRT1 благодаря следующим модулям: 1) путь усиления деградации PER2 после его деацетилирования ферментом SIRT1; 2) генная сеть влияния деацетилазы Sirt1 на транскрипцию гена *Bmal1* мыши и ингибирования функции CLOCK/BMAL1, ассоциированной с E-BOX через деацетилирование гистонов, которая представлена на рис. 2; 3) путь влияния Sirt1 на скорость освобождения комплекса CLOCK/BMAL1 от E-BOX; 4) путь NAMPT/NAD⁺/SIRT1 путь.

В нашей модели механизм регуляции транскрипции гена *Nampt* определяется наличием трех E-BOX в его промоторе аналогично механизму регуляции генов *Per1*, *Per2* и *Cry1* в общепризнанной модели ядра циркадного осциллятора (Kim, Forger, 2012).

Результаты

ДЭГ мыши в качестве биомедицинских моделей возрастных заболеваний

На рис. 3 представлены результаты *in silico* изменения концентрации мРНК гена *Bmal1* мыши с возрастом согласно математической модели (Подколотный и др., 2016) – уровень снижается с увеличением возраста мыши.

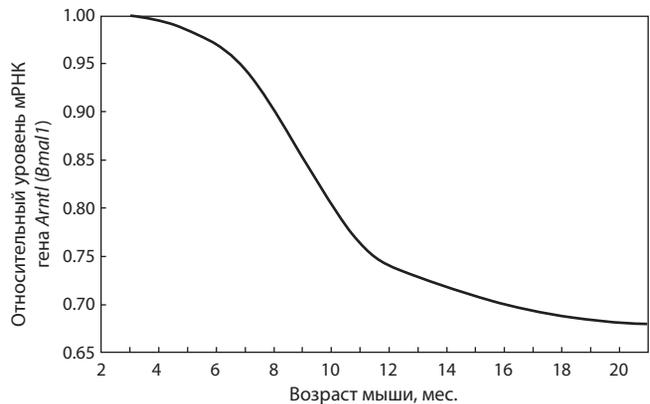


Рис. 3. Результаты *in silico* изменения концентрации мРНК гена *Bmal1* мыши с возрастом, согласно математической модели (Подколотный и др., 2016): уровень снижается с увеличением возраста мыши.

Для верификации результатов моделирования *in silico* возрастных изменений ядра циркадного осциллятора в базе данных PubMed было найдено 10 оригинальных статей, которые приведены в таблице. Они представляли результаты 25 экспериментов RNA-seq с использованием восьми органов (десна, кость, почка, правый желудочек сердца, дуга аорты, гиппокамп, скелетная мышца и матка) в шести генетических линиях мышей, C57BL/6J, Ren1cCre/ZsGreen, B6.129S7(Cg)-Polgtm1Prol/J, BPN/3J, BPH/2J и Kunming, в качестве моделей восьми возрастных заболеваний человека, включая гипертонию, фиброз почки, пародонтит, хрупкость кости, сердечную недостаточность, ремоделирование гладких мышц, нарушение циркадного ритма и возрастные заболевания. Суммарное количество ДЭГ мыши составило 21 754, представлено 9769 уникальных генов из числа 22 283 аннотированных белок-кодирующих генов в референсном геноме GRCm38.p6 эталонной лабораторной мыши *Mus musculus* линии C57BL/6J (Sarsani et al., 2019), как показано в последней строке таблицы.

База знаний MiceDEGdb

На рис. 4 проиллюстрирована работа с базой знаний MiceDEGdb на примере гена *Clock* мыши, пониженная экспрессия которого была идентифицирована в статье (Кауа et al., 2022) у самцов мыши в возрасте 30 мес., которые характеризовались хрупкостью костей в сравнении со здоровыми молодыми самцами мыши в возрасте 2 месяца.

Как можно видеть на этом рисунке, пониженную экспрессию гомологичного гена *CLOCK* человека наблюдали у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (Giebfried, Lorentz, 2023), нарушениями циркадного ритма (Oishi et al., 2005; Roybal et al., 2007), обструктивной болезнью легких и клеточным старением (Li L. et al., 2022), которые соответствуют возрастным расстройствам (Jasenik et al., 2019; Li Z. et al., 2021; Neba Ambe et al., 2022; Siniscalchi et al., 2024).

Кроме того, на рис. 4 (справа) можно видеть осуществленную в этой работе аннотацию рассматриваемого эксперимента с возрастным ростом ломкости костей

Характеристика ДЭГ мыши как модельных животных в биомедицине, выявленных с использованием технологии RNA-seq и документированных в базе знаний MiceDEGdb, созданной в этой работе

№	Линия	Ткань	Синдром	Модель	Норма	N_{DEG}	Литературный источник
1	C57BL/6J	Десна	Пародонтит	Больные мыши	Здоровые мыши	43	Chen Z. et al., 2023
2	C57BL/6J	Кость	Хрупкость	30 мес.	2 мес.	3725	Kaya et al., 2022
3	C57BL/6J	Кость	Хрупкость	23 мес.	2 мес.	1151	
4	C57BL/6J	Кость	Хрупкость	11 мес.	2 мес.	1011	
5	RC ZG	Почка	Фиброз	27 мес., ♀♂	2 мес.	43	Wang et al., 2018
6	RC ZG	Почка	Фиброз	27 мес., ♀	2 мес.	100	
7	RC ZG	Почка	Фиброз	27 мес., ♂	2 мес.	349	
8	C57BL/6J	Почка	Старение	24 мес., ♂	3 мес.	599	Li J. et al., 2022
9	PolGMut	ПЖС	СН	PolG:D257A, ♀	C57BL/6J, ♀	402	Gorr et al., 2022
10	C57BL/6J	ГМДА	Старение	26 мес., ♂♂	6 мес., ♂♂	23	Kiss et al., 2022
11	C57BL/6J	Гиппокамп	НЦР	Биоритм 8:8, ♀	Норма 12:12, ♀	158	Fang et al., 2021
12	C57BL/6J	Мышца	Старение	20 нед., WT, 60 %	20 нед., WT, al	1178	Myers et al., 2021
13	C57BL/6J	Мышца	Старение	80 нед., WT, 60 %	80 нед., WT, al	747	
14	C57BL/6J	Мышца	Старение	20 нед., KO, 60 %	20 нед., KO, al	2323	
15	C57BL/6J	Мышца	Старение	20 нед., KI, 60 %	20 нед., KI, al	1919	
16	C57BL/6J	Мышца	Старение	80 нед., KO, 60 %	20 нед., KO, al	721	
17	C57BL/6J	Мышца	Старение	80 нед., KI, 60 %	20 нед., KI, al	2641	
18	C57BL/6J	Мышца	Старение	80 нед., KO, al	80 нед., WT, al	1976	
19	C57BL/6J	Мышца	Старение	80 нед., WT, al	80 нед., KI, al	445	
20	C57BL/6J	Мышца	Старение	20 нед., KO, al	20 нед., WT, al	1152	
21	C57BL/6J	Мышца	Старение	20 нед., WT, al	20 нед., KI, al	135	
22	VRN/2J	Почка	Гипертония	VRN/2J, гипертония	VRN/3J, норма	883	Puig et al., 2010
23	Kunming	Матка	Токсоплазмоз	Инфекция, до беременности	Без инфекции	10	Zhou et al., 2020
24	Kunming	Матка	Токсоплазмоз	Инфекция, до имплантации плода	Без инфекции	10	
25	Kunming	Матка	Токсоплазмоз	Инфекция, после имплантации плода	Без инфекции	10	
Σ	6 линий	8 тканей	8 болезней	25 моделей	17 моделей	21 754	10 статей

Примечание. Линии мыши: RC|ZG – Ren1сCre|ZsGreen; PolGMut – B6.129S7(Cg)-Polgtm1Prol/J. Пол: ♀, самки; ♂, самцы; ♂♂, парабионты (хирургически объединенные кровеносные системы). Ткани: ПЖС – правый желудочек сердца; ГМДА – гладкие мышцы дуги аорты. Заболевания: СН – сердечная недостаточность; НЦР – нарушение циркадного ритма; WT – дикий тип; KO – нокаут по гену *Sirt1*; KI – усиление (knock-in) по гену *Sirt1*; al – питание без ограничений *ad libitum*.

мышы одновременно со снижением уровня экспрессии гена *Clock* мышы (Kaya et al., 2022) в терминах снижения экспрессии гена *BMAL1* человека, паралогичного гену *Clock* мышы согласно базе данных GeneCards (Stelzer et al., 2016), при следующих возрастных расстройствах человека: рак (Elshazley et al., 2012), нарушение циркадного ритма и болезнь Паркинсона (Ding et al., 2011), в качестве верификации наших прогнозов *in silico*, представленных на рис. 3.

Пилотный выпуск MiceDEGdb содержит 85092 таких аннотаций для 318 генов человека, изменения экспрессии которых имеют клинические проявления при 895 заболеваниях, согласно 912 оригинальным статьям, цитируе-

мым с использованием их идентификаторов PubMed ID. Информационное содержание MiceDEGdb может быть интересным для генетиков, молекулярных биологов, биоинформатиков, клиницистов, фармацевтов и генетических консультантов по персонализированной медицине.

MiceDEGdb является свободно доступной URL=<https://www.sysbio.ru/MiceDEGdb>.

Обсуждение

В качестве иллюстрации практического применения созданной в этой работе базы знаний MiceDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам мышы как модельного объекта биомедицинских исследований рас-

Mouse Gene	Mouse strain	Disorder	Pathogenic expression change	PMID	Human gene-homolog	Gene expression change	Feature	Health sign	PMID
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	CLOCK	deficit	circadian rhythm disorder	worsened	15950223
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	BMAL1	deficit	circadian rhythm disorder	worsened	21658431
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	CLOCK	deficit	obstructive pulmonary disease	worsened	36419003
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	BMAL1	deficit	Parkinson's disease	worsened	21658431
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	CLOCK	deficit	circadian rhythm disorder	worsened	17379666
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	BMAL1	deficit	circadian rhythm disorder	worsened	22510946
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	CLOCK	deficit	inflammatory bowel diseases	worsened	37218867
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	BMAL1	deficit	cancer	worsened	22510946
Clock	C57BL/6	age-related bone fragility	deficit	35094432	CLOCK	deficit	cellular senescence	worsened	36419003

Рис. 4. Пример использования созданной в этой работе базы знаний MiceDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам мыши как модельного объекта биомедицинских исследований для верификации результатов моделирования *in silico* в сравнении с независимыми экспериментальными данными.

смотрены ДЭГ, связанные с развитием хрупкости костей в процессе старения, полученные на мышах линии C57BL/6 в различных возрастных категориях, от 2 до 23 и 30 мес. (Кауа et al., 2022).

Мы обратили внимание на показатели дифференциальной экспрессии генов *Clock* и *Bmal1*, кодирующих субъединицы транскрипционного фактора CLOCK/BMAL1, одного из центральных элементов циркадного осциллятора млекопитающих, поскольку известно, что система циркадных часов участвует в регуляции состояния костной ткани (Swanson et al., 2018). Мыши с нокаутом гена *Clock* демонстрируют снижение плотности кости (Yuan et al., 2017). У мышей с нокаутом гена *Bmal1* отмечают уменьшение костной массы и ее плотности (Chen G. et al., 2020; Кікуо, 2024). Белок Bmal1 регулирует дифференцировку остеокластов и резорбцию костей прямым и опосредованным путем (Chen G. et al., 2020).

Уровни дифференциальной экспрессии генов *Clock* и *Bmal1* мышей C57BL/6 старших возрастных групп были существенно ниже, по сравнению с группой молодых животных (Кауа et al., 2022), как это показано на рис. 4 с помощью PubMed ID = 35 094 432. Известно, что старение сопровождается нарушением функционирования цир-

кадной системы, которая координирует практически все процессы, протекающие в живых организмах, в том числе и моделирование и ремоделирование костной ткани. Об этом же свидетельствуют результаты, полученные нами путем математического моделирования, продемонстрировавшие, в частности, что некоторые параметры циркадного ритма и уровень экспрессии элементов циркадного осциллятора существенно изменяются с возрастом (Подколовный и др., 2016).

Мы осуществили поиск публикаций, представленных в базе PubMed, об однонаправленных с полученными у мышей изменениями экспрессии генов *Clock* и *Bmal1* у пациентов с различными патологиями по сравнению со здоровыми людьми. Отметим, что снижение экспрессии этих генов, описанное в публикациях, характерно для возрастных патологий человека, таких как рак, воспаление, нейродегенеративные заболевания, диабет, нарушения циркадного ритма, и состояний клеточного старения (см. рис. 4). Представленный пример использования базы знаний MiceDEGdb для анализа вариантов ДЭГ, связанных с развитием хрупкости костей в процессе старения, показал, что интерпретация ДЭГ с привлечением дополнительной информации, полученной из научных публикаций, а также

результатов математических моделирования, дает возможность наблюдать достаточно согласованную картину возрастных изменений.

Наконец, разработка базы знаний MiceDEGdb по мыши как модели заболеваний человека является естественным шагом на пути к развитию семейства баз данных по ДЭГ животных для биомедицины и фармацевтики, начиная с созданной нами ранее базы данных RatDEGdb (Чадаева и др., 2023) по получаемым в ИЦиГ СО РАН уникальным линиям НИСАГ (ISIAH) и OXYS крысы, которые представляют собой селекционные генетические модели повышенного артериального давления у людей и преждевременного старения соответственно, а также связанных с ними заболеваний.

Заключение

База знаний MiceDEGdb предоставляет коллекцию экспериментальных данных и набор инструментов для интерактивного анализа в рамках проведения геномных исследований мыши в качестве модельного объекта биомедицинских исследований.

Существующие медицинские базы данных фокусируются исследования на геноме человека (Sun et al., 2022), что может быть обогащено предложенной базой знаний MiceDEGdb о мыши как наиболее часто используемом лабораторном животном для биомедицинских и фармацевтических исследований.

В дальнейшем мы планируем продолжить добавлять новые данные по экспрессии генов мыши, прежде всего, получаемых в ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия). Текущий интерфейс к базе знаний MiceDEGdb (см. рис. 4) планируется совершенствовать по мере выявления, накопления и систематизации типовых поисковых запросов пользователей.

Список литературы / References

Подколотный Н.Л., Твердохлеб Н.Н., Подколотная О.А. Математическая модель циркадного осциллятора млекопитающих: взаимодействие с системой NAD⁺/SIRT1 и возрастные изменения экспрессии генов циркадного осциллятора. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016;20(6):848-856. doi 10.18699/VJ16.201
[Podkolodnyy N.L., Tverdokhlebl N.N., Podkolodnaya O.A. Computational model for mammalian circadian oscillator: interacting with NAD⁺/SIRT1 pathway and age-related changes in gene expression of circadian oscillator. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2016;20(6):848-856. doi 10.18699/VJ16.201]

Филонов С.В., Подколотный Н.Л., Подколотная О.А., Твердохлеб Н.Н., Пономаренко П.М., Рассказов Д.А., Богомолов А.Г., Пономаренко М.П. Human_SNP_TATAdb – база данных о SNP, статистически достоверно изменяющих средство TATA-связывающего белка к промоторам генов человека: полногеномный анализ и варианты использования. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):728-736. doi 10.18699/VJGB-23-85
[Filonov S.V., Podkolodnyy N.L., Podkolodnaya O.A., Tverdokhlebl N.N., Ponomarenko P.M., Rasskazov D.A., Bogomolov A.G., Ponomarenko M.P. Human_SNP_TATAdb: a database of SNPs that statistically significantly change the affinity of the TATA-binding protein to human gene promoters: genome-wide analysis and use cases. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(7):728-736. doi 10.18699/VJGB-23-85]

Чадаева И.В., Филонов С.В., Золотарева К.А., Хандаев Б.М., Ершов Н.И., Подколотный Н.Л., Кожемякина Р.В., Рассказов Д.А., Богомолов А.Г., Кондратюк Е.Ю., Климова Н.В., Шихевич С.Г., Рязанова М.А., Федосеева Л.А., Редина О.Е., Кожевникова О.С., Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Маркель А.Л., Пономаренко М.П., Ощепков Д.Ю. База знаний RatDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам крысы как модельного объекта биомедицинских исследований. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):794-806. doi 10.18699/VJGB-23-92
[Chadaeva I.V., Filonov S.V., Zolotareva K.A., Khandaev B.M., Ershov N.I., Podkolodnyy N.L., Kozhemyakina R.V., Rasskazov D.A., Bogomolov A.G., Kondratyuk E.Yu., Klimova N.V., Shikhevich S.G., Ryazanova M.A., Fedoseeva L.A., Redina O.E., Kozhevnikova O.S., Stefanova N.A., Kolosova N.G., Markel A.L., Ponomarenko M.P., Oshchepkov D.Yu. RatDEGdb: a knowledge base of differentially expressed genes in the rat as a model object in biomedical research. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(7):794-806. doi 10.18699/VJGB-23-92]

Amaladoss A., Chen Q., Liu M., Dummler S.K., Dao M., Suresh S., Chen J., Preiser P.R. *De novo* generated human red blood cells in humanized mice support *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129825. doi 10.1371/journal.pone.0129825

Bruter A.V., Varlamova E.A., Okulova Y.D., Tatarskiy V.V., Silaeva Y.Y., Filatov M.A. Genetically modified mice as a tool for the study of human diseases. *Mol Biol Rep*. 2024;51(1):135. doi 10.1007/s11033-023-09066-0

Chen G., Tang Q., Yu S., Xie Y., Sun J., Li S., Chen L. The biological function of BMAL1 in skeleton development and disorders. *Life Sci*. 2020;253:117636. doi 10.1016/j.lfs.2020.117636

Chen Z., Huang Z., Zhao X., Zhou Y., Zhang P., Li Y. Transcriptome analysis of differentially expressed genes involved in the inflammatory status of gingiva in aged mice. *Oral Dis*. 2023;29(4):1757-1769. doi 10.1111/odi.14222

Chuang D.M., Chen R.W., Chalecka-Franaszek E., Ren M., Hashimoto R., Senatorov V., Kanai H., Hough C., Hiroi T., Leeds P. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord*. 2002;4(2):129-136. doi 10.1034/j.1399-5618.2002.01179.x

Chuprin J., Buettner H., Seedhom M.O., Greiner D.L., Keck J.G., Ishikawa F., Shultz L.D., Brehm M.A. Humanized mouse models for immuno-oncology research. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(3):192-206. doi 10.1038/s41571-022-00721-2

Conti L., Reitano E., Cattaneo E. Neural stem cell systems: diversities and properties after transplantation in animal models of diseases. *Brain Pathol*. 2006;16(2):143-154. doi 10.1111/j.1750-3639.2006.00009.x

Ding H., Liu S., Yuan Y., Lin Q., Chan P., Cai Y. Decreased expression of *Bmal2* in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2011;499(3):186-188. doi 10.1016/j.neulet.2011.05.058

Elshazley M., Sato M., Hase T., Yamashita R., Yoshida K., Toyokuni S., Ishiguro F., Osada H., Sekido Y., Yokoi K., Usami N., Shames D.S., Kondo M., Gazdar A.F., Minna J.D., Hasegawa Y. The circadian clock gene *BMAL1* is a novel therapeutic target for malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*. 2012;131(12):2820-2831. doi 10.1002/ijc.27598

Fang K., Liu D., Pathak S.S., Yang B., Li J., Karthikeyan R., Chao O.Y., Yang Y.M., Jin V.X., Cao R. Disruption of circadian rhythms by ambient light during neurodevelopment leads to autistic-like molecular and behavioral alterations in adult mice. *Cells*. 2021;10(12):3314. doi 10.3390/cells10123314

Frias-Staheli N., Dorner M., Marukian S., Billerbeck E., Labitt R.N., Rice C.M., Ploss A. Utility of humanized BLT mice for analysis of dengue virus infection and antiviral drug testing. *J Virol*. 2014;88(4):2205-2218. doi 10.1128/JVI.03085-13

Giebfried J., Lorentz A. Relationship between the biological clock and inflammatory bowel disease. *Clocks Sleep*. 2023;5(2):260-275. doi 10.3390/clockssleep5020021

- Girard C.A., Wunderlich F.T., Shimomura K., Collins S., Kaizik S., Proks P., Abdulkader F., Clark A., Ball V., Zubcevic L., Bentley L., Clark R., Church C., Hugill A., Galvanovskis J., Cox R., Rorsman P., Bruning J.C., Ashcroft F.M. Expression of an activating mutation in the gene encoding the K_{ATP} channel subunit Kir6.2 in mouse pancreatic beta cells recapitulates neonatal diabetes. *J Clin Invest.* 2009;119(1):80-90. doi 10.1172/jci35772
- Gorr M.W., Francois A., Marcho L.M., Saldana T., McGrail E., Sun N., Stratton M.S. Molecular signature of cardiac remodeling associated with Polymerase Gamma mutation. *Life Sci.* 2022;298:120469. doi 10.1016/j.lfs.2022.120469
- Gryksa K., Schmidtner A.K., Masis-Calvo M., Rodriguez-Villagra O.A., Havasi A., Wirobski G., Maloumy R., Jagle H., Bosch O.J., Slatery D.A., Neumann I.D. Selective breeding of rats for high (HAB) and low (LAB) anxiety-related behaviour: A unique model for comorbid depression and social dysfunctions. *Neurosci Biobehav Rev.* 2023;152:105292. doi 10.1016/j.neubiorev.2023.105292
- Gunawan M., Her Z., Liu M., Tan S.Y., Chan X.Y., Tan W.W.S., Dharmaraaja S., Fan Y., Ong C.B., Loh E., Chang K.T.E., Tan T.C., Chan J.K.Y., Chen Q. A novel human systemic lupus erythematosus model in humanised mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):16642. doi 10.1038/s41598-017-16999-7
- Hild B., Dreier M.S., Oh J.H., McCulloch J.A., Badger J.H., Guo J., Thefaine C.E., Umarova R., Hall K.D., Gavrilo O., Rosshart S.P., Trinchieri G., Rehmann B. Neonatal exposure to a wild-derived microbiome protects mice against diet-induced obesity. *Nat Metab.* 2021;3(8):1042-1057. doi 10.1038/s42255-021-00439-y
- Jacenic D., Cygankiewicz A.I., Mokrowiecka A., Malecka-Panas E., Fichna J., Krajewska W.M. Sex- and age-related estrogen signaling alteration in inflammatory bowel diseases: modulatory role of estrogen receptors. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13):3175. doi 10.3390/ijms20133175
- Kaya S., Schurman C.A., Dole N.S., Evans D.S., Alliston T. Prioritization of genes relevant to bone fragility through the unbiased integration of aging mouse bone transcriptomics and human GWAS analyses. *J Bone Miner Res.* 2022;37(4):804-817. doi 10.1002/jbmr.4516
- Keng C.T., Sze C.W., Zheng D., Zheng Z., Yong K.S., Tan S.Q., Ong J.J., Tan S.Y., Loh E., Upadya M.H., Kuick C.H., Hotta H., Lim S.G., Tan T.C., Chang K.T., Hong W., Chen J., Tan Y.J., Chen Q. Characterisation of liver pathogenesis, human immune responses and drug testing in a humanised mouse model of HCV infection. *Gut.* 2016;65(10):1744-1753. doi 10.1136/gutjnl-2014-307856
- Kikyo N. Circadian regulation of bone remodeling. *Int J Mol Sci.* 2024;25(9):4717. doi 10.3390/ijms25094717
- Kim J.K., Forger D.B. A mechanism for robust circadian timekeeping via stoichiometric balance. *Mol Syst Biol.* 2012;8:630. doi 10.1038/msb.2012.62
- Kiss T., Nyul-Toth A., Gulej R., Tarantini S., Csipo T., Mukli P., Ungvari A., Balasubramanian P., Yabluchanskiy A., Benyo Z., Conley S.M., Wren J.D., Garman L., Huffman D.M., Csiszar A., Ungvari Z. Old blood from heterochronic parabionts accelerates vascular aging in young mice: transcriptomic signature of pathologic smooth muscle remodeling. *GeroScience.* 2022;44(2):953-981. doi 10.1007/s11357-022-00519-1
- Krause C., Suwada K., Blomme E.A.G., Kowalkowski K., Liguori M.J., Mahalingaiah P.K., Mittelstadt S., Peterson R., Rendino L., Vo A., Van Vleet T.R. Preclinical species gene expression database: development and meta-analysis. *Front Genet.* 2023;13:1078050. doi 10.3389/fgene.2022.1078050
- Li J., Gao F., Wei L., Chen L., Qu N., Zeng L., Luo Y., Huang X., Jiang H. Predict the role of lncRNA in kidney aging based on RNA sequencing. *BMC Genomics.* 2022;23(1):254. doi 10.1186/s12864-022-08479-8
- Li L., Zhang M., Zhao C., Cheng Y., Liu C., Shi M. Circadian clock gene Clock-Bmal1 regulates cellular senescence in Chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med.* 2022;22(1):435. doi 10.1186/s12890-022-02237-y
- Li Z., Zhang Z., Ren Y., Wang Y., Fang J., Yue H., Ma S., Guan F. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology.* 2021;22(2):165-187. doi 10.1007/s10522-021-09910-5
- Liu B., Cui D., Liu J., Shi J.S. Transcriptome analysis of the aged SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease reveals novel molecular targets of formononetin protection. *Front Pharmacol.* 2024;15:1440515. doi 10.3389/fphar.2024.1440515
- Liu L., van Schaik T.A., Chen K.S., Rossignoli F., Borges P., Vrbanac V., Wakimoto H., Shah K. Establishment and immune phenotyping of patient-derived glioblastoma models in humanized mice. *Front Immunol.* 2024;14:1324618. doi 10.3389/fimmu.2023.1324618
- Lu Z. PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature. *Database (Oxford).* 2011;2011:baq036. doi 10.1093/database/baq036
- Lukacs N.W., Strieter R.M., Standiford T.J., Kunkel S.L. Characterization of chemokine function in animal models of diseases. *Methods.* 1996;10(1):158-165. doi 10.1006/meth.1996.0090
- Monteiro C.J., Heery D.M., Whitchurch J.B. Modern approaches to mouse genome editing using the CRISPR-Cas toolbox and their applications in functional genomics and translational research. *Adv Exp Med Biol.* 2023;1429:13-40. doi 10.1007/978-3-031-33325-5_2
- Myers M.J., Shaik F., Shaik F., Alway S.E., Mohamed J.S. Skeletal muscle gene expression profile in response to caloric restriction and aging: a role for Sirt1. *Genes (Basel).* 2021;12(5):691. doi 10.3390/genes12050691
- Neba Ambe G.N.N., Breda C., Bhambra A.S., Arroo R.R.J. Effect of the citrus flavone nobiletin on circadian rhythms and metabolic syndrome. *Molecules.* 2022;27(22):7727. doi 10.3390/molecules27227727
- Oishi K., Ohkura N., Amagai N., Ishida N. Involvement of circadian clock gene *Clock* in diabetes-induced circadian augmentation of plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*) expression in the mouse heart. *FEBS Lett.* 2005;579(17):3555-3559. doi 10.1016/j.febslet.2005.05.027
- Petrova D.D., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Potter E.A., Kirikovich S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells. Part II: surface molecules, which belongs to distinctive groups with particular functions, form a unique pattern characteristic of a certain type of tumor stem-like cells. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24):15800. doi 10.3390/ijms232415800
- Puig O., Wang I.M., Cheng P., Zhou P., Roy S., Cully D., Peters M., Benita Y., Thompson J., Cai T.Q. Transcriptome profiling and network analysis of genetically hypertensive mice identifies potential pharmacological targets of hypertension. *Physiol Genomics.* 2010;42A(1):24-32. doi 10.1152/physiolgenomics.00010.2010
- Roybal K., Theobald D., Graham A., DiNieri J.A., Russo S.J., Krishnan V., Chakravarty S., Peevey J., Ohrlein N., Birnbaum S., Vitaterna M.H., Orsulak P., Takahashi J.S., Nestler E.J., Carlezon W.A. Jr., McClung C.A. Mania-like behavior induced by disruption of *CLOCK*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(15):6406-6411. doi 10.1073/pnas.0609625104
- Sarsani V.K., Raghupathy N., Fiddes I.T., Armstrong J., Thibaud-Nissen F., Zinder O., Bolisetty M., Howe K., Hinerfeld D., Ruan X., Rowe L., Barter M., Ananda G., Paten B., Weinstock G.M., Churchill G.A., Wiles M.V., Schneider V.A., Srivastava A., Reinholdt L.G. The genome of C57BL/6J "Eve", the mother of the laboratory mouse genome reference strain. *G3 (Bethesda).* 2019;9(6):1795-1805. doi 10.1534/g3.119.400071
- Segalat L. Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. *ACS Chem Biol.* 2007;2(4):231-236. doi 10.1021/cb700009m
- Siniscalchi C., Nouvenne A., Cerundolo N., Meschi T., Ticinesi A.; on behalf of the Parma Post-Graduate Specialization School in Emergency-Urgency Medicine Interest Group on Thoracic Ultrasound.

- Diaphragm ultrasound in different clinical scenarios: a review with a focus on older patients. *Geriatrics (Basel)*. 2024;9(3):70. doi 10.3390/geriatrics9030070
- Stelzer G., Rosen N., Plaschkes I., Zimmerman S., Twik M., Fishilevich S., Stein T.I., Nudel R., Lieder I., Mazor Y., Kaplan S., Dahan D., Warshawsky D., Guan-Golan Y., Kohn A., Rappaport N., Safran M., Lancet D. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016;54:1.30.1-1.30.33. doi 10.1002/cpbi.5
- Sun S., Wang Y., Maslov A.Y., Dong X., Vijg J. SomaMutDB: a database of somatic mutations in normal human tissues. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D1100-D1108. doi 10.1093/nar/gkab914
- Swanson C.M., Kohrt W.M., Buxton O.M., Everson C.A., Wright K.P. Jr., Orwoll E.S., Shea S.A. The importance of the circadian system & sleep for bone health. *Metabolism*. 2018;84:28-43. doi 10.1016/j.metabol.2017.12.002
- Swindell W.R., Johnston A., Sun L., Xing X., Fisher G.J., Bulyk M.L., Elder J.T., Gudjonsson J.E. Meta-profiles of gene expression during aging: limited similarities between mouse and human and an unexpectedly decreased inflammatory signature. *PLoS One*. 2012; 7(3):e33204. doi 10.1371/journal.pone.0033204
- Vandamme T.F. Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci*. 2014;6(1):2-9. doi 10.4103/0975-7406.124301
- Viehmann Milam A.A., Maher S.E., Gibson J.A., Lebastchi J., Wen L., Ruddle N.H., Herold K.C., Bothwell A.L. A humanized mouse model of autoimmune insulinitis. *Diabetes*. 2014;63(5):1712-1724. doi 10.2337/db13-1141
- Wang Y., Eng D.G., Pippin J.W., Gharib S.A., McClelland A., Gross K.W., Shankland S.J. Sex differences in transcriptomic profiles in aged kidney cells of renin lineage. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(4):606-621. doi 10.18632/aging.101416
- White P.L., Wiederhold N.P., Loeffler J., Najvar L.K., Melchers W., Herrera M., Bretagne S., Wickes B., Kirkpatrick W.R., Barnes R.A., Donnelly J.P., Patterson T.F. Comparison of nonculture blood-based tests for diagnosing invasive aspergillosis in an animal model. *J Clin Microbiol*. 2016;54(4):960-966. doi 10.1128/jcm.03233-15
- Yajima M., Imadome K., Nakagawa A., Watanabe S., Terashima K., Nakamura H., Ito M., Shimizu N., Honda M., Yamamoto N., Fujiwara S. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J Infect Dis*. 2008;198(5):673-682. doi 10.1086/590502
- Yong K.S.M., Her Z., Chen Q. Humanized mice as unique tools for human-specific studies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018;66(4): 245-266. doi 10.1007/s00005-018-0506-x.
- Yuan G., Hua B., Yang Y., Xu L., Cai T., Sun N., Yan Z., Lu C., Qian R. The circadian gene *Clock* regulates bone formation via PDIA3. *J Bone Miner Res*. 2017;32(4):861-871. doi 10.1002/jbmr.3046
- Zayoud M., El Malki K., Frauenknecht K., Trinschek B., Kloos L., Karram K., Wanke F., Georgescu J., Hartwig U.F., Sommer C., Jonuleit H., Waisman A., Kurschus F.C. Subclinical CNS inflammation as response to a myelin antigen in humanized mice. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013; 8(4):1037-1047. doi 10.1007/s11481-013-9466-4
- Zhou X., Zhang X.X., Mahmmod Y.S., Hernandez J.A., Li G.F., Huang W.Y., Wang Y.P., Zheng Y.X., Li X.M., Yuan Z.G. A transcriptome analysis: various reasons of adverse pregnancy outcomes caused by acute *Toxoplasma gondii* infection. *Front Physiol*. 2020; 11:115. doi 10.3389/fphys.2020.00115

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.11.2024. После доработки 09.12.2024. Принята к публикации 16.12.2024.

doi 10.18699/vjgb-25-19

Компьютерная реконструкция и анализ генных сетей, контролирующих уровень тревожности у лабораторных мышей и человека

Е.Г. Вергунов ^{1, 2, 3} , В.А. Савостьянов ⁴, А.А. Макарова ¹, Е.И. Николаева ⁴, А.Н. Савостьянов ^{1, 2, 3}¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия⁴ Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия vergounov@gmail.com

Аннотация. Тревожность – это нормотипичное состояние человека, которое, как и любая другая эмоция, имеет адаптивное значение. Но состояние чрезмерно высокой или низкой тревожности влечет за собой негативные последствия для адаптации, что в первую очередь обуславливает важность изучения этих двух крайних состояний. При этом известно, что в условиях восприятия авersive стимулов, ассоциированных с тревожностью, изменяется активность поясной коры мозга. Преимущество животных как моделей при изучении генетических оснований тревожности у человека связано с возможностью тонко контролировать внешние условия формирования определенного состояния, доступностью тканей мозга и возможностью создавать и изучать трансгенные модели, в том числе с использованием дифференциально экспрессирующихся генов мелких лабораторных животных из семейства мышиных с низкой и высокой тревожностью. В рамках трансляционного подхода была реконструирована трехдоменная потенциальная генная сеть, которая ассоциирована с генерализованной тревожностью у человека, по моделям мышей с разным уровнем тревожности путем автоматического анализа текстов научных статей. Один домен ассоциирован с пониженной тревожностью у человека, второй – с повышенной, третий служит диспетчером, который активирует один из двух доменов в зависимости от статуса организма (генетического, эпигенетического, физиологического). Этапы работы: (I) из базы данных NCBI GEO взят список генов, экспрессирующихся в поясной коре головного мозга линии мышей дикого типа CD-1 (эксперимент GSE29014). С помощью инструментов этой базы выявлены различия в уровнях экспрессии генов в группах мышей с низкой и высокой (относительно нормальной) тревожностью; (II) поиск ортологов ДЭГ у человека и мышей, ассоциированных с тревожностью в базе данных OMA Orthology; (III) компьютерная реконструкция с помощью когнитивной системы ANDSystem на основе генов-ортологов человека из этапа (II), генов человека из базы данных MalaCards, ассоциированных с тревожностью человека. Апробированные методы трансляционного подхода для реконструкции генных сетей регуляции поведения могут использоваться для выявления молекулярно-генетических маркеров черт личности человека, склонности к психопатологии.

Ключевые слова: дифференциально экспрессирующиеся гены; поясная кора головного мозга; автоматический анализ текстов; научные публикации; компьютерная реконструкция; генные сети; модель мышей с поведением высокой-нормальной-низкой тревожности.

Для цитирования: Вергунов Е.Г., Савостьянов В.А., Макарова А.А., Николаева Е.И., Савостьянов А.Н. Компьютерная реконструкция и анализ генных сетей, контролирующих уровень тревожности у лабораторных мышей и человека. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):162-170. doi 10.18699/vjgb-25-19

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного проекта № FWNR-2022-0020.

Computer reconstruction of gene networks controlling anxiety levels in humans and laboratory mice

E.G. Vergunov ^{1, 2, 3} , V.A. Savostyanov ⁴, A.A. Makarova ¹, E.I. Nikolaeva ⁴, A.N. Savostyanov ^{1, 2, 3}¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia⁴ Herzen University, St. Petersburg, Russia vergounov@gmail.com

Abstract. Anxiety is a normotypic human condition, and like any other emotion has an adaptive value. But excessively high or low anxiety has negative consequences for adaptation, which primarily determines the importance of studying these two extreme conditions. At the same time, it is known that the perception of aversive stimuli associated with anxiety leads to changes in the activity of the brain's cingulate cortex. The advantage of animals as models in study-

ing the genetic bases of anxiety in humans is in the ability to subtly control the external conditions of formation of a certain state, the availability of brain tissues, and the ability to create and study transgenic models, including through the use of differentially expressed genes of small laboratory animals from the family Muridae with low and high anxiety. Within the framework of the translational approach, a three-domain potential gene network, which is associated with generalized anxiety in humans, was reconstructed using mouse models with different levels of anxiety by automatically analyzing the texts of scientific articles. One domain is associated with reduced anxiety in humans, the second with increased anxiety, and the third is a dispatcher who activates one of the two domains depending on the status of the organism (genetic, epigenetic, physiological). Stages of work: (I) A list of genes expressed in the cingulate cortex of the wild type CD-1 mouse line from the NCBI GEO database (experiment GSE29014). Using the tools of this database, differences in gene expression levels were revealed in groups of mice with low and high (relatively normal) anxiety. (II) Search for orthologs of DEG in humans and mice associated with anxiety in the OMA Orthology database. (III) Computer reconstruction using the ANDSystem cognitive system based on (a) human orthologous genes from stage (III), (b) human genes from the MalaCards database associated with human anxiety. The proven methods of the translational approach for the reconstruction of gene networks for behavior regulation can be used to identify molecular genetic markers of human personality traits, propensity to psychopathology.

Key words: differentially expressed genes; cingulate cortex; automatic text analysis; scientific publications; computer reconstruction; gene networks; mouse model with high-normal-low anxiety behavior.

For citation: Vergunov E.G., Savostyanov V.A., Makarova A.A., Nikolaeva E.I., Savostyanov A.N. Computer reconstruction of gene networks controlling anxiety levels in humans and laboratory mice. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(1):162-170. doi 10.18699/vjgb-25-19

Введение

Тревожность – нормотипичное состояние человека (Malezieux et al., 2023) и, как любая другая эмоция, имеет адаптивное значение (Stein, Bouwer, 1997). Однако состояние чрезмерной тревожности или полное отсутствие таковой влечет за собой негативные последствия для адаптации (Penninx et al., 2021). Считается доказанным, что причинами крайних вариантов выражения тревожности является сочетание генетических факторов и факторов среды (Hettema et al., 2001).

Преимущество животных как моделей при изучении генетических оснований тревожности у человека связано с возможностью тонко контролировать внешние условия формирования определенного состояния, доступностью тканей мозга и возможностью создавать и изучать трансгенные модели (Vandamme, 2014; Чадаева и др., 2023; Краусе et al., 2023), в том числе с использованием дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) мелких лабораторных животных из семейства мышинных с низкой (low anxiety behavior, LAB) и высокой (high anxiety behavior, HAV) тревожностью (Gryksa et al., 2023). При сопоставлении животных и человеческих моделей генетические исследования людей с генерализованным тревожным расстройством сравнивают с моделями на грызунах, полученных при воздействии стрессогенных стимулов (Koskinen, Novatta, 2023). Очевидна значимость таких моделей для понимания молекулярных основ тревожности при создании генетических моделей.

В настоящее время при объяснении тревожности у человека рассматривается большое количество генов (Otowa et al., 2016; Koskinen, Novatta, 2023; Mucha et al., 2023). Молекулярные механизмы тревожности как у человека, так и у животных связаны с дифференциальной активностью генов нейротрансмиттерных систем, преимущественно серотониновой и дофаминовой, а также с участием других моноаминов и ГАМК (Morris-Rosendahl, 2002; Nuss, 2015; Gottschalk, Domschke, 2017; Galyamina et al., 2018; Moraes et al., 2024; Strom et al., 2024). При этом отмечена

роль генетических полиморфизмов в определении уровня тревожности (Sen et al., 2004; Ivanov et al., 2019).

Генетические маркеры тревожности у мышей и людей во многом близки, что позволяет переносить результаты, полученные на животных, на понимание механизмов тревожности у человека (Novatta, Barlow, 2008; Hettema et al., 2011; Brasher et al., 2023). Проявление генетических полиморфизмов сильно модифицировано социокультурными факторами, и в целом взаимосвязь тревожности с генотипом у человека существенно модулируется условиями внешней среды (Schinka et al., 2004; Ebstein, 2006; Meng et al., 2024; Petrican et al., 2024).

Попытки выявить генетические маркеры поведенческих свойств на основе анализа генов-кандидатов обычно оказываются малоэффективными вследствие того, что не существует одиночных генов, однозначно определяющих поведение (Duncan et al., 2014; Bruzzone et al., 2024). Это объясняется тем, что формирование фенотипических характеристик организмов контролируется не отдельными генами, а генными сетями – группами координированно функционирующих генов, взаимодействующих друг с другом через свои продукты – РНК, белки, метаболиты (Kolchanov et al., 2000; Колчанов и др., 2013). Именно генные сети, функционируя на основе информации, закодированной в геномах, обеспечивают формирование всех фенотипических признаков организмов (молекулярных, биохимических, клеточных, физиологических, морфологических и др.) (Колчанов и др., 2013).

Мы полагаем, что реконструкция и анализ генных сетей – перспективные подходы к пониманию молекулярно-генетических механизмов, которые лежат в основе формирования личностных характеристик человека, включая тревожность, индуцируемых факторами внешней среды. Реконструкция генных сетей и их функциональных модулей осуществляется на основе молекулярно-генетической информации, представленной в научных публикациях и фактографических базах данных, таких как результаты секвенирования геномов человека и животных, материалы

по дифференциально экспрессирующимся генам, аллельным полиморфизмам, ассоциированным с целевыми фенотипическими характеристиками организмов, и др. (Mostafavi et al., 2008; Krämer et al., 2014; Szklarczyk et al., 2015; Chen et al., 2016; Ivanisenko et al., 2022).

Однако реконструкция генных сетей тревожности человека не может быть выполнена на основе прижизненных экспериментальных исследований, требующих взятия проб биологических тканей мозга для получения молекулярно-генетических данных. Поэтому мы использовали трансляционный подход, основанный на анализе результатов, полученных L. Szibere с коллегами (2011) в экспериментах на мышах, в которых изучалась дифференциальная экспрессия генов в поясной коре головного мозга линии мышей дикого типа CD-1 с различным уровнем тревожности.

Эксперимент показал, что мыши с высокой тревожностью демонстрируют более пассивную стратегию ее преодоления, чем мыши с низкой тревожностью, что напоминает клиническую коморбидность тревоги и депрессии (их совместного проявления), наблюдаемую у психиатрических пациентов (Szibere et al., 2011). Это явилось обоснованием использования данных по ДЭГ мышей для реконструкции генных сетей человека, вовлеченных в контроль разных уровней тревожности. Детали трансляционного подхода описаны ниже.

В реконструированной потенциальной генной сети человека нами было выявлено три функциональных домена, один из которых отвечает за реакцию пониженной тревожности, другой – за реакцию повышенной тревожности, а третий играет роль диспетчера, активирующего один из двух других доменов в зависимости от генетического, эпигенетического, физиологического статуса организма и состояния внешней среды.

Материал и методы

Экспериментальные данные. Для реконструкции генных сетей контроля тревожности использована информация из работы (Szibere et al., 2011), в которой 25 особей мышей дикого типа линии CD-1 одного поколения (*Mus musculus* Linnaeus, 1758; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=10090>) были подвергнуты стрессовому воздействию (плавание в холодной воде в течение 10 мин). После этого с помощью экспрессионного чипа MouseWG-6 v1.1 Expression BeadChip-system (46 132 образца) была проведена оценка уровня экспрессии генов в поясной коре головного мозга этих мышей. Экспериментальные животные были разделены на основе поведенческих тестов в рукавах приподнятого крестообразного лабиринта на три группы: с низкой (low anxiety behavior, LAB), нормальной (normal anxiety behavior, NAB) и высокой (high anxiety behavior, HAB) тревожностью (Szibere et al., 2011). Результаты эксперимента представлены в базе NCBI GEO с индексом GSE29014 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE29014>).

Методы компьютерного анализа. Список генов, экспрессирующихся, согласно (Szibere et al., 2011), в поясной коре головного мозга мышей (эксперимент GSE29014),

взят из базы данных NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE29014>). Выявление различий в уровнях экспрессии генов между группами мышей с разными уровнями тревожности выполнено с помощью инструментария NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2g/?acc=GSE29014>). Для поиска ортологов дифференциально экспрессирующихся генов у человека и мышей, ассоциированных с тревожностью, была использована база данных OMA Orthology (<https://omabrowser.org/oma/home/>).

Реконструкция потенциальных генных сетей человека, ассоциированных с состоянием генерализованной тревожности высокого и низкого уровня, осуществлялась на основе генов человека, ортологических генам мыши, дифференциально экспрессирующимся в поясной коре головного мозга мыши. Для этого применялась разработанная в ИЦиГ СО РАН когнитивная система ANDSystem (Ivanisenko et al., 2019), использующая методы машинного чтения и искусственного интеллекта для автоматического извлечения знаний и фактов из источников больших генетических данных – текстов десятков миллионов научных статей и патентов и тысяч фактографических баз данных. В настоящее время в базе знаний ANDSystem содержится информация о 2 млн генов и белков, 46 тыс. заболеваний, десятках тысяч метаболитов и биологических процессов, а также десятках миллионов межмолекулярных взаимодействий (Ivanisenko et al., 2024).

Результаты

Принципиальная схема анализа данных, начинающегося с формирования списка ДЭГ в поясной коре мышей линии CD-1 для групп высокой (HAB) и низкой (LAB) тревожности, который включает в себя поиск ортологов дифференциально экспрессирующихся генов у человека и мышей, ассоциированных с тревожностью, и завершающегося реконструкцией потенциальных генных сетей человека, ассоциированных с уровнями тревожности, приведена на рис. 1. Рассмотрим основные результаты этого подхода.

Получение списка ДЭГ в поясной коре мышей линии CD-1 для групп HAB и LAB

Прежде всего был проведен поиск дифференциально экспрессирующихся генов в поясной коре мышей линии CD-1, отличающих группу с высокой тревожностью (HAB) от группы с нормальной (NAB) тревожностью и группу с низкой тревожностью (LAB) от группы с нормальной тревожностью (NAB). При сравнении групп HAB и NAB выявлено 185 ДЭГ, а при сравнении групп LAB и NAB – 193 ДЭГ (см. рис. 1). Количество общих ДЭГ у мышей, полученных в сравнениях HAB/NAB и LAB/NAB, равно 133. Оценка значимости столь сильного пересечения с использованием гипергеометрического распределения с поправкой Бонферрони для множественных сравнений дает величину $P_{adj} < 8.4 \cdot 10^{-5}$ (см. рис. 1).

Можно предположить, что стресс-ответы двух сравниваемых пар групп мышей, соответствующих повышенной или пониженной тревожности, являются частями некоторой крупной генной сети, определяющей уровень тревожности при стресс-ответе.



Рис. 1. Базовые этапы реконструкции потенциальной генной сети человека, ассоциированной с высоким и низким уровнями тревожности.

Поиск ортологов ДЭГ у человека и мышей, ассоциированных с тревожностью

Идентификация генов человека, ортологичных ДЭГ мыши, выявленным при сравнении генных сетей, ответственных за различия в уровнях тревожности между группами мышей LAB/NAB и HAB/NAB, осуществлялась с использованием базы данных OMA Orthology (<https://omabrowser.org/oma/home/>). Для этого был написан скрипт на языке Python, который сравнивал ID гены мыши с ортологами человека и выдавал ID для генов человека. Всего в таких сравнениях было обнаружено 8 генов-ортологов человека на основе ДЭГ для мышей LAB/NAB и 16 – на основе ДЭГ для мышей HAB/NAB. Количество общих для двух списков генов-ортологов человека составило 5. Оценка значимости пересечения с использованием гипергеометрического распределения с поправкой Бонферрони для множественных сравнений дает величину $P_{adj} < 0.024 < 0.05$ (см. рис. 1).

Реконструкция потенциальных генных сетей человека, ассоциированных с состоянием генерализованной тревожности высокого и низкого уровня

Решение этой задачи осуществлялось с помощью когнитивной системы ANDSystem. Использовались два типа информации. Прежде всего, выборка, содержащая 19 выявленных ранее различных генов-ортологов человека. И кроме того, 176 генов человека, ассоциированных с расстройствами тревожного и депрессивного спектра и тревожностью человека, которые были взяты из базы данных MalaCards (<https://www.malacards.org/card/anxiety#Genes>).

На этой основе с помощью ANDSystem были реконструированы две потенциальные генные сети человека: 1) HAGn (High Anxiety Gene Network), ассоциированная с высокой тревожностью и содержащая 8 генов и 36 белков; 2) LAGn (Low Anxiety Gene Network), ассоциированная с низкой тревожностью, в которую вошли 3 гена и 26 белков.

Генная сеть LAGn, ответственная за состояние низкого уровня тревожности, включает крупный кластер, содержащий 10 связано взаимодействующих белков и генов, и пять изолированных малоразмерных кластеров (рис. 2).

В генной сети HAGn, ответственной за состояние высокой тревожности, во-первых, выделяется крупный кластер из 32 связано взаимодействующих белков и генов, затем средний, который состоит из 7 белков и генов, а также два изолированных кластера меньшего размера (рис. 3).

Отметим, что крупный кластер HAGn (см. рис. 3, I–III) включает в себя целиком три кластера LAGn (см. рис. 2, I–III), а средний кластер HAGn (см. рис. 3, IV) включает в себя целиком один кластер LAGn (см. рис. 2, IV). Два кластера HAGn (см. рис. 3, VII, VIII) и два кластера LAGn (см. рис. 2, V, VI) не имеют аналогов в кластерах другой генной сети. И хотя кластеры IV, VII и VIII могут иметь совпадающие белки с прочими кластерами другой генной сети, но даже в этом случае их роль в связях в «своих» кластерах отличается от роли в кластерах другой генной сети.

Обе сети (LAGn и HAGn) имеют три общих гена. Оценка значимости пересечения LAGn и HAGn, согласно гипергеометрическому распределению с поправкой Бонферрони для множественных сравнений, дает величину $P_{adj} < 0.040 (< 0.050)$ (см. рис. 1). Также сети LAGn и HAGn имеют 21 общий белок, $P_{adj} < 0.0001$ (см. рис. 1).

Обсуждение

Можно предположить, что три выявленных гена, общие для двух сетей (LAGn и HAGn), формируют особую генную сеть – интерфейс GnI (Gene Network Interface), регулирующую взаимодействие между генными сетями LAGn и HAGn, которые ответственны за формирование состояния низкой и высокой тревожности. Качественная схема взаимодействия LAGn, HAGn и GnI приведена на рис. 4. Здесь домен 1 (часть LAGn) отвечает за реакцию пониженной тревожности; домен 2 (часть HAGn) отвечает за реакцию повышенной тревожности; домен 3 (GnI, общая часть и для LAGn, и для HAGn) выступает как интерфейс

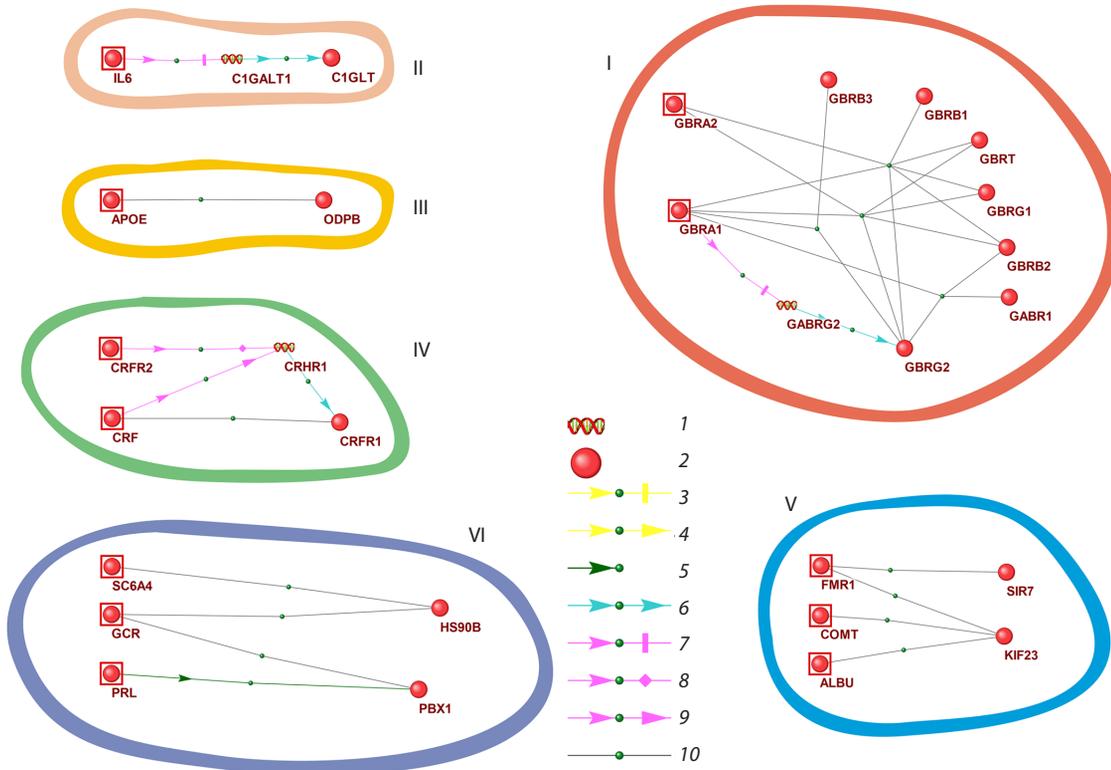


Рис. 2. Визуализация потенциальной геной сети человека LAGn, ответственной за состояние низкой тревожности у человека.

Римскими цифрами обозначены изолированные кластеры. 1 – ген, 2 – белок, 3 – подавление активности белка, 4 – повышение активности белка, 5 – каталитическая реакция, 6 – экспрессия, 7 – подавление экспрессии гена, 8 – регуляция экспрессии гена, 9 – повышение экспрессии гена, 10 – белок-белковое взаимодействие.

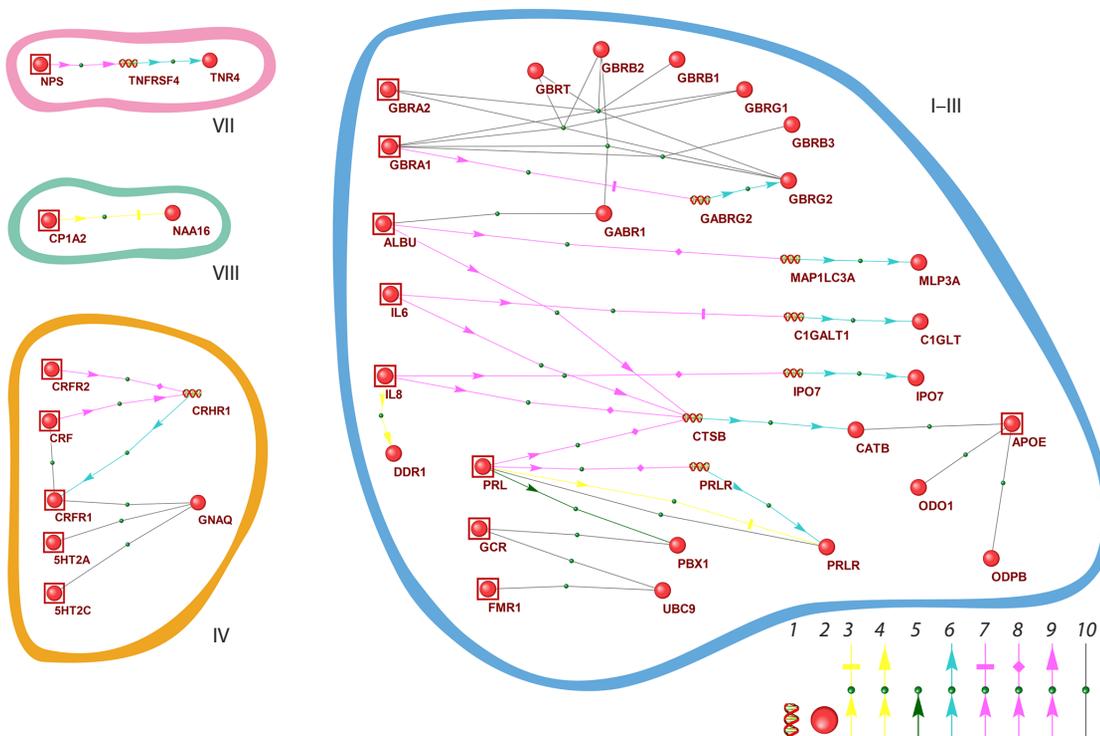


Рис. 3. Визуализация потенциальной геной сети человека HAGn, ответственной за состояние высокой тревожности у человека.

Усл. обозн. см. на рис. 2.

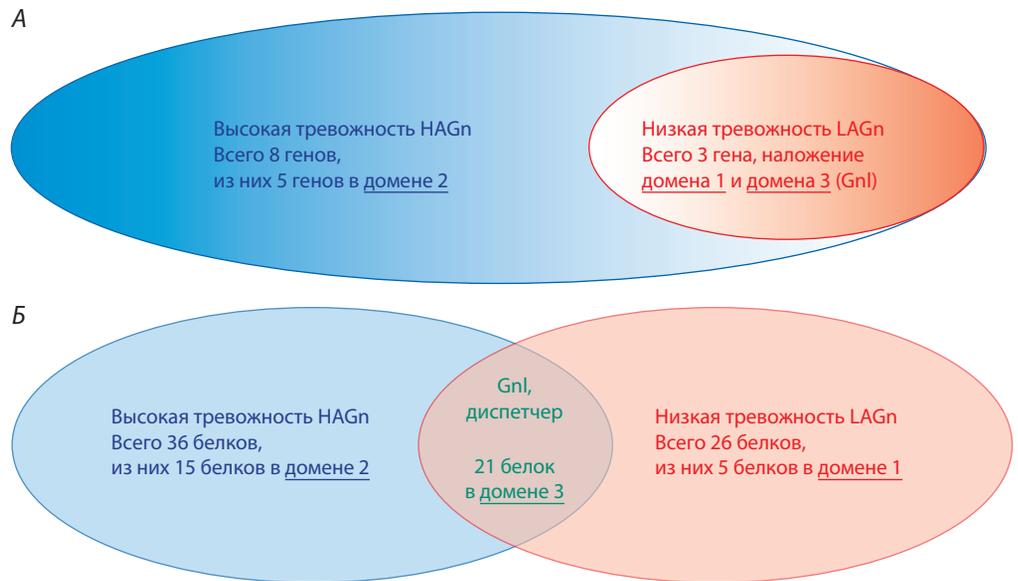


Рис. 4. Качественная схема взаимодействия LAGn (генная сеть пониженной тревожности), HAGn (генная сеть повышенной тревожности) и GnI (диспетчер, который активирует домен 1 или домен 2).

А – распределение генов, Б – распределение белков, кодируемых генами.

между доменами 1 и 2. Он играет роль диспетчера, который активирует домен 1 или 2 в зависимости от генетического, эпигенетического, физиологического статуса организма. Обсуждение подхода на основе существования подобного диспетчера дано в (Shin et al., 2024).

Как показывает наш анализ ДЭГ на основе эксперимента GSE29014, аналогичная трехдоменная структура проявляется для взаимодействия двух наборов генов, ассоциированных с низкой (LAV) и высокой (HAV) тревожностью мышей, а также генов-ортологов (см. рис. 1). Взаимодействия LAGn, HAGn и GnI носят сложный характер и нуждаются в дальнейшем изучении (см. рис. 4).

Причина выбора в нашей работе поясной коры головного мозга для выявления генов, экспрессия которых после стресс-ответа ассоциирована с повышением или понижением уровня тревожности экспериментальных мышей, обусловлена тем, что в фМРТ исследованиях (de la Pena-Arteaga et al., 2024) была показана измененная активность именно поясной коры мозга в условиях восприятия авersive стимулов, ассоциированных с тревожностью.

Обратим внимание на тот факт, что эксперименты, проводившиеся L. Czibere с коллегами (2011) на генетической линии мышей дикого типа CD-1, выявили две противоположные реакции на одно и то же стрессовое воздействие. Это можно объяснить наличием скрытой геномной изменчивости в популяции обследованных мышей (наличие спектра полиморфизмов или эпигенетических модификаций, затрагивающих разнообразные геномные локусы). Возможно, именно с этим связан тот факт, что степень тревожности представляет собой некоторый континуум, оценки которого непрерывно варьируют от низких через средние к высоким значениям (Friligkou et al., 2024).

Проведенный нами анализ показал, что в основе качественных различий у мышей между низким и нормальным уровнями тревожности с одной стороны и между

высоким и нормальным с другой стороны, выявленных в эксперименте (Czibere et al., 2011), могут лежать генные сети, функционирующие в поясной коре головного мозга и обеспечивающие контрастные состояния тревожности относительно нормы.

Ранее в генетических исследованиях показана связь тревожности с генами моноаминовых систем мозга (Lesch et al., 1996; Murphy et al., 2013). Полиморфизм по генам серотониновой системы, включая гены, кодирующие серотониновые рецепторы и транспортеры серотонина, ассоциирован с разным уровнем тревожности (Purves et al., 2020).

Комплекс выявленных нами генов человека в составе реконструированных потенциальных генных сетей включает гены моноаминовых систем мозга. К таковым, например, относятся рецепторы серотонина 5HT2A и 5HT2C (домен потенциальной генной сети для состояния с высокой тревожностью). Эти рецепторы принадлежат к суперсемейству рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), и посредством взаимодействия с GPCR передают внеклеточные сигналы внутрь клеток, а также опосредуют действие большого количества соединений, влияющих на депрессию, шизофрению, тревогу, галлюцинации, диспимию, характер сна, пищевое поведение и нейроэндокринные функции (Van Oekelen et al., 2003), что хорошо согласуется с моноаминовой гипотезой тревожности (Morris-Rosendahl, 2002; Gottschalk, Domschke, 2017; Hirai et al., 2024).

В реконструированных нами потенциальных генных сетях человека включены также взаимодействия с генами, кодирующими такие белки, как COMT или APOE, которые не относятся к нейротрансмиттерам, но ассоциированы с тревожностью и депрессией через участие в регуляции широкого круга метаболических процессов (Koskinen, Novatta, 2023).

Установлено наличие функциональной взаимосвязи между генетическими полиморфизмами и уровнем тревожности для групп людей, живущих в разных условиях среды (Gunthert et al., 2007). Показано, что средовые факторы сложным образом взаимодействуют с генетическими маркерами тревожности, в ряде случаев приводя к инверсии эффектов аллельного полиморфизма при смене условий жизни (Schinka et al., 2004; Sen et al., 2004; Ivanov et al., 2019; Meng et al., 2024; Petrican et al., 2024).

Можно предположить, что уровень и направленность тревожности как стресс-ответа зависят: (а) от генов, непосредственно вовлеченных в обработку нервных сигналов; (б) от генов, регулирующих другие функции организма (метаболические, физиологические...); (в) от наличия скрытой геномной изменчивости – эпигенетических модификаций, полиморфизмов и др. по двум указанным выше группам генов (а) и (б).

Известно, что результаты, полученные на животных моделях при разработке лекарственных средств, не всегда могут быть адекватно экстраполированы на человека (Hackam, Redelmeier, 2006). Возникает также опасение, что исследование на 25 особях одного поколения линии диких мышей может привести к упрощенным выводам и ограниченному пониманию сложной сети генов, вовлеченных в формирование тревожности, а любые ошибки или неточности в первоначальных данных – к неверным выводам о роли генов в тревожности.

При нашей апробации трансляционного подхода такие вопросы были решены следующим образом: полученные на основе списка ДЭГ поясной коры головного мозга мышей гены-ортологи человека и мыши были сопоставлены с набором из базы MalaCards (176 генов человека, которые ассоциированы с генерализованной тревожностью и расстройствами тревожного и депрессивного спектра для человека). В базе MalaCards дается набор ссылок на работы, описывающие соответствующие эксперименты, что позволяет проверять их достоверность для каждого случая. После такого сопоставления была проведена реконструкция потенциальных (т.е. предполагающих специальное дальнейшее изучение) генных сетей именно для человека с помощью когнитивной системы ANDSystem на основе автоматического анализа (и разрешения найденных в них неточностей и противоречий) 6 млн текстов статей из ведущих изданий по биологической тематике. Таким образом, влияние неточности или недостаточности исходных данных в группах мышей LAB и NAB в нашей апробации было сведено к пренебрежительно малому уровню.

Заклучение

На основе использованных нами программных ресурсов и сформированного алгоритма анализа данных по дифференциальной экспрессии генов разработан программный модуль для компьютерной реконструкции генных сетей, вовлеченных в регуляцию стресс-ответа, приводящего к тревожности различного уровня.

В рамках трансляционного подхода была реконструирована трехдоменная потенциальная генная сеть, которая ассоциирована с генерализованной тревожностью у человека, по моделям мышей с разным уровнем тревожности

путем автоматического анализа текстов научных статей. Один домен ассоциирован с пониженной тревожностью у человека, второй – с повышенной, третий служит диспетчером, который активирует один из двух доменов в зависимости от статуса организма (генетического, эпигенетического, физиологического).

Мы полагаем, что этот подход может быть модифицирован для реконструкции генных сетей, ассоциирующих как с тревожностью, так и с другими поведенческими реакциями при стресс-ответах разных типов.

Ограничения

Реконструированная нами мультидоменная генная сеть человека, которая ассоциирована с генерализованной тревожностью, является потенциальной, т.е. предполагает специальное дальнейшее изучение и уточнение. Таким образом, в данной работе сделан начальный шаг в исследовании доменов генной сети, которая ассоциирована с тревожностью человека.

Список литературы / References

- Колчанов Н.А., Игнатъева Е.В., Подколотная О.А., Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г. Генные сети. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):833-850
[Kolchanov N.A., Ignatieva E.V., Podkolodnaya O.A., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. Gene networks. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2013;17(4/2):833-850 (in Russian)]
- Чадаева И.В., Филонов С.В., Золотарева К.А., Хандаев Б.М., Ершов Н.И., Подколотный Н.Л., Кожемякина Р.В., Рассказов Д.А., Богомолов А.Г., Кондратьев Е.Ю., Климова Н.В., Шихевич С.Г., Рязанова М.А., Федосеева Л.А., Редина О.Е., Кожевникова О.С., Стефанова Н.А., Колосова Н.Г., Маркель А.Л., Пономаренко М.П., Ощепков Д.Ю. База знаний RatDEGdb по дифференциально экспрессирующимся генам крысы как модельного объекта биомедицинских исследований. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(7):794-806. doi 10.18699/VJGB-23-92
[Chadaeva I.V., Filonov S.V., Zolotareva K.A., Khandaev B.M., Ershov N.I., Podkolodnyy N.L., Kozhemyakina R.V., Rasskazov D.A., Bogomolov A.G., Kondratyuk E.Y., Klimova N.V., Shikhovich S.G., Ryazanova M.A., Fedoseeva L.A., Redina O.E., Kozhevnikova O.S., Stefanova N.A., Kolosova N.G., Markel A.L., Ponomarenko M.P., Oshchepkov D.Y. RatDEGdb: a knowledge base of differentially expressed genes in the rat as a model object in biomedical research. *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2023;27(7):794-806. doi 10.18699/VJGB-23-92]
- Brasher M.S., Mize T.J., Thomas A.L., Hoeffler C.A., Ehringer M.A., Evans L.M. Testing associations between human anxiety and genes previously implicated by mouse anxiety models. *Genes Brain Behav*. 2023;22(6):e12851. doi 10.1111/gbb.12851
- Bruzzone S.E.P., Ozenne B., Fisher P.M., Ortega G., Jensen P.S., Dam V.H., Svarer C., Knudsen G.M., Lesch K.P., Frokiaer V.G. No association between peripheral serotonin-gene-related DNA methylation and brain serotonin neurotransmission in the healthy and depressed state. *Clin Epigenet*. 2024;416(1):71. doi 10.1186/s13148-024-01678-y
- Chen Y., Elenee Argentinis J.D., Weber G. IBM Watson: how cognitive computing can be applied to big data challenges in life sciences research. *Clin Ther*. 2016;38(4):688-701. doi 10.1016/j.clinthera.2015.12.001
- Czibere L., Baur L.A., Wittmann A., Gemmeke K., Steiner A., Weber P., Pütz B., Ahmad N., Bunck M., Graf C., Widner R., Kühne C., Panhuysen M., Hamsch B., Rieder G., Reinheckel T., Peters C., Holsboer F., Landgraf R., Deussing J.M. Profiling trait anxiety: tran-

- scriptome analysis reveals cathepsin B (*Ctsb*) as a novel candidate gene for emotionality in mice. *PLoS One*. 2011;6(8):e23604. doi 10.1371/journal.pone.0023604
- de la Pena-Arteaga V., Chavarria-Elizondo P., Juaneda-Segui A., Martinez-Zalacain I., Morgado P., Menchon J.M., Pico-Perez M., Fullana M.A., Soriano-Mas C. Trait anxiety is associated with attentional brain networks. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2024;83:19-26. doi 10.1016/j.euroneuro.2024.02.013
- Duncan L.E., Pollastri A.R., Smoller J.W. Mind the gap: why many geneticists and psychological scientists have discrepant views about gene-environment interaction (G×E) research. *Am Psychol*. 2014; 69(3):249-268. doi 10.1037/a0036320
- Ebstein R.P. The molecular genetic architecture of human personality: beyond self-report questionnaires. *Mol Psychiatry*. 2006;11(5):427-445. doi 10.1038/sj.mp.4001814
- Friligkou E., Løkhammer S., Cabrera-Mendoza B., Shen J., He J., Deiana G., Zanoaga M.D., Asgel Z., Pilcher A., Di Lascio L., Makharashvili A., Koller D., Tylee D.S., Pathak G.A., Polimanti R. Gene discovery and biological insights into anxiety disorders from a large-scale multi-ancestry genome-wide association study. *Nat Genet*. 2024;56(10):2036-2045. doi 10.1038/s41588-024-01908-2
- Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Kudryavtseva N.N. Changes in the expression of neurotransmitter system genes in the ventral tegmental area in depressed mice: RNA-SEQ data. *Neurosci Behav Physiol*. 2018;48(5):591-602. doi 10.1007/s11055-018-0605-5
- Gottschalk M.G., Domschke K. Genetics of generalized anxiety disorder and related traits. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(2):159-168. doi 10.31887/DCNS.2017.19.2/kdomschke
- Gryksa K., Schmidtnr A.K., Masis-Calvo M., Rodriguez-Villagra O.A., Havasi A., Wirowski G., Maloumy R., Jagle H., Bosch O.J., Slatery D.A., Neumann I.D. Selected breeding of rats for high (HAB) and low (LAB) anxiety-related behaviour: a unique model for comorbid depression and social dysfunctions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2023;152:105292. doi 10.1016/j.neubiorev.2023.105292
- Gunther K., Conner T.S., Armeli S., Tennen H., Covault J., Kranzler H.R. Serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety reactivity in daily life: a daily process approach to gene-environment interaction. *Psychosom Med*. 2007;69(8):762-768. doi 10.1097/PSY.0b013e318157ad42
- Hackam D.G., Redelmeier D.A. Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA*. 2006;296(14):1727-1732. doi 10.1001/jama.296.14.1731
- Hettema J.M., Neale M.C., Kendler K.S. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry*. 2001;158(10):1568-1578. doi 10.1176/appi.ajp.158.10.1568
- Hettema J.M., Webb B.T., Guo A.-Y., Zhao Z., Maher B.S., Chen X., An S.-S., Sun C., Aggen S.H., Kendler K.S., Kuo P.-H., Otowa T., Flint J., van den Oord E.J. Prioritization and association analysis of murine-derived candidate genes in anxiety-spectrum disorders. *Biol Psychiatry*. 2011;70(9):888-896. doi 10.1016/j.biopsych.2011.07.012
- Hirai A., Toda C., Yohannes Y.B., Collins N., Tambai M., Nomiya K., Eguchi A., Hoshi N., Hirano T., Nakayama S.M.M., Ishizuka M., Ikenaka Y. Role of brain monoamines in acetamiprid-induced anxiety-like behavior. *Toxicology*. 2024;505:153839. doi 10.1016/j.tox.2024.153839
- Hovatta I., Barlow C. Molecular genetics of anxiety in mice and men. *Ann Med*. 2008;40(2):92-109. doi 10.1080/07853890701747096
- Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Mishchenko E.L., Saik O.V. A new version of the ANDSys tool for automatic extraction of knowledge from scientific publications with expanded functionality for reconstruction of associative gene networks by considering tissue-specific gene expression. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(Suppl.1):34. doi 10.1186/s12859-018-2567-6
- Ivanisenko V.A., Gaisler E.V., Basov N.V., Rogachev A.D., Chereviz S.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Mishchenko E.L., Khripko O.P., Khripko Y.I., Voevoda S.M., Karpenko T.N., Velichko A.J., Voevoda M.I., Kolchanov N.A., Pokrovsky A.G. Plasma metabolomics and gene regulatory networks analysis reveal the role of non-structural SARS-CoV-2 viral proteins in metabolic dysregulation in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2022;12(1):19977. doi 10.1038/s41598-022-24170-0
- Ivanisenko V.A., Rogachev A.D., Makarova A.-L.A., Basov N.V., Gaisler E.V., Kuzmicheva I.N., Demenkov P.S., Venzel A.S., Ivanisenko T.V., Antropova E.A., Kolchanov N.A., Plesko V.V., Moroz G.B., Lomivorotov V.V., Pokrovsky A.G. AI-assisted identification of primary and secondary metabolomic markers for postoperative delirium. *Int J Mol Sci*. 2024;25(21):11847. doi 10.3390/ijms252111847
- Ivanov R., Zamyatin V., Klimenko A., Matushkin Y., Savostyanov A., Lashin S. Reconstruction and analysis of gene networks of human neurotransmitter systems reveal genes with contentious manifestation for anxiety, depression, and intellectual disabilities. *Genes*. 2019;10(9):699. doi 10.3390/genes10090699
- Kolchanov N.A., Anan'ko E.A., Kolpakov F.A., Podkolodnaya O.A., Ignat'eva E.V., Goryachkovskaya T.N., Stepanenko I.L. Gene networks. *Mol Biol*. 2000;34(4):449-460. doi 10.1007/BF02759554
- Koskinen M.-K., Hovatta I. Genetic insights into the neurobiology of anxiety. *Trends Neurosci*. 2023;46(4):318-331. doi 10.1016/j.tins.2023.01.007
- Krämer A., Green J., Pollard J., Jr, Tugendreich S. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*. 2014; 30(4):523-530. doi 10.1093/bioinformatics/btt703
- Krause C., Suwada K., Blomme E.A.G., Kowalkowski K., Liguori M.J., Mahalingaiah P.K., Mittelstadt S., Peterson R., Rendino L., Vo A., Van Vleet T.R. Preclinical species gene expression database: development and meta-analysis. *Front Genet*. 2023;13:1078050. doi 10.3389/fgene.2022.1078050
- Lesch K.P., Bengel D., Heils A., Sabol S.Z., Greenberg B.D., Petri S., Benjamin J., Muller C.R., Hamer D.H., Murphy D.L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996;274(5292):1527-1531. doi 10.1126/science.274.5292.1527
- Malezieux M., Klein A.S., Gogolla N. Neural circuits for emotion. *Annu Rev Neurosci*. 2023;46:211-231. doi 10.1146/annurev-neuro-111020-103314
- Meng P., Pan C., Qin X., Cai Q., Zhao Y., Wei W., Cheng S., Yang X., Cheng B., Liu L., He D., Shi S., Chu X., Zhang N., Jia Y., Wen Y., Liu H., Zhang F. A genome-wide gene-environmental interaction study identified novel loci for the relationship between ambient air pollution exposure and depression, anxiety. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2024;285:117121. doi 10.1016/j.ecoenv.2024.117121
- Moraes A.C.N., Wijaya C., Freire R., Quagliato L.A., Nardi A.E., Kyriakoulis P. Neurochemical and genetic factors in panic disorder: a systematic review. *Transl Psychiatry*. 2024;14:294. doi 10.1038/s41398-024-02966-0
- Morris-Rosendahl D.J. Are there anxious genes? *Dialogues Clin Neurosci*. 2002;4(3):251-260. doi 10.31887/DCNS.2002.4.3/dmrosendahl
- Mostafavi S., Ray D., Warde-Farley D., Grouios C., Morris Q. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol*. 2008; 9(Suppl.1):S4. doi 10.1186/gb-2008-9-s1-s4
- Mucha M., Skrzypiec A.E., Kolenchery J.B., Brambilla V., Patel S., Labrador-Ramos A., Kudla L., Murrall K., Skene N., Dymicka-Piekarska V., Klejman A., Przewlocki R., Mosienko V., Pawlak R. miR-483-5p offsets functional and behavioural effects of stress in male mice through synapse-targeted repression of *Pgap2* in the basolateral amygdala. *Nat Commun*. 2023;14:2134. doi 10.1038/s41467-023-37688-2
- Murphy D.L., Moya P.R., Fox M.A., Rubenstein L.M., Wendland J.R., Timpano K.R. Anxiety and affective disorder comorbidity related to serotonin and other neurotransmitter systems: obsessive-compulsive disorder as an example of overlapping clinical and genetic heterogeneity. *Phil Trans R Soc B*. 2013;368:20120435 doi 10.1098/rstb.2012.0435

- Nuss P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015;17(11):165-175. doi 10.2147/NDT.S58841
- Otowa T., Hek K., Lee M., Byrne E.M., Mirza S.S., Nivard M.G., Bigdeli T., ... Maher B.S., van den Oord E.J., Wray N.R., Tiemeier H., Hettema J.M. Meta-analysis of genome-wide association studies of anxiety disorders. *Mol Psychiatry.* 2016;21(10):1391-1399. doi 10.1038/mp.2015.197
- Penninx B.W., Pine D.S., Holmes E.A., Reif A. Anxiety disorders. *Lancet.* 2021;397(10277):914-927. doi 10.1016/S0140-6736(21)00359-7
- Petrican R., Fornito A., Boyland E. Lifestyle factors counteract the neurodevelopmental impact of genetic risk for accelerated brain aging in adolescence. *Biol Psychiatry.* 2024;95(5):453-464. doi 10.1016/j.biopsych.2023.06.023
- Purves K.L., Coleman J.R.I., Meier S.M., Rayner C., Davis K.A.S., Cheesman R., Bækvad-Hansen M., Børghlum A.D., Wan Cho S., Jürgen Deckert J., Gaspar H.A., Bybjerg-Grauholm J., Hettema J.M., Hotopf M., Hougaard D., Hübel C., Kan C., McIntosh A.M., Mors O., Bo Mortensen P., Nordentoft M., Werge T., Nicodemus K.K., Mattheisen M., Breen G., Eley T.C. A major role for common genetic variation in anxiety disorders. *Mol Psychiatry.* 2020;25(12):3292-3303. doi 10.1038/s41380-019-0559-1
- Schinka J.A., Busch R.M., Robichaux-Keene N. A meta-analysis of the association between the serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR and trait anxiety. *Mol Psychiatry.* 2004;9(2):197-202. doi 10.1038/sj.mp.4001405
- Sen S., Burmeister M., Ghosh D. Meta-analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism 5-HTTLPR and anxiety-related personality traits. *Am J Med Genet.* 2004;127B(1):85-89. doi 10.1002/ajmg.b.20158
- Shin D., Gong J.-R., Jeong S.D., Cho Y., Kim H.-P., Kim T.-Y., Cho K.-H. Attractor landscape analysis reveals a reversion switch in the transition of colorectal tumorigenesis. *Adv Sci.* 2024;2412503. doi 10.1002/advs.202412503
- Stein D.J., Bouwer C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. *J Anxiety Disord.* 1997;11(4):409-429. doi 10.1016/s0887-6185(97)00019-4
- Strom N.I., Verhulst F., Bacanu S.A., Cheesman R., Purves K.L., Gedik H., Mitchell B.L., ... Million Veteran Program, FinnGen, 23andMe; Deckert J., Eley T.C., Mattheisen M., Hettema J.M. Genome-wide association study of major anxiety disorders in 122,341 European-ancestry cases identifies 58 loci and highlights GABAergic signaling. *medRxiv.* 2024. doi 10.1101/2024.07.03.24309466
- Szklarczyk D., Franceschini A., Wyder S., Forslund K., Heller D., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Roth A., Santos A., Tsafou K.P., Kuhn M., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(D1):D447-D452. doi 10.1093/nar/gku1003
- Vandamme T.F. Use of rodents as models of human diseases. *J Pharm Bioallied Sci.* 2014;6(1):2-9. doi 10.4103/0975-7406.124301
- Van Oekelen D., Luyten W.H., Leysen J.E. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sci.* 2003;72(22):2429-2449. doi 10.1016/s0024-3205(03)00141-3

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.11.2024. После доработки 16.12.2024. Принята к публикации 16.12.2024.

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».

Сетевое издание «Вавиловский журнал генетики и селекции (Vavilov Journal of Genetics and Breeding)» – реестровая запись СМИ Эл № ФС77-85772, зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 14 августа 2023 г.

Издание включено 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, Russian Science Citation Index, Российский индекс научного цитирования, ВИНИТИ, Web of Science CC, Scopus, PubMed Central, DOAJ, ROAD, Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar.

Открытый доступ к полным текстам:
русскоязычная версия – на сайте <https://vavilovj-icg.ru/>
и платформе Научной электронной библиотеки, elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
англоязычная версия – на сайте vavilov.elpub.ru/index.php/jour
и платформе PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

При перепечатке материалов ссылка обязательна.

✉ email: 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.

Дата публикации 28.02.2025. Формат 60 × 84 ¹/₈. Уч.-изд. л. 22.5.

