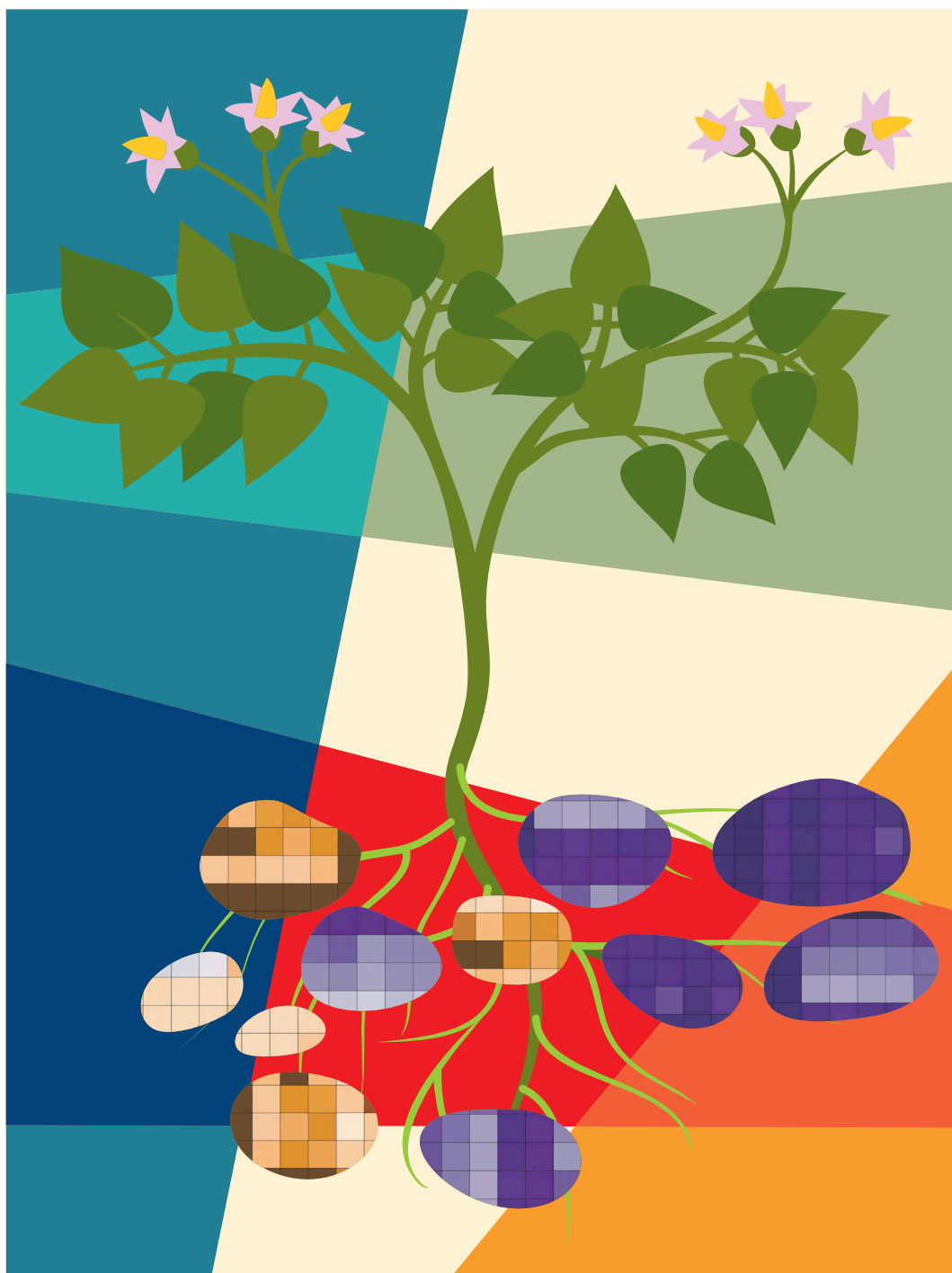


# ВАВИЛОВСКИЙ

## ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2024 • 28 • 2



Молекулярная и клеточная биология / Генетика и селекция растений / Иммуниет растений к болезням /  
Генетика животных / Медицинская генетика / Актуальные технологии



Сетевое издание

# ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/vjgb-24-15

## Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

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

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

## Главный редактор

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

## Заместители главного редактора

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

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

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

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

## Ответственный секретарь

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

## Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

*А. Бёрнер* – д-р наук (Германия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Ж. Ле Гуи* – д-р наук (Франция)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*И.Б. Розозин* – канд. биол. наук (США)

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

*Е.Ю. Рыкова* – д-р биол. наук (Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Online edition

# VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

## VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/vjgb-24-15

**Founders**

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

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

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

**Editor-in-Chief**

A.V. Kochetov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

**Deputy Editor-in-Chief**

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

**Executive Secretary**

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

**Editorial board**

O.S. Afanasenko, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

L.A. 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. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

D.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States

A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia

E.Y. Rykova, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Y.N. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia

R.I. Sheiko, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Agricul.), Belarus

S.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.A. Stepanov, 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

- 131 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Транскрипционный фактор DREF регулирует экспрессию гена микроРНК *bantam Drosophila melanogaster*.  
М.Б. Шварц, М.М. Прудникова, О.В. Андреенков,  
Е.И. Волкова, И.Ф. Жимулев, О.В. Антоненко, С.А. Демаков
- 138 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Оценка клеточных линий с индуцируемой деплецией компонентов когезина и конденсинов посредством анализа морфологии метафазных хромосом. А.М. Юнусова, А.В. Смирнов, И.Е. Пристяжнюк, Т.А. Шнайдер, Е.К. Мальцева, С.Д. Афонникова, О.А. Гусев, Н.Р. Баттулин (на англ. языке)

## Генетика и селекция растений

- 148 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Среднем и Верхнем Поволжье по ISSR-маркерам. О.В. Шейкина, Е.М. Романов
- 155 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Многомерный анализ многолетних климатических данных в связи с урожайностью, скороспелостью и проблемой глобального потепления.  
В.М. Ефимов, Д.В. Речкин, Н.П. Гончаров

## Иммунитет растений к болезням

- 166 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Изучение генетической коллекции земляники (*Fragaria* L.) по устойчивости к мучнистой росе. А.С. Лыжин, И.В. Лукьянчук
- 175 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
*In silico* поиск R-генов у примитивных культурных видов картофеля.  
А.А. Гурина, М.С. Ганчева, Н.В. Алпатьева, Е.В. Рогозина

## Генетика животных

- 185 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**  
Различия в плодовитости между двумя линиями *Drosophila melanogaster* дикого типа коррелируют с различиями в экспрессии гена *Jeh1*, кодирующего фермент деградации ювенильного гормона. О.В. Андреенкова, Н.В. Адоньева, В.М. Ефимов, Н.Е. Грунтенко

190

### ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Влияние породы и среды на длину теломер лейкоцитов у крупного рогатого скота. Н.С. Юдин, А.В. Игошин, Г.А. Ромашов, А.А. Мартынов, Д.М. Ларкин (на англ. языке)

## Медицинская генетика

198

### ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Аберрантное метилирование генов развития плаценты в ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией 16. О.Ю. Васильева, Е.Н. Толмачева, А.Э. Дмитриев, Я.А. Даркова, Е.А. Саженова, Т.В. Никитина, И.Н. Лебедев, С.А. Васильев

204

### ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Состав бактериального микробиома мокроты пациентов с разными патоморфологическими формами немелкоклеточного рака легкого. В.Г. Дружинин, Е.Д. Баранова, П.С. Деменков, Л.В. Мацкова, А.В. Ларионов

215

### ОБЗОР

Роль сиртуинов в эпигенетической регуляции и контроле старения. Е.М. Самойлова, С.Е. Романов, Д.А. Чудакова, П.П. Лактионов

228

### ОБЗОР

Влияние транспозонов на развитие болезни Альцгеймера. Р.Н. Мустафин, Э.К. Хуснутдинова

## Актуальные технологии

239

### ОБЗОР

Невирусные системы внутриклеточной доставки инструментов редактирования генома. И.Х. Шайхутдинов, П.В. Ильясов, О.В. Грибкова, Л.В. Лимарева

249

### ОБЗОР

Проблемы создания фаговых библиотек антител и пути их решения. В.С. Арипов, Н.В. Волкова, А.А. Ильичев, Д.Н. Щербаков

## Molecular and cell biology

- 131 ORIGINAL ARTICLE  
Transcription factor DREF regulates expression of the microRNA gene *bantam* in *Drosophila melanogaster*. M.B. Schwartz, M.M. Prudnikova, O.V. Andreenkov, E.I. Volkova, I.F. Zhimulev, O.V. Antonenko, S.A. Demakov
- 138 ORIGINAL ARTICLE  
Assessing cell lines with inducible depletion of cohesin and condensins components through analysis of metaphase chromosome morphology. A.M. Yunusova, A.V. Smirnov, I.E. Prist'yazhnuk, T.A. Shnaider, E.K. Maltseva, S.D. Afonnikova, O.A. Gusev, N.R. Battulin

## Plant genetics and breeding

- 148 ORIGINAL ARTICLE  
Variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plus trees in the Middle and Upper Volga Region with the use of ISSR markers. O.V. Sheikina, E.M. Romanov
- 155 ORIGINAL ARTICLE  
Multivariate analysis of long-term climate data in connection with yield, earliness and the problem of global warming. V.M. Efimov, D.V. Rechkin, N.P. Goncharov

## Plant immunity

- 166 ORIGINAL ARTICLE  
Study of a genetic collection of strawberry (*Fragaria* L.) for resistance to powdery mildew. A.S. Lyzhin, I.V. Luk'yanchuk
- 175 ORIGINAL ARTICLE  
*In silico* search for and analysis of *R* gene variation in primitive cultivated potato species. A.A. Gurina, M.S. Gancheva, N.V. Alpatieva, E.V. Rogozina

## Animal genetics

- 185 ORIGINAL ARTICLE  
Fertility differences between two wild-type *Drosophila melanogaster* lines correlate with differences in the expression of the *Jheh1* gene, which codes for an enzyme degrading juvenile hormone. O.V. Andreenkova, N.V. Adonyeva, V.M. Efimov, N.E. Gruntenko

- 190 ORIGINAL ARTICLE  
Influence of breed and environment on leukocyte telomere length in cattle. N.S. Yudin, A.V. Igoshin, G.A. Romashov, A.A. Martynov, D.M. Larkin

## Medical genetics

- 198 ORIGINAL ARTICLE  
Aberrant methylation of placental development genes in chorionic villi of spontaneous abortions with trisomy 16. O.Yu. Vasilyeva, E.N. Tolmacheva, A.E. Dmitriev, Ya.A. Darkova, E.A. Sazhenova, T.V. Nikitina, I.N. Lebedev, S.A. Vasilyev
- 204 ORIGINAL ARTICLE  
Composition of the sputum bacterial microbiome of patients with different pathomorphological forms of non-small-cell lung cancer. V.G. Druzhinin, E.D. Baranova, P.S. Demenkov, L.V. Matskova, A.V. Larionov
- 215 REVIEW  
Role of sirtuins in epigenetic regulation and aging control. E.M. SamoiloVA, S.E. Romanov, D.A. Chudakova, P.P. Laktionov
- 228 REVIEW  
Involvement of transposable elements in Alzheimer's disease pathogenesis. R.N. Mustafin, E.K. Khusnutdinova


## Mainstream technologies

- 239 REVIEW  
Non-viral systems for intracellular delivery of genome editing tools. I.H. Shaikhutdinov, P.V. Ilyasov, O.V. Gribkova, L.V. Limareva
- 249 REVIEW  
Problems of creating antibody phage libraries and their solutions. V.S. Aripov, N.V. Volkova, A.A. Ilyichev, D.N. Shcherbakov

DOI 10.18699/vjgb-24-20

## Транскрипционный фактор DREF регулирует экспрессию гена микроРНК *bantam* *Drosophila melanogaster*

М.Б. Шварц, М.М. Прудникова, О.В. Андреенков, Е.И. Волкова, И.Ф. Жимулев, О.В. Антоненко, С.А. Демаков 

Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
 demakov@mcb.nsc.ru

**Аннотация.** Ген *bantam* кодирует жизненно важную микроРНК и имеет сложный паттерн экспрессии в различных тканях на разных стадиях развития дрозофилы. Эта микроРНК обеспечивает нормальное развитие глазных и крыловых имажинальных дисков, центральной нервной системы, а также участвует в поддержании недифференцированного состояния стволовых клеток в яичниках взрослых самок. На клеточном уровне *bantam* стимулирует пролиферацию клеток и препятствует апоптозу. Ген *bantam* является мишенью нескольких консервативных сигнальных каскадов, в частности Hippo. На сегодняшний день известно не менее 10 белков, напрямую регулирующих экспрессию этого гена в разных тканях дрозофилы. В настоящей работе мы обнаружили, что регуляторная область *bantam* содержит мотивы, характерные для сайтов связывания DREF – транскрипционного фактора, который регулирует экспрессию генов каскада Hippo. Используя трансгенные линии, содержащие полноразмерный фрагмент, спасающий летальность делеции *bantam*, и фрагмент с нарушенным сайтом связывания DREF, мы показали, что эти мотивы имеют функциональное значение, поскольку их нарушение в локусе *bantam* снижает уровень экспрессии в личинках и яичниках гомозиготных мух, что коррелирует со сниженной жизнеспособностью и фертильностью. Влияние связывания DREF с промоторной областью гена *bantam* на уровень его экспрессии предполагает дополнительный уровень сложности регуляции экспрессии этой микроРНК. Снижение количества откладываемых яиц и сокращение репродуктивного периода у самок при нарушении сайта связывания DREF в регуляторной области гена *bantam* позволяют предполагать, что через *bantam* DREF также участвует в регуляции оогенеза дрозофилы. Ключевые слова: микроРНК; генетическая регуляция; мутагенез; транскрипция; факторы транскрипции.

**Для цитирования:** Шварц М.Б., Прудникова М.М., Андреенков О.В., Волкова Е.И., Жимулев И.Ф., Антоненко О.В., Демаков С.А. Транскрипционный фактор DREF регулирует экспрессию гена микроРНК *bantam* *Drosophila melanogaster*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;28(2):131-137. DOI 10.18699/vjgb-24-20

## Transcription factor DREF regulates expression of the microRNA gene *bantam* in *Drosophila melanogaster*

M.B. Schwartz, M.M. Prudnikova, O.V. Andreenkov, E.I. Volkova, I.F. Zhimulev, O.V. Antonenko, S.A. Demakov 

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

**Abstract.** The *bantam* gene encodes a vital microRNA and has a complex expression pattern in various tissues at different stages of *Drosophila* development. This microRNA is involved in the control of normal development of the ocular and wing imaginal discs, the central nervous system, and also in maintaining the undifferentiated state of stem cells in the ovaries of adult females. At the cellular level, *bantam* stimulates cell proliferation and prevents apoptosis. The *bantam* gene is a target of several conserved signaling cascades, in particular, Hippo. At the moment, at least ten proteins are known to directly regulate the expression of this gene in different tissues of *Drosophila*. In this study, we found that the *bantam* regulatory region contains motifs characteristic of binding sites for DREF, a transcription factor that regulates the expression of Hippo cascade genes. Using transgenic lines containing a full-length *bantam* lethality-rescuing deletion fragment and a fragment with a disrupted DREF binding site, we show that these motifs are functionally significant because their disruption at the *bantam* locus reduces expression levels in the larvae and ovaries of homozygous flies, which correlates with reduced vitality and fertility. The effect of DREF binding to the promoter region of the *bantam* gene on its expression level suggests an additional level of complexity in the regulation of expression of this microRNA. A decrease in the number of eggs laid and a shortening of the reproductive period in females when the DREF binding site in the regulatory region of the *bantam* gene is disrupted suggests that, through *bantam*, DREF is also involved in the regulation of *Drosophila* oogenesis.

Key words: microRNA; genetic regulation; mutagenesis; transcription; transcription factors.

**For citation:** Schwartz M.B., Prudnikova M.M., Andreenkov O.V., Volkova E.I., Zhimulev I.F., Antonenko O.V., Demakov S.A. Transcription factor DREF regulates expression of the microRNA gene *bantam* in *Drosophila melanogaster*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024;28(2):131-137. DOI 10.18699/vjgb-24-20

## Введение

Ген *bantam* кодирует жизненно важную микроРНК, которая экспрессируется во многих тканях на всем протяжении жизненного цикла дрозофилы. На клеточном уровне *bantam* стимулирует пролиферацию клеток и препятствует апоптозу (Brennecke et al., 2003). Эта микроРНК обеспечивает нормальное развитие глазных и крыловых имажинальных дисков, центральной нервной системы, а также участвует в поддержании недифференцированного состояния стволовых клеток в яичниках взрослых самок (Shcherbata et al., 2007; Peng et al., 2009; Reddy, Irvine, 2011; Slattery et al., 2013; Weng, Cohen, 2015).

Экспрессия гена *bantam* контролируется с помощью широкого набора транскрипционных факторов, формирующих ансамбли в разных тканях и на разных стадиях развития. В регуляции экспрессии гена *bantam* участвуют такие консервативные морфогены, как *Notch*, *Wingless*, *Dpp* (Herranz et al., 2008; Oh, Irvine, 2010; Ku, Sun, 2017). Нарушение регуляции *bantam* приводит к неправильному развитию многих имажинальных органов, проблемам с жизнеспособностью и фертильностью (Hipfner et al., 2002; Brennecke et al., 2003; Shcherbata et al., 2007).

Один из ключевых регуляторов экспрессии *bantam* – транскрипционный коактиватор Yorkie (Yki), который, связываясь с тканеспецифичными транскрипционными факторами, обеспечивает нужный уровень экспрессии *bantam* (Peng et al., 2009; Slattery et al., 2013; Nagata et al., 2022). Коактиватор Yki является частью высококонсервативного сигнального каскада Hippo (Oh, Irvine, 2010). У дрозофилы этот каскад подавляет процесс клеточного деления, индуцируя арест клеточного цикла и апоптоз. Каскад начинается с киназы Hippo (Hpo), которая запускает последовательное фосфорилирование ряда белков и в конечном итоге приводит к инактивации Yki (Huang et al., 2005; Reddy, Irvine, 2011). Показано, что промотор гена *hpo* содержит мотивы DRE (DREF responding element). Мотивы DRE содержат и промотор гена *warts* (*wts*) – второй ключевой киназы каскада Hippo. С этими мотивами связывается транскрипционный фактор DREF, усиливая экспрессию *hpo* и *wts* в глазных имажинальных дисках (Fujiwara et al., 2012; Vo et al., 2014). Таким образом, DREF позитивно регулирует каскад Hippo и, соответственно, снижает уровень экспрессии *bantam*.

В нашей работе мы обнаружили, что регуляторная область *bantam* содержит мотивы, характерные для сайтов связывания DREF, и проверили, к чему приводит их нарушение на уровне организма. Мы исследовали, как нарушение сайтов связывания DREF с локусом *bantam* отразилось на жизнеспособности и фертильности мух.

## Материалы и методы

**Получение мутации сайта связывания DREF.** Для получения мутации использовали фрагмент ДНК из локуса *bantam* длиной 4709 п. н. (3L:637635-642343, release=r6.23), включающий мотивы DRE и DRE-like. Мотивы DRE и DRE-like изолировали друг от друга с помощью уникального сайта рестрикции EcoRV, расположенного между ними. Для мутирования каждого из этих мотивов проводили рестрикцию эндонуклеазой ClaI (AT|CG|AT), а затем встраивали выступающие 5'-концы с применением

фрагмента Кленова. При этом происходило встраивание двух нуклеотидов CG в ключевой части каждого мотива. Затем обе части фрагмента ДНК 4709 п. н. с мутированными мотивами DRE и DRE-like лигировали и полученный фрагмент ДНК DREF встраивали по сайтам рестрикции KpnI и NotI в вектор pUni-mod, содержащий сайт рекомбинации attB (Андреевков и др., 2016). Для получения трансгенной линии «DREF» использовали систему attP/attB специфической интеграции с линией, содержащей attP-сайт в районе 10A1-2 X-хромосомы (Андреевков и др., 2016).

**Линии мух.** Трансгенная линия «4.7» имела генотип  $y^1, Df(1)w^{67c23}, 10A1-2-«4.7»$ ; *ban<sup>Δ1</sup>/TM6B*. Она содержала встройку трансгена с полноразмерным фрагментом ДНК из локуса *bantam* длиной 4709 п. н. в район 10A1-2 (Schwartz et al., 2019).

Трансгенная линия «DREF» имела генотип  $y^1, Df(1)w^{67c23}, 10A1-2-«DREs\_mut»$ ; *ban<sup>Δ1</sup>/TM6B* и содержала встройку трансгена с модифицированным фрагментом 4.7 в район 10A1-2. Модификация фрагмента 4.7 заключалась в мутировании потенциальных сайтов связывания белка DREF. Во всех проведенных экспериментах исследовали гомозиготы по встройке трансгена.

Линия «уи» имела генотип  $y^1, Df(1)w^{67c23}$ ; линия «*ban+*» –  $y^1, Df(1)w^{67c23}; +/TM6B$ , где *TM6B* – балансерная хромосома с фенотипом *Tb* – короткое тело личинок и имаго; линия «*Δban*» – генотип  $y^1, Df(1)w^{67c23}; ban<sup>Δ1</sup>/TM6B$ .

Линии мух содержали при +23 °C на стандартном корме с добавлением сухих дрожжей.

**Иммуноокрашивание.** Непрямое иммуофлуоресцентное окрашивание политечных хромосом выполняли согласно описанному ранее протоколу (Kolesnikova et al., 2013) мышиными моноклональными антителами к белку DREF (получены от С.М. Hart, США), разведение 1:200, с последующей окраской goat-anti-mouse-Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, # A28175), разведение 1:600.

**Определение жизнеспособности мух.** Для определения жизнеспособности мух трансгенных линий в одну пробирку сажали 5 самок и 5 самцов одной линии. Раз в пять дней мух переводили на свежий корм и продолжали эксперимент в течение месяца. В качестве контроля использовали мух линии «*TM6*». По результатам трех повторов за время эксперимента в каждой линии в среднем было следующее количество потомков: «4.7» –  $454 \pm 92$ ; «DREF» –  $287 \pm 112$ ; «*TM6*» –  $756 \pm 289$ .

Жизнеспособность гомозигот по делеции *ban<sup>Δ1</sup>* в трансгенных линиях определяли как отношение количества мух, имеющих тело нормальной длины (*Tb+*), к общему количеству вылетевших потомков. Так как фенотип *Tb* идентифицируется на стадии личинки, куколки и имаго, можно на разных стадиях развития отличить мух без балансера – гомозигот по делеции *ban<sup>Δ1</sup>* – от гетерозиготных мух. Жизнеспособность мух на разных стадиях развития в трансгенных линиях сравнивали с жизнеспособностью контрольных мух с помощью критерия Стьюдента, с предварительной проверкой нормальности распределения по критерию Шапиро–Уилка.

**Определение фертильности самок.** Для определения фертильности самок трансгенных линий скрещивали с самцами линии «уи». В качестве контроля использовали



ли самок линии «уи». В каждом скрещивании брали по 5 самок и 5 самцов. Каждые сутки мух пересаживали на свежий корм и считали количество отложенных яиц. Эксперимент продолжался до гибели последней трансгенной самки в пробирке. Количество яиц за все время эксперимента нормировалось на количество самок. Эксперимент повторяли три раза. При построении кривой динамики фертильности количество яиц, отложенное самками каждый день, нормировалось на актуальное количество живых самок. Различия в уровне фертильности между линиями оценивали с помощью критерия Стьюдента, а также критерия  $\chi^2$ .

**Определение уровня экспрессии зрелой микроРНК *bantam*.** Уровень экспрессии зрелой микроРНК *bantam* определяли количественной ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции (qRT-PCR), адаптированной для исследования микроРНК за счет применения удлиненного stem-loop праймера (Chen et al., 2005; Kramer, 2011). В качестве референсного гена мы использовали мРНК *U6* (Zhang et al., 2017). Для получения кДНК брали 5 мкг тотальной РНК, а также M-MuLV-РН ревертазу и сопутствующие реактивы, согласно инструкции производителя (Biolabmix). Относительную экспрессию гена *bantam* определяли, применяя метод  $\Delta\Delta Ct$ . Реакцию обратной транскрипции проводили на амплификаторе BioRad C-1000 (США).

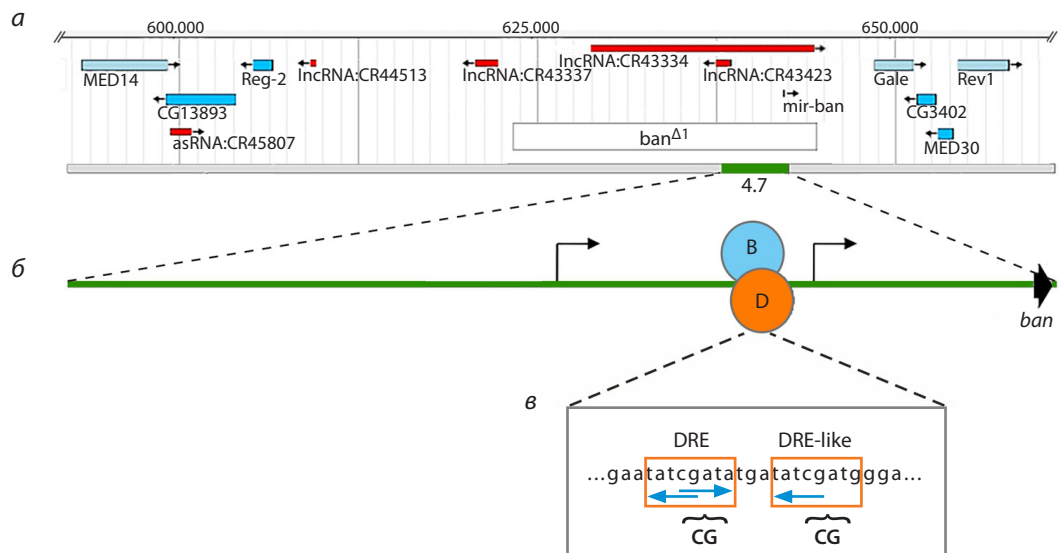
Эксперимент был сделан в двух биологических повторях. При этом использовали 30 мкл следующих реакционных смесей: для детекции *bantam* – по 3 мкл 5 мкМ праймеров *ban-F* и *ban-R*, 3 мкл 2.5 мкМ зонда TaqMan-*ban*, 3 мкл 10xAS буфера, 3 мкл 4 мкМ dNTP, 1 ед. активности Taq-полимеразы; для детекции *U6* – по 3 мкл 10 мкМ праймеров *U6-F* и *U6-R*, 3 мкл 2.5 мкМ зонда TaqMan

*U6*, 3 мкл 10xAS буфер, 3 мкл 4 мкМ dNTP, 1 ед. активности Taq-полимеразы, 3 мкл 10 мМ  $MgCl_2$  до конечной концентрации  $Mg^{2+}$  2.5 мМ на реакцию. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованных в экспериментах, даны в 5'→3' ориентации: *ban-SL* – gt cgtaccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatcgcagacaatcag, *ban-F* – gcgccgggatgagatcattttg, *ban-R* – cagtgcagggtccgaggt, TaqMan-*ban* – cgcactggatcgcagacaatcagcttt, *U6-SL* – gtcgta tccagtgcagggtccgaggtattcgcactggatcgcagcgccatgc, *U6-F* – gccgcatacagagaagatta, *U6-R* – agtgcagggtccgaggt, TaqMan-*U6* – ttcgcactggatcgcagcgccatgc.

## Результаты и обсуждение

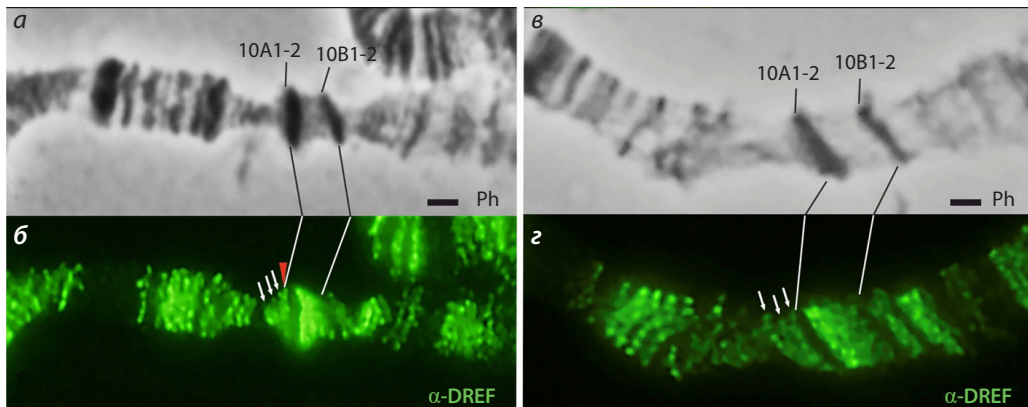
### В регуляторной области *bantam* расположены сайты связывания DREF

Для исследования роли DREF в регуляции экспрессии гена *bantam* мы использовали линии трансгенных мух. Линия мух «4.7» содержала вставку трансгена с фрагментом ДНК длиной 4709 п.н. из локуса *bantam* (рис. 1, а) в район 10A1-2 X-хромосомы. Этот фрагмент, далее обозначенный как фрагмент 4.7 (см. рис. 1, б), содержит последовательность, кодирующую «шпильку» микроРНК *bantam*, а также два предполагаемых промотора гена *bantam* (Brennecke et al., 2003; Qian et al., 2011). Ранее было показано, что фрагмент 4.7 спасает летальную делецию *ban<sup>Δ1</sup>*, удаляющую около 21 т.п.н. из локуса *bantam* (Schwartz et al., 2019). В составе фрагмента 4.7, в 1.2 т.п.н. выше «шпильки» *bantam* мы обнаружили мотивы TATCGATA и TATCGATG, соответствующие DRE и DRE-like элементам соответственно (Ohler et al., 2002). Оба мотива характерны для сайтов связывания транскрипционного фактора DREF (см. рис. 1, в).



**Рис. 1.** Молекулярно-генетическая организация локуса *bantam*.

а – фрагмент ДНК 4.7, содержащий ген *bantam* (зеленый прямоугольник), делеция *ban<sup>Δ1</sup>* – белый прямоугольник; положение остальных генов в районе – голубые и красные прямоугольники; б – схема организации фрагмента ДНК 4.7. Сайты связывания белков DREF и BEAF-32 – овалы D и B соответственно. Изогнутые стрелки – положение предполагаемых промоторов гена *bantam* (Brennecke et al., 2003; Qian et al., 2011). Положение шпильки *bantam* – черная стрелка; в – последовательность нуклеотидов с сайтами связывания белков DREF и BEAF-32. Мотивы, характерные для сайтов связывания DREF – оранжевые прямоугольники и BEAF-32 – синие стрелки. Фигурными скобками отмечены динуклеотидные инсерции, разрушающие сайты связывания DREF.



**Рис. 2.** Иммунолокализация белка DREF в районе 10A1-2 X-хромосомы трансгенных линий мух.

Линии мух: «4.7» (а, б) и «DREF» (в, з). Микрофотографии политенных X-хромосом слюнных желез личинок в режиме фазового контраста (Ph) и после окраски антителами против DREF (зеленый цвет). Белыми стрелками отмечены эндогенные сигналы локализации DREF в районе 9F, красным треугольником – дополнительный сигнал локализации DREF в дистальной части диска 10A1-2, соответствующий локализации трансгена в линии «4.7». В линии «DREF» дополнительный сигнал отсутствует (з). Шкала 1 мкм.

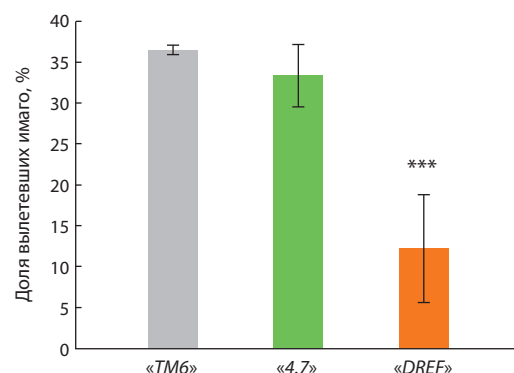
Линия мух «DREF» содержала вставку трансгена с фрагментом 4.7 с нарушенными сайтами связывания DREF. Для нарушения сайтов связывания DREF мы внесли мутации в мотивы DRE (DREF-responding element) и DRE-like (см. рис. 1, в). Следует отметить, что DRE и DRE-like включают в себя мотивы CGATA, формирующие сайт связывания инсуляторного белка BEAF-32. Введенные нами мутации не нарушали мотивы CGATA и, соответственно, не разрушали сайт связывания BEAF-32. Иммунолокализация на политенных хромосомах личинок дрозофилы показала, что в линии «4.7» в дистальной части диска 10A1-2 в месте встройки транспозона есть дополнительный сигнал локализации DREF (рис. 2, б, красная стрелка). При этом в линии «DREF» этот дополнительный сигнал отсутствует (см. рис. 2, з). Можно полагать, что обнаруженные нами мотивы DRE и DRE-like соответствуют сайту связывания белка DREF, а введенные нами мутации данных мотивов приводят к нарушению связывания белка DREF.

### Нарушение сайта связывания DREF в регуляторной области *bantam* влияет на жизнеспособность мух

Мы обнаружили, что мухи из линии «DREF» выживали на фоне делеции *ban<sup>Δ1</sup>*, однако жизнеспособность таких мух была значительно снижена по сравнению с мухами из линии «4.7» (рис. 3), а также с контрольными мухами «ТМ6», не содержащими ни трансгена, ни делеции *ban<sup>Δ1</sup>*. Причем гибель мух, гомозиготных по *ban<sup>Δ1</sup>*, в линии «DREF» в основном происходила на стадии поздней куколки, что совпадает с характерной летальностью делеции *ban<sup>Δ1</sup>* (Brennecke et al., 2003). Использование контроля, содержащего балансер ТМ6В, позволяло учитывать влияние самого балансера на жизнеспособность мух.

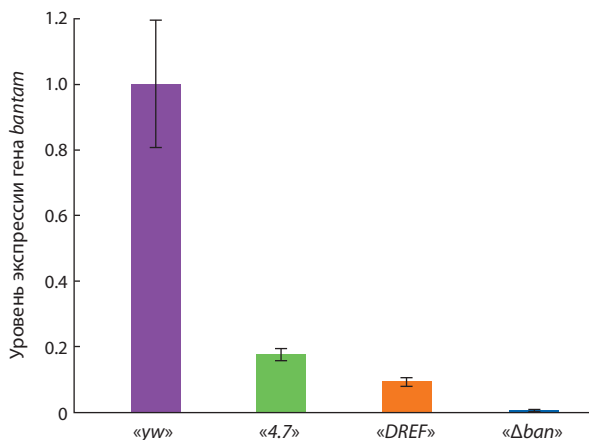
Для того чтобы выяснить, ассоциировано ли снижение жизнеспособности трансгенных мух «DREF» с экспрессией гена *bantam*, мы изучали уровень экспрессии зрелой микроРНК *bantam* в личинках трансгенных и контрольных мух. Исследования проводили с помощью метода ПЦР в

реальном времени, адаптированного для микроРНК (Chen et al., 2005; Kramer, 2011). Линия «уи» с нормальным локусом *bantam* служила положительным контролем. В качестве отрицательного контроля мы использовали линию «*Aban*», с делецией *ban<sup>Δ1</sup>*. Отбирали личинок, гомозиготных по встройкам. Так как особи, гомозиготные по делеции *ban<sup>Δ1</sup>*, погибают на стадии куколки, анализировали личинок. Как и следовало ожидать, в линии «*Aban*» зрелая микроРНК *bantam* не детектировалась у личинок, гомозиготных по *ban<sup>Δ1</sup>* (рис. 4). Экспрессия *bantam* оказалась снижена в обеих трансгенных линиях, «4.7» и «DREF», по сравнению с контролем «уи». Существенное снижение уровня экспрессии зрелой микроРНК в линии «4.7» кажется удивительным, при том что жизнеспособность мух в линии «4.7» не отличалась от контроля. Возможно, это объясняется тем, что в линии «4.7» уровень экспрессии микроРНК *bantam* хотя и существенно снижен, но сохраняется на достаточном уровне во всех тканях, где это необходимо для выживания мух. А в линии «DREF»



**Рис. 3.** Влияние связывания DREF с регуляторной областью *bantam* на жизнеспособность имаго в трансгенных линиях мух.

Доля имаго, гомозиготных по делеции *ban<sup>Δ1</sup>*, в трансгенных линиях мух «4.7» (зеленый столбец) и «DREF» (оранжевый столбец). Доля имаго в контрольной линии мух «ТМ6» (серый столбец), содержащих только нативный локус *bantam* дикого типа. \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Рис. 4.** Экспрессия микроРНК *bantam* в личинках 3-го возраста.

Уровни представленности зрелой микроРНК *bantam* в трансгенных линиях «4.7» и «DREF» и контрольной линии «Δban», гомозиготных по делеции *ban<sup>Δ1</sup>*. Экспрессия *bantam* в контрольной линии «уw» условно принята за единицу. Уровни экспрессии *bantam* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена мяРНК *U6*.

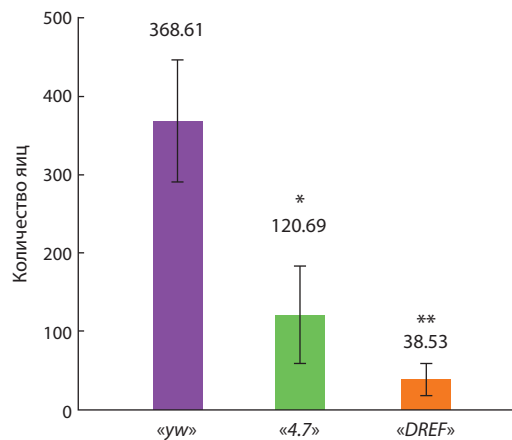
уровень экспрессии *bantam* повсеместно находится на низком пороговом уровне, что значительно сказывается на жизнеспособности. Возможно также, что в линии «DREF» уровень экспрессии *bantam* снижен только в определенных тканях, критически важных для выживания мух. Полученные данные говорят о том, что, хотя трансген «DREF» спасает делецию *ban<sup>Δ1</sup>*, он не содержит всех регуляторных элементов, необходимых для полноценной экспрессии *bantam*.

Принципиальная способность мутантного трансгена в линии «DREF» «спасать» делецию *ban<sup>Δ1</sup>* косвенно подтверждает то, что внесенные мутации не разрушили сайт связывания белка BEAF-32. Ранее нами было показано, что разрушение сайт связывания белка BEAF-32 в регуляторной области *bantam* приводит к гибели на стадии поздней куколки (Schwartz et al., 2019).

Интересно, что в трансгенной линии «DREF» жизнеспособность взрослых мух, гомозиготных по *ban<sup>Δ1</sup>*, зависела от пола. Доля самцов, гомозиготных по *ban<sup>Δ1</sup>*, составляла всего 30 % от всех взрослых мух, что достоверно ниже, чем в линии «4.7» и в контроле ( $p < 0.01$ ). Это может объясняться тем, что разрушение сайта связывания DREF в регуляторной области *bantam* в большей степени влияет на жизнеспособность самцов, чем самок. Другим объяснением может служить разный уровень активности трансгена в X-хромосоме, связанный с дозовой компенсацией. Несмотря на то что самцы линии «DREF», гомозиготные по *ban<sup>Δ1</sup>*, были менее жизнеспособными, чем самки, у них не было проблем с фертильностью.

#### Нарушение сайта связывания DREF в промоторной области *bantam* существенно снижает фертильность самок

Мы исследовали фертильность самок трансгенных линий, оценивая усредненное количество отложенных яиц на одну самку (см. Материалы и методы). В линии «4.7» фертильность самок, гомозиготных по *ban<sup>Δ1</sup>*, была достоверно снижена по сравнению с самками контрольной линии



**Рис. 5.** Фертильность самок трансгенных линий мух.

Усредненное количество яиц на одну самку из контрольной линии «уw» и трансгенных линий «4.7» и «DREF», гомозиготных по трансгенам и по делеции *ban<sup>Δ1</sup>*. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

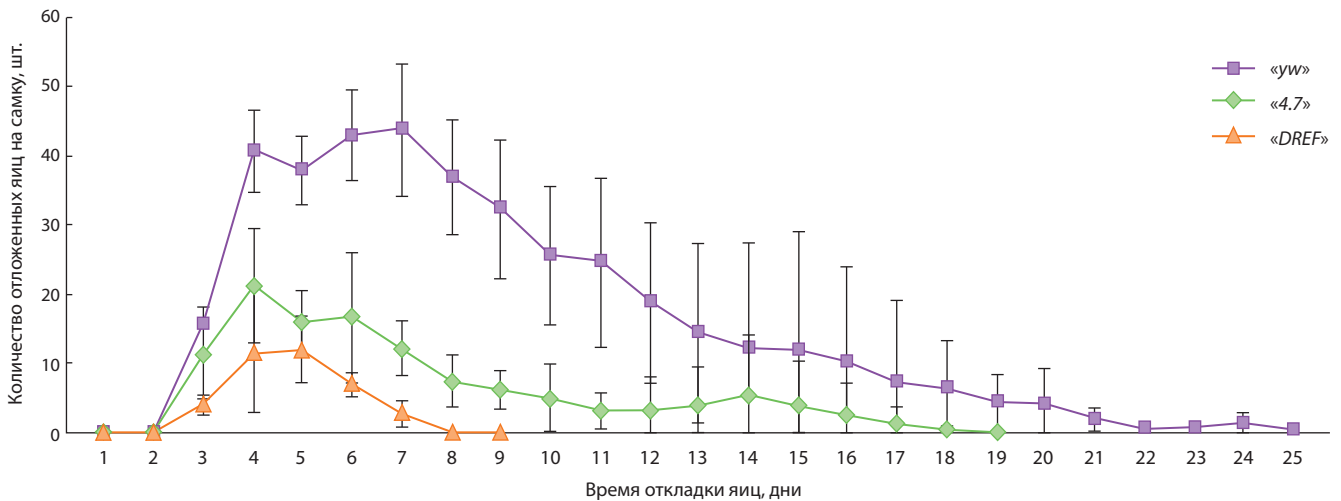
«уw» и составляла 32.7 % от фертильности контрольных самок «уw», принятой за 100 % (рис. 5). Фертильность самок, гомозиготных по *ban<sup>Δ1</sup>*, в линии «DREF» составляла лишь 10.5 %. Эти данные указывают на то, что фрагмент 4.7 содержит не все регуляторные элементы, необходимые для нормального прохождения оогенеза, а мутация сайта связывания в линии «DREF» еще более существенно нарушает этот процесс.

Однако нужно учитывать, что продолжительность жизни самок в трансгенных линиях была значительно снижена по сравнению с контрольными самками линии «уw» ( $p < 0.05$ ). Так, в линии «уw» 50 % самок погибали в среднем на 22-й день эксперимента, в линии «4.7» – на 16-й день, а в линии «DREF» – на 10-й день.

В то же время сокращение продолжительности жизни не являлось единственным объяснением снижения количества яиц, которые откладывали самки трансгенных линий. Анализ динамики откладки яиц показал, что самки трансгенных линий не только откладывают меньше яиц в каждый день эксперимента, чем самки контрольной линии «уw» ( $p < 0.001$ ), но и гораздо раньше заканчивают откладывать яйца (рис. 6). Репродуктивный период у самок линии «4.7» длился в среднем 16.3 дня ( $p < 0.01$ ), а у самок «DREF» — 8.3 дня ( $p < 0.001$ ), в то время как репродуктивный период у контрольных самок «уw» составлял 24.7 дня.

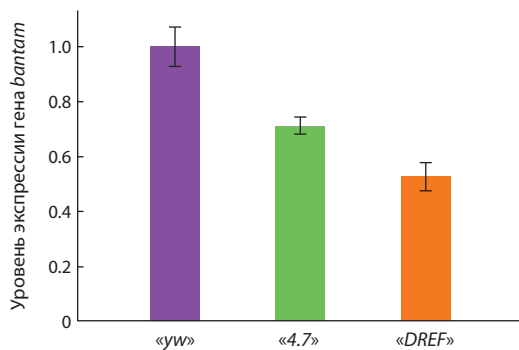
#### Нарушение сайта связывания DREF снижает экспрессию микроРНК *bantam* в яичниках взрослых мух

Раннее завершение откладки яиц в трансгенных линиях сходно с ситуацией, описанной по инактивации микроРНК *bantam* в стволовых клетках зародышевого пути в яичниках взрослых мух (Shcherbata et al., 2007). По данным авторов, у таких самок около 14 % стволовых клеток зародышевого пути уходило из своей ниши за день. Это может приводить как к общему снижению фертильности, так и к сокращению репродуктивного периода.



**Рис. 6.** Временная динамика фертильности самок.

Усредненное количество откладываемых яиц в день на одну самку в контрольной линии «yw» и в трансгенных линиях «4.7» и «DREF», гомозиготных по трансгенам и по делеции *bant*<sup>Δ1</sup>.



**Рис. 7.** Экспрессия зрелой микроРНК *bantam* в яичниках трансгенных самок.

Уровни представленности зрелой микроРНК *bantam* в трансгенных линиях «4.7» и «DREF», гомозиготных по делеции *bant*<sup>Δ1</sup>. Экспрессия *bantam* в контрольной линии «yw» условно принята за единицу. Уровни экспрессии *bantam* нормализованы относительно уровня экспрессии референсного гена мРНК *U6*.

Мы решили проверить, действительно ли связывание DREF с регуляторной областью *bantam* влияет на уровень экспрессии зрелой микроРНК. С помощью ПЦР в реальном времени мы показали, что экспрессия микроРНК *bantam* в яичниках у самок трансгенных линий «4.7» и «DREF» ниже, чем у самок контрольной линии «yw» (рис. 7).

Полученные результаты согласуются с тем, что в обеих трансгенных линиях фертильность самок снижена по сравнению с контрольными самками «yw». При этом в линии «DREF» экспрессия *bantam* снижена не только по сравнению с «yw», но и по сравнению с «4.7». Это свидетельствует о том, что связывание DREF с регуляторной областью гена *bantam* играет важную роль в его экспрессии в яичниках и именно нарушение этого связывания может объяснять значительное снижение фертильности у самок линии «DREF».

## Заключение

В настоящей работе мы проверили функциональность потенциального сайта связывания транскрипционного фактора DREF, обнаруженного в регуляторной области гена *bantam*. Нарушение данного сайта связывания DREF оказывает существенное влияние на жизнеспособность мух, а также на фертильность самок. Это сопровождается значительным снижением экспрессии зрелой микроРНК *bantam* как в целых личинках, так и в яичниках взрослых мух. Как было показано ранее, DREF положительно влияет на активность каскада Hippo, тем самым опосредованно ограничивая экспрессию *bantam* (Fujiwara et al., 2012; Vo et al., 2014). Влияние связывания DREF с промоторной областью гена *bantam* на уровень его экспрессии предполагает дополнительный уровень сложности регуляции экспрессии этой микроРНК.

Снижение количества откладываемых яиц и сокращение репродуктивного периода у самок при нарушении сайта связывания DREF в регуляторной области гена *bantam* позволяют предполагать, что через *bantam* DREF также участвует в регуляции оогенеза дрозофилы.

## Список литературы / References

- Андреев О.В., Андреевкова Н.Г., Волкова Е.И., Георгиев П.Г., Гончарова А.А., Похолкова Г.В., Демаков С.А. Эктопическое привлечение белка Chromator в системе UAS>DBD(GAL4) как метод изучения инсуляторных белков в политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*. *Цитология*. 2016;58(6):493-497 [Andreenkov O.V., Andreenkova N.G., Volkova E.I., Georgiev P.G., Goncharova A.A., Pokholkova G.V., Demakov S.A. Ectopic tethering of the Chromator protein in UAS>DBD(GAL4) system as approach for studying of the insulator proteins in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Tsitologiya = Cell and Tissue Biology*. 2016;58(6):493-497 (in Russian)]
- Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A., Russell R.B., Cohen S.M. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*. 2003;113(1):25-36. DOI 10.1016/s0092-8674(03)00231-9

- Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20):e179. DOI 10.1093/nar/gni178
- Fujiwara S., Ida H., Yoshioka Y., Yoshida H., Yamaguchi M. The warts gene as a novel target of the *Drosophila* DRE/DREF transcription pathway. *Am. J. Cancer Res.* 2012;2(1):36-44
- Herranz H., Pérez L., Martín F.A., Milán M. A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the *Drosophila* wing. *EMBO J.* 2008;27(11):1633-1645. DOI 10.1038/emboj.2008.84
- Hipfner D.R., Weigmann K., Cohen S.M. The *bantam* gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics.* 2002;161(4):1527-1537. DOI 10.1093/genetics/161.4.1527
- Huang J., Wu S., Barrera J., Matthews K., Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell.* 2005;122(3):421-434. DOI 10.1016/j.cell.2005.06.007
- Kolesnikova T.D., Posukh O.V., Andreyeva E.N., Bebyakina D.S., Ivankin A.V., Zhimulev I.F. *Drosophila* SUUR protein associates with PCNA and binds chromatin in a cell cycle-dependent manner. *Chromosoma.* 2013;122(1-2):55-66. DOI 10.1007/s00412-012-0390-9
- Kramer M.F. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2011;95(1):15.10.1-15.10.15. DOI 10.1002/0471142727.mb1510s95
- Ku H.Y., Sun Y.H. Notch-dependent epithelial fold determines boundary formation between developmental fields in the *Drosophila* antenna. *PLoS Genet.* 2017;13(7):e1006898. DOI 10.1371/journal.pgen.1006898
- Nagata R., Akai N., Kondo S., Saito K., Ohsawa S., Igaki T. Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via *bantam* microRNA in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 2022;32(5):1064-1076.e4. DOI 10.1016/j.cub.2022.01.016
- Oh H., Irvine K.D. Yorkie: the final destination of Hippo signaling. *Trends Cell Biol.* 2010;20(7):410-417. DOI 10.1016/j.tcb.2010.04.005
- Ohler U., Liao G.C., Niemann H., Rubin G.M. Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. *Genome Biol.* 2002;3:research0087.1. DOI 10.1186/gb-2002-3-12-research0087
- Peng H.W., Slattey M., Mann R.S. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: *Homothorax* and *yorkie* regulation of the microRNA *bantam* in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev.* 2009;23(19):2307-2319. DOI 10.1101/gad.1820009
- Qian J., Zhang Z., Liang J., Ge Q., Duan X., Ma F., Li F. The full-length transcripts and promoter analysis of intergenic microRNAs in *Drosophila melanogaster*. *Genomics.* 2011;97(5):294-303. DOI 10.1016/j.ygeno.2011.02.004
- Reddy B.V.V.G., Irvine K.D. Regulation of *Drosophila* glial cell proliferation by Merlin-Hippo signaling. *Development.* 2011;138(23):5201-5212. DOI 10.1242/dev.069385
- Schwartz (Berkaeva) M.B., Pankova T.E., Demakov S.A. ADF1 and BEAF-32 chromatin proteins affect nucleosome positioning and DNA decompaction in 61C7/C8 interband region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2019;23(2):154-159. DOI 10.18699/VJ19.475
- Shcherbata H.R., Ward E.J., Fischer K.A., Yu J.Y., Reynolds S.H., Chen C.H., Xu P., Hay B.A., Ruohola-Baker H. Stage-specific differences in the requirements for germline stem cell maintenance in the *Drosophila* ovary. *Cell Stem Cell.* 2007;1(6):698-709. DOI 10.1016/j.stem.2007.11.007
- Slattey M., Voutev R., Ma L., Nègre N., White K.P., Mann R.S. Divergent transcriptional regulatory logic at the intersection of tissue growth and developmental patterning. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003753. DOI 10.1371/journal.pgen.1003753
- Vo N., Horii T., Yanai H., Yoshida H., Yamaguchi M. The Hippo pathway as a target of the *Drosophila* DRE/DREF transcriptional regulatory pathway. *Sci. Rep.* 2014;4:7196. DOI 10.1038/srep07196
- Weng R., Cohen S.M. Control of *Drosophila* Type I and Type II central brain neuroblast proliferation by *bantam* microRNA. *Development.* 2015;142(21):3713-3720. DOI 10.1242/dev.127209
- Zhang X., Aksoy E., Girke T., Raikhel A.S., Karginov F.V. Transcriptome-wide microRNA and target dynamics in the fat body during the gonadotrophic cycle of *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;114(10):E1895-E1903. DOI 10.1073/pnas.1701474114

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 19-14-00051П. Авторы выражают признательность центру коллективных исследований «Молекулярная и клеточная биология» ИМКБ СО РАН за предоставленные ресурсы при поддержке программы фундаментальных научных исследований по проекту FWGZ-2021-0014.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 07.11.2023. После доработки 29.11.2023. Принята к публикации 29.11.2023.

DOI 10.18699/vjgb-24-16

# Assessing cell lines with inducible depletion of cohesin and condensins components through analysis of metaphase chromosome morphology

A.M. Yunusova<sup>1</sup>, A.V. Smirnov<sup>1</sup>, I.E. Pristyazhnuk <sup>1</sup>, T.A. Shnaider <sup>1</sup>, E.K. Maltseva<sup>2</sup>, S.D. Afonnikova <sup>1</sup>,  
O.A. Gusev <sup>3, 4, 5</sup>, N.R. Battulin <sup>1, 2</sup> 


<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Kazan Federal University, Kazan, Russia

<sup>5</sup> Endocrinology Research Center, Moscow, Russia

 battulin@gmail.com

**Abstract.** One of the most productive strategies for finding the functions of proteins is to study the consequences of loss of protein function. For this purpose, cells or organisms with a knockout of the gene encoding the protein of interest are obtained. However, many proteins perform important functions and cells or organisms could suddenly lose fitness when the function of a protein is lost. For such proteins, the most productive strategy is to use inducible protein degradation systems. A system of auxin-dependent protein degradation is often implemented. To use this system, it is sufficient to introduce a transgene encoding a plant-derived auxin-dependent ubiquitin ligase into mammalian cells and insert a sequence encoding a degron domain into the gene of interest. A crucial aspect of development of cell lines engineered for inducible protein depletion is the selection of cell clones with efficient auxin-dependent degradation of the protein of interest. To select clones induced by depletion of the architectural chromatin proteins RAD21 (a component of the cohesin complex) and SMC2 (a component of the condensin complex), we propose to use the morphology of metaphase chromosomes as a convenient functional test. In this work, we obtained a series of clones of human HAP1 cells carrying the necessary genetic constructs for inducible depletion of RAD21 and SMC2. The degradation efficiency of the protein of interest was assessed by flow cytometry, Western blotting and metaphase chromosome morphology test. Based on our tests, we showed that the clones we established with the SMC2 degron effectively and completely lose protein function when induced by auxin. However, none of the HAP1 clones we created with the RAD21 degron showed complete loss of RAD21 function upon induction of degradation by auxin. In addition, some clones showed evidence of loss of RAD21 function even in the absence of induction. The chromosome morphology test turned out to be a convenient and informative method for clone selection. The results of this test are in good agreement with flow cytometry analysis and Western blotting data.

**Key words:** SMC proteins; degron; chromosome condensation.

**For citation:** Yunusova A.M., Smirnov A.V., Pristyazhnuk I.E., Shnaider T.A., Maltseva E.K., Afonnikova S.D., Gusev O.A., Battulin N.R. Assessing cell lines with inducible depletion of cohesin and condensins components through analysis of metaphase chromosome morphology. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):138-147. DOI 10.18699/vjgb-24-16

## Оценка клеточных линий с индуцируемой деплецией компонентов когезина и конденсинов посредством анализа морфологии метафазных хромосом

А.М. Юнусова<sup>1</sup>, А.В. Смирнов<sup>1</sup>, И.Е. Пристяжнюк <sup>1</sup>, Т.А. Шнайдер <sup>1</sup>, Е.К. Мальцева<sup>2</sup>, С.Д. Афонникова <sup>1</sup>,  
О.А. Гусев <sup>3, 4, 5</sup>, Н.Р. Баттулин <sup>1, 2</sup> 


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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Life Improvement by Future Technologies (LIFT) Center, Москва, Россия

<sup>4</sup> Казанский федеральный университет, Казань, Россия

<sup>5</sup> Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

 battulin@gmail.com

**Аннотация.** Одна из самых продуктивных стратегий поиска функций различных белков – исследование последствий потери функции белка. Часто для этого получают клетки или организмы с нокаутом гена, кодирующего белок интереса. Однако многие белки выполняют настолько важные функции, что клетка или организм резко теряют жизнеспособность при потере функции такого белка. Для этих белков наиболее продуктивной стратегией является применение систем индуцируемой деградации белка. Часто используют систему ауксин-

зависимой деградации белков. Для применения этой системы достаточно ввести в клетки млекопитающих трансген, кодирующий растительную ауксин-зависимую убиквитин лигазу, и включить в ген интереса последовательность, кодирующую дегроновый домен. Важный этап создания клеток, способных к индуцируемой деплеции белка, – отбор клеточных клонов с эффективной ауксин-зависимой деградацией белка интереса. Для отбора клонов с индуцируемой деплецией архитектурных белков хроматина RAD21 (компонент когезинового комплекса) и SMC2 (компонент конденсинового комплекса) мы предлагаем использовать морфологию метафазных хромосом как удобный функциональный тест. В данной работе мы получили серию клонов клеток человека HAP1, несущих необходимые генетические конструкции для индуцируемой деплеции RAD21 и SMC2. Эффективность деградации белка интереса была оценена с помощью проточной цитофлуориметрии, Вестерн-блоттинга и теста на морфологию метафазных хромосом. На основе проведенных тестов мы продемонстрировали, что созданные нами клоны с дегроном SMC2 эффективно и полно теряют функцию белка при индукции ауксином. При этом ни один из созданных нами клонов HAP1 с дегроном RAD21 не показал полной потери функции RAD21 при индукции деградации ауксином. Кроме того, некоторые клоны имели признаки потери функции RAD21 даже в отсутствие индукции. Использованный нами тест на морфологию хромосом оказался удобным и информативным для отбора клонов. Результаты этого теста хорошо согласуются с данными проточной цитофлуориметрии анализа и Вестерн-блоттинга.

**Ключевые слова:** SMC белки; дегрон; конденсация хромосом.

## Introduction

Chromatin architectural proteins play a crucial role in maintaining the three-dimensional structure of the genome (Kabirova et al., 2023). Among them, special attention is drawn to the cohesin and condensin complexes belonging to the SMC (structural maintenance of chromosomes) family of proteins. Cohesin has many different functions: it ensures cohesion of sister chromatids after replication (Losada et al., 1998), forms loops and TADs (topologically associating domains) via the loop extrusion mechanism (Nuebler et al., 2018), and is involved in the repair of DNA breaks (Litwin et al., 2018). Condensins, on the other hand, organize the loops of metaphase chromosomes during cell division (Gibcus et al., 2018). These functions can be considered critical for maintaining cell life; therefore, homozygous loss-of-function mutations in the genes encoding cohesin subunits are lethal for cells.

The inability to obtain dividing cells without cohesin makes it difficult to study the cohesin complex. To characterize the consequences of cohesin loss, researchers use various tricks. For example, V.C. Seitan et al. utilized a conditional knockout approach to examine the effects of cohesin loss in postmitotic thymocytes *in vivo* (Seitan et al., 2011). The absence of cell division in mature thymocytes makes them more tolerant to the severe consequences of cohesin loss, such as disruption of mitotic mechanics due to loss of chromatid cohesion. However, for use in cell cultures, conditional knockout of proteins crucial for cell division is almost inapplicable, since cells actively proliferate in culture, and DNA excision of a gene fragment using Cre recombinase in a specific cell rarely occurs. Therefore, it takes a long time (several days or weeks) for a knockout to occur in a significant part of the cells.

The study of chromatin architectural proteins has greatly advanced with the development of inducible protein degradation methods. A comprehensive overview of these technologies can be found in the article by E. de Wit and E.P. Nora (2023). Among the various systems used for degrading proteins, the auxin-dependent protein depletion system is currently the most widely employed (Phanindhar, Mishra, 2023). While this system offers great potential for solving scientific problems, its application comes with several challenges that are not adequately addressed in the existing literature.

One of these problems is the selection of clones that carry all the necessary genetic modifications and are truly capable of

inducible depletion of the protein of interest. The difficulty is that the addition of the degron tag can negatively affect protein function, which reduces cell fitness. Under such conditions, a selection advantage is given to cells that have somehow blocked the functioning of the introduced system of auxin-dependent protein degradation, for example, due to epigenetic silencing of exogenous plant ubiquitin ligase (Yunusova et al., 2021). Therefore, clone selection based on Western blotting or loss of protein function tests is of particular importance for the application of auxin degron technology.

Here, we used the involvement of cohesin and condensins in the formation of the metaphase chromosome to assess the completeness of the loss of protein function in cell clones with inducible depletion of these complexes. We showed that assessment of chromosome morphology is a convenient functional test that allows screening of clones.

## Materials and methods

**Cell culture and cell lines.** The human HAP1 cell line (a near-haploid cell line derived from the KBM-7 cell line) was purchased from Horizon Discovery. HCT116-based cell lines with auxin-inducible degron-tagged *RAD21* and *SMC2* genes were kindly provided by Dr. Masato Kanemaki. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub> in growth medium that consisted of IMDM supplemented with 10 % FBS (vol/vol), 2 mM GlutaMAX (all from Thermo Fisher Scientific, USA) and 50 U/ml penicillin/50 mg/ml streptomycin (Capricorn Scientific GmbH, Germany). After reaching 70–80 % confluency, cells were detached with 0.05 % trypsin/EDTA and replated at a 1:3 ratio into new cell culture dishes. Cells subjected to flow cytometric analysis were resuspended in PBS. Flow cytometric analysis was performed on a BD FACSAria (BD Biosciences).

**Auxin treatment.** For inducing degradation of proteins fused with miniIAA7, 500 μM Indole 3 acetic Acid (IAA, I2886, Sigma-Aldrich, USA) was added directly to the culture medium. HCT116 cell lines were treated with 1 μM 5-Ph-IAA at the appropriate time intervals.

**Plasmids and constructs.** Donor vectors with homology arms, degron tag (miniIAA7-eGFP) and selection cassette were assembled in one reaction using the Gibson Assembly (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix, NEB, USA) in the pMK290 backbone (Addgene, 72828). miniIAA7-eGFP

List of used primers and sgRNAs

Primers	Target	Sequence (5'–3')
Homology arms	<i>RAD21</i>	RAD21 HAR_F: gcgaattggagctccccgggatccactttggcctttaccctcttga RAD21 HAR_R: ttggcgctgcaccggatcctataatggaaccttggtccagg RAD21 HAL_F: acgcacggtgtgggtcggtggagctagaagcattatagctagtg RAD21 HAL_R: aacaaaagctgggtaccggatcccactgaagctgagttcaaaagtg
Homology arms	<i>SMC2</i>	SMC2 HAR_F: gcgaattggagctccccgggatcctaggagctggggctgcaaaa SMC2 HAR_R: ttggcgctgcaccggatccaacttcgacgtgtgctccttt SMC2 HAL_F: tccctgaagaggttactaactactaaaagtatttctcatcttg SMC2 HAL_R: ggaacaaaagctgggtaccggatcctcatggtgtctgtagtgta
sgRNA	<i>RAD21</i>	CCAAGGTTCCATATTATATA
sgRNA	<i>SMC2</i>	ACCACCCAAAGGAGCACATG
sgRNA	<i>AAVS1</i>	GGGGCCACTAGGGACAGGAT
Genotyping	<i>RAD21</i>	hRAD21_F: CAGCGTGCTCTTGCTAAACT hRAD21_R: AAGATTGCCAGTGTACTGATGGAA hRAD21_F1: CACAGGGAGTGATTGATAAGGGA hRAD21_R1: TGGGGGCAATTTGTAAGCAC hRAD21_F2: GCTGACACAGGAAGAACCCTA hRAD21_R2: TCAAGAGGGTGACCATTGTTGT
Genotyping	<i>SMC2</i>	hSMC2_F: CAAGCAGTCAACCACCAGGA hSMC2_R: TCACAACCACAATAATTGGACCAT hSMC2_out_F: CATGTGACACTTGATGGGGGA hSMC2_out_R: GTACGGCCATATATCAGGGGA
Genotyping	<i>eGFP</i>	GFP_R: CAGCTCGACCAGGATGGG

fragment was amplified from the vector pSH-EFIRE5-B-Scipin-miniIAA7-mEGFP (Addgene, 129719). Homology arms for *RAD21* (NCBI Entrez Gene ID: 5885) and *SMC2* (NCBI Entrez Gene ID: 10592) were PCR-amplified from human genomic DNA with Q5 polymerase (NEB, USA). For auxin receptor F-box protein overexpression AtAFB2 plasmids were used (pSH-EFIRE5-P-AtAFB2-mCherry-weak NLS vector (Addgene, 129717)). SgRNA targeting the last codon of the *RAD21* and *SMC2* genes were cloned into gRNA\_Cloning Vector (Addgene, 41824). For CRISPR/Cas9 gene targeting the human codon-optimized Cas9 expression plasmid (Addgene, 41815) was used. The list of primers and gRNA sequences is shown in Table.

**Generation of HAP1 cell lines with an auxin-inducible degron system.** Generation of degron cell lines was done essentially as previously described (Yunusova et al., 2021). Briefly, HAP1 cells were electroporated at conditions of 1200 V, 30 ms, 1 pulse, using the Neon Transfection system (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions with minor modifications. Per electroporation, 250,000 cells were resuspended in 10 µL of DPBS containing 1 µg of the plasmids with the ratio 1:1:2 (gRNA:Cas9:Donor vector for recombination, accordingly). Immediately following pulsation, cells were transferred into pre-warmed cell media without antibiotics. The next day cells were split into 10 cm dishes at 1:4 and 1:10 dilutions and placed under Hygromycin B selection (0.8 mg/ml) or puromycin selection (1 µg/ml). The medium was replaced every three days. After 10 to 14 days of selection, single-cell clones were visible, and a subset of clones was handpicked with pipette tips under microscope.

Then part of the cells were lysed in PBND lysis buffer (0.2 mg/ml proteinase K, 10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45 % (v/v) NP-40, and 0.45 % (v/v) Tween 20) or DNA extraction buffer (0.2 mg/ml proteinase K, 10 mM TrisHCl pH 8, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 0.5 % SDS) for 1 h at 55 °C followed by proteinase K inactivation for 10 min at 95 °C. The target regions were amplified by PCR with HS-Taq DNA Polymerase (Biolabmix, Russia). The parameters were as follows: 95 °C for 30 s, then 34 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C (unless otherwise stated) for 30 s, 72 °C for 1 min/kb, and a final step at 72 °C for 5 min. The amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

**Protein detection.** The cells were washed twice with PBS and scraped from the surface in the presence of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxycholate, and 0.1 % SDS) containing the protease inhibitor cocktail (1x Complete ULTRA, 1x PhosSTOP (both from Roche, Switzerland), 5 mM NaF (Sigma-Aldrich)). After that, the cells were sonicated by three 10 s pulses at 33–35 % power settings with UW 2070 (Bandelin Electronics, Germany). Lysates were centrifuged at 14,000 g for 20 min at 2 °C, frozen, and stored at –80 °C. The protein concentrations in cell lysates were quantified using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Equal amounts (20 µg) of total protein were separated on 10 % SDS-PAGE and then transferred onto the Immun-Blot PVDF membrane (Bio-Rad, USA). After blocking in 5 % milk/TBST for 2 h, the membrane was incubated with primary antibodies against RAD21 and SMC2 (#12673/#8720, Cell Signaling Technology, USA) at 4 °C overnight. On the following day, membranes were incubated with horseradish peroxidase-con-



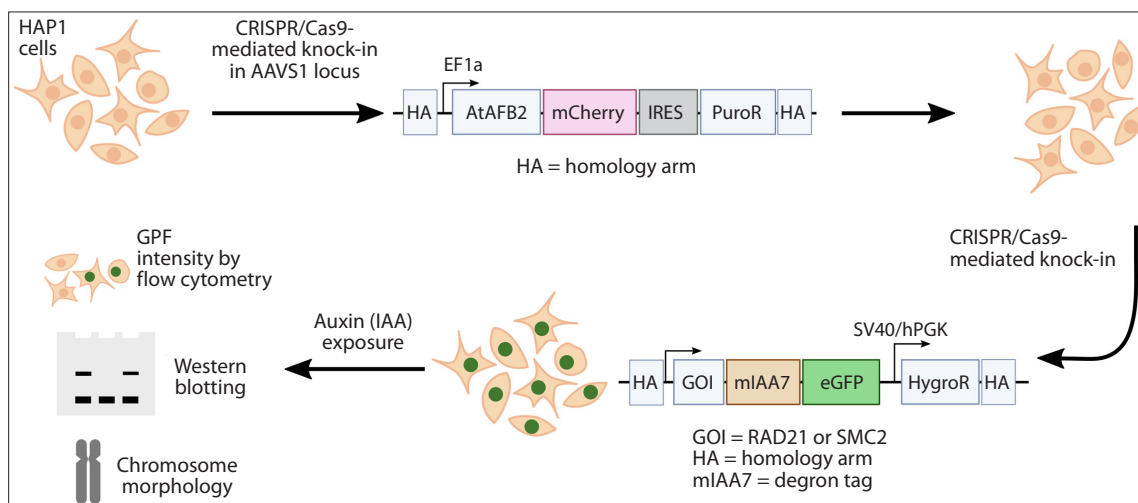


Fig. 1. Overview of experimental design.

jugated secondary antibodies (#7074, Cell Signaling Technology) for 2 h at room temperature. Detection was performed with Clarity™ (Bio-RAD) and detected iBright™ FL1500 (Thermo Fisher Scientific).

**Chromosome spread.** Chromosome preparations were made according to the previously described protocol with minor modifications (Kruglova et al., 2008). Briefly, human cell cultures were exposed to 50 ng/ml Colcemid (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 3 h followed by auxin treatment for 2 hours. Afterwards, cells were detached with 0.05 % Trypsin-EDTA solution (Capricorn Scientific GmbH, Germany) and resuspended in hypotonic solution (0.38 M KCl) for 15 min at 37 °C. Then, cells were fixed with Carnoy fixative (3:1 methanol: glacial acetic acid), dropped onto cold wet glass slides, and stained with 1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich). The samples were analyzed using a Carl Zeiss Axioscop 2 fluorescence microscope at the Center for Collective Use of Microscopy of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS (Novosibirsk, Russia). Image processing was carried out using ISIS software (MetaSystems GmbH, Germany). At least 50 metaphase plates were analyzed for each experimental group. Three categories of metaphase plates were distinguished: metaphases with separated chromatids, metaphases with non-separated chromatids, and an intermediate category of metaphase plates in which the chromatids either lay parallel, in close proximity, but were not in contact, or some of the chromosomes were with non-separated chromatids.

## Results

### Introduction of modifications into the genome of cells

In this study, we implemented a clone selection system based on chromosome morphology to obtain HAP1 cells capable of inducible depletion of RAD21 (a component of the cohesin complex) and SMC2 (a component of the condensin I and II complexes).

To generate these cells, we employed the methodology described in the study by (Yunusova et al., 2021). The process of obtaining cell lines with auxin-dependent degradation of the

protein of interest involved two rounds of genome modification, as illustrated in Fig. 1. Firstly, we performed targeted integration of an exogenous construct that encodes a degron fused with the *eGFP* gene and a selectable marker in front of the stop codon of the gene of interest. Secondly, we introduced the *AtAFB2* gene, a component of plant ubiquitin ligase and an auxin receptor, into the cell genome through either random or targeted integration. In fact, modification of the gene of interest and integration of ubiquitin ligase *AtAFB2* can be carried out in the reverse order, since effective operation of the system occurs only in cells that have both modifications.

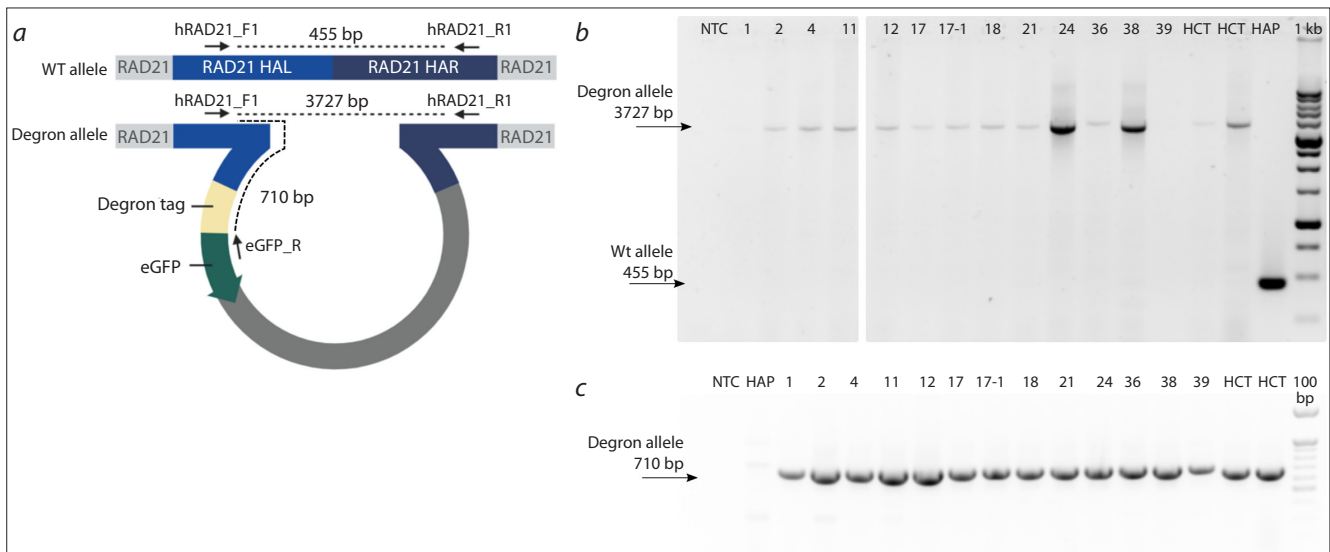
In the presence of auxin, the *AtAFB2* protein interacts with the degron domain, leading to polyubiquitination and subsequent degradation of the chimeric protein in the proteasome. This system allows for the controlled depletion of the protein of interest upon auxin induction.

### PCR genotyping of cell clones with a degron

It is crucial to modify all alleles of the gene of interest to prevent residual wild-type alleles from maintaining protein function. For this study, we selected the human cell line HAP1 as the experimental cell line. The near haploid karyotype of HAP1 cells simplifies the process of obtaining modified sub-clones, as modification of a single allele of the gene of interest is sufficient. However, the presence of pseudogenes poses a significant challenge in clone selection, as they can complicate the identification of clones with the desired modification.

One such pseudogene, *RAD21P1*, located on the X chromosome, shares a high degree of homology (over 93 %) with the C-terminal fragment of the *RAD21* gene (Supplementary Material 1)<sup>1</sup>. It is in this region that we inserted an exogenous construct containing a degron tag, *eGFP*, and a selectable marker (see Fig. 1). Therefore, the selection of appropriate primers for PCR genotyping is a critical step in the workflow. We carefully selected and tested several pairs of primers, as well as their combinations (see the Table), using DNA isolated from the HCT116 *RAD21\_mAC* cell line as a positive control sample. These cells were obtained and intensively charac-

<sup>1</sup> Supplementary Materials 1 and 2 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx7.pdf>



**Fig. 2.** PCR genotyping of knockin in the *RAD21* gene.

*a* – scheme of primer annealing for the wild-type allele and the knockin allele; *b* – results of genotyping with primers hRAD21\_F1-hRAD21\_R1. It can be seen that none of the 13 cell clones tested contain the wild-type allele; *c* – genotyping results with primers hRAD21\_F1-GFP\_R. It can be seen that all 13 cell clones tested have the knockin allele. 1, 2, 4, 11, 12, 17, 17-1, 18, 21, 24, 36-1, 38, 39 – numbers of the tested clones; HCT – HCT116 *RAD21*\_mAC; HAP – HAP1 without modifications; NTC – no template control; 1 kb and 100 bp ladders.

terized by another group (Yesbolatova et al., 2020), but since the design of the modification of the endogenous *RAD21* gene was similar to what we used, these cells can be used as a reference for interpreting our results. Intact wild-type human DNA and DNA from one of the clones with targeted modification of the *RAD21* locus, obtained in our laboratory, were also used as test samples. Indeed, some primer combinations amplified a nonspecific PCR product from the pseudogene even in the absence of a wild-type allele. Therefore, to genotype the selected clones, we used the hRAD21\_F1/hRAD21\_R1 primer combination (Fig. 2, *a*), which amplified only a specific product. PCR genotyping of clones with modification of the *SMC2* gene did not reveal amplification of nonspecific fragments.

At the first stage, the *AtAFB2* gene was integrated into the *AAVS1* safe-harbor locus, and puromycin-resistant cells were selected. These cells were then used for the second round of modification – insertion – of a construct with a degron at the end of the *RAD21* gene. After selection on hygromycin, we selected more than a hundred colonies and performed PCR genotyping with primers hRAD21\_F1/hRAD21\_R1. Using the selected primers (see Fig. 2, *a*), we genotyped cell clones that had successfully passed selection for resistance to the antibiotic hygromycin. Figure 2, *b*, *c* shows the results of genotyping of 13 selected cell clones carrying the degron tag modification in the *RAD21* gene.

The same genotyping strategy was used to establish HAP1 cell lines with the *SMC2* degron (Supplementary Material 2).

#### Assessment of the degree of protein depletion upon induction of degradation by auxin

The degree of degradation of the chimeric protein RAD21\_miniIAA7\_eGFP was assessed by the number of GFP-positive cells on a flow cytometer after 2 hours of exposure to auxin. Most of the clones demonstrated low efficiency of degradation of the target protein (Fig. 3, *a*). We assume that this is due to

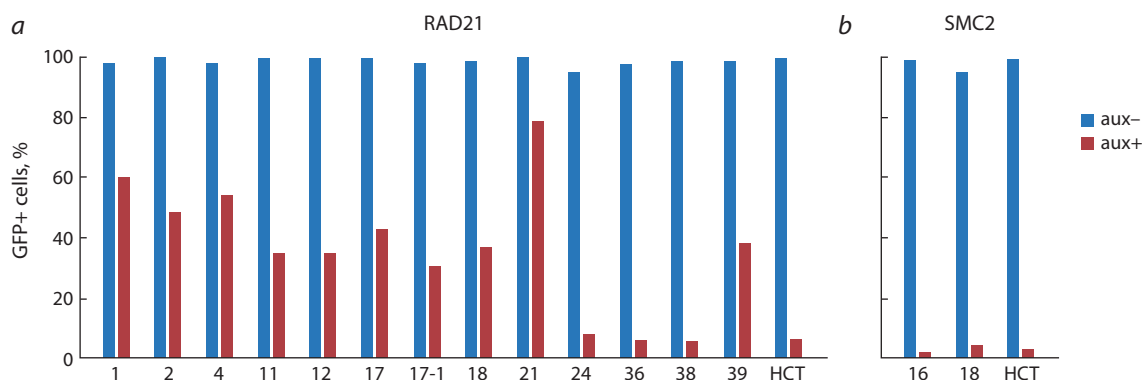
low expression in cells of the auxin receptor *AtAFB2*, which is integrated into the *AAVS1* locus. Since we used *AtAFB2* fused to the fluorescent protein mCherry (see Fig. 1), its expression level can be detected using a flow cytometer. Indeed, the level of mCherry fluorescence was higher in clones with more efficient degradation of RAD21\_miniIAA7\_eGFP (data not shown). We believe that integration of *AtAFB2* transgene into a random location in the genome rather than into the *AAVS1* locus is a better strategy, since in this case it is possible to select for clones in which the insertion provides strong, persistent expression of *AtAFB2*. This might happen due to the selection of clones with a high copy number of the insertion or with a successful epigenetic landscape at the site of integration. Based on this analysis, we continued to functionally characterize the depletion efficiency of only those clones that showed a degree of degradation comparable to the HCT116 *RAD21*\_mAC cell line (Yesbolatova et al., 2020).

A similar analysis was carried out for subclones with the chimeric protein *SMC2*\_miniIAA7\_eGFP. In this case, both subclones tested had a degree of chimeric protein degradation comparable to the control sample (*SMC2*\_mAID\_Clover) (see Fig. 3, *b*). *SMC2*\_mAID\_Clover cells were previously obtained using a similar strategy by tagging the *SMC2* gene in (Yesbolatova et al., 2020).

Selected cell clones were assessed for loss of protein function by analyzing metaphase chromosome morphology.

#### Assessment of loss of function of cohesin and condensins based on chromosome morphology analysis

Since the architectural proteins of chromatin – the cohesin and condensin complexes – have a well known function in the formation of mitotic chromosomes, changes in chromosome morphology can serve as a convenient criterion for assessing the function of these proteins. Therefore, we assessed the proportion of cells with abnormal chromosome morphology in



**Fig. 3.** Evaluation of degradation efficiency of a protein of interest using flow cytometry.

*a* – the proportion of cells that have not degraded (GFP+) fusion protein RAD21\_minilAA7\_eGFP. 1, 2, 4, 11, 12, 17, 17-1, 18, 21, 24, 36, 38, 39 – numbers of tested clones; HCT – positive control, cells with efficient degradation of the protein of interest HCT116 RAD21\_mAC; *b* – the proportion of cells that have not degraded (GFP+) fusion protein SMC2\_minilAA7\_eGFP. 16, 18 – numbers of tested clones; HCT – positive control, cells with efficient degradation of the protein of interest HCT116 SMC2\_mAC.

clones before and after depletion of the target protein induced by auxin exposure. Cohesin ensures cohesion of sister chromatids; therefore, in clones with RAD21\_minilAA7\_eGFP, we counted the number of metaphase plates with unconnected chromatids (Fig. 4). Condensins are responsible for the compaction of metaphase chromosomes and the formation of their rod-shaped morphology; therefore, for clones with SMC2\_minilAA7\_eGFP, we counted the number of metaphase plates with non-compacted chromosomes (Fig. 5).

It is clearly seen from Fig. 4 that in unmodified cells, cohesion of sister chromatids is observed in the vast majority of metaphase plates (see Fig. 4, *a*). We use HCT116 RAD21\_mAC cells as a positive control, since these cells demonstrate effective depletion of RAD21 (Yesbolatova et al., 2020). For these cells, without auxin exposure, all plates have chromosomes with sister chromatid cohesion. And when depletion of RAD21 is induced by auxin, no plates with normal chromosome morphology remain, and the vast majority of plates contain separate chromatids (see Fig. 4, *b*). This shows that the chromosome morphology test allows us to assess cohesin function both before and after induction of RAD21 depletion by auxin. None of the three HAP1 cell clones (see Fig. 4, *c–e*) showed loss of cohesin function comparable to the positive control. In clones 24 and 38, there is no loss of chromatid cohesion in most laminae. And in clone 36, even in the absence of auxin induction, 25 percent of the plates did not have chromatid cohesion, that is, cohesin function was impaired without induction.

In the case of the SMC2 degren, both selected clones showed the same complete loss of condensin function after induction as the control and no evidence of protein function deficiency without auxin induction (see Fig 5).

### Evaluation of cohesin and condensins depletion based on Western blotting

Assessing the efficiency of degradation of a protein of interest based on flow cytometry is indirect, since in this way only the protein fused with degren and fluorescent domains will be included in the analysis. It is possible to propose several scenarios in which, despite the degradation of the fusion protein,

functional molecules of the protein of interest remain in the cells (we discuss these scenarios in Discussion). Therefore, it is important to complement the analysis of the morphology of metaphase chromosomes with the Western blotting methods.

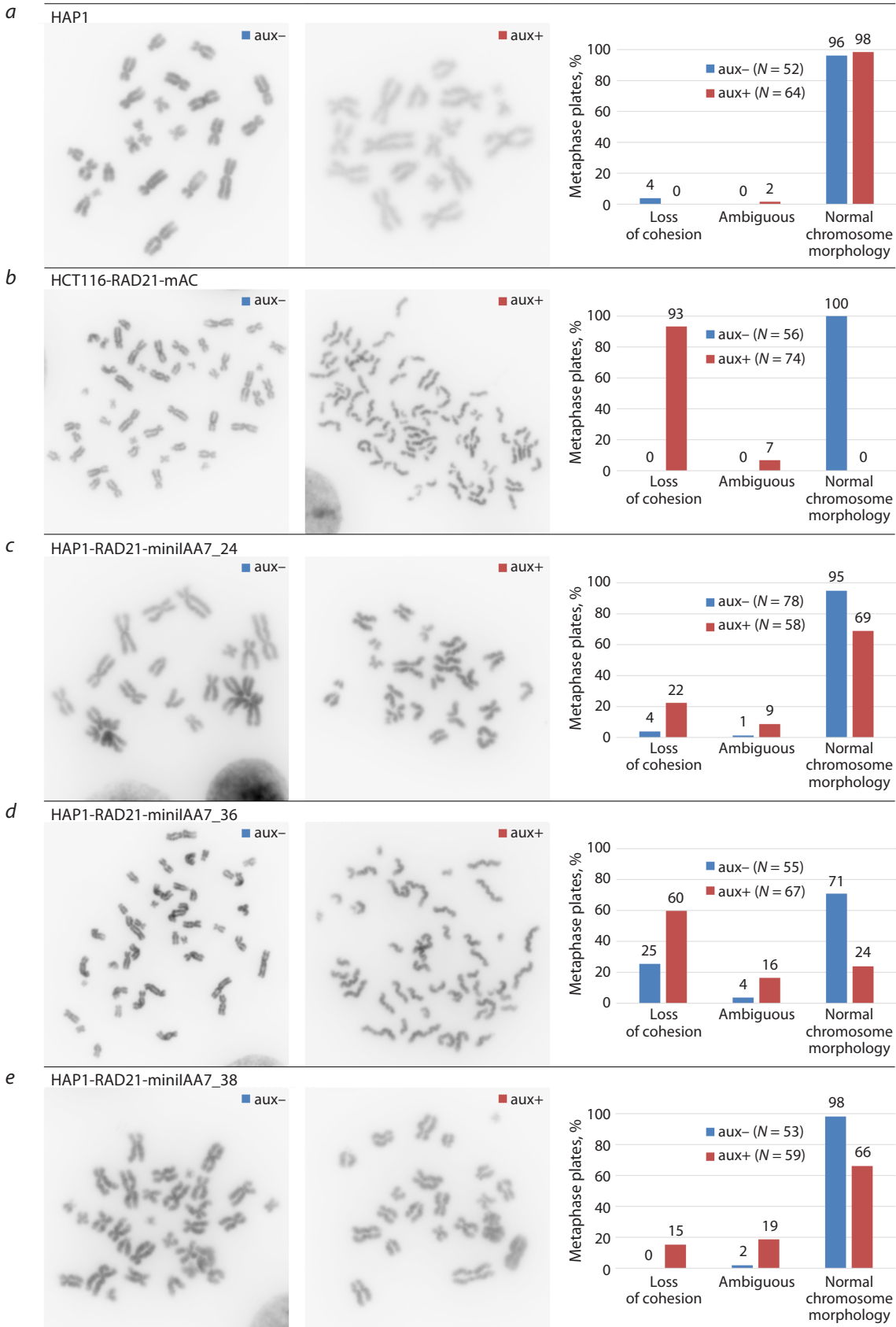
Figure 6, *a* shows the results of Western blotting of the RAD21 protein. It is clearly seen that the amount of RAD21 protein in unmodified cells is greater than in modified cells. In positive control cells HCT116 RAD21\_mAC after induction with auxin, RAD21 is not detected at all. In clones 24, 36, 38, two forms of the protein are detected, a heavier one corresponding to the fusion protein with GFP and a lighter one corresponding to the wild-type protein. After exposure to auxin, fusion protein decreases (clones 24, 38) or completely disappears (clone 36). However, in clones 24, 36, 38, the wild-type form of the RAD21 protein does not decrease after auxin induction.

Western blotting of the SMC2 protein carried out for clone 16 also showed that knockin of the degren domain into the SMC2 gene leads to a decrease in the amount of protein compared to unmodified cells. After induction of protein degradation by auxin, SMC2 is not detected (see Fig. 6, *b*).

### Discussion

Protein function studies are often based on the loss of function strategy. However, for many proteins, loss of function will have a dramatic impact on viability. The use of inducible depletion systems makes it possible to apply a loss of function approach to such proteins. However, like any complex technology, inducible protein depletion has its own limitations. In this article, we described an approach based on the use of chromosome morphology as a convenient functional test for selecting clones with inducible depletion of the architectural chromatin proteins cohesin and condensins.

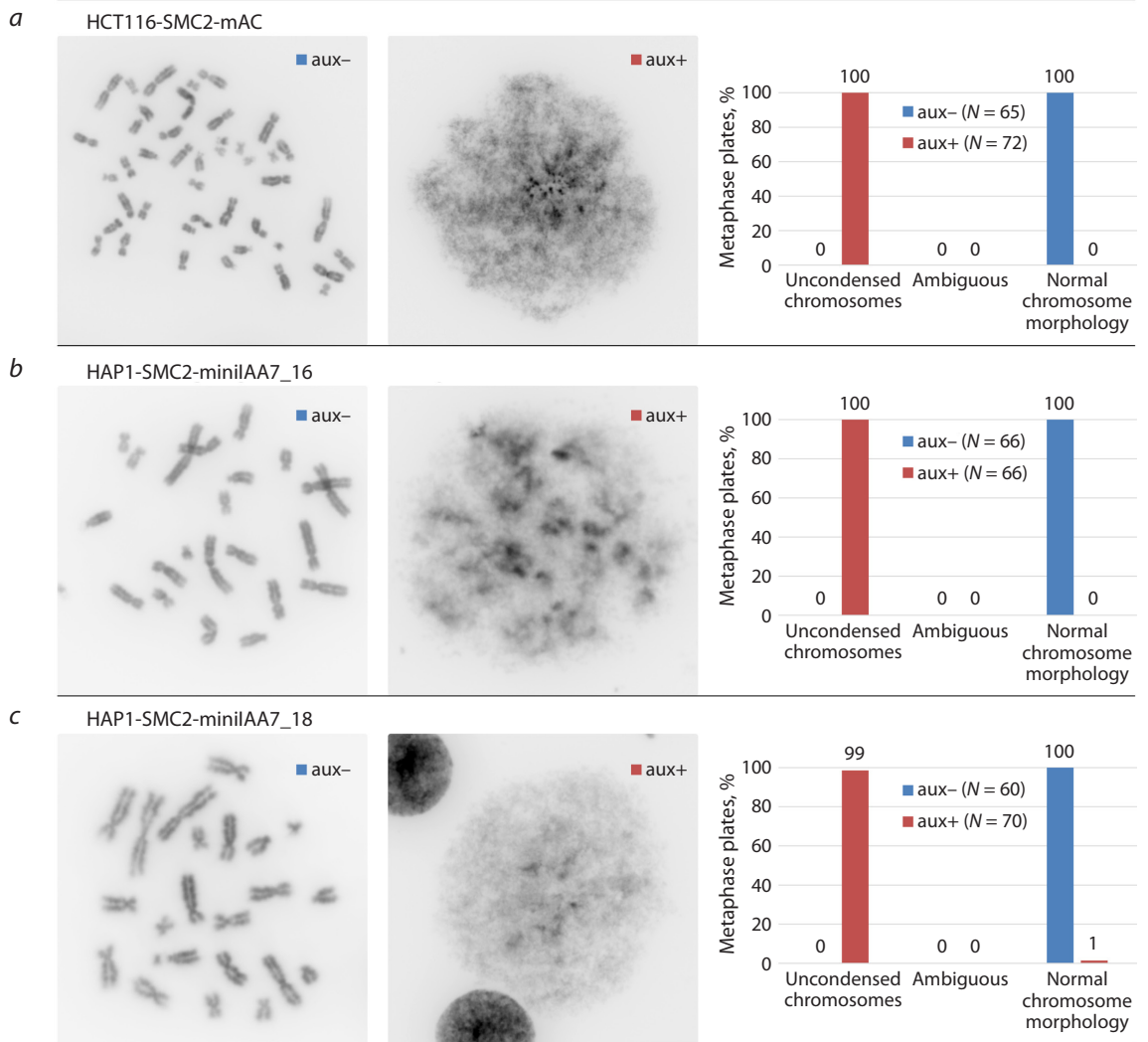
The difficulty of obtaining cell clones capable of inducible protein depletion appears to depend greatly on the properties of the particular protein of interest. In our work, clones capable of effective loss of SMC2 function were obtained easily, without any trouble at the stage of genotyping the clones or at subsequent stages of assessing the completeness of degradation. At the same time, the attempt to obtain a clone capable of



**Fig. 4.** Assessment of changes in chromosome morphology after induction of RAD21 depletion.

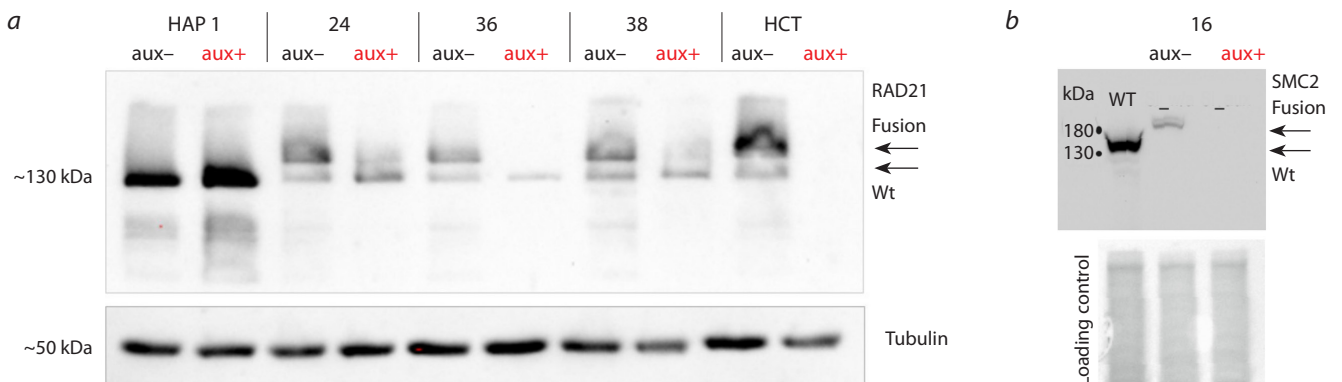
For each cell clone, one metaphase plate is presented, illustrating the most common chromosome morphology without induction (aux-) and after induction (aux+). Also presented is a diagram summarizing the proportion of metaphase plates with loss of chromatid cohesion, normal chromosome morphology and ambiguous. For each condition, the number of analyzed metaphase plates is indicated – N.

a – HAP1 cells without modifications – negative control; b – HCT116 RAD21\_mAC, cells with effective RAD21 depletion – positive control; c–e – cell clones tested.



**Fig. 5.** Assessment of changes in chromosome morphology after induction of SMC2 depletion.

For each cell clone, one metaphase plate is presented, illustrating the most common chromosome morphology without induction (aux-) and after induction (aux+). Also presented is a diagram summarizing the proportion of metaphase plates with uncondensed chromosomes, normal chromosome morphology and ambiguous. For each condition, the number of analyzed metaphase plates is indicated – N. a – HCT116-SMC2-mAC; cells with effective SMC2 depletion – positive control; b, c – cell clones tested.



**Fig. 6.** Identification of proteins of interest using Western blotting.

a – Western blotting of RAD21 in cells without modification (HAP), in cells with effective depletion of RAD21 (HCT) and three cell clones tested (24, 36, 38) without induction (aux-) and after induction of depletion (aux+). For RAD21, the sizes of the fusion protein and the wild-type protein are indicated. Tubulin detection was used as an internal control; b – Western blotting of SMC2 in cells without modification (wt), and cell clone tested (16) without induction (aux-) and after induction of depletion (aux+). Total protein staining (loading control).

efficient degradation of the RAD21 protein was not successful: the clones we obtained suffer from loss of protein function without auxin induction and incomplete protein degradation after induction. This is clearly visible when comparing these parameters with HCT116 RAD21\_mAC cells, which we chose as a positive control (these cells are capable of effective auxin-induced depletion of RAD21) (Yesbolatova et al., 2020).

We believe that in the case of RAD21, the main problem is the decrease in the amount of RAD21 in cells even in the absence of auxin induction (“basal degradation”). This decrease may have two independent causes: 1) instability of the transcript/protein due to fusion with the degron tag and GFP. Theoretically, introduction of a genetic construct could reduce the knockin transcription efficiency of *RAD21*; cause a decrease in transcript stability; reduce the efficiency of translation of the knockin transcript; cause a decrease in the stability of the fusion protein (Yu et al., 2015); 2) background ubiquitin ligase activity in the absence of auxin. Such activity will lead to polyubiquitinylation and degradation of the protein carrying the degron tag (Li et al., 2019). Apparently, both occur in our case. To address the first cause, one can do little except make a fusion not with the C-terminus, but with the N-terminus of the peptide. But the second cause depends entirely on the properties of the peptide used and the auxin-dependent ubiquitin ligase. We used the ubiquitin ligase AtAFB2, which is thought to have lower basal activity compared to OsTIR1 (Li et al., 2019). However, a system with even lower activity has recently emerged. It was created based on OsTIR1 by replacing the ligand with a synthetic auxin analogue 5-Ph-IAA and rationally designing the active site of the enzyme (Yesbolatova et al., 2020). Our positive control cells are designed with just such a system. The Western blot in Fig. 6 clearly shows that the amount of the heavy fusion form of the protein in the positive control is significantly greater than in clones 24, 36, 38 that we created based on AtAFB2. This may be explained by the higher basal activity of AtAFB2. In addition, the use of alternative depletion systems, such as dTAG, may be a productive strategy for achieving degradation of architectural chromatin proteins (Nabet et al., 2018).

As we noted above, the key stage in obtaining cells capable of inducible depletion is the complete modification of all alleles of the gene of interest. All cell clones used in this work did not have wild-type alleles when analyzed by PCR (see Fig. 2). However, Western blotting reveals a band corresponding in size to unmodified RAD21. Since there are no wild-type alleles during genotyping, this eliminates the possibility of contamination of samples with unmodified cells. Theoretically, repair of the break introduced by Cas9 can lead to the loss of the primer annealing site (we previously reported this issue (Korablev et al., 2020)); such damaged alleles will not be detected by PCR, however, they can produce a functional transcript. But for haploid HAP1 cells, this explanation does not apply since each clone contains exactly one modified *RAD21* allele. Alternative explanations suggest that wild-type *RAD21* appears in cells containing the correct modification of *RAD21*. For example, a transcript from a modified allele can be spliced and, as a result, a fusion peptide is not formed. During translation, a peptide bond may also not be formed, for example, like in 2A viral peptides. One can speculate

that something similar may form between the fusion parts of the peptide. However, both of these explanations in our case remain at the level of speculation.

For some genes, pseudogenes could be the source of a functional peptide (Zhang et al., 2023); however, in the case of *RAD21*, the pseudogene is highly mutated and contains many stop codons and therefore does not have a functional open reading frame.

Of course, the most direct way to assess depletion of a protein of interest is Western blotting, but this method is highly dependent on the quality and specificity of the antibodies. It is known that the specificity of many antibodies is questioned (Baker, 2015).

## Conclusion

Therefore, for many proteins, the use of Western blotting can be problematic. Therefore, a convenient functional test is an excellent way to characterize cells capable of induced depletion of a protein of interest. The chromosome morphology test used in this work proved to be very informative.

## References

- Baker M. Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature*. 2015;521(7552):274-276. DOI 10.1038/521274a
- de Wit E., Nora E.P. New insights into genome folding by loop extrusion from inducible degron technologies. *Nat. Rev. Genet.* 2023; 24(2):73-85. DOI 10.1038/s41576-022-00530-4
- Gibcus J.H., Samejima K., Goloborodko A., Samejima I., Naumova N., Nuebler J., Kanemaki M.T., Xie L., Paulson J.R., Earnshaw W.C., Mirny L.A., Dekker J. A pathway for mitotic chromosome formation. *Science*. 2018;359(6376):eaao6135. DOI 10.1126/science.aao6135
- Kabirova E., Nurislamov A., Shadskiy A., Smirnov A., Popov A., Salnikov P., Battulin N., Fishman V. Function and evolution of the loop extrusion machinery in animals. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(5):5017. DOI 10.3390/ijms24055017
- Korablev A., Lukyanchikova V., Serova I., Battulin N. On-target CRISPR/Cas9 activity can cause undesigned large deletion in mouse zygotes. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(10):3604. DOI 10.3390/ijms21103604
- Kruglova A.A., Kizilova E.A., Zhelezova A.I., Gridina M.M., Golubitsa A.N., Serov O.L. Embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells with near-tetraploid karyotype provide high yield of chimeras. *Cell Tissue Res*. 2008;334(3):371-380. DOI 10.1007/s00441-008-0702-9
- Li S., Prasanna X., Salo V.T., Vattulainen I., Ikonen E. An efficient auxin-inducible degron system with low basal degradation in human cells. *Nat. Methods*. 2019;16(9):866-869. DOI 10.1038/s41592-019-0512-x
- Litwin I., Pilarczyk E., Wysocki R. The emerging role of cohesin in the DNA damage response. *Genes (Basel)*. 2018;9(12):581. DOI 10.3390/genes9120581
- Losada A., Hirano M., Hirano T. Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev*. 1998;12(13):1986-1997. DOI 10.1101/gad.12.13.1986
- Nabet B., Roberts J.M., Buckley D.L., Paulk J., Dastjerdi S., Yang A., Leggett A.L., Erb M.A., Lawlor M.A., Souza A., Scott T.G., Vittori S., Perry J.A., Qi J., Winter G.E., Wong K.-K., Gray N.S., Bradner J.E. The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* 2018;14:431-441. DOI 10.1038/s41589-018-0021-8
- Nuebler J., Fudenberg G., Imakaev M., Abdennur N., Mirny L.A. Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115(29):E6697-E6706. DOI 10.1073/pnas.1717730115

- Phanindhar K., Mishra R.K. Auxin-inducible degron system: an efficient protein degradation tool to study protein function. *Biotechniques*. 2023;74(4):186-198. DOI 10.2144/btn-2022-0108
- Seitan V.C., Hao B., Tachibana-Konwalski K., Lavagnoli T., Mira-Bontenbal H., Brown K.E., Teng G., Carroll T., Terry A., Horan K., Marks H., Adams D.J., Schatz D.G., Aragon L., Fisher A.G., Krangel M.S., Nasmyth K., Merckenschlager M. A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature*. 2011;476(7361):467-471. DOI 10.1038/nature10312
- Yesbolatova A., Saito Y., Kitamoto N., Makino-Itou H., Ajima R., Nakano R., Nakaoka H., Fukui K., Gamo K., Tominari Y., Takeuchi H., Saga Y., Hayashi K., Kanemaki M.T. The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice. *Nat. Commun.* 2020;11(1):5701. DOI 10.1038/s41467-020-19532-z
- Yu K., Liu C., Kim B.-G., Lee D.-Y. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnol. Adv.* 2015;33(1):155-164. DOI 10.1016/j.biotechadv.2014.11.005
- Yunusova A., Smirnov A., Shnaider T., Lukyanchikova V., Afonnikova S., Battulin N. Evaluation of the OsTIR1 and AtAFB2 AID systems for genome architectural protein degradation in mammalian cells. *Front. Mol. Biosci.* 2021;8:757394. DOI 10.3389/fmolb.2021.757394
- Zhang M., Zhao Y., Liu X., Ruan X., Wang P., Liu L., Wang D., Dong W., Yang C., Xue Y. Pseudogene MAPK6P4-encoded functional peptide promotes glioblastoma vasculogenic mimicry development. *Commun. Biol.* 2023;6(1):1059. DOI 10.1038/s42003-023-05438-1

---

**Funding.** This work was supported by Russian Science Foundation grant No. 23-74-00055. Cell culture was performed at the Collective Center of ICG SB RAS "Collection of Pluripotent Human and Mammalian Cell Cultures for Biological and Biomedical Research", project number FWNR-2022=0019 (<https://ckp.icgen.ru/cells/>; [http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_cells/collections/ICG\\_SB\\_RAS\\_CELL](http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL)). Cryoarchiving and primary analysis of control cell lines HCT-116 RAD21-mAC and SMC2-mAC was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, grant 075-15-2021-1344.

**Acknowledgements.** We thank Masato Kanemaki for sharing the HCT-116 RAD21-mAC and SMC2-mAC cell lines.


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

Received November 14, 2023. Revised November 29, 2023. Accepted December 4, 2023.

DOI 10.18699/vjgb-24-17

## Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Среднем и Верхнем Поволжье по ISSR-маркерам

О.В. Шейкина , Е.М. Романов 

Поволжский государственный технологический университет, Йошкар-Ола, Россия  
 shejkinaov@volgatech.net

**Аннотация.** Снижение уровня изменчивости селекционных популяций лесных древесных видов, представляющих собой совокупность отобранных плюсовых деревьев, считается одной из ключевых проблем в лесной селекции. Она связана с опасностью потери генетического разнообразия будущих искусственно созданных лесов, а также с риском возникновения инбредной депрессии семенного потомства плюсовых деревьев. Эффективным инструментом для изучения изменчивости, определения особенностей генетической структуры и степени дифференциации растений являются ДНК-маркеры. Наше исследование направлено на оценку уровня генетического разнообразия и степени дифференциации плюсовых деревьев разного географического происхождения с применением ISSR-маркеров. С использованием шести ISSR-праймеров изучено 270 плюсовых деревьев из Пензенской области, Чувашской Республики, Республик Татарстан и Марий Эл. Сравнимые выборки характеризовались разным уровнем генетического разнообразия. Всего для шести ISSR-праймеров обнаружено 215 ПЦР-фрагментов, при этом у разных выборок число амплифицированных фрагментов варьировало от 186 до 201. Основные показатели генетической изменчивости находились в следующих пределах: доля полиморфных локусов 95.7–96.9 %, число аллелей на локус 1.96–1.97, число эффективных аллелей 1.31–1.48, индекс Шеннона 0.291–0.429, ожидаемая гетерозиготность 0.205–0.298. По результатам анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) установлено, что 82 % вариативности ISSR-локусов обнаруживается внутри выборок плюсовых деревьев и только 18 % приходится на изменчивость между сравниваемыми группами деревьев из разных географических районов. Построение UPGMA-дендрограммы показало близость генетической структуры плюсовых деревьев из Пензенской области, Чувашской Республики и Республики Татарстан и обособленность плюсового генофонда сосны обыкновенной из Республики Марий Эл. Результаты исследований указывают на то, что уровень генетического разнообразия, структура генетической изменчивости и характер дифференциации плюсовых деревьев соответствуют ранее выявленным для природных популяций сосны обыкновенной в Среднем и Верхнем Поволжье.

Ключевые слова: *Pinus sylvestris* L.; плюсовые деревья; генетическое разнообразие; дифференциация; ISSR-маркеры.

**Для цитирования:** Шейкина О.В., Романов Е.М. Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Среднем и Верхнем Поволжье по ISSR-маркерам. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2): 148-154. DOI 10.18699/vjgb-24-17

## Variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plus trees in the Middle and Upper Volga Region with the use of ISSR markers

O.V. Sheikina , E.M. Romanov 

Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola, Russia  
 shejkinaov@volgatech.net

**Abstract.** One of the serious issues in forest breeding is how to reduce the variability level in breeding populations of forest tree species that is a set of selected plus trees. The problem is that variability is jeopardized by the risk of losing the genetic diversity of future artificial forests, as well as emerging inbreeding depression in the seed plus trees progeny. DNA markers are an effective tool to study variability, identify features of the genetic structure and degree of plant differentiation. The research focuses on assessing the level of the genetic diversity and the degree of differentiation of plus trees of various geographic origin with the use of ISSR markers. We used six ISSR primers to study 270 plus trees grown in the Penza region, the Chuvash Republic, the Republic of Tatarstan and the Mari El Republic. The samples of plus trees under study were characterized by different levels of genetic diversity. Two hundred fifteen PCR fragments were identified for six ISSR primers in total, while the number of amplified fragments varied from 186 to 201 in different plus trees samples. The genetic variability varied within the following limits: 95.7–96.9 %, polymorphic loci; 1.96–1.97, the number of alleles per locus; 1.31–1.48, the number of effective alleles per locus; finally, 0.291–0.429, Shannon's index; 0.205–0.298, the expected heterozygosity. According to the analysis of molecular variance (AMOVA), 82 % of the variability of ISSR markers is typical for the plus tree samples, while only 18 % is variability among the compared groups of trees from different geographical zones. The dendrogram generated by UPGMA showed that the plus trees grown in the Penza region, the Chuvash Republic and the Republic



of Tatarstan are similar in term of the genetic structure of plus trees, while the plus gene pool of Scots pine from the Mari El Republic stands alone. The results of the research prove that the level of genetic diversity, the structure of genetic variability, and the nature of differentiation of plus trees are consistent with those previously elicited for natural populations of Scots pine in the Middle and Upper Volga region.

Key words: *Pinus sylvestris* L.; plus trees; genetic diversity; differentiation; ISSR markers.

**For citation:** Sheikina O.V., Romanov E.M. Variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) plus trees in the Middle and Upper Volga Region with the use of ISSR markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):148-154. DOI 10.18699/vjgb-24-17

## Введение

Селекционное семеноводство основных лесообразующих видов в России преимущественно базируется на массовом отборе плюсовых деревьев (Тараканов и др., 2021). Плюсовые деревья отбираются в естественных насаждениях по ряду фенотипических признаков: высоте, диаметру, качеству ствола, устойчивости к болезням и т. д. Для массового получения семян лесных древесных видов вегетативным потомством плюсовых деревьев создают лесосеменные плантации первого порядка, которые стали неотъемлемой частью лесосеменной базы (Царев и др., 2021). При реализации программ лесного семеноводства для сосны обыкновенной на принципах плюсовой селекции актуальными являются проблема снижения генетического разнообразия плюсового генофонда вследствие отбора ограниченного числа плюсовых деревьев, а также риск возникновения инбредной депрессии семенного потомства по причине близкого расположения родственных клонов на лесосеменных плантациях (Koelewijn et al., 1999; Hosius et al., 2006). Поэтому требуется проведение исследований, направленных на изучение разнообразия отобранного плюсового генофонда и выявление характера его дифференциации с привлечением как морфометрических признаков (Тараканов, Кальченко, 2015; Бессчетнова, Бессчетнов, 2017), так и молекулярных маркеров (Шигапов, 1995; Милютин и др., 2013; Ильинов, Раевский, 2021).

Молекулярные маркеры – эффективный инструмент для решения широкого спектра вопросов в области лесной селекции и семеноводства, в том числе для оценки генетического разнообразия плюсовых деревьев (Шейкина, 2022б). Для оценки изменчивости плюсовых деревьев сосны обыкновенной и созданных их потомством лесосеменных плантаций использованы изоферменты (Шигапов, 1995), ISSR-маркеры (Милютин и др., 2013; Khanova et al., 2020) и микросателлиты (Ильинов, Раевский, 2021; Камалов и др., 2022). При сравнительных исследованиях генетического разнообразия плюсового генофонда древесных видов и природных популяций получены противоречивые результаты. В ряде работ отмечается, что плюсовые деревья могут характеризоваться сравнимым с природными популяциями уровнем генетической изменчивости (Bergman, Ruetz, 1991; Ильинов, Раевский, 2023). В других публикациях встречаются данные о снижении аллельного разнообразия в выборках плюсовых деревьев, произрастающих на лесосеменных плантациях (Шигапов, 1995; Ильинов, Раевский, 2015).

На территории Среднего и Верхнего Поволжья полиморфизм ISSR-локусов был исследован лишь для небольшой выборки 36 плюсовых деревьев в Республике Марий Эл (Милютин и др., 2013). Оценка генетического

разнообразия плюсовых деревьев сосны обыкновенной в других частях Среднего и Верхнего Поволжья ранее не проводилась. В то же время ISSR-маркеры были использованы для выявления особенностей популяционно-генетической структуры сосны обыкновенной в Китае (Hui-yu et al., 2005), Португалии (Cipriano et al., 2013), на Восточно-Европейской равнине и Урале (Видякин и др., 2015; Vasilyeva et al., 2021; Chertov et al., 2022; Sboeva et al., 2022), в Пермском крае (Пришнинская и др., 2019) и в Поволжье (Шейкина, 2022а).

Цель настоящей работы заключалась в изучении генетической изменчивости и дифференциации плюсовых деревьев сосны обыкновенной из Среднего Поволжья на основе анализа ISSR-маркеров. Мы предположили, что уровень генетического разнообразия, структура генетической изменчивости и характер дифференциации плюсовых деревьев, отобранных в результате селекционных мероприятий, соответствуют ранее выявленным для природных популяций сосны обыкновенной в Среднем и Верхнем Поволжье.

## Материалы и методы

Объектом изучения были плюсовые деревья сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) или их клоны из четырех районов Среднего и Верхнего Поволжья. Образцы для молекулярно-генетических исследований в Республике Татарстан заготовлены непосредственно с плюсовых деревьев, произрастающих на территории Зеленодольского лесничества. Остальные образцы получены с клонов плюсовых деревьев, произрастающих на объектах лесного семеноводства: в Чувашской Республике – с лесосеменной плантации первого порядка в Ибресинском лесничестве, в Пензенской области – с лесосеменной плантации первого порядка в Чаадаевском лесничестве, в Республике Марий Эл – с коллекционно-маточного участка в Сернурском лесничестве. Всего изучено 270 деревьев.

Источником ДНК служила высушенная хвоя. Препараты ДНК получены с использованием СТАВ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). ПЦР выполнена с применением шести ISSR-праймеров: (CA)<sub>6</sub>AGCT, (CA)<sub>6</sub>AG, (CA)<sub>6</sub>GT, (CA)<sub>6</sub>AC, (AG)<sub>8</sub>T и (AG)<sub>8</sub>GCT (Hui-yu et al., 2005). ПЦР проводили в термоциклере MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad, США) по следующей программе: 94 °C – 5 мин; 35 циклов: 94 °C – 45 с, 60 °C – 45 с, 72 °C – 45 с; 72 °C – 7 мин. Для постановки ПЦР использовали компоненты коммерческого набора Epcyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия) в следующей концентрации: 10× ПЦР-буфер – 1 мкл; dNTPs – 0.2 мкл (10 mM); праймер – 0.1 мкл (100 мкM); препарат ДНК – 1 мкл (20 нг); Taq-полимераза – 0.1 мкл (2 ед./мкл); вода – 7.6 мкл. Чтобы проверить воспроизводимость полученных ДНК-фин-

герпринтов, ПЦР с каждым образцом проводили в трехкратной повторности. Визуализацию результатов ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в 1.5 % агарозном геле в 1× TBE буфере при напряжении электрического поля 80 В и окрашивании раствором этидия бромидом. Изображения гелей получены с применением системы гель-документирования GelDoc 2000 (Bio-Rad, США) и программного пакета Quantity One® Version 4.6.3. Расчет длин ПЦР-фрагментов осуществлен по отношению к маркеру “100 bp+3.0 kb DNA Ladder” («Евроген», Россия).

Интерпретация результатов молекулярно-генетического анализа проведена на основе составления бинарной матрицы, в которой присутствующие на электрофореграмме ПЦР-фрагменты обозначались как «1», а отсутствующие – как «0». Расчет показателей генетического разнообразия, анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) и анализ главных координат (PCoA) выполнены в программе GenAlEx (Peakall, Smouse, 2012). Статистическую значимость различий между средними значениями показателей генетического разнообразия выборок плюсовых деревьев оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Дендрограмма, иллюстрирующая генетическое взаимоотношение выборок плюсовых деревьев, построена на основе частот встречаемости ISSR-локусов в программе POPTREEW (Takezaki et al., 2014) невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) с бутстреп-поддержкой 10000 репликаций.

## Результаты

Для шести ISSR-праймеров выявлено 215 амплифицированных фрагментов ДНК, из которых 99.5 % оказались полиморфными (табл. 1). Число ПЦР-фрагментов в выборках плюсовых деревьев разного географического происхождения варьировало от 186 в Республике Марий Эл до 201 в Пензенской области, а доля полиморфных локусов находилась в интервале от 95.7 до 96.9 %. Число редких ПЦР-фрагментов с частотой встречаемости менее 5 % в разных выборках варьировало от 1 до 23, а число уникальных – от 0 до 2.

Изученные выборки плюсовых деревьев различались по информационному индексу Шеннона и ожидаемой гетерозиготности. Наименьшие значения показателей выявлены для плюсовых деревьев из Республики Марий Эл

( $I = 0.291$ ,  $Ne = 0.205$ ). Максимальные значения генетической изменчивости определены для сосны из Пензенской области ( $I = 0.429$ ,  $Ne = 0.298$ ). Различия между выборками значимы ( $p = 0.01$ ). По числу аллелей на locus и числу эффективных аллелей плюсовые деревья разного географического происхождения не отличались ( $Na = 1.96–1.97$ ,  $Ne = 1.31–1.48$ ) при  $p = 0.01$ . В целом для всех деревьев число аллелей на locus составило 1.99, эффективных аллелей – 1.37, индекс Шеннона – 0.363, ожидаемая гетерозиготность – 0.230. Примеры спектров ПЦР-фрагментов приведены на рис. 1.

Использование разных ISSR-праймеров при ПЦР позволило проанализировать от 27 до 40 локусов, из которых 80.6–93.5 % являются полиморфными (табл. 2). Высокий уровень полиморфизма позволяет говорить о том, что рассмотренный набор маркеров может быть полезным и информативным инструментом при оценке генетической изменчивости как природных популяций хозяйственно ценного вида, так и лесных культур и объектов единого генетико-селекционного комплекса, к которому в том числе относятся плюсовые деревья. Другие показатели генетического разнообразия для разных ISSR-праймеров варьировали в следующих пределах: число аллелей на locus – от 1.62 до 1.90, число эффективных аллелей – от 1.31 до 1.41, индекс Шеннона – от 0.331 до 0.393, ожидаемая гетерозиготность – от 0.206 до 0.252.

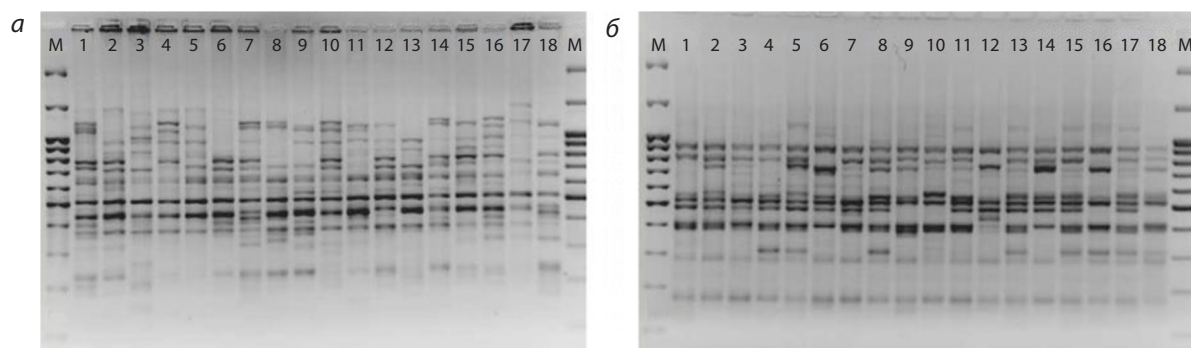
Анализ молекулярной дисперсии выявил, что 82 % генетической изменчивости распределено внутри выборок плюсовых деревьев из разных географических районов Среднего Поволжья (табл. 3). На межпопуляционную изменчивость приходится 18 % генетического разнообразия. Попарные сравнения плюсовых деревьев из разных географических районов показали, что на межпопуляционную изменчивость может приходиться от 14 до 24 %. Наибольшей генетической подразделенностью характеризуются выборки из Пензенской области и Республики Марий Эл (24 %), а также из Чувашской Республики и Республики Марий Эл (23 %). Для остальных случаев доля межпопуляционной изменчивости составила 14–16 %. Во всех случаях уровень значимости  $p < 0.001$ .

На UPGMA-дендрограмме с высоким значением бутстреп-поддержки (100) выборки деревьев из Пензенской области, Республики Татарстан и Чувашской Республики

**Таблица 1.** Показатели генетического разнообразия плюсовых деревьев сосны обыкновенной

Географическое происхождение	Число деревьев	N ( $N_{05}$ , R)	P, %	Na	Ne	I	Ne
Пензенская область	63	201 (1, 1)	96.5	1.96 ± 0.013	1.48 ± 0.021	0.429 ± 0.014	0.298 ± 0.010
Республика Татарстан	66	199 (23, 1)	96.9	1.97 ± 0.021	1.36 ± 0.021	0.343 ± 0.015	0.232 ± 0.011
Чувашская Республика	70	194 (6, 2)	95.7	1.96 ± 0.020	1.44 ± 0.022	0.391 ± 0.016	0.273 ± 0.010
Республика Марий Эл	71	186 (4, 0)	95.7	1.96 ± 0.020	1.31 ± 0.020	0.291 ± 0.015	0.205 ± 0.010
Итого	270	215	99.5	1.99 ± 0.020	1.37 ± 0.011	0.363 ± 0.008	0.230 ± 0.006
F-критерий Фишера ( $F_{0.01} = 4.94$ )	–	–	–	0.07	0.99	14.87	13.92

Примечание. Здесь и в табл. 2: N – число ПЦР-фрагментов;  $N_{05}$  – число ПЦР-фрагментов с частотой <5 %; R – число уникальных ПЦР-фрагментов; P – процентное содержание полиморфных локусов; Na – число аллелей на locus; Ne – число эффективных аллелей; I – индекс Шеннона; Ne – ожидаемая гетерозиготность. Данные приведены как среднее значение ± стандартная ошибка.



**Рис. 1.** ДНК-профили, показывающие полиморфизм плюсовых деревьев сосны обыкновенной, полученные с ISSR-праймерами (CA)<sub>6</sub>AGCT (а) и (AG)<sub>8</sub>T (б).

1–18 – номера образцов ДНК; М – маркер длин ДНК 100 bp + 3.0 kb DNA Ladder.

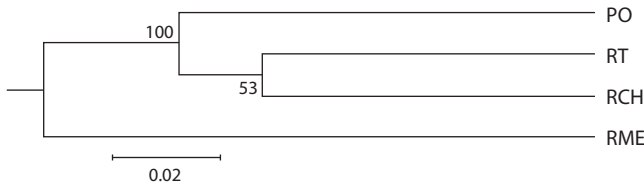
**Таблица 2.** Показатели генетического разнообразия ISSR-праймеров

ISSR-праймер	N (N <sub>05</sub> )	P, %	Na	Ne	I	He
(CA) <sub>6</sub> AGCT	34 (2)	81.6	1.65 ± 0.064	1.36 ± 0.026	0.359 ± 0.020	0.228 ± 0.014
(CA) <sub>6</sub> AG	40 (1)	86.3	1.77 ± 0.048	1.31 ± 0.023	0.331 ± 0.017	0.206 ± 0.012
(CA) <sub>6</sub> GT	35 (0)	92.9	1.90 ± 0.033	1.41 ± 0.029	0.338 ± 0.019	0.248 ± 0.014
(CA) <sub>6</sub> AC	39 (1)	91.0	1.88 ± 0.033	1.35 ± 0.024	0.363 ± 0.017	0.227 ± 0.012
(AG) <sub>8</sub> T	27 (0)	93.5	1.89 ± 0.042	1.41 ± 0.033	0.393 ± 0.021	0.252 ± 0.016
(AG) <sub>8</sub> GCT	40 (3)	80.6	1.62 ± 0.062	1.37 ± 0.025	0.359 ± 0.019	0.231 ± 0.013

**Таблица 3.** Распределение внутри- и межпопуляционной генетической изменчивости плюсовых деревьев сосны обыкновенной по результатам анализа молекулярной дисперсии

Источник изменчивости	df	SS	MS	V	Доля изменчивости, %
Для всех выборок					
Между популяциями	3	1409.3	469.7	6.5	18.0
Внутри популяций	299	8040.9	30.2	30.2	82.0
Пензенская область и Республика Татарстан					
Между популяциями	1	428.9	428.9	6.1	16.0
Внутри популяций	127	4148.7	32.7	32.7	84.0
Пензенская область и Чувашская Республика					
Между популяциями	1	405.3	405.3	5.6	14.0
Внутри популяций	131	4516.9	34.5	34.5	86.0
Пензенская область и Республика Марий Эл					
Между популяциями	1	642.3	642.3	9.2	24.0
Внутри популяций	132	3924.4	29.7	29.7	76.0
Республика Татарстан и Чувашская Республика					
Между популяциями	1	395.4	395.4	5.4	15.0
Внутри популяций	134	4116.5	30.7	30.7	85.0
Республика Татарстан и Республика Марий Эл					
Между популяциями	1	332.8	332.8	4.5	15.0
Внутри популяций	135	3523.9	26.1	26.1	85.0
Чувашская Республика и Республика Марий Эл					
Между популяциями	1	608.7	608.7	8.2	23.0
Внутри популяций	139	3892.2	28.0	28.0	77.0

Примечание. df – число степеней свободы; SS – сумма квадратов; MS – стандартное отклонение; V – дисперсия.



**Рис. 2.** UPGMA-дендрограмма, построенная с использованием генетической дистанции Нея между плюсовыми деревьями *P. sylvestris* L.

PO – Пензенская область, RT – Республика Татарстан, RCH – Чувашская Республика, RME – Республика Марий Эл.

вошли в один кластер (рис. 2). Выборка плюсовых деревьев из Республики Марий Эл отнесена к отдельному кластеру.

На основе попарных генетических дистанций Нея выполнен анализ главных координат для отдельных деревьев сосны обыкновенной (рис. 3, а) и выборок плюсовых деревьев (рис. 3, б). РСоА анализ для особей показал, что три главные оси отвечают за 17.03 % полиморфизма ISSR-локусов, при этом на первую координату приходится 8.45 %, а на вторую – 4.96 % всей изменчивости. На уровне выборок плюсовых деревьев 81.02 % всего разнообразия приходится на первую и вторую координату. Яркое выраженных географических градиентов по осям не выявлено. Однако можно отметить сходство в распределении выборок на первой оси с расположением районов отбора плюсовых деревьев по отношению к р. Волге по первой оси: плюсовые деревья из Республик Марий Эл и Татарстан произрастают на левом берегу, тогда как из Пензенской области и Чувашской Республики – на правом.

### Обсуждение

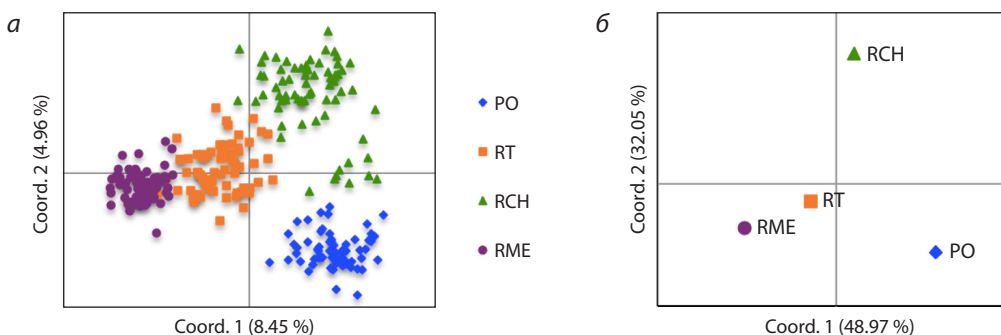
В настоящей работе выполнена оценка генетической изменчивости и дифференциации плюсового генофонда сосны обыкновенной из разных районов Среднего и Верхнего Поволжья. Для сохранения генетического разнообразия вида в процессе искусственного восстановления важно, чтобы селекционные популяции характеризовались высоким уровнем изменчивости. Из литературы известно, что доля полиморфных ISSR-локусов в популяциях сосны обыкновенной варьирует от 42 до 100 % (Hui-yu et al., 2005; Cipriano et al., 2013; Видякин и др., 2015; Пришневская и др., 2019). Для изученных выборок плюсовых деревьев и подобранных маркеров этот показатель варьиро-

вал в пределах 95.7–96.9 % и в среднем составил 99.5 %, что хорошо согласуется с результатами других исследований. Полученное значение доли полиморфных локусов для плюсовых деревьев было сопоставимо с данными для 12 природных популяций сосны обыкновенной (96.7 %) из Верхнего и Среднего Поволжья, проанализированных тем же набором ISSR-маркеров (Шейкина, 2022а).

Другие показатели генетического разнообразия, установленные для исследованных выборок плюсовых деревьев, тоже не уступали значениям, выявленным для природных популяций. Так, число эффективных аллелей и ожидаемая гетерозиготность для плюсовых деревьев составили 1.31–1.48 и 0.205–0.298 соответственно, тогда как для природных популяций – 1.27–1.39 и 0.174–0.241 (Шейкина, 2022а). Близкое значение ожидаемой гетерозиготности ISSR-локусов ( $H_e = 0.239$ ) установлено для плюсовых деревьев сосны обыкновенной из Республики Башкортостан (Khanova et al., 2020). Меньшие значения ожидаемой гетерозиготности были характерны для популяций сосны обыкновенной на Русской равнине ( $H_e = 0.046–0.239$ ) (Видякин и др., 2015; Пришневская и др., 2019; Vasilyeva et al., 2021; Sboeva et al., 2022) и Урале ( $H_e = 0.149–0.185$ ) (Chertov et al., 2022). Для португальских популяций показаны (Cipriano et al., 2013) высокие значения ожидаемой гетерозиготности ( $H_e = 0.447–0.488$ ), в 1.5–2.4 раза превышающие приведенные выше значения.

Индекс Шеннона в изученных нами выборках плюсовых деревьев варьировал от 0.331 до 0.393. В других исследованиях индекс Шеннона, установленный для популяций из разных частей России, составил 0.087–0.357 (Vasilyeva et al., 2021; Chertov et al., 2022; Sboeva et al., 2022). Более высокие значения индекса Шеннона ( $I = 0.636–0.681$ ) определены для популяций сосны обыкновенной из Португалии (Cipriano et al., 2013). Различия в уровнях генетического разнообразия могут быть обусловлены как географической вариабельностью, так и тем фактом, что в исследованиях использованы разные наборы и количество ISSR-маркеров.

На основе анализа молекулярной дисперсии плюсовых деревьев сосны разного географического происхождения выявлено, что 18 % изменчивости ISSR-локусов приходится на межпопуляционную компоненту. Это согласуется с данными, ранее полученными для природных популяций сосны обыкновенной в Верхнем и Среднем Поволжье (14 %) (Шейкина, 2022а). Для популяций с Восточно-



**Рис. 3.** Расположение в пространстве главных координат (РСоА) плюсовых деревьев сосны обыкновенной (а) и географических происхождений (б).

PO – Пензенская область, RT – Республика Татарстан, RCH – Чувашская Республика, RME – Республика Марий Эл.

Европейской равнины и Урала значение этого параметра может достигать 37–48 % (Vasilyeva et al., 2021; Chertov et al., 2022; Sboeva et al., 2022). Оценка дифференциации популяций сосны обыкновенной в разных частях ареала на основе определения показателя генетической подразделенности ( $G_{st}$ ) показала, что на долю межпопуляционной компоненты изменчивости ISSR-локусов может приходиться от 5.8 до 55.8 % (Hui-yu et al., 2005; Cipriano et al., 2013; Видякин и др., 2015; Vasilyeva et al., 2021; Шейкина, 2022a; Chertov et al., 2022; Sboeva et al., 2022). Относительно низкие значения показателя генетической подразделенности получены для популяций со Среднего Урала ( $G_{st} = 0.155$ ) (Sboeva et al., 2022) и из Португалии ( $G_{st} = 0.058$ ) (Cipriano et al., 2013). Большой генетической подразделенностью по сравнению с изученными выборками плюсовых деревьев отличались популяции из Китая ( $G_{st} = 0.396$ ) (Hui-yu et al., 2005), с Восточно-Европейской равнины ( $G_{st} = 0.439–0.558$ ) (Видякин и др., 2015; Vasilyeva et al., 2021; Sboeva et al., 2022) и Урала ( $G_{st} = 0.362$ ) (Chertov et al., 2022). Показатель генетической подразделенности природных популяций из Верхнего и Среднего Поволжья составил 0.161 (Шейкина, 2022a). Таким образом, данные по структуре генетической изменчивости выборок плюсовых деревьев, полученные в нашем исследовании, в целом не противоречат более ранним результатам, описанным для природных популяций сосны обыкновенной.

Кластеризация выборок UPGMA-методом выявила обособленность плюсового генофонда сосны обыкновенной из Республики Марий Эл от трех других групп деревьев. Выборки деревьев из Пензенской области, Чувашской Республики и Республики Татарстан составляют единый кластер с близкой генетической структурой. При изучении популяционной структуры сосняков в Среднем и Верхнем Поволжье также установлены отличия популяций из Республики Марий Эл, расположенных на правом берегу р. Волги, от левобережных популяций из Чувашской Республики и Пензенской области (Шейкина, 2022a). Выявленная дифференциация популяций и плюсовых генофондов сосны обыкновенной разного географического происхождения может быть результатом пересечения миграционных путей вида в последниковый период. В частности, с помощью аллозимного анализа показано, что в формировании генофонда популяций сосны обыкновенной на Восточно-Европейской равнине могли принимать участие пять разных плейстоценовых рефугиумов (Санников и др., 2020).

## Заключение

Изученные выборки плюсовых деревьев из разных частей Среднего и Верхнего Поволжья различаются между собой по уровню полиморфизма ISSR-локусов. Отобранный в процессе селекционных мероприятий плюсовой генофонд сосны обыкновенной характеризуется сопоставимым с природными популяциями уровнем генетического разнообразия в регионе исследования. Структура генетической изменчивости и характер дифференциации выборок плюсовых деревьев разного географического происхождения тоже соответствуют популяционно-генетической структуре природных популяций.

Полученные нами результаты подтверждают возможность использования ISSR-маркеров в изучении популяционной генетической структуры сосны обыкновенной, отмеченную А.И. Видякиным с коллегами (Видякин и др., 2015), а высокий уровень изменчивости отобранных локусов (80.6–93.5 %) позволяет рекомендовать данный набор для оценки генетической изменчивости природных популяций, лесных культур и объектов единого генетико-селекционного комплекса. Для повышения надежности оценки генетического разнообразия и дифференциации плюсовых деревьев в будущем необходимо провести исследования с применением других типов молекулярных маркеров.

## Список литературы / References

- Бессчетнова Н.Н., Бессчетнов В.П. Изменчивость морфометрических признаков хвои на клоновой плантации плюсовых деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(2):198–206. DOI 10.18699/VJ17.237 [Besschetnova N.N., Besschetnov V.P. Variability of morphometrical characteristics of needles at a clonal plantation of plus trees of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(2):198–206. DOI 10.18699/VJ17.237 (in Russian)]
- Видякин А.И., Боронникова С.В., Нечаева Ю.С., Пришневская Я.В., Бобошина И.В. Генетическая изменчивость, структура и дифференциация популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на северо-востоке Русской равнины по данным молекулярно-генетического анализа. *Генетика*. 2015;51(12):1401–1409. DOI 10.7868/S0016675815120139 [Vidyakin A.I., Boronnikova S.V., Nechayeva Y.S., Pryshnivskaya Y.V., Boboshina I.V. Genetic variation, population structure, and differentiation in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from the northeast of the Russian plain as inferred from the molecular genetic analysis data. *Russ. J. Genet.* 2015;51(12):1213–1220. DOI 10.1134/S1022795415120133]
- Ильинов А.А., Раевский Б.В. Сравнительная оценка генетического разнообразия естественных популяций и клоновых плантаций сосны обыкновенной и ели финской в Карелии. *Экол. генетика*. 2015;13(4):55–67 [Ilinov A.A., Raevskiy B.V. Comparative evaluation of the genetic diversity of natural populations and clonal seed orchards of *Pinus sylvestris* L. and *Picea × fennica* (Regel) Kom. in Karelia. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(6):607–616. DOI 10.1134/S2079059717060065]
- Ильинов А.А., Раевский Б.В. Генетическое разнообразие деревьев сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. различных селекционных категорий в плюсовых насаждениях Карелии. *Экол. генетика*. 2021;19(1):23–35. DOI 10.17816/ecogen50176 [Ilinov A.A., Raevsky B.V. Genetic diversity of scots pine trees of different selection categories in plus stands of Karelia. *Ekologicheskaya Genetika* = *Ecological Genetics*. 2021;19(1):23–35. DOI 10.17816/ecogen50176 (in Russian)]
- Ильинов А.А., Раевский Б.В. Микросателлитные локусы в генетической оценке плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. *Изв. вузов. Лесн. журн.* 2023;3:48–68. DOI 10.37482/0536-1036-2023-3-48-68 [Ilinov A.A., Raevsky B.V. Genetic evaluation by microsatellite loci of *Pinus sylvestris* L. plus trees. *Lesnoy Zhurnal* = *Russian Forestry Journal*. 2023;3:48–68. DOI 10.37482/0536-1036-2023-3-48-68 (in Russian)]
- Камалов Р.М., Петюренко М.Ю., Дегтярева А.П. Изменчивость показателей молекулярных маркеров у клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* L. *Труды С.-Петерб. науч.-исслед. ин-та лесн. хоз-ва*. 2022;3:4–14. DOI 10.21178/2079-6080.2022.3.4 [Kamalov R.M., Peturenko M.Yu., Degtyareva A.P. Variability of indicators of molecular markers in clones of plus trees *Pinus sylvestris* L. *Trudy Sankt-Petersburgskogo Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Lesnogo Khozyaystva* = *Proceedings of the Saint Peters-*

- burg Forestry Research Institute. 2022;3:4-14. DOI 10.21178/2079-6080.2022.3.4 (in Russian)]
- Милютин Т.Н., Шейкина О.В., Новиков П.С. Молекулярно-генетические исследования изменчивости клонов плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* по ISSR-маркерам. *Хвойные бореальной зоны*. 2013;31(1-2):102-105  
[Milyutina T.N., Sheikina O.V., Novikov P.S. Molecular-genetic research of variation in clonal progeny of *Pinus sylvestris* plus trees using ISSR markers. *Khvoynye Boreal'noy Zony = Conifers of the Boreal Area*. 2013;31(1-2):102-105 (in Russian)]
- Пришневская Я.В., Нассонова Е.С., Чертов Н.В., Жуланов А.А., Васильева Ю.С., Боронникова С.В., Календарь Р.Н. Внутривидовое генетическое разнообразие популяций двух видов древесных растений Пермского края. *Бюл. науки и практики*. 2019;5(4):58-68. DOI 10.33619/2414-2948/41/06  
[Prishnevskaya Ya.V., Nasonova E.S., Chertov N.V., Zhulanov A.A., Vasileva Yu.S., Boronnikova S.V., Kalendar R.N. Genetic diversity within species of two species woody plants populations in Perm Krai. *Bulleten Nauki i Praktiki = Bulletin of Science and Practice*. 2019;5(4):58-68. DOI 10.33619/2414-2948/41/06 (in Russian)]
- Санников С.Н., Петрова И.В., Егоров Е.В., Санникова Н.С. Поиск и выявление системы плейстоценовых рефугиумов вида *Pinus sylvestris* L. *Экология*. 2020;3:181-189. DOI 10.31857/S0367059720030130  
[Sannikov S.N., Petrova I.V., Egorov E.V., Sannikova N.S. Searching for and revealing the system of pleistocene refugia for the species *Pinus sylvestris* L. *Russ. J. Ecol.* 2020;51(3):215-223. DOI 10.1134/S1067413620030133]
- Тараканов В.В., Кальченко Л.И. Фенетический анализ клоновых и естественных популяций сосны в Алтайском крае. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2015  
[Tarakanov V.V., Kalchenko L.I. Phenetic Analysis of Clonal and Natural Populations of *Pinus sylvestris* L. in the Altai Territory. Novosibirsk: Acad. Publ. House "Geo", 2015 (in Russian)]
- Тараканов В.В., Паленова М.М., Паркина О.В., Роговцев Р.В., Третьякова Р.А. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор). *Лесохозяйственная информация*. 2021;1:100-143. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2021.1.09  
[Tarakanov V.V., Palenova M.M., Parkina O.V., Rogovtsev R.V., Tretyakova R.A. Forest tree breeding in Russia: achievements, challenges, priorities (review). *Lesokhozyastvennaya Informatsiya = Forestry Information*. 2021;1:100-143. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2021.1.09 (in Russian)]
- Царев А.П., Лаур Н.В., Царев В.А., Царева Р.П. Современное состояние лесной селекции в Российской Федерации: тренд последних десятилетий. *Изв. вузов. Лесн. журн.* 2021;6:38-55. DOI 10.37482/0536-1036-2021-6-38-55  
[Tsarev A.P., Laur N.V., Tsarev V.A., Tsareva R.P. The current state of forest breeding in the Russian Federation: the trend of recent decades. *Lesnoy Zhurnal = Russian Forestry Journal*. 2021;6:38-55. DOI 10.37482/0536-1036-2021-6-38-55 (in Russian)]
- Шейкина О.В. Генетическая структура и дифференциация популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Среднем и Верхнем Поволжье. *Экол. генетика*. 2022а;20(4):261-270. DOI 10.17816/ecogen110866  
[Sheikina O.V. Genetic structure and differentiation of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in the Middle and Upper Volga Regions. *Ekologicheskaya Genetika = Ecological Genetics*. 2022а;20(4):261-270. DOI 10.17816/ecogen110866 (in Russian)]
- Шейкина О.В. Применение молекулярных маркеров в лесном селекционном семеноводстве в России: опыт и перспективы (обзор). *Вестн. Поволж. гос. технол. ун-та. Сер.: Лес. Экология. Природопользование*. 2022б;2(54):64-79. DOI 10.25686/2306-2827.2022.2.64  
[Sheikina O.V. Application of molecular markers in forest breeding and seed production in Russia: experience and prospects (review). *Vestnik Povolzhskogo Gosudarstvennogo Tekhnologicheskogo Universiteta. Seriya: Les. Ekologiya. Prirodopolzovanie = Vestnik of Volga State University of Technology. Series: Forest. Ecology. Nature Management*. 2022б;2(54):64-79. DOI 10.25686/2306-2827.2022.2.64 (in Russian)]
- Шигапов З.Х. Сравнительный генетический анализ лесосеменных плантаций и природных популяций сосны обыкновенной. *Лесоведение*. 1995;3:19-24  
[Shigapov Z.H. Comparative genetic analysis of forest seed plantations and natural populations of Scots pine. *Lesovedenie = Russian Journal of Forest Science*. 1995;3:19-24 (in Russian)]
- Bergman F., Ruetz W. Isozyme genetic variation and heterozygosity in random tree samples and selected orchard clones from the same Norway spruce populations. *For. Ecol. Manag.* 1991;46(1-2):39-47. DOI 10.1016/0378-1127(91)90243-0
- Chertov N., Nechaeva Y., Zhulanov A., Pystogova N., Danilova M., Boronnikova S., Kalendar R. Genetic structure of *Pinus* populations in the Urals. *Forests*. 2022;13(8):1278. DOI 10.3390/f13081278
- Cipriano J., Carvalho A., Fernandes C., Gaspar M.J., Pires J., Bento J., Roxo L., Louzada J., Lima-Brito J. Evaluation of genetic diversity of Portuguese *Pinus sylvestris* L. populations based on molecular data and inferences about the future use of this germplasm. *J. Genet.* 2013;92(2):e41-e48. DOI 10.1007/s12041-013-0241-3
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987;19:11-15
- Hosius B., Leinemann L., Konner M., Bergmann F. Genetic aspects of forestry in the Central Europe. *Eur. J. For. Res.* 2006;125(4):407-417. DOI 10.1007/s10342-006-0136-4
- Hui-yu L., Jing J., Gui-feng L., Xu-jun M., Jing-xiang D., Shi-lie L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers. *J. For. Res.* 2005;16(3):216-218. DOI 10.1007/BF02856818
- Khanova E., Kononov V., Timeryanov A., Isyanyulova R., Rafikova V. Genetic and selection assessment of the scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in forest seed orchards. *Wood Res.* 2020;65(2):283-292. DOI 10.37763/wr.1336-4561/65.2.283292
- Koelwijn H.P., Koski V., Savolainen O. Magnitude and timing of inbreeding depression in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Evolution*. 1999;53(3):758-768. DOI 10.1111/j.1558-5646.1999.tb05370.x
- Peakall R., Smouse P.E. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460
- Sboeva Y., Chertov N., Nechaeva Y., Valeeva A., Boronnikova S., Kalendar R. Genetic diversity, structure, and differentiation of *Pinus sylvestris* L. populations in the East European Plain and the Middle Urals. *Forests*. 2022;13(11):1798. DOI 10.3390/f13111798
- Takezaki N., Nei M., Tamura K. POPTREEW: web version of POPTREE for constructing population trees from allele frequency data and computing some other quantities. *Mol. Biol. Evol.* 2014;31(6):1622-1624. DOI 10.1093/molbev/msu093
- Vasilyeva Y., Chertov N., Nechaeva Y., Sboeva Y., Pystogova N., Boronnikova S., Kalendar R. Genetic structure, differentiation and originality of *Pinus sylvestris* L. populations in the East of the East European Plain. *Forests*. 2021;12(8):999. DOI 10.3390/f12080999

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-16-00220 (<https://rscf.ru/project/23-16-00220/>) с использованием оборудования ЦКП «Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей» Поволжского государственного технологического университета, г. Йошкар-Ола.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.02.2023. После доработки 29.09.2023. Принята к публикации 29.09.2023.

DOI 10.18699/vjgb-24-18

# Многомерный анализ многолетних климатических данных в связи с урожайностью, скороспелостью и проблемой глобального потепления

В.М. Ефимов , Д.В. Речкин, Н.П. Гончаров 

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

**Аннотация.** Изменение климата – определяющая проблема растениеводства XXI в. Агротехнологии будущего в Российской Федерации должны быть связаны с оптимизацией землепользования, которая будет осуществляться как с применением алгоритмов «умного» сельского хозяйства, так и на основе прогноза потенциальных климатических изменений. Это позволит повысить рентабельность и устойчивость производства сельскохозяйственной продукции без дополнительных затрат за счет своевременного учета возможных рисков. При этом оптимизация системы возделывания культур должна базироваться не на имеющихся эмпирических показателях, полученных по ограниченным во времени точкам учета (месяц, год), и субъективной человеческой оценке, а на комплексном анализе массивов многолетней информации. В настоящей работе приведены результаты многомерного анализа метеорологических экстремумов и связанных с ними неурожая в Восточной и Западной Европе за последние 2600 лет по летописным данным и палеореконструкциям, а также реконструкциям гелиофизических данных за последние 9000 лет. Отмечается, что идущее глобальное потепление продлится еще некоторое время. Однако последующие изменения климата могут быть направлены в любую сторону, причем, скорее, в сторону похолодания, а не потепления, поэтому надо быть готовыми к любым сценариям будущего. Для нивелирования последствий этих изменений селекция может сыграть ключевую роль в решении проблем продовольственной безопасности. Обсуждаются перспективы разработки мер адаптации растениеводства к происходящим и ожидаемым изменениям климата, и сделан вывод, что селекция будущего должна базироваться на использовании уже отработанных в программах предварительной селекции (pre-breeding) высокоадаптированных сельскохозяйственных культур, потенциально отвечающих будущим вызовам, обусловленным потенциальным изменением климата. Ключевые слова: климат; глобальное потепление; модели; селекция будущего; адаптивность; скороспелость.

**Для цитирования:** Ефимов В.М., Речкин Д.В., Гончаров Н.П. Многомерный анализ многолетних климатических данных в связи с урожайностью, скороспелостью и проблемой глобального потепления. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):155-165. DOI 10.18699/vjgb-24-18

## Multivariate analysis of long-term climate data in connection with yield, earliness and the problem of global warming

V.M. Efimov , D.V. Rechkin, N.P. Goncharov 

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

**Abstract.** Climate change is the key challenge to agriculture in the XXI century. Future agricultural techniques in the Russian Federation should involve the optimization of land utilization. This optimization should apply algorithms for smart farming and take into consideration possible climate variations. Due to timely risk assessment, this approach would increase profitability and production sustainability of agricultural products without extra expenditures. Also, we should ground farming optimization not on available empirical data encompassing limited time intervals (month, year) or human personal evaluations but on the integral analysis of long-term information bodies using artificial intelligence. This article presents the results of a multivariate analysis of meteorological extremes which caused crop failures in Eastern and Western Europe in last 2600 years according to chronicle data and paleoreconstructions as well as reconstructions of heliophysical data for the last 9000 years. This information leads us to the conclusion that the current global warming will last for some time. However, subsequent climate changes may go in any direction. And cooling is more likely than warming; thus, we should be prepared to any scenario. Plant breeding can play a key role in solving food security problems connected with climate changes. Possible measures to adapt plant industry to the ongoing and expected climate changes are discussed. It is concluded that future breeding should be based on the use of highly adapted crops that have already been produced in pre-breeding programs, ready to meet future challenges caused by potential climate change. Key words: climate; global warming; models; next generation breeding; adaptability; earliness.

**For citation:** Efimov V.M., Rechkin D.V., Goncharov N.P. Multivariate analysis of long-term climate data in connection with yield, earliness and the problem of global warming. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):155-165. DOI 10.18699/vjgb-24-18

## Введение

Резкие изменения климата непосредственно влияли на существование человека на протяжении всей геологической летописи (Gupta, 2004). Последнее похолодание в Палеарктике (в том числе до экстремальных проявлений) началось в позднем плейстоцене, около 27 тыс. лет назад, и закончилось примерно 14 тыс. лет назад (Prentice, 2009). По археологическим данным, обитавшие на этой территории люди либо успешно адаптировались к климатическим изменениям, либо мигрировали в местности с более благоприятными условиями, где в VIII–X вв. до н. э. занялись производящим хозяйством (Шнирельман, 2012), т. е. земледелием на основе domestикации растений и последовавшим за ним одомашниванием животных (Гончаров, 2013). В настоящее время очевидно, что концепция «вызова-и-ответа» А. Дж. Тойнби (Toynbee, 1954), согласно которой переход к земледелию был «ответом» древних охотников и собирателей на резкую аридизацию, обусловленную таянием позднплейстоценовых ледников, не нашла подтверждения (Трифонов, Караханян, 2004). Более того, земледелие в Передней Азии возникло в фазу относительной гумидизации, т. е. медленного повышения увлажнения.

Локальное и глобальное изменение климата – определяющая проблема XXI в. и его первых десятилетий, которые являются критическим временем для принятия мер по смягчению ожидаемых наихудших последствий для человечества и агробиоэкосистем (Eckardt et al., 2023). Грядущее изменение климата может иметь многочисленные негативные последствия для производства сельскохозяйственных культур во всем мире, что потребует существенного расширения биоразнообразия (зародышевой плазмы), необходимого для включения в селекцию как новых признаков, так и совершенно новых видов растений. При этом остро стоит проблема сбора, сохранения и последующего эффективного и рационального использования биоразнообразия возделываемых видов и их сородичей в условиях изменяющегося климата (Eastwood et al., 2022).

У многих видов-сородичей важных в хозяйственном отношении культур обнаружены значительные полиморфизмы в отношении сезонной адаптации (Гончаров, Чикида, 1995; Leigh et al., 2022; Liang, Tian, 2023), которые могут быть эффективно использованы для повышения общей приспособленности возделываемых растений в условиях локального и глобального изменения климата.

Последствия климатических изменений беспокоят специалистов разного профиля (Катцов и др., 2011; Ruddiman et al., 2016), в том числе биологов и аграриев, работающих с самыми разнообразными объектами (Baltzoi et al., 2015; Гурова, Осипова, 2018; Morgounov et al., 2018; Eastwood et al., 2022; и др.). Не вызывает сомнений тот факт, что наблюдаемые тенденции в изменении климата оказывают неблагоприятное воздействие на урожайность многих широко возделываемых культур. С хозяйственной точки зрения они представляют собой существенную потенциальную угрозу для общемирового производства растениеводческой и другой сельскохозяйственной продукции (Lobell, Gourdjji, 2012). Прогнозируется, что изменение

климата окажет отрицательное воздействие не только на производство продуктов питания, но и на их качество (Atkinson et al., 2008) и, как следствие, приведет к снижению уровня продовольственной безопасности. Расширение полиморфизма по многим признакам (Trifonova et al., 2021) и последующая селекция на оптимизацию длины вегетационного периода (скороспелость) возделываемых растений становятся все более актуальными (Kamran et al., 2014; Смоленская и др., 2022).

Потенциальные изменения климата делают неизбежной для селекционеров перспективу изменения программ создания сортов растений нового поколения и выведения новых пород животных. Во главу угла должны быть поставлены требования более высокой приспособленности к грядущим изменениям, которые, как становится очевидным, будут значительно отличаться от современных тенденций. При этом ни масштаб, ни их характер пока не поддаются однозначной оценке. В настоящее время чаще всего прогнозируются возможные риски, обусловленные повсеместным использованием наиболее популярных (стандартных) архитектурных возделываемых растений (Jatayev et al., 2020; Liu et al., 2022). Эта проблема очень серьезная, так как, например, около 70 % возделываемых в настоящее время короткостебельных сортов мягкой пшеницы являются носителями ограниченного числа аллелей генов *Rht*, а именно двух из них – *Rht-B1b* и *Rht-D1b* (Сухих и др., 2021).

Среди исследователей нет единодушия и в том, вызваны ли наблюдаемые глобальные изменения климата антропогенным влиянием или они происходят по естественным причинам (Ruddiman et al., 2016; Lobkovsky et al., 2022; и др.). В последнее время все большее распространение получает гипотеза «нестабильного Солнца» (Solanki et al., 2004; Usoskin et al., 2014). Ее суть заключается в утверждении, что приходящийся на нашу планету поток тепла, так называемая солнечная постоянная, не является такой уж постоянной, по крайней мере, в масштабах тысячелетий, и время от времени претерпевает неожиданные и непредсказуемые при современном уровне наших знаний изменения.

Вполне определенно можно утверждать, что наблюдаемое в настоящее время глобальное потепление началось задолго до бурного индустриального развития. Именно сейчас мы живем в «эпоху перемен», когда поток тепла от Солнца на нашу планету в очередной раз начинает меняться и, соответственно, на Земле будет изменяться климатический режим (Usoskin et al., 2014; Biswas et al., 2023). В связи с этим анализ исторических и современных данных для оценки возможных пределов естественных колебаний климата представляется важным для выбора стратегий природопользования и успешного ведения сельского хозяйства в будущем.

Цель настоящей работы – оценка пределов изменчивости климата, метеорологических экстремумов и неурожая в Восточной и Западной Европе за 2600 лет на основе летописных данных (Бараш, 1989), палеорекоконструкций температуры воздуха (Слепцов, Клименко, 2005), а также композитных гелиофизических данных масштаба тысячелетий, опирающихся на прокси-методы (Clette et al., 2014;



Wu et al., 2018). Для обеспечения более полного охвата изучаемых явлений и более глубокого анализа имеющихся данных нами применены методы многомерного анализа, в частности метод главных компонент.

## Материалы и методы

В работе использованы:

- 1) летописные данные по годам с метеорологическими экстремумами и неурожаями в Западной и Восточной Европе за 2600 лет (с X в. до н. э. по XVI в. н. э.) из обзорной работы С.И. Бараша (1989);
- 2) реконструкция климата Восточной Европы (Русской равнины) за последние 2000 лет по палеоклиматическим данным из работы А.М. Слепцова, В.В. Клименко (2005);
- 3) реконструкция солнечной активности за последние 9000 лет по различным косвенным данным из (Wu et al., 2018);
- 4) ежегодные числа Вольфа SN(v2.0) (1700–2022), по: (WDC-SILSO, Royal Observatory of Belgium, Brussels).

В летописные данные, опубликованные в работе С.И. Бараша (1989), ввели дополнительные признаки, для того чтобы компенсировать не вполне точное отражение природы характеристик лет: в дополнение к разрозненным признакам, отражающим неурожай по различным причинам (засуха, заливы), введен интегральный признак, аккумулирующий сведения о неурожаях вообще, при этом формирование указанного признака выполнялось исключительно по данным С.И. Бараша, приведенным в приложениях к его работе (рис. 1).

Многолетние данные были обработаны методом главных компонент для временных рядов (PCA-TS) (Karhunen, 1947; Loève, 1948). Метод позволяет разлагать любой временной ряд на главные компоненты, отражающие тренд, квазициклические колебания и «шум» (Ефимов и др., 1988). В современном варианте метода PCA-TS (Efimov et al., 2021) одномерный временной ряд преобразуется в траекторную матрицу (Takens, 1981), между ее строками вычисляется матрица евклидовых расстояний, из которой методом главных координат извлекаются главные компоненты (Gower, 1966). По фазовым портретам, построенным на главных компонентах, выявляются однородные по паттернам изменчивости интервалы временного ряда.

Следует отдельно отметить ошибочность очень распространенного положения, что статистическая независимость главных компонент означает и их функциональную независимость и что поэтому никакая главная компонента не может быть производной от другой, в точном математическом смысле, так как корреляция между ними равна нулю. В качестве контрпримера достаточно рассмотреть два временных ряда,  $\sin(t)$  и  $\cos(t)$ , и убедиться, что производная от синуса равна косинусу, их фазовый портрет является окружностью, а корреляция между ними равна нулю.

Похожие ситуации постоянно возникают при обработке реальных рядов методом главных компонент. Если одна из компонент интерпретируется как производная от другой, это можно использовать для прогноза. Часто компоненты идут парами с близкими дисперсиями и частотами, их фазовые портреты похожи на окружность, а по вкладкам

признаков в компоненты или сдвигу относительно друг друга можно определить, какая из них является производной от другой. Еще один часто встречающийся вариант: вклады в одну из компонент одинаковы по знаку и близки по величине (тренд), а в другую – составлены из двух различных по знаку последовательных интервалов, характеризующих изменение тренда.

Поскольку у каждой прямой есть два направления, выбор ориентации – забота пользователя. Любую главную компоненту всегда можно умножить на «-1». Соответственно, изменятся знаки вкладов в нее всех признаков. Рекомендуется выбирать ориентацию компонент таким образом, чтобы в случае тренда знаки всех вкладов были положительными, а при разнонаправленности сначала шли отрицательные вклады, а потом положительные. Тогда фазовая траектория будет вращаться преимущественно по часовой стрелке, причем положительное значение производной будет означать рост основной компоненты, а отрицательное – ее падение.

При вычислении взаимных парных корреляций между проявлениями перечисленных характеристик лет мы применили отсеечение «статистического шума» (Приложение 1)<sup>1</sup>, приходящегося на малозначимые (младшие) главные компоненты, и ограничились изучением эффектов обнаруженной модуляции на события, отмечаемые в летописях. Поэтому в приводимом Приложении 2 диагональные элементы матрицы всегда меньше единицы. Для заданного числа объектов ( $n = 2600$ ) при среднем значении коэффициента корреляции ( $r = 0.500$ ) средняя ошибка коэффициента корреляции составит:  $s_r = (1 - r^2) / \sqrt{n}$  не более 0.014. Таким образом, значения коэффициентов парных корреляций, превышающие утроенную среднюю ошибку (0.044), считали значимыми.

## Результаты

Мы проанализировали собранные С.И. Барашем (1989) данные (см. рис. 1), преобразованные в матрицу, в которой объектами были годы, а признаками – зафиксированные в летописях благоприятные (урожай) либо неблагоприятные (все остальные) события.

Использовали следующие обозначения: Зас-ВЕ – засуха, местные недороды в Восточной Европе; ЗаН-ВЕ – сильная засуха, чрезвычайный повсеместный неурожай; Дож-ВЕ – дождливое лето, местные недороды; ДоН-ВЕ – избыточно влажное лето и чрезвычайный повсеместный неурожай; Зим-ВЕ – суровая зима; ЗиН-ВЕ – очень суровая зима и местные недороды от гибели озимых; Гол-ВЕ – голод; Сар-ВЕ – саранча; Эпи-ВЕ – эпидемия; Чум-ВЕ – чума; Осп-ВЕ – черная оспа; Тиф-ВЕ – сыпной тиф; Мор-ВЕ – мор (эпизоотия); Урж-ВЕ – хороший урожай; НеУ-ВЕ – повсеместный неурожай. Аналогичные обозначения (с суффиксом «ЗЕ») использованы для Западной Европы.

Признаки НеУ-ВЕ и НеУ-ЗЕ добавлены нами. В работе С.И. Бараша (1989) неурожайные годы не отмечаются признаками Урж-ВЕ и Урж-ЗЕ, а «закодированы» скрытым образом в признаках Зас, ЗаН, Дож, ДоН и ЗиН. Мы выделили это влияние в пару отдельных признаков и оценили влияние всех перечисленных характеристик лет.

<sup>1</sup> Приложения 1–3 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx8.pdf>

Метеорологические экстремумы, повсеместные неурожаи, местные недороды, голода и эпидемии в Западной Европе за 2600 лет  
(с I тысячелетия до н.э. по XVI в. н.э.)

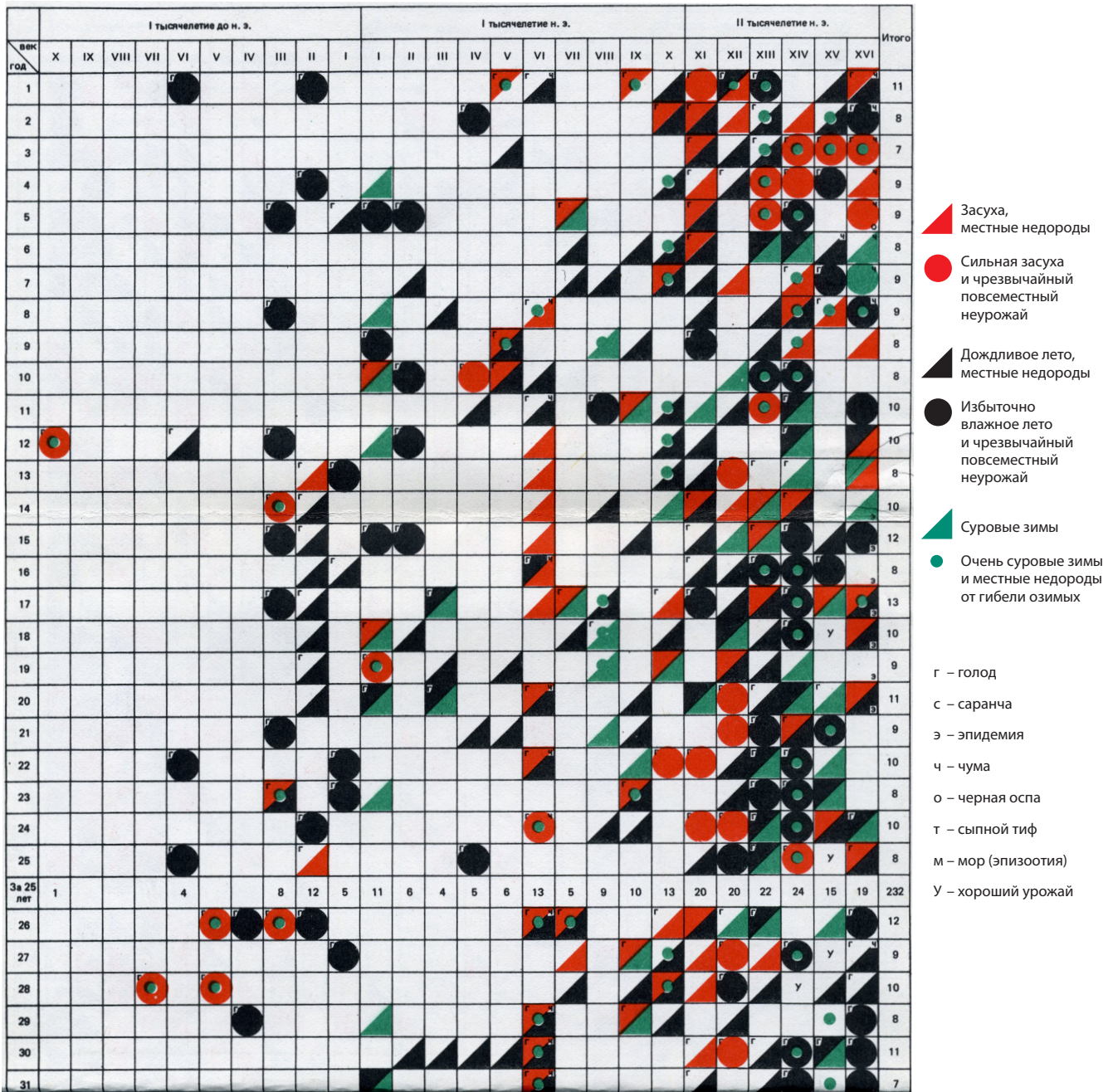


Рис. 1. Метеорологические экстремумы и неурожаи в Западной (ЗЕ) и Восточной Европе (ВЕ) за 2600 лет (с X в. до н.э. до XV в. н.э.). Из (Бараш, 1989, фрагмент).

Оказалось, что существенным влиянием на неурожаи обладают только характеристики ЗаН и ДоН, связанные с повсеместными неурожаями, а не с локальными (местными) недородами.

В данных С.И. Бараша (1989) отсутствуют какие-либо сведения об эпидемиях сыпного тифа в Западной Европе (признак Тиф-ЗЕ имеет нулевое значение), поэтому в итоговой матрице данных по Восточной Европе представлено 15 признаков, по Западной Европе – 14, всего 29.

Обработка проведена методом главных компонент (рис. 2, Приложения 1–3). На первую (PC1) и вторую

(PC2) главные компоненты приходится 22 % совокупной дисперсии выборки (см. Приложение 1). Собственные числа традиционно упорядочены по убыванию значений. Они отражают перераспределение информации и концентрацию наиболее существенных факторов в первых (старших) главных компонентах (см. Приложение 3).

Так как сумма всех собственных чисел равна порядку матрицы корреляций (количеству признаков исходной выборки), при невозможности выделения каких-либо закономерностей во взаимодействии (взаимосвязанности) признаков каждое собственное число должно было быть

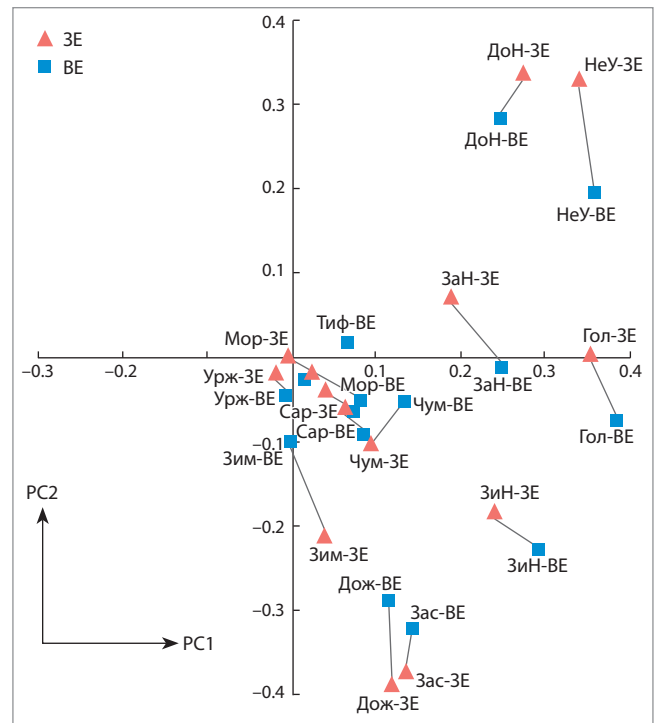
равным единице (для матрицы корреляций, вычисленной по исходной матрице данных с центрированными и нормированными признаками). Поэтому значение «1» можно считать границей, по превышению которой соответствующая главная компонента отражает существенный для описания выборки фактор. Следовательно, главные компоненты, собственные числа которых не дотягивают до этой границы, отнесены к несущественным. По аналогии со сложившейся в информатике и радиотехнике традицией (Оппенгейм, Шафер, 1979) будем называть информативный набор главных компонент сигналом (см. Приложение 1), а прочие, неинформативные, компоненты – статистическим шумом. В данном случае сигналом считаем старшие главные компоненты, PC1–PC12, на которые приходится около 66 % совокупной дисперсии изучаемой выборки данных. Их собственные векторы приведены в Приложении 3.

Первая главная компонента (PC1; 14.5 % общей дисперсии выборки) отражает влияние климатических (природных) факторов на повсеместные неурожаи и, как следствие, на голод как в Восточной, так и в Западной Европе. Наибольшие по абсолютной величине вклады в формирование PC1 дают признаки ЗаН-ВЕ, ДоН-ВЕ, ЗиН-ВЕ, ЗаН-ЗЕ, ДоН-ЗЕ, ЗиН-ЗЕ; как следствие, высоки вклады зависимых признаков НеУ-ВЕ, Гол-ВЕ, НеУ-ЗЕ и Гол-ЗЕ. Природу действующего фактора можно определить как «урожай vs. голод».

Вторая главная компонента (PC2; 7.5 % общей дисперсии) отражает влияние фактора, обуславливаемого совокупностью признаков Зас-ВЕ, Дож-ВЕ, ДоН-ВЕ, ЗиН-ВЕ, а также Зас-ЗЕ, Дож-ЗЕ, ДоН-ЗЕ, Зим-ЗЕ и НеУ-ЗЕ. При этом (для Западной Европы) вклады признаков Зас-ЗЕ, Дож-ЗЕ и Зим-ЗЕ, с одной стороны, и ДоН-ЗЕ и НеУ-ЗЕ, с другой, имеют разные знаки. Это может означать лишь то, что в Западной Европе влияние второго по силе фактора определяет главным условием неурожая избыток влаги в летний период. Напротив, для Восточной Европы подобные климатические причины не приводят к неурожаям, хотя и оказывают влияние на растениеводство в целом. Природу фактора, формирующего вторую главную компоненту, можно определить как различия в характере увлажнения Восточной и Западной Европы.

Обработка летописных данных, свидетельствующих о метеорологических экстремумах и неурожаях в Западной и Восточной Европе за 2600 лет, позволила оценить сходство рядов этих событий по положению признаков в фазовом пространстве главных компонент (см. рис. 2, Приложение 2). Для наглядности признаки, аналогичные для Восточной и Западной Европы, соединены линиями (см. рис. 2).

Третья главная компонента (PC3; 5.8 % общей дисперсии) показывает, что влияние повсеместных неурожая в Западной Европе сказывается лишь как угроза голода, тогда как в Восточной Европе угрозой представляет не столько голод, сколько эпидемии, а в первую очередь чума. Это связано при поисках пищи с контактами населения степных и лесостепных районов с мелкими животными (сурки, суслики, тарбаганы и пр.), обитателями степных ландшафтов, являющимися переносчиками чумы.



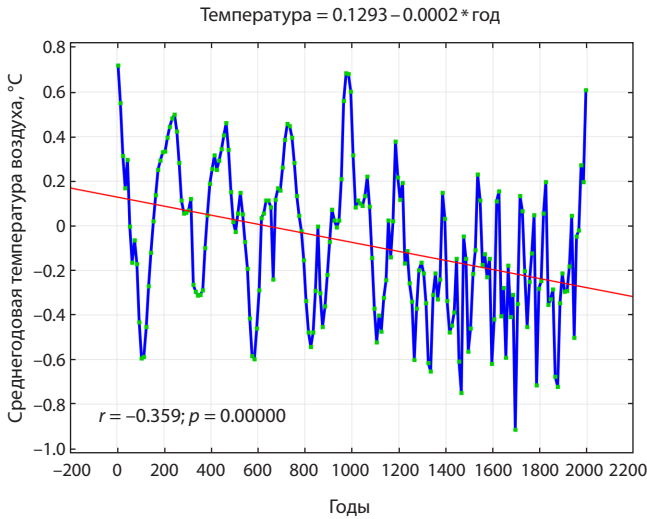
**Рис. 2.** Сходство проявлений характеристик лет в пространстве главных компонент PC1 и PC2.

ЗЕ – Западная Европа; ВЕ – Восточная Европа.

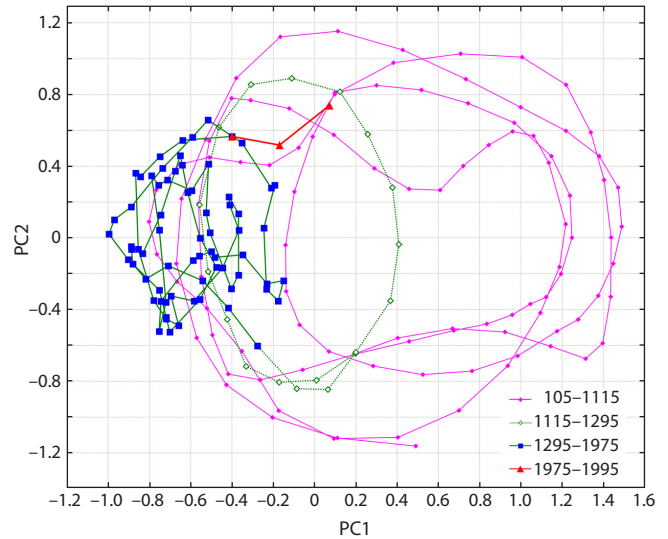
Связь эпидемий и эпизоотий с неурожайными годами можно объяснить снижением общей сопротивляемости организмов людей и домашних животных, вызванным недостатком пищи. Иным образом проявляется природа при вспышках численности («нашествиях») саранчи, обладающей уникальной способностью усиливать стадное поведение в поколениях, производимых на свет родительскими особями, выросшими в условиях дефицита пищи.

Для оценки изменения климата нами использован материал из работы А.М. Слепцова и В.В. Клименко (2005), в которой предпринята попытка реконструкции климата Восточной Европы (Русской равнины) на основе данных из четырех различных источников: инструментальных данных, исторических свидетельств, палинологических и дендрохронологических сведений. Динамика среднегодовой температуры воздуха Русской равнины восстановлена авторами для последних 2000 лет (рис. 3).

А.М. Слепцов и В.В. Клименко отмечают отрицательный тренд среднегодовых температур, четко проявившийся в последнее тысячелетие, а именно после 1200 г. и до второй половины XX в. Экстраполировав эти данные на следующее 50 лет, они делают вывод о том, что так называемое «глобальное потепление» на самом деле было антропогенным и спасло человечество от «глобального похолодания», которое, как показывает история XIV–XVIII вв., нанесло бы гораздо больший ущерб нашей цивилизации. Кроме того, они отмечают существование ярко выраженного примерно 200-летнего климатического ритма, тесно связанного с колебаниями солнечной активности (Слепцов, Клименко, 2005).



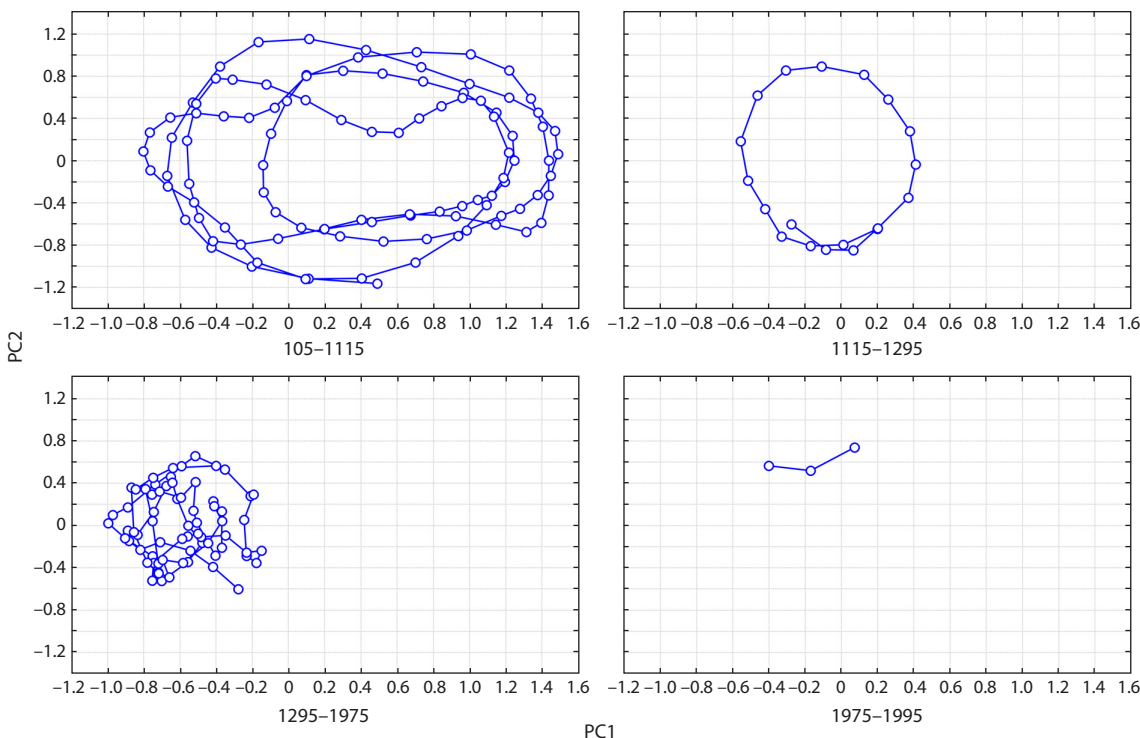
**Рис. 3.** Отклонения средней годовой температуры воздуха от современных значений для территории Русской равнины (осреднение по десятилетиям). По: (Слепцов, Клименко, 2005, рис. 3).



**Рис. 4.** Фазовый портрет динамики средней годовой температуры воздуха для территории Русской равнины на плоскости первых двух главных компонент (PC1 и PC2).

Четко виден относительно благополучный период с I по XII в. н. э. с последующим похолоданием после XII в. и протянувшийся почти до настоящего времени. Однако из данных, представленных на рис. 3, можно получить дополнительную информацию. При обработке этого временного ряда методом главных компонент (рис. 4 и 5) отчетливо видна его внутренняя неоднородность. Исходя из полученных коэффициентов корреляции первых двух главных

компонент (PC1 и PC2) со средней годовой температурой с различными лагами, можно сделать заключение, что первая главная компонента (PC1, 47.7 % дисперсии) отвечает за повышение температуры воздуха (потепление), в то время как вторая (PC2, 24.9 % дисперсии) – за ее производную (см. таблицу). Это означает, что, когда траектория ряда находится выше нуля по второй компоненте (PC2), она обязана двигаться вправо, т. е. в сторону повышения



**Рис. 5.** Фазовый портрет динамики средней годовой температуры воздуха для территории Русской равнины на плоскости первых двух главных компонент (PC1 и PC2) с разнесением по температурным режимам.

Коэффициенты корреляции (×1000) первых двух главных компонент  
со средней годовой температурой воздуха для территории Русской равнины с различными лагами

Лаг	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PC1	492	621	723	795	825	820	777	701	592	459
PC2	-638	-640	-518	-314	-106	132	348	542	653	646

Примечание. Светло-красный, светло-зеленый –  $p < 0.001$ ; красный, зеленый –  $p < 10^{-4}$ .

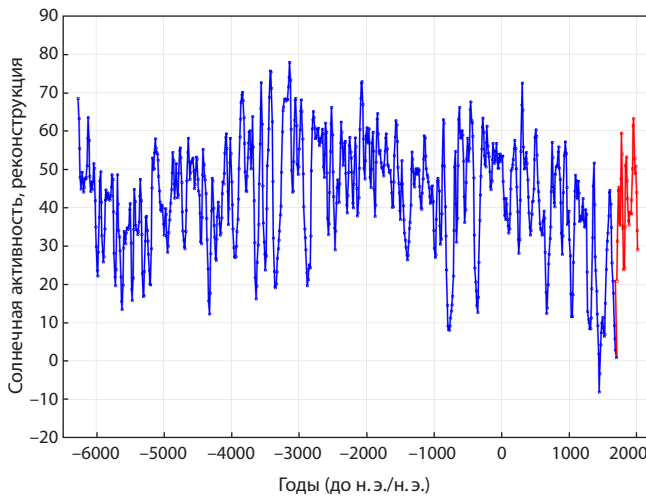


Рис. 6. Реконструкция солнечной активности за последние 9000 лет (из: Wu et al., 2018).

температуры, до тех пор, пока не спустится ниже нуля и не повернет обратно. Эта закономерность проявляется без заметных отклонений (рис. 6 и 7). При этом в анализируемом периоде времени выделяются четыре отрезка: режим циклических колебаний с периодом около 200 лет (105–1115 гг.), переходный режим (1115–1295 гг.), режим квазихаотических колебаний (1295–1975 гг.) и режим «повышение температуры» (начавшийся после 1975 г. и продолжающийся до настоящего времени) (см. рис. 4 и 5).

Исходя из фазового портрета (см. рис. 6 и 7), траектория рассматриваемого временного ряда, во-первых, уже вышла за пределы, в которых она находилась в течение последних семи столетий; во-вторых, она еще не вышла за пределы, в которых находилась в течение всего I тыс. и начала II тыс. н. э.; в-третьих, не исключается возможность, что возвращается режим циклических колебаний температур, характерный для I тыс. н. э. Если это заключение верно, то и без антропогенного воздействия в ближайшие 50–60 лет можно ожидать продолжения повышения температур по естественным, не связанным с антропогенным воздействием, причинам.

Приведенные результаты обработки временных рядов (см. рис. 4–6) подтверждают выводы нашего предыдущего анализа (Ефимов, Гончаров, 2013). А именно: климат в Западной и Восточной Европе по неустановленным на сегодняшний день причинам испытывает многовековые колебания и резко переходит из одного режима в другой. Особенно заметны переходы в I и II тыс. н. э. и в XIV–XVIII вв. Наблюдаемые в настоящее время резкие клима-

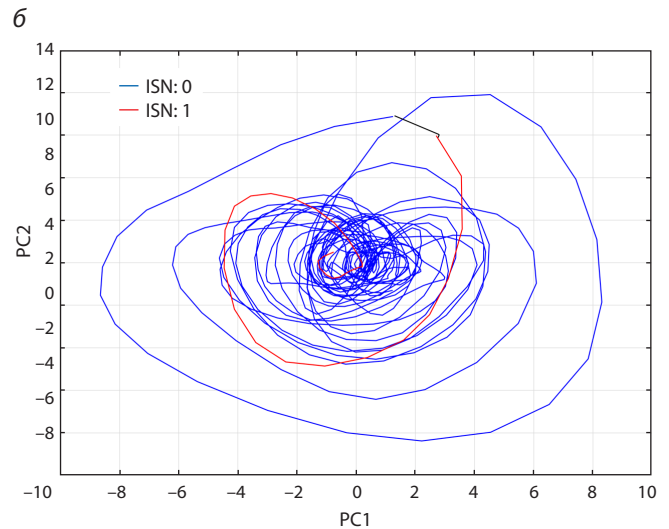
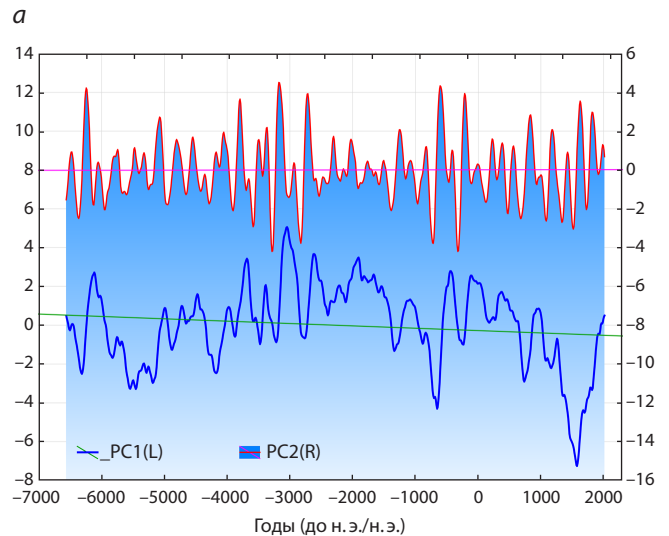


Рис. 7. Первые две главные компоненты (PC1 и PC2) солнечной активности за последние 9000 лет (а) и их фазовый портрет (б). Дисперсия PC1 = 36.3 %, PC2 = 28.5 %.

тические изменения (см. рис. 6 и 7), возможно, являются очередным переходом из одного климатического режима в другой, ближайший аналог которого более теплый и засушливый, чем современный, режим I тыс. н. э.

Кроме того, методы многомерного анализа позволяют выделить резко отличающиеся интервалы различного влияния теплового потока на нашу планету (см. рис. 7). В соответствии с реконструкцией данных солнечной активности за последние 9000 лет (см. рис. 7, а) есть все

основания предположить, что в настоящее время она в виде теплового потока на нашу планету претерпевает серьезные изменения (Wu et al., 2018). Начало этих изменений следует отнести как минимум к XVI–XVII вв., что автоматически исключает гипотезу антропогенного воздействия как главной причины современного изменения климата. Нужно отметить (см. рис. 7, а), что I тыс. н.э. теплее, причем как по сравнению с предшествующим I тыс. до н.э., так и с последующим II тыс. н.э.

## Обсуждение

Согласно анализу результатов С.И. Бараша (1989), «голодными» в Восточной Европе становятся годы, для которых характерны либо засухи, либо чрезмерные дожди в ареалах, сопоставимых с масштабами субконтинента (см. рис. 2, Приложение 2). Аналогичные зависимости проявляются и в Западной Европе, при этом связь между голодом и чрезмерным выпадением осадков на ее территории более ярко выражена, в то время как суровость зим в Восточной Европе обуславливает голод чаще, чем в Западной. Такие различия между субконтинентами обусловлены их географическими особенностями. Западная Европа, вытянутая с юго-запада на северо-восток, представляет собой естественную преграду, о которую разбиваются воды Гольфстрима – основного источника дополнительного тепла и влаги со стороны Атлантики (Hendry, 1982; Hogg, 1992; Hogg, Johns, 1995). Воздействие полярных воздушных масс на этом субконтиненте выражено не столь отчетливо, как в Восточной Европе. Напротив, влияние Гольфстрима на Восточную Европу сильно ослаблено, холодные массы арктического воздуха весьма существенно влияют на развитие растений. При этом вымерзание озимых культур более значимо для Восточной Европы, где они занимают существенную долю посевных площадей, чем для Западной.

Корреляция эпидемий чумы с неурожаями в Восточной Европе почти в два раза выше, чем в Западной (см. Приложение 2). Возможно, это связано с преимущественно аридным степным характером восточноевропейских агроландшафтов с наличием популяций степных грызунов, являющихся первичными распространителями этой болезни. Именно они при недостатке питания вплотную приближаются к жилищу человека. Другая ситуация с вирусом оспы: корреляции в данном случае невысоки как для Восточной Европы, так и для Западной. Вирус оспы передается от человека к человеку без промежуточных распространителей. Влияет только активное перемещение людей по территориям.

Климат в Западной и Восточной Европе по неустоявшимся естественным причинам испытывает многовековые колебания, резко переходящие из одного режима в другой (см. рис. 3). Наиболее вероятная причина таких колебаний – крупномасштабные (порядка тысячелетий) изменения теплового потока, приходящего на Землю от Солнца. Особенно заметные переходы отмечались при наступлении I и II тыс. н.э. и в XIV–XVIII вв. Наблюдаемые в наше время климатические изменения, возможно, являются либо очередным переходом в новый, пока неизвестный, климатический режим, либо продолжением уже наступившего полтысячелетия назад холодного климатического ре-

жима. Идущее сейчас глобальное потепление фактически началось в середине прошлого тысячелетия (в XX веке), но на фоне беспрецедентного похолодания («малого ледникового периода» в XIV–XVIII вв.) оно долгое время воспринималось как возврат к климатической норме. Только в настоящее время возникло представление о том, что если потепление продолжится дальше, то оно может вызвать катастрофические последствия, к которым необходимо готовиться заранее. Поскольку основной причиной таких изменений декларировано антропогенное воздействие, то естественным следствием стала иллюзия, что человечеству под силу изменить климат.

Вопрос о ведущей причине изменения климатических режимов, несмотря на давнюю историю его всестороннего изучения и практическую значимость, все еще не решен современной наукой. Одни исследователи считают главной причиной антропогенное влияние (и уже успели получить за это три Нобелевские премии: в 2007 г. – премию мира (Solomon et al., 2007), в 2018 г. – по экономике (Nordhaus, 2019), в 2021 г. – по физике (Manabe, 2019, 2023)), тогда как другие – очередным витком естественных колебаний климата (Usoskin et al., 2014; Lobkovsky et al., 2022; и др.).

Поскольку Земля практически все тепло получает от Солнца, то встает вопрос о закономерностях динамики теплового потока и возможности прогноза его изменения. Естественно, что в первую очередь изучаются направления преимущественного движения показателей (тренд) и цикличность динамики. Однако на примере солнечной активности четко видна зависимость результатов от масштаба рассматриваемого периода. Если, например, ограничиться эпохой прямых регулярных наблюдений солнечной активности (последние 300 лет), то прежде всего выявляется так называемая 11-летняя цикличность, а если ее «снять», то восходящий тренд не вызывает никаких сомнений и прогнозом может быть только дальнейшее безграничное возрастание (что, собственно, сейчас и происходит).

Если увеличить масштаб рассмотрения до 1000 лет, то видна средневековая «яма» в середине II тыс. н.э., из которой мы только сейчас выходим. Прогнозом, очевидно, может быть только дальнейший подъем. При увеличении масштаба рассмотрения до трех тысячелетий видно, что «провалы» случались и раньше, но не такой большой глубины как сейчас, поэтому после выхода из провала динамика начинает медленно дрейфовать в сторону похолодания, сопровождаясь более мелкими колебаниями. Прогнозом будут недолгое повышение и последующий пологий дрейф в сторону понижения. Если рассмотреть максимально доступную на сегодняшний день «длинную» информацию (см. рис. 6), то видно, что очень значительные «провалы» случались и посреди максимальных подъемов, например на рубеже IV и III тыс. до н.э. Возможно, подобное изменение может случиться и в XXI столетии. Причина «провалов» неизвестна, и надежных статистических закономерностей пока не выявлено.

## Заключение

В литературе уже давно обсуждаются перспективы использования климатических моделей в разработке превентивных мер адаптации в различных областях жизне-

деятельности человека к происходящим и ожидаемым изменениям климата (Катцов и др., 2011; и др.). Климат полностью контролирует то, что будет жить и расти в конкретном биоме. В последнее время исследования влияния изменения климата на сельское хозяйство приобрели широкий размах (Раунер, 1981; Sirotenko, 2001; Золотокрылин и др., 2020; Cooper, Messina, 2023; и др.). Однако разброс модельных оценок реакции сельскохозяйственного производства для многих регионов чрезвычайно высокий. Основная причина этого – различия в исходной метеорологической информации, способах ее обобщения и в используемых методах получения оценки влияния.

Изменение парадигмы селекции, обусловленной прогнозами потенциального потепления, наиболее часто обсуждается в связи с возможной аридизацией значительных территорий (Трифонов, Караханян, 2004) и, как следствие, с необходимостью повышения засухоустойчивости возделываемых культур (Zotova et al., 2020; Cooper, Messina, 2023) и поиском новых перспективных для культивирования засухоустойчивых видов растений (Baltzoi et al., 2015). При этом стратегии адаптации к изменениям климата могут включать более точное соответствие фенологии растений наличию влаги (Сессарецци и др., 2010); расширение доступа к набору сортов с разной скороспелостью (Смоленская, Гончаров, 2023), для того чтобы избежать проявлений у них стресса в критические периоды жизненного цикла; повышение эффективности водопользования и переориентации на селекцию сортов нового поколения для обеспечения буфера против растущей непредсказуемости (Сессарецци и др., 2010). В любом случае селекционерам в настоящее время необходимо учитывать высокую вероятность изменения климата на десятки лет вперед, даже если и не будут достигнуты наблюдаемые ранее уровни экстремумов, которые могут привести к аридизации значительных территорий и сдвигу агрозон в направлении с юга на север. В связи с этим создание скороспелых сортов в качестве превентивных мер повышения адаптивности агробиocenозов является очень актуальной задачей.

## Список литературы / References

Бараш С.И. История неурожаев и погоды в Европе. Л.: Гидрометеоздат, 1989  
[Barash S.I. History of Crop Failures and Weather in Europe. Leningrad: Gidrometeoizdat Publ., 1989 (in Russian)]  
Гончаров Н.П. Доместикация растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/2):884-899  
[Goncharov N.P. Plant domestication. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4/2): 884-899 (in Russian)]  
Гончаров Н.П., Чикида Н.Н. Генетика типа развития у *Aegilops squarrosa* L. *Генетика*. 1995;31(3):396-399  
[Goncharov N.P., Chikida N.N. Genetics of the growth habit in *Aegilops squarrosa* L. *Genetika (Moscow)*. 1995;31(3):343-346]  
Гурова Т.А., Осипова Г.М. Проблема сопряженной стрессоустойчивости растений при изменении климата в Сибири. *Сиб. вестн. с.-х. науки*. 2018;48(2):81-92. DOI 10.26898/0370-8799-2018-2-11  
[Gurova T.A., Osipova G.M. The problem of combined stress resistance of plants under climate change in Siberia. *Sibirskiy Vestnik Sel'skokhozyaystvennoy Nauki* = *Siberian Herald of Agricultural*

*Science*. 2018;48(2):81-92. DOI 10.26898/0370-8799-2018-2-11 (in Russian)]  
Ефимов В.М., Гончаров Н.П. Погодные экстремумы и неурожай в Европе. В: Десятое сибирское совещание по климатологическому мониторингу. Тез. рос. конф. Томск, 14-17 октября 2013 г. Томск: Аграф-Пресс, 2013;53  
[Efimov V.M., Goncharov N.P. Weather extremes and crop failures in Europe. In: Abstracts from the Tenth Siberian Meeting on Climate-Ecological Monitoring. Tomsk, October 14-17, 2013. Tomsk: Agraf-Press Publ., 2013;53 (in Russian)]  
Ефимов В.М., Галактионов Ю.К., Шушпанова Н.Ф. Анализ и прогноз временных рядов методом главных компонент. Новосибирск: Наука, 1988  
[Efimov V.M., Galaktionov Yu.K., Shushpanova N.F. Analysis and Forecast of Time Series by the Principal Component Method. Novosibirsk: Nauka Publ., 1988 (in Russian)]  
Золотокрылин А.Н., Черенкова Е.А., Титкова Т.Б. Аридизация засушливых земель Европейской части России и связь с засухами. *Изв. РАН. Сер. географическая*. 2020;84(2):207-217. DOI 10.31857/S258755662002017X  
[Zolotokrylin A.N., Cherenkova E.A., Titkova T.B. Aridization of drylands in the European part of Russia: Secular trends and links to droughts. *Izvestiya Rossiiskoi Akademii Nauk. Seriya Geograficheskaya* = *Bulletin of the RAS. Geographic Series*. 2020;84(2):207-217. DOI 10.31857/S258755662002017X (in Russian)]  
Катцов В.М., Мелешко В.П., Хлебникова Е.И., Школьник И.М. Оценка климатических воздействий на сельское хозяйство России в первой половине XXI века: современные возможности физико-математического моделирования. *Агрофизика*. 2011;(3): 22-30  
[Kattsov V.M., Meleshko V.P., Khlebnikova E.I., Shkolnik I.M. Assessment of climate impacts on agriculture in Russia over the first half of the XXI century: current opportunities provided by numerical modeling. *Agrofizika* = *Agrophysica*. 2011;(3):22-30 (in Russian)]  
Оппенгейм А.В., Шафер Р.В. Цифровая обработка сигналов. М.: Связь, 1979  
[Oppenheim A.V., Schaffer R.W. Digital Signal Processing. New Jersey: Pearson, 1975]  
Раунер Ю.Л. Климат и урожайность зерновых культур. М.: Наука, 1981  
[Rauner Yu.L. Climate and Crop Productivity. Moscow: Nauka Publ., 1981 (in Russian)]  
Слепцов А.М., Клименко В.В. Обобщение палеоклиматических данных и реконструкция климата Восточной Европы за последние 2000 лет. *История и современность*. 2005;(1):118-135  
[Sleptsov A.M., Klimentko V.V. Generalization of paleoclimatic data and reconstruction of the climate of Eastern Europe for the last 2000 years. *Istoriya i Sovremennost'* = *History and Modernity*. 2005;(1):118-135 (in Russian)]  
Смоленская С.Э., Гончаров Н.П. Аллельное разнообразие генов *Vrn* и контроль типа и скорости развития у пшениц. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(8):933-946. DOI 10.18699/VJGB-23-108  
[Smolenskaya S.E., Goncharov N.P. Allelic diversity of the *Vrn* genes and the control of growth habit and earliness in wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(8):933-946. DOI 10.18699/VJGB-23-108 (in Russian)]  
Смоленская С.Э., Ефимов В.М., Кручинина Ю.В., Немцев Б.Ф., Челурнов Г.Ю., Овчинникова Е.С., Белан И.А., Зуев Е.В., Чжоу Чэньси, Пискарев В.В., Гончаров Н.П. Скороспелость и морфотип сортов мягкой пшеницы Западной и Восточной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(7):662-674. DOI 10.18699/VJGB-22-81  
[Smolenskaya S.E., Efimov V.M., Kruchinina Yu.V., Nemtsev B.F., Chelurnov G.Yu., Ovchinnikova E.S., Belan I.A., Zuev E.V., Zhou Chenxi, Piskarev V.V., Goncharov N.P. Earliness and morpho-

- types of common wheat cultivars of Western and Eastern Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(7):662-674. DOI 10.18699/VJGB-22-81 (in Russian)]
- Сухих И.С., Вавилова В.Ю., Блинов А.Г., Гончаров Н.П. Разнообразие и фенотипический эффект аллельных вариантов генов короткостебельности *Rht* у пшениц. *Генетика*. 2021;57(2):127-139. DOI 10.31857/S0016675821020107
- [Sukhikh I.S., Vavilova V.Y., Blinov A.G., Goncharov N.P. Diversity and phenotypical effect of the allelic variants of *Rht* dwarfing genes in wheat. *Russ. J. Genet.* 2021;57(2):127-138. DOI 10.1134/S1022795421020101]
- Трифонов В.Г., Караханян А.С. Геодинамика и история цивилизаций. М.: Наука, 2004
- [Trifonov V.G., Karakhanyan A.S. Geodynamics and History of Civilizations. Moscow: Nauka Publ., 2004 (in Russian)]
- Шнирельман В.А. Возникновение производящего хозяйства: Очаги древнейшего земледелия. М.: Либроком, 2012
- [Shnirelman V.A. The Emergence of a Productive Economy: Centers of Ancient Agriculture. Moscow: Librokom Publ., 2012 (in Russian)]
- Atkinson M.D., Kettlewell P.S., Poulton P.R., Hollins P.D. Grain quality in the Broadbalk Wheat Experiment and the winter North Atlantic Oscillation. *J. Agric. Sci.* 2008;146(5):541-549. DOI 10.1017/S0021859608007958
- Baltzoi P., Fotia K., Kyrkas D., Nikolaou K., Paraskevopoulou A.T., Accogli A.R., Karras G. Low water-demand plants for landscaping and agricultural cultivations – A review regarding local species of Epirus/Greece and Apulia/Italy. *Agric. Agric. Sci. Procedia*. 2015;4: 250-260. DOI 10.1016/j.aaspro.2015.03.029
- Biswas A., Karak B.B., Usoskin I., Weisshaar E. Long-term modulation of solar cycles. *Space Sci. Rev.* 2023;219(3):19. DOI 10.1007/s11214-023-00968-w
- Ceccarelli S., Grando S., Maatougui M., Michael M., Slash M., Haghparast R., Rahmanian M., Taheri A., Al-Yassin A., Benbelkacem A., Labdi M., Mimoun H., Nachit M. Plant breeding and climate changes. *J. Agric. Sci.* 2010;148(6):627-637. DOI 10.1017/S0021859610000651
- Clette F., Svalgaard L., Vaquero J.M., Cliver E.W. Revisiting the sunspot number: A 400-year perspective on the solar cycle. *Space Sci. Rev.* 2014;186:35-103. DOI 10.1007/s11214-014-0074-2
- Cooper M., Messina C.D. Breeding crops for drought-affected environments and improved climate resilience. *Plant Cell*. 2023;35(1):162-186. DOI 10.1093/plcell/koac321
- Eastwood R.J., Tambam B.B., Aboagye L.M., Akparov Z.I., Aladele S.E., Allen R., Amri A., ... Tapia Toll J., Vu D.T., Vu T.D., Way M.J., Yazbek M., Zorrilla C., Kilian B. Adapting agriculture to climate change: A synopsis of coordinated National Crop Wild Relative Seed Collecting Programs across five continents. *Plants*. 2022;11(14):1840. DOI 10.3390/plants11141840
- Eckardt N.A., Ainsworth E.A., Bahuguna R.N., Broadley M.R., Busch W., Carpita N.C., ... Rim E.Y., Ronald P.C., Salt D.E., Shigenaga A.M., Wang E., Wolfe M., Zhang X. Climate change challenges, plant science solutions. *Plant Cell*. 2023;35(1):24-66. DOI 10.1093/plcell/koac303
- Efimov V.M., Efimov K.V., Polunin D.A., Kovaleva V.Y. New possibilities of the PCA-Seq method in the analysis of time series (on the example of solar activity). *J. Phys. Conf. Ser.* 2021;2099(1):012034. DOI 10.1088/1742-6596/2099/1/012034
- Gower J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*. 1966;53(3-4):325-338. DOI 10.1093/biomet/53.3-4.325
- Gupta A. Origin of agriculture and domestication of plants and animals linked to early Holocene climate amelioration. *Curr. Sci.* 2004; 87(1):54-59
- Hendry R.M. On the structure of the deep Gulf Stream. *J. Mar. Res.* 1982;40(1):119-142
- Hogg N.G. On the transport of the Gulf Stream between Cape Hatteras and the Grand Banks. *Deep-Sea Res.* 1992;39(7-8):1231-1246. DOI 10.1016/0198-0149(92)90066-3
- Hogg N.G., Johns W.E. Western boundary currents. *Rev. Geophys.* 1995;33(S2):1311-1334. DOI 10.1029/95RG00491
- Jatayev S., Sukhikh I., Vavilova V., Smolenskaya S.E., Goncharov N.P., Kurishbayev A., Zotova L., Absattarova A., Serikbay D., Hu Y.-G., Borisjuk N., Gupta N.P., Jacobs B., de Groot S., Koekemoer F., Alharthi B., Lethola K., Cu D., Schramm C., Anderson P., Jenkins C., Soole K.L., Shavrukov Y., Langridge P. Green revolution 'stumbles' in a dry environment: Dwarf wheat plants with *Rht* genes fail to produce higher yield than taller genotypes under drought. *Plant Cell Environ.* 2020;43(10):2355-2364. DOI 10.1111/pce.13819
- Kamran A., Iqbal M., Spaner D. Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): A key factor for global adaptability. *Euphytica*. 2014; 197:1-26. DOI 10.1007/s10681-014-1075-7
- Karhunen K. Über lineare Methoden in der Wahrscheinlichkeitsrechnung. *Ann. Acad. Sci. Fennicae. Ser. A. I. Math.-Phys.* 1947;37:1-79.
- Leigh F.J., Wright T.I., Horsnell R.A., Dyer S., Bentley A.R. Progenitor species hold untapped diversity for potential climate-responsive traits for use in wheat breeding and crop improvement. *Heredity*. 2022;128(5):291-303. DOI 10.1038/s41437-022-00527-z
- Liang Y., Tian F. Plant genetics: Mechanisms of wild soybean adaptation. *Curr. Biol.* 2023;33(2):R82-R84. DOI 10.1016/j.cub.2022.12.009
- Liu Z., Hu Z., Lai X., Cao J., Zhang J., Ma X., Zhang X., Wang X., Ji W., Xu S. Multi-environmental population phenotyping suggests the higher risks of wheat *Rht-B1b* and *Rht-D1b* cultivars in global warming scenarios. *bioRxiv*. 2022;07:500398. DOI 10.1101/2022.07.18.500398
- Lobell D.B., Gourdji S.M. The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiol.* 2012;160(4):1686-1697. DOI 10.1104/pp.112.208298
- Lobkovsky L.I., Baranov A.A., Ramazanov M.M., Vladimirova I.S., Gabsatarov Y.V., Semiletov I.P., Alekseev D.A. Trigger mechanisms of gas hydrate decomposition, methane emissions, and glacier breakups in polar regions as a result of tectonic wave deformation. *Geosciences*. 2022;12(10):372. DOI 10.3390/geosciences12100372
- Loève M. Fonctions Aléatoires de Second Ordre. In: Lévy P. (Ed.). *Processus Stochastique et Mouvement Brownien*. Paris: Gauthier-Villars, 1948;366-420
- Manabe S. Role of greenhouse gas in climate change. *Tellus A: Dyn. Meteorol. Oceanogr.* 2019;71(1):1620078. DOI 10.1080/16000870.2019.1620078
- Manabe S. Nobel Lecture: Physical modeling of Earth's climate. *Rev. Mod. Phys.* 2023;95(1):010501. DOI 10.1103/RevModPhys.95.010501
- Morgounov A., Sonder K., Abugaliev A., Bhadauria V., Cuthbert R.D., Shamanin V., Zelenskiy Yu., DePauw R.M. Effect of climate change on spring wheat yields in North America and Eurasia in 1981-2015 and implications for breeding. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204932. DOI 10.1371/journal.pone.0204932
- Nordhaus W. Climate change: The ultimate challenge for economics. *Am. Econ. Rev.* 2019;109(6):1991-2014. DOI 10.1257/aer.109.6.1991
- Pearson K.L. III. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos. Mag.* 1901;2(11):559-572
- Prentice R. Cultural responses to climate change in the Holocene. *Anthos*. 2009;1(1):3. DOI 10.15760/anthos.2009.41
- Ruddiman W.F., Fuller D.Q., Kutzbach J.E., Tzedakis P.C., Kaplan J.O., Ellis E.C., Vavrus S., Roberts J., Fyfe C.N., He R.F., Lemmen C., Woodbridge J. Late Holocene climate: Natural or anthropogenic? *Rev. Geophys.* 2016;54(1):93-118. DOI 10.1002/2015RG000503
- Sirotenko O.D. Crop modeling: Advances and problems. *Agron. J.* 2001;93(3):650-653. DOI 10.2134/agronj2001.933650ax
- Solanki S.K., Usoskin I.G., Kromer B., Schüssler M., Beer J. An unusually active Sun during recent decades compared to the previous



- 11,000 years. *Nature*. 2004;431(7012):1084-1087. DOI 10.1038/nature02995
- Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K., Tignor M., Miller H. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007
- Takens F. Detecting strange attractors in turbulence. In: Rand D., Young L.S. (Eds). *Dynamical Systems and Turbulence*. Warwick 1980. Lecture Notes in Mathematics. Vol. 898. Berlin: Springer, 1981;366-381. DOI 10.1007/BFb0091924
- Toynbee A.J. *A Study of History*. London: Oxford University Press, 1954
- Trifonova A.A., Dedova L.V., Zuev E.V., Goncharov N.P., Kudryavtsev A.M. Comparative analysis of the gene pool structure of *Triticum aethiopicum* wheat accessions conserved *ex situ* and recollected in field after 85 year later. *Biodivers. Conserv.* 2021;30(2):329-342. DOI 10.1007/s10531-020-02091-6
- Usoskin I.G., Hulot G., Gallet Y., Roth R., Licht A., Joos F., Kovaltsov G.A., Thebault E., Khokhlov A. Evidence for distinct modes of solar activity. *Astron. Astrophys.* 2014;562(1):L10. DOI 10.1051/0004-6361/201423391
- Wu C.J., Usoskin I.G., Krivova N., Kovaltsov G.A., Baroni M., Bard E., Solanki S.K. Solar activity over nine millennia: A consistent multi-proxy reconstruction. *Astron. Astrophys.* 2018;615:A93. DOI 10.1051/0004-6361/201731892
- Zotova L., Shamambaeva N., Lethola K., Alharthi B., Vavilova V., Smolenskaya S.E., Goncharov N.P., Jatayev S., Kurishbayev A., Gupta N.K., Gupta S., Schramm C., Anderson P., Jenkins C.L.D., Soole K.L., Shavrukov Yu. *TaDrAp1* and *TaDrAp2*, Partner genes of a transcription repressor, coordinate plant development and drought tolerance in spelt and bread wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(21): 8296. DOI 10.3390/ijms21218296

---

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-16-20026) и Правительства Новосибирской области.

**Прозрачность финансовой деятельности.** Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.


**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.03.2023. После доработки 13.11.2023. Принята к публикации 18.11.2023.

DOI 10.18699/vjgb-24-19

## Изучение генетической коллекции земляники (*Fragaria L.*) по устойчивости к мучнистой росе

А.С. Лыжин  , И.В. Лукьянчук 

Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина, Мичуринск, Россия  
 Ranenburzhetc@yandex.ru

**Аннотация.** Мучнистая роса (*Sphaerotheca macularis* Mag. (син. *Podosphaera aphanis* Wallr.)) – опасное заболевание земляники (*Fragaria L.*). Устойчивость земляники к мучнистой росе контролируется полигенно. У различных сортов земляники садовой идентифицировано несколько генетических локусов (QTL) с большим вкладом в устойчивость к болезни. Для QTL 08 *To-f* разработаны диагностические ДНК-маркеры, показавшие высокий уровень надежности выявления гена в картирующих популяциях. Цель настоящего исследования – изучение генетической коллекции земляники по устойчивости к мучнистой росе и идентификация перспективных для селекции на устойчивость к *S. macularis* форм. Объектами исследования были дикорастущие виды рода *Fragaria L.*, сорта и отборные сеянцы земляники садовой (*F. × ananassa* Duch.) селекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина, а также формы, интродуцированные из различных эколого-географических регионов. Для идентификации QTL 08 *To-f* использовали маркеры IB535110 и IB533828. Локус 08 *To-f* обнаружен у 23.2 % генотипов земляники, в том числе у дикорастущих видов *F. moschata* и *F. orientalis*, сортов земляники садовой отечественной (Былинная, Сударушка) и зарубежной (Florence, Korona, Malwina, Ostara, Polka, Red Gauntlet) селекции. Степень корреляции между наличием маркеров IB535110 и IB533828 и фенотипической устойчивостью (признаки поражения мучнистой росой отсутствуют) составила 0.649. Коэффициент детерминации ( $R^2$ ), показывающий вклад изучаемого локуса в формирование признака, равен 0.421, т.е. в 42.1 % случаев устойчивость определяется наличием QTL 08 *To-f*, тогда как в 57.9 % случаев влияние оказывают факторы внешней среды. Все генотипы земляники с локусом 08 *To-f* характеризуются высокой полевой устойчивостью к *S. macularis* в условиях г. Мичуринска Тамбовской области. Таким образом, локус 08 *To-f* является перспективным для придания устойчивости к местным расам мучнистой росы, а маркеры IB535110 и IB533828 могут быть использованы в программах маркер-опосредованной селекции по созданию устойчивых к мучнистой росе генотипов земляники.

Ключевые слова: земляника; мучнистая роса; устойчивость; молекулярные маркеры; QTL.

**Для цитирования:** Лыжин А.С., Лукьянчук И.В. Изучение генетической коллекции земляники (*Fragaria L.*) по устойчивости к мучнистой росе. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):166-174. DOI 10.18699/vjgb-24-19

## Study of a genetic collection of strawberry (*Fragaria L.*) for resistance to powdery mildew

A.S. Lyzhin  , I.V. Luk'yanchuk 

I.V. Michurin Federal Scientific Center, Michurinsk, Russia  
 Ranenburzhetc@yandex.ru

**Abstract.** Powdery mildew (*Sphaerotheca macularis* Mag. (syn. *Podosphaera aphanis* Wallr.)) is a dangerous disease of strawberry (*Fragaria L.*). The resistance of strawberry to powdery mildew is controlled polygenically. Several genetic loci with a large contribution to disease resistance have been identified in various strawberry varieties. Diagnostic DNA markers have been developed for QTL 08 *To-f*. They showed a high level of reliable gene detection in mapping populations. The purpose of this study was assessment of a strawberry genetic collection for resistance to powdery mildew and identification of promising strawberry forms for breeding for resistance to *S. macularis*. The objects of the study were wild species of the genus *Fragaria L.*, varieties and selected seedlings of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) created in the I.V. Michurin Federal Scientific Center, and strawberry varieties introduced from various ecological and geographical regions. To identify QTL 08 *To-f*, DNA markers IB535110 and IB533828 were used. Locus 08 *To-f* was detected in 23.2 % of the analyzed strawberry genotypes, including wild species *F. moschata* and *F. orientalis*, strawberry varieties of Russian breeding (Bylinnaya and Sudarushka) and foreign breeding (Florence, Korona, Malwina, Ostara, Polka and Red Gauntlet). The correlation between the presence of markers IB535110 and IB533828 and phenotypic resistance (powdery mildew effect on strawberry plants is absent) was 0.649. The determination coefficient ( $R^2$ ) showing the contribution of the studied locus to the manifestation of the trait was 0.421, that is, in 42.1 % of cases resistance was explained by the presence of QTL 08 *To-f*, and in 57.9 % of cases, by other genetic factors. All strawberry genotypes with locus 08 *To-f* were characterized by high field resistance to *S. macularis* in the conditions of

Michurinsk, Tambov region. Thus, locus *08 To-f* is promising for conferring resistance on local powdery mildew races, and markers IB535110 and IB533828 can be used in marker-assisted breeding programs to create powdery mildew-resistant strawberry genotypes.

Key words: strawberry; powdery mildew; resistance; molecular markers; QTL.

**For citation:** Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I.V. Study of a genetic collection of strawberry (*Fragaria L.*) for resistance to powdery mildew. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):166-174. DOI 10.18699/vjgb-24-19

## Введение

Мучнистая роса – опасное заболевание растений земляники. Возбудителем является облигатный биотрофный гриб *Sphaerotheca macularis* Mag. (син. *Podosphaera aphanis* Wallr.). Наибольший вред насаждениям наносит конидиальная стадия патогена – *Oidium fragariae* Harz. (Холод, Семенова, 2014; Taria et al., 2021). Мучнистая роса поражает все надземные органы растения и визуально проявляется в виде белого мучнистого налета мицелия и конидий гриба. Сильно пораженные листья закручиваются вверх в форме лодочки, зараженные цветоносы формируют деформированные плоды, усы и молодые розетки отстают в росте и впоследствии погибают (Kennedy et al., 2013; Стольникова, Колесникова, 2017). Потери урожая от поражения растений земляники мучнистой росой могут превышать 60 % (Nelson et al., 1995; Lifshitz et al., 2007).

Особенно большой ущерб мучнистая роса наносит насаждениям земляники защищенного грунта (теплицы, парники, тоннели) ввиду складывающихся благоприятных условий для развития патогена – повышенной температуры и влажности (Sylla et al., 2013; Taria et al., 2021). Развитию патогена способствуют теплая погода (температура 18–24 °C) и высокая влажность воздуха (около 100 %). Спад болезни наблюдается при чрезмерной сухости воздуха или обилии осадков (они смывают значительную часть спор и улучшают состояние растений), а также при температурах ниже 15 °C и выше 30 °C (Зубов, 1990, 2004). Отмечена тенденция более раннего проявления болезни весной после теплых и снежных зим. В более суровые бесснежные зимы основной запас инфекции погибает и наблюдается позднее и слабое развитие патогена (Горова, Горов, 2004).

Контроль распространения *S. macularis* в насаждениях земляники обеспечивается в первую очередь применением фунгицидов контактного (сера) и системного (каптан, беномил) действия (Vajrai et al., 2019; Palmer, Holmes, 2021). Однако активное применение химических средств защиты растений противоречит мировой тенденции развития сельскохозяйственного производства – его биологизации и экологизации (Жученко, 2009; Gorgitano, Pirilli, 2016). Кроме того, *S. macularis* характеризуется высокой способностью вырабатывать резистентность к фунгицидам (Cargisse, Bouchard, 2010; Sombardier et al., 2010). В связи с этим перспективное направление повышения резистентности – выявление из существующего сортимента и создание новых сортов с генетически детерминированной устойчивостью к патогенам.

Устойчивость сортов земляники садовой к мучнистой росе контролируется полигенно, на формирование признака в зависимости от генотипа оказывают влияние аддитивные и неаддитивные генные эффекты. Наследуемость

признака ( $H^2$ ), по разным оценкам, колеблется от средней до высокой ( $H^2 = 0.44–0.94$ ), что свидетельствует о перспективности селекционного повышения устойчивости (Kennedy et al., 2014). Анализ наследования устойчивости к *S. macularis* в гибридных комбинациях показывает непрерывную изменчивость гибридов от устойчивых до восприимчивых форм, в ряде комбинаций возможна трансгрессия (аддитивная компонента), приводящая к появлению сеянцев, превосходящих по устойчивости родительские формы. Аддитивные эффекты, по сообщениям ряда авторов (Зубов, 2004; Kennedy et al., 2014), играют основную роль в формировании устойчивости земляники к мучнистой росе.

Некоторые исходные формы земляники (дикорастущие виды *F. orientalis*, *F. moschata*, *F. ovalis*, межвидовые гибриды 298-22-19-21 (FB<sub>2</sub> *F. orientalis*, *F. moschata*, *F. × ananassa*), 778-7 (FB<sub>2</sub> *F. ovalis*, *F. × ananassa*), 297-22-124, 297-28-84 (FB<sub>1</sub> *F. orientalis*, *F. × ananassa*)) способны передавать высокий уровень устойчивости большому числу гибридных форм, независимо от комбинации скрещивания (неаддитивная компонента). Преобладание неаддитивных генных эффектов позволяет выделять доноры устойчивости земляники к мучнистой росе (Зубов, 2004; Davik, Honne, 2005).

В последние годы также обнаружено несколько главных локусов количественных признаков (QTL) устойчивости к мучнистой росе, которые, однако, были характерны только для конкретных комбинаций скрещивания. Так, в комбинации Emily × Fenella идентифицировано шесть QTL, в комбинации Red Gauntlet × Napil – пять. К числу наиболее стабильных относятся локусы *FaRPa1C* (Emily × Fenella) и *FaRPa6D2* (Red Gauntlet × Napil). При этом поиск этих локусов в генетически разнообразной выборке сортов и форм земляники показал полное их отсутствие у других генотипов, что ограничивает возможности их использования в селекции (Cockerton et al., 2018).

В комбинации скрещивания Sonata × Babett найдено три локуса устойчивости к мучнистой росе, *FxaPMR5b*, *FxaPMR7A*, *FxaPMR7X2*, причем один QTL (*FxaPMR7A*) был идентифицирован при проведении экспериментов в теплице, а два (*FxaPMR5b*, *FxaPMR7X2*) – в условиях открытого грунта (Sargent et al., 2019). Однако диагностические маркеры для данных локусов не разработаны, что не позволяет использовать их на практике для выявления устойчивых к *S. macularis* форм. В 2020 г. Н. Koishihara с коллегами на основе анализа гибридных комбинаций Miyazaki Natsu Haruka × 08 To-f, Miyazaki Natsu Haruka × Ohkimi, 09s E-b45e × Miyazaki Natsu Haruka обнаружили еще один QTL (вклад в дисперсию признака – 15.7 %). Для диагностики в геноплазме земляники локуса *08 To-f* были разработаны ДНК-маркеры IB535110 и IB533828,

позволяющие идентифицировать устойчивые к мучнистой росе генотипы в анализируемых комбинациях скрещивания с вероятностью 98.5 %. Указанные маркеры, согласно рекомендациям авторов, пригодны для маркер-опосредованного скрининга устойчивых к мучнистой росе по локусу *08 To-f* форм земляники (Koishihara et al., 2020).

Определенный вклад в формирование устойчивости земляники к *S. macularis* также может вносить локус *MLO* (Mildew Resistance Locus O), гены которого участвуют в формировании восприимчивости к патогену. Блокирование экспрессии активных аллелей этих генов или перевод их в рецессивное состояние способствует проявлению устойчивости к мучнистой росе. У октоплоидной земляники садовой найдено 68 *MLO* последовательностей, наиболее важные из них – *FaMLO10*, *FaMLO17* и *FaMLO20* (Taria et al., 2021). Кроме того, на устойчивость земляники к мучнистой росе оказывают влияние факторы транскрипции семейства *TGA* (участвуют в метаболизме салициловой кислоты). У *F. × ananassa* идентифицировано 11 *FaTGA* генов, наибольшей специфичностью к заражению *S. macularis* характеризуются гены *FaTGA1*, *FaTGA2*, *FaTGA5*, *FaTGA7*, *FaTGA8* и *FaTGA10* (Feng et al., 2020).

Проводятся прикладные исследования по разработке ДНК-маркеров для выявления устойчивых к мучнистой росе генотипов земляники. В частности, научная группа J.C. Liu на основе SSR-анализа гибридных семян от скрещивания сортов Darselect (восприимчивый к мучнистой росе) и Sweet Charlie (устойчивый к мучнистой росе) выделила SSR-маркеры FSS50 и FSS121, показавшие тесную связь с наличием фенотипической устойчивости (Liu et al., 2012). Н.-J. Je с коллегами на основании анализа гибридной комбинации Akihime (восприимчивый) × Seolhyang (устойчивый) разработали CAPS-маркер SP1-Eae I, позволяющий обнаружить устойчивые к мучнистой росе генотипы земляники (Je et al., 2015).

Разработка диагностических ДНК-маркеров, пригодных для использования в программах маркер-опосредованной селекции, – важный этап повышения эффективности отбора устойчивых к патогенам генотипов и создания новых сортов (Whitaker et al., 2012). Однако данные о пригодности найденных молекулярных маркеров для анализа генетически разнообразных сортов земляники садовой или дикорастущих видов рода *Fragaria L.*, а также распространенности локусов резистентности в геноплазме земляники разработчиками маркеров не приводятся.

Целью настоящего исследования стали изучение генетической коллекции земляники по устойчивости к мучнистой росе и выявление перспективных для селекции на устойчивость к *S. macularis* форм.

## Материалы и методы

Биологическими объектами исследования были 43 образца, состоящие из дикорастущих видов рода *Fragaria L.*, сортов и отборных семян земляники садовой (*F. × ananassa* Duch.) селекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина, а также форм, происходящих из различных эколого-географических регионов (табл. 1).

Фенотипическую оценку устойчивости генотипов земляники к мучнистой росе проводили в 2018–2022 гг. в полевых условиях на естественном инфекционном фоне.

Устойчивость оценивалась по шкале от 0 до 5 баллов, где 0 – признаки поражения отсутствуют, 5 – очень сильное поражение всех надземных органов растения (Зубов, 1990).

Геномную ДНК земляники выделяли из молодых листьев, экстракцию проводили методом СТАВ, модифицированным для культуры земляники (Лукьянчук и др., 2018).

Для идентификации локуса *08 To-f* использовали маркеры IB535110 и IB533828 (Koishihara et al., 2020). Маркер IB535110 представлен ампликоном 500 п. н., IB533828 – ампликоном около 120 п. н.

Реакционная смесь для ПЦР общим объемом 15 мкл содержала: 20 нг геномной ДНК, 1.5 мМ Таq-буфера (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $-\text{KCl}$ ), 2.0 мМ dNTPs, 2.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 мкМ каждого праймера, 0.2 U Таq-полимеразы. Все компоненты произведены фирмой Thermo Fisher Scientific (США).

Аmplification проводили в термоциклере T100 (Bio-Rad, США) по программе: начальная денатурация: 94 °C – 1 мин, 35 циклов: 94 °C – 30 с,  $T_m$  – 45 с, 72 °C – 1 мин; финальная элонгация: 72 °C – 5 мин.  $T_m$  – температура отжига праймеров: 35110\_v1F/35110\_v1R – 60 °C, 22828\_v6F/22828\_v6R – 58 °C.

Разделение продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 2 % агарозном геле. Размер амплифицированных продуктов оценивали с использованием маркера молекулярного веса Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Полученные экспериментальные данные обрабатывали с применением методов математической статистики с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 2016 и STATISTICA 6.0. Сопоставление частоты встречаемости признака «устойчивость к мучнистой росе» в выборках отечественных и зарубежных сортов выполняли с использованием критерия Стьюдента. Достоверность результатов фитопатологической оценки генотипов земляники оценивали методом двухфакторного дисперсионного анализа. Статистическую связь между наличием ДНК-маркеров для локуса *08 To-f* устойчивости к мучнистой росе и ее фенотипическим проявлением определяли методом регрессионного анализа с использованием *F*-критерия Фишера.

## Результаты и обсуждение

За период проведения исследований (2018–2023 гг.) в условиях г. Мичуринска Тамбовской области отмечены как относительно благоприятные для развития *S. macularis* годы (2018, 2019, 2020), так и неблагоприятные для патогена (2021, 2022). В условиях, способствующих распространению болезни, степень поражения генотипов земляники мучнистой росой варьировала в диапазоне от 0 до 4 баллов, в неблагоприятных для патогена условиях поражение растений не превышало 1 балла (рис. 1, табл. 2).

Дисперсионный анализ полученных результатов показал статистически достоверное влияние на проявление признака «устойчивость к мучнистой росе» как генотипа, так и складывающихся погодных условий (табл. 3).

При этом отмечено преобладание влияния условий окружающей среды над генотипом при формировании признака. Коэффициент наследуемости ( $H^2$ ), рассчиты-

**Таблица 1.** Список дикорастущих видов, сортов и отборных форм земляники

Генотип	Комбинация скрещивания	Оригинатор, страна происхождения
<i>F. orientalis</i> Los.	Дикорастущий вид	Приморский край, Россия
<i>F. moschata</i> Duch.		Европейская часть России
<i>F. ovalis</i> (Lehm.) Rydb.		Британская Колумбия, Канада
<i>F. virginiana</i> subsp. <i>platypetala</i> (Rydb.) Staudt		
Избранница	Фестивальная × Senga Sengana	Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина, Россия
Ласточка	922-67 × Привлекательная	
Рубиновый каскад		
Привлекательная	Рубиновый кулон × Allbritton	
Урожайная ЦГЛ	Senga Sengana × Redcoat	
Фейерверк		
Флора		
298-19-9-43	FB <sub>2</sub> <i>F. orientalis</i> Los., <i>F. moschata</i> Duch., <i>F.</i> × <i>ananassa</i> Duch.	
28-11	Лакомая × Maryshka	
922-67	FB <sub>3</sub> <i>F. ovalis</i> (Lehm.) Rydb.	
Берегиня	Соловушка × Unduka	Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства, Россия
Боровицкая	Надежда × Red Gauntlet	
Витязь	Сюрприз олимпиаде × Фестивальная ромашка	
Кокинская заря	Славутич × 157-7	
Кубата	Кубенская × Holiday	
Сударушка	Фестивальная × Roxana	
Царица	Venta × Red Gauntlet	
Царскосельская	Павловчанка × Holiday	Институт агроинженерных и экологических проблем сельскохозяйственного производства, Россия
Фестивальная	Обильная × Premier	Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Россия
Былинная	Персиковая × Сеянец ВИР-228613	Крымская опытно-селекционная станция Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, Россия
Clery	Sweet Charlie × Onebor	Consorzio Italiano Vivaisti (CIV), Италия
Joly	T2-6 × A20-17	
Murano	R6R1-26 × A030-12	
Limalexia	E0011 × E0021	Limgroup, Нидерланды
Driscoll Jubilee	50C130 × 19A331	Driscoll's, Великобритания
Korona	Tamella × Unduka	Plant Research International – WUR, Нидерланды
Ostara	Red Gauntlet × Masherahs Daurenre	
Polka	Unduka × Sivetta	
Sonata	Elsanta × Polka	
Albion	Diamante × Cal 94.16-1	University of California Davis, США
Monterey	Cal. 27-85.06 × Albion	
Vima Tarda	Vima Zanta × Vicoda	Vissers International BV, Нидерланды
Malwina	Sophie × clone Schimmelpfeng, Weihenstefan	Peter Stoppel, Германия
Florence	[Tioga × (Red Gauntlet × (Wiltguard × Gorella))] × (Providence × self)	MEIOSIS Ltd, Великобритания
Symphony	Rhapsody × Holiday	Mylnefield Research Services Ltd, Великобритания
Kimberly	Gorella × Chandler	Gebr. Vissers, Нидерланды
Flamenco	Evita × EMR77	East Malling Research Station, Великобритания
Red Gauntlet	(New Jersey 1051 × Climax) × (Climax × New Jersey 1051)	Шотландия
Barlidaun	MDUS 2359 × MDUS 2713	США

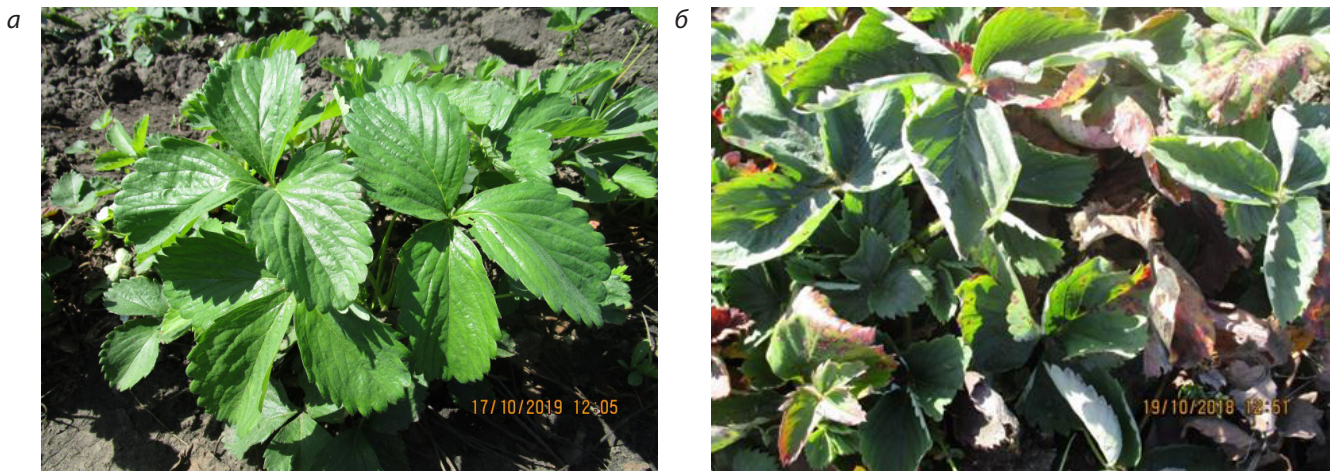


Рис. 1. Поражение растений земляники мучнистой росой: а – сорт Сударушка, без поражения; б – сорт Фестивальная, степень поражения 3.0 балла.

ваемый как отношение генотипической дисперсии к общей фенотипической дисперсии, составил 34.8 %. Низкий вклад генетической дисперсии в фенотипическую вариацию признака объясняется погодно-климатическими условиями: из пяти лет исследований два года (2021 и 2022) были неблагоприятными для развития *S. macularis*, вследствие чего фенотипические различия между устойчивыми и восприимчивыми сортами не проявлялись. При учете только относительно благоприятных для развития патогена лет (2018, 2019, 2020), в которые различия между сортами были более контрастными, вклад генотипа в формирование признака составил 50.7 %.

Варьирование коэффициента наследуемости устойчивости к мучнистой росе в зависимости от степени инфекционной нагрузки описывается также другими исследователями, в частности отмечается, что низкая фенотипическая изменчивость признака снижает рассчитываемый показатель наследуемости (Kennedy et al., 2014).

Большая часть изучаемой коллекции земляники (88.4 % форм), в том числе и все анализируемые дикорастущие виды рода *Fragaria*, характеризовалась высоким уровнем устойчивости к *S. macularis* – степень поражения растений не превышала 1.0 балла. Необходимо отметить, что у сорта Sonata (в генотипе присутствуют QTL *FxaPMR5b*, *FxaPMR7A*, *FxaPMR7X2* устойчивости к мучнистой росе (Sargent et al., 2019)), степень поражения в среднем за годы исследований составила 0.2 балла, а в отдельные годы – 1.0 балла. Кроме того, сорт Cleru, полученный гибридизацией устойчивого к мучнистой росе сорта Sweet Charlie (Liu et al., 2012), в отдельные годы отмечался поражением листового аппарата на 1 балл (средний балл поражения за 2018–2022 гг. – 0.4).

Отсутствием за годы исследований признаков поражения мучнистой росой характеризовались 18 из 43 проанализированных генотипов земляники, что составляет 41.9 % от общего количества форм. Среди сортов земляники садовой отсутствие признаков поражения *S. macularis* обнаружено у 35.9 % генотипов; среди сортов российской селекции – у 29.4 % форм, среди сортов зарубежной селекции – у 47.4 % форм. При этом различия в распространении признака «устойчивость к мучнистой росе» в

выборках отечественных и зарубежных сортов являются статистически недостоверными (при уровне значимости  $p \leq 0.05$   $t_{\text{факт}} = 0.4 \leq t_{\text{ст}} = 4.3$ ).

К числу устойчивых к *S. macularis* (признаки поражения за годы исследований отсутствуют) относятся дикорастущие виды *F. moschata*, *F. orientalis*, *F. ovalis*, *F. virginiana* subsp. *platypetala*, сорта земляники садовой Боровицкая, Былинная, Кубата, Сударушка, Флора (отечественной селекции), Florence, Korona, Limalexia, Malwina, Murano, Ostara, Polka, Red Gauntlet, Vima Tarda (зарубежной селекции). Наличие у многих дикорастущих видов земляники (*F. ovalis*, *F. virginiana*, *F. chiloensis* и др.) популяций с высоким уровнем устойчивости к мучнистой росе подтверждается литературными данными, причем эколого-географическая разобщенность мест произрастания данных видов предполагает наличие различных механизмов устойчивости растений к *S. macularis* (Kennedy et al., 2013).

Следует отметить, что генотипы земляники, устойчивые к мучнистой росе в условиях Тамбовской области, могут поражаться патогеном в других регионах. Например, в условиях Алтайского края (Западная Сибирь) сорта Korona, Polka поражаются на 1.0–1.5 балла, а сорт Былинная – до 2.5 балла (Стольникова, Колесникова, 2017). Полученные результаты объясняются наличием у *S. macularis* физиологических рас, специфичных для различных регионов.

Для выявления генетических факторов устойчивости был проведен молекулярно-генетический скрининг анализируемой коллекции генотипов земляники по ДНК-маркерам IB535110 и IB533828, сцепленным с QTL *08 To-f* устойчивости к мучнистой росе. Маркеры IB535110 и IB533828 идентифицированы у 10 из 43 форм, что составляет 23.2 %. Данные, полученные для этих маркеров, характеризуются 100 % совпадением. Пример идентификации приведен на рис. 2, результаты – в табл. 2.

Среди проанализированных дикорастущих видов рода *Fragaria* QTL *08 To-f* выявлен у земляники мускатной (*F. moschata*) и земляники восточной (*F. orientalis*). При этом отборная форма 298-19-9-43 (трехвидовой гибрид, второе беккросное поколение от *F. moschata* и *F. orien-*

**Таблица 2.** Поражение мучнистой росой изучаемых генотипов земляники в условиях г. Мичуринска Тамбовской области (2018–2022 гг.) и наличие у них ДНК-маркеров локуса устойчивости *08 To-f*

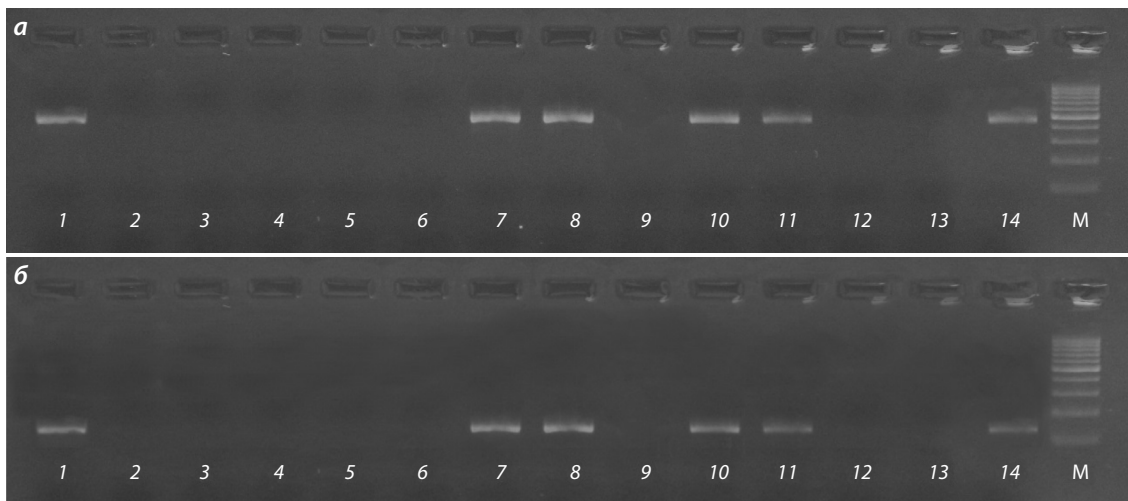
Генотип	Степень поражения, балл						Фенотипическое проявление устойчивости*	Локус <i>08 To-f</i>	
	2018 г.	2019 г.	2020 г.	2021 г.	2022 г.	Среднее		IB535110	IB533828
<i>F. moschata</i> Duch.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
<i>F. orientalis</i> Los.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
<i>F. ovalis</i> (Lehm.) Rydb.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	0	0
<i>F. virginiana</i> subsp. <i>platypetala</i> (Rydb.) Staudt	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	0	0
Берегиня	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.4	S	0	0
Боровицкая	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	0	0
Былинная	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
Витязь	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.4	S	0	0
Избранница	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Кокинская заря	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.4	S	0	0
Кубата	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	0	0
Ласточка	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Привлекательная	2.0	2.0	1.0	0.0	1.0	1.2	S	0	0
Рубиновый каскад	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Сударушка	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
Урожайная ЦГЛ	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.4	S	0	0
Фейерверк	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Фестивальная	3.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.8	S	0	0
Флора	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	0	0
Царскосельская	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.6	S	0	0
Царица	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Albion	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.6	S	0	0
Barlidaun	3.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.8	S	0	0
Cley	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.4	S	0	0
Driscoll Jubilee	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Flamenco	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Florence	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
Joly	1.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.4	S	0	0
Kimberly	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	0.8	S	0	0
Korona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
Limalexia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	0	0
Malwina	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
Monterey	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.4	S	0	0
Murano	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	0	0
Ostara	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
Polka	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
Red Gauntlet	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	1	1
Sonata	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Symphony	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
Vima Tarda	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	R	0	0
298-19-9-43	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.6	S	0	0
922-67	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	S	0	0
28-11	4.0	3.0	2.0	1.0	1.0	2.2	S	0	0
HCP <sub>0.5</sub>						0.1			

\* R – устойчивость (признаки поражения за годы исследований отсутствуют); S – восприимчивость (за годы исследований отмечены признаки поражения).

**Таблица 3.** Результаты двухфакторного дисперсионного анализа поражения генотипов земляники мучнистой росой за годы исследований

Источник вариации	SS	df	MS	F	p-значение	F критическое
Генотип	63.42326	42	1.510078	10.07462	2.23E-28	1.457365
Погодные условия	10.8186	4	2.704651	18.04433	2.4E-12	2.425453
Погрешность	25.1814	168	0.149889			
Итого	99.42326	214				

Примечание. SS – сумма квадратов отклонений; df – число степеней свободы; MS – средняя сумма квадратов отклонений, приходящаяся на одну степень свободы; F – F-критерий Фишера (фактическое значение); p-значение – значимость результатов; F критическое – критическое значение F-критерия.



**Рис. 2.** Электрофоретический профиль маркеров IB535110 (а) и IB533828 (б) 14 из 43 проанализированных генотипов земляники.

1 – Red Gauntlet; 2 – Symphony; 3 – Берегиня; 4 – Избранница; 5 – Limalexia; 6 – Monterey; 7 – Былинная; 8 – Korona; 9 – Barlidaun; 10 – Сударушка; 11 – Polka; 12 – *F. ovalis*; 13 – *F. virginiana* subsp. *Platypetala*; 14 – *F. moschata*. М – маркер молекулярного веса.

*talis*) QTL *08 To-f* от исходных видов не унаследовала (средняя степень поражения мучнистой росой за годы исследования составила 1.6 балла, максимальная – 2.0 балла). Из числа сортов земляники садовой доля генотипов с идентифицированным QTL устойчивости к мучнистой росе составила 22.2 % (8 из 36 сортов). Среди сортов отечественной селекции QTL *08 To-f* присутствует у двух форм (сорта Былинная и Сударушка) из 17 (11.7 %), а из зарубежных сортов – у шести генотипов (Florence, Korona, Malwina, Ostara, Polka, Red Gauntlet) из 19 (31.6 %). Нужно отметить, что у сорта Sonata, для которого, согласно литературным данным (Sargent et al., 2019), идентифицированы QTL устойчивости к мучнистой росе (*FxaPMR5b*, *FxaPMR7A*, *FxaPMR7X2*), QTL *08 To-f* не обнаружен (маркеры IB535110 и IB533828 отсутствуют). Полученные результаты подтверждают, что устойчивость сорта Sonata детерминирована QTL, выявленными ранее.

На основании проведенного BLAST-анализа последовательностей используемых маркеров было выдвинуто предположение об ортологичности QTL *FxaPMR7A* и *08 To-f* (Sargent et al., 2019). Для сорта Red Gauntlet также были найдены другие QTL (на хромосомах 2A, 4B, 6D, 7C и 7D) (Cockerton et al., 2018). Поэтому у данного сорта фенотипическая устойчивость может быть детерминирована кумулятивным действием нескольких QTL

и необходимо проведение дополнительных исследований для сопоставления полученных результатов и уточнения количества выявленных QTL и их локализации.

Анализ родословных сортов с маркерами IB535110 и IB533828 показал, что сорта Florence и Ostara созданы с использованием сорта Red Gauntlet, который, согласно полученным данным, служит источником QTL *08 To-f*. Сорт Korona выделен в комбинации скрещивания Tamella × Unduka, сорт Polka – в гибридной комбинации Unduka × Sivetta, поэтому источником QTL *08 To-f* для данных форм предположительно является сорт Unduka. Для уточнения необходимо проведение анализа исходных родительских форм на наличие диагностических маркеров IB535110 и IB533828.

Необходимо отметить, что с использованием сортов Red Gauntlet и Unduka получены сорта Боровицкая (Надежда × Red Gauntlet), Царица (Venta × Red Gauntlet) и Берегиня (Соловушка × Unduka), не имеющие, согласно результатам молекулярно-генетического анализа, QTL *08 To-f* устойчивости к мучнистой росе. Сорт Былинная выделен в комбинации Персиковая × Сеянец ВИР-228613, для исходных форм данные о наличии QTL *08 To-f* отсутствуют. Для сорта Сударушка исходными формами являются Фестивальная и Roxana. Сорт Фестивальная поражался мучнистой росой за годы исследований в среднем



на 1.8 балла с варьированием поражения по годам от 1.0 до 3.0 балла, а маркеры IB535110 и IB533828 у него отсутствуют. Поэтому источником QTL *08 To-f* для сорта Сударушка служит предположительно сорт Roxana.

Сопоставление результатов молекулярно-генетического анализа и фенотипической оценки устойчивости к мучнистой росе показало, что все генотипы земляники с идентифицированными маркерами IB535110 и IB533828 в условиях г. Мичуринска Тамбовской области характеризуются полевой устойчивостью к *S. macularis* (признаки поражения патогеном за годы исследования отсутствуют). Таким образом, QTL *08 To-f* является перспективной компонентой генетической детерминанты устойчивости к местным расам мучнистой росы, а сорта Былинная, Сударушка, Florence, Korona, Malwina, Ostara, Polka, Red Gauntlet и дикорастущие виды *F. moschata* и *F. orientalis* – ценные исходные формы, которые могут быть использованы в селекционных программах по созданию устойчивых к патогенам генотипов земляники. При этом для сокращения времени проведения исследований, финансовых и трудовых ресурсов допустимо использование одного из двух маркеров. Недостатком этих маркеров является наличие только одного ампликона, в связи с чем возможно получение ложноотрицательных результатов, обусловленных ингибированием ПЦР. Для исключения ложноотрицательных результатов необходимо проведение предварительной оценки качества экстрагированной ДНК.

Кроме того, согласно проведенным ранее исследованиям, сорт Былинная характеризуется наличием гена *Rpfl* устойчивости к фитотрофной корневой гнили (возбудитель – *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman) (Лыжин, Лукьянчук, 2020), а сорт Сударушка – наличием гена *Rca2* устойчивости к антракнозной черной гнили (возбудитель – *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds) (Лыжин и др., 2019). Поэтому данные сорта представляют собой комплексные источники аллелей резистентности к грибным патогенам.

Следует также отметить, что ряд изучаемых генотипов земляники (*F. ovalis*, *F. virginiana* subsp. *platypetala*, сорта земляники садовой Боровицкая, Кубата, Флора, Limalexia, Murano, Vima Tarda), у которых QTL *08 To-f* отсутствует, не поражен за годы исследований мучнистой росой.

Зависимость фенотипического проявления устойчивости к *S. macularis* от присутствия в генотипе QTL *08 To-f* описывается уравнением регрессии  $y = 0.758x + 0.242$ . Проверка значимости модели регрессии с использованием *F*-критерия Фишера показала, что при уровне значимости 0.05 нулевая гипотеза об отсутствии зависимости между переменными опровергается (табл. 4).

Степень корреляции между наличием маркеров IB535110 и IB533828 и фенотипической устойчивостью (признаки поражения мучнистой росой отсутствуют) составила 0.649, что по шкале Чеддока соответствует заметной связи между признаками ( $0.5 < r_{xy} < 0.7$ ). Коэффициент детерминации ( $R^2$ ), показывающий вклад изучаемого локуса в проявление признака, равен 0.4209, т. е. в 42.09 % случаев фенотипическая устойчивость определяется наличием QTL *08 To-f*, тогда как в 57.91 % случаев влияние оказывают другие факторы. По литературным данным, коэффициент детерминации для некоторых идентифици-

**Таблица 4.** Результаты регрессионного анализа зависимости фенотипической устойчивости земляники к мучнистой росе от наличия локуса *08 To-f*

Показатель	df	SS	MS	F	Значимость F
Регрессия	1	4.40451	4.40451	29.79651	2.54E-06
Остаток	41	6.060606	0.14782		
Итого	42	10.46512			

Примечание. df – число степеней свободы; SS – сумма квадратов отклонений; MS – средняя сумма квадратов отклонений, приходящаяся на одну степень свободы; F – F-критерий Фишера (фактическое значение); Значимость F – значимость результатов.

рованных QTL устойчивости к мучнистой росе варьировал от 0.16 до 0.57 (Cockerton et al., 2018).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у этих форм дополнительных генетических детерминант устойчивости к *S. macularis*. В связи с этим идентификация в гибридном потомстве земляники устойчивых к мучнистой росе генотипов с использованием диагностических маркеров IB535110 и IB533828 возможна при наличии у родительских форм QTL *08 To-f*. В других случаях устойчивость к *S. macularis* может контролироваться иными генетическими факторами и, следовательно, использование маркеров IB535110 и IB533828 недопустимо.

## Заключение

Таким образом, маркеры IB535110 и IB533828 позволяют достоверно идентифицировать в геноплазме земляники QTL *08 To-f* устойчивости к мучнистой росе и могут быть использованы в программах маркер-опосредованного совершенствования сортимента. Перспективными источниками устойчивости к *S. macularis* по результатам молекулярно-генетического анализа являются дикорастущие виды *F. moschata* и *F. orientalis*, а также сорта земляники садовой Былинная, Сударушка, Florence, Korona, Malwina, Ostara, Polka и Red Gauntlet.

## Список литературы / References

- Говорова Г.Ф., Говоров Д.Н. Земляника: прошлое, настоящее, будущее. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2004  
[Govorova G.F., Govorov D.N. Strawberry: Past, Present, Future. Moscow: Rosinformagrotekh Publ., 2004 (in Russian)]
- Жученко А.А. Биологизация и экологизация интенсификационных процессов в сельском хозяйстве. *Вестн. ОрелГАУ*. 2009;3:8-12  
[Zhuchenko A.A. Biologization and ecologization of intensification processes in agriculture. *Vestnik OrelGAU = Bulletin of Orel State Agrarian University*. 2009;3:8-12 (in Russian)]
- Зубов А.А. Генетические особенности и селекция земляники. Мичуринск, 1990  
[Zubov A.A. Genetic Features and Breeding of Strawberry. Michurinsk, 1990 (in Russian)]
- Зубов А.А. Теоретические основы селекции земляники. Мичуринск: ВНИИГиСПР, 2004  
[Zubov A.A. Theoretical Foundations of Strawberry Breeding. Michurinsk: Michurin All-Russia Institute for the Genetics and Breeding of Fruit Plants, 2004 (in Russian)]
- Лукьянчук И.В., Лыжин А.С., Козлова И.И. Анализ генетической коллекции земляники (*Fragaria L.*) по генам *Rca2* и *Rpfl* с использованием молекулярных маркеров. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(7):795-799. DOI 10.18699/VJ18.423

- [Luk'yanchuk I.V., Lyzhin A.S., Kozlova I.I. Analysis of strawberry genetic collection (*Fragaria L.*) for *Rca2* and *Rpf1* genes with molecular markers. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(7):795-799. DOI 10.18699/VJ18.423 (in Russian)]
- Лыжин А.С., Лукьянчук И.В. Анализ полиморфизма генотипов земляники (*Fragaria L.*) по гену устойчивости к фитофторозной корневой гнили *Rpf1* для идентификации перспективных для селекции и садоводства форм. *Весті Національної академії наук України. Серія аграрних наук*. 2020;58(3):311-320. DOI 10.29235/1817-7204-2020-58-3-311-320
- [Lyzhin A.S., Luk'yanchuk I.V. Analysis of polymorphism of strawberry genotypes (*Fragaria L.*) according to the strawberry red root spot resistance gene *Rpf1* for identification of strawberry forms promising for breeding and horticulture. *Vesti Natsyonal'nyy Akademii Navuk Belarusi. Seryya Agrarnykh Navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Series*. 2020;58(3):311-320. DOI 10.29235/1817-7204-2020-58-3-311-320 (in Russian)]
- Лыжин А.С., Лукьянчук И.В., Жбанова Е.В. Полиморфизм сортов земляники (*Fragaria* × *ananassa*) по гену устойчивости к антракнозу *Rca2*. *Труды по прикл. ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(1):73-77. DOI 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77
- [Lyzhin A.S., Lukyanchuk I.V., Zhibanova E.V. Polymorphism of the *Rca2* anthracnose resistance gene in strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa*). *Trudy po Prikladnoy Botanike, Genetike i Seleksii = Proceedings on Applied Botany, Genetics, and Breeding*. 2019; 180(1):73-77. DOI 10.30901/2227-8834-2019-1-73-77 (in Russian)]
- Стольников Н.П., Колесникова А.В. Сортосвая устойчивость земляники к мучнистой росе в условиях юга Западной Сибири. *Садоводство и виноградарство*. 2017;5:49-51. DOI 10.18454/VSTISP.2017.5.7593
- [Stolnikova N.P., Kolesnikova A.V. Variety resistance of strawberry to powdery mildew in conditions of the south of Western Siberia. *Sadovodstvo i Vinogradarstvo = Horticulture and Viticulture*. 2017; 5:49-51. DOI 10.18454/VSTISP.2017.5.7593 (in Russian)]
- Холод Н.А., Семенова Л.Г. Восприимчивость сортов земляники садовой к мучнистой росе. *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2014;25(01):111-115
- [Holod N., Semenova L. Susceptibility of strawberry varieties to powdery mildew. *Plodovodstvo i Vinogradarstvo Yuga Rossii = Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2014;25(01):111-115 (in Russian)]
- Bajpai S., Shukla P.S., Asiedu S., Pruski K., Prithiviraj B. A biostimulant preparation of brown seaweed *Ascophyllum nodosum* suppresses powdery mildew of strawberry. *Plant Pathol. J.* 2019;35(5):406-416. DOI 10.5423/PPJ.OA.03.2019.0066
- Carisse O., Bouchard J. Age-related susceptibility of strawberry leaves and berries to infection by *Podosphaera aphanis*. *Crop Prot.* 2010;29(9):969-978. DOI 10.1016/j.cropro.2010.03.008
- Cockerton H.M., Vickerstaff R.J., Karlström A., Wilson F., Sobczyk M., He J.Q., Sargent D.J., Passey A.J., McLeary K.J., Pakozdi K., Harrison N., Lumbreras-Martinez M., Antanaviciute L., Simpson D.W., Harrison R.J. Identification of powdery mildew resistance QTL in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Theor. Appl. Genet.* 2018;131(9):1995-2007. DOI 10.1007/s00122-018-3128-0
- Davik J., Honne B.I. Genetic variance and breeding values for resistance to a wind-borne disease [*Sphaerotheca macularis* (Wall. ex Fr.)] in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) estimated by exploring mixed and spatial models and pedigree information. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111(2):256-264. DOI 10.1007/s00122-005-2019-3
- Feng J., Cheng Y., Zheng C. Expression patterns of octoploid strawberry *TGA* genes reveal a potential role in response to *Podosphaera aphanis* infection. *Plant Biotechnol. Rep.* 2020;14:55-67. DOI 10.1007/s11816-019-00582-9
- Gorgitano M.T., Pirilli M. Life cycle economic and environmental assessment for a greening agriculture. *Qual. – Access Success*. 2016; 17(S1):181-185
- Je H.J., Ahn J.W., Yoon H.S., Kim M.K., Ryu J.S., Hong K.P., Lee S.D., Park Y.H. Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker for selecting powdery mildew-resistance line in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 2015;33(5):722-729. DOI 10.7235/hort.2015.14133
- Kennedy C., Hasing T.N., Peres N.A., Whitaker V.M. Evaluation of strawberry species and cultivars for powdery mildew resistance in open-field and high tunnel production systems. *HortScience*. 2013; 48(9):1125-1129. DOI 10.21273/HORTSCI.48.9.1125
- Kennedy C., Osorio L.F., Peres N.A., Whitaker V.M. Additive genetic effects for resistance to foliar powdery mildew in strawberry revealed through divergent selection. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2014; 139(3):310-316. DOI 10.21273/JASHS.139.3.310
- Koishihara H., Enoki H., Muramatsu M., Nishimura S., Susumu Y.U.I., Honjo M. Marker associated with powdery mildew resistance in plant of genus *Fragaria* and use thereof. U.S. Patent No. 10,724,093. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2020
- Lifshitz C., David N., Shalit N., Slotzky S., Tanami Z., Elad Y., Dai N. Inheritance of powdery mildew resistance in strawberry lines from the Israeli germplasm collection. In: *Proceedings of the NASS/NASGA conference* (February 9-12, 2007, Ventura, California). Los Angeles, 2007;74-76
- Liu J., Duan K., Zhang Q., Ye Z., Gao Q. Genetic mapping and preliminary analysis of SSR marker for powdery mildew resistance in strawberry. *Acta Agriculturae Jiangxi*. 2012;24(11):49-52
- Nelson M.D., Gubler W.D., Shaw D.V. Inheritance of powdery mildew resistance in greenhouse-grown versus field-grown California strawberry progenies. *Phytopathology*. 1995;85(4):421-424
- Palmer M.G., Holmes G.J. Fungicide sensitivity in strawberry powdery mildew caused by *Podosphaera aphanis* in California. *Plant Dis.* 2021;105(9):2601-2605. DOI 10.1094/PDIS-12-20-2604-RE
- Sargent D.J., Buti M., Šurbanovski N., Brurberg M.B., Alsheikh M., Kent M.P., Davik J. Identification of QTLs for powdery mildew (*Podosphaera aphanis*; syn. *Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*) susceptibility in cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *PLoS One*. 2019;14(9):e0222829. DOI 10.1371/journal.pone.0222829
- Sombardier A., Dufour M.-C., Blancard D., Corio-Costet M.-F. Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides: distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest Manag. Sci.* 2010;66:35-43. DOI 10.1002/ps.1827
- Sylla J., Alsanius B.W., Krüger E., Becker D., Wohanka W. *In vitro* compatibility of microbial agents for simultaneous application to control strawberry powdery mildew (*Podosphaera aphanis*). *Crop Prot.* 2013;51:40-47. DOI 10.1016/j.cropro.2013.04.011
- Tapia R.R., Barbey C.R., Chandra S., Folta K.M., Whitaker V.M., Lee S. Evolution of the MLO gene families in octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) and progenitor diploid species identified potential genes for strawberry powdery mildew resistance. *Hortic. Res.* 2021;8(1):153. DOI 10.1038/s41438-021-00587-y
- Whitaker V.M., Osorio L.F., Hasing T., Gezan S. Estimation of genetic parameters for 12 fruit and vegetative traits in the University of Florida strawberry breeding population. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 2012;137(5):316-324. DOI 10.21273/JASHS.137.5.316

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России «Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного научно-технологического развития РФ в сфере генетических технологий» по соглашению № 075-15-2021-1050 от 28.09.2021.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.03.2023. После доработки 12.10.2023. Принята к публикации 12.10.2023.


DOI 10.18699/vjgb-24-21

## *In silico* поиск *R*-генов у примитивных культурных видов картофеля

А.А. Гурина <sup>1</sup> , М.С. Ганчева <sup>2</sup>, Н.В. Алпатьева <sup>1</sup>, Е.В. Рогозина <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

 a.gurina@vir.nw.ru

**Аннотация.** Ключевую роль в защите растений от патогенов играют рецепторы, кодируемые *R*-генами. Они являются генетической основой для селекции многих сельскохозяйственных культур, в том числе картофеля. Множество генов устойчивости у картофеля стало известно и было вовлечено в селекцию благодаря изучению широкого разнообразия диких сородичей картофеля. Использование примитивных культурных видов (ПКВ), относящихся к первичному генофонду картофеля, также перспективно. Как наиболее близкие к ранним доместцированным формам картофеля, ПКВ представляют особый интерес для исследования эволюции генов устойчивости. Целью настоящего исследования стали поиск и анализ *R*-генов у ПКВ картофеля, геномы которых с различным качеством сборки представлены в базе данных NCBI. Исследовано 27 образцов, относящихся к трем видам: *Solanum phureja* Juz. & Bukasov, *S. stenotomum* Juz. & Bukasov и *S. goniocalyx* Juz. & Bukasov. Проведен *in silico* поиск последовательностей, гомологичных 26 *R*-генам, идентифицированных у различных по филогенетической отдаленности от ПКВ картофеля видов: паслёна (*S. americanum* Mill.), североамериканских (*S. bulbocastanum* Dunal., *S. demissum* Lindl.) и южноамериканских (*S. venturii* Hawkes & Hjert., *S. berthaultii* Hawkes) диких видов, а также видов культурного картофеля (*S. tuberosum* L., *S. andigenum* Juz. & Bukasov). Гомологи кодирующих последовательностей всех исследованных генов обнаружены у ПКВ картофеля с относительно высокой степенью сходства (85–100 %). Впервые у примитивных культурных видов картофеля найдены гомологи генов *R3b*, *Rpi-amr3* и *Rpi-ber1*. Для 15 *R*-генов проведен анализ полиморфизма нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Приведены отличия в частоте замен у ПКВ картофеля при анализе *R*-генов, референсные последовательности которых идентифицированы у разных видов. Для всех изученных NBS-LRR генов доля замещенных аминокислот в LRR-домене превосходит этот показатель для NBS-домена. Показана потенциальная перспективность использования ПКВ картофеля в качестве источников устойчивости к вертициллёзному увяданию. Ключевые слова: *R*-гены; NBS-LRR; полиморфизм; *Solanum phureja*; *S. stenotomum*.


**Для цитирования:** Гурина А.А., Ганчева М.С., Алпатьева Н.В., Рогозина Е.В. *In silico* поиск *R*-генов у примитивных культурных видов картофеля. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):175-184. DOI 10.18699/vjgb-24-21

## *In silico* search for and analysis of *R* gene variation in primitive cultivated potato species

А.А. Gurina <sup>1</sup> , М.С. Gancheva <sup>2</sup>, N.V. Alpatieva <sup>1</sup>, E.V. Rogozina <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

 a.gurina@vir.nw.ru

**Abstract.** Pathogen recognition receptors encoded by *R* genes play a key role in plant protection. Nowadays, *R* genes are a basis for breeding many crops, including potato. Many potato *R* genes have been discovered and found suitable for breeding thanks to the studies of a wide variety of wild potato species. The use of primitive cultivated potato species (PCPS) as representatives of the primary gene pool can also be promising in this respect. PCPS are the closest to the early domesticated forms of potato; therefore, their investigation could help understand the evolution of *R* genes. The present study was aimed at identifying and analyzing *R* genes in PCPS listed in the open database of NCBI and Solomics DB. In total, the study involved 27 accessions belonging to three species: *Solanum phureja* Juz. & Bukasov, *S. stenotomum* Juz. & Bukasov and *S. goniocalyx* Juz. & Bukasov. Materials for the analysis were the sequencing data for the said three species from the PRJNA394943 and PRJCA006011 projects. An *in silico* search was carried out for sequences homologous to 26 *R* genes identified in potato species differing in phylogenetic distance from PCPS, namely nightshade (*S. americanum*), North- (*S. bulbocastanum*, *S. demissum*) and South-American (*S. venturii*, *S. berthaultii*) wild potato species, as well as the cultivated potato species *S. tuberosum* and *S. andigenum*. Homologs of all investigated protein-coding sequences were discovered in PCPS with a relatively high degree of similarity (85–100 %). Homologs of the *Rpi-R3b*, *Rpi-amr3* and *Rpi-ber1* genes have been identified in PCPS for the first time. An analysis of polymorphism of nucleotide and amino acid sequences has been carried out for 15 *R* genes. The differences in frequencies of substitutions in PCPS have been demonstrated by analysis of *R* genes, the reference sequences of which have been identified

in different species. For all the studied NBS-LRR genes, the proportion of substituted amino acids in the LRR domain exceeds this figure for the NBS domain. The potential prospects of using PCPS as sources of resistance to *Verticillium wilt* have been shown.

Key words: R genes; NBS-LRR; polymorphism; *Solanum phureja*; *S. stenotomum*.

**For citation:** Gurina A.A., Gancheva M.S., Alpatieva N.V., Rogozina E.V. In silico search for and analysis of R gene variation in primitive cultivated potato species. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):175-184. DOI 10.18699/vjgb-24-21

## Введение

Главный фактор эволюции растений – адаптация к неблагоприятным внешним условиям, в том числе к воздействию микроорганизмов и вредителей (Fang et al., 2022). За последнее время достигнут значительный прогресс в познании молекулярных механизмов взаимодействия растений с патогенами. Установлено, что у растений существует многоуровневая система защиты от вредных организмов, включающая стадии распознавания, сигналинга и инициации защитного ответа (Zhang et al., 2019). Показано, что в активации иммунитета ведущую роль играют рецепторы, локализованные на поверхности или внутри клетки, а R-гены (гены устойчивости), кодирующие рецепторы, являются генетической основой селекции многих сельскохозяйственных культур на устойчивость к болезням (Deng et al., 2020).

У растений выделяют две системы иммунитета: РАМР (pathogen-associated molecular patterns) иммунитет, включает распознавание элиситоров (консервативные нерасо-специфические сигналы: полисахариды, хитин и т.п.) и ЕТИ (effector-triggered immunity) иммунитет, включающий распознавание расо-специфических эффекторов. Именно с распознаванием эффекторов связано действие R-генов, которые прямо или косвенно (опосредованно другими белками) взаимодействуют с эффекторами и запускают иммунный ответ растений, часто включающий запрограммированную смерть клеток, блокирующую дальнейшее распространение патогена (Kourelis et al., 2018).

Картофель – важнейшая незерновая культура, по объемам производства занимает четвертое место среди всех сельскохозяйственных культур. По данным FAO, в 2020 г. мировое производство картофеля составило более 350 млн т (FAO, 2020). Несмотря на высокий потенциал адаптации, картофель поражается множеством болезней и вредителей, 27 из которых причиняют экономически значимый ущерб повсеместно (Bradshaw, 2021). Заболевания картофеля приводят к ежегодным потерям около 11.6 % валового сбора (FAO, 2010). Возделывание устойчивых сортов картофеля необходимо для стабильного агропроизводства, оптимизации применения химических средств защиты, получения продукции высокого качества. Интрогрессия генов устойчивости от дикорастущих и культурных родичей картофеля (видов секции *Petota* Dumort. рода *Solanum* L.) позволяет создавать устойчивые сорта и селекционные линии. Поиск генов устойчивости к возбудителям болезней и вредителям у представителей разных групп генофонда картофеля представляет актуальное направление исследований, проводимых научными центрами в Европе, США, Индии и Китае (Bradshaw, 2021).

Селекционная ценность клубненосных видов *Solanum* зависит от их совместимости с культурным картофелем и характера наследования целевого признака (Рогозина,

Хавкин, 2017). Примитивные культурные виды, в том числе *S. phureja* Juz. & Bukasov, *S. stenotomum* Juz. & Bukasov, *S. goniocalyx* Juz. & Bukasov (по системе J. Hawkes (Hawkes, 1990) *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx* (Juz. & Bukasov) Hawkes) относятся к первичному генофонду, представители которого легко скрещиваются с сортовым картофелем (Bradeen, Kole, 2011). В связи с этим использование в качестве исходного материала для селекции примитивных культурных видов представляет особый интерес.

В 2011 г. вышла первая статья, описывающая последовательность генома искусственно созданного удвоенного моноплоида DM 1-3 516 R44 (DM1-3) *Solanum* L. группы Phureja (Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC), 2011). Опубликованная последовательность представляла 86 % генома искусственно созданного гомозиготного клона. Она была получена в результате интеграции двух сборок геномных последовательностей: диплоидного гетерозиготного клона RH89-039-16 и клона DM 1-3 516 R44 (CIP 801092), (The Potato Genome Sequencing Initiative, [https://www.hutton.ac.uk/sites/default/files/documents/posters/sharma/Sharma\\_Potato\\_Sequencing\\_Initiative.pdf](https://www.hutton.ac.uk/sites/default/files/documents/posters/sharma/Sharma_Potato_Sequencing_Initiative.pdf), дата обращения 2 мая 2023 г.).

Совершенствование технологий секвенирования позволило к 2022 г. создать сборки геномных последовательностей представителей всех групп генофонда картофеля: диких и культурных видов и тетраплоидных сортов картофеля (Usadel, 2022). Представленная в базах данных NCBI, Spud DB, Solomics генетическая информация о картофеле и родственных *Solanum* spp. способствует лучшему пониманию их генетических различий, процесса эволюции видов, помогает в поиске генов, определяющих селекционно-ценные признаки.

Цель работы – поиск и структурный анализ R-генов в данных полногеномного секвенирования, включая данные коротких прочтений (sequence raw archive, SRA) и частично собранные (до уровня контигов) геномы ПКВ картофеля.

## Материалы и методы

**Материал.** Для поиска генов устойчивости были использованы: последовательность референсного генома картофеля DM1-3 v4.3 (PGSC, 2011), данные коротких прочтений, полученные в результате полногеномного секвенирования в проекте PRJNA394943 (Li Y. et al., 2018), а также сборки геномов из проекта PRJCA006011 (Tang et al., 2022) для образцов ПКВ: *Solanum phureja*, *S. stenotomum*, *S. goniocalyx* (табл. 1).

В качестве объектов для анализа были взяты 26 R-генов (полный список приведен в Приложении 2)<sup>1</sup>, референсные

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу:  
<https://vavilov-icg.ru/download/pict-2024-28/appx9.pdf>

**Таблица 1.** Полногеномные последовательности и SRA-данные, взятые в анализ

Вид	Обозначение	Количество образцов (SRA-данные)	Сборка генома
<i>S. phureja</i>	phu	9	DM1-3; PG6169; PG6225
<i>S. stenotomum</i>	stn	8	PG6029; PG6055
<i>S. goniocalyx</i>	gon	4	PG6148

Примечание. Идентификационные номера сборок геномов даны согласно (Tang et al., 2022). Полное описание материала представлено в Приложении 1.

последовательности которых представлены в базе данных NCBI. Эти последовательности были выделены из генетического материала диких и культурных видов картофеля, а также американского черного паслёна *S. americanum*.

***In silico*-поиск и анализ *R*-генов в геномах ПКВ картофеля.** На первом этапе анализа *in silico* осуществлен поиск гомологов *R*-генов в данных полногеномного секвенирования и сборках геномов ПКВ картофеля.

**Поиск и анализ гомологов *R*-генов в SRA-данных.** После оценки качества секвенирования (FASTQC v0.11.9) (Wingett, Andrews, 2018) проводили фильтрацию низкокачественных прочтений (Trimmomatic 0.39), которая включала удаление ПЦР-дубликатов, а также прочтений, содержащих более чем 20 % нуклеотидов с Phred качеством менее 5 или более 10 % неустановленных нуклеотидов (Bolger et al., 2014). Далее выполняли выравнивание прочтений каждого образца на референсные *R*-гены с использованием алгоритма локального множественного выравнивания программы bowtie2 v.2.3.5.1 (Langmead, Salzberg, 2012). Результаты выравнивания обрабатывали при помощи программ samtools 1.10 и bedtools 2.30.0, эти же программы использовали для оценки достаточности и однородности покрытия генов (Quinlan, Hall, 2010). Поиск вариантов осуществляли с помощью VarScan 2.4.4 с минимальным покрытием 5 (Koboldt et al., 2009). Обработку результатов производили с использованием R 4.2.2 и Python 3.8.2.

**Поиск и анализ *R*-генов в сборках геномов ПКВ картофеля.** Проверка наличия последовательностей генов в нескольких сборках геномов ПКВ картофеля из проекта PRJCA006011 (Tang et al., 2022) проведена при помощи local blast 2.5.0+ алгоритма (Ladunga, 2017). Отбирали последовательности, имеющие сходство с референсными – не менее 80 % и покрывающие не менее 80 % последних, которые могли представлять как полные последовательности *R*-генов, так и отдельные их части – UTR, экзоны, интроны. При помощи локального выравнивания ClustalW выбраны последовательности с полностью представленной кодирующей областью гена.

На втором этапе обнаруженные в геномах ПКВ картофеля гены устойчивости анализировали на наличие полиморфизма в нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Для оценки изменений аминокислотных последовательностей применяли локальное выравнивание ClustalW в программе Mega X (Kumar et al., 2018). Для вычисления доменной организации и ключевых позиций в аминокислотных последовательностях *R*-генов использовали InterPro (Paysan-Lafosse et al., 2023).

## Результаты

В данных полногеномного секвенирования и сборках геномов *S. phureja*, *S. stenotomum*, *S. goniocalyx* идентифицированы гомологи всех 26 исходных референсных *R*-генов, выявлено их значительное сходство (более 80 %) в кодирующих областях. Некодирующие последовательности (UTR и/или интроны) в большинстве предполагаемых гомологов значительно отличаются от таковых в референсных генах, и степень их сходства, как правило, не превышает 60 %.

Проведены оценка качества и равномерности покрытия SRA-данных на каждый из 26 *R*-генов и поиск в сборках геномов ПКВ картофеля полных кодирующих последовательностей. Из дальнейшего анализа исключены гены, точные и полные белок-кодирующие последовательности которых неизвестны, а также гены, при первичном поиске которых были расхождения между данными, полученными при изучении сборок геномов, и SRA-данными (в частности, при анализе SRA-данных ген *Rpi-mch1* имел крайне низкое покрытие, хотя в сборках он присутствовал). С учетом опубликованных данных о высокой степени сходства генов в кластерах на IV, VIII и IX хромосомах из каждого кластера выбран один референсный ген для анализа группы гомологов: *Rpi-R2-like* для группы гомологов *Rpi-R2*, *Rpi-R2-like*, *Rpi-abpt* и *Rpi-blb3*; *Rpi-sto1* – для группы гомологов *Rpi-sto1*, *Rpi-blb1* и *Rpi-bt1*; *Rpi-vnt1.3* – среди разных аллельных вариантов гена *Rpi-vnt1*.

На основании результатов первого этапа анализа были отобраны 15 *R*-генов. Ряд этих генов обеспечивает устойчивость картофеля к фитофторозу: *Rpi-R1* (Ballvora et al., 2002), *Rpi-R2-like* (Lokossou et al., 2009), *Rpi-R3a* (Huang et al., 2005), *Rpi-R3b* (Li G. et al., 2011), *Rpi-sto1* (Vleeshouwers et al., 2008), *Rpi-blb2* (van der Vossen et al., 2005), *Rpi-vnt1.3* (Foster et al., 2009), *Rpi-ber1* (Monino-Lopez et al., 2021), *Rpi-R8* (Vossen et al., 2016) и *Rpi-amr3*- у паслёна (Witek et al., 2021). Среди них также были найдены гены устойчивости к X вирусу картофеля – *Rx* (Bendahmane et al., 1999), патотипу Pa2 бледной цистообразующей нематоды – *Gpa2* (van der Vossen et al., 2000), к вертициллёзному увяданию – *Ve1*, *Ve2* (Song et al., 2017), к вирусам мозаики томата и табака – *Tm2-ToMV* (Wu X. et al., неопубл.). Все указанные гены являются представителями двух семейств: гены *Ve1* и *Ve2* – семейства RLP/RKL (receptor-like proteins/receptor-like kinases), остальные 13 генов – семейства CC-NBS-LRR (Coiled-Coil Nucleotide Binding Site Leucine Rich Repeats).

В сборках геномов ПКВ картофеля обнаружено разное число копий, анализируемых *R*-генов (табл. 2). Ген *Rpi-R3a* представлен единственной последовательностью в

**Таблица 2.** Количество копий генов в сборках ПКВ картофеля с указанием числа копий, не содержащих преждевременных стоп-кодонов (в скобках)

Ген	DM1-3	PG6029	PG6225	PG6169	PG6148	PG6055
<i>Rpi-amr3</i>	6 (1)	11 (3)	7 (6)	6 (2)	9 (6)	8 (4)
<i>Rpi-R1</i>	3 (0)	8 (6)	7 (3)	4 (3)	7 (5)	9 (5)
<i>Rpi-R2-like</i>	26 (7)	34 (22)	35 (21)	24 (17)	45 (26)	40 (23)
<i>Rpi-R3a</i>	7 (1)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	2 (2)	1 (1)
<i>Rpi-R3b</i>	2 (0)	5 (1)	3 (2)	5 (2)	7 (6)	4 (2)
<i>Rpi-sto1</i>	5 (3)	16 (12)	13 (8)	7 (5)	20 (13)	8 (6)
<i>Rpi-blb2</i>	1 (0)	3 (1)	4 (4)	2 (2)	4 (3)	2 (1)
<i>Rpi-ber1</i>	3 (1)	6 (1)	9 (2)	4 (1)	5 (1)	3 (1)
<i>Rpi-vnt1.3</i>	6 (5)	6 (6)	11 (6)	10 (9)	17 (12)	13 (7)
<i>Ve1</i>	3 (2)	4 (2)	6 (4)	7 (6)	5 (3)	5 (3)
<i>Ve2</i>	3 (1)	3 (2)	3 (1)	4 (1)	4 (1)	4 (1)
<i>Rpi-R8</i>	10 (1)	18 (12)	20 (9)	21 (15)	12 (7)	15 (9)
<i>Rx</i>	2 (1)	4 (3)	6 (4)	3 (1)	4 (4)	2 (2)
<i>Gpa2</i>	2 (2)	3 (2)	7 (4)	2 (2)	6 (5)	2 (2)
<i>Tm2-ToMV</i>	4 (3)	6 (5)	11 (8)	7 (7)	10 (7)	9 (6)

большинстве геномов. Гены *Rpi-amr3*, *Rpi-R1*, *Rpi-R3b*, *Rpi-blb2*, *Rpi-ber1*, *Ve1*, *Ve2*, *Rx*, *Gpa2* и *Tm2-ToMV* имеют от одной до десяти копий. Более десятка копий обнаружено у генов *Rpi-sto1*, *Rpi-vnt1.3*, *Rpi-R8*. Число копий гена *Rpi-R2-like* в разных сборках может достигать 45. Заметных различий в числе копий каждого гена между сборками геномов не наблюдается, коэффициент парной корреляции между числом копий в разных сборках превышает 80 % (см. табл. 2).

В отличие от остальных сборок, в референсном геноме DM1-3 несколько генов (*Rpi-R1*, *Rpi-R3b*, *Rpi-blb2*) не имеют гомологов, способных производить схожие белки (все гомологичные последовательности содержат преждевременные стоп-кодоны) (см. табл. 2). Мы связываем это с синтетическим происхождением удвоенного моноплоида *S. phureja*.

Для отобранных 15 референсных *R*-генов в дальнейшем был проведен анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей на наличие полиморфизма у ПКВ картофеля. При этом у данных видов в кодирующих последовательностях генов устойчивости обнаружено более 2000 сайтов полиморфизма, большинство из которых – однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). Во всех генах хотя бы в одной из копий были найдены делеции или инсерции, которые влияют на предполагаемую аминокислотную последовательность. Тем не менее для всех генов в геномах отдельных видов были найдены такие варианты, которые способны производить белок, схожий с референсным.

Распределение встречаемости SNP соответствует представлениям о ПКВ картофеля как о группе близкородственных видов. Наиболее распространены общие для всех образцов SNP относительно уникальных SNP (найденных только в одном образце). Множество общих SNP (572, что составляет более 25 % от всех выявленных) при

этом отличали исследованные образцы от референсных последовательностей *R*-генов (рис. 1). Почти 15 % обнаруженных SNP составляют уникальные сайты.

Распределение встречаемости SNP в образцах ПКВ картофеля зависит от происхождения вида – источника референсного *R*-гена. Мы обнаружили значимые различия (критерий Краскела–Уоллеса 7.4044,  $p$ -value = 0.02467) между общими для всех исследованных образцов ПКВ картофеля SNP в генах из североамериканских диких видов и из культурных видов картофеля (см. рис. 1). Аналогичные показатели мы отмечаем и при анализе сборок геномов. Для референсных генов *Rpi-R8*, *Rx*, *Ve1*, *Ve2*, источниками которых являются образцы культурного картофеля, количество общих для ПКВ картофеля вариативных сайтов было минимальным. А в генах *Rpi-R3a*, *Rpi-blb2*, *Rpi-R2-like*, идентифицированных у филогенетически отдаленных от ПКВ картофеля образцов североамериканских диких видов картофеля, более 40 % обнаруженных SNP были одинаковы для всех образцов ПКВ картофеля (см. рис. 1). Отличия в частотах уникальных SNP не столь выражены, но наибольшая доля характерна для генов *Rpi-R8*, *Ve1* и *Gpa2*, источниками которых являются культурные виды картофеля.

Из генов, происходящих от североамериканских диких видов картофеля, только *Rpi-R1* нарушает тенденцию высокой доли общих SNP, свойственную остальным генам (доля общих для ПКВ SNP в этом гене составляет менее 20 %) (см. рис. 1). Данный ген был интрогрессирован в культурный картофель из отдаленного дикого вида *S. demissum*. Однако при исследовании различных копий этого гена, представленных в геномах ПКВ, в каждой из них мы обнаружили несколько инделей, включая делеции длиной до 15 нуклеотидов. Аналогичное снижение доли общих SNP вместе с наличием инделей в каждой из копий мы наблюдали при исследовании другого гена устойчивости к

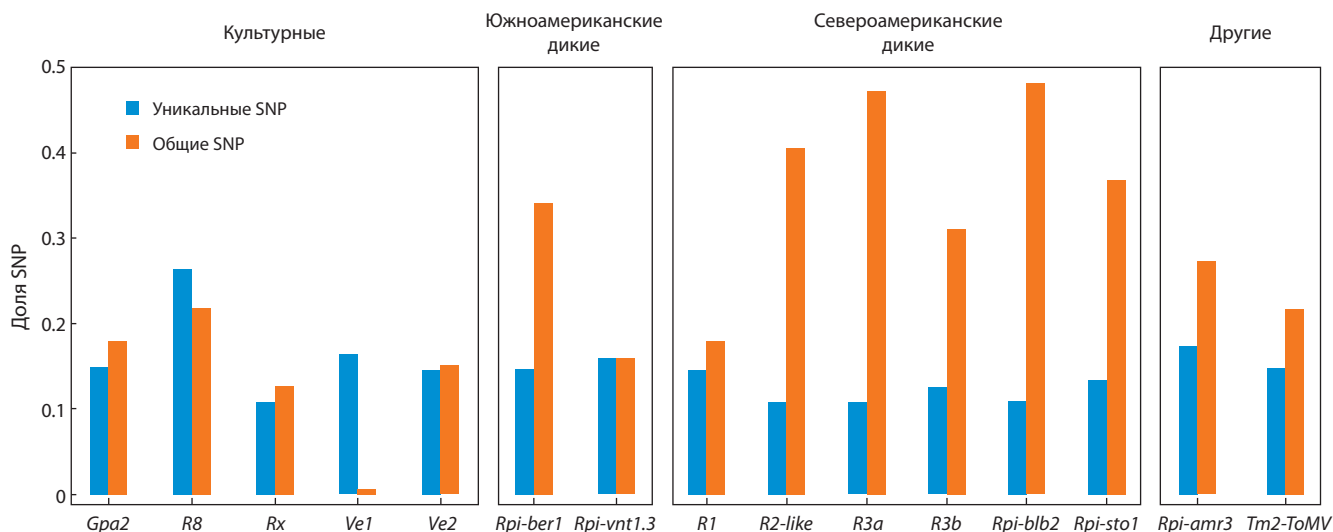


Рис. 1. Встречаемость SNP в гомологах *R*-генов среди образцов ПКВ картофеля (по SRA-данным).

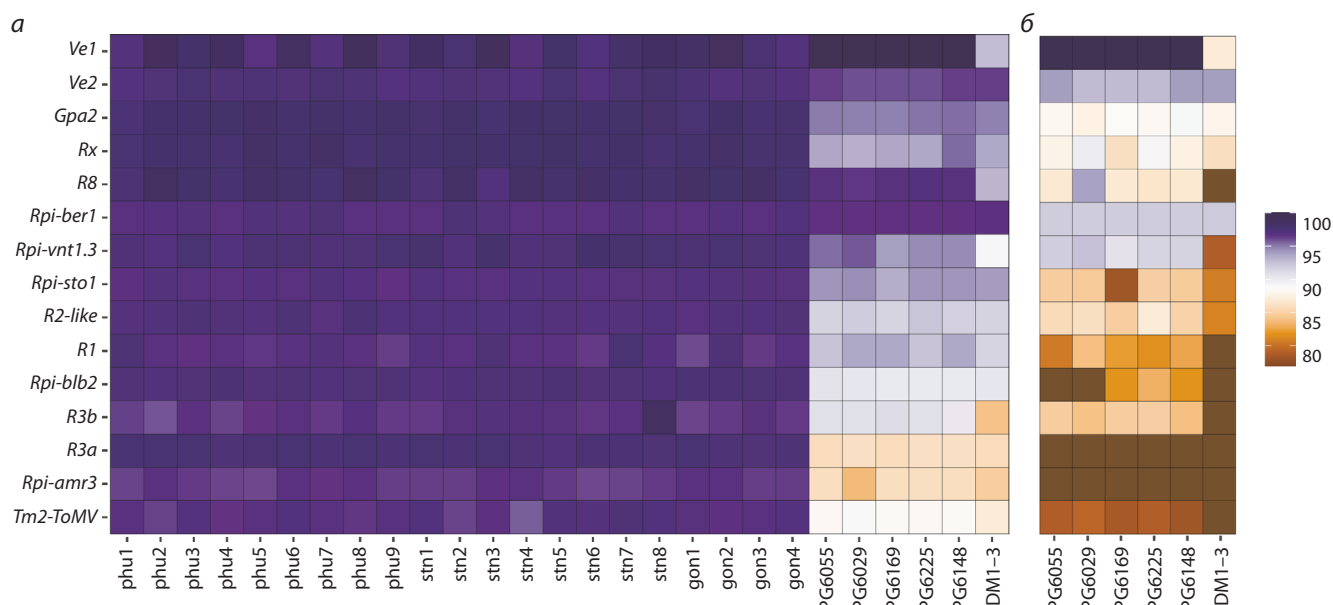


Рис. 2. Тепловая карта сходства нуклеотидных последовательностей *cds* (а) и аминокислотных последовательностей (б) гомологов *R*-генов у ПКВ картофеля с референсными последовательностями *R*-генов.

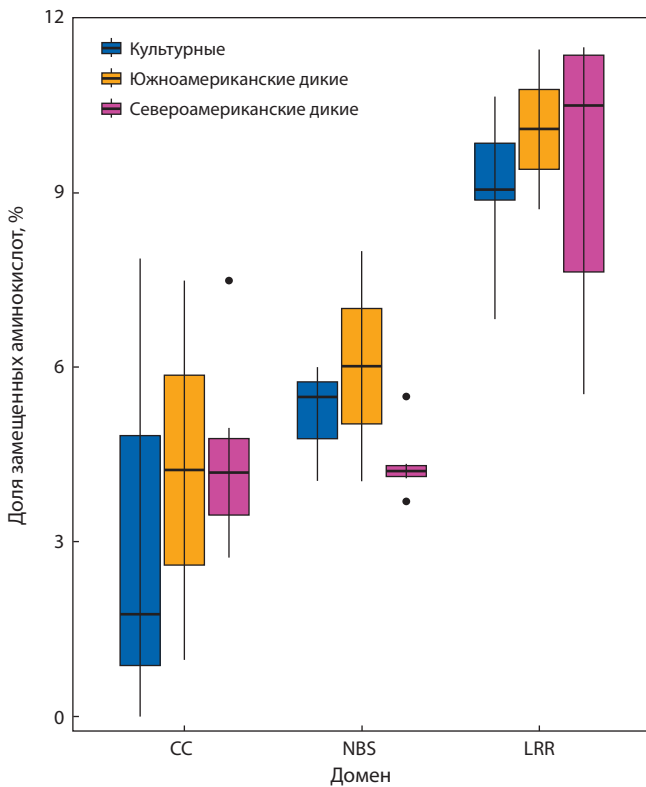
Цветовая шкала отображает уровень сходства с референсным геном.

фитофторозу – *Rpi-amr3*, обнаруженного у *S. americanum*, одного из видов паслёна, также очень далекого от культурного картофеля.

При анализе сборок геномов и SRA-данных выявлены различия в степени сходства последовательностей, найденных у ПКВ картофеля, с референсными последовательностями *R*-генов (рис. 2, а). Различия наиболее выражены у многокопийных генов. Это связано с тем, что при анализе SRA-данных фактически учитывается консенсусная последовательность для всех копий. И увеличение количества копий уменьшает вероятность учета SNP, поскольку в консенсусной последовательности учитывается тот вариант, который встречается в большинстве копий.

Наиболее сильные различия между оценками собранных геномов и сырых прочтений наблюдаются при анализе генов *Rpi-R3a* и *Rpi-amr3* (см. рис. 2, а). Скорее всего, это результат химерного выравнивания прочтений с других генов на референсные. При дальнейшем анализе этих последовательностей результаты обработки SRA-данных нами не учитывались.

Обнаружены различия между образцами ПКВ картофеля по степени сходства найденных гомологов (без учета сборки DM1-3) с референсными последовательностями *R*-генов. Медианный уровень отличий составляет 0.5 %. Наиболее схожие с референсным геном копии генов *Rpi-ber1* и *Ve1* между разными геномами ПКВ картофеля



**Рис. 3.** Сравнение доли аминокислотных замен в разных доменах *R*-генов.

Значимые различия между LRR и другими доменами оценивали согласно критерию Краскела–Уоллеса 17.343,  $p$ -value = 0.0001714.

отличаются единичными SNP (0.01 %). Максимальный уровень различий между нуклеотидными последовательностями гомологов *R*-генов у ПКВ картофеля выявлен для гена *Rpi-amr3*, он составляет 2.3 %. Близкий к этому значению уровень полиморфизма отмечен при анализе гомологов *Rx*, *R1*, *Rpi-vnt1.3*, *Rpi-sto1*. Для генов *Rpi-R8*, *Rpi-blb2*, *Ve2* показано, что одна или несколько копий довольно стабильны и обладают низким уровнем полиморфизма, в то время как другие копии значительно различаются между собой. Это соответствует представлениям об эволюционном процессе *R*-генов, для которых копияность может снизить влияние отбора.

В сборках ПКВ картофеля (без учета сборки DM1-3) у гомологов всех *R*-генов выявлены копии, потенциально способные производить аминокислотные последовательности (в них не обнаружены сдвиги рамки считывания и преждевременные стоп-кодона). Степень сходства с референсной аминокислотной последовательностью варьирует (72–100 %) (см. рис. 2, б).

Гены, происхождение которых напрямую связано с культурным картофелем, по сходству аминокислотных последовательностей с референсными четко подразделяются на две группы: гены семейства RLP-RLK (*Ve1* и *Ve2*) обладают самым высоким сходством с референсным геном: 100 и 92–94 % соответственно; сходство генов семейства CC-NBS-LRR (*Gpa2*, *Rx*, *Rpi-R8*) существенно ниже: 85–90 % (см. рис. 2, б). Гены семейства CC-NBS-LRR, происхождение которых связано с южноамериканскими

дикими видами, имеют более высокое сходство аминокислотных последовательностей с референсными, чем гены *Rpi-R2-like*, *Rpi-sto1*, *Rpi-R1* и *Rpi-R3b* из североамериканских диких видов: около 95 и 80–85 % соответственно. Изменения нуклеотидной последовательности в генах *Rpi-R3a*, а также *Rpi-amr3* и *Tm2-ToMV* приводят к низкому сходству (75–80 %) с референсной аминокислотной последовательностью (см. рис. 2, б).

Функциональный анализ аминокислотных последовательностей, выполненный при помощи InterPro, показал, что в гомологах NBS-LRR генов у ПКВ картофеля нет изменений в доменной организации даже в тех последовательностях, сходство которых с референсной последовательностью составляет менее 80 %.

Распределение аминокислотных замен по отдельным доменам у генов семейства CC-NBS-LRR показано на рис. 3. Учитывались только последовательности, образующие полноценные белки (не содержащие преждевременных стоп-кодонов). Не включены гены *Ve1* и *Ve2*, имеющие, согласно данным InterPro и NCBI, другую доменную организацию по сравнению с CC-NBS-LRR.

Доля замещенных аминокислот значительно варьирует в зависимости от домена (см. рис. 3). В LRR-доме всех найденных гомологов *R*-генов обнаружено наибольшее число (в среднем более 9 %) аминокислотных замен по сравнению с референсом. В генах *Rpi-vnt1.3*, *Rpi-sto1*, *Rpi-R1* и *Rpi-R3b* доля замещенных в LRR-доме аминокислот превышает 10 %. Доля замен в CC-доме значительно варьировала между генами. В этом домене не обнаружено аминокислотных замен у гомологов генов *R8*, *Rpi-vnt1.3* и *Rx*, в то время как у генов *Rpi-blb2*, *Gpa2* аминокислотных замен 7 %, у гена *Tm2-ToMV* – 11 %. В NBS-доме в среднем около 5 % замещенных аминокислот.

Распределение замещенных аминокислот в разных доменах среди ПКВ картофеля также неравномерно. В CC-доме почти всех генов большинство замен встречается лишь в отдельных образцах или небольших группах. Общие для всех образцов ПКВ замещенные аминокислоты представлены 0–3 сайтами. Исключение – ген *Gpa2*, в котором пять замен в CC-доме являются общими, и из них несколько замен расположено или в RanGAP2-сайте взаимодействия (по данным NCBI), или в непосредственной близости от него (соседние аминокислоты). В NBS-доме преобладают общие для ПКВ картофеля замены, единственным геном, где они отсутствовали, был *Rx*. В LRR-доме общие и характерные лишь для некоторых образцов замещенные аминокислоты распределены относительно равномерно.

## Обсуждение

Картофель – гетерозиготный тетраплоид, генетический анализ которого является сложной задачей. Геномное исследование картофеля и родственных клубнеобразующих видов, поиск и аннотация генов, определяющих агрономически важные характеристики, вносят существенный вклад в частную генетику культуры и совершенствование технологий селекции (Bradshaw, 2021). Прimitивные культурные виды картофеля относятся к систематической группе, интересной с точки зрения эволюции и в качестве



источника селекционно-ценных признаков картофеля, таких как устойчивость к болезням.

Нами проведен биоинформатический анализ данных полногеномного секвенирования 27 образцов видов *S. phureja*, *S. stenotomum* и *S. goniocalyx* (21 SRA-данных и 6 сборок геномов) по 26 генам устойчивости к возбудителям болезней и вредителям. У всех образцов найдены последовательности, гомологичные кодирующим участкам всех проанализированных *R*-генов. Выявлено их значительное сходство с соответствующими участками референсных генов (> 85 %). Некодирующие последовательности (UTR и/или интроны) в большинстве предполагаемых гомологов сильно отличаются от таковых в референсных генах, и степень их сходства, как правило, не превышает 60 %.

Многие из референсных последовательностей получены из далеких от ПКВ картофеля видов. Так, последовательность гена *Rpi-amr3* изолирована из паслёна *S. americanum*, а *Rpi-blb2* – из *S. bulbocastanum*, представителя североамериканских диких видов картофеля. Последний напрямую не скрещивается с культурными видами, и обнаружение гомологов *R*-генов с довольно высоким уровнем сходства у ПКВ представляет интерес с точки зрения особенностей эволюции этих генов. Впервые у видов *S. phureja* и *S. stenotomum* обнаружены гомологи генов *Rpi-R3b*, *Rpi-amr3* и *Rpi-ber1*.

У культурного картофеля, возделываемого на территории Южной Америки, обнаружены гомологи генов, обеспечивающих надежную защиту от фитофтороза, южноамериканского дикого вида *S. venturii* и мексиканских видов *S. bulbocastanum* и *S. stoloniferum*, а также генов расоспецифической устойчивости к фитофторозу североамериканского вида *S. demissum*. Ранее молекулярно-генетический скрининг образцов коллекции картофеля ВИР выявил наличие SCAR-маркеров *Rpi*-генов у диких видов картофеля северо- и южноамериканских серий и у образцов ПКВ картофеля (Muratova et al., 2020; Гурина и др., 2022; Rogozina et al., 2023). Сходство дикого и культурного картофеля по генам устойчивости к узкоспециализированному паразиту *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary подтверждает вывод о наследовании части генетического материала дикорастущих видов диплоидным культурным картофелем (Hardigan et al., 2017).

Обнаружение у представителей культурного картофеля не только генов, участвующих в защите картофеля от фитофтороза, вирусов, бледной нематоды, но и гомологов *R*-генов томата и паслёна, хорошо согласуется с данными о существенно большем репертуаре генов устойчивости к болезням у картофеля, по сравнению с близкородственными паслёновыми культурами (Tang et al., 2022).

Ранее проведенный биоинформатический анализ референсного генома картофеля DM1-3 (Jupé et al., 2012; Lozano et al., 2012) был выполнен без учета генов *R3b*, *Rpi-amr3*, *Ve1*, *Ve2*, *Rpi-ber1*, так как их последовательности еще не были известны. В более поздней работе, посвященной поиску NBS-LRR генов у культурного картофеля *S. stenotomum* subsp. *goniocalyx*, не были использованы последовательности генов *R8*, *Ve1*, *Ve2*, *Rpi-ber1* и *Tm2-ToMV* (Liu, 2020). Для большинства выявленных нами гомологов *R*-генов степень их сходства с референсными

последовательностями соответствует опубликованным данным (Lozano et al., 2012; Liu, 2020). Однако у изученных образцов *S. goniocalyx* Z. не обнаружены в достаточной мере достоверные гомологичные последовательности для генов *Rx*, *R3b* и *Gpa2* (Liu, 2020). Вероятнее всего, это связано с крайне высокой степенью полиморфизма некодирующих частей этих генов, которые к тому же занимают довольно протяженные участки, что препятствует их полноразмерному анализу.

Диплоидные виды *S. phureja* и *S. stenotomum* наиболее близки ранним доместичированным формам клубнеобразующих видов рода *Solanum* L. У представителей этих видов мы обнаружили гомологи *R*-генов с разной эволюционной историей. На древнее происхождение внеклеточного рецептора, кодируемого геном *Ve1*, указывает широкое распространение функциональных и нефункциональных гомологов *Ve1* у растений семейства Solanaceae и других филогенетически отдаленных видов (Song et al., 2017). У ПКВ картофеля во всех сборках найдены копии гена *Ve1*, которые по аминокислотной последовательности не отличаются от референса, что говорит о потенциальной перспективности этой группы в качестве донора устойчивости к вертицилллёзному увяданию.

Эволюция генов мексиканского вида *S. bulbocastanum* *Rpi-blb1* и *Rpi-blb3* происходила с разной скоростью и разными путями, а для гена *Rpi-blb2* в образцах *S. bulbocastanum* были обнаружены только последовательности, идентичные референсному гену (Lokossou et al., 2010). Поэтому выявление гомологов *Rpi-blb2* и *Rpi-sto1* (ортолога *Rpi-blb1*) у культурного картофеля, произрастающего на другом континенте и не скрещивающегося с *S. bulbocastanum*, представляет значительный интерес.

*R*-гены, в особенности представители семейства NBS-LRR, как правило, представлены в геноме не одиночно, а в виде кластеров – многочисленных копий гомологичных генов (Prakash et al., 2020). В геномах ПКВ картофеля большинство исследованных *R*-генов (кроме *R3a*, *Rpi-ber1* и *Ve2*) также представлены двумя и более копиями. Особо выделяется ген *R2-like*, который относится к большому кластеру *R*-генов, лежащих на IV хромосоме. Его копияность среди ПКВ картофеля была самой высокой, количество найденных копий варьировало от 24 до 40. По литературным данным, присутствие/отсутствие гена и число его копий – это распространенный тип полиморфизма среди генов устойчивости, поскольку их организация способствует неравной рекомбинации, в результате которой в потомстве возникают отличия в числе копий одного гена. Для некоторых генов мы действительно наблюдали различия в количестве копий, но поскольку сборки незавершенные, а метод показывал лишь гомологи, имеющие сходство выше порогового, мы не можем точно утверждать, что обнаруженные различия имеют место, а не являются следствием методических аспектов работы.

Некоторые исследователи связывают с процессом одомашнивания потерю разнообразия во многих генах, в первую очередь хозяйственно ценных, к которым относятся и *R*-гены (Li Y. et al., 2018; Tang et al., 2022). Li с коллегами (2018) отмечали более низкую вариабельность генетического материала культурных видов по сравнению с дикими. Это хорошо согласуется с высокой долей общих

SNP у ПКВ картофеля, а также с систематикой картофеля, разработанной D. Spooner, в которой большинство ПКВ картофеля рассматривается как группа в составе одного вида *S. tuberosum* (Spooner et al., 2014).

Исследуемые *R*-гены обладают сложной структурой; ранее была показана неравнозначность скорости аминокислотных замен в разных доменах (Prakash et al., 2020). Так, NBS-домен – более консервативный, поскольку связан с активацией механизма защиты растений внутри клетки, в то время как LRR-домен, отвечающий за распознавание патогена, – более вариабельный, и скорость замен в нем выше. Выявленная нами неравномерность распределения аминокислотных замен по доменам NBS-LRR белков соответствует данным литературы о скорости эволюции этих белков.

По распространенности замещенных аминокислот среди образцов ПКВ картофеля домены *R*-генов также неравномерны. Наиболее распространены общие для этой группы изменения в NBS-домене, что, вероятно, связано с изменением белков, в дальнейшем активируемых *R*-генами. В СС-домене, напротив, наименьшее количество общих для ПКВ картофеля аминокислотных замен. О выполняемой функции этого домена до сих пор мало известно, есть данные, что в некоторых белках он запускает механизм клеточной смерти (Huang et al., 2021), но для других генов показано его взаимодействие с системой распознавания патогена (Rairdan et al., 2008). Предположить, чем обусловлены и к чему могут привести такие отличия в ПКВ картофеля, достаточно сложно, но при исследовании различных копий нами выявлено, что в большинстве явно нефункциональных последовательностей (содержащих преждевременный стоп-кодон) индели были именно в СС-домене. Это может отражать эволюционный характер диверсификации паралогов в геноме при сохранении относительно стабильного варианта.

В LRR-домене обнаружены как общие, так и характерные для отдельных образцов или набольших групп замещенные аминокислоты, скорее всего, эти замены – часть адаптивного механизма предковых форм ПКВ картофеля к распространенным в то время расам патогенов. Механизм работы LRR-домена изучен плохо. Показано, что даже небольшое количество изменений конкретных аминокислот может привести к изменению распознаваемого патогена от вируса к нематоду (Slootweg et al., 2017). В то же время известны большие группы ортологов, схожих между собой лишь на 85–90 %, которые распознают один и тот же патоген (Park et al., 2005). Вероятно, лишь изменения конкретных паттернов в последовательности приводят к изменению эффектора, который распознается LRR-доменом. Но для подробного изучения этого явления требуются значительно большее количество хорошо фенотипированных образцов, а также применение методов, позволяющих оценить взаимодействие продуктов разных генов.

## Заключение

У примитивных культурных видов картофеля обнаружены последовательности, гомологичные *R*-генам, участвующим в защите картофеля от фитофтороза, вирусов, бледной нематоды; картофеля и томата – от вертициллёзного

увядания; томата – от вирусов мозаики. Впервые произведен поиск и показано наличие у ПКВ картофеля гомологов генов *R3b*, *Rpi-amr3*, *Ve1*, *Ve2*, *Rpi-ber1*. Схожесть кодирующих последовательностей, обнаруженных у ПКВ картофеля, с референсными *R*-генами свыше 85 % для всех генов. Впервые продемонстрировано, что гомологи всех *R*-генов во всех исследованных сборках геномов имеют копии, среди которых во всех геномах, кроме DM1-3, встречается хотя бы одна последовательность, не содержащая стоп-кодонов или сдвигов рамки считывания.

У исследованной группы образцов выявлены различия в характере полиморфизма *R*-генов, в зависимости от источника референсного гена. Для гомологов генов из североамериканских диких видов, по сравнению с генами из культурных видов картофеля, значимо более представлены изменения, характеризующие группу ПКВ картофеля в целом. Впервые показано, что одна из копий гена *Ve1* у ПКВ картофеля не содержит аминокислотных замен относительно референсного гена, что говорит о потенциальной устойчивости ПКВ картофеля к вертициллёзному увяданию (*Verticillium dahliae* Kleb.).

## Список литературы / References

- Гурина А.А., Алпатьева Н.В., Чалая Н.А., Мироненко Н.В., Хютти А.В., Рогозина Е.В. Гомологи генов устойчивости к фитофторозу у представителей клубнеобразующих видов рода *Solanum* L. *Генетика*. 2022;58(12):1418-1430. DOI 10.31857/S0016675822120049
- [Gurina A.A., Alpatieva N.V., Chalaya N.A., Mironenko N.V., Khiutti A.V., Rogozina E.V. Homologs of late blight resistance genes in representatives of tuber-bearing species of the genus *Solanum* L. *Russ. J. Genet.* 2022;58(12):1473-1484. DOI 10.1134/S1022795422120043]
- Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Межвидовые гибриды картофеля как доноры долговременной устойчивости к патогенам. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(1):30-41. DOI 10.18699/VJ17.221
- [Rogozina E.V., Khavkin E.E. Interspecific potato hybrids as donors of durable resistance to pathogens. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(1):30-41. DOI 10.18699/VJ17.221 (in Russian)]
- Armstrong M.R., Vossen J., Lim T.Y., Hutten R.C.B., Xu J., Strachan S.M., Harrower B., Champouret N., Gilroy E.M., Hein I. Tracking disease resistance deployment in potato breeding by enrichment sequencing. *Plant Biotechnol. J.* 2019;17(2):540-549. DOI 10.1111/pbi.12997
- Ballvora A., Ercolano M.R., Weiß J., Meksem K., Bormann C.A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 2002;30(3):361-371. DOI 10.1046/J.1365-313X.2001.01292.X
- Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D.C. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*. 1999;11(5):781-791. DOI 10.1105/tpc.11.5.781
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. DOI 10.1093/bioinformatics/btu170
- Bradeen J.M., Kole C. (Eds.). *Genetics, Genomics and Breeding of Potato*. CRC Press, 2011. DOI 10.1201/b10881
- Bradshaw J.E. *Potato Breeding: Theory and Practice*. Cham (Switzerland): Springer, 2021. DOI 10.1007/978-3-030-64414-7
- Deng Y., Ning Y., Yang D.-L., Zhai K., Wang G.-L., He Z. Molecular basis of disease resistance and perspectives on breeding strategies for resistance improvement in crops. *Mol. Plant*. 2020;13(10):1402-1419. DOI 10.1016/j.molp.2020.09.018

- Fang Y., Jiang J., Hou X., Guo J., Li X., Zhao D., Xie X. Plant protein-coding gene families: Their origin and evolution. *Front. Plant Sci.* 2022;13:995746. DOI 10.3389/fpls.2022.995746
- FAO. The Second Report on the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, 2010
- FAO. Land Use Statistics and Indicators. Global, Regional and Country Trends, 2000–2020. No. 48. Rome: FAOSTAT analytical Brief, 2020
- Foster S.J., Park T.H., Pel M., Brigneti G., Sliwka J., Jagger L., van der Vossen E., Jones J.D.G. *Rpi-vnt1.1*, a *Tm-2<sup>2</sup>* homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2009;22(5):589-600. DOI 10.1094/MPMI-22-5-0589
- Hardigan M.A., Laimbeer F.P.E., Newton L., Crisovan E., Hamilton J.P., Vaillancourt B., Wiegert-Rininger K., Wood J.C., Douches D.S., Farré E.M., Veilleux R.E., Buell C.R. Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;114(46):E9999-E10008. DOI 10.1073/pnas.1714380114
- Hawkes J.G. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, 1990
- Huang S., van der Vossen E.A.G., Kuang H., Vleeshouwers V.G.A.A., Zhang N., Borm T.J.A., van Eck H.J., Baker B., Jacobsen E., Visser R.G.F. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. *Plant J.* 2005;42(2):251-261. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02365.x
- Huang J., Wu X., Sun K., Gao Z. Structure and function analysis of a CC-NBS-LRR protein AT1G12290. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021;1(534):206-211. DOI 10.1016/j.bbrc.2020.11.111
- Jones J., Foster S.J., Chu Z., Park T.H., Pel M.A. Late Blight Resistance Genes and Methods. US Patent WO 2009013468 A3. 2013
- Jupe F., Pritchard L., Etherington G.J., MacKenzie K., Cock P.J.A., Wright F., Sharma S.K., Bolser D., Bryan G.J., Jones J.D.G., Hein I. Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome. *BMC Genomics.* 2012;13:75. DOI 10.1186/1471-2164-13-75
- Koboldt D.C., Chen K., Wylie T., Larson D.E., McLellan M.D., Mardis E.R., Weinstock G.M., Wilson R.K., Ding L. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics.* 2009;25(17):2283-2285. DOI 10.1093/Bioinformatics/BTP373
- Kourelis J., van der Hoorn R.A.L. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *Plant Cell.* 2018;30(2):285-299. DOI 10.1105/tpc.17.00579
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(6):1547-1549. DOI 10.1093/MOLBEV/MSY096
- Ladunga I. Finding similar nucleotide sequences using Network BLAST searches. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2017;58(1):3.3.1-3.3.25. DOI 10.1002/CPBI.29
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* 2012;9(4):357-359. DOI 10.1038/nmeth.1923
- Li G., Huang S., Guo X., Li Y., Yang Y., Guo Z., Kuang H., Rietman H., Bergervoet M., Vleeshouwers V.G.G.A., van der Vossen E.A.G., Qu D., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. Cloning and characterization of *R3b*; members of the *R3* superfamily of late blight resistance genes show sequence and functional divergence. 2011;24(10):1132-1142. DOI 10.1094/MPMI-11-10-0276
- Li Y., Colleonì C., Zhang J., Liang Q., Hu Y., Ruess H., Simon R., Liu Y., Liu H., Yu G., Schmitt E., Ponitzki C., Liu G., Huang H., Zhan F., Chen L., Huang Y., Spooner D., Huang B. Genomic analyses yield markers for identifying agronomically important genes in potato. *Mol. Plant.* 2018;11(3):473-484. DOI 10.1016/j.molp.2018.01.009
- Liu Z. Diversity of NB-LRR genes in the genome of *Solanum stenotomum* subsp. *goniocalyx*. Thesis. Montreal: McGill University, 2020
- Lokossou A.A., Park T.H., van Arkel G., Arens M., Ruyter-Spira C., Morales J., Whisson S.C., Birch P.R.J., Visser R.G.F., Jacobsen E., van der Vossen E.A.G. Exploiting knowledge of *R/Avr* genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2009;22(6):630-641. DOI 10.1094/MPMI-22-6-0630
- Lokossou A.A., Rietman H., Wang M.Q., Krenke P., Schoot H., Henken B., Hoekstra R., Vleeshouwers V.G.A.A., van der Vossen E.A.G., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vosman B. Diversity, distribution, and evolution of *Solanum bulbocastanum* late blight resistance genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2010;23(9):1206-1216. DOI 10.1094/MPMI-23-9-1206
- Lozano R., Ponce O., Ramirez M., Mostajo N., Orjeda G. Genome-wide identification and mapping of NBS-encoding resistance genes in *Solanum tuberosum* group phureja. *PLoS One.* 2012;7(4):e34775. DOI 10.1371/journal.pone.0034775
- Monino-Lopez D., Nijenhuis M., Kodde L., Kamoun S., Salehian H., Schentsnyi K., Stam R., Lokossou A., Abd-El-Halim A., Visser R.G.F., Vossen J.H. Allelic variants of the NLR protein *Rpi-ehc1* differentially recognize members of the *Phytophthora infestans* PexRD12/31 effector superfamily through the leucine-rich repeat domain. *Plant J.* 2021;107(1):182-197. DOI 10.1111/tpj.15284
- Muratova (Fadina) O.A., Beketova M.P., Kuznetsova M.A., Rogozina E.V., Khavkin E.E. South American species *Solanum alandiae* Card. and *S. okadae* Hawkes et Hjerting as potential sources of genes for potato late blight resistance. *Proc. Appl. Bot. Genet. Breed.* 2020;181(1):73-83. DOI 10.30901/2227-8834-2020-1-73-83
- Oosumi T., Rockhold D.R., Maccree M.M., Deahl K.L., McCue K.F., Belknap W.R. Gene *Rpi-bt1* from *Solanum bulbocastanum* confers resistance to late blight in transgenic potatoes. *Am. J. Pot. Res.* 2009; 86:456-465. DOI 10.1007/s12230-009-9100-4
- Paal J., Henselewski H., Muth J., Meksem K., Menéndez C.M., Salamini F., Ballvora A., Gebhardt C. Molecular cloning of the potato *Grol-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J.* 2004;38(2):285-97. DOI 10.1111/j.1365-313X.2004.02047.x
- Park T.H., Gros J., Sikkema A., Vleeshouwers V.G., Muskens M., Allefs S., Jacobsen E., Visser R.G., van der Vossen E.A. The late blight resistance locus *Rpi-bib3* from *Solanum bulbocastanum* belongs to a major late blight R gene cluster on chromosome 4 of potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005;18(7):722-729. DOI 10.1094/MPMI-18-0722
- Paysan-Lafosse T., Blum M., Chuguransky S., Grego T., Pinto B.L., Salazar G.A., Bileschi M.L., ... Sillitoe I., Thanki N., Thomas P.D., Tosatto S.C.E., Wu C.H., Bateman A. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D418-D427. DOI 10.1093/NAR/GKAC993
- Potato Genome Sequencing Consortium; Xu X., Pan S., Cheng S., Zhang B., Mu D., Ni P., Zhang G., Yang S., ... Kloosterman B., van Eck H., Datema E., Hekkert Bt., Goverse A., van Ham R.C., Visser R.G. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature.* 2011;475(7355):189-195. DOI 10.1038/nature10158
- Prakash C., Trognitz F.C., Venhuizen P., von Haeseler A., Trognitz B. A compendium of genome-wide sequence reads from NBS (nucleotide binding site) domains of resistance genes in the common potato. *Sci. Rep.* 2020;10(1):11392. DOI 10.1038/s41598-020-67848-z
- Quinlan A.R., Hall I.M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841-842. DOI 10.1093/bioinformatics/btq033
- Rairdan G.J., Collier S.M., Sacco M.A., Baldwin T.T., Boettrich T., Moffett P. The coiled-coil and nucleotide binding domains of the Potato Rx disease resistance protein function in pathogen recognition and signaling. *Plant Cell.* 2008;20(3):739-751. DOI 10.1105/tpc.107.056036
- Rogozina E.V., Gurina A.A., Chalaya N.A., Zoteyeva N.M., Kuznetsova M.A., Beketova M.P., Muratova O.A., Sokolova E.A., Drobyazina P.E., Khavkin E.E. Diversity of late blight resistance genes in

- the VIR potato collection. *Plants*. 2023;12(2):273. DOI 10.3390/plants12020273
- Sliwka J., Jakuczun H., Chmielarz M., Hara-Skrzypiec A., Tomczyńska I., Kilian A., Zimnoch-Guzowska E. A resistance gene against potato late blight originating from *Solanum × michoacanum* maps to potato chromosome VII. *Theor. Appl. Genet.* 2012;124(2):397-406. DOI 10.1007/s00122-011-1715-4
- Slootweg E., Koropacka K., Roosien J., Dees R., Overmars H., Lankhorst R.K., van Schaik C., Pomp R., Bouwman L., Helder J., Schots A., Bakker J., Smant G., Goverse A. Sequence exchange between homologous NB-LRR genes converts virus resistance into nematode resistance, and vice versa. *Plant Physiol.* 2017;175(1):498-510. DOI 10.1104/pp.17.00485
- Song Y., Zhang Z., Seidl M.F., Majer A., Jakse J., Javornik B., Thomma B.P.H.J. Broad taxonomic characterization of *Verticillium* wilt resistance genes reveals an ancient origin of the tomato Ve1 immune receptor. *Mol. Plant Pathol.* 2017;18(2):195-209. DOI 10.1111/MPP.12390
- Spooner D.M., Ghislain M., Simon R., Jansky S.H., Gavrilenko T. Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes. *Bot. Rev.* 2014;80:283-383. DOI 10.1007/s12229-014-9146-y
- Tang D., Jia Y., Zhang J., Li H., Cheng L., Wang P., Bao Z., Liu Z., Feng S., Zhu X., Li D., Zhu G., Wang H., Zhou Y., Zhou Y., Bryan G.J., Buell C.R., Zhang C., Huang S. Genome evolution and diversity of wild and cultivated potatoes. *Nature*. 2022;606(7914):535-541. DOI 10.1038/s41586-022-04822-x
- Usadel B. *Solanaceae* pangenomes are coming of graphical age to bring heritability back. *aBIOTECH*. 2022;3(4):233-236. DOI 10.1007/s42994-022-00087-0
- van der Vossen E.A., van der Voort J.N., Kanyuka K., Bendahmane A., Sandbrink H., Baulcombe D.C., Bakker J., Stiekema W.J., Klein-Lankhorst R.M. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J.* 2000;23(5):567-576. DOI 10.1046/j.1365-313x.2000.00814.x. PMID: 10972883
- van der Vossen E., Sikkema A., Hekkert Bt., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 2003;36(6):867-882. DOI 10.1046/j.1365-313x.2003.01934.x
- van der Vossen E.A.G., Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A., Allefs S. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J.* 2005;44(2):208-222. DOI 10.1111/j.1365-313X.2005.02527.x
- Vleeshouwers V.G.A.A., Rietman H., Krenek P., Champouret N., Young C., Oh S.K., Wang M., Bouwmeester K., Vosman B., Visser R.G.F., Jacobsen E., Govers F., Kamoun S., van der Vossen E.A.G. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS One*. 2008;3(8):2875. DOI 10.1371/journal.pone.0002875
- Vossen J.H., van Arkel G., Bergervoet M., Jo K.R., Jacobsen E., Visser R.G.F. The *Solanum demissum* *R8* late blight resistance gene is an *Sw-5* homologue that has been deployed worldwide in late blight resistant varieties. *Theor. Appl. Genet.* 2016;129(9):1785-1796. DOI 10.1007/S00122-016-2740-0
- Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *FI1000Res*. 2018;7:1338. DOI 10.12688/f1000research.15931.2
- Witek K., Lin X., Karki H.S., Jupe F., Witek A.I., Steuernagel B., Stam R., van Oosterhout C., Fairhead S., Heal R., Cocker J.M., Bhanvadia S., Barrett W., Wu C.H., Adachi H., Song T., Kamoun S., Vleeshouwers V.G.A.A., Tomlinson L., Wulff B.B.H., Jones J.D.G. A complex resistance locus in *Solanum americanum* recognizes a conserved *Phytophthora* effector. *Nat. Plants*. 2021;7(2):198-208. DOI 10.1038/S41477-021-00854-9
- Zhang R., Zheng F., Wei S., Zhang S., Li G., Cao P., Zhao S. Evolution of disease defense genes and their regulators in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(2):335. DOI 10.3390/ijms20020335

---





**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-26-00111 «Гены устойчивости картофеля к фитофторозу в контексте эволюции культурных и диких клубненосных видов *Solanum* L.».


**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.07.2023. После доработки 29.08.2023. Принята к публикации 30.08.2023.

DOI 10.18699/vjgb-24-22

# Различия в плодовитости между двумя линиями *Drosophila melanogaster* дикого типа коррелируют с различиями в экспрессии гена *Jheh1*, кодирующего фермент деградации ювенильного гормона

О.В. Андрееenkova , Н.В. Адоньева, В.М. Ефимов , Н.Е. Грунтенко  

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


**Аннотация.** Ювенильный гормон играет у личинок *Drosophila melanogaster* роль “status quo” гормона, препятствуя преждевременному наступлению метаморфоза, а у имаго выполняет гонадотропную функцию, обеспечивая подготовку яичников к вителлогенезу. При снижении уровня ювенильного гормона у самок *D. melanogaster* наблюдаются нарушения репродукции, выражающиеся в задержке начала откладки яиц и снижении плодовитости. Еще одним фактором, способным повлиять на репродуктивную функцию насекомых, является инфицирование матерински наследуемой симбиотической  $\alpha$ -протеобактерией *Wolbachia*. Настоящее исследование посвящено анализу экспрессии двух генов метаболизма ювенильного гормона, кодирующих ферменты его синтеза и деградации – кислоту О-метилтрансферазу ювенильного гормона (*jhamt*) и эпоксидгидразу ювенильного гормона (*Jheh1*) соответственно, у четырех линий *D. melanogaster* дикого типа, две из которых инфицированы *Wolbachia*. Линии *w153* и *Bi90* происходят от отдельных самок, отловленных в дикой природе, и инфицированы *Wolbachia*, а линии *w153<sup>T</sup>* и *Bi90<sup>T</sup>* получены на их основе посредством тетрациклиновой обработки и характеризуются отсутствием инфекции. Известно, что линия *Bi90* инфицирована штаммом *Wolbachia* генотипа *wMel*, а линия *w153* – штаммом *Wolbachia wMelPlus*, относящимся к генотипу *wMelCS*. Обнаружено, что инфицирование как одним, так и другим штаммом *Wolbachia* не влияет на экспрессию исследованных генов. В то же время показано, что обе линии с ядерным генотипом *w153* отличаются от линий с генотипом *Bi90* повышенным уровнем экспрессии гена *Jheh1* и не различаются по уровню экспрессии гена *jhamt*. Уровень плодовитости не зависел от инфицирования *Wolbachia*, но у линий с ядерным генотипом *w153* он оказался существенно ниже, чем у линий с ядерным генотипом *Bi90*. Полученные данные позволяют сделать обоснованное предположение о том, что межлинейный полиморфизм *D. melanogaster* по метаболизму ювенильного гормона коррелирует с уровнем плодовитости и определяется деградацией гормона, а не его синтезом.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*; *Wolbachia*; *jhamt*; *Jheh1*; экспрессия генов; плодовитость; метаболизм ювенильного гормона.

**Для цитирования:** Андрееenkova О.В., Адоньева Н.В., Ефимов В.М., Грунтенко Н.Е. Различия в плодовитости между двумя линиями *Drosophila melanogaster* дикого типа коррелируют с различиями в экспрессии гена *Jheh1*, кодирующего фермент деградации ювенильного гормона. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):185-189. DOI 10.18699/vjgb-24-22

## Fertility differences between two wild-type *Drosophila melanogaster* lines correlate with differences in the expression of the *Jheh1* gene, which codes for an enzyme degrading juvenile hormone

O.V. Andreenkova , N.V. Adonyeva, V.M. Efimov , N.E. Gruntenko  

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

**Abstract.** Juvenile hormone plays a “status quo” role in *Drosophila melanogaster* larvae, preventing the untimely metamorphosis, and performs a gonadotropic function in imagoes, ensuring the ovaries’ preparedness for vitellogenesis. The decreased level of juvenile hormone results in reproductive disorders in *D. melanogaster* females including a delay in the oviposition onset and a fertility decrease. Another factor that can affect the insect reproduction is an infection with the maternally inherited symbiotic  $\alpha$ -proteobacterium *Wolbachia*. The present study is devoted to the analysis of the expression of two juvenile hormone metabolism genes encoding enzymes of its synthesis and degradation, juvenile hormone acid O-methyltransferase (*jhamt*) and juvenile hormone epoxide hydrase (*Jheh1*), respectively, in four wild-type *D. melanogaster* lines, two of them being infected with *Wolbachia*. Lines *w153* and *Bi90* were both derived

from an individual wild-caught females infected with *Wolbachia*, while lines *w153<sup>T</sup>* and *Bi90<sup>T</sup>* were derived from them by tetracycline treatment and are free of infection. Line *Bi90* is known to be infected with the *Wolbachia* strain *wMel*, and line *w153*, with the *Wolbachia* strain *wMelPlus* belonging to the *wMelCS* genotype. It was found that infection with either *Wolbachia* strain does not affect the expression of the studied genes. At the same time, it was shown that the *w153* and *w153<sup>T</sup>* lines differ from the *Bi90* and *Bi90<sup>T</sup>* lines by an increased level of the *Jheh1* gene expression and do not differ in the *jhamt* gene expression level. Analysis of the fertility of these four lines showed that it does not depend on *Wolbachia* infection either, but differs between lines with different nuclear genotypes: in *w153* and *w153<sup>T</sup>*, it is significantly lower than in lines *Bi90* and *Bi90<sup>T</sup>*. The data obtained allow us to reasonably propose that the inter-line *D. melanogaster* polymorphism in the metabolism of the juvenile hormone is determined by its degradation (not by its synthesis) and correlates with the fertility level.

**Key words:** *Drosophila melanogaster*; *Wolbachia*; *jhamt*; *Jheh1*; gene expression; fertility; juvenile hormone metabolism.

**For citation:** Andreenkova O.V., Adonyeva N.V., Efimov V.M., Gruntenko N.E. Fertility differences between two wild-type *Drosophila melanogaster* lines correlate with differences in the expression of the *Jheh1* gene, which codes for an enzyme degrading juvenile hormone. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2): 185-189. DOI 10.18699/vjgb-24-22

## Введение

Согласно современным представлениям о генетическом контроле размножения двукрылых насекомых, ключевую роль в его регуляции играет 20-гидроксиэкдизон (20Э), а ювенильный гормон (ЮГ) только обеспечивает подготовку яичников к вителлогенезу, в отличие от большинства других отрядов насекомых, у которых ЮГ выполняет ту функцию, которую у *Diptera* осуществляет 20Э (Roy et al., 2018; Wu et al., 2021). Баланс этих двух гормонов определяет многие события в жизни насекомых с полным превращением, начиная от личиночного периода, в котором повышение 20Э провоцирует начало линьки, а уровень ЮГ определяет, станет ли эта линька личиночной, если он высок, или началом метаморфоза, если он падает (Truman, Riddiford, 2007), включая нейро-гормональный стресс-ответ, в котором задействованы оба гормона, и заканчивая регуляцией изменений, происходящих в яичниках, в условиях теплового или голодового стресса (Gruntenko et al., 2003a; Terashima et al., 2005; Gruntenko, Rauschenbach, 2008).

Несмотря на «вспомогательную» роль ЮГ в регуляции оогенеза и размножения у *Drosophila*, имеются данные о том, что у мух со сниженным уровнем ювенильного гормона наблюдаются нарушения репродукции, выражающиеся в задержке начала откладки яиц и снижении плодовитости (Altaratz et al., 1991; Gruntenko et al., 2003b; Yamamoto et al., 2013; Meiselman et al., 2017), а обработка самок эндогенным ЮГ ускоряет созревание яиц (Richard et al., 2001). Таким образом, можно предположить, что, контролируя поглощение вителлогенинов ооцитами (Berger, Dubrovsky, 2005), ЮГ участвует в определении уровня плодовитости у *Drosophila*.

Внутриклеточная сигнализация ЮГ достаточно хорошо описана в настоящее время (Jindra et al., 2015; Roy et al., 2018), включая комплекс рецептора ЮГ Methoprene-tolerant (Met) – Taiman – Germ cell-expressed (Gce), белок теплового шока HSP83 и нуклеопорин Nup358, взаимодействующие с Met и обеспечивающие проникновение гормона в ядро и активацию им транскрипционного фактора Kr-h1. В то же время механизмы регуляции уровня самого ЮГ до сих пор недостаточно исследованы.

Чтобы пополнить арсенал знаний по этим вопросам, мы оценили уровень плодовитости и экспрессии генов синтеза и деградации ЮГ, *jhamt* и *Jheh1*, у четырех линий *Drosophila melanogaster*, для двух из которых су-

ществование различий в уровне плодовитости было продемонстрировано ранее (Adonyeva et al., 2021). Ген *jhamt* кодирует фермент кислую О-метилтрансферазу ЮГ (ЖНАМТ), превращающий ЮГ-кислоту или неактивные предшественники ЮГ в активную форму гормона на заключительном этапе пути биосинтеза ЮГ у насекомых (Niwa et al., 2008). Ген *Jheh1* кодирует одну из форм эпоксидгидразы ЮГ, которая инактивирует гормон путем гидролиза эпоксидной функциональной группы с образованием ЮГ-диола (Flatt et al., 2005).

Следует отметить, что еще одним фактором, способным влиять как на плодовитость мух, так и на метаболизм ЮГ у них, является инфицирование матерински-наследуемой симбиотической  $\alpha$ -протеобактерией *Wolbachia pipiensis* (Werren et al., 2008; Burdina, Gruntenko, 2022). Вольбахии – чрезвычайно широко распространенный внутриклеточный симбионт насекомых, инфицирующий более 40 % исследованных видов и оказывающий значительное влияние на физиологию хозяина (Werren et al., 2008; Burdina, Gruntenko, 2022). Поскольку линии *w153<sup>T</sup>* и *Bi90<sup>T</sup>*, различия в плодовитости которых были показаны ранее, происходят каждая от отдельной самки, отловленной в дикой природе, и были изначально инфицированы *Wolbachia*, мы решили использовать для анализа как несущие инфекцию *w153* и *Bi90*, так и прошедшие антибактериальную терапию *w153<sup>T</sup>* и *Bi90<sup>T</sup>* в поисках возможных эффектов *Wolbachia* на уровень плодовитости и экспрессию генов метаболизма ювенильного гормона.

## Материалы и методы

**Линии дрозофилы.** В работе были использованы четыре линии *D. melanogaster*: полученные от одной самки линии *w153* и *Bi90*, несущие штаммы *Wolbachia*, относящиеся к генотипам *wMelCS* и *wMel* соответственно (Plinsky, 2013), и их отводки, *w153<sup>T</sup>* и *Bi90<sup>T</sup>*, прошедшие антибактериальную терапию до начала экспериментов. Линии получены из коллекции Института цитологии и генетики СО РАН. Важно отметить, что штамм *Wolbachia wMelPlus*, инфицирующий линию *w153*, отличается от других опубликованных штаммов генотипа *wMelCS* наличием большой хромосомной инверсии (Korenskaia et al., 2022).

Мух содержали на стандартной питательной среде (агар-агар 7 г/л; кукурузная мука 50 г/л; сухие дрожжи 18 г/л; сахар 40 г/л) в инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 25 °С, относительной влажности 50 %, 12-ча-

совом световом дне. Для экспериментов мух синхронизировали по вылету (мух собирали через 3–4 ч). Для анализа плодовитости и уровня экспрессии генов брали самок в возрасте 10 сут после вылета имаго.

**Выделение суммарной РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени.** Для оценки количества мРНК генов *jhamt* и *Jheh1* замораживали в жидком азоте в 1.5 мл пробирке типа Ерпендорф по 15 самок для каждого биологического повтора каждой линии. Всего было сделано три биологических повтора всех четырех линий дрозофил. После извлечения пробирки из жидкого азота к замороженным мухам добавляли 150 мкл TRI reagent No. BCVT8883 (Sigma, США) и гомогенизировали их пестиком. Для освобождения гомогената от крупных фрагментов тканей центрифугировали пробирки 5 мин при 10000 оборотов в центрифуге Ерпендорф при температуре 7 °С и переносили гомогенат в чистые 0.5 мл пробирки. Добавляли 30 мкл холодного хлороформа и после встряхивания оставляли на 15 мин при комнатной температуре. Затем центрифугировали гомогенат 15 мин при 12000 оборотов (7 °С). К супернатанту добавляли 75 мкл холодного изопропанола и после встряхивания оставляли на 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования (12000 оборотов 10 мин) дважды промывали осадок 150 мкл 75° этанола с промежуточным центрифугированием и подсушивали осадок, который затем растворяли в 100 мкл деионизированной воды. Концентрацию РНК измеряли на Nanodrop OneC (Thermo Scientific, США) и доводили деионизированной водой до 200 нг/мкл. Синтез кДНК выполняли с помощью ABScript III RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover No. RK20429 (ABclonal Technology, Китай) в соответствии с прилагаемым к нему протоколом.

Экспрессию *jhamt* и *Jheh1* анализировали на ДНК-амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США) с помощью метода ПЦР в реальном времени с использованием набора M-427 с SYBR-Green I («Синтол», Россия). Данные нормировали на *Act5C*. Для каждого образца делали по три технических повтора (см. таблицу).

**Плодовитость.** Для расчета плодовитости три пары самок и самцов в возрасте от 0 до 5 ч помещали в стаканы для культивирования (по 10 стаканов на экспериментальную группу), где они откладывали яйца в стандартных условиях содержания, и переносили их в свежие стаканы каждые 24 ч в течение 10 дней. Плодовитость оценивали как количество потомства (имаго), появляющегося из яиц, отложенных экспериментальными мухами в течение десятих сут, в пересчете на одну родительскую самку.

**Статистический анализ.** Статистическую значимость различий уровня плодовитости (количество яиц в день на одну самку) в экспериментальных группах оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Попарные сравнения проводили с применением поправки Бенджамини–Хохберга. Во всех случаях величина  $p < 0.05$  считалась статистически значимой. Результаты на гистограммах представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Анализ данных по экспрессии генов проводили методом  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak, Schmittgen, 2001) с использованием трех биологических повторов, каждая из которых получена из трех технических. Поскольку амплификатор Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad) сообщает только среднюю из трех технических и ошибку средней, ни проверить нормальность, ни воспользоваться непараметрическими критериями, ни даже применить бутстреп нельзя. Однако из этой информации легко получить сумму квадратов трех технических значений.

Общая формула квадрата ошибки средней:

$$SEM^2(\bar{x}) = (\sum x_i^2 - N\bar{x}^2) / (N \times (N - 1)).$$

Тогда для каждой биологической повторности  $N = 3$  и

$$\sum x_i^2 = 6SEM^2(\bar{x}) + 3\bar{x}^2.$$

Этого достаточно, чтобы рассчитать как общую среднюю, так и ее ошибку:

$$\bar{x} = (\sum \bar{x}_k) / 3;$$

$$SEM^2(\bar{x}) = (6\sum SEM^2(\bar{x}_k) + 3\sum \bar{x}_k^2 - 9\bar{x}^2) / 72.$$

Суммарное число технических значений для каждой общей средней, очевидно, равно 9. При расчете критерия Стьюдента достоверности разности двух общих средних получается  $2 \times 9 - 2 = 16$  степеней свободы. Известно, что критерии достоверности типа критерия Стьюдента устойчивы к отклонениям от нормальности (Kendall, Stuart, 1961) из-за приближения распределения средних к нормальному с ростом объема выборки.

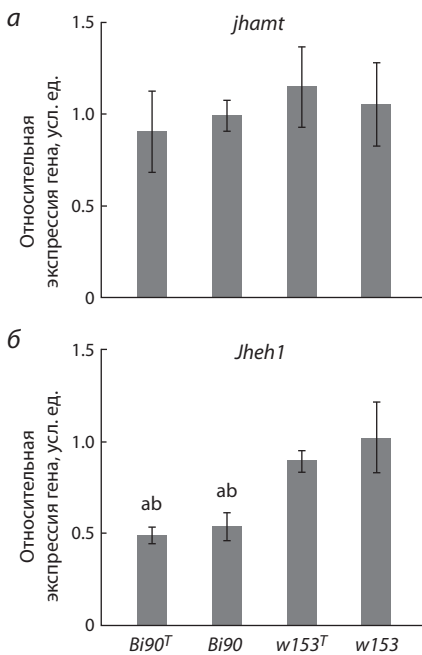
Поскольку всего произведено шесть сравнений, для *p*-value дополнительно рассчитаны поправки Бенджамини–Хохберга в форме, удобной для сравнения с тремя стандартными уровнями значимости (Наркевич, Виноградов, 2020).

## Результаты и обсуждение

Количественная ОТ-ПЦР в реальном времени не обнаружила достоверных различий в уровне экспрессии гена ксил-О-метилтрансферазы ЮГ *jhamt* как между линиями с одинаковым генетическим фоном, но либо инфидиро-

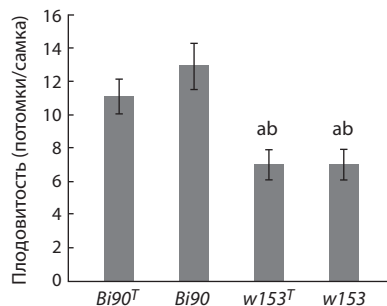
Последовательности праймеров, использованных в ОТ-ПЦР в реальном времени

Название гена	5'→3'	Длина	Tm, °C	Литературный источник
<i>jhamt</i>	F	GTCAGTTGTTGAACGATGTGGGT	23	Qu et al., 2017
	R	CCTCATATTTTCACCTTGCTGC	24	
<i>Jheh1</i>	F	AGTTTACCAGGTTATGGCTGGTC	23	Guio et al., 2014
	R	CAGTCTCCACCCTGGATAAAGAA	23	
<i>Act5C</i>	F	GCGCCCTTACTCTTTCACCA	20	Guio et al., 2014
	R	ATGTCACGGACGATTTACCG	20	



**Рис. 1.** Уровень относительной экспрессии генов *jhamt* и *Jheh1* самок линий *D. melanogaster*: *Bi90* (инфицированной штаммом *wMel Wolbachia*), *w153* (инфицированной штаммом *wMelPlus Wolbachia*), *Bi90<sup>T</sup>* (неинфицированной), *w153<sup>T</sup>* (неинфицированной).

Каждое значение – среднее из трех биологических повторов. а – достоверность отличий от самок линии *w153* ( $p < 0.001$ ); б – достоверность отличий от самок линии *w153<sup>T</sup>* ( $p < 0.001$ ).



**Рис. 2.** Уровень плодовитости линий *D. melanogaster*: *Bi90* (инфицированной штаммом *wMel Wolbachia*), *w153* (инфицированной штаммом *wMelPlus Wolbachia*), *Bi90<sup>T</sup>* (неинфицированной), *w153<sup>T</sup>* (неинфицированной).

Каждое значение – среднее из 10 повторностей (три самки на повторность). Планки погрешности отражают стандартную ошибку. а – достоверность отличий от самок линии *Bi90* ( $p < 0.001$ ); б – достоверность отличий от самок линии *Bi90<sup>T</sup>* ( $p < 0.001$ ).

ванными *Wolbachia*, либо нет (пары линий *D. melanogaster Bi90/Bi90<sup>T</sup>* и *w153/w153<sup>T</sup>*), так и между линиями с одинаковым инфекционным статусом, но с разным генетическим фоном (пары *Bi90/w153* и *Bi90<sup>T</sup>/w153<sup>T</sup>*)

(рис. 1, а). В то же время экспрессия гена эпоксидгидразы ЮГ, *Jheh1*, была достоверно ниже ( $p < 0.001$ ) у линий *Bi90* и *Bi90<sup>T</sup>* по сравнению как с линией *w153*, так и с линией *w153<sup>T</sup>* (см. рис. 1, б). Это свидетельствует об отсутствии влияния инфицирования *Wolbachia* на уровень экспрессии *jhamt* и *Jheh1* и позволяет предположить отсутствие изменений синтеза и деградации ЮГ под действием бактерии. С другой стороны, существование различий в уровне экспрессии гена фермента деградации ЮГ, *Jheh1*, между парами линий *D. melanogaster Bi90/Bi90<sup>T</sup>* и *w153/w153<sup>T</sup>* дает возможность предположить различия в уровне активности фермента и, как следствие, – в содержании ЮГ, уровень которого должен быть выше у линий *Bi90* и *Bi90<sup>T</sup>* со сниженным уровнем экспрессии гена фермента деградации гормона.

Анализ плодовитости линий *Bi90*, *Bi90<sup>T</sup>*, *w153* и *w153<sup>T</sup>* показал, что линии с предположительно более низким уровнем ЮГ – *w153* и *w153<sup>T</sup>* – характеризуются достоверно более низкой ( $p < 0.001$ ) плодовитостью по сравнению как с линией *Bi90*, так и с линией *Bi90<sup>T</sup>* (рис. 2). Это соответствует данным, полученным ранее, о корреляции низкого уровня плодовитости с низким уровнем ЮГ (Altaratz et al., 1991; Gruntenko et al., 2003b; Yamamoto et al., 2013; Meiselman et al., 2017) или с мутацией гена его рецептора, *Met<sup>27</sup>* (Gruntenko et al., 2000). Данные о снижении числа стволовых клеток зародышевой линии в яичниках *D. melanogaster* с мутациями в генах *jhamt* и *Met* или при нокадауне последнего также свидетельствуют о важной роли ЮГ в регуляции плодовитости (Luo et al., 2020).

Однако следует отметить, что в большинстве исследований показанные нарушения репродукции и снижение плодовитости были связаны с нарушением синтеза или функции рецептора ЮГ (Altaratz et al., 1991; Yamamoto et al., 2013; Meiselman et al., 2017; Luo et al., 2020), тогда как наши результаты свидетельствуют о корреляции межлинейных различий в плодовитости у *D. melanogaster* с различиями в экспрессии гена, кодирующего фермент не синтеза, а деградации ювенильного гормона.

Отсутствие различий в плодовитости между инфицированными и не инфицированными вольбахией линиями с одинаковым генетическим фоном (*Bi90/Bi90<sup>T</sup>* и *w153/w153<sup>T</sup>*) коррелирует с отсутствием различий в экспрессии генов синтеза и деградации ЮГ между ними и позволяет предположить отсутствие влияния вольбахии на этот показатель. Это несколько противоречит данным, полученным нами ранее на линии *Bi90<sup>wMelPlus</sup>*, плодовитость и деградация ЮГ у которой отличались от таковых у линии *Bi90* (Gruntenko et al., 2019).

Однако нужно учесть, что линия *Bi90<sup>wMelPlus</sup>* была получена путем переноса цитоплазмы со штаммом вольбахии из линии *w153* на ядерный фон линии *Bi90* (посредством 20 поколений возвратных скрещиваний самок, несущих соответствующий штамм *Wolbachia*, с самцами линии *Bi90<sup>T</sup>*), и существует ненулевая вероятность того, что некоторые аспекты влияния вольбахии на физиологию хозяина могут быть связаны со свежим переносом бактерии, а не с самим фактом ее наличия в цитоплазме. Это предположение косвенно подтверждается отсутствием эффекта вольбахии на плодовитость и деградацию ЮГ у линии *Bi90*, обнаруженным в той же работе (Gruntenko et al., 2019).

Также с отсутствием эффекта *Wolbachia* на экспрессию генов *jhamt* и *Jheh1* у самок *D. melanogaster* коррелируют данные транскриптомного анализа инфицированных самок этого вида, не выявившего изменений в дифференциальной экспрессии генов сигнального каскада ЮГ и ферментов его метаболизма в сравнении с неинфицированными самками (Detcharoen et al., 2021; Lindsey et al., 2021).

### Заключение

Суммируя полученные данные, можно выдвинуть три предположения, сделанных на их основе: 1) ЮГ все же играет некоторую роль в контроле репродуктивной функции *D. melanogaster*; 2) катаболизм ЮГ имеет не меньшее, если не большее, значение в обеспечении межлинейного полиморфизма по его уровню; 3) *Wolbachia* не влияет на уровень ЮГ и плодовитость *D. melanogaster* при длительной истории симбиоза конкретного штамма бактерии и линии хозяина.



## 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)]
- Adonyeva N.V., Menshanov P.N., Gruntenko N. A link between atmospheric pressure and fertility of *Drosophila* laboratory strains. *Insects*. 2021;12(10):947. DOI 10.3390/insects12100947
- Altartaz M., Applebaum Sh.W., Richard D.S., Gilbert L.I., Segal D. Regulation of juvenile hormone synthetis in wild-type and apterous mutant *Drosophila*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1991;81(1-3):205-216. DOI 10.1016/0303-7207(91)90219-i
- Berger E.M., Dubrovsky E.B. Juvenile hormone molecular actions and interactions during development of *Drosophila melanogaster*. *Vitam. Horm.* 2005;73:175-215. DOI 10.1016/S0083-6729(05)73006-5
- 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
- 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
- Flatt T., Tu M.P., Tatar M. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bio-Essays*. 2005;27(10):999-1010. DOI 10.1002/bies.20290
- Gruntenko N.E., Rauschenbach I.Y. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effects on reproduction. *J. Insect Physiol.* 2008;54(6):902-908. DOI 10.1016/j.jinsphys.2008.04.004
- Gruntenko N.E., Khlebobdarova T.M., Vasenkova I.A., Sukhanova M.J., Wilson T.G., Rauschenbach I.Y. Stress-reactivity of a *Drosophila melanogaster* strain with impaired juvenile hormone action. *J. Insect Physiol.* 2000;46(4):451-456. DOI 10.1016/S0022-1910(99)00131-6
- Gruntenko N.E., Bownes M., Terashima J., Sukhanova M.Zh., Rauschenbach I.Y. Heat stress affects oogenesis differently in wild-type *Drosophila virilis* and a mutant with altered juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone levels. *Insect. Mol. Biol.* 2003a;12(4):393-404. DOI 10.1046/j.1365-2583.2003.00424.x
- Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V., Bownes M., Segal D., Adonyeva N.V., Rauschenbach I.Y. Stress response in a juvenile hormone-deficient *Drosophila melanogaster* mutant apterous<sup>56f</sup>. *Insect Mol. Biol.* 2003b;12(4):353-363. DOI 10.1046/j.1365-2583.2003.00419.x
- 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
- Guio L., Barron M.G., Gonzalez J. The transposable element Bari-Jeh1 mediates oxidative stress response in *Drosophila*. *Mol. Ecol.* 2014; 23(8):2020-2030. DOI 10.1111/mec.12711
- Ilinsky Y.Y. Coevolution of *Drosophila melanogaster* mtDNA and *Wolbachia* genotypes. *PLoS One*. 2013;8(1):e54373. DOI 10.1371/journal.pone.0054373
- Jindra M., Bellés X., Shinoda T. Molecular basis of juvenile hormone signaling. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015;11:39-46. DOI 10.1016/j.cois.2015.08.004
- Kendall M.G., Stuart A. The Advanced Theory of Statistics. Vol. 2. Inference and Relationship. London: Charles Griffin, 1961
- 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
- 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
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. DOI 10.1006/meth.2001.1262
- Luo W., Veeran S., Wang J., Li S., Li K., Liu S.N. Dual roles of juvenile hormone signaling during early oogenesis in *Drosophila*. *Insect Sci.* 2020;27(4):665-674. DOI 10.1111/1744-7917.12698
- Meiselman M., Lee S.S., Tran R.T., Dai H., Ding Y., Rivera-Perez C., Wijesekera T.P., Dauwalder B., Noriega F.G., Adams M.E. Endocrine network essential for reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017;114(19):E3849-E3858. DOI 10.1073/pnas.1620760114
- Niwa R., Niimi T., Honda N., Yoshiyama M., Itoyama K., Kataoka H., Shinoda T. Juvenile hormone acid O-methyltransferase in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2008;38(7):714-720. DOI 10.1016/j.ibmb.2008.04.003
- Qu Z., Bendena W.G., Nong W., Siggins K.W., Noriega F.G., Kai Z.P., Zang Y.Y., Koon A.C., Chan H.Y.E., Chan T.F., Chu K.H., Lam H.M., Akam M., Tobe S.S., Lam Hui J.H. MicroRNAs regulate the sesquiterpenoid hormonal pathway in *Drosophila* and other arthropods. *Proc. Biol. Sci.* 2017;284(1869):20171827. DOI 10.1098/rspb.2017.1827
- Richard D.S., Jones J.M., Barbarito M.R., Cerula S., Detweiler J.P., Fisher S.J., Brannigan D.M., Scheswohl D.M. Vitellogenesis in diapausing and mutant *Drosophila melanogaster*: further evidence for the relative roles of ecdysteroids and juvenile hormones. *J. Insect Physiol.* 2001;47(8):905-913. DOI 10.1016/S0022-1910(01)00063-4
- Roy S., Saha T.T., Zou Z., Raikhel A.S. Regulatory pathways controlling female insect reproduction. *Annu. Rev. Entomol.* 2018;63:489-511. DOI 10.1146/annurev-ento-020117-043258
- Terashima J., Takaki K., Sakurai S., Bownes M. Nutritional status affects 20-hydroxyecdysone concentration and progression of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Endocrinol.* 2005;187(1):69-79. DOI 10.1677/joe.1.06220
- Truman J.W., Riddiford L.M. The morphostatic actions of juvenile hormone. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2007;37(8):761-770. DOI 10.1016/j.ibmb.2007.05.011
- 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
- Wu Z., Yang L., He Q., Zhou S. Regulatory mechanisms of vitellogenesis in insects. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;8:593613. DOI 10.3389/fcell.2020.593613
- Yamamoto R., Bai H., Dolezal A.G., Amdam G., Tatar M. Juvenile hormone regulation of *Drosophila* aging. *BMC Biol.* 2013;11:85. DOI 10.1186/1741-7007-11-85

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-14-00090. В работе использовались линии *D. melanogaster* из коллекции Института цитологии и генетики СО РАН, поддерживаемой Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект FWNR-2022-0019).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 01.12.2023. После доработки 17.01.2024. Принята к публикации 18.01.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-23

# Influence of breed and environment on leukocyte telomere length in cattle

N.S. Yudin <sup>1#</sup>, A.V. Igoshin <sup>1#</sup>, G.A. Romashov<sup>1</sup>, A.A. Martynov<sup>2</sup>, D.M. Larkin <sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Arctic State Agrotechnological University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia

<sup>3</sup> Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

 dlarkin@rvc.ac.uk

**Abstract.** High milk yield is associated with reduced longevity in high-producing dairy cattle breeds. Pre-term culling leads to high replacement heifer demand and economic losses for the dairy industry. Selection for this trait is limited because of low heritability and difficulties in phenotype measurement. Telomeres are elements found at the ends of chromosomes, consisting of repetitive DNA sequences, several thousand base pairs in length, coupled with nucleoprotein complexes. Eventually, in humans and most other animals, telomere length reduces with age. When telomeric DNA is truncated to a critical length, cell ageing, cell cycle arrest, and apoptosis are induced. As a result, telomere length can be considered as a predictor of health risks and an individual's lifespan. The leukocyte telomere length may be used as a proxy phenotype of productive lifespan to improve cattle selection. Our objectives were to assess the effects of breed and breed group (dairy vs. beef) on the leukocyte telomere length and to estimate the effect of cold climate on this trait in Kalmyk cattle populations from the South (Rostov Oblast) and Far North (Republic of Sakha) regions of Russia. The leukocyte telomere lengths were estimated computationally from whole-genome resequencing data. We leveraged data on leukocyte telomere length, sex, and age of 239 animals from 17 cattle breeds. The breed factor had a significant effect on leukocyte telomere length across our sample. There was no difference in leukocyte telomere length between dairy and beef groups. The population factor had a significant effect on leukocyte telomere length in Kalmyk animals. In conclusion, we found that breed, but not breed group (dairy vs. beef), was significantly associated with leukocyte telomere length in cattle. Residence in colder climates was associated with longer leukocyte telomere length in Kalmyk breed cattle.

**Key words:** longevity; selection; cattle; breed; dairy; beef; environment; cold climate; leukocyte telomere length.

**For citation:** Yudin N.S., Igoshin A.V., Romashov G.A., Martynov A.A., Larkin D.M. Influence of breed and environment on leukocyte telomere length in cattle. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):190-197. DOI 10.18699/vjgb-24-23


# Влияние породы и среды на длину теломер лейкоцитов у крупного рогатого скота

Н.С. Юдин <sup>1#</sup>, А.В. Игошин <sup>1#</sup>, Г.А. Ромашов<sup>1</sup>, А.А. Мартынов<sup>2</sup>, Д.М. Ларкин <sup>3</sup> 

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

<sup>2</sup> Арктический государственный агротехнологический университет, Якутск, Россия

<sup>3</sup> Королевский ветеринарный колледж, Лондон, Великобритания

 dlarkin@rvc.ac.uk

**Аннотация.** Высокие удои молока сопряжены с сокращением продолжительности жизни у высокопродуктивных молочных пород скота. Преждевременная выбраковка приводит к значительным экономическим потерям в молочном животноводстве и увеличению потребности в ремонтных телках. Отбор по этому признаку затруднен из-за низкой наследуемости и сложности измерения данного фенотипа. Теломеры – это структуры, находящиеся на концах хромосом, состоящие из повторяющихся последовательностей ДНК длиной в несколько тысяч пар оснований, связанных с нуклеопротеиновыми комплексами. У людей и большинства других животных длина теломер уменьшается с возрастом. Когда теломерная ДНК сокращается до критической длины, индуцируются процессы старения клеток, остановки клеточного цикла и апоптоза. В результате длину теломер можно рассматривать как предиктор рисков для здоровья и продолжительности жизни индивида. Длина теломер лейкоцитов может быть использована в качестве суррогатного фенотипа для признака продуктивного долголетия для улучшения селекции крупного рогатого скота. Целью нашей работы было – оценить влияние породы и направления продуктивности (молочное или мясное) на длину теломер лейкоцитов, а также проанализировать влияние холодного климата на этот признак в популяциях крупного рогатого скота калмыцкой породы на Юге (Ростовская область) и Крайнем Севере (Республика Саха) России. Измерение длины теломер лейкоцитов осуществлено с помощью компьютерных методов на основе данных полногеномного

ресеквенирования. Мы использовали данные о длине теломер лейкоцитов, половой принадлежности и возрасте 239 животных, относящихся к 17 породам крупного рогатого скота. Фактор породы оказывает существенное влияние на длину теломер лейкоцитов в нашей выборке. Достоверных различий в длине теломер лейкоцитов между молочными и мясными группами нами не выявлено. Значительное влияние на длину теломер лейкоцитов у животных калмыцкой породы оказывает фактор популяции. Таким образом, мы обнаружили, что именно порода, но не направление продуктивности (молочное или мясное), достоверно влияла на длину теломер лейкоцитов у крупного рогатого скота. Разведение в более холодном климате было ассоциировано с большей длиной теломер лейкоцитов у крупного рогатого скота калмыцкой породы.

Ключевые слова: долголетие; селекция; крупный рогатый скот; молочный; мясной; холодный климат; длина теломер лейкоцитов.

## Introduction

High milk production correlates with poor longevity in high-producing cattle breeds, primarily Holstein Friesian (Hu et al., 2021). Pre-term culling leads to high replacement heifer demand and economic losses for the dairy industry (Grandl et al., 2019). There is a need to improve the longevity traits of dairy cattle. However, selection for these traits is limited because of low heritability and difficulties in phenotype measurement (Zhang H. et al., 2021).

Telomeres are elements found at the ends of chromosomes, consisting of repetitive DNA sequences, several thousand base pairs in length, coupled with nucleoprotein complexes (Jenner et al., 2022). They protect the chromosomes from degradation and inhibit aberrant rearrangements during cell division (Monaghan, Ozanne, 2018). Telomeres become shorter with every cell division due to the end replication problem (Chakravarti et al., 2021) but can be maintained through telomerase activity (Schrumpfová, Fajkus, 2020) and shelterin complex (de Lange, 2018). Eventually, in humans and most other animals, telomere length reduces with age (Blackburn et al., 2015; Whitemore et al., 2019). When telomeric DNA is truncated to a critical length, cell ageing, cell cycle arrest, and apoptosis are induced (Chakravarti et al., 2021; López-Otín et al., 2023). As a result, telomere length can be considered as a predictor of health risks and an individual's lifespan. Telomere length is correlated with many age-related conditions in humans (Armanios, 2022; Rossiello et al., 2022) and reduced life expectancy in humans and other species (Wilbourn et al., 2018; Liu et al., 2019; Crocco et al., 2021).

Telomeres in cattle shorten with age, similar to most other animals (Miyashita et al., 2002). Adult Holstein dams with short telomeres are more likely to be culled than dams with long telomeres (Brown et al., 2012). Productive lifespan in Holsteins was correlated with telomere length at birth (Ilska-Warner et al., 2019), at the age of one year (Seeker et al., 2018a), as well as telomere attrition rate (Seeker et al., 2021). The telomere length in the Agerolese breed, having a long lifespan, was significantly higher than that in the Holstein breed of the same age (Iannuzzi et al., 2022). Therefore, telomere length may be used as a proxy trait of lifespan and health to improve cattle selection.

Telomere length in cattle is a complex trait controlled by both genetics and environment. However, it is still unclear to what extent these factors influence this trait. A recent meta-analysis of the heritability of telomere length showed a moderate mean heritability of this trait (0.45) in 18 vertebrate species (Chik et al., 2022). Estimates of the heritability of telomere length, even in a single species (human), may range from 0.36

(Andrew et al., 2006) to 0.70 (Broer et al., 2013). This variability in estimates appears to be due to different research methodologies. For example, in most studies, parents and offspring are of different ages. In statistical analyses, age is counted as a covariate, but this implies a linear relationship between telomere length and age, which is not always the case (Dugdale, Richardson, 2018).

The influence of environmental factors on telomere length has been well studied in human epidemiological studies. For example, a negative correlation was found between telomere length and emotional stress (Law et al., 2016), Western pattern diet (Rafie et al., 2017), cigarette smoking (Astuti et al., 2017), and environmental chemicals (Zhang X. et al., 2013). In birds, short telomeres or a high rate of telomere shortening have been associated with malaria infection (Asghar et al., 2016), increased brood size (Reichert et al., 2014), early postnatal stress (Herborn et al., 2014) and sibling competition (Mizutani et al., 2016).

Heritability estimates of leukocyte telomere length in Holstein cattle ranged from 0.32 to 0.47 (Seeker et al., 2018a, b). Fourteen candidate genes at birth and nine at first lactation were associated with this trait in this breed using a genome-wide association study (Ilska-Warner et al., 2019). Our genome-wide association study of seventeen cattle breeds revealed several SNPs associated with bovine telomere length. We also confirmed the effects of loci reported by previous studies (Igochin et al., 2023). Mastitis (Ilska-Warner et al., 2019), bovine leukaemia virus infection (Szczołka et al., 2019), oxidative stress (Ribas-Maynou et al., 2022), parturition and raising the first calf (O'Daniel et al., 2023), lameness (Ilska-Warner et al., 2019), and lactation (Laubenthal et al., 2016) have been found to be associated with cattle telomere length. The management of the farm and genetics are herd-related factors that can significantly affect telomere length (Brown et al., 2012). However, the question remains unanswered: to what extent is telomere length in cattle determined by breed and influenced by environmental stressors, such as weather conditions?

There are two studies on the association of the animal breed and telomere length in cattle (Tilesi et al., 2010; Iannuzzi et al., 2022). Both studies found differences in telomere lengths between the two cattle breeds in the same tissues. However, it is unclear how widespread this phenomenon is across multiple cattle breeds with different phylogenetic origins and ecogeographic breeding conditions. P. Kordowitzki et al. hypothesized that severely disturbed energy balance in high-producing dairy cows eventually leads to decreased regenerative capacity and premature senescence, which can be

The climatic conditions for the sampling locations in Rostov Oblast and the Republic of Sakha (according to <https://climatecharts.net> (Zepner et al., 2021), accessed on 30 August 2023)

Location	Coordinates	Mean January temperature, °C	Mean July temperature, °C	Mean annual temperature, °C	Precipitation sum, mm
Mechetny settlement (Rostov Oblast)	48°03'54"N, 40°38'23"E	-4.4	23.7	9.8	508.7
Kyuyorelyakh settlement (Republic of Sakha)	62°34'17"N, 126°50'26"E	-37.2	18.0	-9.1	312.7

assessed by telomere length (Kordowitzki et al., 2021). The fraction of short telomeres in PBMCs of the high-producing Holstein-Friesian breed was higher than in the dual-purpose Polish Red breed, but this observation was not supported by a statistical test significance. Therefore, it remains unclear whether different breeds of cattle (dairy vs. beef) exhibit variation in telomere length.

Seeker et al. suggested that heat may be an environmental stressor capable of causing telomere attrition (Seeker et al., 2021). They found a strong correlation between maximum summer temperature and telomere attrition in Holstein-Friesian cattle. Heat stress during gestation also affected the telomere length in newborn Holstein calves. A higher median temperature-humidity index during gestation resulted in calves born with shorter telomere lengths (Meesters et al., 2023). There are, however, no studies that investigate the influence of cold weather on telomere length in cattle. A single human study showed that prenatal temperature exposure below 5 °C was associated with longer telomere length in newborn babies (Martens et al., 2019).

There are only two native beef cattle breeds in Russia: Kalmyk and its derivative Kazakh Whiteheaded breeds. It is believed that the Kalmyk cattle originated in Northwest China (Dzungaria) and was brought to Russia, to the Volga area, by migrating nomadic tribes in the seventeenth century (Dmitriev, Ernst, 1989). The Kalmyk breed was created under harsh conditions: the icy wind in winter or the hot sun in summer, frequent epizootics, etc. The specific traits of the Kalmyk breed include high viability, adaptation to the harsh climate, resistance to infections, long lifespan, thickening of the epidermis at the expense of the dermis in winter, abundance of sebaceous and sweat glands in the skin compared to other breeds (Dmitriev, Ernst, 1989). In Russia, the Kalmyk beef herd is mainly found in two regions: the Republic of Kalmykia and Rostov Oblast (Kayumov et al., 2014). This breed has also been reared in the Republic of Sakha (Yakutia) since 2013 when about 200 Kalmyk cattle animals were imported from the Republic of Kalmykia (Sleptsov, Machakhtyrova, 2019). Yakutia has an extreme and severe climate, with the average winter temperature below -35 °C.

The objectives of our study were (1) to assess the effects of breed and breed group (dairy vs. beef) on the leukocyte telomere length in the sample of 239 animals from 17 cattle breeds and (2) to estimate the effect of cold climate on this trait in Kalmyk cattle populations from the South and Far North regions of Russia. We hypothesized that high milk yield or extreme cold weather may be stress factors that may have led to a change in telomere length in cattle.

## Materials and methods

**Samples.** In this work, we leveraged data on leukocyte telomere length, sex, and age of 239 animals from 17 cattle breeds used in our previous study (Igoshin et al., 2023). The leukocyte telomere lengths have been estimated computationally from whole-genome resequencing data using TelSeq software (Ding et al., 2014), which is a frequently used program for this purpose and which has been confirmed by multiple experimental techniques (Ding et al., 2014; Cook et al., 2016; Pinese et al., 2020; Taub et al., 2022; Zhang D. et al., 2022). The details of the estimation procedure can be found in our previous work (Igoshin et al., 2023).

The breeds investigated are dairy (Russian Black Pied, Holstein, Kholmogory, Red Steppe, Yaroslavl), beef (Charolais, Hereford, Kalmyk, Kazakh Whiteheaded, Wagyu), and dual-purpose (Alatau, Bestuzhev, Buryat, Kostroma, Tagil, Ukrainian Grey, Yakut) (Dunin, Dankvert, 2013; Lhasaranov, 2020). Among 30 individuals of the Kalmyk cattle breed (Supplementary Material 1)<sup>1</sup>, one group of animals ( $n = 10$ ) was reared in Rostov Oblast (Mechetny settlement), while the other ( $n = 20$ ) was from the Republic of Sakha (Kyuyorelyakh settlement). The climatic conditions in these locations differ substantially (see the Table). All the Kalmyk animals from both locations were raised in a stall-pasture system.

**Population structure.** Even in the absence of selection, a founder effect or, more broadly, genetic drift could lead to genetic differentiation between two isolated populations of common origin. To ensure that two populations of the Kalmyk breed are genetically indistinguishable, we performed the principal component analysis using PLINK v.1.9 (Purcell et al., 2007) (--pca option) and the analysis of population structure using fastSTRUCTURE v1.0 (Raj et al., 2014). The fastSTRUCTURE program was run with  $K$  ranging from  $K = 2$  to  $K = 8$ . The resulting cluster memberships were visualized with PONG v.1.5 software (Behr et al., 2016). For both methods, we used an LD-pruned (PLINK: --indep-pairwise 5000 100 0.1) dataset containing genotypes of 20,184 SNPs in 116 animals (Kalmyk animals and individuals having SRA ID from Supplementary Material 1).

**Statistical analysis.** Like in many other studies, the distribution of LTL in our work was skewed. If not corrected, this violates the assumptions of parametric tests, thus affecting statistical power (Lantz, 2013). Therefore, associations with LTL were tested by using log-transformed LTL values (e.g. Leung et al., 2014; Lynch et al., 2016). To find out whether a breed factor contributes to LTL variation in cattle, we used

<sup>1</sup> Supplementary Materials 1–6 are available at: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx10.pdf>

ANOVA (“*aov*” R function) with log-transformed LTLs ( $\log_{10}(\text{LTLs})$ ) as a response variable and breed as a factor variable, accounting for age and sex:  $\text{aov}(\log\text{LTL} \sim \text{Age} + \text{Sex} + \text{Breed})$ . To find out which breeds significantly differ from each other, we additionally performed a standard ANOVA *post hoc* test – Tukey’s HSD test utilising the “*glht*” function from the “*multcomp*” R package (Hothorn et al., 2008). Also, we combined beef and dairy breeds into two groups and tested for a difference between them:  $\text{aov}(\log\text{LTL} \sim \text{Age} + \text{Sex} + \text{Group})$ . As all the Kalmyk individuals used were dams, the test for differences between this breed’s populations was conducted by accounting only for age:  $\text{aov}(\log\text{LTL} \sim \text{Age} + \text{Population})$ .

For statistically significant variables we estimated the variance explained ( $\eta^2$ ) using the “*eta\_squared*” function from the “*effectsize*” R package (Ben-Shachar et al., 2020) with the “*partial = TRUE*” option.

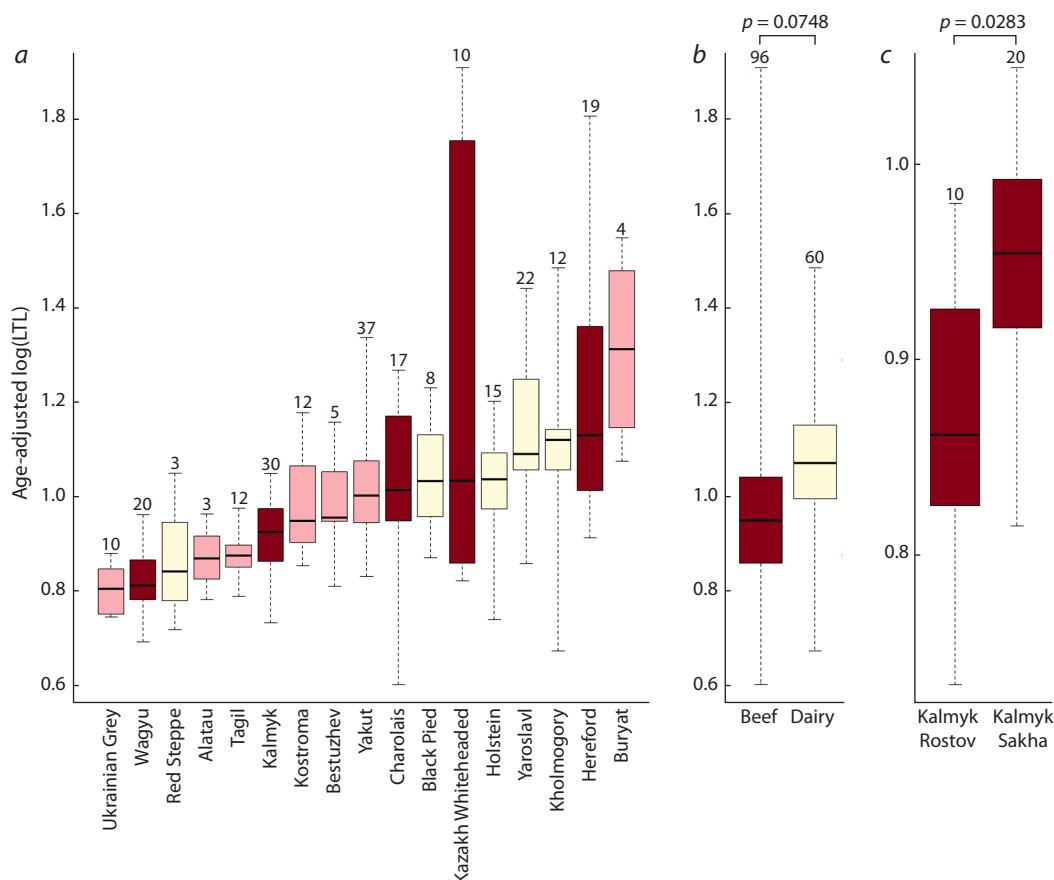
**Preparing data for visualization and descriptive statistics.** As confirmed in our study, telomere length typically decreases with age (Spearman’s  $\rho = -0.305$ ,  $p = 1.58 \times 10^{-6}$  for raw and log-transformed LTLs) (Supplementary Material 2). Therefore, for boxplot visualization and descriptive statistics, we calculated the  $\log_{10}(\text{LTL})$  values expected given the constant age. For this purpose, we fitted a regression model (“*lm*” R function) with  $\log\text{LTL}$  as the response variable, and

age, sex (coded by 0/1) and breed (16 covariates coded by 0/1) variables as predictors. As a result, we obtained regression parameters (intercept and slopes for each predictor) and residuals. For each animal, we summed up: the intercept, the animal’s residual, and products of each predictor value and its respective slope. For the age predictor, however, actual values were substituted by the average value of 4.5 years. The resulting values represent the expectation for  $\log\text{LTL}$  given the constant age of 4.5 years. These age-adjusted  $\log_{10}(\text{LTLs})$  and their corresponding values in kilobases (hereafter “age-adjusted LTLs”) are shown in Supplementary Material 1. The descriptive statistics for breeds can be found in Supplementary Material 3.

## Results

The statistical analysis shows that breed factor has a significant ( $p = 6.12 \times 10^{-15}$ ,  $\eta^2 = 0.37$ ) effect on leukocyte telomere length across our sample of 239 individuals (see Figure, a). Tukey’s HSD test showed significant differences for 28 breed pairs (Supplementary Material 4). At the same time, there is no significant difference in LTL between dairy and beef groups ( $p = 0.0748$ ) (see Figure, b).

The statistical testing performed for the Kalmyk breed shows that the population factor has a significant ( $p = 0.0283$ ,



Boxplots illustrating the log-transformed and adjusted for age (expectation at 4.5 years) leukocyte telomere lengths in (a) different breeds; (b) beef and dairy breed groups, and (c) in two populations of the Kalmyk breed.

The *p*-values designate the statistical significance for differences between the abovementioned categories. The brown, pink and light-yellow colours correspond to beef, dual-purpose, and dairy breeds. The numbers at the top of boxplots indicate the number of animals.

$\eta^2 = 0.17$ ) effect on LTL in studied Kalmyk animals, with the individuals from Rostov Oblast having shorter telomeres (see Figure, c). The results of the principal component analysis show that the Rostov and Sakha populations form two highly overlapping clusters (Supplementary Material 5). Also, fastSTRUCTURE results suggest that the two Kalmyk populations are homogeneous and possible genetic differences between them do not exceed the level of variation within other breeds (Supplementary Material 6). Therefore, the LTL differences between the two groups are most likely explained by environmental conditions.

It should also be mentioned that the age variable significantly affects LTL in all tests:  $p = 1.46 \times 10^{-6}$ ,  $\eta^2 = 0.10$  (testing for the effect of breed);  $p = 0.0248$ ,  $\eta^2 = 0.07$  (dairy vs. beef group); and  $p = 0.0038$ ,  $\eta^2 = 0.27$  (Kalmyk Sakha vs. Kalmyk Rostov). However, the sex factor has no significant effect on LTL either in the test for breed factor ( $p = 0.205$ ) or in the test for the factor of breed group ( $p = 0.8752$ ).

## Discussion

The primary aim of this study was to investigate the correlation between the breed type and leukocyte telomere length (LTL) in cattle. Our additional goal was to check the effect of the environment (e. g., colder climate) on the LTL within populations of the same breed grown in different climates. Based on the resequencing data of 17 cattle breeds, our findings indicate that the breed factor has a significant impact on LTL. These results align with earlier studies that reported LTL differences in pairwise comparisons between cattle breeds (Tilesi et al., 2010; Iannuzzi et al., 2022). We also found evidence for an association between LTL and differences in climatic conditions for a single cattle breed reared in different regions of Russia.

It was shown in our analysis that the breed factor contributes more to total LTL variation compared to age. The possible practical implication for this could be the use of breeds characterised by long telomeres in crossbreeding programs aimed to improve telomere-length-associated phenotypes in cattle.

Apart from cattle, studies are reporting LTL differences between *Caenorhabditis elegans* strains (Cook et al., 2016), outbred populations and inbred strains of mice (*Mus musculus* and *Peromyscus leucopus*) (Manning et al., 2002), and dog breeds (Fick et al., 2012). These reports suggest the existence of a genetic basis for such variability. Based on heritability estimates for LTL in Holsteins (0.32–0.47) (Seeker et al., 2018a, b), we propose that genetic factors may largely explain inter-breed differences observed in our study.

Herein we compared the LTL in dairy and beef breeds. The results however, did not reveal any statistically significant difference between these two groups. This finding is consistent with a previous study that compared LTLs between dairy and dual-purpose cattle breeds, which also showed no difference (Kordowitzki et al., 2021). Our study focused on distinct groups of cattle breeds, specifically dairy and beef, covering a wider range of genetics than the previous study. Also, each production breed type was represented by five breeds. Therefore, the results reported herein could provide stronger support for the lack of LTL differences between the cattle breed types. Our results are also consistent with similar studies done in other domestic species, e. g., dogs, where no difference in LTL was reported for breed groups (working,

herding, hunting) (Fick et al., 2012). It appears that complementary contributions of many factors affecting a particular breed (e. g. genetic makeup, management practices, veterinary care, climate conditions, etc.) have a greater influence on the LTL than physiological features associated with different production types. This result suggests that the selection for telomere-length-associated traits will probably not lead to substantial changes in milk or meat yields.

To investigate the possible effects of environments on telomere lengths of the same cattle breed, we compared the LTLs between two populations of the Kalmyk cattle reared in different climatic conditions. We observed a significant difference in agreement with a previous human study showing an association between prenatal cold exposure and longer blood telomere length in newborns (Martens et al., 2019). Indeed, longer telomere lengths detected in animals from the Sakha Republic with colder climates compared to the control population from Rostov Oblast imply that there could be a mechanism of telomere maintenance in colder climates in cattle. In ectotherms, however, there are reports that at cooler conditions telomere shortening happens during development (Friesen et al., 2022; Burraco et al., 2023), but other authors did not confirm this observation (McLennan et al., 2018).

In bat species, *Myotis myotis*, average and minimum temperatures, rainfall and wind speed during the spring when bats emerge from hibernation, give birth and rear young were associated with higher telomere attrition (Foley et al., 2020). The authors, however, did not report which variable is the driver for telomere length change. The comparison of telomere length between two species of rodents hibernating at either 3 or 14 °C revealed that individuals hibernating at the warmer temperature had longer telomeres than individuals hibernating at the colder temperature (Nowack et al., 2019). The authors hypothesized that the observed effect was not related to cold climate, but rather was associated with restoration of telomere length during frequent arousals when the body temperature returns to normal values.

The mechanisms by which cold climate impacts leukocyte telomere length in cattle remain unclear. On the one hand, cold exposure may inhibit telomere shortening, since low temperature reduces the rate of cell proliferation in mammalian cells (Kanagawa et al., 2006; Fulbert et al., 2019). On the other hand, cold exposure may induce telomere elongation by influencing the components of the telomerase complex. It was shown that cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) was essential for telomere maintenance at hypothermia conditions *in vitro* by regulating both reverse transcriptase TERT and the RNA subunit TERC in the telomerase core complex (Zhang Y. et al., 2016). The transcription of telomeric repeat-containing RNAs (TERRAs), which are associated with telomere stability, was induced in mice exposed to cold (Galigniana et al., 2020).

One could ask if there is an optimal ambient temperature at which the LTL in cattle would be the longest. The few studies on the effect of ambient temperature on the LTL of endothermic mammals do not allow us to answer this question unambiguously. Extremely low or high ambient temperatures lead to hypo- and hyperthermia when the body temperature deviates substantially below and above the narrow limits of the regulated range, i. e., cause stress. The influence of a large

number of stressors, including extreme environmental factors, is known to be associated with shorter telomeres or an increased rate of telomere shortening (Chatelain et al., 2020; Lin, Epel, 2022).

Indirect information on the effect of moderate cold on LTL, when body temperature remains within the normal range, could be obtained from studies of the effect of body temperature on the ageing process. On the one hand, in endotherms, a small decrease in body temperature is associated with an increase in life expectancy (Conti et al., 2006; Carrillo, Flouris, 2011). On the other hand, in some cases, there is an inverse relationship (Zhao et al., 2022). For example, human females tend to have a longer life expectancy than males, but their body temperature is higher (Waalén, Buxbaum, 2011). The mechanisms that control the relationship between body temperature and life expectancy involve not only a decrease in metabolic rate when the temperature declines, but also neuroendocrine processes that indirectly affect a variety of physiological responses when temperature changes. Therefore, the optimal limits of ambient temperature at which the LTL in cattle will be longest could exist, but this question requires further study.

## Conclusion

In conclusion, we found that breed, but not breed group (dairy vs. beef), significantly influenced leukocyte telomere length in cattle. Residence in colder climates was associated with longer leukocyte telomere length in the Kalmyk cattle breed. Our results add to the evidence regarding the influence of breed origin and cold climate on this trait in farm animals.

## References

- Andrew T., Aviv A., Falchi M., Surdulescu G.L., Gardner J.P., Lu X., Kimura M., Kato B.S., Valdes A.M., Spector T.D. Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *Am. J. Hum. Genet.* 2006;78(3): 480-486. DOI 10.1086/500052
- Armanios M. The role of telomeres in human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2022;23:363-381. DOI 10.1146/annurev-genom-010422-091101
- Asghar M., Palinauskas V., Zaghdoudi-Allan N., Valkiūnas G., Mukhin A., Platonova E., Färnert A., Bensch S., Hasselquist D. Parallel telomere shortening in multiple body tissues owing to malaria infection. *Proc. Biol. Sci.* 2016;283(1836):20161184. DOI 10.1098/rspb.2016.1184
- Astuti Y., Wardhana A., Watkins J., Wulaningsih W.; PILAR Research Network. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis. *Environ. Res.* 2017;158:480-489. DOI 10.1016/j.envres.2017.06.038
- Behr A.A., Liu K.Z., Liu-Fang G., Nakka P., Ramachandran S. pong: fast analysis and visualization of latent clusters in population genetic data. *Bioinformatics.* 2016;32(18):2817-2823. DOI 10.1093/bioinformatics/btw327
- Ben-Shachar M.S., Lüdtke D., Makowski D. effectsize: Estimation of effect size indices and standardized parameters. *J. Open Source Softw.* 2020;5(56):2815. DOI 10.21105/joss.02815
- Blackburn E.H., Epel E.S., Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science.* 2015;350(6265):1193-1198. DOI 10.1126/science.aab3389
- Broer L., Codd V., Nyholt D.R., Deelen J., Mangino M., Willemsen G., Albrecht E., ... Vink J.M., Spector T.D., Slagboom P.E., Martin N.G., Samani N.J., van Duijn C.M., Boomsma D.I. Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013;21(10):1163-1168. DOI 10.1038/ejhg.2012.303
- Brown D.E., Dechow C.D., Liu W.S., Harvatine K.J., Ott T.L. Hot topic: association of telomere length with age, herd, and culling in lactating Holsteins. *J. Dairy Sci.* 2012;95(11):6384-6387. DOI 10.3168/jds.2012-5593
- Burraco P., Hernandez-Gonzalez M., Metcalfe N.B., Monaghan P. Ageing across the great divide: tissue transformation, organismal growth and temperature shape telomere dynamics through the morphological transition. *Proc. Biol. Sci.* 2023;290(1992):20222448. DOI 10.1098/rspb.2022.2448
- Carrillo A.E., Flouris A.D. Caloric restriction and longevity: effects of reduced body temperature. *Ageing Res. Rev.* 2011;10(1):153-162. DOI 10.1016/j.arr.2010.10.001
- Chakravarti D., LaBella K.A., DePinho R.A. Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell.* 2021;184(2):306-322. DOI 10.1016/j.cell.2020.12.028
- Chatelain M., Drobnik S.M., Szulkin M. The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: a meta-analysis. *Ecol. Lett.* 2020;23(2):381-398. DOI 10.1111/ele.13426
- Chik H.Y.J., Sparks A.M., Schroeder J., Dugdale H.L. A meta-analysis on the heritability of vertebrate telomere length. *J. Evol. Biol.* 2022;35(10):1283-1295. DOI 10.1111/jeb.14071
- Conti B., Sanchez-Alavez M., Winsky-Sommerer R., Morale M.C., Lucero J., Brownell S., Fabre V., Huitron-Resendiz S., Henriksen S., Zorrilla E.P., de Lecea L., Bartfai T. Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span. *Science.* 2006; 314(5800):825-828. DOI 10.1126/science.1132191
- Cook D.E., Zdraljevic S., Tanny R.E., Seo B., Riccardi D.D., Noble L.M., Rockman M.V., Alkema M.J., Braendle C., Kammenga J.E., Wang J., Kruglyak L., Félix M.A., Lee J., Andersen E.C. The genetic basis of natural variation in *Caenorhabditis elegans* telomere length. *Genetics.* 2016;204(1):371-383. DOI 10.1534/genetics.116.191148
- Crocco P., De Rango F., Dato S., Rose G., Passarino G. Telomere length as a function of age at population level parallels human survival curves. *Ageing (Albany NY).* 2021;13(1):204-218. DOI 10.18632/aging.202498
- de Lange T. Shelterin-mediated telomere protection. *Annu. Rev. Genet.* 2018;52:223-247. DOI 10.1146/annurev-genet-032918-021921
- Ding Z., Mangino M., Aviv A., Spector T., Durbin R. Estimating telomere length from whole genome sequence data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(9):e75. DOI 10.1093/nar/gku181
- Dmitriev N.G., Ernst L.K. (Eds.). *Animal Genetics Resources of the USSR. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1989*
- Dugdale H.L., Richardson D.S. Heritability of telomere variation: it is all about the environment! *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2018;373(1741):20160450. DOI 10.1098/rstb.2016.0450
- Dunin I.M., Dankvert A.G. (Eds.). *Breeds and Types of Farm Animals in the Russian Federation. Moscow: All-Russia Research Institute of Animal Breeding, 2013 (in Russian)*
- Fick L.J., Fick G.H., Li Z., Cao E., Bao B., Heffelfinger D., Parker H.G., Ostrander E.A., Riabowol K. Telomere length correlates with life span of dog breeds. *Cell Rep.* 2012;2(6):1530-1536. DOI 10.1016/j.celrep.2012.11.021
- Foley N.M., Petit E.J., Brazier T., Finarelli J.A., Hughes G.M., Touzalin F., Puechmaile S.J., Teeling E.C. Drivers of longitudinal telomere dynamics in a long-lived bat species, *Myotis myotis*. *Mol. Ecol.* 2020;29(16):2963-2977. DOI 10.1111/mec.15395
- Friesen C.R., Wapstra E., Olsson M. Of telomeres and temperature: Measuring thermal effects on telomeres in ectothermic animals. *Mol. Ecol.* 2022;31(23):6069-6086. DOI 10.1111/mec.16154
- Fulbert C., Gaude C., Sulpice E., Chabardès S., Ratel D. Moderate hypothermia inhibits both proliferation and migration of human glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* 2019;144(3):489-499. DOI 10.1007/s11060-019-03263-3

- Galigniana N.M., Charó N.L., Uranga R., Cabanillas A.M., Piwien-Pilipuk G. Oxidative stress induces transcription of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) by engaging PKA signaling and cytoskeleton dynamics. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 2020; 1867(4):118643. DOI 10.1016/j.bbamer.2020.118643
- Grandl F., Furger M., Kreuzer M., Zehetmeier M. Impact of longevity on greenhouse gas emissions and profitability of individual dairy cows analysed with different system boundaries. *Animal*. 2019; 13(1):198-208. DOI 10.1017/S175173111800112X
- Herborn K.A., Heidinger B.J., Boner W., Noguera J.C., Adam A., Daunt F., Monaghan P. Stress exposure in early post-natal life reduces telomere length: an experimental demonstration in a long-lived seabird. *Proc. Biol. Sci.* 2014;281(1782):20133151. DOI 10.1098/rspb.2013.3151
- Hothorn T., Bretz F., Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.* 2008;50(3):346-363. DOI 10.1002/bimj.20081042
- Hu H., Mu T., Ma Y., Wang X., Ma Y. Analysis of longevity traits in Holstein cattle: A review. *Front. Genet.* 2021;12:695543. DOI 10.3389/fgene.2021.695543
- Iannuzzi A., Albarella S., Parma P., Galdiero G., D'Anza E., Pistucci R., Peretti V., Ciotola F. Characterization of telomere length in Agerolese cattle breed, correlating blood and milk samples. *Anim. Genet.* 2022;53(5):676-679. DOI 10.1111/age.13227
- Igoshin A.V., Yudin N.S., Romashov G.A., Larkin D.M. A multibreed genome-wide association study for cattle leukocyte telomere length. *Genes (Basel)*. 2023;14(8):1596. DOI 10.3390/genes14081596
- Ilska-Warner J.J., Psifidi A., Seeker L.A., Wilbourn R.V., Underwood S.L., Fairlie J., Whitelaw B., Nussey D.H., Coffey M.P., Banos G. The genetic architecture of bovine telomere length in early life and association with animal fitness. *Front. Genet.* 2019;10:1048. DOI 10.3389/fgene.2019.01048
- Jenner L.P., Peska V., Fulnečková J., Sýkorová E. Telomeres and their neighbors. *Genes (Basel)*. 2022;13(9):1663. DOI 10.3390/genes13091663
- Kanagawa T., Fukuda H., Tsubouchi H., Komoto Y., Hayashi S., Fukui O., Shimoya K., Murata Y. A decrease of cell proliferation by hypothermia in the hippocampus of the neonatal rat. *Brain Res.* 2006;1111(1):36-40. DOI 10.1016/j.brainres.2006.06.112
- Kayumov F.G., Chernomyrdin V.N., Mayevskaya L.A., Surundaeva L.G., Polskikh S.S. The use of Kalmyk cattle on animal breeding farms in Russia. *Izv. Orenbg. State Agrar. Univ.* 2014;5(49):116-119 (in Russian)
- Kordowitzki P., Merle R., Hass P.-K., Plendl J., Rieger J., Kaessmeyer S. Influence of age and breed on bovine ovarian capillary blood supply, ovarian mitochondria and telomere length. *Cells*. 2021;10(10):2661. DOI 10.3390/cells10102661
- Lantz B. The impact of sample non-normality on ANOVA and alternative methods. *Br. J. Math. Stat. Psychol.* 2013;66(2):224-244. DOI 10.1111/j.2044-8317.2012.02047.x
- Laubenthal L., Hoelker M., Frahm J., Dänicke S., Gerlach K., Südekum K.-H., Sauerwein H., Häussler S. Short communication: Telomere lengths in different tissues of dairy cows during early and late lactation. *J. Dairy Sci.* 2016;99(6):4881-4885. DOI 10.3168/jds.2015-10095
- Law E., Girgis A., Lambert S., Sylvie L., Levesque J., Pickett H. Telomeres and stress: promising avenues for research in psycho-oncology. *Asia-Pacific J. Oncol. Nurs.* 2016;3(2):137-147. DOI 10.4103/2347-5625.182931
- Leung C.W., Lارايا B.A., Needham B.L., Rehkopf D.H., Adler N.E., Lin J., Blackburn E.H., Epel E.S. Soda and cell aging: associations between sugar-sweetened beverage consumption and leukocyte telomere length in healthy adults from the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Am. J. Public Health*. 2014;104(12):2425-2431. DOI 10.2105/AJPH.2014.302151
- Lhasaranov B. Pasture animal husbandry in Eastern Siberia. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 2020;31(3):24160-24163. DOI 10.26717/BJSTR.2020.31.005094
- Lin J., Epel E. Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* 2022;73:101507. DOI 10.1016/j.arr.2021.101507
- Liu J., Wang L., Wang Z., Liu J.-P. Roles of telomere biology in cell senescence, replicative and chronological ageing. *Cells*. 2019;8(1):54. DOI 10.3390/cells8010054
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243-278. DOI 10.1016/j.cell.2022.11.001
- Lynch S.M., Peek M.K., Mitra N., Ravichandran K., Branas C., Spangler E., Zhou W., Paskett E.D., Gehlert S., DeGraffinreid C., Rebbeck T.R., Riethman H. Race, ethnicity, psychosocial factors, and telomere length in a multicenter setting. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146723. DOI 10.1371/journal.pone.0146723
- Manning E.L., Crossland J., Dewey M.J., Van Zant G. Influences of inbreeding and genetics on telomere length in mice. *Mamm. Genome*. 2002;13(5):234-238. DOI 10.1007/s003350020027
- Martens D.S., Plusquin M., Cox B., Nawrot T.S. Early biological aging and fetal exposure to high and low ambient temperature: A birth cohort study. *Environ. Health Perspect.* 2019;127(11):117001. DOI 10.1289/EHP5153
- McLennan D., Armstrong J.D., Stewart D.C., Mckelvey S., Boner W., Monaghan P., Metcalfe N.B. Telomere elongation during early development is independent of environmental temperatures in Atlantic salmon. *J. Exp. Biol.* 2018;221(Pt. 11):jeb178616. DOI 10.1242/jeb.178616
- Meesters M., Van Eetvelde M., Martens D.S., Nawrot T.S., Dewulf M., Govaere J., Opsomer G. Prenatal environment impacts telomere length in newborn dairy heifers. *Sci. Rep.* 2023;13(1):4672. DOI 10.1038/s41598-023-31943-8
- Miyashita N., Shiga K., Yonai M., Kaneyama K., Kobayashi S., Kojima T., Goto Y., Kishi M., Aso H., Suzuki T., Sakaguchi M., Nagai T. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types. *Biol. Reprod.* 2002;66(6):1649-1655. DOI 10.1095/biolreprod66.6.1649
- Mizutani Y., Niizuma Y., Yoda K. How do growth and sibling competition affect telomere dynamics in the first month of life of long-lived seabird? *PLoS One*. 2016;11(11):e0167261. DOI 10.1371/journal.pone.0167261
- Monaghan P., Ozanne S.E. Somatic growth and telomere dynamics in vertebrates: relationships, mechanisms and consequences. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. Biol. Sci.* 2018;373(1741):20160446. DOI 10.1098/rstb.2016.0446
- Nowack J., Tarmann I., Hoelzl F., Smith S., Giroud S., Ruf T. Always a price to pay: hibernation at low temperatures comes with a trade-off between energy savings and telomere damage. *Biol. Lett.* 2019;15(10):20190466. DOI 10.1098/rsbl.2019.0466
- O'Daniel S.E., Kochan K.J., Long C.R., Riley D.G., Randel R.D., Welsh T.H.J. Comparison of telomere length in age-matched primiparous and multiparous Brahman cows. *Animals (Basel)*. 2023; 13(14):2325. DOI 10.3390/ani13142325
- Pinese M., Lacaze P., Rath E.M., Stone A., Brion M.-J., Ameur A., Nagpal S., ... Kaplan W., Gibson G., Gyllensten U., Cairns M.J., McNamara M., Dinger M.E., Thomas D.M. The Medical Genome Reference Bank contains whole genome and phenotype data of 2570 healthy elderly. *Nat. Commun.* 2020;11(1):435. DOI 10.1038/s41467-019-14079-0
- 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
- Rafie N., Golpour Hamedani S., Barak F., Safavi S.M., Miraghajani M. Dietary patterns, food groups and telomere length: a systematic review of current studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2017;71(2):151-158. DOI 10.1038/ejcn.2016.149
- Raj A., Stephens M., Pritchard J.K. fastSTRUCTURE: variational inference of population structure in large SNP data sets. *Genetics*. 2014;197(2):573-589. DOI 10.1534/genetics.114.164350



- Reichert S., Stier A., Zahn S., Arrivé M., Bize P., Massemin S., Criscuolo F. Increased brood size leads to persistent eroded telomeres. *Front. Ecol. Evol.* 2014;2:9. DOI 10.3389/fevo.2014.00009
- Ribas-Maynou J., Llavanera M., Mateo-Otero Y., Ruiz N., Muiño R., Bonet S., Yeste M. Telomere length in bovine sperm is related to the production of reactive oxygen species, but not to reproductive performance. *Theriogenology.* 2022;189:290-300. DOI 10.1016/j.theriogenology.2022.06.025
- Rossiello F., Jurk D., Passos J.F., d'Adda di Fagnagna F. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat. Cell Biol.* 2022; 24(2):135-147. DOI 10.1038/s41556-022-00842-x
- Schrumpfová P.P., Fajkus J. Composition and function of telomerase-A polymerase associated with the origin of eukaryotes. *Biomolecules.* 2020;10(10):1425. DOI 10.3390/biom10101425
- Seeker L.A., Ilkska J.J., Psifidi A., Wilbourn R.V., Underwood S.L., Fairlie J., Holland R., Froy H., Salvo-Chirside E., Bagnall A., Whitelaw B., Coffey M.P., Nussey D.H., Banos G. Bovine telomere dynamics and the association between telomere length and productive lifespan. *Sci. Rep.* 2018a;8(1):12748. DOI 10.1038/s41598-018-31185-z
- Seeker L.A., Ilkska J.J., Psifidi A., Wilbourn R.V., Underwood S.L., Fairlie J., Holland R., Froy H., Bagnall A., Whitelaw B., Coffey M., Nussey D.H., Banos G. Longitudinal changes in telomere length and associated genetic parameters in dairy cattle analysed using random regression models. *PLoS One.* 2018b;13(2):e0192864. DOI 10.1371/journal.pone.0192864
- Seeker L.A., Underwood S.L., Wilbourn R.V., Dorrens J., Froy H., Holland R., Ilkska J.J., Psifidi A., Bagnall A., Whitelaw B., Coffey M., Banos G., Nussey D.H. Telomere attrition rates are associated with weather conditions and predict productive lifespan in dairy cattle. *Sci. Rep.* 2021;11(1):5589. DOI 10.1038/s41598-021-84984-2
- Sleptsov I.I., Machakhtyrova V.A., Ivanova N.P. Clinical and physiological indicators of the Kalmyk cattle breed in Yakutia conditions. *Bull. Kurgan State Agric. Acad.* 2019;4(32):44-46 (in Russian)
- Szczotka M., Kocki J., Iwan E., Pluta A. Determination of telomere length and telomerase activity in cattle infected with bovine leukaemia virus (BLV). *Pol. J. Vet. Sci.* 2019;22(2):391-403. DOI 10.24425/pjvs.2019.129299
- Taub M.A., Conomos M.P., Keener R., Iyer K.R., Weinstock J.S., Yanek L.R., Lane J., ... de Andrade M., Correa A., Chen Y.I., Boerwinkle E., Barnes K.C., Ashley-Koch A.E., Arnett D.K.; NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Consortium; TOPMed Hematology and Hemostasis Working Group; TOPMed Structural Variation Working Group; Laurie C.C., Abecasis G., Nickerson D.A., Wilson J.G., Rich S.S., Levy D., Ruczinski I., Aviv A., Blackwell T.W., Thornton T., O'Connell J., Cox N.J., Perry J.A., Armanios M., Battle A., Pankratz N., Reiner A.P., Mathias R.A. Genetic determinants of telomere length from 109,122 ancestrally diverse whole-genome sequences in TOPMed. *Cell Genom.* 2022;2(1):100084. DOI 10.1016/j.xgen.2021.100084
- Tilesi F., Di Domenico E.G., Pariset L., Bosco L., Willems D., Valentini A., Ascenzioni F. Telomere length diversity in cattle breeds. *Diversity.* 2010;2(9):1118-1129. DOI 10.3390/d2091118
- Waalén J., Buxbaum J.N. Is older colder or colder older? The association of age with body temperature in 18,630 individuals. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2011;66(5):487-492. DOI 10.1093/geronol/glr001
- Whittemore K., Vera E., Martínez-Nevaldo E., Sanpera C., Blasco M.A. Telomere shortening rate predicts species life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(30):15122-15127. DOI 10.1073/pnas.1902452116
- Wilbourn R.V., Moatt J.P., Froy H., Walling C.A., Nussey D.H., Boonekamp J.J. The relationship between telomere length and mortality risk in non-model vertebrate systems: a meta-analysis. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. Biol. Sci.* 2018;373(1741):20160447. DOI 10.1098/rstb.2016.0447
- Zepner L., Karrasch P., Wiemann F., Bernard L. ClimateCharts.net – an interactive climate analysis web platform. *Int. J. Digit. Earth.* 2021; 14(3):338-356. DOI 10.1080/17538947.2020.1829112
- Zhang D., Newton C.A., Wang B., Povysil G., Noth I., Martinez F.J., Raghu G., Goldstein D., Garcia C.K. Utility of whole genome sequencing in assessing risk and clinically relevant outcomes for pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2022;60(6):2200577. DOI 10.1183/13993003.00577-2022
- Zhang H., Liu A., Wang Y., Luo H., Yan X., Guo X., Li X., Liu L., Su G. Genetic parameters and genome-wide association studies of eight longevity traits representing either full or partial lifespan in Chinese Holsteins. *Front. Genet.* 2021;12:634986. DOI 10.3389/fgene.2021.634986
- Zhang X., Lin S., Funk W.E., Hou L. Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. *Occup. Environ. Med.* 2013;70(10):743-749. DOI 10.1136/oemed-2012-101350
- Zhang Y., Wu Y., Mao P., Li F., Han X., Zhang Y., Jiang S., Chen Y., Huang J., Liu D., Zhao Y., Ma W., Songyang Z. Cold-inducible RNA-binding protein CIRP/hnRNP A18 regulates telomerase activity in a temperature-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(2): 761-775. DOI 10.1093/nar/gkv1465
- Zhao Z., Cao J., Niu C., Bao M., Xu J., Huo D., Liao S., Liu W., Speakman J.R. Body temperature is a more important modulator of lifespan than metabolic rate in two small mammals. *Nat. Metab.* 2022; 4(3):320-326. DOI 10.1038/s42255-022-00545-5








**Funding.** The work was supported by the Russian Scientific Foundation grant No. 22-26-00143 (<https://rscf.ru/project/22-26-00143/>).

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

Received December 3, 2023. Revised December 25, 2023. Accepted December 25, 2023.


DOI 10.18699/vjgb-24-24

## Аберрантное метилирование генов развития плаценты в ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией 16

О.Ю. Васильева , Е.Н. Толмачева , А.Э. Дмитриев , Я.А. Даркова , Е.А. Саженова ,  
Т.В. Никитина , И.Н. Лебедев , С.А. Васильев 

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

 oksana.vasilyeva@medgenetics.ru

**Аннотация.** У человека анеуплоидия не совместима с рождением здоровых детей и в основном приводит к гибели эмбрионов на ранних стадиях развития в первом триместре беременности. Наиболее частая анеуплоидия среди спонтанных абортусов первого триместра беременности – трисомия 16. Однако механизмы, приводящие к гибели эмбрионов с трисомией 16, остаются недостаточно исследованными. Одним из таких потенциальных механизмов является нарушение развития плаценты, в том числе ремоделирования спиральных артерий. Ремоделирование спиральных артерий заключается в миграции клеток трофобласта в спиральные артерии матери и замещении их эндотелия для обеспечения стабильного питания эмбриона и снабжения кислородом. Это комплексный процесс, зависящий от множества факторов как со стороны эмбриона, так и со стороны матери. Нами проведен анализ уровня метилирования семи генов (*ADORA2B*, *NPR3*, *PRDM1*, *PSG2*, *PHTLH*, *SV2C* и *TICAM2*), участвующих в развитии плаценты, в ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией 16 ( $n = 14$ ), по сравнению со спонтанными абортусами с нормальным кариотипом ( $n = 31$ ) и контрольной группой медицинских абортусов ( $n = 10$ ). Для получения библиотек для секвенирования использована таргетная амплификация отдельных регионов генов с помощью разработанных олигонуклеотидных праймеров на бисульфит-конвертированной ДНК. Анализ проводили с применением таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. В группе спонтанных абортусов с трисомией 16 был значимо повышен уровень метилирования генов *PRDM1* и *PSG2* по сравнению с медицинскими абортусами ( $p = 0.0004$  и  $p = 0.0015$  соответственно). В группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом не обнаружено повышения уровня метилирования генов *PRDM1* и *PSG2*, но был значимо повышен уровень метилирования гена *ADORA2B* по сравнению с медицинскими абортусами ( $p = 0.032$ ). Полученные результаты указывают на потенциальные механизмы патогенетического действия трисомии 16 на развитие плаценты с участием изученных генов.

Ключевые слова: анеуплоидия; трисомия 16; метилирование ДНК; ворсины хориона; невынашивание беременности; бисульфитное секвенирование; спонтанные абортусы.


**Для цитирования:** Васильева О.Ю., Толмачева Е.Н., Дмитриев А.Э., Даркова Я.А., Саженова Е.А., Никитина Т.В., Лебедев И.Н., Васильев С.А. Аберрантное метилирование генов развития плаценты в ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией 16. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):198-203. DOI 10.18699/vjgb-24-24

## Aberrant methylation of placental development genes in chorionic villi of spontaneous abortions with trisomy 16

O.Yu. Vasilyeva , E.N. Tolmacheva , A.E. Dmitriev , Ya.A. Darkova , E.A. Sazhenova ,  
T.V. Nikitina , I.N. Lebedev , S.A. Vasilyev 

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

 oksana.vasilyeva@medgenetics.ru

**Abstract.** In humans, aneuploidy is incompatible with the birth of healthy children and mainly leads to the death of embryos in the early stages of development in the first trimester of pregnancy. Trisomy 16 is the most common aneuploidy among spontaneous abortions of the first trimester of pregnancy. However, the mechanisms leading to the death of embryos with trisomy 16 remain insufficiently investigated. One of these potential mechanisms is abnormal placental development, including aberrant remodeling of spiral arteries. Spiral artery remodeling involves the migration of trophoblast cells into the maternal spiral arteries, replacing their endothelium and remodeling to ensure a stable embryonic nutrition and oxygen supply. This is a complex process which depends on many factors from both the embryo and the mother. We analyzed the methylation level of seven genes (*ADORA2B*, *NPR3*,

*PRDM1*, *PSG2*, *PHTLH*, *SV2C*, and *TICAM2*) involved in placental development in the chorionic villi of spontaneous abortions with trisomy 16 ( $n = 14$ ), compared with spontaneous abortions with a normal karyotype ( $n = 31$ ) and the control group of induced abortions ( $n = 10$ ). To obtain sequencing libraries, targeted amplification of individual gene regions using designed oligonucleotide primers for bisulfite-converted DNA was used. The analysis was carried out using targeted bisulfite massive parallel sequencing. In the group of spontaneous abortions with trisomy 16, the level of methylation of the *PRDM1* and *PSG2* genes was significantly increased compared to induced abortions ( $p = 0.0004$  and  $p = 0.0015$ , respectively). In the group of spontaneous abortions, there was no increase in the level of methylation of the *PRDM1* and *PSG2* genes, but the level of methylation of the *ADORA2B* gene was significantly increased compared to the induced abortions ( $p = 0.032$ ). The results obtained indicate the potential mechanisms of the pathogenetic effect of trisomy 16 on the placental development with the participation of the studied genes.

Key words: aneuploidy; trisomy 16; DNA methylation; chorionic villi; miscarriage; bisulfite sequencing; spontaneous abortions.

**For citation:** Vasilyeva O.Yu., Tolmacheva E.N., Dmitriev A.E., Darkova Ya.A., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Lebedev I.N., Vasilyev S.A. Aberrant methylation of placental development genes in chorionic villi of spontaneous abortions with trisomy 16. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):198-203. DOI 10.18699/vjgb-24-24

## Введение

Спонтанный аборт (невынашивание беременности) – это неиндуцированная гибель эмбриона или плода до 20 недель гестации. В преобладающем большинстве случаев беременность прерывается, когда эмбрион имеет не совместимые с жизнью генетические отклонения. Чуть более 50 % всех клинически диагностированных выкидышей вызваны анеуплоидией, которая в основном возникает во время сперматогенеза или оогенеза, или на ранних стадиях эмбрионального развития, а наиболее частой анеуплоидией среди спонтанных абортусов первого триместра является трисомия 16 (Nikitina et al., 2016). Большая часть анеуплоидных эмбрионов гибнет на стадии имплантации, а следующий пик эмбриональной летальности отмечается около 8–9-й недели беременности. Однако механизмы, приводящие к гибели эмбрионов с анеуплоидией, остаются слабо исследованными.

В первом триместре беременности происходит важнейший процесс – ремоделирование спиральных артерий, заключающееся в миграции клеток трофобласта в спиральные артерии матери и замещении их эндотелия для обеспечения стабильного питания эмбриона и снабжения кислородом (Red-Horse et al., 2004; Jauniaux et al., 2006). Это комплексный процесс, зависящий от множества факторов как со стороны эмбриона, так и со стороны матери. Наши предварительные результаты показывают, что у спонтанных абортусов первого триместра с анеуплоидным кариотипом наблюдаются масштабные нарушения метилирования повторяющихся последовательностей (Vasilyev et al., 2021) и генов, играющих важную роль в развитии плаценты (Tolmacheva et al., 2022).

В настоящем исследовании проведено более подробное исследование части генов, нарушения метилирования которых были ранее обнаружены у спонтанных абортусов с трисомией 16 (*PRDM1*, *PHTLH*) (Tolmacheva et al., 2022) и нормальным кариотипом (*ADORA2B*, *NPR3*, *PSG2*, *SV2C* и *TICAM2*) (Неопубл. данные).

Ген *ADORA2B* связан с ремоделированием спиральных артерий, а его гиперметилирование – с нарушением развития плаценты, задержкой роста плода и развитием преэклампсии (Jia et al., 2012; Yeung et al., 2016). Ген

*NPR3* является рецептором натрийуретического пептида А, играющего важную роль в ремоделировании спиральных артерий стенки матки (Zhang et al., 2021). Дефицит натрийуретического пептида А ухудшает инвазию трофобласта и ремоделирование спиральных артерий, что приводит к фенотипу, подобному преэклампсии. Ген *PRDM1* – ключевой регулятор терминальной дифференцировки гигантских клеток трофобласта, замещающих собой эндотелий спиральных артерий матери (Maioli et al., 2004). Ген *PSG2* кодирует специфичный для беременности бета-1-гликопротеин 2, экспрессия которого повышена в трофобласте, а ее повышенный уровень в циркулирующих клетках трофобласта отмечается при истинном вращении плаценты (placenta accreta) (Grunblatt et al., 2004). Ген *PHTLH* кодирует остеоостатин (parathyroid hormone-related protein), который является предшественником сигнального пептида, играющего роль в дифференцировке гигантских клеток трофобласта мыши (Sandor et al., 2017). Для генов *SV2C* и *TICAM2* известны нарушения экспрессии при других патологиях беременности, потенциально связанных с аномальной плацентацией (McMaster et al., 2004). Экспрессия гена *SV2C* повышается в экзосомах в крови матери при гестационном диабете по сравнению с группой с нормальным протеканием беременности (Fang et al., 2021). Гипометилирование и высокая экспрессия гена *TICAM2* также связаны с преэклампсией и преждевременными родами (Mason et al., 2011; Lim et al., 2020).

Целью настоящего исследования стал анализ аберрантного метилирования генов развития плаценты *ADORA2B*, *NPR3*, *PRDM1*, *PSG2*, *PHTLH*, *SV2C* и *TICAM2* среди спонтанных абортусов первого триместра беременности с трисомией 16.

## Материалы и методы

Анализ проведен на ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией 16 ( $n = 14$ , гестационный возраст  $8.7 \pm 1.6$  нед.), спонтанных абортусов с нормальным кариотипом ( $n = 31$ , гестационный возраст  $10.0 \pm 2.2$  нед.) и медицинских абортусов ( $n = 10$ , гестационный возраст  $8.3 \pm 1.2$  нед.). Использованы образцы из биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ меди-

Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованных для получения библиотек для таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования

Наименование гена/ участка гена		Последовательность	Продукт, п. н.	Координаты (hg38), регион гена
ADORA2B_m1	F	5'-GATAGATATTTGGTTATTTGTGTTT-3'	519	chr17:15945552-15946070, экзон 1-интрон 1
	R	5'-TACCTTACCCTTAATAAAAACCTCC-3'		
ADORA2B_m2	F	5'-GTTATGTTGTTGGAGATAGGA-3'	331	chr17:15945246-15945576, экзон 1
	R	5'-AAACACAAATAACCAATATCTATC-3'		
NPR3	F	5'-TAGGGAGGAGTTTGTATGAAGAAT-3'	465	chr5:32711142-32711606, экзон 1
	R	5'-TCCTTCTCTACAATCACTAATTT-3'		
PRDM1	F	5'-AGTTTGTGTATTGAAATTGTATAAG-3'	372	chr6:106107017-106107388, экзон 7
	R	5'-ACTCATAAAAACCTACCCCTAAAAA-3'		
PSG2	F	5'-GTTGTTGTGTGTAGAGGAGGAATAG-3'	344	chr19:43083681-43084024, промотор
	R	5'-ATCCCAAACCAAACCTAAAACCTAAC-3'		
PTHLH	F	5'-GGGTTTGTATAGTAATTATTATTTT-3'	476	chr12:27969063-27969538, экзон 4-интрон 4
	R	5'-ATCCCATTCCTTCTATTACAATC-3'		
SV2C	F	5'-AGAGTAAGAGAGGGTTGGAGAGTAG-3'	393	chr5:76084117-76084509, интрон 1
	R	5'-ATACTAATAACCCCAAACCAATTC-3'		
TICAM2	F	5'-ATTGTTTATGTTTTGAGGTGTTT-3'	671	chr5:115601810-115602480, экзон 1-интрон 1
	R	5'-CACATTAACCCCTAACTCACAATAA-3'		

цинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра. Образцы тканей хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для всех образцов получено информированное согласие родителей на использование биоматериала для биобанкирования и проведения исследований. Исследование одобрено комитетом по биоэтике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (09.11.2020/№ 7).

Определение кариотипа проводили с помощью стандартного цитогенетического анализа на прямых препаратах ворсин хориона и в культурах фибробластов экстраэмбриональной мезодермы (Lebedev et al., 2004). Наличие трисомии 16 верифицировано методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием субтеломерных ДНК-зондов (16q и 16p) по описанной методике (Васильев и др., 2010).

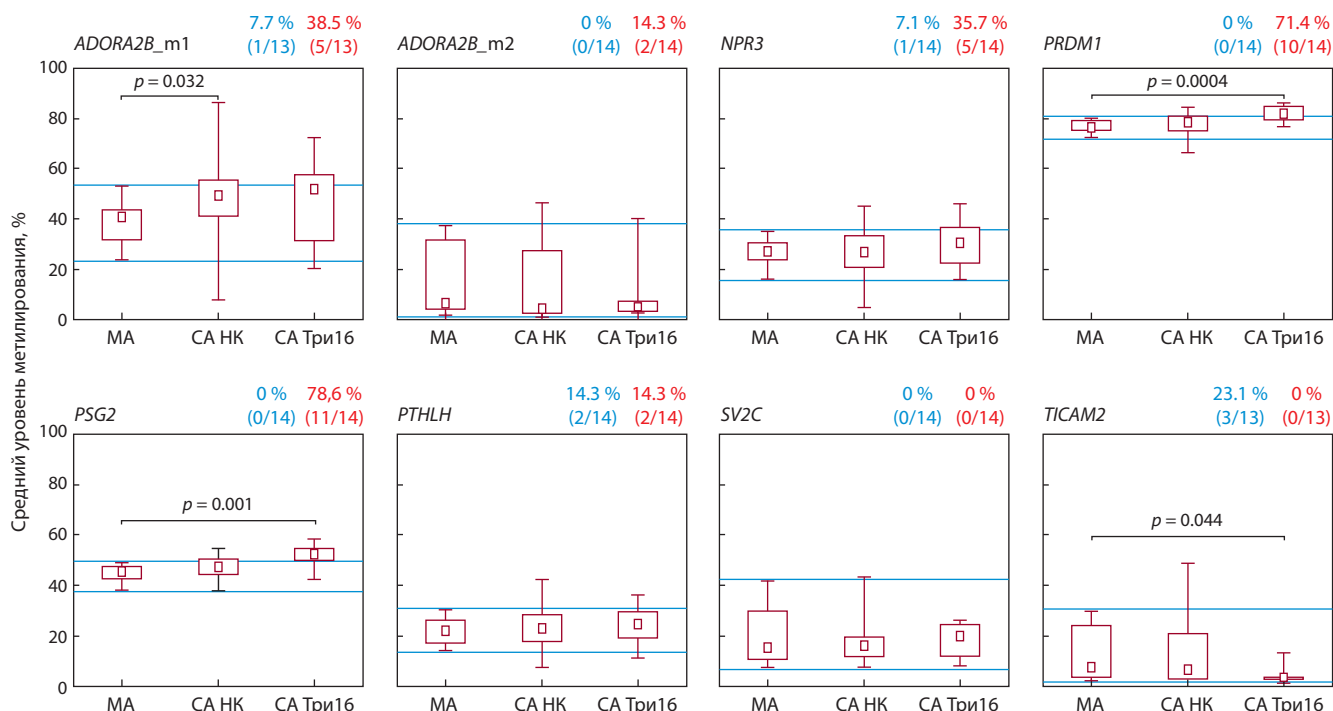
Разделение тканей выполняли морфологически, затем клетки ворсин хориона инкубировали в течение ночи при  $37^{\circ}\text{C}$  с протеиназой К. Для выделения ДНК применяли стандартный фенол-хлороформный метод. Бисульфитную модификацию ДНК проводили с использованием набора EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. В ходе бисульфитной конверсии неметилированный цитозин модифицируется в урацил, который при дальнейшей ПЦР заменяется на тимин, а метилированный цитозин не подвергается модификации.

Анализ профиля метилирования осуществляли с помощью таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования. Для получения библиотек были использованы разработанные олигонуклеотидные праймеры,

позволяющие амплифицировать с бисульфит-конвертированной ДНК целевые участки генов *ADORA2B*, *NPR3*, *PRDM1*, *PSG2*, *PTHLH*, *SV2C* и *TICAM2* (см. таблицу). Выбор генов и целевых участков в них был обусловлен содержанием в них дифференциально метилированных CpG-сайтов в ворсинах хориона спонтанных абортусов, по нашим предварительным результатам, полученных с помощью широкомасштабного анализа метилирования (Tolmacheva et al., 2022), и их участием в развитии плаценты.

Амплификацию целевых фрагментов проводили с использованием набора БиоМастер HS-Таг ПЦР (2x) («Биолабмикс», Россия) по протоколу производителя со следующими условиями ПЦР:  $95^{\circ}\text{C}$  5 мин; 36 циклов:  $95^{\circ}\text{C}$  30 с,  $60^{\circ}\text{C}$  45 с,  $72^{\circ}\text{C}$  45 с. Концентрацию целевых фрагментов определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Продукты реакции очищали от примесей с применением раствора сефадекса G50 (Sigma, США).

Таргетное бисульфитное массовое параллельное секвенирование осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MicroKit (2x150). Оценка качества прочтений проведена с помощью FastQC v0.11.8, после чего был выполнен тримминг оставшихся последовательностей адаптеров и низких по качеству прочтений с помощью Trim-Galore. Затем прочтения картировали на бисульфит-конвертированные таргетные последовательности с использованием инструмента bwa-meth v0.2.2 с параметрами по умолчанию. Данные по метилированию в контексте CpG были извлечены из полученных файлов BAM с помощью инструмента MethylDackel. Результаты



Средний уровень метилирования CpG-сайтов в целевых участках генов *ADORA2B*, *NPR3*, *PRDM1*, *PSG2*, *PTHLH*, *SV2C* и *TICAM2* в ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией 16 по сравнению со спонтанными абортусами с нормальным кариотипом и медицинскими абортусами.

MA – медицинские абортусы; CA HK – спонтанные абортусы с нормальным кариотипом; CA Три16 – спонтанные абортусы с трисомией 16. Прямоугольники обозначают 25-й и 75-й перцентили; усы отмечают минимальное и максимальное значения; квадрат в центре прямоугольника обозначает медиану; голубыми линиями отмечены минимальное и максимальное значения в группе MA. Над рисунками указаны доля и число спонтанных абортусов с трисомией 16 с уровнями метилирования целевых генов, выходящими за пределы вариации в группе медицинских абортусов (снижение – синий цвет, повышение – красный).

представляли в виде уровня метилирования, являющегося отношением числа цитозинов к суммарному числу цитозинов и тиминов в отдельном CpG-сайте. Кроме того, вычислен средний уровень метилирования вдоль всех целевых участков. Статистический анализ выполнен с помощью программного пакета Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для сравнения уровня метилирования между группами образцов использовали ранговый критерий Манна–Уитни. Отличия считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

## Результаты

Значимые отличия у спонтанных абортусов с трисомией 16 по сравнению с медицинскими абортусами наблюдались в следующих генах: *PRDM1* ( $81.9 \pm 2.8$  против  $76.5 \pm 2.6$  %,  $p = 0.0004$ ), *PSG2* ( $51.6 \pm 4.4$  против  $44.6 \pm 3.6$  %,  $p = 0.001$ ), *TICAM2* ( $4.5 \pm 3.6$  против  $12.5 \pm 11.0$  %,  $p = 0.044$ ) (см. рисунок). При этом уровень метилирования генов *PRDM1* и *PSG2* в группе спонтанных абортусов с трисомией 16 был выше, а гена *TICAM2* – ниже по сравнению с медицинскими абортусами. В группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом был значимо выше уровень метилирования гена *ADORA2B* (регион m1) по сравнению с группой медицинских абортусов ( $48.8 \pm 15.3$  против  $38.7 \pm 10.2$  %,  $p = 0.032$ ) (см. рисунок).

Часть спонтанных абортусов имела уровни метилирования, выходящие за пределы нормальной вариабельности в контрольной группе медицинских абортусов (см. рисунок). Максимальное число спонтанных абортусов с трисомией 16 с повышенным уровнем метилирования обнаружено для генов *PSG2* (11 из 14 образцов, что составляет 78.6 % от всего количества исследуемых образцов) и *PRDM1* (10 из 14 образцов – 71.4 %) (см. рисунок). Повышенный уровень метилирования также наблюдался у части спонтанных абортусов с трисомией 16 по следующим генам: *ADORA2B\_m1* (38.5 %), *ADORA2B\_m2* (14.3 %), *NPR3* (35.7 %) и *PTHLH* (13.3 %). Сниженный уровень метилирования у части спонтанных абортусов фиксировался только для генов *ADORA2B\_m1* (7.7 %), *NPR3* (7.1 %), *PTHLH* (14.3 %) и *TICAM2* (23.1 %). Для гена *SV2C* не выявлено ни одного спонтанного абортуса с нарушенным уровнем метилирования (см. рисунок).

## Обсуждение

Ранее наша группа и другие авторы показывали нарушения метилирования в ворсинах хориона спонтанных абортусов с трисомией 16: повышение уровня метилирования ретроинверсии LINE-1 (Vasilyev et al., 2021) и широкоштабные нарушения уровня метилирования по всему геному (Blair et al., 2014; Tolmacheva et al., 2022). Кроме того, обнаружено, что нарушения метилирования при трисомии 16 перекрываются с таковыми при преэклампсии с ранним началом (Blair et al., 2014). Учитывая, что одним

из механизмов развития преэклампсии считается нарушение плацентации и ремоделирования спиральных артерий (McMaster et al., 2004), возможным механизмом, приводящим к гибели эмбрионов с трисомией 16, является нарушение метилирования генов развития плаценты.

В настоящей работе показано, что в изучаемой группе спонтанных абортусов с трисомией 16 существенно повышен уровень метилирования генов *PRDM1* и *PSG2* по сравнению с медицинскими абортусами. При этом уровень метилирования данных генов не повышался значимо в группе спонтанных абортусов с нормальным кариотипом. Так как ген *PRDM1* является транскрипционным фактором, наблюдается его влияние на многие процессы в организме. Недавно обнаружено, что гипометилирование гена *PRDM1* и соответствующее повышение экспрессии гена в ворсинах хориона ассоциированы с привычным невынашиванием беременности (Du et al., 2020). Потенциально негативный эффект гипометилирования *PRDM1* может быть связан с аномальной миграцией и повышенным уровнем апоптоза клеток трофобласта (Du et al., 2020), а также с ролью *PRDM1* в регуляции ключевого для развития трофобласта транскрипционного фактора *GATA2* (Paul et al., 2017).

Возможно, повышенный уровень метилирования генов *PRDM1* и *PSG2* у группы спонтанных абортусов с трисомией 16 связан с влиянием дополнительной хромосомы на профиль метилирования ДНК (Толмачёва и др., 2013). Этот процесс, вероятно, запускается специфическими генами, расположенными на 16-й хромосоме, которые могут быть вовлечены в регуляцию метилирования ДНК (Tolmacheva et al., 2022). В контексте данной работы интересно, что *CTCF*, являющийся одним из ключевых регуляторов конформации хроматина и расположенный на 16-й хромосоме, может регулировать транскрипцию генов *PSG* человека (*PSG1–PSG9*, *PSG11*) в клетках трофобласта. Подавление экспрессии *CTCF* повышало или подавляло экспрессию нескольких генов *PSG*, и этот эффект сопровождался эпигенетическими изменениями (Jeong et al., 2021).

Интересным результатом, требующим дальнейшего изучения, является значимое повышение уровня метилирования гена *ADORA2B* у спонтанных абортусов с нормальным кариотипом. Вероятно, у отдельных эмбрионов с нормальным кариотипом нарушения метилирования некоторых генов, участвующих в развитии плаценты, могут быть вызваны другими причинами, не связанными с влиянием анеуплоидии.

## Закключение

Полученные результаты указывают на то, что aberrantный уровень метилирования генов развития плаценты может быть важным фактором, ассоциированным с гибелью эмбрионов с трисомией 16 в первом триместре беременности.

## Список литературы / References

Васильев С.А., Тимошевский В.А., Лебедев И.Н. Цитогенетические механизмы генерации анеуплоидии в соматических клетках работников ядерно-химического производства с инкорпорированным плутонием-239. *Генетика*. 2010;46(11):1565-1570

- [Vasilyev S.A., Timoshevsky V.A., Lebedev I.N. Cytogenetic mechanisms of aneuploidy in somatic cells of chemonuclear industry professionals with incorporated plutonium-239. *Russ. J. Genet.* 2010; 46(11):1381-1385. DOI 10.1134/s1022795410110141]
- Толмачёва Е.Н., Кашеварова А.А., Скрябин Н.А., Лебедев И.Н. Эпигенетические эффекты трисомии 16 в плацентарных тканях человека. *Молекуляр. биология*. 2013;47(3):423-432. DOI 10.7868/s002689841303018x
- [Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Lebedev I.N. Epigenetic effects of trisomy 16 in human placenta. *Mol. Biol.* 2013;47(3):373-381. DOI 10.1134/s0026893313030175]
- Blair J.D., Langlois S., Mcfadden D.E., Robinson W.P. Overlapping DNA methylation profile between placentas with trisomy 16 and early-onset preeclampsia. *Placenta*. 2014;35(3):216-222. DOI 10.1016/j.placenta.2014.01.001
- Du G., Yu M., Xu Q., Huang Z., Huang X., Han L., Fan Y., Zhang Y., Wang R., Xu S., Han X., Fu G., Lv S., Qin Y., Wang X., Lu C., Xia Y. Hypomethylation of *PRDM1* is associated with recurrent pregnancy loss. *J. Cell. Mol. Med.* 2020;24(12):7072-7077. DOI 10.1111/jcmm.15335
- Fang Y., Wan C., Wen Y., Wu Z., Pan J., Zhong M., Zhong N. Autism-associated synaptic vesicle transcripts are differentially expressed in maternal plasma exosomes of physiopathologic pregnancies. *J. Transl. Med.* 2021;19(1):154. DOI 10.1186/s12967-021-02821-6
- Grubblatt E., Mandel S., Jacob-Hirsch J., Zeligson S., Amariglio N., Rechavi G., Li J., Ravid R., Roggendorf W., Riederer P., Youdim M.B. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2004;111(12):1543-1573. DOI 10.1007/s00702-004-0212-1
- Jauniaux E., Poston L., Burton G.J. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum. Reprod. Update*. 2006;12(6):747-755. DOI 10.1093/humupd/dml016
- Jeong D.S., Kim M.H., Lee J.Y. Depletion of *CTCF* disrupts *PSG* gene expression in the human trophoblast cell line Swan 71. *FEBS Open Bio*. 2021;11(3):804-812. DOI 10.1002/2211-5463.13087
- Jia R.Z., Zhang X., Hu P., Liu X.M., Hua X.D., Wang X., Ding H.J. Screening for differential methylation status in human placenta in preeclampsia using a CpG island plus promoter microarray. *Int. J. Mol. Med.* 2012;30(1):133-141. DOI 10.3892/ijmm.2012.983
- Lebedev I.N., Ostroverkhova N.V., Nikitina T.V., Sukhanova N.N., Nazarenko S.A. Features of chromosomal abnormalities in spontaneous abortion cell culture failures detected by interphase FISH analysis. *Eur. J. Hum. Genet.* 2004;12(7):513-520. DOI 10.1038/sj.ejhg.5201178
- Lim J.H., Kang Y.J., Bak H.J., Kim M.S., Lee H.J., Kwak D.W., Han Y.J., Kim M.Y., Boo H., Kim S.Y., Ryu H.M. Epigenome-wide DNA methylation profiling of preeclamptic placenta according to severe features. *Clin. Epigenetics*. 2020;12(1):128. DOI 10.1186/s13148-020-00918-1
- Maioli E., Fortino V., Pacini A. Parathyroid hormone-related protein in preeclampsia: a linkage between maternal and fetal failures. *Biol. Reprod.* 2004;71(6):1779-1784. DOI 10.1095/biolreprod.104.030932
- Mason C.W., Buhimschi I.A., Buhimschi C.S., Dong Y., Weiner C.P., Swaan P.W. ATP-binding cassette transporter expression in human placenta as a function of pregnancy condition. *Drug Metab. Dispos.* 2011;39(6):1000-1007. DOI 10.1124/dmd.111.038166
- McMaster M.T., Zhou Y., Fisher S.J. Abnormal placentation and the syndrome of preeclampsia. *Semin. Nephrol.* 2004;24(6):540-547. DOI 10.1016/s0270-9295(04)00124-x
- Nikitina T.V., Sazhenova E.A., Tolmacheva E.N., Sukhanova N.N., Kashevarova A.A., Skryabin N.A., Vasilyev S.A., Nemtseva T.N., Yuriev S.Y., Lebedev I.N. Comparative cytogenetic analysis of spontaneous abortions in recurrent and sporadic pregnancy losses. *Biomed. Hub*. 2016;1(1):1-11. DOI 10.1159/000446099

- Paul S., Home P., Bhattacharya B., Ray S. GATA factors: Master regulators of gene expression in trophoblast progenitors. *Placenta*. 2017; 60(Suppl. 1):S61-S66. DOI 10.1016/j.placenta.2017.05.005
- Red-Horse K., Zhou Y., Genbacev O., Prakobphol A., Foulk R., McMaster M., Fisher S.J. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* 2004;114(6):744-754. DOI 10.1172/JCI22991
- Sandor C., Robertson P., Lang C., Heger A., Booth H., Vowles J., Witty L., Bowden R., Hu M., Cowley S.A., Wade-Martins R., Weber C. Transcriptomic profiling of purified patient-derived dopamine neurons identifies convergent perturbations and therapeutics for Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2017;26(3):552-566. DOI 10.1093/hmg/ddw412
- Tolmacheva E.N., Vasilyev S.A., Nikitina T.V., Lytkina E.S., Sazhenova E.A., Zhigalina D.I., Vasilyeva O.Y., Markov A.V., Demeneva V.V., Tashireva L.A., Kashevarova A.A., Lebedev I.N. Identification of differentially methylated genes in first-trimester placentas with trisomy 16. *Sci. Rep.* 2022;12(1):1166. DOI 10.1038/s41598-021-04107-9
- Vasilyev S.A., Tolmacheva E.N., Vasilyeva O.Y., Markov A.V., Zhigalina D.I., Zatula L.A., Lee V.A., Serdyukova E.S., Sazhenova E.A., Nikitina T.V., Kashevarova A.A., Lebedev I.N. LINE-1 retrotransposon methylation in chorionic villi of first trimester miscarriages with aneuploidy. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2021;38(1):139-149. DOI 10.1007/s10815-020-02003-1
- Yeung K.R., Chiu C.L., Pidsley R., Makris A., Hennessy A., Lind J.M. DNA methylation profiles in preeclampsia and healthy control placentas. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2016;310(10):H1295-H1303. DOI 10.1152/ajpheart.00958.2015
- Zhang W., Li S., Lou J., Li H., Liu M., Dong N., Wu Q. Atrial natriuretic peptide promotes uterine decidualization and a TRAIL-dependent mechanism in spiral artery remodeling. *J. Clin. Invest.* 2021; 131(20):e151053. DOI 10.1172/JCI151053

---

**Финансирование.** Исследование проведено при поддержке гранта РНФ № 23-15-00341.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.11.2023. После доработки 18.01.2024. Принята к публикации 18.01.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-25

## Состав бактериального микробиома мокроты пациентов с разными патоморфологическими формами немелкоклеточного рака легкого

В.Г. Дружинин <sup>1,2</sup> , Е.Д. Баранова <sup>1</sup>, П.С. Деменков <sup>3</sup>, Л.В. Мацкова <sup>4</sup>, А.В. Ларионов <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия

<sup>2</sup> Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

<sup>3</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

 druzhinin\_vladim@mail.ru

**Аннотация.** Исследования последних лет показали, что бактериальный микробиом респираторного тракта влияет на развитие рака легкого. Изменение состава микробиома у пациентов связывают с хроническими воспалительными процессами, так как многие бактерии вызывают окислительный стресс, а также способны прямо или опосредованно повреждать геном в клетках организма хозяина. До настоящего времени состав респираторного микробиома у больных с различными гистологическими вариантами рака легкого не изучен. В настоящем исследовании для анализа таксономического состава микробиома мокроты 52 пациентов с плоскоклеточным раком легкого, 52 пациентов с аденокарциномой легкого и 52 здоровых доноров контрольной группы использовали технологию массового параллельного секвенирования региона V3-V4 16S рPHK. Микробиомы мокроты больных с разными гистологическими типами рака легкого и контроля не имели значимых различий по индексу видового богатства (Шеннона), однако у пациентов они отличались от контроля по индексу выравненности (Пиелу). Структуры бактериальных сообществ (бета-разнообразие) между аденокарциномой и плоскоклеточным раком также были близкими. Тем не менее матрица, построенная по Брэю–Кёртису, позволила выявить различия между пациентами с плоскоклеточным раком и здоровыми субъектами, но не между аденокарциномой и контролем. Метод LEFse позволил идентифицировать в мокроте больных плоскоклеточным раком увеличение содержания *Bacillota* (*Streptococcus* и *Bacillus*) и *Actinomycetota* (*Rothia*) при сопоставлении с образцами пациентов с аденокарциномой. Не найдено различий в содержании бактерий между образцами больных аденокарциномой и контроля. В микробиоме образцов мокроты пациентов с плоскоклеточным раком по сравнению с контролем было повышено содержание представителей родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Peptostreptococcus* (филум *Bacillota*), *Prevotella*, *Macellibacteroides* (филум *Bacteroidota*), *Rothia* (филум *Actinomycetota*) и *Actinobacillus* (филум *Pseudomonadota*). Таким образом, бактериальный микробиом мокроты пациентов с разными гистологическими типами немелкоклеточного рака легкого имеет существенные различия. Дальнейшие исследования должны быть посвящены поиску микробиомных биомаркеров рака легкого на уровне бактериальных видов с использованием полногеномного секвенирования.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого; плоскоклеточный рак легкого; аденокарцинома легкого; бактериальный микробиом; мокрота; таксономический состав; 16S рPHK; NGS секвенирование.

**Для цитирования:** Дружинин В.Г., Баранова Е.Д., Деменков П.С., Мацкова Л.В., Ларионов А.В. Состав бактериального микробиома мокроты пациентов с разными патоморфологическими формами немелкоклеточного рака легкого. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024;28(2):204-214. DOI 10.18699/vjgb-24-25

## Composition of the sputum bacterial microbiome of patients with different pathomorphological forms of non-small-cell lung cancer


V.G. Druzhinin <sup>1,2</sup> , E.D. Baranova <sup>1</sup>, P.S. Demenkov <sup>3</sup>, L.V. Matskova <sup>4</sup>, A.V. Larionov <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

<sup>2</sup> Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

<sup>3</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

 druzhinin\_vladim@mail.ru

**Abstract.** Recent studies have shown that the bacterial microbiome of the respiratory tract influences the development of lung cancer. Changes in the composition of the microbiome are observed in patients with chronic inflammatory processes. Such microbiome changes may include the occurrence of bacteria that cause oxidative stress and



that are capable of causing genome damage in the cells of the host organism directly and indirectly. To date, the composition of the respiratory microbiome in patients with various histological variants of lung cancer has not been studied. In the present study, we determined the taxonomic composition of the sputum microbiome of 52 patients with squamous cell carcinoma of the lung, 52 patients with lung adenocarcinoma and 52 healthy control donors, using next-generation sequencing (NGS) on the V3-V4 region of the bacterial gene encoding 16S rRNA. The sputum microbiomes of patients with different histological types of lung cancer and controls did not show significant differences in terms of the species richness index (Shannon); however, the patients differed from the controls in terms of evenness index (Pielou). The structures of bacterial communities (beta diversity) in the adenocarcinoma and squamous cell carcinoma groups were also similar; however, when analyzed according to the matrix constructed by the Bray–Curtis method, there were differences between patients with squamous cell carcinoma and healthy subjects, but not between those with adenocarcinoma and controls. Using the LEfSe method it was possible to identify an increase in the content of *Bacillota* (*Streptococcus* and *Bacillus*) and *Actinomycetota* (*Rothia*) in the sputum of patients with squamous cell carcinoma when compared with samples from patients with adenocarcinoma. There were no differences in the content of bacteria between the samples of patients with adenocarcinoma and the control ones. The content of representatives of the genera *Streptococcus*, *Bacillus*, *Peptostreptococcus* (phylum *Bacillota*), *Prevotella*, *Mcellibacteroides* (phylum *Bacteroidota*), *Rothia* (phylum *Actinomycetota*) and *Actinobacillus* (phylum *Pseudomonadota*) was increased in the microbiome of sputum samples from patients with squamous cell carcinoma, compared with the control. Thus, the sputum bacterial microbiome of patients with different histological types of non-small-cell lung cancer has significant differences. Further research should be devoted to the search for microbiome biomarkers of lung cancer at the level of bacterial species using whole-genome sequencing.

Key words: non-small cell lung cancer; squamous cell lung cancer; lung adenocarcinoma; bacterial microbiome; sputum; taxonomic composition; 16S rRNA; NGS sequencing.

**For citation:** Druzhinin V.G., Baranova E.D., Demenkov P.S., Matskova L.V., Larionov A.V. Composition of the sputum bacterial microbiome of patients with different pathomorphological forms of non-small-cell lung cancer. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):204–214. DOI 10.18699/vjgb-24-25

## Введение

Исследования последнего времени показывают, что многие бактерии, обитающие в организме человека, имеют отношение к развитию злокачественных опухолей. Уже описаны микробные экосистемы, способные инициировать онкогенную трансформацию, вызывать метаболические изменения в микроокружении опухоли или модулировать ответ на иммунотерапию рака (Xavier et al., 2020; Chen et al., 2022). Предполагается, что комплексные метагеномные подходы позволяют точно идентифицировать профили микробиома, связанные с опухолью, и раскрывать механизмы влияния бактерий на возникновение и прогрессирование рака (Chiu, Miller, 2019). Кроме того, недавние исследования выявили микробные профили, специфичные для определенных типов рака, которые могут служить биомаркерами для диагностики риска развития опухолей (Wu et al., 2021).

Рак легкого (РЛ) возникает в паренхиме легкого или бронхах и ежегодно диагностируется примерно у 1.2 млн человек во всем мире (Cheng T.Y. et al., 2016). Смертность от РЛ остается высокой отчасти из-за отсутствия раннего выявления диагностических биомаркеров, в том числе метагеномных. Поэтому поиск бактерий, связанных с риском развития РЛ, в последние годы резко активизировался, особенно в связи с применением технологии массового параллельного секвенирования ДНК (Mao et al., 2018; Maddi et al., 2019). Предыдущие исследования показали, что существуют особенности состава микробиоты в образцах слюны, бронхоальвеолярного лаважа, легочной ткани, которые могут быть связаны с РЛ, но результаты этих исследований в отношении значимости конкретных бактерий во многом противоречивы (Hasegawa et al., 2014; Lee et al., 2016; Liu H.X. et al., 2018; Tsay et al., 2018; Peters et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2019; Cheng C. et al., 2020; Zhuo et al., 2020).

Важный источник информации о составе микробиоты респираторного тракта – мокрота, которая пока мало изучена у больных РЛ (Hosgood et al., 2014, 2019; Cameron et al., 2017; Druzhinin et al., 2020; Ran et al., 2020). Хотя мокрота не отражает микробиом какой-либо конкретной части дыхательных путей, она может быть полезной для поиска метагеномных биомаркеров РЛ, поскольку ее сбор относительно прост и неинвазивен.

Несмотря на тот факт, что все формы РЛ происходят из эпителиальных клеток слизистой оболочки дыхательных путей, современная классификация включает несколько различных гистологических типов этого заболевания (Tsao, Yoon, 2018). Рак легкого принято разделять на мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), на долю которого приходится 85 % всех случаев РЛ (Molina et al., 2008). Немелкоклеточный рак легкого в свою очередь подразделяется на крупноклеточный рак легкого, аденокарциному легкого (АКЛ) и плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ). Разные гистологические типы РЛ характеризуются своеобразием биологических паттернов, различием молекулярных маркеров и особенными стратегиями лечения (Herbst et al., 2008). Исходя из этого, можно предположить, что состав микробиома респираторного тракта также может различаться у пациентов, страдающих аденокарциномой легкого и плоскоклеточным раком легкого. На сегодняшний день этот вопрос остается открытым с учетом крайне малого числа опубликованных исследований, посвященных сопоставлению респираторного микробиома с отдельными гистологическими типами рака легкого.

В настоящей работе впервые представлены результаты сравнительного изучения таксономического состава бактериального микробиома мокроты больных АКЛ, ПРЛ и здоровых доноров, жителей Кузбасского региона Западной Сибири.

## Материалы и методы

Состав микробиоты изучен в образцах мокроты 52 пациентов с АКЛ (37 мужчин, 15 женщин; средний возраст 62.5 года); 52 пациентов с ПРЛ (49 мужчин, 3 женщины; средний возраст 59.9 года) и 52 здоровых доноров (39 мужчин, 13 женщин; средний возраст 62.5 года). Выборка пациентов с НМРЛ была сформирована из лиц, впервые поступивших на обследование в Кемеровский областной онкологический диспансер (Кемерово, Российская Федерация). Материал для исследования был собран за период с марта 2018 г. по март 2022 г. На каждого участника была заполнена анкета, содержащая информацию о месте и дате рождения, среде проживания, роде занятий, подверженности профессиональным вредностям, состоянии здоровья, приеме лекарственных препаратов, рентгенологических процедурах, курении и употреблении алкоголя. Для пациентов с НМРЛ дополнительно учитывали результаты клинического и гистологического анализов, первичную локализацию опухоли, стадию заболевания в соответствии с классификацией TNM (tumor,

nodus, metastasis) (Goldstraw, 2013). Демографические и клинические данные о пациентах и контрольных донорах представлены в табл. 1.

Критериями включения были: возраст мужчин и женщин  $\geq 40$  лет, сдача мокроты и подписание письменного информированного согласия. Критерии исключения – любое острое или хроническое состояние, которое ограничивало бы возможность пациента участвовать в исследовании, использование антибиотиков в течение 4 нед. до сбора материала, невозможность получить образец мокроты или отказ дать информированное согласие. Все участники были проинформированы о целях, возможных рисках исследования и подписали информированное согласие. Исследование одобрено комиссией по биомедицинской этике Кемеровского государственного университета (протокол № 17/2021 от 05.04.2021). При включении пациентов и контрольных доноров в исследование соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, 2000).

**Таблица 1.** Характеристика исследуемых групп

Показатели	ПРЛ, n = 52	АКЛ, n = 52	Контроль, n = 52
Возраст, лет (M)	59.9	62.5	62.5
Пол (n/%):			
Мужчины	49/94.0	37/71.0	39/75.0
Женщины	3/6.0	15/29.0	13/25.0
Место жительства (n/%):			
Город	35/67.0	40/77.0	46/88.0
Село	17/33.0	12/23.0	6/12.0
Профессиональные вредности (n/%):			
Да	19/37.0	23/44.0	12/23.0
Нет	33/63.0	29/56.0	40/77.0
Статус курения (n/%):			
Да	38/73.0	25/48.0	20/38.5
Нет	14/27.0	27/52.0	32/61.5
Употребление алкоголя (n/%):			
Да	34/65.0	35/67.0	39/75.0
Нет	18/35.0	17/33.0	13/25.0
Хронические заболевания (n/%):			
Сердечно-сосудистые	29/56.0	40/77.0	20/38.5
Бронхиты	16/31.0	12/23.0	4/8.0
ХОБЛ	24/45.0	6/12.0	0
Желудочно-кишечные	7/15.0	7/15.0	11/21.0
Диабет	1/2.0	3/6.0	4/8.0
Астма	3/6.0	1/2.0	1/2.0
Ожирение	4/8.0	15.0	1/2.0
TNM (n/%):			
I, II	28/54.0	32/61.5	–
III, IV	24/46.0	20/38.5	
Локализация опухоли (n/%):			
Центральный	27/52.0	3/6.0	–
Периферический	22/42.0	47/90.0	
Не установлена	3/6.0	2/4.0	

Примечание. TNM (tumor-node-metastasis) – опухоль-узел-метастаз; M – среднее значение.

Для анализа таксономического состава микробиома дыхательных путей образцы (2–3 мл) мокроты от пациентов с НМРЛ и доноров контрольной группы получали неинвазивным способом посредством продуктивного кашля. Эти образцы немедленно помещали в стерильные пластиковые флаконы и замораживали (–20 °С). Замороженные образцы транспортировали в лабораторию и хранили при –80 °С до процедуры выделения бактериальной ДНК.

Экстракцию ДНК, амплификацию и секвенирование 16S рРНК на приборе MiSeq (Illumina, США) выполняли в соответствии с рекомендациями производителя. Подробное описание процедур приведено ранее (Druzhinin et al., 2021).

Обработку данных, полученных по итогам секвенирования микробиомов, проводили при помощи пакета программ QIIME2 (Bolyen et al., 2019). Была осуществлена проверка качества и создана библиотека последовательностей. Объединение последовательностей в операционные таксономические единицы (OTU) выполняли на основе 99 % порога сходства нуклеотидного состава с использованием библиотек референсных последовательностей Greengenes (версии 13-8) и SILVA (версия 138) с последующим удалением синглтонов (OTU, содержащих только один сиквенс). Соответствие наименований бактериальных филумов современной международной номенклатуре определяли с использованием ресурса LPSN (Parte et al., 2020).

Общее разнообразие (альфа-разнообразие) прокариотических сообществ мокроты оценивали по количеству выделенных OTU (аналог видового богатства) и индексам Шеннона ( $H = \sum p_i \ln p_i$ , где  $p_i$  – доля  $i$ -го вида в сообществе). Равномерность распределения видов по их обилию в сообществе оценивали индексом Пиелу. Различия структуры бактериальных сообществ разных образцов (бета-разнообразие) анализировали при помощи UniFrac (Lozupone, Knight, 2005) – метода, распространенного в экологии микроорганизмов, оценивающего различие между сообществами на основе филогенетического родства представленных таксонов. При расчете индексов разнообразия использовали нормализацию выборок по 1070 сиквенсам (минимальное количество полученных сиквенсов на образец). Достоверность различий между группами образцов оценивали методом PERMANOVA (Adonis). Построение графа анализа главных координат (PCOA) проводили с помощью пакета QIIME2. Для сравнения относительного процентного содержания отдельных бактериальных таксономических единиц в микробиомах сопоставляемых групп использовали показатель размера эффекта линейного дискриминантного анализа (LEFse) (Segata et al., 2011).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с применением пакета программ STATISTICA.10 (Statsoft, США). Оценку количественных показателей осуществляли посредством вычисления средних значений ( $M$ ). Для оценки достоверности различий относительного процентного содержания отдельных бактериальных таксонов в образцах применяли ранговый U-тест Манна–Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0.05$ . Для устранения эффекта множественных

сравнений при оценке значимости различий использовали поправку False Discovery Rate (FDR). Для оценки взаимосвязей между содержанием отдельных бактерий в мокроте пациентов с наличием сопутствующих заболеваний, курением, употреблением алкоголя, местом жительства, профессиональных вредных факторов применяли метод множественного регрессионного анализа.

## Результаты

В ходе секвенирования области V3-V4 гена 16S рРНК в мокроте идентифицировано в общей сложности девять типов бактерий с относительной частотой выше 0.1 %. Преобладающими типами бактерий в микробиомах пациентов с ПРЛ, пациентов с АКЛ и в контроле были *Bacillota* и *Bacteroidota*, которые вместе составляли около 70 % общей микробиоты. В целом относительное процентное содержание, а также соотношение доминантных бактериальных типов в мокроте оказалось близким к параметрам, описанным ранее для микробиома мокроты у больных РЛ (Hosgood et al., 2014; Huang et al., 2019).

Для оценки альфа-разнообразия использован индекс Шеннона. Результаты анализа показали отсутствие различий между сопоставляемыми выборками пациентов и здоровыми донорами (рис. 1). Вместе с тем значимое снижение альфа-разнообразия по индексу Пиелу (evenness) было обнаружено в мокроте пациентов с АКЛ и с ПРЛ по сравнению с контролем (тест Краскела–Уоллиса;  $p = 0.0001$ ). При этом не было достоверных различий в равномерности между разными гистологическими типами РЛ (рис. 2).

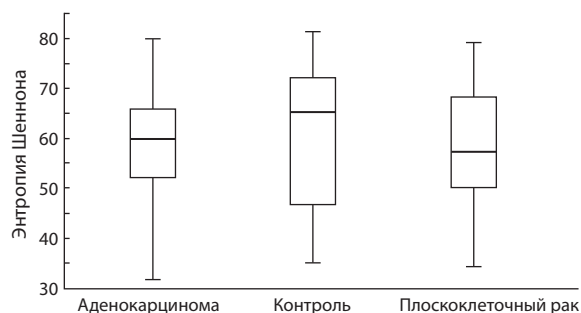


Рис. 1. Индекс разнообразия Шеннона микробиомов пациентов с аденокарциномой, плоскоклеточным раком легкого и контрольных доноров.

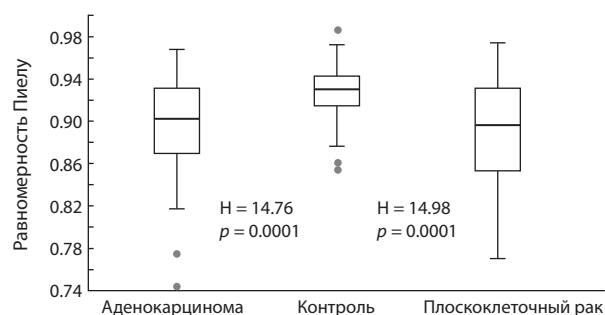
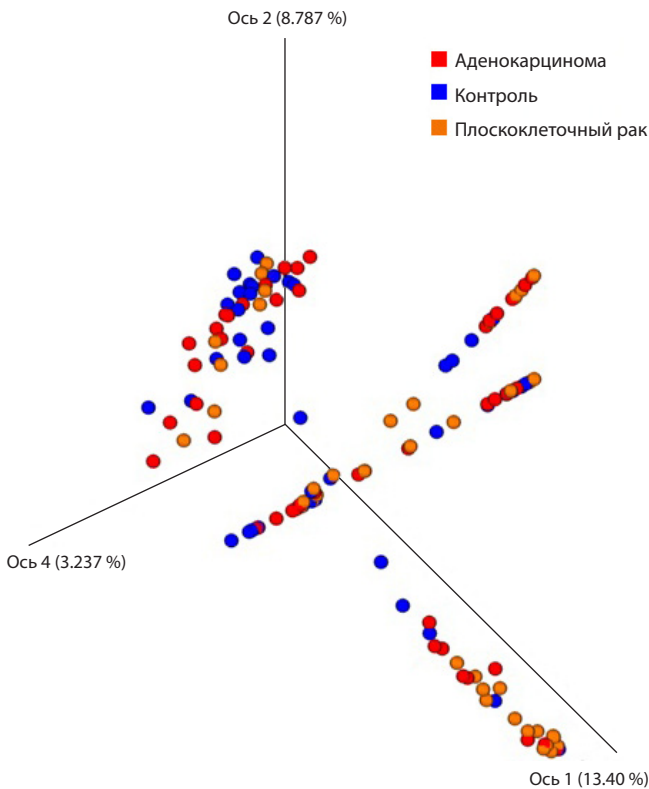


Рис. 2. Индекс Пиелу микробиомов пациентов с аденокарциномой, плоскоклеточным раком легкого и контрольных доноров.



**Рис. 3.** Трехмерная диаграмма, построенная методом анализа главных компонент, демонстрирующая филогенетическое разнообразие прокариотических сообществ в мокроте пациентов с аденокарциномой, плоскоклеточным раком легкого и контрольных доноров.

Различия в структуре бактериальных сообществ (бета-разнообразии) в образцах мокроты больных АКЛ, ПРЛ и здоровых лиц оценивали с помощью теста PERMANOVA (Адониса), используя матрицу различий, построенную по методу Брея–Кёртиса (рис. 3). Анализ показал, что различия в бета-разнообразии имеются только между сообществами ПРЛ и контроля (псевдо-F = 3.89;  $p = 0.007$ ).

Различия в таксономическом составе бактерий между исследуемыми выборками были изучены с помощью линейного дискриминантного анализа (LEFse), который дает возможность оценить размер эффекта представленности различных бактерий. Метод LEFse позволил выявить значимое увеличение представительства отдельных бактериальных таксонов в мокроте больных с ПРЛ по сравнению с аденокарциномой легкого. Это относится, в частности, к типу *Bacillota*, классу *Bacilli* и роду *Streptococcus* (рис. 4). Сопоставление таксономического состава пациентов с ПРЛ и здоровых доноров показало увеличение содержания в мокроте больных представителей типов *Bacillota* и *Pseudomonadota*, класса *Bacilli*, родов *Streptococcus*, *Rothia*, *Bacillus*, *Macellibacteroides* и др. (рис. 5). Существенно меньшим оказалось число бактериальных таксонов, по которым LEFse-анализ обнаружил различия между здоровыми донорами и пациентами с АКЛ (рис. 6). Конкретно, в мокроте здоровых лиц найдено увеличение содержания представителей порядка *Clostridiales*, класса *Clostridia* и рода *Moryella*, тогда как у пациентов с АКЛ

увеличено представительство порядка *Flavobacteriales* и класса *Flavobacteriia*.

Метод множественного регрессионного анализа (МРА) был использован для оценки возможных связей между содержанием отдельных бактерий в мокроте больных ПРЛ с целым рядом других факторов, потенциально способных повлиять на состав микробиоты. Помимо значимых для ПРЛ родов бактерий (*Streptococcus*, *Rothia*, *Bacillus*, *Macellibacteroides*), модели МРА включили пол, возраст пациентов, сопутствующие заболевания, курение, употребление алкоголя, место жительства и наличие профессиональных вредных факторов (см. табл. 1). В результате установлено, что среди изученных конфаундеров только наличие сердечно-сосудистых заболеваний (ишемия, гипертоническая болезнь и др.), хронических бронхитов и/или хронической обструктивной болезни легких было связано с плоскоклеточным раком легкого.

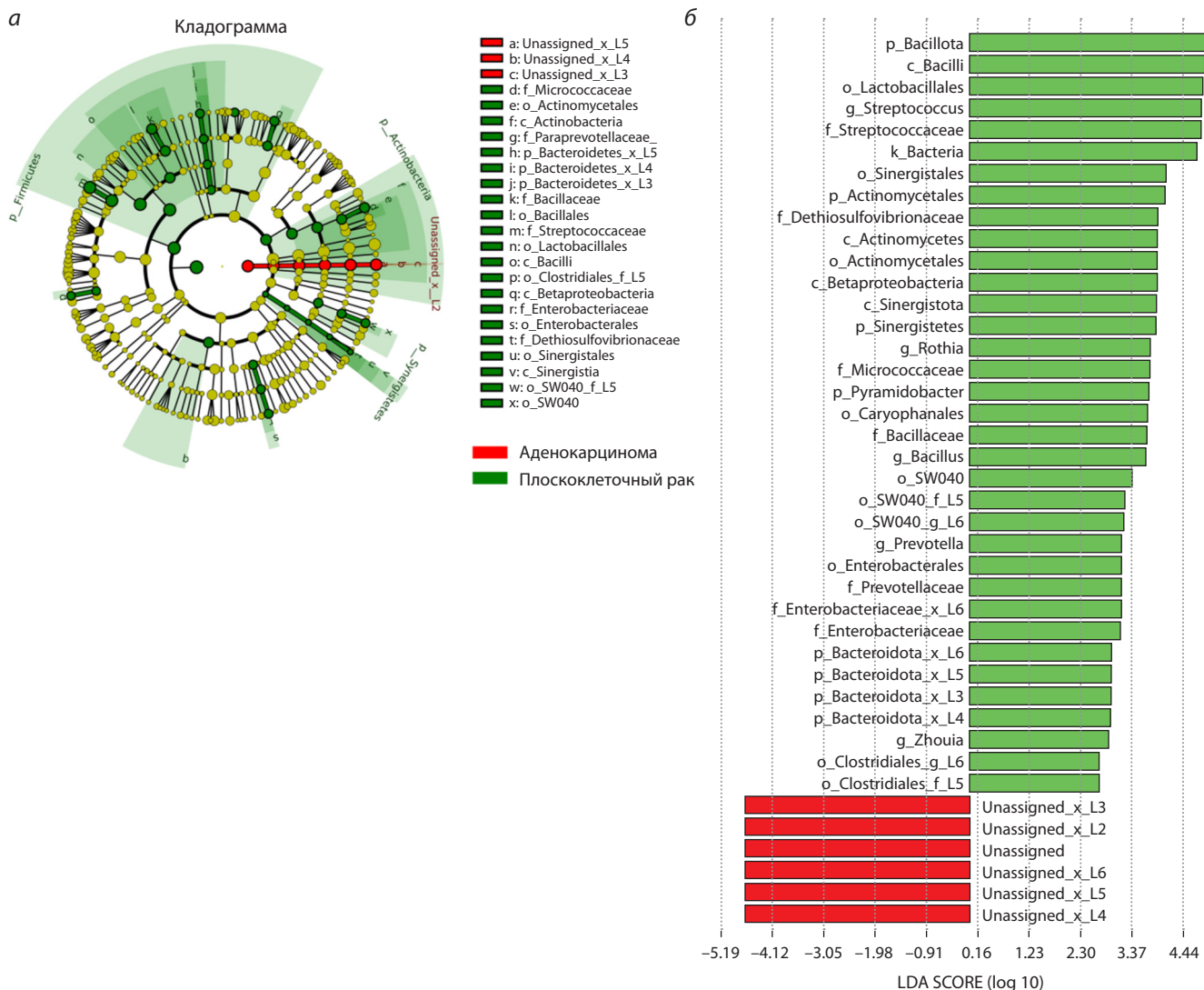
Отдельно было изучено влияние возраста и статуса курения на состав микробиоты у пациентов и в контрольной группе. Корреляционный анализ (Спирмена) обнаружил значимое увеличение с возрастом содержания представителей рода *Prevotella* в мокроте пациентов с АКЛ ( $p = 0.0196$ ) и пациентов с ПРЛ ( $p = 0.0274$ ) (рис. 7). Одновременно с этим у пациентов с АКЛ наблюдается положительная корреляция возраста с содержанием представителей родов *Atopobium* ( $p = 0.03$ ) и *Leptotrichia* ( $p = 0.03$ ). Для контрольных доноров выявлены увеличение с возрастом содержания бактерий из родов *Porphyromonas* ( $p = 0.01$ ) и *Veillonella* ( $p = 0.045$ ) и одновременно – уменьшение содержания представителей родов *Lachnoanaerobaculum* ( $p = 0.02$ ), *Stomatobaculum* ( $p = 0.006$ ) и *Oribacterium* ( $p = 0.02$ ).

Статус курения не оказывал никакого влияния на состав микробиома мокроты у пациентов с аденокарциномой легкого и плоскоклеточным раком легкого. Для выборки контроля обнаружено увеличение содержания *Streptococcus* в мокроте курящих доноров по сравнению с некурящими (20.87 против 15.16 %;  $p = 0.0007$ ), а также достоверное уменьшение содержания *Neisseria* в мокроте курильщиков (2.75 против 5.68 %;  $p = 0.001$ ).

Отдельный интерес представляет вопрос о возможном влиянии стадии опухолевого процесса на состав бактерий в мокроте. В табл. 2 сведены результаты сопоставления процентного содержания бактериальных таксонов, значительно различающихся между пациентами с НМРЛ, находящимися на I–II и III–IV стадиях заболевания. Из данных этого анализа следует, что в мокроте пациентов на поздних стадиях опухолевого процесса наблюдается увеличение содержания бактерий, относящихся к четырем родам.

Первичная локализация опухоли при РЛ может быть еще одним фактором, потенциально способным влиять на состав бактериальной микробиоты респираторного тракта. Поэтому было выполнено сопоставление среднего процентного содержания родов бактерий в мокроте пациентов с центральным НМРЛ и периферическим НМРЛ (табл. 3).

Как следует из результатов анализа, центральная локализация опухоли сопровождается увеличением представителей рода *Bacteroides*. В то же время у пациентов с пери-



**Рис. 4.** Разная представленность бактериальных таксонов в образцах мокроты пациентов с плоскоклеточным раком и аденокарциномой легкого.

Здесь и на рис. 5 и 6: а – кладограмма, дающая представление о близости различающихся таксономических групп; б – график, показывающий результаты LEFse-анализа; LDA – линейный дискриминантный анализ.

ферическим НМРЛ наблюдается увеличение содержания бактерий рода *Veillonella* по сравнению с центральной локализацией опухоли (12.79 % против 7.99 %;  $p = 0.01$ ).

### Обсуждение

Различия в таксономическом составе бактериального микробиома респираторного тракта человека уже признаны важным патогенетическим фактором рака легкого (Maddi et al., 2019; Yagi et al., 2021), однако до настоящего времени вопрос о значении микрофлоры у пациентов с разными гистологическими типами НМРЛ остается открытым. Здесь мы сопоставили таксономический состав микробиома в образцах мокроты пациентов с двумя наиболее распространенными формами НМРЛ – аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого.

Согласно результатам предыдущих исследований, респираторная микробиота больных РЛ имеет тенденцию к снижению альфа-разнообразия по сравнению со здоровы-

ми людьми, в то время как бета-разнообразие существенно не отличается (Lee et al., 2016; Liu N.N. et al., 2020). Эта же тенденция отмечена для микробиомов пораженных и непораженных раком тканей легкого (Kim et al., 2022).

Сведений о сходстве или различиях между параметрами разнообразия сообществ дыхательных путей и тканей легкого пациентов с разными гистологическими типами РЛ к настоящему времени немного, и эти результаты противоречивы. В частности, альфа-разнообразие микробиома оказалось выше в мокроте больных АКЛ по сравнению с ПРЛ, и было также обнаружено значимое различие в бета-разнообразии между этими группами, но сопоставляемые выборки были слишком малы (6 и 7 случаев соответственно) (Ran et al., 2020). В другом исследовании показано, что микробиота бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) более разнообразна в ПРЛ, чем при АКЛ (Gomes et al., 2019). Никаких различий в альфа-разнообразии, как и в бета-разнообразии микробиомов из образцов мокроты

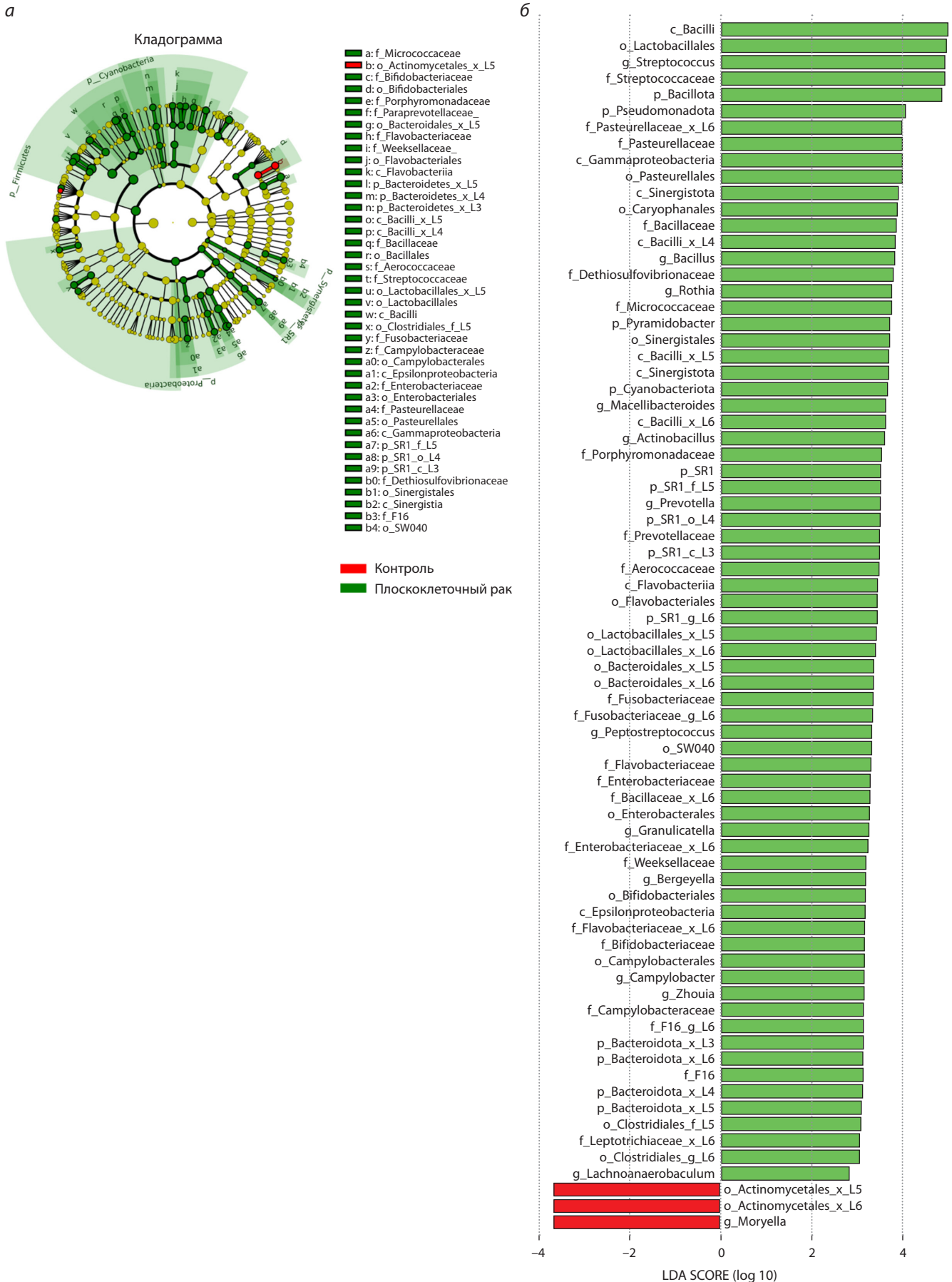
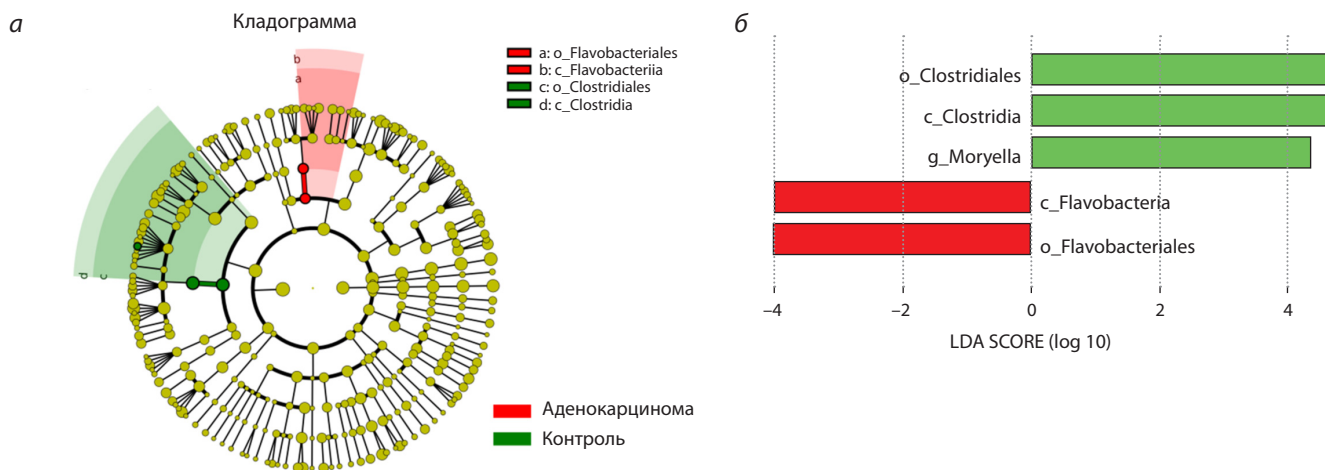
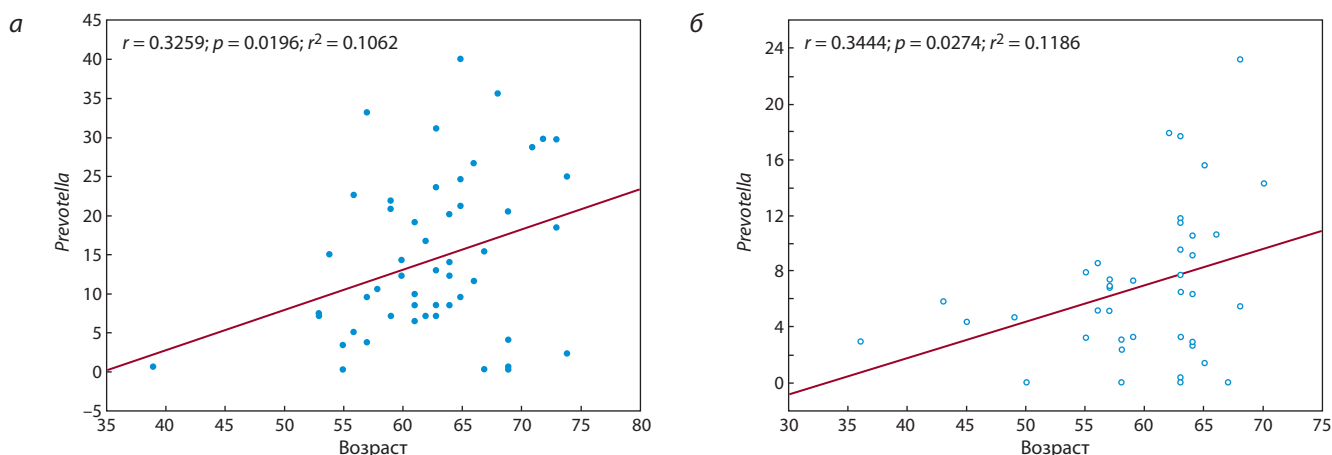


Рис. 5. Разная представленность бактериальных таксонов в образцах мокроты пациентов с плоскоклеточным раком и здоровых доноров.



**Рис. 6.** Разная представленность бактериальных таксонов в образцах мокроты пациентов с аденокарциномой легкого и здоровых доноров.



**Рис. 7.** Содержание представителей *Prevotella* в мокроте больных аденокарциномой легкого (а) и плоскоклеточным раком легкого (б) в зависимости от возраста.

**Таблица 2.** Среднее процентное содержание таксонов бактерий в микробиоме мокроты больных немелкоклеточным раком легкого на разных стадиях заболевания

Род бактерий	I–II (n = 60), M, %	III–IV (n = 44), M, %	p*
<i>Porphyromonas</i>	3.09	3.99	0.004*
<i>Alloprevotella</i>	1.75	3.86	0.002*
<i>Selenomonas</i>	1.1	1.4	0.007*
<i>Megasphaera</i>	0.88	1.45	0.03
<i>Oribacterium</i>	0.48	0.72	0.01*
<i>Filifactor</i>	0.05	0.09	0.03

\* Здесь и в табл. 3: значение p меньше, чем значение p с поправкой на FDR.

и БАЛ, не выявлено между выборками больных с АКЛ и ПРЛ (Huang et al., 2019). Микробиом тканей опухолей пациентов с АКЛ не отличался по альфа-разнообразию от ПРЛ, хотя в группе аденокарцином было зафиксировано достоверное увеличение содержания грамположительных бактерий (Kovaleva et al., 2020).

**Таблица 3.** Среднее процентное содержание таксонов бактерий в микробиоме мокроты больных немелкоклеточным раком легкого с различной локализацией опухоли

Род бактерий	Центральный рак легкого (n = 31), M, %	Периферический рак легкого (n = 68), M, %	p
<i>Veillonella</i>	8.76	12.79	0.01*
<i>Bacillus</i>	3.52	1.87	0.03
<i>Granulicatella</i>	1.63	0.94	0.04
<i>Bacteroides</i>	1.62	0.52	0.002*
<i>Oribacterium</i>	0.43	0.18	0.03

Наше исследование показало, что значения индекса Шеннона, отражающего видовое богатство микробиоты, близки в сопоставляемых когортах пациентов и контрольных доноров. Существенное снижение в обеих когортах пациентов по сравнению с контролем отмечено для индекса равномерности (evenness), основанного на

измерении относительной численности различных видов в сообществе и являющегося одной из метрик, характеризующих альфа-разнообразие. Структуры бактериальных сообществ (бета-разнообразие) между АКЛ и ПРЛ также были близкими, однако согласно матрице, построенной по методу Брэй–Кёртиса, различия имелись между сообществами бактерий пациентов с ПРЛ и здоровыми субъектами, но не между АКЛ и контролем (см. рис. 3). Таким образом, наше исследование показало, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -разнообразие бактериальных сообществ мокроты пациентов с разными гистологическими типами являются схожими. Тем не менее следует отметить, что микробиом пациентов с ПРЛ значительно отличается от микробиома здоровых людей.

Для ответа на вопрос о различиях между составами микробиома мокроты в когортах пациентов с разными гистологическими типами РЛ нами был использован метод LEFse, который наиболее часто применяется в микробиомных исследованиях. Анализ LEFse позволил идентифицировать различия между сравниваемыми выборками пациентов (см. рис. 4). Мокрота больных ПРЛ имела значимое обогащение представителями *Bacillota* (род *Streptococcus* и *Bacillus*) и *Actinomycetota* (род *Rothia*) при сопоставлении с образцами пациентов с аденокарциномой. Сравнение состава респираторного микробиома в группах пациентов с ПРЛ и здоровых субъектов также дало возможность выявить ряд значимых различий. По итогам анализа LEFse (см. рис. 5) в мокроте пациентов по сравнению с контролем повышено содержание представителей филумов *Bacillota* и *Pseudomonadota*; родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Rothia*, *Macellibacteroides*, *Prevotella*, *Actinobacillus* и *Peptostreptococcus*. У здоровых участников исследования отмечено увеличение представительства отряда *Actinomycetales* и рода *Moryella*.

Несколько предыдущих исследований показало, что состав бактериальной микробиоты в респираторном тракте больных РЛ может быть гистологически зависим. Например, Q. Leng с коллегами (2021) использовали цифровую капельную ПЦР для анализа 25 родов бактерий, ассоциируемых обычно с НМРЛ, в мокроте 17 больных НМРЛ и 10 здоровых субъектов. В мокроте пациентов с ПРЛ обнаружено значимое увеличение содержания представителей родов *Acidovorax*, *Streptococcus*, *H. pylori* и *Veillonella*, тогда как повышенное обилие *Capnocytophaga* найдено в мокроте больных аденокарциномой. Эти же бактериальные биомаркеры мокроты затем были подтверждены в когорте, состоящей из 69 случаев НМРЛ и 79 контрольных доноров. В другом исследовании изучена связь между микрофлорой слюны и раком легкого. Были секвенированы образцы ДНК 20 больных РЛ (10 ПРЛ и 10 АКЛ) и контрольных субъектов ( $n = 10$ ) (Yan et al., 2015). На уровне бактериальных родов содержание *Capnocytophaga*, *Selenomonas* и *Veillonella* было повышено как при АКЛ, так и при плоскоклеточном раке, а *Neisseria* было снижено как при аденокарциноме легкого так и при плоскоклеточном раке легкого.

В нашем исследовании пациенты с ПРЛ имели значимое увеличение содержания представителей родов *Streptococcus*, *Bacillus* и *Rothia* по сравнению с аденокарциномой. В мокроте больных АКЛ по сравнению с ПРЛ, как и

в предыдущем исследовании (Leng et al., 2021), имелось увеличение содержания *Capnocytophaga* (1.46 против 1.08 %), однако эти различия не были достоверны. Таким образом, можно констатировать с одной стороны, что две основные гистологические формы РЛ имеют различающиеся респираторные микробиомы, однако, с другой стороны, нет единого набора бактериальных таксонов, маркирующих эти различия. Возможно, этот факт отражает исходно неодинаковый состав бактерий, населяющих дыхательный тракт пациентов с НМРЛ, проживающих в разных регионах мира, т. е. является следствием действия экологических факторов (Costello et al., 2012).

Важная находка, полученная в результате данного исследования, – существенная разница содержания бактериальных таксонов в микробиоме мокроты у больных с разными гистологическими формами РЛ по сравнению со здоровыми субъектами. Если для ПРЛ выявляется значимое обогащение в мокроте представителей родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Rothia*, *Macellibacteroides*, *Prevotella*, *Actinobacillus* и *Peptostreptococcus* (см. рис. 5), то для выборки пациентов с аденокарциномой не обнаружено каких-либо существенных различий в составе бактерий по сравнению с контролем (см. рис. 6). Этот факт означает, что поиск метагеномных биомаркеров, связанных с РЛ, может быть корректным только при раздельном анализе состава микробиоты в зависимости от гистологической принадлежности опухоли.

Размер выборок, использованных в нашем исследовании, позволил изучить, помимо гистологического типа опухоли, другие отдельные факторы (возраст, статус курения, стадию злокачественного процесса, локализацию опухоли), потенциально способные влиять на состав микробиоты при немелкоклеточном раке легкого. Интересным представляется однонаправленное увеличение с возрастом содержания представителей рода *Prevotella*, которое было зарегистрировано в обеих выборках пациентов (см. рис. 7). Это не согласуется с результатами исследования образцов БАЛ у больных НМРЛ, где в подгруппе больных старше 60 лет регистрировали снижение содержания *Prevotella* (*P. oryzae*) по сравнению с более молодыми пациентами (Zheng et al., 2021).

Сравнение состава микробиома мокроты у курящих и некурящих пациентов с ПРЛ и АКЛ не показало никаких различий в составе бактерий. Вместе с тем в группе контроля отмечено увеличение содержания *Streptococcus*, а также заметное снижение *Neisseria* в мокроте курильщиков по сравнению с некурящими, что согласуется с ранее опубликованными результатами (Huang, Shi, 2019; Ying et al., 2022). Примечателен тот факт, что в верхних отделах желудочно-кишечного тракта у курильщиков также наблюдаются увеличение представительства *Streptococcus* и снижение *Neisseria* по сравнению с некурящими донорами (Shanahan et al., 2018). Согласно последним данным (Halдар et al., 2020), влияние курения на микробиоту мокроты остается неясным и требует дальнейшего изучения.

Оценка возможного влияния стадии НМРЛ на структуру микробиома мокроты показала, что в мокроте пациентов на поздних стадиях опухолевого процесса наблюдается увеличение содержания бактерий, относящихся к родам *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Selenomonas*, *Megasphaera*,



*Oribacterium* и *Filifactor*. У больных НМРЛ с центральным раком легкого было увеличено содержание в мокроте бактерий из рода *Bacteroides*. В то же время у пациентов с периферическим раком легкого отмечено увеличение содержания *Veillonella* по сравнению с центральной локализацией опухоли. Эти результаты следует считать предварительными, так как анализ был выполнен для суммарной выборки пациентов без учета гистологического типа немелкоклеточного рака легкого.

## Заключение

Проведен сравнительный анализ таксономического состава бактериального микробиома мокроты больных с двумя основными гистологическими типами НМРЛ и здоровых доноров мокроты на основе последовательности участка гена, кодирующего 16S рРНК, идентифицированной с использованием технологии массового параллельного секвенирования. Выявлены значимые различия в содержании представителей целого ряда родов бактерий в мокроте пациентов с плоскоклеточным раком легкого и аденокарциномой легкого. В частности, присутствие *Streptococcus*, *Bacillus*, *Rothia* и других родов повышено в мокроте больных ПРЛ по сравнению со здоровыми субъектами.

Представленные результаты требуют подтверждения в независимых крупномасштабных исследованиях для дальнейшего понимания роли микробиоты мокроты в развитии немелкоклеточного рака легкого. Кроме того, поиск бактериальных «сигнатур», связанных риском развития рака легкого, требует полногеномного секвенирования для получения точной оценки таксономического состава на видовом уровне.

## Список литературы / References

- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., ... Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., Caporaso J.G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 2019;37(8):852-857. DOI 10.1038/s41587-019-0209-9
- Cameron S.J.S., Lewis K.E., Huws S.A., Hegarty M.J., Lewis P.D., Pachebat J.A., Mur L.A.J. A pilot study using metagenomic sequencing of the sputum microbiome suggests potential bacterial biomarkers for lung cancer. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177062. DOI 10.1371/journal.pone.0177062
- Chen Y., Wu F.H., Wu P.Q., Xing H.Y., Ma T. The role of the tumor microbiome in tumor development and its treatment. *Front. Immunol.* 2022;13:935846. DOI 10.3389/fimmu.2022.935846
- Cheng C., Wang Z., Wang J., Ding C., Sun C., Liu P., Xu X., Liu Y., Chen B., Gu B. Characterization of the lung microbiome and exploration of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 2020;9(3):693-704. DOI 10.21037/tlcr-19-590
- Cheng T.Y., Cramb S.M., Baade P.D., Youlden D.R., Nwogu C., Reid M.E. The international epidemiology of lung cancer: latest trends, disparities, and tumor characteristics. *J. Thorac. Oncol.* 2016;11(10):1653-1671. DOI 10.1016/j.jtho.2016.05.021
- Chiu C.Y., Miller S.A. Clinical metagenomics. *Nat. Rev. Genet.* 2019;20(6):341-355. DOI 10.1038/s41576-019-0113-7
- Costello E.K., Stagaman K., Dethlefsen L., Bohannan B.J., Relman D.A. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science.* 2012;336(6086):1255-1262. DOI 10.1126/science.1224203
- Druzhinin V.G., Matskova L.V., Demenkov P.S., Baranova E.D., Volobaev V.P., Minina V.I., Apalko S.V., Churina M.A., Romanyuk S.A., Shcherbak S.G., Ivanov V.I., Larionov A.V. Taxonomic diversity of sputum microbiome in lung cancer patients and its relationship with chromosomal aberrations in blood lymphocytes. *Sci. Rep.* 2020;10(1):9681. DOI 10.1038/s41598-020-66654-x
- Druzhinin V.G., Matskova L.V., Demenkov P.S., Baranova E.D., Volobaev V.P., Minina V.I., Larionov A.V., Titov V.A., Fucic A. Genetic damage in lymphocytes of lung cancer patients is correlated to the composition of the respiratory tract microbiome. *Mutagenesis.* 2021;36(2):143-153. DOI 10.1093/mutage/geab004
- Goldstraw P. New staging system: How does it affect our practice? *J. Clin. Oncol.* 2013;31(8):984-991. DOI 10.1200/JCO.2012.42.7922
- Gomes S., Cavadas B., Ferreira J.C., Marques P.I., Monteiro C., Suceana M., Sousa C., Vaz Rodrigues L., Teixeira G., Pinto P., Tavares de Abreu T., Bárbara C., Semedo J., Mota L., Carvalho A.S., Matthiesen R., Pereira L., Seixas S. Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 2019;9(1):12838. DOI 10.1038/s41598-019-49195-w
- Haldar K., George L., Wang Z., Mistry V., Ramshah M.Y., Free R.C., John C., Reeve N.F., Miller B.E., Tal-Singer R., Webb A.J., Brookes A.J., Tobin M.D., Singh D., Donaldson G.C., Wedzicha J.A., Brown J.R., Barer M.R., Brightling C.E. The sputum microbiome is distinct between COPD and health, independent of smoking history. *Respir. Res.* 2020;21(1):183. DOI 10.1186/s12931-020-01448-3
- Hasegawa A., Sato T., Hoshikawa Y., Ishida N., Tanda N., Kawamura Y., Kondo T., Takahashi N. Detection and identification of oral anaerobes in intraoperative bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *Microbiol. Immunol.* 2014;58(7):375-381. DOI 10.1111/1348-0421.12157
- Herbst R.S., Heymach J.V., Lippman S.M. Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(13):1367-1380. DOI 10.1056/NEJMra0802714
- Hosgood H.D. 3rd, Sapkota A.R., Rothman N., Rohan T., Hu W., Xu J., Vermeulen R., He X., White J.R., Wu G., Wei F., Mongodin E.F., Lan Q. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. *Environ. Mol. Mutagen.* 2014;55(8):643-651. DOI 10.1002/em.21878
- Hosgood H.D. 3rd, Mongodin E.F., Wan Y., Hua X., Rothman N., Hu W., Vermeulen R., Seow W.J., Rohan T., Xu J., Li J., He J., Huang Y., Yang K., Wu G., Wei F., Shi J., Sapkota A.R., Lan Q. The respiratory tract microbiome and its relationship to lung cancer and environmental exposures found in rural China. *Environ. Mol. Mutagen.* 2019;60(7):617-623. DOI 10.1002/em.22291
- Huang C., Shi G. Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases. *J. Transl. Med.* 2019;17(1):225. DOI 10.1186/s12967-019-1971-7
- Huang D., Su X., Yuan M., Zhang S., He J., Deng Q., Qiu W., Dong H., Cai S. The characterization of lung microbiome in lung cancer patients with different clinicopathology. *Am. J. Cancer Res.* 2019;9(9):2047-2063
- Kim O.H., Choi B.Y., Kim D.K., Kim N.H., Rho J.K., Sul W.J., Lee S.W. The microbiome of lung cancer tissue and its association with pathological and clinical parameters. *Am. J. Cancer Res.* 2022;12(5):2350-2362
- Kovaleva O., Podlesnaya P., Rashidova M., Samoilova D., Petrenko A., Zborovskaya I., Mochalnikova V., Kataev V., Khlopko Y., Plotnikov A., Gratchev A. Lung microbiome differentially impacts survival of patients with non-small cell lung cancer depending on tumor stroma phenotype. *Biomedicines.* 2020;8(9):349. DOI 10.3390/biomedicines8090349
- Lee S.H., Sung J.Y., Yong D., Chun J., Kim S.Y., Song J.H., Chung K.S., Kim E.Y., Jung J.Y., Kang Y.A., Kim Y.S., Kim S.K., Chang J., Park M.S. Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions. *Lung Cancer.* 2016;102:89-95. DOI 10.1016/j.lungcan.2016.10.016
- Leng Q., Holden V.K., Deepak J., Todd N.W., Jiang F. Microbiota biomarkers for lung cancer. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(3):407. DOI 10.3390/diagnostics11030407

- Liu H.X., Tao L.L., Zhang J., Zhu Y.G., Zheng Y., Liu D., Zhou M., Ke H., Shi M.M., Qu J.M. Difference of lower airway microbiome in bilateral protected specimen brush between lung cancer patients with unilateral lobar masses and control subjects. *Int. J. Cancer*. 2018;142(4):769-778. DOI 10.1002/ijc.31098
- Liu N.N., Ma Q., Ge Y., Yi C.X., Wei L.Q., Tan J.C., Chu Q., Li J.Q., Zhang P., Wang H. Microbiome dysbiosis in lung cancer: from composition to therapy. *NPJ Precis. Oncol.* 2020;4(1):33. DOI 10.1038/s41698-020-00138-z
- Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71(12):8228-8235. DOI 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
- Maddi A., Sabharwal A., Violante T., Manuballa S., Genco R., Patnaik S., Yendamuri S. The microbiome and lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 2019;11(1):280-291. DOI 10.21037/jtd.2018.12.88
- Mao Q., Jiang F., Yin R., Wang J., Xia W., Dong G., Ma W., Yang Y., Xu L., Hu J. Interplay between the lung microbiome and lung cancer. *Cancer Lett.* 2018;415:40-48. DOI 10.1016/j.canlet.2017.11.036
- Molina J.R., Yang P., Cassivi S.D., Schild S.E., Adjei A.A. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* 2008;83(5):584-594. DOI 10.4065/83.5.584
- Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C., Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70(11):5607-5612. DOI 10.1099/ijsem.0.004332
- Peters B.A., Hayes R.B., Goparaju C., Reid C., Pass H.I., Ahn J. The microbiome in lung cancer tissue and recurrence-free survival. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2019;28(4):731-740. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-18-0966
- Ran Z., Liu J., Wang F., Xin C., Shen X., Zeng S., Song Z., Xiong B. Analysis of pulmonary microbial diversity in patients with advanced lung cancer based on high-throughput sequencing technology. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2020;23(12):1031-1038. DOI 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.103.16 (in Chinese)
- Segata N., Izard J., Waldron L., Gevers D., Miropolsky L., Garrett W.S., Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R60. DOI 10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Shanahan E.R., Shah A., Koloski N., Walker M.M., Talley N.J., Morrison M., Holtmann G.J. Influence of cigarette smoking on the human duodenal mucosa-associated microbiota. *Microbiome.* 2018;6(1):150. DOI 10.1186/s40168-018-0531-3
- Tsao M.S., Yoon J.Y. The eighth TNM classification for lung cancer – What is next? *Lung Cancer.* 2018;121:97-98. DOI 10.1016/j.lungcan.2018.04.018
- Tsay J.J., Wu B.G., Badri M.H., Clemente J.C., Shen N., Meyn P., Li Y., Yie T.A., Lhakhang T., Olsen E., Murthy V., Michaud G., Sulaiman I., Tsigos A., Heguy A., Pass H., Weiden M.D., Rom W.N., Sterman D.H., Bonneau R., Blaser M.J., Segal L.N. Airway microbiota is associated with upregulation of the PI3K pathway in lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2018;198:1188-1198. DOI 10.1164/rccm.201710-2118OC
- Wang K., Huang Y., Zhang Z., Liao J., Ding Y., Fang X., Liu L., Luo J., Kong J. A preliminary study of microbiota diversity in saliva and bronchoalveolar lavage fluid from patients with primary bronchogenic carcinoma. *Med. Sci. Monit.* 2019;25:2819-2834. DOI 10.12659/MSM.915332
- Wu Y., Jiao N., Zhu R., Zhang Y., Wu D., Wang A.J., Fang S., Tao L., Li Y., Cheng S., He X., Lan P., Tian C., Liu N.N., Zhu L. Identification of microbial markers across populations in early detection of colorectal cancer. *Nat. Commun.* 2021;12(1):3063. DOI 10.1038/s41467-021-23265-y
- Xavier J.B., Young V.B., Skufca J., Ginty F., Testerman T., Pearson A.T., Macklin P., ... Johnson W.E., Jobin C., Ridlon J.M., Koh A.Y., Yu M., Kelly L., Wargo J.A. The cancer microbiome: distinguishing direct and indirect effects requires a systemic view. *Trends Cancer.* 2020;6(3):192-204. DOI 10.1016/j.trecan.2020.01.004
- Yagi K., Huffnagle G.B., Lukacs N.W., Asai N. The lung microbiome during health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10872. DOI 10.3390/ijms221910872
- Yan X., Yang M., Liu J., Gao R., Hu J., Li J., Zhang L., Shi Y., Guo H., Cheng J., Razi M., Pang S., Yu X., Hu S. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2015;5(10):3111-3122
- Ying K.L., Brasky T.M., Freudenheim J.L., McElroy J.P., Nickerson Q.A., Song M.A., Weng D.Y., Wewers M.D., Whiteman N.B., Mathe E.A., Shields P.G. Saliva and lung microbiome associations with electronic cigarette use and smoking. *Cancer Prev. Res. (Phila).* 2022;15(7):435-446. DOI 10.1158/1940-6207.CAPR-21-0601
- Zhang W., Luo J., Dong X., Zhao S., Hao Y., Peng C., Shi H., Zhou Y., Shan L., Sun Q., Li Y., Zhao X. Salivary microbial dysbiosis is associated with systemic inflammatory markers and predicted oral metabolites in non-small cell lung cancer patients. *J. Cancer.* 2019;10(7):1651-1662. DOI 10.7150/jca.28077
- Zheng L., Sun R., Zhu Y., Li Z., She X., Jian X., Yu F., Deng X., Sai B., Wang L., Zhou W., Wu M., Li G., Tang J., Jia W., Xiang J. Lung microbiome alterations in NSCLC patients. *Sci. Rep.* 2021;11(1):11736. DOI 10.1038/s41598-021-91195-2
- Zhuo M., An T., Zhang C., Wang Z. Characterization of microbiota in cancerous lung and the contralateral non-cancerous lung within lung cancer patients. *Front. Oncol.* 2020;10:1584. DOI 10.3389/fonc.2020.01584







**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00022P).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 14.04.2023. После доработки 21.07.2023. Принята к публикации 23.07.2023.

DOI 10.18699/vjgb-24-26

## Роль сиртуинов в эпигенетической регуляции и контроле старения







Е.М. Самойлова <sup>1, 2#</sup>, С.Е. Романов <sup>1, 3#</sup>, Д.А. Чудакова <sup>4</sup>, П.П. Лактионов <sup>1, 3</sup> <sup>1</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия<sup>3</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия<sup>4</sup> Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия laktionov@mcb.nsc.ru

**Аннотация.** Достижения современного здравоохранения в развитых странах позволили увеличить продолжительность жизни, из-за чего все более актуальным становится сохранение активного долголетия. С момента открытия белки семейства сиртуинов рассматривались в качестве значимых регуляторов физиологических процессов, ассоциированных со старением. Сиртуины проявляют деацетилазную, деацетилазную, АДФ-рибозилтрансферазную активность и модифицируют множество белковых субстратов, включая компоненты хроматина и регуляторные белки. Столь многофакторная система регуляции затрагивает ряд процессов, таких как клеточный метаболизм, функции митохондрий, эпигенетическую регуляцию, репарацию ДНК и прочие. Неудивительно, что активность белков-сиртуинов затрагивает проявление классических признаков старения организма: клеточное старение, нарушения метаболизма, митохондриальную дисфункцию, геномную нестабильность и нарушение эпигенетической регуляции. Непосредственное изменение активности сиртуинов в клетках человека также рассматривается в качестве маркера старения и вовлечено в генез различных возраст-зависимых патологических состояний. Кроме того, экспериментальные данные, полученные на модельных животных, а также результаты популяционных геномных исследований позволяют предположить влияние сиртуинов на продолжительность жизни. Вместе с тем многообразие функций сиртуинов и биохимических субстратов делает крайне нетривиальным выявление причинно-следственных связей и непосредственной роли сиртуинов в контроле функционального состояния организма. Однако влияние сиртуинов на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов в ходе старения и при патологиях – один из наиболее важных аспектов поддержания гомеостаза органов и тканей. Представленный обзор посвящен разнообразию белков-сиртуинов у человека и модельных животных. Помимо краткого описания основных ферментативных и биологических активностей сиртуинов, рассматривается роль сиртуинов в эпигенетической регуляции структуры хроматина, в том числе в контексте развития нестабильности генома, ассоциированной со старением. Проведен критический анализ работ по исследованию функциональной связи сиртуинов и долголетия, а также влияния сиртуинов на ассоциированные со старением патологические процессы, такие как хроническое воспаление, фиброз и нейровоспаление.

Ключевые слова: сиртуины; старение; деацетилирование белков; эпигенетическая регуляция.

**Для цитирования:** Самойлова Е.М., Романов С.Е., Чудакова Д.А., Лактионов П.П. Роль сиртуинов в эпигенетической регуляции и контроле старения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):215-227. DOI 10.18699/vjgb-24-26

## Role of sirtuins in epigenetic regulation and aging control

Е.М. Samoilova <sup>1, 2#</sup>, S.E. Romanov <sup>1, 3#</sup>, D.A. Chudakova <sup>4</sup>, P.P. Laktionov <sup>1, 3</sup> <sup>1</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia<sup>2</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia<sup>3</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia<sup>4</sup> Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia laktionov@mcb.nsc.ru

**Abstract.** Advances in modern healthcare in developed countries make it possible to extend the human lifespan, which is why maintaining active longevity is becoming increasingly important. After the sirtuin (SIRT) protein family was discovered, it started to be considered as a significant regulator of the physiological processes associated with aging. SIRT has deacetylase, deacylase, and ADP-ribosyltransferase activity and modifies a variety of protein substrates, including chromatin components and regulatory proteins. This multifactorial regulatory system affects many processes: cellular metabolism, mitochondrial functions, epigenetic regulation, DNA repair and more. As is expected, the activity of sirtuin proteins affects the manifestation of classic signs of aging in the body, such as cellular senescence, metabolic disorders, mitochondrial dysfunction, genomic instability, and the disruption of epigenetic regulation. Changes in the SIRT activity in human cells can also be considered a marker of aging and are involved in

the genesis of various age-dependent disorders. Additionally, experimental data obtained in animal models, as well as data from population genomic studies, suggest a SIRT effect on life expectancy. At the same time, the diversity of sirtuin functions and biochemical substrates makes it extremely complicated to identify cause-and-effect relationships and the direct role of SIRT in controlling the functional state of the body. However, the SIRT influence on the epigenetic regulation of gene expression during the aging process and the development of disorders is one of the most important aspects of maintaining the homeostasis of organs and tissues. The presented review centers on the diversity of SIRT in humans and model animals. In addition to a brief description of the main SIRT enzymatic and biological activity, the review discusses its role in the epigenetic regulation of chromatin structure, including the context of the development of genome instability associated with aging. Studies on the functional connection between SIRT and longevity, as well as its effect on pathological processes associated with aging, such as chronic inflammation, fibrosis, and neuroinflammation, have been critically analyzed.

Key words: sirtuins; aging; protein deacetylation; epigenetic regulation.

**For citation:** Samoilova E.M., Romanov S.E., Chudakova D.A., Laktionov P.P. Role of sirtuins in epigenetic regulation and aging control. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):215-227. DOI 10.18699/vjgb-24-26

## Введение

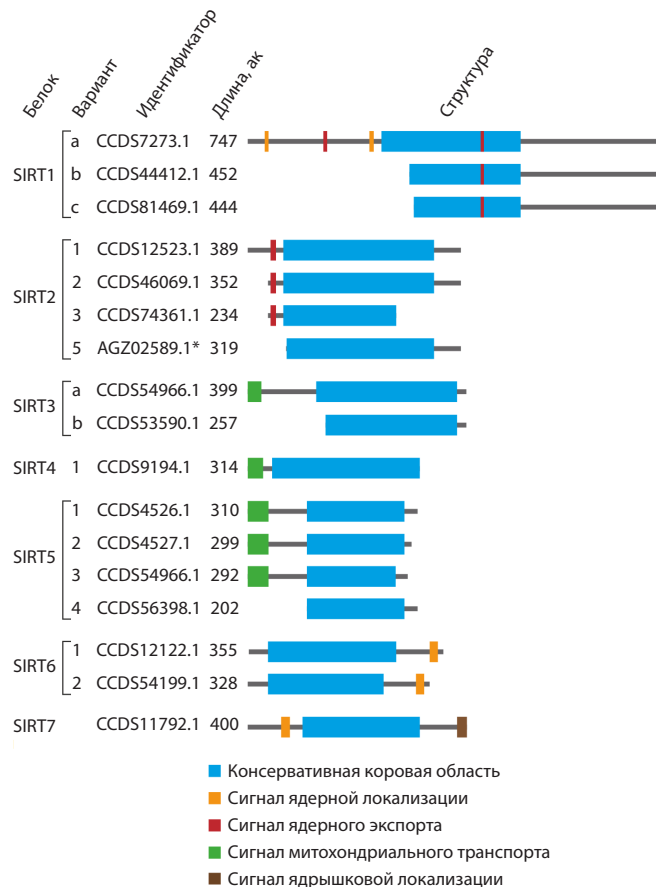
Первый представитель белков-сиртуинов, Sir2 (silent information regulator 2), обнаружен у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и изначально описан в качестве ключевого репрессора транскрипции в HM-локусах, ответственных за переключение типа спаривания дрожжевых клеток (Ivy et al., 1986). Впоследствии оказалось, что Sir2 необходим для подавления экспрессии транскриптов вблизи теломер и сайленсинга ретротранспозонов, интегрированных в tandemные повторы рибосомной ДНК (Gottschling et al., 1990; Bryk et al., 1997), а его основной функцией является НАД<sup>+</sup>-зависимое деацетилирование гистонов (Imai et al., 2000; Smith et al., 2000). Установлено также, что делеция гена *Sir2* практически вдвое сокращает продолжительность жизни *S. cerevisiae*, тогда как оверэкспрессия *Sir2*, напротив, увеличивает ее на одну треть (Sinclair, Guarente, 1997; Kaerberlein et al., 1999). Гомологи Sir2, объединенные названием «сиртуины» (silent information regulator two proteins), были найдены во всех доменах живых организмов от бактерий и архей до человека (Frye, 2000), поэтому прямая связь между активностью Sir2 и продолжительностью жизни дрожжей положила начало исследованиям о роли семейства НАД<sup>+</sup>-зависимых деацетилаз в регуляции процессов старения. У млекопитающих обнаружено семь белков-сиртуинов (SIRT1–SIRT7), среди них наибольшей гомологией к дрожжевому Sir2 обладает SIRT1 (Frye, 2000).

Благодаря специфичной функции и характерному строению сиртуины высших эукариот были объединены в семейство гистоновых деацетилаз третьего класса (class III HDAC) (Gray, Ekström, 2001). Все сиртуины человека характеризуются наличием общей консервативной коровой области длиной 250–270 аминокислот (рис. 1). Этот фрагмент белка состоит из большого домена с укладкой Россмана (Rossmann fold domain), характерного для многих НАД<sup>+</sup>-зависимых белков, и малого домена, который включает Zn-связывающий и спиральный (helical) модули (Moniot et al., 2013).

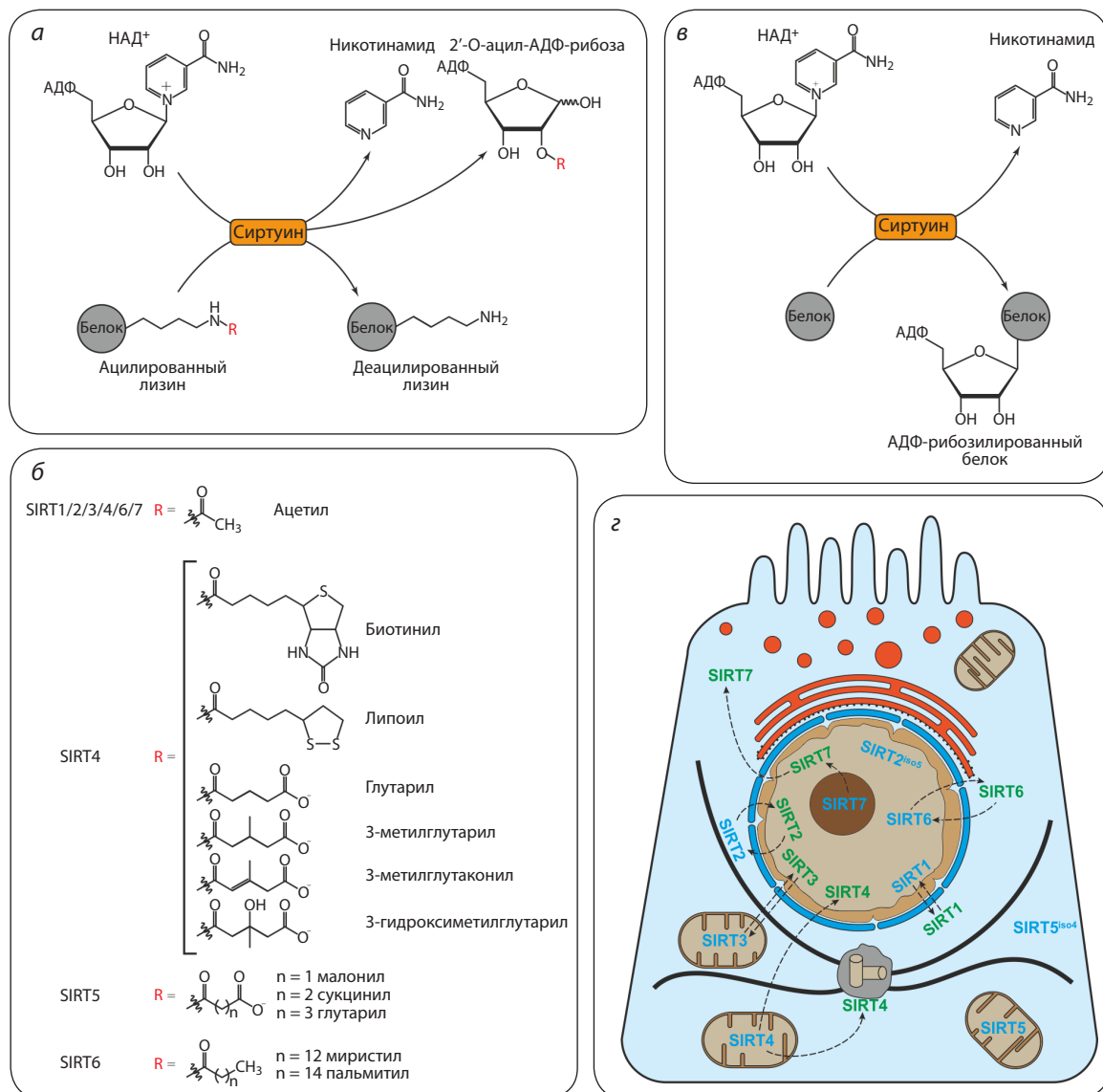
Основные различия между гомологами обнаруживаются в N- и C-концевых доменах, которые у разных белков могут содержать сигналы ядерной или ядрышковой локализации (NLS и NoLS соответственно), ядерного экспорта (NES) или митохондриального транспорта (MTS) (см. рис. 1). Следует отметить, что семь генов-сиртуинов

человека кодируют не менее 23 белковых изоформ (Rack et al., 2014; Zhang X. et al., 2021). Особенности минорных изоформ могут быть как отсутствие сигнальных последовательностей транспорта, так и измененная структура корового домена, что может наделять их оригинальными функциями (Rack et al., 2014; Du Y. et al., 2018).

Сиртуины вовлечены в регуляцию множества внутриклеточных процессов, таких как клеточный метаболизм, функции митохондрий, ремоделирование хроматина, ре-



**Рис. 1.** Разнообразие сиртуинов человека. Приведены сведения о белковых изоформах, аннотированных в базе CCDS (Pruitt et al., 2009). Цветными прямоугольниками помечены функциональные участки белков. \* Идентификатор аминокислотной последовательности из базы NCBI Proteins (Sayers et al., 2022).



**Рис. 2.** Молекулярная функция сиртуинов человека.

*а* – схема деацетилазной реакции, осуществляемой сиртуинами; *б* – список некоторых функциональных групп, удаляемых разными сиртуинами; *в* – схема АДФ-рибозилтрансферазной реакции с участием сиртуинов; *г* – локализация сиртуинов человека в клетках. Белок обозначен голубым цветом, если на схеме помещен в область конститутивной локализации, или зеленым – в противном случае.

акция на окислительный стресс (Wu et al., 2022). На уровне организма сиртуины влияют на обмен веществ, старение, канцерогенез. В частности, изменение активности сиртуинов в клетках человека и модельных организмов рассматривается в качестве маркеров старения (Kumar et al., 2014; Zhang J. et al., 2016), а также факторов, влияющих на общую продолжительность жизни (Roichman et al., 2021). В рамках представленного обзора будут проанализированы регуляторные активности сиртуинов, их участие в эпигенетической регуляции и вовлеченность в генез ассоциированных с возрастом патологических состояний.

### Биохимическая активность сиртуинов

В первую очередь, сиртуины известны в качестве ферментов-деацетилаз гистоновых и негистоновых белков (рис. 2, *а*) (Sauve et al., 2006). Кроме того, сиртуины способны удалять различные ацильные остатки (см. рис. 2,

*а, б*). Например, SIRT5 преимущественно деацетирует остатки лизина, модифицированные сукцинильной, малониловой или глутарильной группами (Du J. et al., 2011; Tan et al., 2014). Некоторые сиртуины совмещают деацетилазную и деацетилазную активность. Так, SIRT6 способен удалять остатки миристиновой и пальмитиновой жирных кислот (Jiang et al., 2013; Zhang X. et al., 2017), а SIRT4 удаляет остатки липоевой кислоты, биотина, глутарата и его производных (Laurent et al., 2013; Mathias et al., 2014).

Сиртуины также проявляют способность к моно-АДФ-рибозилированию белков (Frye, 1999). В таких реакциях сиртуины переносят АДФ-рибозу из НАД<sup>+</sup> напрямую на аминокислотные остатки аргинина с высвобождением никотинамида (см. рис. 2, *в*) (Fahie et al., 2009). К настоящему моменту АДФ-рибозилтрансферазная активность у млекопитающих описана для SIRT4, SIRT6 и SIRT7, однако суммарное количество их мишеней невелико. На-

пример, SIRT4 АДФ-рибозилирует глутаматдегидрогеназу GDH в бета-клетках поджелудочной железы и подавляет ее активность, ограничивая метаболизм глутамата и глутамина (Haigis et al., 2006). Белок SIRT6 при окислительном стрессе рекрутируется к точкам разрыва ДНК и индуцирует восстановление поврежденных путем рибозилирования поли-АДФ-рибозилтрансферазы PARP1 – одного из важнейших регуляторов репарации (Мао et al., 2011). Кроме того, в фибробластах SIRT6 привлекается к 5'-нетранслируемой области ретротранспозона LINE1 и подавляет его экспрессию путем рибозилирования репрессора транскрипции KAP1 (Van Meter et al., 2014). Авторибозилирование SIRT7 у человека регулирует его связывание с генами, обогащенными гистоновой модификацией mH2A1.1, оно важно для гомеостаза глюкозы (Simonet et al., 2020).

### Организация и функции сиртуинов в клетках

Сиртуины разделяют на преимущественно ядерные (SIRT1/6/7), цитоплазматические (SIRT2) и митохондриальные (SIRT3/4/5) (Michishita et al., 2005), однако внутриклеточная локализация сиртуинов может изменяться как в ходе клеточного цикла, так и под действием различных стимулов (см. рис. 2, 3).

Белок SIRT1 в основном обнаруживается в ядре, где он задействован в регуляции структуры хроматина и активности множества регуляторных белков, вместе с тем он был найден в цитоплазме клеток (Bai, Zhang, 2016). Предполагается, что в норме SIRT1 присутствует в ядре, но под действием неизвестных стимулов он может транспортироваться в цитоплазму благодаря наличию сигнала ядерного экспорта (NES) (Sun, Fang, 2016). Перемещение SIRT1 в цитоплазму также наблюдается в ходе клеточного старения, сопровождаемого аутофагоцитозом SIRT1 в лизосомах (Xu et al., 2020; Wang L. et al., 2021).

Для преимущественно ядерного белка SIRT6 продемонстрирована цитоплазматическая локализация в клетках печени в ответ на повышенные уровни насыщенных жирных кислот, где он деацетилюет и активирует ацил-КоА-синтазу 5 (ACSL5) – один из ферментов окисления жирных кислот (Hou et al., 2022). В макрофагах мыши фракция SIRT6 постоянно присутствует в цитоплазме и стимулирует секрецию белка TNF $\alpha$  путем удаления его меристильной модификации (Bresque et al., 2022).

Белок SIRT7 является единственным сиртуином, для которого наблюдается обогащение в ядрышках, где он вовлечен в транскрипцию рибосомных генов (Ford et al., 2006; Kiran et al., 2013). В стрессовых условиях, когда нарушается продукция рРНК, SIRT7 перемещается в нуклеоплазму или цитоплазму (Chen et al., 2013; Zhang P.-Y. et al., 2016), где взаимодействует с множеством белков (Tsai et al., 2012; Lee et al., 2014). Хотя точная функция цитоплазматического SIRT7 остается неустановленной, предположительно, она связана с регуляцией репликативного старения клеток (Kiran et al., 2013).

Цитоплазматический белок SIRT2 вовлечен в регуляцию клеточного цикла, метаболизма жирных кислот и углеводов, ответов на окислительный стресс и многие другие процессы. В интерфазе он локализуется на микротрубочках и деацетилюет  $\alpha$ -тубулин (North et al., 2003).

В процессе G2/M-перехода SIRT2 временно мигрирует в ядра и деацетилюет гистон H4 по лизину 16, тем самым модулируя конденсацию хроматина (Vaquero et al., 2006). Транспорт SIRT2 из ядра в цитоплазму происходит активно благодаря наличию на N-конце сигнала ядерного экспорта (NES) (North, Verdin, 2007). Уровень экспорта из ядра зависит от посттрансляционных модификаций в белке и может нарушаться под действием различных стимулов (North, Verdin, 2007). Так, например, заражение клеток HeLa бактерией *Listeria monocytogenes* приводит к дефосфорилированию SIRT2 по остатку S25, что вызывает повышение ядерной концентрации белка, где он опосредует репрессию генов иммунного ответа посредством деацетилирования H3K18ac (Eskandarian et al., 2013; Pereira et al., 2018).

Перемещение SIRT2 в ядро наблюдается в клетках глиобластомы и других типах опухолей, причем пациенты с более высоким уровнем SIRT2 в ядрах опухолевых клеток имеют худший прогноз развития глиомы (Imaoka et al., 2012; Eldridge et al., 2020). Снижение ядерного экспорта может достигаться и за счет альтернативного сплайсинга. Так, обнаруженная недавно изоформа SIRT2<sup>iso5</sup> с неизвестной ферментативной активностью лишена сигнала ядерного экспорта и конститутивно присутствует в ядре, где взаимодействует с гистон-метилтрансферазами, а также подавляет транскрипцию и репликацию вируса гепатита В (Rack et al., 2014; Piracha et al., 2020).

Белки SIRT3, SIRT4 и SIRT5 локализуются преимущественно в матриксе митохондрий и играют ключевую роль в таких клеточных процессах, как ответ на окислительный стресс, диссимиляция веществ и апоптоз (Michishita et al., 2005). При этом у мышей нарушение функции SIRT3 приводит к значительному увеличению ацетилирования митохондриальных белков, в то время как нокаут SIRT4 и SIRT5 имеет значительно более слабый эффект (Lombard et al., 2007; Finkel et al., 2009). Однако митохондриальные сиртуины выявляются и в других клеточных компартментах. Белок SIRT3 детектируется в клеточном ядре, где задействован в регуляции структуры гетерохроматина и NHEJ-зависимой репарации повреждений ДНК (Sengupta, Haldar, 2018; Diao et al., 2021). Белок SIRT4 взаимодействует с центросомой в конце G2-фазы, а в условиях митохондриального стресса перемещается в ядро, хотя функция этого остается неясной (Ramadani-Muja et al., 2019; Bergmann et al., 2020). Кроме того, из четырех исследованных изоформ SIRT5 только три содержат сигнал митохондриальной локализации (см. рис. 1), при этом самая короткая изоформа, SIRT5<sup>iso4</sup>, лишена его и обнаруживается в цитоплазме клеток (Du Y. et al., 2018).

### Роль сиртуинов в регуляции структуры хроматина и эпигенетической регуляции

Ключевыми звеньями эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов являются специфические метки – модификации гистонов и метилирование ДНК, а также эффекторные белки, способные устанавливать и распознавать такие метки. Координированная работа этой системы определяет свойства хроматина, обуславливающие активность генов и стабильность генома. Сиртуины

задействованы в непосредственном контроле гистоновых модификаций, а также влияют на активность и стабильность регуляторных факторов.

Белок SIRT1 участвует в формировании гетерохроматина путем удаления меток H4K16Ac, H3K9Ac и H1K26Ac и посредством взаимодействия с гистоновой метилтрансферазой Suv39h1, отвечающей за установку ключевой гистоновой модификации конститутивного гетерохроматина H3K9me3 (Vaquero et al., 2004, 2007; Bosch-Presegué et al., 2011). Таким образом, SIRT1 участвует в установке H3K9me3 путем удаления H3K9Ac и прямого взаимодействия с Suv39h1, которое повышает специфическую активность последней в результате конформационных изменений, деацетилирования K266 в составе каталитического SET-домена, а также повышает устойчивость к протеосомной деградации, подавляя убиквитинирование по сайту K87 в составе хромодомена Suv39h1 (Vaquero et al., 2007; Bosch-Presegué et al., 2011). Нарушение функции SIRT1 приводит к значительной потере HP1 и H3K9me3 в составе перичентромерного гетерохроматина (Vaquero et al., 2007; Wang R.-H. et al., 2008; El Ramy et al., 2009).

Важно отметить, что столь существенное влияние на структуру хроматина не может не затрагивать экспрессии иных регуляторных факторов. Так, например, обнаружено, что активация SIRT1 приводит к увеличению пролиферации, инвазии и ускоряет эпителиально-мезенхимальный переход в клетках опухоли поджелудочной железы, что связано по меньшей мере частично с подавлением экспрессии генов транскрипционных факторов FOXO3 и GRHL3 (Leng et al., 2021).

Белок SIRT1 также вовлечен в регуляцию метилирования ДНК, причем как на уровне регуляции транскрипции, так и на уровне непосредственно модуляции активности ДНК-метилтрансфераз. Так, на модели эмбриональных стволовых клеток мыши было продемонстрировано, что SIRT1 деацетилюет гистоны H1 и H4 в области промотора гена *Dnmt3l*, подавляя его экспрессию (Heo et al., 2017). Дефицит же SIRT1 приводит к повышенному уровню метилирования геномной ДНК и к дерегуляции импринтированных генов (Heo et al., 2017). Интересно отметить, что в этой же работе было показано, что SIRT1 способен деацетилировать белок Dnmt3l, что снижает его стабильность (Heo et al., 2017). Также было выявлено влияние SIRT1 и на ДНК-метилтрансферазу человека DNMT1, причем деацетилирование остатков лизина в каталитическом домене вызывало повышение метилтрансферазной активности, а деацетилирование в области GK-линкера – ее снижение (Peng et al., 2011). В ходе дифференцировки макрофагов человека белки SIRT1 и SIRT2 физически взаимодействуют с ДНК-метилтрансферазой DNMT3B для предотвращения аберрантной активации провоспалительных генов (Li T. et al., 2020).

Помимо ДНК-метилтрансфераз, SIRT1 влияет на активность множества других негистоновых мишеней. Так, деацетилирование белка p53 под действием SIRT1 приводило к репрессии апоптоза в клетках H1299 (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Кроме этого, деацетилирование p53 вызывает подавление его регуляторной активности в качестве онкосупрессора (Ong, Ramasamy, 2018).

Деацетилирование под действием SIRT1 белка Ku70, одного из ключевых компонентов NHEJ репарации ДНК и поддержания стабильности теломер, активирует репарацию ДНК (Jeong et al., 2007). Таким образом, в указанных примерах SIRT1 выступает в роли фактора, стимулирующего выживание клетки при повреждении ДНК. Однако SIRT1 также способен деацетилировать компонент транскрипционного комплекса NF-κB белок p65, что, напротив, приводит к активации индуцируемого TNF-α апоптоза в клетках немелкоклеточного рака легкого (Yeung et al., 2004).

Деацетилирование транскрипционных факторов FOXO (FOXO1, FOXO3, FOXO4) под действием SIRT1 может приводить как к активации апоптоза (FOXO1), так и к остановке клеточного цикла и подавлению апоптоза (FOXO3) (Brunet et al., 2004; Yang et al., 2005). В свою очередь, деацетилирование FOXO4 повышает протективное действие при окислительном стрессе (van der Horst et al., 2004). Помимо описанного выше, SIRT1 вовлечен в регуляцию активности транскрипционных факторов, контролирующих ответ на гипоксию, метаболизм, клеточную инвазию и пролиферацию.

Белок SIRT3 в большей степени описан в качестве регулятора функций митохондрий, вместе с тем в ядрах отмечена его роль в NHEJ-репарации ДНК посредством удаления гистоновой модификации H3K56ac (Sengupta, Haldar, 2018). Показана также роль SIRT3 в деацетилировании гистона H3 по 27-му остатку лизина, что ассоциировано с подавлением транскрипции гена транскрипционного фактора FOS и предотвращением TNF-α-индуцированного воспалительного и профиброзного ответа в кардиомиоцитах крысы (Palomer et al., 2020).

На уровне хроматина было представлено, что в клетках HEK293T SIRT3 способен напрямую взаимодействовать с компонентами ядерной ламины LaminB1 и LBR, а также с белками гетерохроматина HP1α, HP1γ и KAP1 (Diao et al., 2021). Более того, делеция SIRT3 в мезенхимальных стволовых клетках (МСК) человека приводила к диссоциации ламин-ассоциированных доменов и снижению представленности белковых маркеров гетерохроматина H3K9me3, HP1α и KAP1, а также компонента ядерной мембраны LaminB1 (Diao et al., 2021). Восстановление уровня SIRT3 вызывало обратный эффект (Diao et al., 2021). Вместе с тем важно отметить, что делеция SIRT3 приводила к ускорению клеточного старения, а все обнаруженные эффекты являются, в том числе, классическими его проявлениями, в связи с чем при всей очевидности фенотипа и участии SIRT3 в регуляции иных процессов, ассоциированных с клеточным старением, причинно-следственная связь может оказаться более сложной.

Белок SIRT6 также вовлечен в эпигенетическую регуляцию; одной из первых его обнаруженных активностей на уровне регуляции хроматина была способность деацетилировать гистон H3 по K9 и K56 (Kawahara et al., 2009). Посредством регуляции ацетилирования H3K9 SIRT6 выступает в роли корепрессора таких транскрипционных факторов, как NF-κB и HIF-1α (Kawahara et al., 2009; Zhong et al., 2010). Деацетилирование H3K9 под влиянием SIRT6 задействовано в регуляции теломер и

экспрессии генов (Michishita et al., 2008; Zhong et al., 2010). Так, например, контроль дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши зависит от удаления меток H3K56ac и H3K9ac в районе промоторов генов *Oct4*, *Sox2*, и *Nanog* (Etchegaray et al., 2015). Кроме того, SIRT6 способен напрямую деацетилировать ДНК-метилтрансферазу DNMT1, что снижает ее стабильность (Jia et al., 2021; Subramani et al., 2023).

Повышенная экспрессия SIRT6 вызывает дестабилизацию DNMT1 и снижение уровня метилирования промоторов генов *NOTCH1* и *NOTCH2*, что приводит к преимущественной остеогенной дифференцировке МСК жировой ткани (Jia et al., 2021). В культурах клеток мелкоклеточного рака легкого снижение экспрессии SIRT6 приводит к стабилизации DNMT1 и метилированию промотора гена *NOTCH1*, который участвует в онкогенезе и метастазировании (Subramani et al., 2023). Как уже упоминалось ранее, SIRT6 посредством рибозилирования репрессора транскрипции KAP1 задействован в подавлении экспрессии LINE1 и поддержании стабильности генома (Van Meter et al., 2014).

Белок SIRT7 – единственный сиртуин, локализованный в ядрышке, где он играет ключевую роль в формировании транскрипционно неактивного гетерохроматина путем привлечения DNMT1, SIRT1, а также SMARCA5 к повторам рибосомальной ДНК (Ianni et al., 2017; Paredes et al., 2018). Компактное состояние хроматина необходимо для предотвращения гомологичной рекомбинации между повторяющимися последовательностями рДНК, поэтому нарушение функции SIRT7 приводит к формированию активного хроматина, нестабильности области рДНК и генома и ускоренному клеточному старению (Ianni et al., 2017; Paredes et al., 2018). Также SIRT7 вовлечен в регуляцию R-петель – РНК-ДНК комплексов, тоже являющихся потенциальным фактором нестабильности генома (Aguilera, García-Muse, 2012; Song et al., 2017).

Интересно отметить, что на модели дрозофилы было продемонстрировано, что с возрастом область распространения R-петель увеличивается, при этом их количество остается неизменным (Hall, 2023). Дефекты в процессинге R-петель могут приводить к накоплению в цитоплазме гибридов ДНК/РНК, одноцепочечных фрагментов ДНК, что стимулирует иммунный ответ, хроническое воспаление, апоптоз и клеточное старение (Chatzidoukaki et al., 2021; Crossley et al., 2023). Белок SIRT7 деацетилирует и активирует геликазу DDX21, задействованную в разрешении R-петель (Song et al., 2017).

Кроме того, показана роль SIRT7 в деацетилировании модификации гистона H3K18ac, что необходимо для активации репарации двуцепочечных разрывов ДНК (Barber et al., 2012; Lin et al., 2016b; Vazquez et al., 2016). Для SIRT7 было также продемонстрировано прямое взаимодействие с белками гетерохроматина KAP1, HP1 $\alpha$ , HP1 $\gamma$  и компонентами ядерной ламины LBR и LaminB1 в клетках HEK293T (Bi et al., 2020). Снижение уровня SIRT7 в МСК человека приводило к ускоренному старению, дестабилизации гетерохроматина, активации повторенных последовательностей и активации провоспалительного сигнального пути cGAS-STING (Bi et al., 2020).

## Связь сиртуинов с продолжительностью жизни

Впервые возможное влияние сиртуинов на продолжительность жизни было обнаружено в экспериментах с оверэкспрессией Sir2, что приводило к увеличению числа циклов почкования у дрожжей *S. cerevisiae* (Kaerberlein et al., 1999). В исследованиях гомологов Sir2 – белка SIR-2.1 у нематоды *Caenorhabditis elegans*, и dSirt1 у *Drosophila melanogaster* – наблюдалось увеличение продолжительности жизни при их оверэкспрессии (Tissenbaum, Guarente, 2001; Rogina, Helfand, 2004). Вместе с тем оверэкспрессия Sir2 у дрожжей увеличивает репликативный потенциал, но не регулирует продолжительность жизни покоящихся клеток – ключевой параметр в модели хронологического старения *S. cerevisiae* (Fabrizio et al., 2005). А у нематод позитивный эффект сиртуинов зависит от генетического фона и не обнаруживается в некоторых лабораторных линиях (Burnett et al., 2011; Viswanathan, Guarente, 2011; Schmeisser et al., 2013; Zhao et al., 2019).

У дрозофилы влияние оверэкспрессии dSirt1 на продолжительность жизни имеет дозозависимый характер, при этом превышение определенного порога может, напротив, сокращать продолжительность жизни за счет токсичности для некоторых органов (Griswold et al., 2008; Burnett et al., 2011; Whitaker et al., 2013). В частности, продемонстрировано, что индуцируемая тканеспецифичная оверэкспрессия dSirt1 увеличивает медианную продолжительность жизни мух только при активации трансгена в жировой ткани, но не в мышцах (Banerjee et al., 2012). Аналогичным образом увеличение продолжительности жизни мышей на 9–16 % было достигнуто запуском трансгенного SIRT1 специфично в клетках гипоталамуса (Satoh et al., 2013), тогда как в более раннем исследовании оверэкспрессия SIRT1 у мышей не влияла на продолжительность жизни, хотя и снижала вероятность возникновения онкологических заболеваний (Herranz et al., 2010).

Влияние оверэкспрессии сиртуинов на увеличение продолжительности жизни было также показано для сиртуинов дрозофилы dSirt4 и dSirt6 (Wood et al., 2018; Taylor et al., 2022). В недавнем исследовании замедление старения и увеличение максимальной продолжительности жизни под влиянием SIRT6 выявлены у мышей (Roichman et al., 2021). Эффект SIRT6 на продолжительность жизни связывают с его участием в репарации ДНК (Tian et al., 2019). Более того, активность видоспецифичных вариантов SIRT6 в отношении репарации коррелирует с максимальной продолжительностью жизни разных видов грызунов (Tian et al., 2019).

Противоречивые результаты получены для белка SIRT7. В частности, недавно продемонстрировано, что самцы мышей с нокаутом SIRT7 обладают повышенной медианной продолжительностью жизни и демонстрируют более медленное снижение физиологических параметров (Mizumoto et al., 2022). Такой результат контрастирует с наблюдениями из более ранних работ, где нокаут SIRT7 значительно сокращал продолжительность жизни. Важно отметить, что ни в одном из экспериментов по оценке влияния сиртуинов на продолжительность жизни организма не обнаружено экстремального увеличения про-



должительности жизни, а наряду со сложностью в подборе корректных экспериментальных – максимально близких генетически – контролей это приводит к неоднозначным выводам о роли сиртуинов в качестве автономных факторов долголетия (Brenner, 2022).

Данные о возможной связи сиртуинов и продолжительности жизни человека в некоторой мере подтверждаются результатами популяционной генетики. Например, исследование голландских долгожителей продемонстрировало, что носители однонуклеотидного полиморфизма rs12778366 имеют лучшую толерантность к глюкозе и сниженный риск смерти (Figarska et al., 2013). В исследовании американцев европейского происхождения и популяций Джорджии и Луизианы была выявлена ассоциация полиморфизма rs7896005 гена *SIRT1* с продолжительностью жизни и длиной теломер в лимфоцитах (Kim et al., 2012). Помимо этого, полиморфизмы *SIRT1* rs3758391 и rs4746720 были ассоциированы со здоровым долголетием у китайцев хань (Zhang W.-G. et al., 2010). Напротив, в аналогичном исследовании другой популяции китайских долгожителей связь указанных локусов с долголетием не найдена (Lin et al., 2016a). Также в ряде работ не выявлены связи генетических вариантов гена *SIRT1* с долголетием (Flachsbart et al., 2006; Willcox et al., 2008; Soerensen et al., 2013).

В пятом интроне гена *SIRT3* была идентифицирована вариабельность числа tandemных повторов (VNTR), некоторые варианты ее приобретают свойства аллель-специфичного энхансера, причем аллель без энхансерной активности практически не встречался среди мужчин старше 90 лет, при этом у женщин подобной корреляции не наблюдалось (Bellizzi et al., 2005). Полиморфизмы гена *SIRT3* rs11555236 и rs4980329 были ассоциированы с продолжительностью жизни женщин в популяции итальянцев (Albani et al., 2014).

Однонуклеотидный полиморфизм rs107251 гена *SIRT6* был ассоциирован с более чем пятилетним увеличением продолжительности жизни у пожилых людей в США, а полиморфизм rs117385980 был связан с долголетием у финнов (TenNapel et al., 2014; Hirvonen et al., 2017). Аллельный вариант *SIRT6* с заменами N308K/A313S, обладающий сильной АДФ-рибозилтрансферазной активностью, обогащен в группе долгожителей среди евреев ашке-нази (Simon et al., 2022).

### Роль сиртуинов в хроническом воспалении

Помимо отдельных свидетельств о возможной функциональной связи сиртуинов и продолжительности жизни, для сиртуинов показана значимая роль в развитии возраст-ассоциированных заболеваний, в частности связанных с хроническим воспалением. Белки *SIRT1*, *SIRT2* и *SIRT6* противодействуют воспалительной реакции путем подавления сигнального пути NF-κB (Vazquez et al., 2021). Ключевой элемент этого пути, транскрипционный фактор NF-κB, контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, состоит из пяти субъединиц: p50, p52, p65 (RelA), RelB и c-Rel (Vazquez et al., 2021).

Существует несколько механизмов подавления активности сигнального пути NF-κB белками-сиртуинами. Так, сиртуины *SIRT1* и *SIRT2* могут деацетилировать субъеди-

ницу p65 по остатку лизина 310, что напрямую ингибирует активность NF-κB, а также препятствует метилированию соседних остатков лизина (K314 и K315), что способствует убиквитинированию и деградации p65 (Rothgiesser et al., 2010). Белок *SIRT6* взаимодействует с субъединицей p65 и деацетирует лизин 9 гистона H3 (H3K9) в промоторах генов-мишеней NF-κB, уменьшая тем самым воспаление (Kawahara et al., 2009). *SIRT1* способен деацетилировать и подавлять активность транскрипционных коактиваторов NF-κB, таких как PARP-1 и гистон-ацетил-трансфераза p300 (Rajamohan et al., 2009).

Сиртуины оказывают влияние на сигнальный путь TGF-β, который играет ключевую роль в тубулоинтерстициальном фиброзе почек, стимулируя выработку фактора роста соединительной ткани (CTGF) (Isaka, 2018). Оверэкспрессия *SIRT1* подавляет индуцированный TGF-β1 клеточный апоптоз и фиброз и снижает экспрессию CTGF посредством стимуляции TGF-β1 в почках мышей с односторонней обструкцией мочеточника (Ren et al., 2015). Также *SIRT1* может ослаблять TGF-β-зависимую передачу сигналов за счет деацетилирования молекул SMAD3 и SMAD4, что ингибирует выработку коллагена, фибронектина и металлопротеазы MMP7 (Zhang Y. et al., 2017).

Влияние сиртуинов на активность транскрипционных факторов семейства SMAD важно и при сердечном фиброзе. Так, при систематическом нокауте гена *Sirt6* мыши нарушается ингибирование сигнального пути TGF-β/Smad3, что вызывает сердечный фиброз (Maity et al., 2020). Кроме того, *SIRT1* оказывает кардиопротекторное действие, деацетилируя SMAD2/3 и снижая активность сигнального пути TGF-β в сердечных фибробластах мыши (Buguc-Twum et al., 2018).

Белок *SIRT3* обладает антифибротическими свойствами за счет ослабления TGF-β-зависимой передачи сигналов, а подавление активности *SIRT3* может приводить к трансформации мышечных и человеческих сердечных фибробластов в миофибробласты – клетки, способные синтезировать внеклеточный матрикс (Sundaresan et al., 2016). Ожидается, что активаторы белков-сиртуинов противодействуют фиброзу. Так, хонокиол – активатор белка *SIRT3* – противодействует фиброзу почек у мышей с односторонней обструкцией мочеточника (Quan et al., 2020). Аналогичным образом активация как *SIRT1*, так и *SIRT3* под действием ресвератрола ослабляет сердечный фиброз у мышей ингибированием пути TGF-β/Smad3 (Liu et al., 2019).

Физиологический эффект сиртуинов при воспалении напрямую связан с действием на иммунные клетки. Например, *SIRT1* участвует в передаче воспалительных сигналов в дендритных клетках мыши, модулируя баланс провоспалительных Т-хелперных клеток типа 1 и противовоспалительных регуляторных Т-клеток Foxp3(+), а дефицит *SIRT6* в макрофагах приводит к воспалению с усилением ацетилирования и большей стабильностью FoxO1 (Woo et al., 2016, 2018). Белок *SIRT4* также оказывает противовоспалительное действие, поскольку его дефицит может усиливать воспаление, способствовать инфильтрации макрофагов и развитию клеточной гепатокарциномы у человека (Li Z. et al., 2019). В клетках печени мышей белок *SIRT3* ингибирует выработку провоспалительных

хемокинов и некоторых профибротических факторов (LoBianco et al., 2020).

Как и в случае хронического воспаления, при нейровоспалении сиртуины оказывают в основном противовоспалительное действие, однако описаны и исключения. Например, ингибирование белка SIRT2 у мышей с ускоренным старением клеток снижало нейровоспаление, о чем свидетельствуют сниженные уровни глиального фибриллярного кислого белка GFAP, IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ , и повышенные уровни субъединиц глутаматных рецепторов GluN2A, GluN2B и GluA1, однако ингибирование SIRT2 не могло обратить вспять снижение когнитивных функций или нейровоспаление (Diaz-Perdigon et al., 2020). В этом случае SIRT2 проявлял временный провоспалительный эффект.

Нейродегенеративные заболевания коррелируют со старением, как и изменение экспрессии сиртуинов (Julien et al., 2009; Jiao, Gong, 2020). Интересно отметить, что возрастные изменения уровней сывороточных сиртуинов могут быть использованы в качестве диагностического инструмента (Kumar et al., 2014). Так, например, экспрессия SIRT1 и SIRT6 снижена на фоне нейродегенеративных заболеваний (Jiao, Gong, 2020; Pukhalskaia et al., 2020) и, напротив, высокие уровни SIRT2 обнаруживаются при болезнях Альцгеймера и Паркинсона, что позволяет предположить, что SIRT2 может способствовать нейродегенерации (Sacabelos et al., 2019).

## Заключение

С момента открытия белка Sir2 у дрожжей *S. cerevisiae* внимание к сиртуинам было сосредоточено на их функциях в регуляции процессов, ассоциированных со старением (Пухальская и др., 2022). Исследования последних лет подтверждают ключевую роль сиртуинов в патогенезе возрастных заболеваний. Это делает белки семейства SIRT многообещающими мишенями для исследований в области терапии возраст-зависимых заболеваний. Действительно, на сегодняшний день проводится множество клинических испытаний, направленных на фармакологическую модуляцию активности сиртуинов с целью терапии метаболических, иммунных и неврологических нарушений, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний (Curgu et al., 2021). К сожалению, указанные клинические испытания далеко не всегда демонстрируют позитивные результаты, что, по всей вероятности, может быть в том числе связано с крайне многогранными функциями сиртуинов. Однако динамичное накопление детальной информации об их функциях позволяет надеяться на скорое внедрение таких прогрессивных способов терапии возраст-зависимых заболеваний.

## Список литературы / References

Пухальская А.Э., Кветной И.М., Линькова Н.С., Дятлова А.С., Гупот Е.О., Козлов К.Л., Пальцев М.А. Сиртуины и старение. *Усп. физиол. наук.* 2022;53(1):16-27. DOI 10.31857/S0301179821040056  
[Pukhalskaia A.E., Kvetnoy I.M., Linkova N.S., Diatlova A.S., Gutop E.O., Kozlov K.L., Paltsev M.A. Sirtuins and aging. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk = Progress in Physiological Science.* 2022; 53(1):16-27. DOI 10.31857/S0301179821040056 (in Russian)]

Aguilera A., Garcia-Muse T. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol. Cell.* 2012;46(2):115-124. DOI 10.1016/j.molcel.2012.04.009  
Albani D., Ateri E., Mazzuco S., Ghilardi A., Rodilossi S., Biella G., Ongaro F., Antuono P., Boldrini P., Di Giorgi E., Frigato A., Durante E., Caberlotto L., Zanardo A., Siculi M., Gallucci M., Forloni G. Modulation of human longevity by SIRT3 single nucleotide polymorphisms in the prospective study "Treviso Longeva (TRELONG)." *Age (Dordr.)*. 2014;36(1):469-478. DOI 10.1007/s11357-013-9559-2  
Bai W., Zhang X. Nucleus or cytoplasm? The mysterious case of SIRT1's subcellular localization. *Cell Cycle.* 2016;15(24):3337-3338. DOI 10.1080/15384101.2016.1237170  
Banerjee K.Kr., Ayyub C., Ali S.Z., Mandot V., Prasad N.G., Kothur-Seetharam U. dSir2 in the adult fat body, but not in muscles, regulates life span in a diet-dependent manner. *Cell Rep.* 2012;2(6):1485-1491. DOI 10.1016/j.celrep.2012.11.013  
Barber M.F., Michishita-Kioi E., Xi Y., Tasselli L., Kioi M., Moqtaderi Z., Tennen R.I., Paredes S., Young N.L., Chen K., Struhl K., Garcia B.A., Gozani O., Li W., Chua K.F. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature.* 2012;487(7405):114-118. DOI 10.1038/nature11043  
Bellizzi D., Rose G., Cavalcante P., Covello G., Dato S., De Rango F., Greco V., Maggiolini M., Feraco E., Mari V., Franceschi C., Passarino G., De Benedictis G. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics.* 2005;85(2):258-263. DOI 10.1016/j.ygeno.2004.11.003  
Bergmann L., Lang A., Bross C., Altinluk-Hambüchen S., Fey I., Overbeck N., Stefanski A., Wiek C., Kefalas A., Verhülsdonk P., Mielke C., Sohn D., Stühler K., Hanenberg H., Jänicke R.U., Scheller J., Reichert A.S., Ahmadian M.R., Piekorz R.P. Subcellular localization and mitotic interactome analyses identify SIRT4 as a centrosomally localized and microtubule associated protein. *Cells.* 2020; 9(9):1950. DOI 10.3390/cells9091950  
Bi S., Liu Z., Wu Z., Wang Z., Liu X., Wang S., Ren J., Yao Y., Zhang W., Song M., Liu G.-H., Qu J. SIRT7 antagonizes human stem cell aging as a heterochromatin stabilizer. *Protein Cell.* 2020;11(7):483-504. DOI 10.1007/s13238-020-00728-4  
Bosch-Presegué L., Raurell-Vila H., Marazuela-Duque A., Kane-Goldsmith N., Valle A., Oliver J., Serrano L., Vaquero A. Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection. *Mol. Cell.* 2011;42(2):210-223. DOI 10.1016/j.molcel.2011.02.034  
Brenner C. Sirtuins are not conserved longevity genes. *Life Metab.* 2022;1(2):122-133. DOI 10.1093/lifemeta/loac025  
Bresque M., Cal K., Pérez-Torrado V., Colman L., Rodríguez-Duarte J., Vilaseca C., Santos L., Garat M.P., Ruiz S., Evans F., Dapuerto R., Contreras P., Calliari A., Escande C. SIRT6 stabilization and cytoplasmic localization in macrophages regulates acute and chronic inflammation in mice. *J. Biol. Chem.* 2022;298(3):101711. DOI 10.1016/j.jbc.2022.101711  
Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., Hu L.S., Cheng H.-L., Jedrychowski M.P., Gygi S.P., Sinclair D.A., Alt F.W., Greenberg M.E. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004;303(5666):2011-2015. DOI 10.1126/science.1094637  
Bryk M., Banerjee M., Murphy M., Knudsen K.E., Garfinkel D.J., Curcio M.J. Transcriptional silencing of Ty1 elements in the *RDNI* locus of yeast. *Genes Dev.* 1997;11(2):255-269. DOI 10.1101/gad.11.2.255  
Bugyei-Twum A., Ford C., Civitarese R., Seegobin J., Advani S.L., Desjardins J.-F., Kabir G., Zhang Y., Mitchell M., Switzer J., Thai K., Shen V., Abadeh A., Singh K.K., Billia F., Advani A., Gilbert R.E., Connelly K.A. Sirtuin 1 activation attenuates cardiac fibrosis in a rodent pressure overload model by modifying Smad2/3 transactiva-

- tion. *Cardiovasc. Res.* 2018;114(12):1629-1641. DOI 10.1093/cvr/cvy131
- Burnett C., Valentini S., Cabreiro F., Goss M., Somogyvári M., Piper M.D., Hoddinott M., Sutphin G.L., Leko V., McElwee J.J., Vazquez-Manrique R.P., Orfila A.-M., Ackerman D., Au C., Vinti G., Riesen M., Howard K., Neri C., Bedalov A., Kaerberlein M., Söti C., Partridge L., Gems D. Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature.* 2011;477(7365):482-485. DOI 10.1038/nature10296
- Cacabelos R., Carril J., Cacabelos N., Kazantsev A., Vostrov A., Corzo L., Cacabelos P., Goldgaber D. Sirtuins in Alzheimer's disease: SIRT2-related genotypes and implications for pharmacogenetics. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(5):1249. DOI 10.3390/ijms20051249
- Chatzidoukaki O., Stratigi K., Goulielmaki E., Niotis G., Akalestou-Clocher A., Gkirtzimanaki K., Zafeiropoulos A., Altmüller J., Topalis P., Garinis G.A. R-loops trigger the release of cytoplasmic ssDNAs leading to chronic inflammation upon DNA damage. *Sci. Adv.* 2021;7(47):eabj5769. DOI 10.1126/sciadv.abj5769
- Chen S., Seiler J., Santiago-Reichel M., Felbel K., Grummt I., Voit R. Repression of RNA polymerase I upon stress is caused by inhibition of RNA-dependent deacetylation of PAF53 by SIRT7. *Mol. Cell.* 2013;52(3):303-313. DOI 10.1016/j.molcel.2013.10.010
- Crossley M.P., Song C., Bocek M.J., Choi J.-H., Kousorous J., Sathirachinda A., Lin C., Brickner J.R., Bai G., Lans H., Vermeulen W., Abu-Remaileh M., Cimprich K.A. R-loop-derived cytoplasmic RNA-DNA hybrids activate an immune response. *Nature.* 2023;613(7942):187-194. DOI 10.1038/s41586-022-05545-9
- Curry A.M., White D.S., Donu D., Cen Y. Human sirtuin regulators: The "success" stories. *Front. Physiol.* 2021;12:752117. DOI 10.3389/fphys.2021.752117
- Diao Z., Ji Q., Wu Z., Zhang W., Cai Y., Wang Z., Hu J., Liu Z., Wang Q., Bi S., Huang D., Ji Z., Liu G.-H., Wang S., Song M., Qu J. SIRT3 consolidates heterochromatin and counteracts senescence. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(8):4203-4219. DOI 10.1093/nar/gkab161
- Diaz-Perdigon T., Belloch F.B., Ricobaraza A., Elboray E.E., Suzuki T., Tordera R.M., Puerta E. Early sirtuin 2 inhibition prevents age-related cognitive decline in a senescence-accelerated mouse model. *Neuropsychopharmacology.* 2020;45(2):347-357. DOI 10.1038/s41386-019-0503-8
- Du J., Zhou Y., Su X., Yu J.J., Khan S., Jiang H., Kim J., Woo J., Kim J.H., Choi B.H., He B., Chen W., Zhang S., Cerione R.A., Auwerx J., Hao Q., Lin H. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science.* 2011;334(6057):806-809. DOI 10.1126/science.1207861
- Du Y., Hu H., Hua C., Du K., Wei T. Tissue distribution, subcellular localization, and enzymatic activity analysis of human SIRT5 isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;503(2):763-769. DOI 10.1016/j.bbrc.2018.06.073
- El Ramy R., Magroun N., Messadecq N., Gauthier L.R., Bousin F.D., Kolthur-Seetharam U., Schreiber V., McBurney M.W., Sassone-Corsi P., Dantzer F. Functional interplay between Parp-1 and SirT1 in genome integrity and chromatin-based processes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66(19):3219-3234. DOI 10.1007/s00018-009-0105-4
- Eldridge M.J.G., Pereira J.M., Impens F., Hamon M.A. Active nuclear import of the deacetylase Sirtuin-2 is controlled by its C-terminus and imports. *Sci. Rep.* 2020;10(1):2034. DOI 10.1038/s41598-020-58397-6
- Eskandarian H.A., Impens F., Nahori M.-A., Soubigou G., Coppée J.-Y., Cossart P., Hamon M.A. A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science.* 2013;341(6145):1238858. DOI 10.1126/science.1238858
- Etcheagaray J.-P., Chavez L., Huang Y., Ross K.N., Choi J., Martinez-Pastor B., Walsh R.M., Sommer C.A., Lienhard M., Gladden A., Kugel S., Silberman D.M., Ramaswamy S., Mostoslavsky G., Hochedlinger K., Goren A., Rao A., Mostoslavsky R. The histone deacetylase SIRT6 controls embryonic stem cell fate via TET-mediated production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Cell Biol.* 2015;17(5):545-557. DOI 10.1038/ncb3147
- Fabrizio P., Gattazzo C., Battistella L., Wei M., Cheng C., McGrew K., Longo V.D. Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell.* 2005;123(4):655-667. DOI 10.1016/j.cell.2005.08.042
- Fahie K., Hu P., Swatkoski S., Cotter R.J., Zhang Y., Wolberger C. Side chain specificity of ADP-ribosylation by a sirtuin. *FEBS J.* 2009;276(23):7159-7176. DOI 10.1111/j.1742-4658.2009.07427.x
- Figarska S.M., Vonk J.M., Boezen H.M. SIRT1 polymorphism, long-term survival and glucose tolerance in the general population. *PLoS One.* 2013;8(3):e58636. DOI 10.1371/journal.pone.0058636
- Finkel T., Deng C.-X., Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature.* 2009;460(7255):587-591. DOI 10.1038/nature08197
- Flachsbar F., Croucher P.J.P., Nikolaus S., Hampe J., Cordes C., Schreiber S., Nebel A. Sirtuin 1 (SIRT1) sequence variation is not associated with exceptional human longevity. *Exp. Gerontol.* 2006;41(1):98-102. DOI 10.1016/j.exger.2005.09.008
- Ford E., Voit R., Liszt G., Magin C., Grummt I., Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* 2006;20(9):1075-1080. DOI 10.1101/gad.1399706
- Frye R.A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;260(1):273-279. DOI 10.1006/bbrc.1999.0897
- Frye R.A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;273(2):793-798. DOI 10.1006/bbrc.2000.3000
- Gottschling D.E., Aparicio O.M., Billington B.L., Zakian V.A. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell.* 1990;63(4):751-762. DOI 10.1016/0092-8674(90)90141-Z
- Gray S.G., Ekström T.J. The human histone deacetylase family. *Exp. Cell Res.* 2001;262(2):75-83. DOI 10.1006/excr.2000.5080
- Griswold A.J., Chang K.T., Runko A.P., Knight M.A., Min K.-T. Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(25):8673-8678. DOI 10.1073/pnas.0803837105
- Haigis M.C., Mostoslavsky R., Haigis K.M., Fahie K., Christodoulou D.C., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Karow M., Blander G., Wolberger C., Prolla T.A., Weindrich R., Alt F.W., Guarente L. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic  $\beta$  cells. *Cell.* 2006;126(5):941-954. DOI 10.1016/j.cell.2006.06.057
- Hall H. R-loops in neuronal aging. *Aging.* 2023;15(17):8535-8536. DOI 10.18632/aging.205070
- Heo J., Lim J., Lee S., Jeong J., Kang H., Kim Y., Kang J.W., Yu H.Y., Jeong E.M., Kim K., Kucia M., Waigel S.J., Zacharias W., Chen Y., Kim I.-G., Ratajczak M.Z., Shin D.-M. Sirt1 regulates DNA methylation and differentiation potential of embryonic stem cells by antagonizing Dnmt3l. *Cell Rep.* 2017;18(8):1930-1945. DOI 10.1016/j.celrep.2017.01.074
- Herranz D., Muñoz-Martin M., Cañamero M., Mulero F., Martinez-Pastor B., Fernandez-Capetillo O., Serrano M. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.* 2010;1(1):3. DOI 10.1038/ncomms1001
- Hirvonen K., Laivuori H., Lahti J., Strandberg T., Eriksson J.G., Hackman P. SIRT6 polymorphism rs117385980 is associated with longevity and healthy aging in Finnish men. *BMC Med. Genet.* 2017;18(1):41. DOI 10.1186/s12881-017-0401-z
- Hou T., Tian Y., Cao Z., Zhang J., Feng T., Tao W., Sun H., Wen H., Lu Xiaopeng, Zhu Q., Li M., Lu X., Liu B., Zhao Y., Yang Y., Zhu W.-G. Cytoplasmic SIRT6-mediated ACSL5 deacetylation impedes nonalcoholic fatty liver disease by facilitating hepatic fatty acid oxidation. *Mol. Cell.* 2022;82(21):4099-4115.e9. DOI 10.1016/j.molcel.2022.09.018

- Ianni A., Hoelper S., Krueger M., Braun T., Bober E. Sirt7 stabilizes rDNA heterochromatin through recruitment of DNMT1 and Sirt1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017;492(3):434-440. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.08.081
- Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 2000;403(6771):795-800. DOI 10.1038/35001622
- Imaoka N., Hiratsuka M., Osaki M., Kamitani H., Kambe A., Fukuoka J., Kurimoto M., Nagai S., Okada F., Watanabe T., Ohama E., Kato S., Oshimura M. Prognostic significance of sirtuin 2 protein nuclear localization in glioma: an immunohistochemical study. *Oncol. Rep.* 2012;28(3):923-230. DOI 10.3892/or.2012.1872
- Isaka Y. Targeting TGF- $\beta$  signaling in kidney fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(9):2532. DOI 10.3390/ijms19092532
- Ivy J.M., Klar A.J., Hicks J.B. Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1986;6(2): 688-702. DOI 10.1128/MCB.6.2.688
- Jeong J., Juhn K., Lee H., Kim S.-H., Min B.-H., Lee K.-M., Cho M.-H., Park G.-H., Lee K.-H. SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp. Mol. Med.* 2007;39(1):8-13. DOI 10.1038/emmm.2007.2
- Jia B., Chen J., Wang Q., Sun X., Han J., Guastaldi F., Xiang S., Ye Q., He Y. SIRT6 promotes osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells through antagonizing DNMT1. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:648627. DOI 10.3389/fcell.2021.648627
- Jiang H., Khan S., Wang Y., Charron G., He B., Sebastian C., Du J., Kim R., Ge E., Mostoslavsky R., Hang H.C., Hao Q., Lin H. SIRT6 regulates TNF- $\alpha$  secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature.* 2013;496(7443):110-113. DOI 10.1038/nature12038
- Jiao F., Gong Z. The beneficial roles of SIRT1 in neuroinflammation-related diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020;2020:6782872. DOI 10.1155/2020/6782872
- Julien C., Tremblay C., Émond V., Lebbadi M., Salem N., Bennett D.A., Calon F. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2009;68(1):48-58. DOI 10.1097/NEN.0b013e3181922348
- Kaeberlein M., McVey M., Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 1999;13(19):2570-2580. DOI 10.1101/gad.13.19.2570
- Kawahara T.L.A., Michishita E., Adler A.S., Damian M., Berber E., Lin M., McCord R.A., Ongaiqui K.C.L., Boxer L.D., Chang H.Y., Chua K.F. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF- $\kappa$ B-dependent gene expression and organismal life span. *Cell.* 2009; 136(1):62-74. DOI 10.1016/j.cell.2008.10.052
- Kim S., Bi X., Czarny-Ratajczak M., Dai J., Welsh D.A., Myers L., Welsch M.A., Cherry K.E., Arnold J., Poon L.W., Jazwinski S.M. Telomere maintenance genes *SIRT1* and *XRCC6* impact age-related decline in telomere length but only *SIRT1* is associated with human longevity. *Biogerontology.* 2012;13(2):119-131. DOI 10.1007/s10522-011-9360-5
- Kiran S., Chatterjee N., Singh S., Kaul S.C., Wadhwa R., Ramakrishna G. Intracellular distribution of human SIRT7 and mapping of the nuclear/nucleolar localization signal. *FEBS J.* 2013;280(14):3451-3466. DOI 10.1111/febs.12346
- Kumar R., Mohan N., Upadhyay A.D., Singh A.P., Sahu V., Dwivedi S., Dey A.B., Dey S. Identification of serum sirtuins as novel noninvasive protein markers for frailty. *Aging Cell.* 2014;13(6):975-980. DOI 10.1111/acel.12260
- Laurent G., German N.J., Saha A.K., de Boer V.C.J., Davies M., Koves T.R., Dephore N., Fischer F., Boanca G., Vaitheesvaran B., Lovitch S.B., Sharpe A.H., Kurland I.J., Steegborn C., Gygi S.P., Muoio D.M., Ruderman N.B., Haigis M.C. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol. Cell.* 2013;50(5):686-698. DOI 10.1016/j.molcel.2013.05.012
- Lee N., Kim D.-K., Kim E.-S., Park S.J., Kwon J.-H., Shin J., Park S.-M., Moon Y.H., Wang H.J., Gho Y.S., Choi K.Y. Comparative interactomes of SIRT6 and SIRT7: Implication of functional links to aging. *Proteomics.* 2014;14(13-14):1610-1622. DOI 10.1002/pmic.201400001
- Leng S., Huang W., Chen Y., Yang Ya., Feng D., Liu W., Gao T., Ren Y., Huo M., Zhang J., Yang Yu., Wang Y. SIRT1 coordinates with the CRL4B complex to regulate pancreatic cancer stem cells to promote tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2021;28(12):3329-3343. DOI 10.1038/s41418-021-00821-z
- Li T., Garcia-Gomez A., Morante-Palacios O., Ciudad L., Özkaramet S., Van Dijck E., Rodríguez-Ubreva J., Vaquero A., Ballestar E. SIRT1/2 orchestrate acquisition of DNA methylation and loss of histone H3 activating marks to prevent premature activation of inflammatory genes in macrophages. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(2): 665-681. DOI 10.1093/nar/gkz1127
- Li Z., Li H., Zhao Z.-B., Zhu W., Feng P.-P., Zhu X.-W., Gong J.-P. SIRT4 silencing in tumor-associated macrophages promotes HCC development via PPAR $\delta$  signalling-mediated alternative activation of macrophages. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019;38(1):469. DOI 10.1186/s13046-019-1456-9
- Lin R., Yan D., Zhang Y., Liao X., Gong G., Hu J., Fu Y., Cai W. Common variants in *SIRT1* and human longevity in a Chinese population. *BMC Med. Genet.* 2016a;17(1):31. DOI 10.1186/s12881-016-0293-3
- Lin R., Zhang Y., Yan D., Liao X., Gong G., Hu J., Fu Y., Cai W. Lack of association between polymorphisms in the *SIRT6* gene and longevity in a Chinese population. *Mol. Cell. Probes.* 2016b;30(2): 79-82. DOI 10.1016/j.mcp.2016.01.005
- Liu Z.-H., Zhang Ya., Wang X., Fan X.-F., Zhang Yu., Li X., Gong Y.-Sh., Han L.-P. SIRT1 activation attenuates cardiac fibrosis by endothelial-to-mesenchymal transition. *Biomed. Pharmacother.* 2019;118:109227. DOI 10.1016/j.biopha.2019.109227
- LoBianco F.V., Krager K.J., Carter G.S., Alam S., Yuan Y., Lavoie E.G., Dranoff J.A., Aykin-Burns N. The role of Sirtuin 3 in radiation-induced long-term persistent liver injury. *Antioxidants.* 2020;9(5): 409. DOI 10.3390/antiox9050409
- Lombard D.B., Alt F.W., Cheng H.-L., Bunkenborg J., Streeper R.S., Mostoslavsky R., Kim J., Yancopoulos G., Valenzuela D., Murphy A., Yang Y., Chen Y., Hirsche M.D., Bronson R.T., Haigis M., Guarente L.P., Farese R.V., Weissman S., Verdin E., Schwer B. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(24):8807-8814. DOI 10.1128/MCB.01636-07
- Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., Gu W. Negative control of p53 by Sir2a promotes cell survival under stress. *Cell.* 2001;107(2):137-148. DOI 10.1016/S0092-8674(01) 00524-4
- Maity S., Muhamed J., Sarikhani M., Kumar S., Ahamed F., Spurthi K.M., Ravi V., Jain A., Khan D., Arathi B.P., Desingu P.A., Sundaresan N.R. Sirtuin 6 deficiency transcriptionally up-regulates TGF- $\beta$  signaling and induces fibrosis in mice. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(2): 415-434. DOI 10.1074/jbc.RA118.007212
- Mao Z., Hine C., Tian X., Van Meter M., Au M., Vaidya A., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science.* 2011;332(6036):1443-1446. DOI 10.1126/science.1202723
- Mathias R.A., Greco T.M., Oberstein A., Budayeva H.G., Chakrabarti R., Rowland E.A., Kang Y., Shenk T., Cristea I.M. Sirtuin 4 is a lipamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell.* 2014;159(7):1615-1625. DOI 10.1016/j.cell.2014.11.046
- Michishita E., Park J.Y., Burneskis J.M., Barrett J.C., Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell.* 2005;16(10): 4623-4635. DOI 10.1091/mbc.e05-01-0033
- Michishita E., McCord R.A., Berber E., Kioi M., Padilla-Nash H., Damian M., Cheung P., Kusumoto R., Kawahara T.L.A., Barrett J.C., Chang H.Y., Bohr V.A., Ried T., Gozani O., Chua K.F. SIRT6 is a

- histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*. 2008;452(7186):492-496. DOI 10.1038/nature06736
- Mizumoto T., Yoshizawa T., Sato Y., Ito T., Tsuyama T., Satoh A., Araki S., Tsujita K., Tamura M., Oike Y., Yamagata K. SIRT7 deficiency protects against aging-associated glucose intolerance and extends lifespan in male mice. *Cells*. 2022;11(22):3609. DOI 10.3390/cells11223609
- Moniot S., Schutkowski M., Steegborn C. Crystal structure analysis of human Sirt2 and its ADP-ribose complex. *J. Struct. Biol.* 2013; 182(2):136-143. DOI 10.1016/j.jsb.2013.02.012
- North B.J., Verdin E. Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis. *PLoS One*. 2007;2(8):e784. DOI 10.1371/journal.pone.0000784
- North B.J., Marshall B.L., Borra M.T., Denu J.M., Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell*. 2003;11(2):437-444. DOI 10.1016/S1097-2765(03)00038-8
- Ong A.L.C., Ramasamy T.S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming. *Ageing Res. Rev.* 2018; 43:64-80. DOI 10.1016/j.arr.2018.02.004
- Palomer X., Román-Azcona M.S., Pizarro-Delgado J., Planavila A., Villarroya F., Valenzuela-Alcaraz B., Crispi F., Sepúlveda-Martínez Á., Miguel-Escalada I., Ferrer J., Nistal J.F., García R., Davidson M.M., Barroso E., Vázquez-Carrera M. SIRT3-mediated inhibition of FOS through histone H3 deacetylation prevents cardiac fibrosis and inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020;5(1):14. DOI 10.1038/s41392-020-0114-1
- Paredes S., Angulo-Ibanez M., Tasselli L., Carlson S.M., Zheng W., Li T.-M., Chua K.F. The epigenetic regulator SIRT7 guards against mammalian cellular senescence induced by ribosomal DNA instability. *J. Biol. Chem.* 2018;293(28):11242-11250. DOI 10.1074/jbc.AC118.003325
- Peng L., Yuan Z., Ling H., Fukasawa K., Robertson K., Olashaw N., Koomen J., Chen J., Lane W.S., Seto E. SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities. *Mol. Cell Biol.* 2011;31(23):4720-4734. DOI 10.1128/MCB.06147-11
- Pereira J.M., Chevalier C., Chaze T., Gianetto Q., Impens F., Matondo M., Cossart P., Hamon M.A. Infection reveals a modification of SIRT2 critical for chromatin association. *Cell Rep.* 2018;23(4): 1124-1137. DOI 10.1016/j.celrep.2018.03.116
- Piracha Z.Z., Saeed U., Kim J., Kwon H., Chwae Y.-J., Lee H.W., Lim J.H., Park S., Shin H.-J., Kim K. An alternatively spliced Sirtuin 2 isoform 5 inhibits Hepatitis B virus replication from cccDNA by repressing epigenetic modifications made by histone lysine methyltransferases. *J. Virol.* 2020;94(16):e00926-20. DOI 10.1128/JVI.00926-20
- Pruitt K.D., Harrow J., Harte R.A., Wallin C., Diekhans M., Maglott D.R., Searle S., ... Wu W., Birney E., Haussler D., Hubbard T., Ostell J., Durbin R., Lipman D. The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes. *Genome Res.* 2009;19(7):1316-1323. DOI 10.1101/gr.080531.108
- Pukhalskaia A.E., Dyatlova A.S., Linkova N.S., Kozlov K.L., Kvetnaia T.V., Koroleva M.V., Kvetnoy I.M. Sirtuins as possible predictors of aging and Alzheimer's disease development: verification in the hippocampus and saliva. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020;169(6):821-824. DOI 10.1007/s10517-020-04986-4
- Quan Y., Park W., Jin J., Kim W., Park S.K., Kang K.P. Sirtuin 3 activation by honokiol decreases unilateral ureteral obstruction-induced renal inflammation and fibrosis via regulation of mitochondrial dynamics and the renal NF- $\kappa$ B-TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(2):402. DOI 10.3390/ijms21020402
- Rack J.G.M., VanLinden M.R., Lutter T., Aasland R., Ziegler M. Constitutive nuclear localization of an alternatively spliced Sirtuin-2 isoform. *J. Mol. Biol.* 2014;426(8):1677-1691. DOI 10.1016/j.jmb.2013.10.027
- Rajamohan S.B., Pillai V.B., Gupta M., Sundaresan N.R., Birukov K.G., Samant S., Hottiger M.O., Gupta M.P. SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol. Cell Biol.* 2009;29(15):4116-4129. DOI 10.1128/MCB.00121-09
- Ramadani-Muja J., Gottschalk B., Pfeil K., Burgstaller S., Rauter T., Bischof H., Waldeck-Weiermair M., Bugger H., Graier W.F., Malli R. Visualization of Sirtuin 4 distribution between mitochondria and the nucleus, based on bimolecular fluorescence self-complementation. *Cells*. 2019;8(12):1583. DOI 10.3390/cells8121583
- Ren Y., Du C., Yan L., Wei J., Wu H., Shi Y., Duan H. CTGF siRNA ameliorates tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in obstructed mouse kidneys in a Sirt1-independent manner. *Drug Des. Devel. Ther.* 2015;9:4155-4171. DOI 10.2147/DDDT.S86748
- Rogina B., Helfand S.L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004;101(45):15998-16003. DOI 10.1073/pnas.040418410
- Roichman A., Elhanati S., Aon M.A., Abramovich I., Di Francesco A., Shahar Y., Avivi M.Y., Shurgi M., Rubinstein A., Wiesner Y., Shuchami A., Petrover Z., Lebenthal-Loinger I., Yaron O., Lyashkov A., Ubaida-Mohien C., Kanfi Y., Lerrer B., Fernández-Marcos P.J., Serrano M., Gottlieb E., de Cabo R., Cohen H.Y. Restoration of energy homeostasis by SIRT6 extends healthy lifespan. *Nat. Commun.* 2021;12(1):3208. DOI 10.1038/s41467-021-23545-7
- Rothgiesser K.M., Erener S., Waibel S., Lüscher B., Hottiger M.O. SIRT2 regulates NF- $\kappa$ B-dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J. Cell Sci.* 2010;123(24):4251-4258. DOI 10.1242/jcs.073783
- Satoh A., Brace C.S., Rensing N., Cliften P., Wozniak D.F., Herzog E.D., Yamada K.A., Imai S. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab.* 2013;18(3):416-430. DOI 10.1016/j.cmet.2013.07.013
- Sauve A.A., Wolberger C., Schramm V.L., Boeke J.D. The biochemistry of sirtuins. *Annu. Rev. Biochem.* 2006;75:435-465. DOI 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133500
- Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R., Canese K., Chan J., Coomeau D.C., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T., Wang J., Williams R., Trawick B.W., Pruitt K.D., Sherry S.T. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D20-D26. DOI 10.1093/nar/gkab1112
- Schmeisser K., Mansfeld J., Kuhlow D., Weimer S., Priebe S., Heiland I., Birringer M., Groth M., Segref A., Kanfi Y., Price N.L., Schmeisser S., Schuster S., Pfeiffer A.F.H., Guthke R., Platzer M., Hoppe T., Cohen H.Y., Zarse K., Sinclair D.A., Ristow M. Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide. *Nat. Chem. Biol.* 2013;9(11):693-700. DOI 10.1038/nchembio.1352
- Sengupta A., Haldar D. Human sirtuin 3 (SIRT3) deacetylates histone H3 lysine 56 to promote nonhomologous end joining repair. *DNA Repair (Amst.)*. 2018;61:1-16. DOI 10.1016/j.dnarep.2017.11.003
- Simon M., Yang J., Gigas J., Earley E.J., Hillpot E., Zhang L., Zagorulya M., Tomblin G., Gilbert M., Yuen S.L., Pope A., Van Meter M., Emmrich S., Firsanov D., Athreya A., Biashad S.A., Han J., Ryu S., Tare A., Zhu Y., Hudgins A., Atzmon G., Barzilay N., Wolfe A., Moody K., Garcia B.A., Thomas D.D., Robbins P.D., Vijg J., Seluanov A., Suh Y., Gorbunova V. A rare human centenarian variant of SIRT6 enhances genome stability and interaction with Lamin A. *EMBO J.* 2022;41(21):e110393. DOI 10.15252/embj.2021110393
- Simonet N.G., Thackray J.K., Vazquez B.N., Ianni A., Espinosa-Alcantud M., Morales-Sanfrutos J., Hurtado-Bagès S., Sabidó E., Buschbeck M., Tischfield J., De La Torre C., Esteller M., Braun T., Olivella M., Serrano L., Vaquero A. SirT7 auto-ADP-ribosylation regulates glucose starvation response through mH2A1. *Sci. Adv.* 2020;6(30):eaaz2590. DOI 10.1126/sciadv.aaz2590
- Sinclair D.A., Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles – a cause of aging in yeast. *Cell*. 1997;91(7):1033-1042. DOI 10.1016/S0092-8674(00)80493-6

- Smith J.S., Brachmann C.B., Celic I., Kenna M.A., Muhammad S., Starai V.J., Avalos J.L., Escalante-Semerena J.C., Grubmeyer C., Wolberger C., Boeke J.D. A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(12):6658-6663. DOI 10.1073/pnas.97.12.6658
- Soerensen M., Dato S., Tan Q., Thinggaard M., Kleindorp R., Beekman M., Suchiman H.E.D., Jacobsen R., McGue M., Stevnsner T., Bohr V.A., de Craen A.J.M., Westendorp R.G.J., Schreiber S., Slagboom P.E., Nebel A., Vaupel J.W., Christensen K., Christiansen L. Evidence from case-control and longitudinal studies supports associations of genetic variation in *APOE*, *CETP*, and *IL6* with human longevity. *Age (Dordr.)*. 2013;35(2):487-500. DOI 10.1007/s11357-011-9373-7
- Song C., Hotz-Wagenblatt A., Voit R., Grummt I. SIRT7 and the DEAD-box helicase DDX21 cooperate to resolve genomic R loops and safeguard genome stability. *Genes Dev.* 2017;31(13):1370-1381. DOI 10.1101/gad.300624.117
- Subramani P., Nagarajan N., Mariaraj S., Vilwanathan R. Knockdown of sirtuin6 positively regulates acetylation of DNMT1 to inhibit NOTCH signaling pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *Cell. Signal.* 2023;105:110629. DOI 10.1016/j.cellsig.2023.110629
- Sun L., Fang J. Macromolecular crowding effect is critical for maintaining SIRT1's nuclear localization in cancer cells. *Cell Cycle.* 2016;15(19):2647-2655. DOI 10.1080/15384101.2016.1211214
- Sundaresan N.R., Bindu S., Pillai V.B., Samant S., Pan Y., Huang J.-Y., Gupta M., Nagalingam R.S., Wolfgeher D., Verdin E., Gupta M.P. SIRT3 blocks aging-associated tissue fibrosis in mice by deacetylating and activating glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Mol. Cell. Biol.* 2016;36(5):678-692. DOI 10.1128/MCB.00586-15
- Tan M., Peng C., Anderson K.A., Chhoy P., Xie Z., Dai L., Park J., Chen Y., Huang H., Zhang Y., Ro J., Wagner G.R., Green M.F., Madson A.S., Schmiesing T., Peterson B.S., Xu G., Ilkayeva O.R., Muehlbauer M.J., Braulke T., Muhlhausen C., Backos D.S., Olsen C.A., McGuire P.J., Pletcher S.D., Lombard D.B., Hirschey M.D., Zhao Y. Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell Metab.* 2014;19(4):605-617. DOI 10.1016/j.cmet.2014.03.014
- Taylor J.R., Wood J.G., Mizerak E., Hinthorn S., Liu J., Finn M., Gordon S., Zingas L., Chang C., Klein M.A., Denu J.M., Gorbunova V., Seluanov A., Boeke J.D., Sedivy J.M., Helfand S.L. Sirt6 regulates lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022;119(5):e2111176119. DOI 10.1073/pnas.2111176119
- TenNapel M.J., Lynch C.F., Burns T.L., Wallace R., Smith B.J., Button A., Domann F.E. *SIRT6* minor allele genotype is associated with >5-year decrease in lifespan in an aged cohort. *PLoS One.* 2014;9(12):e115616. DOI 10.1371/journal.pone.0115616
- Tian X., Firsanov D., Zhang Z., Cheng Y., Luo L., Tomblin G., Tan R., Simon M., Henderson S., Steffan J., Goldfarb A., Tam J., Zheng K., Cornwell A., Johnson A., Yang J.-N., Mao Z., Manta B., Dang W., Zhang Z., Vijg J., Wolfe A., Moody K., Kennedy B.K., Bohmann D., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 is responsible for more efficient DNA double-strand break repair in long-lived species. *Cell.* 2019;177(3):622-638.e22. DOI 10.1016/j.cell.2019.03.043
- Tissenbaum H.A., Guarente L. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2001;410(6825):227-230. DOI 10.1038/35065638
- Tsai Y.-C., Greco T.M., Boonmee A., Miteva Y., Cristea I.M. Functional proteomics establishes the interaction of SIRT7 with chromatin remodeling complexes and expands its role in regulation of RNA polymerase I transcription. *Mol. Cell. Proteomics.* 2012;11(5):60-76. DOI 10.1074/mcp.A111.015156
- van der Horst A., Tertoolen L.G.J., de Vries-Smiths L.M.M., Frye R.A., Medema R.H., Burgering B.M.T. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSIRT2<sup>SIRT1</sup>. *J. Biol. Chem.* 2004;279(28):28873-28879. DOI 10.1074/jbc.M401138200
- Van Meter M., Kashyap M., Rezazadeh S., Geneva A.J., Morello T.D., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat. Commun.* 2014;5(1):5011. DOI 10.1038/ncomms6011
- Vaquero A., Scher M., Lee D., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D. Human sirt1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell.* 2004;16(1):93-105. DOI 10.1016/j.molcel.2004.08.031
- Vaquero A., Scher M.B., Lee D.H., Sutton A., Cheng H.-L., Alt F.W., Serrano L., Sternglanz R., Reinberg D. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* 2006;20(10):1256-1261. DOI 10.1101/gad.1412706
- Vaquero A., Scher M., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Serrano L., Reinberg D. SIRT1 regulates the histone methyltransferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature.* 2007;450(7168):440-444. DOI 10.1038/nature06268
- Vaziri H., Dessain S.K., Eaton E.N., Imai S.-I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., Weinberg R.A. *hSIRT2/SIRT1* functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* 2001;107(2):149-159. DOI 10.1016/S0092-8674(01)00527-X
- Vazquez B.N., Thackray J.K., Simonet N.G., Kane-Goldsmith N., Martinez-Redondo P., Nguyen T., Bunting S., Vaquero A., Tischfield J.A., Serrano L. SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *EMBO J.* 2016;35(14):1488-1503. DOI 10.15252/embj.201593499
- Vazquez B.N., Fernández-Duran I., Vaquero A. Sirtuins in hematopoiesis and blood malignancies. Chapter 23. In: Maiese K. (Ed.) *Sirtuin Biology in Medicine*. Academic Press, 2021;373-391. DOI 10.1016/B978-0-12-814118-2.00020-3
- Viswanathan M., Guarente L. Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by *sir-2.1* transgenes. *Nature.* 2011;477(7365):E1-E2. DOI 10.1038/nature10440
- Wang L., Xu C., Johansen T., Berger S.L., Dou Z. SIRT1 – a new mammalian substrate of nuclear autophagy. *Autophagy.* 2021;17(2):593-595. DOI 10.1080/15548627.2020.1860541
- Wang R.-H., Sengupta K., Li C., Kim H.-S., Cao L., Xiao C., Kim S., Xu X., Zheng Y., Chilton B., Jia R., Zheng Z.-M., Appella E., Wang X.W., Ried T., Deng C.-X. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell.* 2008;14(4):312-323. DOI 10.1016/j.ccr.2008.09.001
- Whitaker R., Faulkner S., Miyokawa R., Burhenn L., Henriksen M., Wood J.G., Helfand S.L. Increased expression of *Drosophila Sir2* extends life span in a dose-dependent manner. *Aging.* 2013;5(9):682-691. DOI 10.18632/aging.100599
- Willcox B.J., Donlon T.A., He Q., Chen R., Grove J.S., Yano K., Masaki K.H., Willcox D.C., Rodriguez B., Curb J.D. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105(37):13987-13992. DOI 10.1073/pnas.0801030105
- Woo S.J., Lee S.-M., Lim H.S., Hah Y.-S., Jung I.D., Park Y.-M., Kim H.-O., Cheon Y.-H., Jeon M.-G., Jang K.Y., Kim K.M., Park B.-H., Lee S.-I. Myeloid deletion of SIRT1 suppresses collagen-induced arthritis in mice by modulating dendritic cell maturation. *Exp. Mol. Med.* 2016;48(3):e221. DOI 10.1038/emmm.2015.124
- Woo S.J., Noh H.S., Lee N.Y., Cheon Y.-H., Yi S.M., Jeon H.M., Bae E.J., Lee S.-I., Park B.-H. Myeloid sirtuin 6 deficiency accelerates experimental rheumatoid arthritis by enhancing macrophage activation and infiltration into synovium. *EBioMedicine.* 2018;38:228-237. DOI 10.1016/j.ebiom.2018.11.005
- Wood J.G., Schwer B., Wickremesinghe P.C., Hartnett D.A., Burhenn L., Garcia M., Li M., Verdin E., Helfand S.L. Sirt4 is a mitochondrial regulator of metabolism and lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(7):1564-1569. DOI 10.1073/pnas.1720673115
- Wu Q.J., Zhang T.N., Chen H.H., Yu X.F., Lv J.L., Liu Y.Y., Liu Y.S., Zheng G., Zhao J.Q., Wei Y.F., Guo J.Y., Liu F.H., Chang Q., Zhang Y.X., Liu C.G., Zhao Y.H. The sirtuin family in health and di-

- sease. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022;7(1):402. DOI 10.1038/s41392-022-01257-8
- Xu C., Wang L., Fozouni P., Evjen G., Chandra V., Jiang J., Lu C., Nicastrri M., Bretz C., Winkler J.D., Amaravadi R., Garcia B.A., Adams P.D., Ott M., Tong W., Johansen T., Dou Z., Berger S.L. SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing. *Nat. Cell Biol.* 2020;22(10):1170-1179. DOI 10.1038/s41556-020-00579-5
- Yang Y., Hou H., Haller E.M., Nicosia S.V., Bai W. Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation. *EMBO J.* 2005;24(5):1021-1032. DOI 10.1038/sj.emboj.7600570
- Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., Keller M.D., Jones D.R., Frye R.A., Mayo M.W. Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004; 23(12):2369-2380. DOI 10.1038/sj.emboj.7600244
- Zhang J., Fang L., Lu Z., Xiong J., Wu M., Shi L., Luo A., Wang S. Are sirtuins markers of ovarian aging? *Gene.* 2016;575(2 Pt. 3):680-686. DOI 10.1016/j.gene.2015.09.043
- Zhang P.-Y., Li G., Deng Z.-J., Liu L.-Y., Chen L., Tang J.-Z., Wang Y.-Q., Cao S.-T., Fang Y.-X., Wen F., Xu Y., Chen X., Shi K.-Q., Li W.-F., Xie C., Tang K.-F. Dicer interacts with SIRT7 and regulates H3K18 deacetylation in response to DNA damaging agents. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(8):3629-3642. DOI 10.1093/nar/gkv1504
- Zhang W.-G., Bai X.-J., Chen X.-M. SIRT1 variants are associated with aging in a healthy Han Chinese population. *Clin. Chim. Acta.* 2010;411(21-22):1679-1683. DOI 10.1016/j.cca.2010.06.030
- Zhang X., Spiegelman N.A., Nelson O.D., Jing H., Lin H. SIRT6 regulates Ras-related protein R-Ras2 by lysine defatty-acylation. *eLife.* 2017;6:e25158. DOI 10.7554/eLife.25158
- Zhang X., Ameer F.S., Azhar G., Wei J.Y. Alternative splicing increases sirtuin gene family diversity and modulates their subcellular localization and function. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(2):473. DOI 10.3390/ijms22020473
- Zhang Y., Connelly K.A., Thai K., Wu X., Kapus A., Kepecs D., Gilbert R.E. Sirtuin 1 activation reduces transforming growth factor- $\beta$ 1-induced fibrogenesis and affords organ protection in a model of progressive, experimental kidney and associated cardiac disease. *Am. J. Pathol.* 2017;187(1):80-90. DOI 10.1016/j.ajpath.2016.09.016
- Zhao Y., Wang H., Poole R.J., Gems D. A *fln-2* mutation affects lethal pathology and lifespan in *C. elegans*. *Nat. Commun.* 2019;10(1): 5087. DOI 10.1038/s41467-019-13062-z
- Zhong L., D'Urso A., Toiber D., Sebastian C., Henry R.E., Vady-sirisack D.D., Guimaraes A., Marinelli B., Wikstrom J.D., Nir T., Clish C.B., Vaitheesvaran B., Iliopoulos O., Kurland I., Dor Y., Weissleder R., Shirihai O.S., Ellisen L.W., Espinosa J.M., Mostoslavsky R. The histone deacetylase SIRT6 regulates glucose homeostasis via Hif1 $\alpha$ . *Cell.* 2010;140(2):280-293. DOI 10.1016/j.cell.2009.12.041

---

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 22-74-10123. Работа Д.А. Чудаковой в области исследования старения мозга и нейродегенерации выполнена при финансовой поддержке ФМБА России.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.11.2023. После доработки 15.01.2024. Принята к публикации 16.01.2024.

DOI 10.18699/vjgb-24-27


# Влияние транспозонов на развитие болезни Альцгеймера

Р.Н. Мустафин <sup>1</sup>, Э.К. Хуснутдинова <sup>1, 2</sup><sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия<sup>2</sup> Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия ruji79@mail.ru

**Аннотация.** Болезнь Альцгеймера поражает в среднем 5 % населения со значительным увеличением распространенности с возрастом, что свидетельствует о возможном влиянии на данную патологию тех же механизмов, которые лежат в основе старения человека. Исследование этих механизмов перспективно для разработки эффективных методов лечения и профилактики заболевания. Возможными участниками этих механизмов являются транспозоны, которые служат драйверами эпигенетической регуляции, поскольку формируют в эволюции видоспецифические распределения генов некодирующих РНК в геноме человека. Изучение роли микроРНК в развитии болезни Альцгеймера актуально, поскольку по результатам проведенных GWAS ассоциаций белок-кодирующих генов (*APOE4*, *ABCA7*, *BIN1*, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *TREM2*) трудно объяснить сложный патогенез заболевания. Кроме того, в различных долях головного мозга при болезни Альцгеймера были обнаружены специфические изменения экспрессии множества генов, что может быть обусловлено глобальными регуляторными изменениями под влиянием транспозонов. Действительно, экспериментальные и клинические исследования показали патологическую активацию ретроэлементов при болезни Альцгеймера. Проведенный нами анализ обширной научной литературы в соответствии с базой данных MDTE DB (microRNAs derived from transposable elements) позволил выявить 28 различных микроРНК, происходящих от мобильных элементов (17 – от LINE, 5 – от SINE, 4 – от HERV, 2 – от ДНК-транспозонов), экспрессия которых специфически изменяется при данном заболевании (снижается у 17 и повышается у 11 микроРНК). Экспрессия 13 из 28 микроРНК (miR-151a, -192, -211, -28, -31, -320c, -335, -340, -378a, -511, -576, -708, -885) меняется также при старении и развитии злокачественных новообразований, что подтверждает возможное наличие общих патогенетических механизмов. Большинство из этих микроРНК произошли от LINE-ретроэлементов, патологическая активация которых ассоциирована со старением, канцерогенезом и болезнью Альцгеймера, что свидетельствует в пользу гипотезы о том, что в основе этих трех процессов лежит первичная дисрегуляция транспозонов, которые служат драйверами эпигенетической регуляции экспрессии генов в онтогенезе. Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; канцерогенез; микроРНК; старение; транспозоны; ретроэлементы.

**Для цитирования:** Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Влияние транспозонов на развитие болезни Альцгеймера. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):228-238. DOI 10.18699/vjgb-24-27

## Involvement of transposable elements in Alzheimer's disease pathogenesis

R.N. Mustafin <sup>1</sup>, E.K. Khusnutdinova <sup>1, 2</sup><sup>1</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia<sup>2</sup> Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia ruji79@mail.ru

**Abstract.** Alzheimer's disease affects an average of 5 % of the population with a significant increase in prevalence with age, suggesting that the same mechanisms that underlie aging may influence this pathology. Investigation of these mechanisms is promising for effective methods of treatment and prevention of the disease. Possible participants in these mechanisms are transposons, which serve as drivers of epigenetic regulation, since they form species-specific distributions of non-coding RNA genes in genomes in evolution. Study of miRNA involvement in Alzheimer's disease pathogenesis is relevant, since the associations of protein-coding genes (*APOE4*, *ABCA7*, *BIN1*, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *TREM2*) with the disease revealed as a result of GWAS make it difficult to explain its complex pathogenesis. Specific expression changes of many genes were found in different brain parts of Alzheimer's patients, which may be due to global regulatory changes under the influence of transposons. Experimental and clinical studies have shown pathological activation of retroelements in Alzheimer's disease. Our analysis of scientific literature in accordance with MDTE DB revealed 28 miRNAs derived from transposons (17 from LINE, 5 from SINE, 4 from HERV, 2 from DNA transposons), the expression of which specifically changes in this disease (decreases in 17 and increases in 11 microRNA). Expression of 13 out of 28 miRNAs (miR-151a, -192, -211, -28, -31, -320c, -335, -340, -378a, -511, -576, -708, -885) also changes with aging and cancer development, which indicates the presence



of possible common pathogenetic mechanisms. Most of these miRNAs originated from LINE retroelements, the pathological activation of which is associated with aging, carcinogenesis, and Alzheimer's disease, which supports the hypothesis that these three processes are based on the primary dysregulation of transposons that serve as drivers of epigenetic regulation of gene expression in ontogeny.

Key words: Alzheimer's disease; carcinogenesis; miRNA; aging; transposons; retroelements.

**For citation:** Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Involvement of transposable elements in Alzheimer's disease pathogenesis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):228-238. DOI 10.18699/vjgb-24-27

## Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание, связанное с внеклеточным отложением бляшек бета-амилоида и внутриклеточным накоплением клубков тау-белка с гибелью клеток в головном мозге (Barak et al., 2013). Болезнь Альцгеймера выявляется у 62 % пациентов с деменцией (Swarbrick et al., 2019). Проведенный в 2017 г. метаанализ показал, что распространенность БА составляет 5 % в Европе (3.31 % у мужчин и 7.13 % у женщин) с увеличением этих показателей с возрастом (7.66 % в 75–84 года, 22.53 % в 85 лет и старше). В Японии БА встречается у 7 % людей старше 65 лет, в США – у 9.51 % – старше 70 лет. У жителей Китая частота встречаемости БА составляет 1.27 % у людей 65–69 лет и 18.54 % – в 85–89 лет (Niu et al., 2017). Согласно близнецовым исследованиям, наследуемость БА насчитывает 58 % вне зависимости от пола (Gatz et al., 2006).

В 2018 г. интерпретация результатов GWAS образцов ДНК 314 278 пациентов показала ассоциацию с БА генов *ACE*, *ADAM10*, *BCKDK/KAT8*, *TOMM40*, *VKORC1* (Marrioni et al., 2018). В 2019 г. метаанализ результатов GWAS (53 042 пациента БА и 355 900 здорового контроля) позволил выявить в геноме человека 37 специфических локусов, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Среди них наибольшую значимость имели гены *APH1B*, *BINI*, *CASS4*, *CCDC6*, *NCK2*, *PILRA*, *PTK2B*, *SPRED2*, *TSPAN14*. Однако объяснить роль аллельных вариантов этих генов в патогенезе БА этих генов сложно.

Вероятные механизмы других ассоциированных с БА генов показаны для *LILRB2* (кодирует рецептор, распознающий множественные аллели HLA, способный участвовать в росте фибрилл бета-амилоида); *ABCA1* (участвует в переносе фосфолипидов на аполипопротеины); *AGRN* (необходим для гомеостаза липидов); *AGRN* (участвует в формировании синапсов зрелых нейронов гиппокампа) (Schwartzentruber et al., 2021). В 2021 г. метаанализ позволил определить ассоциацию с БА 23 различных SNP, среди которых наибольшая достоверность определена для rs3865444 (в гене трансмембранного рецептора CD33), rs7561528 (в гене белка-адаптера нуклеоцитоплазмы BIN1) и rs1801133 (в гене метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR) (GNS et al., 2021).

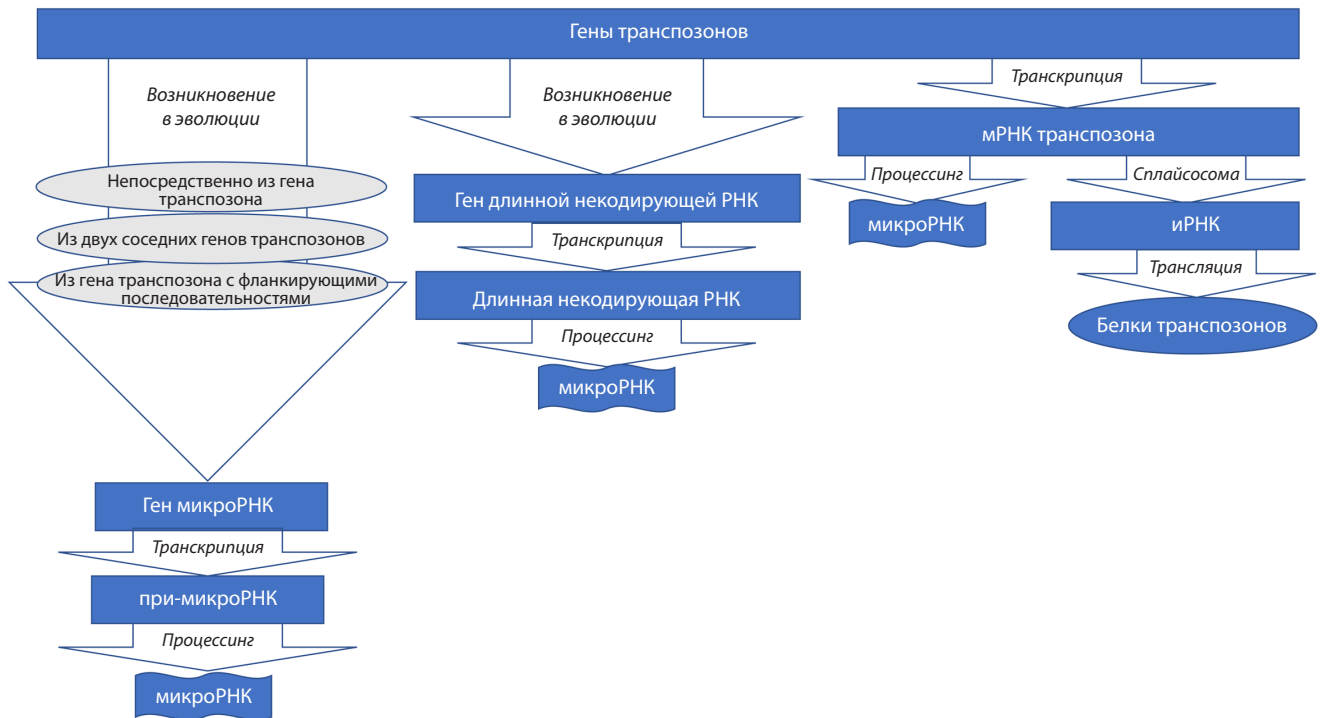
Проведенные полногеномные анализы ассоциаций (GWAS) с болезнью Альцгеймера выявили достоверную ассоциацию аллельных вариантов генов *CLU* (*APOJ*, кодирует аполипопротеин J), *CRI* (кодирует компонент 3b/4b комплемента) (Lambert et al., 2009), *APOE* (кодирует аполипопротеин E), *PICALM* (кодирует белок сборки кластрина, связывающий фосфатидилинозитол) (Harold et

al., 2009; Ando et al., 2022), *BINI* (Ando et al., 2022). Метаанализы результатов GWAS с болезнью Альцгеймера показали достоверную ассоциацию аллельных вариантов генов *TREM2* (кодирует триггерный рецептор, экспрессируемый на миелиодных клетках белка 2) (Guerreiro et al., 2013), *ABCA7* (Ma et al., 2018).

Согласно многочисленным полногеномным метаанализам ассоциаций и крупномасштабным полногеномным ассоциативным исследованиям, самым сильным генетическим фактором риска спорадической БА является аллель *APOE ε4*, тогда как наиболее мощный генетический защитный фактор – аллель *APOE ε2*. Это связано с влиянием APOE на агрегацию и клиренс β-амилоидного пептида, нейрофибриллярную дегенерацию тау, реакции микроглии и астроцитов и гематоэнцефалический барьер (Serrano-Pozo et al., 2021). Напрямую на продукцию и расщепление амилоида влияют также гены *AβPP*, *PSEN1*, *PSEN2*, аллельные варианты которых способствуют усилению агрегации токсических видов амилоида (Robinson et al., 2017).

О ключевой роли генетических факторов в развитии БА свидетельствует наличие моногенных наследственных форм болезни с аутосомно-доминантным типом наследования. Причиной являются герминальные мутации в генах *APP* (amyloid precursor protein) (Rogaev et al., 1994; Goate, 2006), *PSEN1* (presenilin-1) (Sherrington et al., 1995), *PSEN2* (presenilin-2) (Levy-Lahad et al., 1995). Важное значение в патогенезе БА имеет геномная нестабильность, о чем свидетельствует выраженная ассоциация БА с возрастом (для которой характерна геномная нестабильность) (Hou et al., 2017). Одним из компонентов геномной нестабильности при БА может быть изменение экспрессии длинных некодирующих РНК, таких как XIST (X-inactive specific transcript), которая рассматривается в качестве потенциальной мишени для терапии БА (Chanda, Mukhopadhyay, 2020).

Помимо ассоциации аллельных вариантов специфических генов из образцов ДНК лейкоцитов периферической крови больных БА, в ряде исследований проведен анализ экспрессии специфических генов в клетках головного мозга пациентов. Это могло бы объяснить возможные механизмы патогенеза болезни. В 2022 г. метаанализ идентифицировал 1915 дифференциально экспрессируемых генов в энториальной коре (относящейся к гиппокампу части височной доли) у больных БА по сравнению со здоровым контролем (Fagone et al., 2022). Ранее, в 2019 г., метаанализ транскриптома при БА показал дифференциальную экспрессию большого количества генов в разных долях головного мозга: в височной – 323, лобной – 435, теменной – 1023, мозжечковой – 828 генов (Patel et al., 2019). Это свидетельствует о выраженной дерегуляции



Механизмы происхождения микроРНК от транспозонов.

экспрессии генов в головном мозге при БА в масштабе всего генома, что может быть обусловлено патологической активацией транспозонов (TE – transposable elements), занимающих 45 % генома человека. Транспозоны оказывают глобальное регуляторное воздействие на экспрессию всех генов в качестве драйверов эпигенетической регуляции (Мустафин, Хуснутдинова, 2017) и сайтов связывания с транскрипционными факторами (Мустафин, 2019).

Причиной геномной нестабильности в нейронах при БА могут быть соматические рекомбинации между TE, такими как Alu и LINE1 (Pascarella et al., 2022). Об этом свидетельствуют недавние результаты, полученные при флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в отдельных нейронах головного мозга при болезни Альцгеймера (Yurov et al., 2023), а также экспериментальные исследования на мышцах с нокадауном одного аллеля гена *BMI1* (кодирует белок группы Polycomb и регулирует компактизацию гетерохроматина). У взрослых людей в норме определяется повсеместная экспрессия *BMI1* в нейронах головного мозга, но она снижена при болезни Альцгеймера. Мыши *Bmi1*<sup>+/-</sup> характеризуются нейродегенеративными изменениями, сходными с болезнью Альцгеймера. При этом определяется потеря гетерохроматина главным образом в областях расположения повторяющихся последовательностей, к которым относятся TE (El Hajjar et al., 2019).

Эпигенетическая регуляция под влиянием TE осуществляется за счет их взаимосвязи с микроРНК, произошедшими в эволюции от TE различными механизмами (см. рисунок), а также путем процессинга их транскриптов с образованием микроРНК (Wei et al., 2016). МикроРНК оказывают посттранскрипционное регуляторное воздействие на экспрессию генов (Barak et al., 2013) и являются гидами для связывания ДНК-метилтрансфераз (RdDM –

RNA-directed DNA methylation) со специфическими локусами генома, регулируя экспрессию на уровне транскрипции (Watcharanurak, Mutirangura, 2022). Этим можно объяснить наблюдаемое гиперметилование 236 специфических локусов расположения CpG в коре головного мозга больных БА (Smith et al., 2021).

Транспозоны подразделяются на класс ДНК-транспозонов (перемещаются по механизму «вырезание-и-вставка») и на ретроэлементы (РЭ). Транспозиция РЭ происходит путем «копирования-и-вставки» с промежуточной РНК, из которой образуется кДНК посредством обратной транскрипции. По наличию длинных концевых повторов (LTR – long terminal repeats) РЭ классифицируют на LTR-содержащие РЭ и не содержащие LTR-РЭ. К последним относятся автономные LINE (long interspersed elements) и неавтономные SINE (short interspersed elements) и SVE (SINE-VNTR-Alu). Ретроэлементы LTR являются эндогенными ретровирусами (ERV); LINE (L1 и L2), занимают 21 % генома человека (Ravel-Godreuil et al., 2021).

### Роль транспозонов в развитии болезни Альцгеймера

Активность TE находится под контролем эпигенетических модификаторов (метилование ДНК и/или гистонов), а также специфических молекул, таких как PRC2 (Polycomb repressive complex 2, который образует метку H3K27me3), DNMT1 (способствует образованию H4K20me3), белок KAP1 (Kruppel-associated box associated protein 1, способствует образованию меток H3K9me3), сиртуин 6 (SIRT6, вызывает репрессию L1 за счет рибозилирования KAP1, облегчая взаимодействие KAP1 со своими партнерами и образование гетерохроматина в области промотора L1) (Ravel-Godreuil et al., 2021). Согласно недавним данным,

сами ТЕ представляют собой драйверы эпигенетической регуляции генов путем образования из их транскриптов длинных некодирующих РНК и микроРНК (Мустафин, Хуснутдинова, 2017). То есть ТЕ находятся под контролем регуляторных механизмов, драйверами которых они являются, что свидетельствует о наличии эволюционно запрограммированного самоконтроля. Сбой в данной системе – один из факторов старения организма человека (Wood, Helfand, 2013; Van Meter et al., 2014).

Не исключено, что взаимосвязь ТЕ с тау-белками отражает систему взаиморегуляции ТЕ и генов в геноме человека. Действительно, у больных БА в головном мозге выявлено подавление экспрессии гена *BMI1* (компонент репрессивного комплекса Polycomb 1, который способствует компактизации хроматина и сайленсингу генов за счет E3-моно-убиквитин-лигазной активности, опосредованной Ring1a/b на гистон H2A в 19-м положении лизина (H2A<sup>ub</sup>)). Нокаут гена *BMI1* в постмитотических нейронах человека приводил к отложению бета-амилоида и накоплению тау-белка, поскольку BMI1 подавляет транскрипцию тау-белка (Flamier et al., 2018).

Моделирование БА на мышах путем нокаута одного аллеля гена *Bmi1* показало развитие нейродегенерации вследствие дерепрессии ТЕ (El Hajjar et al., 2019). Эксперименты на мышах продемонстрировали усиленный процессинг некодирующих РНК из транскриптов SINE B2 в гиппокампе под влиянием отложения амилоида (Cheng et al., 2020). Транскриптомный анализ выявил активацию ТЕ (главным образом ERV), индуцированную старением и тау-белком в головном мозге мыши. У трансгенных по экспрессии тау-белка мышей в головном мозге было определено повышенное количество ДНК-копий ТЕ (Ramirez et al., 2022). Обнаружено также, что G-квадруплекс, происходящий от эволюционно консервативных L1, подавляет экспрессию генов в нейронах при БА (Hanna et al., 2021).

В 2018 г. анализ образцов посмертной ткани головного мозга показал, что при таупатиях деконденсация гетерохроматина и снижение уровней рiwi и рiРНК вызывают дерегуляцию транспозонов. Выявлено значительное увеличение количества транскриптов HERV при БА (Sun et al., 2018). В том же году при исследовании посмертной ткани головного мозга пациентов с БА (636 человек) и модели болезни на дрозофиле была показана дифференциальная экспрессия нескольких специфических РЭ в ассоциации с нагрузкой нейрофибрилярными тау-клубками. При этом происходила глобальная транскрипционная активация LINE1 и ERV. Были найдены ассоциированные с тау-белками метки хроматина в локусах расположения HERV-Fc1. Проведенное профилирование РЭ у дрозофилы по всему головному мозгу продемонстрировало гетерогенные профили ответов, в том числе зависящие от возраста и генотипа активации ТЕ под влиянием тау-белков (Guo C. et al., 2018).

Дальнейшие исследования посмертной ткани головного мозга пациентов с БА (60 индивидов) подтвердили данные об активации специфических ТЕ (L1 и Alu) при БА по сравнению с контролем (Grundman et al., 2021). Анализ образцов крови 25 пациентов БА с поздним началом позволил выявить значительное усиление экспрессии

1790 транскриптов РЭ (LINE, LTR, SVA) перед клинической феноконверсией (от нормальных когнитивных показателей к манифестации БА), которое назвали «штормом ретротранспозонов» (Macciardi et al., 2022). Не исключено, что полученные исследователями данные свидетельствуют об эффекте обратной взаимосвязи активированных при старении ТЕ с влиянием на них образующихся тау-белков, что запускает каскадный механизм взаимосвязи ТЕ > тау-белки > ТЕ.

Активация РЭ при болезни Альцгеймера зависит от передачи окислительно-восстановительных сигналов (таких как комплекс I митохондриальной дыхательной цепи) от митохондрий к ядру. Предполагается, что данное явление представляет собой побочный эффект общей передачи сигналов от митохондрий к ядру, направленный на облегчение транскрипции митохондриальных генов для восстановления митохондриальных функций (Baeken et al., 2020). В результате происходят гипометилирование ДНК и повышение экспрессии РЭ, таких как LINE1 (Protasova et al., 2021). При этом возможно развитие порочного круга, когда активированные РЭ усугубляют патологию митохондрий за счет инсерций в гены, вовлеченные в их функционирование. Так, были выявлены часто встречающиеся примат-специфичные ретротранспозиции Alu-элементов в интроны гена *TOMM40*, кодирующего белок  $\beta$ -barrel, необходимый для митохондриального транспорта препротеинов и ассоциированный с болезнью Альцгеймера (Larsen et al., 2017).

### Ассоциация микроРНК, произошедших от транспозонов, с болезнью Альцгеймера

В 2016 г. G. Wei с коллегами создали базу данных о происходящих от ТЕ микроРНК (MDTE DB: a database for microRNAs derived from Transposable element) (Wei et al., 2016). В связи с наличием данных о роли дисрегуляции ТЕ при БА (Guo C. et al., 2018; Sun et al., 2018; Grundman et al., 2021; Macciardi et al., 2022) анализ представленных в MDTE DB специфических микроРНК может раскрыть один из механизмов патогенеза БА при активации транспозонов. В 2019 г. S. Swarbrick с коллегами провели систематический обзор накопленных в научной литературе данных об ассоциированных микроРНК с болезнью Альцгеймера. Выявлена достоверная роль 44 микроРНК в плазме крови, 250 микроРНК – в головном мозге, 153 микроРНК – в спинномозговой жидкости (Swarbrick et al., 2019).

Проведенный нами анализ научной литературы позволил определить ассоциацию ряда произошедших от ТЕ микроРНК, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. В 2014 г. при исследовании головного мозга кроликов, моделированных по БА, обнаружена пониженная экспрессия miR-576-3p (Liu et al., 2014), которая произошла от L1 (Wei et al., 2016). В 2022 г. пониженный уровень miR-576-3p найден в сыворотке больных БА людей (Xu et al., 2022). В 2014 г. полногеномный анализ образцов крови 158 пациентов БА и 155 здорового контроля обнаружил значительное отличие экспрессии miR-885-5p (произошла от SINE/MIR (Wei et al., 2016)) при БА (Tan et al., 2014). Дальнейшие исследования показали, что сверхэкспрессия

miR-885-5p ослабляет вызванное бета-амилоидом повреждение нейронов за счет подавления синтеза KREMEN1 (Pan et al., 2022).

В 2015 г. анализ уровней микроРНК в образцах крови 48 больных БА выявил повышение экспрессии miR-151a (Satoh et al., 2015), произошедшей от L2 (Wei et al., 2016); miR-3200 (Satoh et al., 2015) – от ERVL (Wei et al., 2016); снижение miR-502 – от L2 (Wei et al., 2016) (Satoh et al., 2015). В том же году при исследовании 127 больных БА и 123 – контроля обнаружено снижение при БА уровня miR-31 (Dong H. et al., 2015), произошедшей от L2 (Wei et al., 2016). Эксперименты на моделях БА мышей продемонстрировали значительное улучшение неврологических показателей при опосредованной лентивирусами экспрессии miR-31 за счет снижения накопления бета-амилоида в гиппокампе и его основании (Barros-Viegas et al., 2020).

В 2016 г. в эксперименте на мышах, моделированных по БА, выявлена роль miR-211, происходящей от L2 (Wei et al., 2016), воздействующей на NUAК1, вызывая накопление бета-амилоида и снижая выживаемость нейронов (Fan et al., 2016). Повышенный уровень miR-211 показан в другом исследовании на мышах с моделированием БА и накоплением бета-амилоида (Sierksma et al., 2018). Обнаружено снижение экспрессии miR-511, произошедшей от L1 (Wei et al., 2016), при БА, следствием чего является повышенный синтез белка FKBP5 (Zheng et al., 2016). Лечение моделированных по БА мышей прижиганием в акупунктурных точках управляющего сосуда способствовало улучшению когнитивных функций путем повышения экспрессии miR-511-3p (Jia et al., 2022).

В 2017 г. на моделях мышей с БА был найден повышенный уровень miR-28-3p (семейство miR-28 происходит от L2 (Wei et al., 2016)) в спинномозговой жидкости (Hong et al., 2017). В сыворотке крови больных БА людей также определена повышенная, по сравнению со здоровым контролем, концентрация miR-28-3p. Уровень данной микроРНК снижался при эффективной терапии донепизилом (Zhao et al., 2020).

Произошедшая от ERVL miR-1246 (Wei et al., 2016) предложена в качестве биомаркера БА для определения ее уровня в сыворотке крови пациентов (Guo R. et al., 2017). В плазме крови больных БА определено снижение по сравнению с контролем уровня miR-545-3p (Cosin-Tomas et al., 2017). Семейство miR-545 произошло от L2 (Wei et al., 2016). При БА определяется сниженная экспрессия miR-325 (произошла от L2 (Wei et al., 2016)), которая оказывает посттранскрипционное регуляторное влияние на синтез томозина (нарушает синаптическую передачу в головном мозге) в гиппокампе (Barak et al., 2013). Произошедшая от ДНК-транспозона hAT-Tip100 провоспалительная микроРНК miR-326 (Wei et al., 2016) характеризовалась повышенной экспрессией при БА (Cai et al., 2017). Низкие уровни miR-342-5p, произошедшей от SINE (Wei et al., 2016), выявлены при худшем течении БА (Dakterzada et al., 2021). Произошедшая от SINE miR-3646 характеризовалась повышенной экспрессией у больных БА (Lu et al., 2021).

В 2018 г. определена повышенная экспрессия miR-320с, образованной от L1 (Wei et al., 2016), у больных БА по сравнению с пациентами с боковым амиотрофическим

склерозом (Raheja et al., 2018). Ранее была найдена значительная ассоциация локуса расположения гена miR-320 при полногеномном анализе сцепления у больных семейным БА с поздним началом (Kunkle et al., 2016).

На моделях мышей с БА определена повышенная экспрессия miR-320 в нейронах головного мозга (Boese et al., 2016). Пониженный уровень miR-4487 (произошла от L1 (Wei et al., 2016)) обнаружен в нейронах головного мозга больных БА (Hu et al., 2018). При БА определяется сверхэкспрессия miR-384, произошедшей от LINE/Dong-R4 (Wei et al., 2016), которая взаимодействует с мРНК белка BACE1 (бета-секретаза, катализирующая превращение амилоидного предшественника в бета-амилоид (Samadian et al., 2021)). Определено снижение уровня miR-4286, произошедшей от ERVL (Wei et al., 2016), при БА (Henriques et al., 2020), miR-4422-5p в сыворотке крови (произошедшей от LTR/Gypsy (Wei et al., 2016)) (Hajjari et al., 2021).

В 2019 г. при поиске потенциальных биомаркеров и терапевтических агентов БА интеграция транскриптомных данных с белок-белковыми и транскрипционными регуляторными взаимодействиями показала роль miR-192-5p (произошла от L2) и miR-335-5p (произошла от SINE/MIR) (Wei et al., 2016) в качестве ключевых сигнальных и регуляторных молекул, ассоциированных с транскрипционными изменениями при болезни Альцгеймера. Уровни их снижаются как в крови больных БА людей (Rahman et al., 2019), так и в отношении miR-192-5p – в гиппокампе экспериментальных мышей. Дальнейшие исследования продемонстрировали потенциальную прогностическую эффективность miR-192-5p при болезни Альцгеймера. Уровень этой микроРНК понижался при физических упражнениях и способствовал снижению экспрессии TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$ , участвующих в воспалении при БА (Qin et al., 2022). Сходные результаты получены в экспериментах на клеточных культурах и на мышах с моделью БА в отношении miR-335-5p, которая может быть использована для таргетной терапии болезни (Wang et al., 2020).

В 2020 г. обнаружена пониженная экспрессия miR-340 (произошла от ДНК-TE TcMar-Mariner (Wei et al., 2016)) на моделях мышей с БА (Tan et al., 2020). Определен низкий уровень miR-708-5p, произошедшей от L2 (Wei et al., 2016), в образцах крови 28 пациентов с БА (Rahman et al., 2020). Полученные данные были подтверждены при исследовании образцов нервных клеток больных БА (Di Palo et al., 2022). Анализ образцов головного мозга умерших от БА пациентов показал повышенный уровень miR-1202 (Henriques et al., 2020), произошедшей от L1 (Wei et al., 2016).

В 2021 г. анализ образцов ДНК крови 48 больных БА и 48 здорового контроля выявил значительное повышение уровня miR-378a (Dong Z. et al., 2021), которая произошла от SINE/MIR (Wei et al., 2016). Данная микроРНК была предложена в качестве биомаркера болезни Альцгеймера. В головном мозге умерших пациентов с БА обнаружены пониженные уровни miR-1271 (Majumder et al., 2021), произошедшей от L2 (Wei et al., 2016). Определено повышение экспрессии miR-4504, произошедшей от L1, в головном мозге больных БА (Eysert et al., 2021). Получен-

**Таблица 1.** Ассоциация микроРНК, происходящих от транспозонов, с болезнью Альцгеймера

микроРНК	Транспозон, источник микроРНК	Изменение экспрессии	Литературный источник
miR-1202	L1	Повышение	Henriques et al., 2020
miR-1246	ERV1	Повышение	Guo R. et al., 2017
miR-1271	L2	Снижение	Majumder et al., 2021
miR-151a	L2	Повышение	Satoh et al., 2015
miR-192	L2	Снижение	Rahman et al., 2019; Qin et al., 2022
miR-211	L2	Повышение	Fan et al., 2016; Sierksma et al., 2018
miR-28	L2	Повышение	Hong et al., 2017; Zhao et al., 2020
miR-31	L2	Снижение	Dong H. et al., 2015; Barros-Viegas et al., 2020
miR-320	L1	Повышение	Boese et al., 2016; Raheja et al., 2018
miR-3200	ERV1	Снижение	Satoh et al., 2015
miR-325	L2	Снижение	Barak et al., 2013
miR-326	DNA/hAT-Tip100	Повышение	Cai et al., 2017
miR-335	SINE/MIR	Снижение	Rahman et al., 2019; Wang et al., 2020
miR-340	DNA/TcMar-Mariner	Снижение	Tan et al., 2020
miR-342	SINE	Снижение	Dakterzada et al., 2021
miR-3646	SINE/MIR	Повышение	Lu et al., 2021
miR-378a	SINE/MIR	Повышение	Dong Z. et al., 2021
miR-384	LINE/Dong-R4	Повышение	Samadian et al., 2021
miR-4286	ERV1	Снижение	Henriques et al., 2020
miR-4422	LTR-Gypsy	Снижение	Hajjari et al., 2021
miR-4487	L1	Снижение	Hu et al., 2018
miR-4504	L1	Повышение	Eysert et al., 2021
miR-502	L2	Снижение	Satoh et al., 2015
miR-511	L1	Снижение	Zheng et al., 2016; Jia et al., 2022
miR-545	L2	Снижение	Cosin-Tomas et al., 2017
miR-576	L1	Снижение	Liu et al., 2014; Xu et al., 2022
miR-708	L2	Снижение	Rahman et al., 2020; Di Palo et al., 2022
miR-885	SINE/MIR	Снижение	Tan et al., 2014; Pan et al., 2022

ные нами данные об изменениях экспрессии специфических микроРНК, происходящих от ТЕ при БА, приведены в табл. 1.

### Ассоциация микроРНК, произошедших от транспозонов, со старением, канцерогенезом и болезнью Альцгеймера

Согласно эпидемиологическим данным, риск развития БА значительно увеличивается с возрастом (Niu et al., 2017). Как при старении, так и при нейродегенеративных заболеваниях отмечается геномная нестабильность в нейронах, с активацией ТЕ различными механизмами (Wood, Helfand, 2013; Guo C. et al., 2018), включая потерю меток SIRT6 (Van Meter et al., 2014). Хотя БА и злокачественные новообразования (ЗНО) являются ассоциированными со старением болезнями, анализ накопленных в научной литературе данных определил обратную корреляцию между ЗНО и БА, которая может быть обусловлена влиянием

белков p53 и PIN1 (Peptidyl-prolyl cis-trans изомераза, которая модулирует функцию белков) (Lanni et al., 2021). В то же время смертность от БА у людей, выживших от злокачественных новообразований в течение 10 и более лет, оказалась выше, чем в общей популяции (Abdel-Rahman, 2020), что может свидетельствовать о наличии единых патогенетических путей этих болезней, возможно, связанных с дерегуляцией транспозонов.

Изменения активности ТЕ при старении способствуют изменениям экспрессии микроРНК, которые могут действовать развитию БА и подавлению роста ЗНО (действуют как супрессоры опухолей). Для проверки этого предположения нами проведены анализ онлайн-ресурса, созданного в 2018 г. N.W. Wong с коллегами, об изменениях специфических микроРНК при определенных типах ЗНО (Wong et al., 2018), а также поиск литературных данных о микроРНК, ассоциированных с БА и старением. В результате найдено 13 специфических микроРНК, про-

**Таблица 2.** Происходящие от ТЕ микроРНК, связанные со старением, канцерогенезом и болезнью Альцгеймера

микроРНК (ТЕ-источник)	Аббревиатура названия злокачественного новообразования (изменение экспрессии микроРНК)	Изменение уровня микроРНК	
		при болезни Альцгеймера (источник литературы)	при старении (источник литературы)
miR-151a (LINE/L2)	BLCA, BRCA, CESC, COAD, ESCA, HNSC, KICH, KIRC, KIRP, LIHC, LUAD, LUSC, PRAD, READ, STAD, UCEC (повышается)	Повышается Satoh et al., 2015	Снижается Noren Hooten et al., 2013
miR-192 (LINE/L2)	BLCA, BRCA, COAD, KIRC, LUAD, LUSC, PRAD, READ, STAD, UCEC (повышается); CHOL, KICH, KIRP, LIHC, THCA (снижается)	Снижается Rahman et al., 2019; Qin et al., 2022	Снижается Sataranatarajan et al., 2012
miR-211 (LINE/L2)	KIRC, KIRP, LIHC (повышается); BRCA, HNSC, LUAD (снижается)	Повышается Fan et al., 2016; Sierksma et al., 2018	Повышается Smith-Vikos et al., 2016
miR-28 (LINE/L2)	HNSC, KIRC, LUAD, LUSC, PRAD (повышается); BRCA, CHOL, COAD, ESCA, PCPG, READ, STAD, THCA (снижается)	Повышается Hong et al., 2017; Zhao et al., 2020	Снижается Zhang T. et al., 2017
miR-31 (LINE/L2)	BLCA, CESC, HNSC, KIRP, LUAD, LUSC, STAD, THCA, UCEC (повышается); KICH, KIRC, PRAD (снижается)	Снижается Dong H. et al., 2015; Barros-Viegas et al., 2020	Повышается Cho et al., 2015; Dellago et al., 2013
miR-320c (LINE/L1, L2)	CHOL, KIRC, LUSC, STAD, UCEC (повышается); COAD, READ (снижается)	Повышается Boese et al., 2016; Raheja et al., 2018	Снижается Ukai et al., 2012
miR-335 (SINE/MIR)	BLCA, COAD, ESCA, HNSC, LUAD, LUSC, PRAD, STAD, THCA, UCEC (повышается); BRCA, KICH, KIRC, LIHC (снижается)	Снижается Rahman et al., 2019; Wang et al., 2020	Повышается Raihan et al., 2018
miR-340 (DNA/ТсMar-Mariner)	BRCA, COAD, KICH, KIRC, KIRP, LUAD, LUSC, PRAD, UCEC (повышается); CHOL, LIHC, PAAD (снижается)	Снижается Tan et al., 2020	Снижается Zhang H. et al., 2015
miR-378a (SINE/MIR)	PAAD (повышается); BRCA, CHOL, COAD, HNSC, LIHC, LUAD, PAAD, PRAD, READ, STAD (снижается)	Повышается Dong Z. et al., 2021	Повышается Guo D. et al., 2017
miR-511 (LINE/L1)	HNSC, PRAD, READ, STAD (повышается); BRCA, CHOL, KICH, KIRP, LIHC, LUSC, PCPG (снижается)	Снижается Zheng et al., 2016; Jia et al., 2022	Снижается Zheng et al., 2016
miR-576 (LINE/L1)	BLCA, BRCA, ESCA, HNSC, KICH, KIRC, KIRP, LUAD, LUSC, PRAD, READ, STAD, UCEC (повышается); CHOL, LIHC, THCA (снижается)	Снижается Liu et al., 2014; Xu et al., 2022	Повышается Ipson et al., 2018
miR-708 (LINE/L2)	BLCA, BRCA, CHOL, COAD, HNSC, KIRC, LUAD, LUSC, PRAD, READ, STAD (повышается); KICH, THCA (снижается)	Снижается Rahman et al., 2020; Di Palo et al., 2022	Повышается Lee et al., 2017
miR-885 (SINE/MIR)	KICH (повышается); CHOL (снижается)	Снижается Tan et al., 2014; Pan et al., 2022	Повышается Behbahanipour et al., 2019

Примечание. BLCA – уротелиальный рак мочевого пузыря; BRCA – инвазивный рак молочной железы; CESC – плоскоклеточный рак шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома; CHOL – холангиокарцинома; COAD – рак толстой кишки; ESCA – рак пищевода; HNSC – плоскоклеточный рак головы и шеи; KICH – хромофобный рак почки; KIRC – почечно-клеточный рак почки; KIRP – папиллярный рак почки; LIHC – гепатоцеллюлярный рак печени; LUAD – аденокарцинома легкого; LUSC – плоскоклеточный рак легкого; PAAD – аденокарцинома поджелудочной железы; PRAD – аденокарцинома простаты; PCPG – феохромоцитомы и параганглиомы; READ – аденокарцинома прямой кишки; STAD – аденокарцинома желудка; THCA – рак щитовидной железы; UCEC – карцинома эндометрия матки.

исходящих от ТЕ, связанных со старением и вовлеченных одновременно в патогенез БА и ЗНО (табл. 2).

С болезнью Альцгеймера ассоциирована miR-151a (Satoh et al., 2015), изменения которой характерны также для различных ЗНО (Wong et al., 2018) и старения (Noren Hooten et al., 2013). MiR-192, произошедшая от LINE/L2 (Wei et al., 2016), уровень которой снижается при БА (Rahman et al., 2019; Qin et al., 2022), ассоциирована с различными ЗНО (Wong et al., 2018). При старении экспрессия miR-192 значительно снижается в тканях почек

(Sataranatarajan et al., 2012). Произшедшая от LINE/L2 miR-211 (Wei et al., 2016), уровень которой повышается при БА (Fan et al., 2016; Sierksma et al., 2018), ассоциирована также со ЗНО (Wong et al., 2018). Экспрессия miR-211 повышена у долгожителей и может служить биомаркером старения (Smith-Vikos et al., 2016).

Произшедшая от LINE/L2 miR-28 (Wei et al., 2016), уровень которой повышается при БА (Hong et al., 2017; Zhao et al., 2020), ассоциирована также со специфическими ЗНО (Wong et al., 2018). При физиологическом старе-

нии отмечается снижение выработки miR-28 (Zhang T. et al., 2017). Произошедшая от LINE/L2 miR-31 (Wei et al., 2016), уровень которой снижается при БА (Dong H. et al., 2015; Barros-Viegas et al., 2020), ассоциирована со ЗНО (Wong et al., 2018) и характеризуется повышенной экспрессией при репликативном старении (Dellago et al., 2013). MiR-320c, произошедшая от LINE/L2, L1 (Wei et al., 2016), уровень которой повышается при БА (Boese et al., 2016; Raheja et al., 2018), также ассоциирована со специфическими ЗНО (Wong et al., 2018). При старении снижается уровень miR-320c (Ukai et al., 2012).

MiR-335, произошедшая от SINE/MIR (Wei et al., 2016), уровень которой снижается при БА (Rahman et al., 2019; Wang et al., 2020), также ассоциирована со ЗНО (Wong et al., 2018) и старением (Raihan et al., 2018). MiR-340, произошедшая от ДНК-ТЕ TcMar-Mariner (Wei et al., 2016), экспрессия которой снижается при БА, ассоциирована с ЗНО (Wong et al., 2018) и старением (Zhang H. et al., 2015). Произошедшая от SINE/MIR miR-378a (Wei et al., 2016), уровень которой значительно повышен при БА (Dong Z. et al., 2021), ассоциирована с различными ЗНО (Wong et al., 2018) и старением (Guo D. et al., 2017). Уровень miR-511 (источник – L1 (Wei et al., 2016)) снижается не только при БА (Zheng et al., 2016; Jia et al., 2022), но и при старении. Эта микроРНК ассоциирована также с ЗНО (Wong et al., 2018). Произошедшая от L1 miR-576 (Wei et al., 2016), уровень которой снижен при БА (Liu et al., 2014; Xu et al., 2022), ассоциирована со ЗНО (Wong et al., 2018).

При старении определяется усиление экспрессии miR-576 (Ipson et al., 2018). MiR-708, произошедшая от L2 (Wei et al., 2016), пониженный уровень которой наблюдается при БА (Rahman et al., 2020; Di Palo et al., 2022), ассоциирована со специфическими ЗНО (Wong et al., 2018) и старением (Lee et al., 2017). Произошедшая от SINE/MIR микроРНК miR-885, уровень которой снижается при БА (Tan et al., 2014), ассоциирована с хроматофобным раком почки и холангиокарциномой (Wong et al., 2018) и старением (Behbahanipour et al., 2019).

## Заключение

Роль микроРНК в развитии БА свидетельствует о возможном потенциале таргетной терапии болезни, а также поиске оптимальных режимов лечения. Примерами являются снижение уровня miR-192-5p при физических упражнениях, способствующих подавлению выработки провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 $\beta$  (Qin et al., 2022); снижение уровня miR-28-3p после терапии донепизилом, что может быть использовано в качестве диагностического критерия эффективности лечения (Zhao et al., 2020).

МикроРНК могут стать не только терапевтическими агентами, но и высокоточными диагностическими маркерами, поскольку изменения их уровня сопровождаются регрессией клинической картины болезни, как это было показано в отношении miR-511 при воздействии акупунктурных прижиганий при БА (Jia et al., 2022). Экспериментальная эффективность miR-31 (Barros-Viegas et al., 2020) и miR-335-5p (Wang et al., 2020) в отношении резкого снижения накопления бета-амилоида в гиппокампе и его основании свидетельствует о потенциале использования

данной микроРНК для таргетной терапии БА (Barros-Viegas et al., 2020; Wang et al., 2020).

Ассоциация происходящих от ТЕ микроРНК с болезнью Альцгеймера показывает как перспективность их применения в лечении БА, так и необходимость более подробного изучения механизмов действия этих микроРНК, поскольку комплементарность их последовательностей с различными ТЕ может стать вероятной основой для глобальных изменений экспрессии генов, находящихся под регуляторным контролем транспозонов.

## Список литературы / References

- Мустафин Р.Н. Взаимосвязь транспозонов с транскрипционными факторами в эволюции эукариот. *Журн. эвол. биохимии и физиологии*. 2019;55(1):14-22. DOI 10.1134/S004445291901008X [Mustafin R.N. The relationship between transposons and transcription factors in the evolution of eukaryotes. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2019;55(1):14-22. DOI 10.1134/S004445291901008X (in Russian)]
- Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-0 [Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. Non-coding parts of genomes as the basis of epigenetic heredity. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(6):742-749. DOI 10.18699/VJ17.30-0 (in Russian)]
- Abdel-Rahman O. Death from Alzheimer's disease among cancer survivors: a population-based study. *Curr. Med. Res. Opin.* 2020;36(5):835-841. DOI 10.1080/03007795.2020.1734921
- Ando K., Nagaraj S., Kucukali F., de Fisenen M.A., Kosa A.C., Doeraene E., Gutierrez L.L., Brion J.P., Leroy K. PICALM and Alzheimer's disease: An update and perspectives. *Nutrients*. 2022;14(3):539. DOI 10.3390/nul14030539
- Baeken M.W., Moosmann B., Hajieva P. Retrotransposon activation by distressed mitochondria in neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020;525(3):570-575. DOI 10.1016/j.bbrc.2020.02.106
- Barak B., Shvarts-Serebro I., Modai S., Gilam A., Okun E., Michaelson D.M., Mattson M.P., Shomron N., Ashery U. Opposing actions of environmental enrichment and Alzheimer's disease on the expression of hippocampal microRNA in mouse models. *Transl. Psychiatry*. 2013;3(9):e304. DOI 10.1038/tp.2013.77
- Barros-Viegas A.T., Carmona V., Ferreira E., Guedes J., Cardoso A.M., Cunha P., de Almeida L.P., de Oliveira C.R., de Magalhães J.P., Peça J., Cardoso A.L. miRNA-31 improves cognition and abolishes amyloid- $\beta$  pathology by targeting APP and BACE1 in an animal model of Alzheimer's disease. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2020;19:1219-1236. DOI 10.1016/j.omtn.2020.01.010
- Behbahanipour M., Peymani M., Salari M., Hashemi M.S., Nasr-Esfahani M.H., Ghaedi K. Expression profiling of blood microRNAs 885, 361, and 17 in the patients with the Parkinson's disease: integrating interaction data to uncover the possible triggering age-related mechanisms. *Sci. Rep.* 2019;9:13759. DOI 10.1038/s41598-019-50256-3
- Boese A.S., Saba R., Campbell K., Majer A., Medina S., Burton L., Booth T.F., Chong P., Westmacott G., Dutta S.M., Saba J.A., Booth S.A. MicroRNA abundance is altered in synaptoneuroosomes during prion disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 2016;71:13-24. DOI 10.1016/j.mcn.2015.12.001
- Cai Y., Sun Z., Jia H., Luo H., Ye X., Wu Q., Xiong Y., Zhang W., Wan J. *Rpph1* upregulates CDC42 expression and promotes hippocampal neuron dendritic spine formation by competing with miR-330-5p. *Front. Mol. Neurosci.* 2017;10:27. DOI 10.3389/fnmol.2017.00027
- Chanda K., Mukhopadhyay D. LncRNA Xist, X-chromosome instability and Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2020;17(6):499-507. DOI 10.2174/1567205017666200807185624

- Cheng Y., Saville L., Gollen B., Isaac C., Belay A., Mehla J., Patel K., Thakor N., Mohajerani M.H., Zovoilis A. Increased processing of SINE B2 ncRNAs unveils a novel type of transcriptome deregulation in amyloid beta neuropathology. *eLife*. 2020;9:e61265. DOI 10.7554/eLife.61265
- Cho J.H., Dimri M., Dimri G.P. MicroRNA-31 is a transcriptional target of histone deacetylase inhibitors and a regulator of cellular senescence. *J. Biol. Chem.* 2015;290(16):10555-10567. DOI 10.1074/jbc.M114.624361
- Cosin-Tomas M., Antonell A., Llado A., Alcolea D., Fortea J., Ezquerro M., Lleo A., Marti M.J., Pallas M., Sanchez-Valle R.S., Molinuevo J.L., Sanfeliu C., Kaliman P. Plasma miR-545-3p as early biomarkers of Alzheimer's disease: potential and limitations. *Mol. Neurobiol.* 2017;54(7):5550-5562. DOI 10.1007/s12035-016-0088-8
- Dakterzada F., Benítez I.D., Targa A., Lladó A., Torres G., Romero L., de Gonzalo-Calvo D., Moncusí-Moix A., Tort-Merino A., Huerto R., Sánchez-de-la-Torre M., Barbé F., Piñol-Ripoll G. Reduced levels of miR-342-5p in plasma are associated with worse cognitive evolution in patients with mild Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2021;13:705989. DOI 10.3389/fnagi.2021.705989
- Dellago H., Preschitz-Kammerhofer B., Terlecki-Zaniewicz L., Schreiner C., Fortschegger K., Chang M.W., Hackl M., Monteforte R., Kuhnel H., Schosserer M., Gruber F., Tschachler E., Scheideler M., Grillari-Voglauer R., Grillari J., Wieser M. High levels of oncomiR-21 contribute to the senescence-induced growth arrest in normal human cells and its knock-down increases the replicative lifespan. *Aging Cell.* 2013;12(3):446-458. DOI 10.1111/acer.12069
- Di Palo A.D., Siniscalchi C., Crescente G., Leo I.D., Fiorentino A., Pacifico S., Russo A., Potenza N. Effect of cannabidiolic acid, *N-trans*-caffeoyltyramine and cannabisin B from hemp seeds on microRNA expression in human neural cells. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2022;44(10):5106-5116. DOI 10.3390/cimb44100347
- Dong H., Li J., Huang L., Chen X., Li D., Wang T., Hu C., Xu J., Zhang C., Zen K., Xiao S., Yan Q., Wang C., Zhang C.Y. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Dis. Markers.* 2015;2015:625659. DOI 10.1155/2015/625659
- Dong Z., Gu H., Guo Q., Liang S., Xue J., Yao F., Liu X., Li F., Liu H., Sun L., Zhao K. Profiling of serum exosome miRNA reveals the potential of a miRNA panel as diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 2021;58(7):3084-3094. DOI 10.1007/s12035-021-02323-y
- El Hajjar J., Chatoo W., Hanna R., Nkanza P., Tétreault N., Tse Y.C., Wong T.P., Abdouh M., Bernier G. Heterochromatic genome instability and neurodegeneration sharing similarities with Alzheimer's disease in old *Bmi1*<sup>+/−</sup> mice. *Sci. Rep.* 2019;9(1):594. DOI 10.1038/s41598-018-37444-3
- Eysert F., Coulon A., Boscher E., Vreulx A.C., Flaig A., Mendes T., Kilinc D., Lambert J., Chapuis J. Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. *Mol. Psychiatry.* 2021;26(10):5592-5607. DOI 10.1038/s41380-020-00926-w
- Fagone P., Mangano K., Martino G., Quattropani M.C., Pennisi M., Bella R., Fiscicaro F., Nicoletti F., Petralia M.C. Characterization of altered molecular pathways in the entorhinal cortex of Alzheimer's disease patients and *in silico* prediction of potential repurposable drugs. *Genes (Basel).* 2022;13(4):703. DOI 10.3390/genes13040703
- Fan C., Wu Q., Ye X., Luo H., Yan D., Xiong D., Xiong Y., Zhu H., Diao Y., Zhang W., Wan J. Role of miR-211 in neuronal differentiation and viability: implications to pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2016;8:166. DOI 10.3389/fnagi.2016.00166
- Flamier A., El Hajjar J., Adjaye J., Fernandes K.J., Abdouh M., Bernier G. Modeling late-onset sporadic Alzheimer's disease through BMI1 deficiency. *Cell Rep.* 2018;23(9):2653-2666. DOI 10.1016/j.celrep.2018.04.097
- Gatz M., Reynolds C.A., Fratiglioni L., Johansson B., Mortimer J.A., Berg S., Fiske A., Pedersen N.L. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2006;63(2):168-174. DOI 10.1001/archpsyc.63.2.168
- GNS H.S., Marise V.L.P., Satish K.S., Yergolkar A.V., Krishnamurthy M., Rajalekshmi G.S., Radhika K., Burri R.R. Untangling huge literature to disinter genetic underpinnings of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* 2021;71:101421. DOI 10.1016/j.arr.2021.101421
- Goate A. Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2006;9(3 Suppl.):341-347. DOI 10.3233/jad-2006-9s338
- Grundman J., Spencer B., Sarsoza F., Rissman R.A. Transcriptome analyses reveal tau isoform-driven changes in transposable element and gene expression. *PLoS One.* 2021;16(9):e0251611. DOI 10.1371/journal.pone.0251611
- Guerreiro R., Wojtas A., Bras J., Carrasquillo M., Rogava E., Majounie E., Cruchaga C., Sassi C., Kauwe J.S., Younkin S., Hazrati L., Collinge J., Pocock J., Lashley T., Williams J., Lambert J.C., Amouyel P., Goate A., Rademakers R., Morgan K., Powell J., St. George-Hyslop P., Singleton A., Hardy J., Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(2):117-127. DOI 10.1056/NEJMoa1211851
- Guo C., Jeong H.H., Hsieh Y.C., Klein H.U., Bennett D.A., De Jager P.L., Liu Z., Shulman J.M. Tau activates transposable elements in Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 2018;23(10):2874-2880. DOI 10.1016/j.celrep.2018.05.004
- Guo D., Ye Y., Qi J., Tan X., Zhang Y., Ma Y., Li Y. Age and sex differences in microRNAs expression during the process of thymus aging. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2017;49(5):409-419. DOI 10.1093/abbs/gmx029
- Guo R., Fan G., Zhang J., Wu C., Du Y., Ye H., Li Z., Wang L., Zhang Z., Zhang L., Zhao Y., Lu Z. A 9-microRNA signature in serum serves as a noninvasive biomarker in early diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2017;60(4):1365-1377. DOI 10.3233/JAD-170343
- Hajjari S.N., Sadigh-Eteghad S., Shanebandi D., Teimourian S., Shahbazi A., Mehdizadeh M. MicroRNA-4422-5p as a negative regulator of amyloidogenic secretases: A potential biomarker for Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2021;463:108-115. DOI 10.1016/j.neuroscience.2021.03.028
- Hanna R., Flamier A., Barabino A., Bernier G. G-quadruplexes originating from evolutionary conserved L1 elements interfere with neuronal gene expression in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 2021;12(1):1828. DOI 10.1038/s41467-021-22129-9
- Harold D., Abraham R., Hollingworth P., Sims R., Gerrish A., Hamshere M.L., Pahwa J.S., Moskva V., Dowzell K., Williams A., Jones N., Thomas C., Stretton A., Morgan A.R., Loveston S., Powell J., Proitsi P., Klopp N., Wichmann H.E., Carrasquillo M.M., Pankratz V.S., Yonkin S.G., Holmans P.A., O'Donovan M., Owen M.J., Williams J. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 2009;41(10):1088-1093. DOI 10.1038/ng.440
- Henriques A.D., Machado-Silva W., Leite R.E.P., Suemoto C.K., Leite K.R.M., Srougi M., Pereira A.C., Jacob-Filho W., Brazilian Aging Brain Study Group. Genome-wide profiling and predicted significance of post-mortem brain microRNA in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.* 2020;191:111352. DOI 10.1016/j.mad.2020.111352
- Hong H., Li Y., Su B. Identification of circulating miR-125b as a potential biomarker of Alzheimer's disease in APP/PS1 transgenic mouse. *J. Alzheimers Dis.* 2017;59(4):1449-1458. DOI 10.3233/JAD-170156
- Hou Y., Song H., Croteau D.L., Akbari M., Bohr V.A. Genome instability in Alzheimer disease. *Mech. Ageing Dev.* 2017;161(Pt. A):83-94. DOI 10.1016/j.mad.2016.04.005
- Hu L., Zhang R., Yuan Q., Gao Y., Yang M.Q., Zhang C., Huang J., Sun Y., Yang W., Yang J.Y., Min Z., Cheng J., Deng Y., Hu X. The emerging role of microRNA-4487/6845-3p in Alzheimer's disease pathologies is induced by Aβ<sub>25-35</sub> triggered in SH-SY5Y cell. *BMC Syst. Biol.* 2018;12(Suppl. 7):119. DOI 10.1186/s12918-018-0633-3



- Ipson B.R., Fletcher M.B., Espinoza S.E., Fisher A.L. Identifying exosome-derived microRNAs as candidate biomarkers of frailty. *J. Frailty Aging*. 2018;7(2):100-103. DOI 10.14283/jfa.2017.45
- Jia Y.M., Zhu C.F., She Z.Y., Wu M.M., Wu Y.Y., Zhou B.Y., Zhang N. Effects on autophagy of moxibustion at governor vessel acupoints in APP/PS1 double-Transgenic Alzheimer's Disease Mice through the lncRNA Six3os1/miR-511-3p/AKT3 Molecular Axis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2022;2022:3881962. DOI 10.1155/2022/3881962
- Kunkle B.W., Jaworski J., Barral S., Bardarajan B., Beecham G.W., Haines J.L., Pericak-Vance M. Genome-wide linkage analyses of non-Hispanic white families identify novel loci for familial late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2016;12(1):2-10. DOI 10.1016/j.jalz.2015.05.020
- Lambert J.C., Heath S., Even G., Campion D., Sleegers K., Hiltunen M., Combarros O., Zelenika D., Bullido M.J., Tavernier B., Letenneur L., Bettens K., Berr C., Pasquier F., Fievet N., Barberger-Gateau P., Engelborghs S., Deyn P.D., Mateo I., Franck A., Helisalmi S., Tzourio C., Gut I., Van Broeckhoven C., Alperovitch A., Lathrop M., Amouyel P. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 2009;41(10):1094-1099. DOI 10.1038/ng.439
- Lanni C., Masi M., Racchi M., Govoni S. Cancer and Alzheimer's disease inverse relationship: an age-associated diverging derailment of shared pathways. *Mol. Psychiatry*. 2021;26(1):280-295. DOI 10.1038/s41380-020-0760-2
- Larsen P.A., Lutz M.W., Hunnicutt K.E., Mihovilovic M., Saunders A.M., Yoder A.D., Roses A.D. The *Alu* neurodegeneration hypothesis: A primate-specific mechanism for neuronal transcription noise, mitochondrial dysfunction, and manifestation of neurodegenerative disease. *Alzheimer's Dement.* 2017;13(7):828-838. DOI 10.1016/j.jalz.2017.01.017
- Lee B.P., Buric I., George-Pandeth A., Flurkey K., Harrison D.E., Yuan R., Peters L.L., Kuchel G.A., Melzer D., Harries L.W. MicroRNAs miR-203-3p, miR-664-3p and miR-708-5p are associated with median strain lifespan in mice. *Sci. Rep.* 2017;7:44620. DOI 10.1038/srep44620
- Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995;269(5226):973-977. DOI 10.1126/science.7638622
- Liu Q.Y., Chang M.N.V., Lei J.X., Koukiekolo R., Smith B., Zhang D., Ghrabi O. Identification of microRNAs involved in Alzheimer's progression using a rabbit model of the disease. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2014;3(1):33-44
- Lu L., Dai W., Zhu X., Ma T. Analysis of serum miRNAs in Alzheimer's disease. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.* 2021;36:15333175211021712. DOI 10.1177/15333175211021712
- Ma F.C., Wang H.F., Cao X.P., Tan C.C., Tan L., Yu J.T. Meta-analysis of the association between variants in ABCA7 and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2018;63(4):1261-1267. DOI 10.3233/JAD-180107
- Macciardi F., Bacalini M.G., Miramontes R., Boattini A., Taccioli C., Modenini G., Malhas R., Anderlucci L., Gusev Y., Gross T.J., Paddilla R.M., Fiandaca M.S., Head E., Guffanti G., Federoff H.J., Mapstone M. A retrotransposon storm marks clinical phenocopy conversion to late-onset Alzheimer's disease. *Geroscience*. 2022;44(3):1525-1550. DOI 10.1007/s11357-022-00580-w
- Majumder P., Chanda K., Das D., Singh B.K., Charkrabarti P., Jana N.R., Mukhopadhyay D. A nexus of miR-1271, PAX4 and ALK/Ryk influences the cytoskeletal architectures in Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *Biochem. J.* 2021;478(17):3297-3317. DOI 10.1042/BCJ20210175
- Marioni R.E., Harris S.E., Zhang Q., McRae A.F., Hagenaars S.P., Hill W.D., Davies G., Ritchie C.W., Gale C.R., Starr J.M., Goate A.M., Porteous D.J., Yang J., Evans K.L., Deary I.J., Wray N.R., Visscher P.M. GWAS on family history of Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry*. 2018;8(1):99. DOI 10.1038/s41398-018-0150-6
- Niu H., Alvarez-Alvarez I., Guillen-Grima F., Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia*. 2017;32(8):523-532. DOI 10.1016/j.nrl.2016.02.016
- Noren Hooten N., Fitzpatrick M., Wood W.H. 3rd, De S., Ejiogu N., Zhang Y., Mattison J.A., Becker K.G., Zonderman A.B., Evans M.K. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany N. Y.)*. 2013;5(10):725-740. DOI 10.18632/aging.100603
- Pan W., Hu Y., Wang L., Li J. Circ\_0003611 acts as a miR-885-5p sponge to aggravate the amyloid- $\beta$ -induced neuronal injury in Alzheimer's disease. *Metab. Brain Dis.* 2022;37(4):961-971. DOI 10.1007/s11011-022-00912-x
- Pascarella G., Hon C.C., Hashimoto K., Busch A., Luginbuhl J., Parr C., Yip W.H., Abe K., Kratz A., Bonetti A., Agostini F., Severin J., Murayama S., Suzuki Y., Gustincich S., Frith M., Carninci P. Recombination of repeat elements generates somatic complexity in human genomes. *Cell*. 2022;185(16):3025-3040.e6. DOI 10.1016/j.cell.2022.06.032
- Patel H., Dobson R.J.B., Newhouse S.J. A meta-analysis of Alzheimer's disease brain transcriptomic data. *J. Alzheimers Dis.* 2019;68(4):1635-1656. DOI 10.3233/JAD-181085
- Protasova M.S., Andreeva T.V., Rogaev E.I. Factors regulating the activity of LINE1 retrotransposons. *Genes (Basel)*. 2021;12(10):1562. DOI 10.3390/genes12101562
- Qin Z., Han X., Ran J., Guo S., Lv L. Exercise-mediated alteration of miR-192-5p is associated with cognitive improvement in Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation*. 2022;29(1):36-43. DOI 10.1159/000516928
- Raheja R., Regev K., Healy B.C., Mazzola M.A., Beynon V., Glehn F.V., Paul A., Diaz-Cruz C., Gholipour T., Glanz B.I., Kivisakk P., Chitnis T., Weiner H.L., Berry J.D., Gandhi R. Correlating serum microRNAs and clinical parameters in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2018;58(2):261-269. DOI 10.1002/mus.26106
- Rahman M.R., Islam T., Turanli B., Zaman T., Faruquee H.M., Rahman M.M., Mollah M.N.H., Nanda R.K., Arga K.Y., Gov E., Moni M.A. Network-based approach to identify molecular signatures and therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Comput. Biol. Chem.* 2019;78:431-439. DOI 10.1016/j.compbiolchem.2018.12.011
- Rahman M.R., Islam T., Zaman T., Shahjaman M., Karim M.R., Huq F., Quinn J.M.W., Holsinger R.M.D., Gov E., Moni M.A. Identification of molecular signatures and pathways to identify novel therapeutic targets in Alzheimer's disease: Insights from a systems biomedicine perspective. *Genomics*. 2020;112(2):1290-1299. DOI 10.1016/j.ygeno.2019.07.018
- Raihan O., Brishti A., Molla M.R., Li W., Zhang Q., Xu P., Khan M.I., Zhang J., Liu Q. The age-dependent elevation of miR-335-3p leads to reduced cholesterol and impaired memory in brain. *Neuroscience*. 2018;390:160-173. DOI 10.1016/j.neuroscience.2018.08.003
- Ramirez P., Zuniga G., Sun W., Beckmann A., Ochoa E., DeVos S., Hyman B., Chiu G., Roy E.R., Cao W., Orr M., Buggia-Prevot V., Ray W.J., Frost B. Pathogenic tau accelerates aging-associated activation of transposable elements in the mouse central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 2022;208:102181. DOI 10.1016/j.pneurobio.2021.102181
- Ravel-Godreuil C., Zhaidi R., Bonnifet T., Joshi R.L., Fuchs J. Transposable elements as new players in neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 2021;595(22):2733-2755. DOI 10.1002/1873-3468.14205
- Robinson M., Lee B.Y., Hane F.T. Recent progress in Alzheimer's disease research. Part 2: genetics and epidemiology. *J. Alzheimers Dis.* 2017;57(2):317-330. DOI 10.3233/JAD-161149
- Rogaev E.I., Lukiw W.J., Lavrushina O., Rogaeva E.A., St. George-Hyslop P.H. The upstream promoter of the  $\beta$ -amyloid precursor protein gene (*APP*) shows differential patterns of methylation in human brain. *Genomics*. 1994;22(2):340-347. DOI 10.1006/geno.1994.1393
- Samadian M., Gholipour M., Hajiesmaeili M., Taheri M., Ghafouri-Fard S. The eminent role of microRNAs in the pathogenesis of


- Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2021;13:641080. DOI 10.3389/fnagi.2021.641080
- Sataranatarajan K., Feliens D., Mariappan M.M., Lee H.J., Lee M.J., Day R.T., Bindu H., Yalamanchili H.B., Choudhury G.G., Barnes J.L., Remmen H.V., Richardson A., Kasinath B.S. Molecular events in matrix protein metabolism in the aging kidney. *Aging Cell.* 2012;11(6):1065-1073. DOI 10.1111/ace1.12008
- Satoh J.I., Kino Y., Niida S. MicroRNA-seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data. *Biomark. Insights.* 2015;10:21-31. DOI 10.4137/BMI.S25132
- Schwartzentruber J., Cooper S., Liu J.Z., Barrio-Hernandez I., Bello E., Kumasaka N., Young A.M.H., Franklin R.J.M., Johnson T., Estrada K., Gaffney D.J., Beltrao P., Bassett A. Genome-wide meta-analysis, fine-mapping and integrative prioritization implicate new Alzheimer's disease risk genes. *Nat. Genet.* 2021;53(3):392-402. DOI 10.1038/s41588-020-00776-w
- Serrano-Pozo A., Das S., Hyman B.T. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol.* 2021;20(1):68-80. DOI 10.1016/S1474-4422(20)30412-9
- Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J.F., Bruni A.C., Montesi M.P., Sorbi S., Rainero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanseau P., Polinsky R.J., Wasco W., Da Silva H.A., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Tanzi R.E., Roses A.D., Fraser P.E., Rommens J.M., St. George-Hyslop P.H. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1995;375(6534):754-760. DOI 10.1038/375754a0
- Sierksma A., Lu A., Salta E., Eynden E.V., Callaerts-Vegh Z., D'Hooge R., Blum D., Buee L., Fiers M., Stooper B.D. Deregulation of neuronal miRNAs induced by amyloid- $\beta$  or TAU pathology. *Mol. Neurodegener.* 2018;13(1):54. DOI 10.1186/s13024-018-0285-1
- Smith R.G., Pishva E., Shireby G., Smith A.R., Roubroeks J.A.Y., Hannon E., Wheildon G., Mastroeni D., Gasparoni G., Riemschneider M., Giese A., Sharp A.J., Schalkwyk L., Haroutunian V., Viechtbauer W., van den Hove D.L.A., Weedon M., Brokaw D., Francis P.T., Thomas A.J., Love S., Morgan K., Walter J., Coleman P.D., Bennett D.A., De Jager P.L., Mill J., Lunnon K. A meta-analysis of epigenome-wide association studies in Alzheimer's disease highlights novel differentially methylated loci across cortex. *Nat. Commun.* 2021;12(1):3517. DOI 10.1038/s41467-021-23243-4
- Smith-Vikos T., Liu Z., Parsons C., Gorospe M., Ferrucci L., Gill T.M., Slack F.J. A serum miRNA profile of human longevity: findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *Aging (Albany N.Y.).* 2016;8(11):2971-2987. DOI 10.18632/aging.101106
- Sun W., Samimi H., Gamez M., Zare H., Frost B. Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies. *Nat. Neurosci.* 2018;21(8):1038-1048. DOI 10.1038/s41593-018-0194-1
- Swarbrick S., Wragg N., Ghosh S., Stolzing A. Systematic review of miRNA as biomarkers in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 2019;56(9):6156-6167. DOI 10.1007/s12035-019-1500-y
- Tan L., Yu J.T., Tan M.S., Liu Q.Y., Wang H.F., Zhang W., Jiang T., Tan L. Genome-wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2014;40(4):1017-1027. DOI 10.3233/JAD-132144
- Tan X., Luo Y., Pi D., Xia L., Li Z., Tu Q. MiR-340 reduces the accumulation of amyloid- $\beta$  through targeting BACE1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) in Alzheimer's disease. *Curr. Neurovasc. Res.* 2020;17(1):86-92. DOI 10.2174/1567202617666200117103931
- Ukai T., Sato M., Akutsu H., Umezawa A., Mochida J. MicroRNA-199a-3p, microRNA-193b, and microRNA-320c are correlated to aging and regulate human cartilage metabolism. *J. Orthop. Res.* 2012;30(12):1915-1922. DOI 10.1002/jor.22157
- Van Meter M., Kashyap M., Rezazadeh S., Geneva A.J., Morello T.D., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat. Commun.* 2014;5:5011. DOI 10.1038/ncomms6011
- Wang D., Fei Z., Wang H. MiR-335-5p inhibits  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) accumulation to attenuate cognitive deficits through targeting c-jun-N-terminal kinase 3 in Alzheimer's disease. *Curr. Neurovasc. Res.* 2020;17(1):93-101. DOI 10.2174/1567202617666200128141938
- Watcharanurak P., Mutirangura A. Human RNA-directed DNA-methylation methylates high-mobility group box 1 protein-produced DNA gaps. *Epigenomics.* 2022;14(12):741-756. DOI 10.2217/epi-2022-0022
- Wei G., Qin S., Li W., Chen L., Ma F. MDTE DB: a database for microRNAs derived from Transposable element. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 2016;13:1155-1160. DOI 10.1109/TCBB.2015.2511767
- Wong N.W., Chen Y., Chen S., Wang X. OncomiR: and online resource for exploring pan-cancer microRNA dysregulation. *Bioinformatics.* 2018;34(4):713-715. DOI 10.1093/bioinformatics/btx627
- Wood J.G., Helfand S.L. Chromatin structure and transposable elements in organismal aging. *Front. Genet.* 2013;4:274. DOI 10.3389/fgene.2013.00274
- Xu X., Gu D., Xu B., Yang C., Wang L. Circular RNA circ\_0005835 promotes neural stem cells proliferation and differentiate to neuron and inhibits inflammatory cytokines levels through miR-576-ep in Alzheimer's disease. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2022;29(24):35934-35943. DOI 10.1007/s11356-021-17478-3
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y. FISHing for chromosome instability and aneuploidy in the Alzheimer's disease brain. *Methods Mol. Biol.* 2023;2561:191-204. DOI 10.1007/978-1-0716-2655-9\_10
- Zhang H., Yang H., Zhang C., Jing Y., Wang C., Liu C., Zhang R., Wang J., Zhang J., Zen K., Zhang C., Li D. Investigation of microRNA expression in human serum during the aging process. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2015;70(1):102-109. DOI 10.1093/Gerona/glu145
- Zhang T., Brinkley T.E., Liu K., Feng X., Marsh A.P., Kritchevsky S., Zhou X., Nicklas B.J. Circulating miRNAs as biomarkers of gait speed responses to aerobic exercise training in obese older adults. *Aging (Albany N.Y.).* 2017;9(3):900-913. DOI 10.18632/aging.101199
- Zhao X., Wang S., Sun W. Expression of miR-28-3p in patients with Alzheimer's disease before and after treatment and its clinical value. *Exp. Ther. Med.* 2020;20(3):2218-2226. DOI 10.3892/etm.2020.8920
- Zheng D., Sabbagh J.J., Blair L.J., Darling A.L., Wen X., Dickey C.A. MicroRNA-511 binds to FKBP5 mRNA, which encodes a chaperone protein, and regulates neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* 2016;291(34):17897-17906. DOI 10.1074/jbc.M116.727941

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.11.2022. После доработки 30.10.2023. Принята к публикации 02.11.2023.

DOI 10.18699/vjgb-24-28

## Невирусные системы внутриклеточной доставки инструментов редактирования генома


И.Х. Шайхутдинов , П.В. Ильясов  , О.В. Грибкова , Л.В. Лимарева Самарский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия  
 p.v.ilyasov@samsmu.ru

**Аннотация.** Последние десятилетия отмечены интенсивным развитием технологий и систем редактирования генов, которое вывело генную инженерию на новый уровень. Важным звеном этих технологий является специфичная и эффективная доставка компонентов таких систем в клетки-мишени. Традиционные векторы не всегда подходят для этой цели ввиду ограниченного объема полезной нагрузки, рисков, связанных с канцерогенезом и иммуногенностью, токсичности, необходимости высокой степени очистки и оценки качества полученных вирусных носителей, а также возможности встраивания вируса в геном хозяина, что может приводить к сверхэкспрессии компонентов вируса и проблемам с безопасностью. Это обуславливает актуальность поиска новых средств внутриклеточной доставки белков и нуклеиновых кислот. В данной работе приведен обзор абиотических векторов и систем доставки инструментов для редактирования генома, включая липосомы и твердые липидные наночастицы, мембранные везикулы иной природы, пептиды, проникающие в клетки, мицеллы, дендримеры, углеродные нанотрубки, неорганические, полимерные и другие наночастицы, металл-органические каркасные полимеры. Рассмотрены их преимущества, недостатки и предпочтительные области применения, а также возможность их использования для доставки систем редактирования генов. Особое внимание уделено металл-органическим каркасным полимерам и их потенциалу в качестве средств избирательной внутриклеточной доставки белков и полинуклеотидов. Сделан вывод о том, что дальнейшее развитие таких векторов и технологий на их основе может привести к появлению безопасных и эффективных систем доставки, способных длительно циркулировать в крови и распознавать клетки-мишени, обеспечивая адресное высвобождение полезной нагрузки в неизменном состоянии и тем самым улучшая результаты редактирования генов.

Ключевые слова: металл-органические каркасные полимеры; везикулы; наночастицы; вирусные векторы; редактирование генов.

**Для цитирования:** Шайхутдинов И.Х., Ильясов П.В., Грибкова О.В., Лимарева Л.В. Невирусные системы внутриклеточной доставки инструментов редактирования генома. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024; 28(2):239-248. DOI 10.18699/vjgb-24-28

## Non-viral systems for intracellular delivery of genome editing tools

I.H. Shaikhutdinov , P.V. Ilyasov  , O.V. Gribkova , L.V. Limareva Samara State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russia  
 p.v.ilyasov@samsmu.ru

**Abstract.** A hallmark of the last decades is an extensive development of genome editing systems and technologies propelling genetic engineering to the next level. Specific and efficient delivery of genome editing tools to target cells is one of the key elements of such technologies. Conventional vectors are not always suitable for this purpose due to a limited cargo volume, risks related to cancer and immune reactions, toxicity, a need for high-purity viral material and quality control, as well as a possibility of integration of the virus into the host genome leading to overexpression of the vector components and safety problems. Therefore, the search for novel approaches to delivering proteins and nucleic acids into cells is a relevant priority. This work reviews abiotic vectors and systems for delivering genome editing tools into target cells, including liposomes and solid lipid particles, other membrane-based vesicles, cell-penetrating peptides, micelles, dendrimers, carbon nanotubes, inorganic, polymer, metal and other nanoparticles. It considers advantages, drawbacks and preferred applications of such systems as well as suitability thereof for the delivery of genome editing systems. A particular emphasis is placed on metal-organic frameworks (MOFs) and their potential in the targeted intracellular delivery of proteins and polynucleotides. It has been concluded that further development of MOF-based vectors and technologies, as well as combining MOFs with other carriers can result in safe and efficient delivery systems, which would be able to circulate in the body for a long time while recognizing target cells and ensuring cell-specific delivery and release of intact cargoes and, thereby, improving the genome editing outcome.

Key words: metal-organic frameworks; vesicles; nanoparticles; viral vectors; gene editing.

**For citation:** Shaikhutdinov I.H., Ilyasov P.V., Gribkova O.V., Limareva L.V. Non-viral systems for intracellular delivery of genome editing tools. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2): 239-248. DOI 10.18699/vjgb-24-28

## Введение

За последние десятилетия были разработаны новые стратегии и инструменты редактирования генов для лечения наследственных и приобретенных заболеваний. К таким инструментам относятся, в частности, специфические синтетические олигонуклеотиды, рекомбинантные нуклеазы с доменами «цинковый палец» (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), системы редактирования генов на базе кластерных коротких палиндромных повторов и ассоциированных с ними ферментов CRISPR/Cas, редакторы оснований в геномной ДНК. Их эффективность напрямую зависит от методов доставки в клетки-мишени и ткани. В настоящее время для этих целей используют различные подходы и векторные системы, которые характеризуются специфическими преимуществами и недостатками.

К основным проблемам доставки, обусловленным природой инструментов редактирования генома, можно отнести большой размер белков систем CRISPR/Cas, TALEN, сильный отрицательный заряд РНК, иммуногенность, низкую эффективность, неспецифические побочные эффекты (Singh D. et al., 2016). Сложность их трансфекции обусловлена также множеством биологических барьеров, затрудняющих проникновение нуклеиновых кислот и белков в клетку и ядро, причем методы и системы доставки, призванные облегчить преодоление таких барьеров, нередко приносят свои сложности и ограничения, снижающие эффективность генетических модификаций клетки-мишени.

Для доставки вышеуказанных инструментов в клетки используют разнообразные физические методы: электропорацию, механопорацию, микроинъекции, гидродинамические инъекции, сонопорацию и т. д. (Moscato, Steer, 2020). Наиболее часто применяют электропорацию вследствие методической простоты, высокой эффективности трансфекции и редактирования генома *in vivo*, а также микроинъекции из-за возможности введения ДНК напрямую в ядра клеток. В частности, при использовании систем CRISPR/Cas микроинъекция позволяет контролировать количество вводимого комплекса Cas/sgRNA и преодолевать ограничения по их молекулярной массе (Wang H.X. et al., 2017). Главными ограничениями для электропорации являются низкая жизнеспособность клеток после манипуляций, а также необходимость адаптации параметров метода к особенностям конкретных клеток и векторов. В случае микроинъекций к таким ограничениям относятся техническая сложность, трудоемкость и дороговизна процедуры. Кроме того, для этих методов доступны не все ткани организма *in vivo*, и их применяют в основном для редактирования генома мелких животных.

Другой подход к доставке нуклеиновых кислот и белков в клетки включает использование векторов, способных проникать в клетки без применения вспомогательных методов. Традиционно для этих целей используют вирусные векторы, поскольку они обладают оптимизированными в ходе эволюции механизмами внедрения генетического материала в клетки организма-хозяина. Они характеризуются высокой стабильностью, легко проникают через биологические барьеры, способны осуществлять эффективную трансфекцию и индукцию долговременной экс-

прессии генов, а также инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки (Huang et al., 2011). Вместе с тем у вирусных векторов существуют серьезные недостатки, к которым относятся ограниченный объем загрузки материала, риск канцерогенеза, иммуногенность, токсичность, необходимость высокой степени очистки и оценки качества полученных вирусных носителей. Кроме того, многие вирусные векторы интегрируются в геном клетки-мишени, что может привести к избыточной экспрессии компонентов системы редактирования генов и проблемам с безопасностью их применения (Hanlon et al., 2019).

В связи с этим одной из важных задач являются поиск и разработка альтернативных невирусных векторных систем различной природы, способных связывать нуклеиновые кислоты и белки и высвобождать их контролируемым образом. Такие системы доставки должны обладать рядом важных преимуществ, в частности возможностью загрузки компонентов большого размера для доставки, простотой формирования, пониженной токсичностью, минимальным иммунным ответом, настраиваемыми свойствами, необходимыми для практического применения. Почти все синтетические векторы несут положительный заряд, необходимый для электростатического комплексообразования с ДНК (Mintzer, Simanek, 2009). По сравнению с другими системами доставки они способны транспортировать редактирующие комплексы в различных формах, включая ДНК, рибонуклеопротеиды и мРНК (Liu C. et al., 2019; Niggemann et al., 2020). Немаловажен тот факт, что доставка, опосредованная невирусными векторами, носит временный характер, что предпочтительно при некоторых вариантах редактирования генов. Компоненты систем редактирования генов разрушаются вскоре после попадания в клетки, что приводит к снижению нецелевых эффектов (Mout et al., 2017a). Кроме того, многие невирусные векторные системы можно производить с заданными параметрами в промышленных масштабах.

Внимания заслуживают такие системы доставки инструментов редактирования генома, как липосомы и твердые липидные наночастицы, мембранные везикулы иной природы, пептиды, проникающие в клетки, мицеллы, дендримеры, углеродные нанотрубки, неорганические, полимерные и другие наночастицы, металл-органические каркасные полимеры (МОКП). Преимущества и недостатки ряда из них приведены в таблице, более подробная информация представлена в следующих разделах.

## Наночастицы на основе липидов

Перенос генов, опосредованный липосомами, был одной из самых ранних стратегий введения экзогенного генетического материала в клетки-мишени (Mintzer et al., 2009). В настоящее время широко применяют липосомы различного состава, содержащие катионные липиды, полиэтиленгликоль, холестерин, фосфолипиды, диолеилфосфатидную кислоту и др. (Kim et al., 2020; Patel et al., 2020). Они легко проникают в клетки-мишени, а опосредованная ими доставка значительно снижает эффекты по отношению к нецелевым тканям и органам по сравнению с доставкой CRISPR на основе ДНК-векторов (Yeh et al., 2018). Это обуславливает актуальность исследований липидных носителей в качестве систем доставки инстру-

Сводная информация о преимуществах и недостатках невирусных систем доставки средств редактирования генома

Системы доставки	Преимущества	Недостатки
Липосомы и липидные частицы	Простота получения Эффективность адресной доставки Возможность адаптации под конкретные цели Возможность контролируемого высвобождения	Склонность к агрегации Сложности с контролем размера и стабильности
Внеклеточные везикулы	Биосовместимость Эффективность и специфичность доставки Защита связанных компонентов	Относительно низкая стабильность Отсутствие стандартизированных методов получения
Пептиды, проникающие в клетки	Низкая токсичность Эффективность трансфекции Возможность управления структурой носителя	Риск иммунизации Низкая специфичность
Дендримеры	Возможность управления свойствами носителя Защита связанных компонентов Эффективность трансфекции	Токсичность
Полимерные наночастицы	Простота получения Безопасность Возможность управления свойствами носителя	Относительно низкая эффективность доставки
Наночастицы металлов	Биосовместимость Широкий спектр связываемых компонентов Эффективность доставки	Описанные случаи токсичности и иммуногенности
Металл-органические каркасные полимеры	Простота получения Биосовместимость Возможность управления характеристиками пор Защита связанных компонентов Возможность контролируемого высвобождения нагрузки	Относительно низкая эффективность и специфичность адресной доставки Описанные случаи токсичности и иммуногенности

ментов редактирования генов. Например, в работе (Andey et al., 2019) был сконструирован липоплекс, инкапсулировавший малую интерферирующую РНК (миРНК) фактора транскрипции SOX2 для адресной терапии SOX2-обогащенных опухолей легких у бестимусных мышей СВ-17. У 85 % животных после введения липоплекса произошло уменьшение массы и объема опухоли, что ассоциировалось со снижением экспрессии белка SOX2. В обзоре (Lu Z.R. et al., 2021) представлена сводная информация по применению DODAP, а также других ионизируемых, рН-чувствительных и реагирующих на иные изменения окружающей среды липидов для получения наночастиц, включающих молекулы миРНК для онкотерапии и адресного сайленсинга онкогенов. Использование липидных наночастиц для внутриклеточной доставки регуляторных РНК описано в публикациях (Wang C. et al., 2021; Euygeris et al., 2022) и в комплексном обзоре применения липидов и их производных для доставки РНК (Zhang Y. et al., 2021). В этих работах указаны различные подходы и преимущества липидных наночастиц, включая относительную простоту адресной доставки, возможность контролируемого высвобождения, защиту частиц от агрегации и уничтожения иммунной системой в кровотоке за счет использования ПЭГ и других защитных молекул, избегание эндосомного разрушения наночастиц и т. д.

Существуют коммерческие липидные наночастицы для трансфекции, например Lipofectamine 2000, Lipofectamine 3000, RNAiMAX, которые применяют для доставки компонентов CRISPR/Cas9 в виде смеси мРНК Cas9 и гРНК и рибонуклеопротеидов в различные клетки (Yu X.

et al., 2016). Липидные наночастицы позволяют инкапсулировать и доставлять в клетки-мишени одновременно несколько типов РНК (мРНК и миРНК) (Ball et al., 2018). Кроме того, их можно адаптировать для конкретного пути введения, вида клеток и типа инструмента редактирования генома (Liu J. et al., 2019; Lokugamage et al., 2021).

Тем не менее трудности контроля размера, однородности и стабильности липидных наночастиц ограничивают их применение, в частности, при генной терапии *in vivo*. В ряде случаев эти трудности удается преодолеть за счет модификации поверхности наночастиц ПЭГ и другими полимерами либо использования ядер наночастиц иной природы (например, из золота или полистирола), поверх которых формируются липидные слои с включенным содержимым (Yan et al., 2022). Однако в целом это затрудняет получение и применение подобных носителей и в ряде случаев обуславливает целесообразность отказа от таких систем в пользу других биогенных и абиогенных векторов.

### Внеклеточные везикулы: экзосомы и микровезикулы

Для доставки инструментов редактирования генома *in vitro* и *in vivo* без повреждения их в физиологических жидкостях и внеклеточном пространстве в ряде работ предлагают использовать носители-везикулы естественного происхождения на основе клеточных мембран: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца.

Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы, генерируемые всеми клетками. Благодаря их небольшому размеру, превосходной биосовместимости, способности

переносить биомолекулы в другие клетки и специфической экспрессии рецепторов клеточной поверхности, их первоначально рассматривали в качестве носителей для доставки лекарственных средств. В дальнейшем эксперименты показали, что экзосомы, несущие миРНК, могут защищать свою полезную нагрузку от ферментативного гидролиза (период полужизни > 48 ч), тогда как свободная миРНК имеет период полужизни менее 6 ч (Yang Z. et al., 2016). Кроме того, включение миРНК в экзосомы значительно улучшало ее поглощение клетками.

Kamerkar S. с коллегами сконструировали экзосомы, несущие миРНК, мишенью которой являлась протоонкогенная ГТФаза KRAS. Применение этих экзосом подавляло развитие опухолей при различных моделях рака поджелудочной железы у мышей и значительно увеличивало общую выживаемость (Kamerkar et al., 2017).

Для снижения потенциальной иммуногенности экзосом с миРНК и белками при введении мышам с болезнью Альцгеймера использовали везикулы, образуемые дендритными клетками мышцы (Alvarez-Erviti et al., 2011). При этом характерные для клеток-мишеней белки соединяли с Lamp2b – белком, в большом количестве присутствующим в мембранах экзосом. Подобная модификация везикул приводила к эффективному нокдауну гена, специфичному по отношению к типу клеток, и позволяла минимизировать иммунный ответ.

Более того, в экспериментах выяснено, что модифицированные экзосомы способны доставлять направляющую РНК и белок Cas9 от клетки к клетке в линии NuH7 (Chen R. et al., 2019). Исследователи показали, что межклеточная доставка компонентов системы CRISPR/Cas9 позволяла специфично разрезать ДНК вируса гепатита В и вируса папилломы в клетках, инфицированных этими вирусами.

Несмотря на то что транспорт инструментов редактирования генома *in vivo* с помощью экзосом не демонстрировал явных побочных эффектов, эффективность загрузки и адресной доставки нуклеиновых кислот и белков с их помощью до конца не изучена. Дополнительным ограничением применения экзосом в клинической практике является отсутствие стандартизации методов их выделения и анализа (Doyle, Wang, 2019). Таким образом, необходимо детальное изучение механизмов и последствий доставки полезной нагрузки с помощью везикул данного типа, поскольку результат может сильно зависеть от используемых систем и клеток.

Другой тип внеклеточных везикул – микровезикулы – тоже привлекает к себе внимание исследователей как потенциальное средство доставки. В отличие от экзосом, которые формируются эндосомным путем, микровезикулы образуются непосредственно из плазматической мембраны. Они крупнее экзосом, что позволяет увеличить полезную нагрузку (Kanada et al., 2015). Потенциал микровезикул, происходящих из эпителиальных клеток, в качестве системы доставки CRISPR/Cas9 и сорафениба оценивали на модели гепатоцеллюлярной карциномы (Samuel et al., 2020), продемонстрировав усиленный хоминг микровезикул по отношению к опухолевым клеткам и синергическое противоопухолевое действие загруженных агентов. В ряде работ описано также применение

микровезикул для доставки миРНК и микроРНК в клетки с целью регуляции внутриклеточных и тканевых процессов, например фиброза, подавления опухолевого роста и т. д. (Vader et al., 2017; Stolzenburg, Harris, 2018).

### Пептиды, проникающие в клетки

Эффективная система доставки должна работать в различных тканях, обеспечивать быстрое высвобождение из носителя, быть функциональной при низких дозах, нетоксичной и простой в использовании в клинических условиях. Такими свойствами, в частности, обладают пептиды, проникающие в клетки (ППК). Они способны связываться с различными молекулами, взаимодействовать с мембранными структурами, проникать внутрь клеток и доставлять свою нагрузку в цитоплазму или ядро. Известно большое количество таких пептидов, способных ковалентно или нековалентно связывать целевые молекулы и транслоцироваться в клетки за счет непосредственного перехода через мембрану, эндоцитоза или формирования транспортного канала в мембране. Благодаря ряду преимуществ ППК на данный момент применяются в исследованиях для транспортировки малых РНК/ДНК, плазмид, антител и наночастиц в клетки. Среди их достоинств следует отметить контролируемую низкую токсичность, высокую эффективность трансфекции, гибкость структурной конструкции (Lopez-Vidal et al., 2021).

В работе (Ramakrishna et al., 2014) ППК конъюгировали с модифицированным белком Cas9 и направляющей РНК для индукции генетических нарушений в сайте-мишени в эмбриональных стволовых клетках, фибробластах дермы, клетках HEK293T, HeLa и клетках эмбриональной карциномы человека. Данная система доставки инструментов редактирования генома обеспечила эффективное нарушение экспрессии генов с уменьшением количества мутаций вне мишеней по сравнению с трансфекцией плазмидами.

Lopez-Vidal E.M. с коллегами успешно использовали конъюгат синтезированных коротких пептидов с низким содержанием аргинина и антисмысловых олигонуклеотидов для трансфекции клеток HeLa654, а также ткани сердца трансгенных мышей *in vivo* (Lopez-Vidal et al., 2021).

Показана эффективность ППК как векторов для доставки генов в комплексе с модифицированными вирусами, плазмидной ДНК, малыми интерферирующими РНК, олигонуклеотидами, платформами ДНК-оригами, полноразмерными генами и др. (Taylor, Zahid, 2020). К особенностям, ограничивающим их применение, относятся высокая молекулярная масса, риск иммунизации организма хозяина и недостаточная специфичность доставки.

### Дендримеры

Еще одним примером абиогенных векторов являются дендримеры. Среди достоинств их применения отмечают безопасность, отсутствие иммуногенности, высокую эффективность, воспроизводимость, контролируемый размер и возможность широкой модификации структур, способность образовывать стабильные комплексы с различными молекулами и выполнять одновременную доставку нескольких видов молекул (например, лекарственного средства и гена) (Abedi-Gaballu et al., 2018). Они также

могут стимулировать выход полезной нагрузки из эндосом после проникновения в клетку за счет эффекта «протонной губки». К молекулам дендримеров можно присоединять различные функциональные группы и лиганды, например, антитела и сигнальные молекулы, зонды для визуализации, фотосенсибилизаторы и др. (Kim et al., 2020). Одно из уникальных свойств дендримеров – химическая и физическая стабильность, обусловленная их химической структурой (Kalomiraki et al., 2016).

Дендримеры представляют собой сильно разветвленные синтетические макромолекулы с четко определенной структурой и составом. Эти носители создают путем повторной сборки полимерных слоев вокруг центрального ядра. Существует много различных типов дендримеров: пептидные, поли(L-лизиновые), полиамидаминовые (РАМАМ), кремнийорганические, полиэтилениминовые дендримеры и др. В качестве систем доставки терапевтических молекул и генов наиболее широко изучены РАМАМ-дендримеры. Они образуют стабильные комплексы с ДНК, мРНК и микроРНК, называемые «дендриplexами». Эти комплексы демонстрируют высокую эффективность трансфекции и способность защищать нуклеиновые кислоты от разрушения (Fant et al., 2008). Благодаря модификациям возможно создание различных производных РАМАМ-дендримеров с пониженной токсичностью, повышенной клеточной специфичностью и эффективностью доставки генов (Abedi-Gaballu et al., 2018; Liu C. et al., 2019).

В последнее десятилетие обычно используются три стратегии модификации дендримеров: 1) модификация поверхности функциональными группами (Yang J. et al., 2015); 2) формирование гибридного вектора (Biswas et al., 2013); 3) создание самособирающихся супрамолекулярных наночастиц (Yadav et al., 2020).

Примером первой стратегии может служить работа (Nagasaki, Shinkai, 2007), в которой использовали катионный полиазобензолный дендример, модифицированный L-лизином (Lys-G2). Данный дендример в комплексе с плазмидной ДНК после включения его в цитоплазму и последующего УФ-облучения обеспечивал повышенную эффективность трансфекции.

Согласно второй стратегии выполняют сопряжение различных лигандов, полимеров, неорганических наночастиц с поверхностью комплекса дендримеров (Lin et al., 2018), что улучшает свойства дендримера как носителя молекул. Mbatha L.S. с коллегами (Mbatha et al., 2021) при разработке гибридных носителей модифицировали наночастицы золота фолиевой кислотой и полиамидо-аминами 5-го поколения. Оценку их цитотоксичности и трансгенной экспрессии выполняли с использованием репортерного гена люциферазы *in vitro*. Гибридные векторы вызывали повышенную экспрессию гена люциферазы по сравнению с РАМАМ-дендримерами с фолиевой кислотой и несвязанными дендримерами.

Примером третьей стратегии модификации дендримеров является исследование, в котором были созданы супрамолекулярные наночастицы переменного размера (30–450 нм) из трех различных молекулярных строительных блоков: РАМАМ-дендримера с адамантаном, разветвленного полиэтиленimina с конъюгированным цикло-

декстрином и полиэтиленгликоля с адамантаном (Lu S. et al., 2020). Данные наночастицы использовали в качестве вектора для доставки агентов для РНК-интерференции в целях противоопухолевой терапии, что привело к снижению васкуляризации и подавлению роста ксенотрансплантатов опухоли легкого на модели мыши.

В исследовании (Zarebkohan et al., 2015) был разработан РАМАМ-ПЭГ-дендример с покрытием из трипептида «серин-аргинин-лейцин» (SRL) для доставки генов в клетки линии глиомы C6. Результаты показали, что наночастицы такого дендримера обладают хорошей эффективностью при трансфекции клеток опухолей головного мозга.

Таким образом, дендримеры – перспективные средства доставки генетического материала и инструментов редактирования генов. Вместе с тем одним из главных ограничений их применения является токсичность, причем дендримеры 3–5-го поколений менее токсичны, чем дендримеры более высоких поколений (Shcharbin et al., 2013). Кроме того, цитотоксичность дендримеров зависит от количества и характера поверхностных групп, а также от эластичности ветвей дендримеров (Tang et al., 1996), гидрофобности, модификаций поверхности и ядра (Somani et al., 2018). Широкий спектр модификаций перечисленных параметров позволяет найти наиболее подходящую из них для минимизации негативных свойств дендримеров в качестве носителей.

## Полимерные наночастицы

Полимерные наночастицы обладают химическим разнообразием и большим потенциалом за счет гибких структурных модификаций. Они используются для доставки нуклеиновых кислот и других веществ в клетки и ткани организма.

Строительными единицами этих носителей служат различные природные и синтетические полимеры. Природные макромолекулы имеют ряд преимуществ перед синтетическими, которые в основном сводятся к отсутствию токсичности, относительно низкой стоимости и простоте получения. К ним относят целлюлозу, крахмал, желатин, коллаген, хитозан, агар, пектин, инулин, декстрин и др. Эти биополимеры можно модифицировать с целью создания систем доставки для решения конкретных задач (Yadav et al., 2020; Basinska et al., 2021). Например, среди природных полимерных носителей для доставки CRISPR/Cas9 чаще используют хитозан. Его основными достоинствами являются биосовместимость, отсутствие цитотоксичности и биоразлагаемость. Авторы работы (Qiao et al., 2019) инкапсулировали в хитозановые наночастицы красный флуоресцентный белок и комплексы Cas9/рибонуклеопротеид с полиглутаматной пептидной меткой и донорской ДНК. Полимерный носитель позволял одновременно доставлять в клетки как инструмент для редактирования генома, так и матрицу в виде одноцепочечной ДНК и демонстрировал высокую эффективность трансфекции клеток линии HeLa при отсутствии цитотоксичности (Qiao et al., 2019).

Список синтетических полимеров тоже достаточно велик. Среди них в качестве средств доставки наиболее часто используют полимолочную и полигликолевую кислоту, их сополимеры, поликапролактон, полигидроксibuтират

и др. Они характеризуются хорошей биосовместимостью и биоразлагаемостью, что позволило найти им широкое применение в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве и т. д. (Singh A.V., 2011; Zhang S. et al., 2021).

Ведутся разработки по созданию носителей сложного состава, одновременно включающих несколько полимеров, что позволяет компенсировать недостатки одних компонентов за счет достоинств других. Так, в статье (Luo et al., 2018) использовали блок-сополимер полиэтиленгликоля,  $\beta$ -поли(молочной-гликолевой) кислоты и катионных липидов в целях получения специализированных наночастиц для доставки мРНК Cas9 и плазмид CRISPR/Cas9 в макрофаги. Полученные носители вызывали специфическую экспрессию Cas9 в макрофагах, а также в моноцитах *in vitro* и *in vivo*.

Rui Y. с коллегами синтезировали различные полимеры из карбоксилированных разветвленных поли( $\beta$ -аминоэфиров) за счет ступенчатой сополимеризации. Результаты их исследований показали, что полимер, кэпированный лигандом C5, обеспечивал максимальную эффективность высвобождения полезной нагрузки после поглощения клетками. В дальнейшем из него были созданы наночастицы для инкапсуляции рибонуклеопротеинов системы CRISPR-Cas9. Обнаружено, что доставка инструментов редактирования генома привела к 77 и 47 % нокауту целевого гена в клетках HEK-293T и в клетках глиомы мыши GL261 соответственно (Rui et al., 2019).

Таким образом, полимерные наночастицы в большинстве случаев безопасны, их легко синтезировать и придавать им определенные свойства. Кроме того, они разлагаются в организме и подходят для всех стратегий доставки системы CRISPR-Cas9. Тем не менее эффективность доставки за их счет считается недостаточно высокой (Liu C. et al., 2019).

### Наночастицы золота

Существует ряд работ, в которых проблемы на пути доставки *in vitro* и *in vivo* инструментов редактирования генома предлагается решать с использованием наночастиц золота в качестве основы вектора. Показано, что наночастицы золота малого размера (до 3 нм) биосовместимы, не обладают цитотоксичностью и иммуногенностью (Shukla et al., 2005). С наночастицами золота можно связывать различные лиганды, лекарственные средства, инструменты редактирования генома, что расширяет диапазон их применения.

При использовании наночастиц золота для внедрения рибонуклеопротеидов в целях редактирования генов в клетки головного мозга продемонстрировано отсутствие цитотоксичности и неблагоприятного воздействия на работу нейронов (Lee et al., 2018). В работе (Glass et al., 2017) описано успешное применение наночастиц золота с компонентами CRISPR для устранения мутации ДНК, вызывающей мышечную дистрофию Дюшенна у мышей, при минимальных неспецифических эффектах. А в исследовании (Jia et al., 2017) наночастицы золота, ковалентно конъюгированные с нуклеиновыми кислотами (миРНК), обеспечили успешную доставку полезной нагрузки в макрофаги, что привело к уменьшению воспаления и вос-

становлению сердечной функции у экспериментальных животных с кардиомиопатией.

В работе (Mout et al., 2017b) наночастицы золота, покрытые аргинином, конъюгировали с синтезированными конструктами на основе рибонуклеотидов и белка Cas9, меченного олигоглутаматным маркером. Эти комплексы инкубировали с культурами HeLa, HEK-293T и Raw 264.7. Разработанная система доставки белка Cas9 и рибонуклеотидов продемонстрировала высокую эффективность переноса полезной нагрузки в цитоплазму и ядро (около 90 %), а эффективность редактирования генома составила от 23 до 30 %. В исследовании (Tao et al., 2021) показана возможность использования наночастиц золота с модифицированной поверхностью для мониторинга биологических эффектов в режиме реального времени при редактировании генов.

К ограничениям применения наночастиц золота можно отнести недостаток знаний о взаимосвязи иммуногенности и токсичности с физико-химическими свойствами данного носителя (размером, формой, зарядом и модификациями поверхности) (Dykman, Khlebtsov, 2017). Для снижения токсичности таких носителей и повышения эффективности доставки используют наночастицы сложного состава, включающие полиэтиленмин, полиэтиленгликоль и другие компоненты, способствующие снижению иммуногенности частиц и препятствующие их связыванию с неспецифическими рецепторами (Li Y. et al., 2017).

### Металл-органические каркасные полимеры

В последнее время активно ведутся разработки по применению металл-органических каркасных полимеров (МОКП) в качестве невирусных средств доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени. МОКП представляют собой новый класс пористых материалов. Кристаллическая решетка данных полимеров построена за счет координационных связей между центральными ионами щелочноземельных или переходных металлов (Ca, Mg, Zn, Ti, Zr, Mn, Pd, Cu, Cr, Cd и др.) и органическими лигандами с хелатирующими функциональными группами (Cheetham et al., 1999; Valtchev et al., 2009; Farha et al., 2012; Paz et al., 2012; Furukawa et al., 2013; Yu Y. et al., 2013; Li H. et al., 2018; Corella-Ochoa et al., 2019). В процессе синтеза МОКП образуются пористые высокоупорядоченные кристаллические структуры со строго определенными параметрами пор, способные к адсорбции (Wang Z., Cohen, 2009). Технология синтеза МОКП позволяет также управлять степенью пористости и размером пор в соответствии с параметрами полезной нагрузки.

Кроме того, МОКП определенного состава (например, на основе ионов цинка, кальция, магния, титана, циркония, железа и биосовместимых органических лигандов – поликарбоксилатов, имидазолов, аминов, фосфонатов и др.) характеризуются биоразлагаемостью и низкой токсичностью (Horsajada et al., 2012; Lyu et al., 2021). Поэтому МОКП нашли широкое применение в экспериментальной медицине как носители лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением (Su et al., 2015; Ranjbar et al., 2018; Chen G. et al., 2019; Osorio-Toribio et al., 2020). Особенно часто в таких целях используют наноразмер-



ный цеолитный каркасный полимер имидазола и солей цинка (ZIF). Он характеризуется низкой токсичностью, возможностью настройки параметров пор в широких пределах, pH-буферными свойствами и способностью избегать выведения из клеток в составе эндосом (Alsaïari et al., 2018). Также металл-органические каркасные полимеры широко используются для инкапсулирования биологических активных соединений, например инсулина (Chen Y. et al., 2018), гепарина (Vinogradov et al., 2018), гемоглобина (Peng et al., 2019). Помимо этого, группе исследователей удалось успешно инкапсулировать живые клетки в МОКП, обеспечивавший их консервацию и защиту от физических воздействий (Liang et al., 2016).

Инкапсуляция инструментов редактирования генома в порах таких материалов обеспечивает их защиту от разрушения в физиологических условиях до достижения мишени (Peng et al., 2018). Известны два механизма данного процесса. Первый – инкапсуляция путем абсорбции материала, непосредственно в поры. Так, в работе (Teplensky et al., 2019) описан механизм инкапсуляции молекулы РНК в поры циркониевого МОКП – NU-1000. Вторым механизмом – биоминерализация, в этом случае происходит построение металл-органического каркаса вокруг инкапсулируемого материала (Li Y. et al., 2019).

В работе (Alsaïari et al., 2018) описана инкапсуляция CRISPR/Cas9 в полимер ZIF-8. Масса инкапсулированных компонентов достигала 1.2 % от общей массы полимера, при этом эффективность загрузки пор составляла 17 %, что авторы считали хорошим показателем на фоне ранее зарегистрированных значений для систем доставки на основе МОКП. Полимер не обладал цитотоксическим действием в концентрации до 200 мг/мл, был стабилен при физиологических условиях, но быстро разрушался при pH  $\approx$  5–6, что создает потенциал для контролируемого высвобождения инкапсулированных веществ *in vivo*. Полученный комплекс обладал также усиленной способностью к высвобождению из эндосом (что позволяло ему избегать выведения из клеток-мишеней) по сравнению с катионными липосомами и вызывал двукратное снижение экспрессии гена-мишени при инкубировании в течение 2 суток и трехкратное – при инкубировании в течение 4 суток, что вдвое превышало эффективность нокдауна гена-мишени при использовании липофектамина для доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки.

Для повышения безопасности и эффективности редактирования генома важно обеспечить адресную доставку необходимых инструментов к клеткам-мишеням. Alyami M.Z. с коллегами (Alyami et al., 2020) предложили покрытие на основе мембраны клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 для ZIF-8 с инкапсулированным CRISPR/Cas9. Инкубирование модифицированного таким образом МОКП с клетками MCF-7, HeLa, HDFn и aTC показало, что максимальная эффективность поглощения носителя имела место для клеток MCF-7, тогда как клетки других линий поглощали агент в незначительной степени. Кроме того, трансфекция клеток MCF-7 таким композитом приводила к трехкратному подавлению экспрессии EGFP по сравнению с использованием ZIF, покрытого мембраной клеток HeLa (Alyami et al., 2020).

В настоящее время активно обсуждаются конкретные химические процессы, которые можно применять для контролируемой доставки Cas9/gRNA в клетки с помощью МОКП в присутствии эндогенных или внешних сигналов (Yang X. et al., 2019; Lyu et al., 2021). Так, системы носителей, используемые для проникновения в клетки путем эндоцитоза, попадают в органеллы с кислым содержанием, например эндосомы или лизосомы. С учетом pH внутри клетки, для эффективной инкапсуляции и доставки различных гидрофильных соединений созданы pH-чувствительные гибридные носители, состоящие из диоксида кремния и ZIF (SMOF) (Wang Y. et al., 2020). Наночастицы SMOF с инкапсулированными рибонуклеопротеидами позволили осуществлять эффективное редактирование генома *in vivo* в ткани пигментного эпителия сетчатки мышей посредством субретинальной инъекции.

Патологически измененные клетки и ткани нередко характеризуются уникальной микросредой со специфическим pH и уровнями других активных веществ, например, ферментов и АТФ, что можно использовать для избирательной доставки с применением МОКП. В работе (Yang X. et al., 2019) авторы, опираясь на тот факт, что при некоторых патологических явлениях в клетках активируется продукция АТФ, создали АТФ-чувствительный цеолитный каркасный полимер на основе имидазола и ионов цинка (ZIF-90). Данный материал эффективно инкапсулировал CRISPR/Cas9 и обеспечивал доставку большого количества белковой нагрузки в цитозоль, независимо от размера и молекулярной массы частиц. В присутствии АТФ комплексы ZIF-90/белок разрушались с высвобождением белка вследствие конкурентной координации между АТФ и  $Zn^{2+}$  ZIF-90. После трансфекции отмечено подавление экспрессии гена-мишени в клетках HeLa с эффективностью до 35 % (Yang X. et al., 2019).

Результаты исследования (Chen T.T. et al., 2018) тоже продемонстрировали, что наночастицы ZIF-8 способны быстро высвобождать инкапсулированные белковые соединения в кислой среде, но не при pH 7.4, что может быть предпочтительно при некоторых патологических состояниях.

Несмотря на определенные успехи и перспективность разработки МОКП в качестве носителей инструментов редактирования генома, в этой области остаются вопросы, требующие решения. В частности, необходимы исследования: 1) для повышения специфичности и эффективности адресного воздействия наночастиц МОКП; 2) для увеличения стабильности комплексов МОКП с биомолекулами в кровотоке при внутривенном введении; 3) для поиска путей снижения иммуногенности и токсичности; 4) для оценки долгосрочной безопасности носителей; 5) для разработки крупномасштабного производства носителей с заданными параметрами (Lyu et al., 2021; Zheng et al., 2021).

## Заключение

В настоящее время существуют разнообразные методы и системы доставки инструментов редактирования генома. Они обладают как уникальными достоинствами, так и недостатками. При этом надо признать невозможность разработки единственного универсального типа носителя

для доставки таких агентов. Очевидно, что выбор и применение тех или иных вирусных и невирусных векторов должны определяться в первую очередь спецификой решаемых задач. В частности, для комплексной загрузки нескольких веществ и компонентов, которая особенно актуальна при реализации методов редактирования генов, предпочтительно использовать синтетические носители. Поэтому все чаще высказываются предложения о комбинировании различных невирусных систем доставки. Например, в ряде случаев целесообразна доставка генов и терапевтических агентов с помощью проникающих в клетки пептидов в комплексе с наночастицами, мицеллами, липосомами, полимерами. В этом контексте большим потенциалом обладают носители на основе МОКП, обеспечивающие возможность реализации широкого спектра характеристик. Дальнейшее развитие таких векторов и технологий на их основе может привести к появлению безопасных и эффективных систем доставки, способных длительно циркулировать в крови и распознавать клетку-мишень, обеспечивая адресное высвобождение полезной нагрузки в неизменном состоянии.

## Список литературы / References

- Abedi-Gaballu F., Dehghan G., Ghaffari M., Yekta R., Abbaspour-Ravvasjani S., Baradaran B., Dolatabadi J.E.N., Hamblin M.R. PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy. *Appl. Mater. Today*. 2018;12:177-190. DOI 10.1016/j.apmt.2018.05.002
- Alsaiaari S.K., Patil S., Alyami M., Alamoudi K.O., Aleisa F.A., Merzaban J.S., Li M., Khashab N.M. Endosomal escape and delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery enabled by nanoscale zeolitic imidazolate framework. *J. Am. Chem. Soc.* 2018;140(1):143-146. DOI 10.1021/jacs.7b11754
- Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhali S., Wood M.J. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(4):341-345. DOI 10.1038/nbt.1807
- Alyami M.Z., Alsaiaari S.K., Li Y., Qutub S.S., Aleisa F.A., Sougra R., Merzaban J.S., Khashab N.M. Cell-type-specific CRISPR/Cas9 delivery by biomimetic metal organic frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* 2020;142(4):1715-1720. DOI 10.1021/jacs.9b11638
- Andey T., Bora-Singhal N., Chellappan S.P., Singh M. Cationic lipoplexes for treatment of cancer stem cell-derived murine lung tumors. *Nanomedicine*. 2019;18:31-43. DOI 10.1016/j.nano.2019.02.007
- Ball R.L., Hajj K.A., Vizelman J., Bajaj P., Whitehead K.A. Lipid nanoparticle formulations for enhanced co-delivery of siRNA and mRNA. *Nano Lett.* 2018;18(6):3814-3822. DOI 10.1021/acs.nanolett.8b01101
- Basinska T., Gadzinowski M., Mickiewicz D., Slomkowski S. Functionalized particles designed for targeted delivery. *Polymers (Basel)*. 2021;13(12):2022. DOI 10.3390/polym13122022
- Biswas S., Deshpande P.P., Navarro G., Dodwadkar N.S., Torchilin V.P. Lipid modified triblock PAMAM-based nanocarriers for siRNA drug co-delivery. *Biomaterials*. 2013;34(4):1289-1301. DOI 10.1016/j.biomaterials.2012.10.024
- Cheetham A.K., Ferey G., Loiseau T. Open-framework inorganic materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1999;38(22):3268-3292. DOI 10.1002/(SICI)1521-3773(19991115)38:22<3268::AID-ANIE3268>3.0.CO;2-U
- Chen G., Luo J., Cai M., Qin L., Wang Y., Gao L., Huang P., Yu Y., Ding Y., Dong X., Yin X., Ni J. Investigation of metal-organic framework-5 (MOF-5) as an antitumor drug oridonin sustained release carrier. *Molecules*. 2019;24(18):3369. DOI 10.3390/molecules24183369
- Chen R., Huang H., Liu H., Xi J., Ning J., Zeng W., Shen C., Zhang T., Yu G., Xu Q., Chen X., Wang J., Lu F. Friend or foe? Evidence indicates endogenous exosomes can deliver functional gRNA and Cas9 protein. *Small*. 2019;15(38):e1902686. DOI 10.1002/sml.201902686
- Chen T.T., Yi J.T., Zhao Y.Y., Chu X. Biomimetic metal-organic framework nanoparticles enable intracellular delivery and endolysosomal release of native active proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2018;140(31):9912-9920. DOI 10.1021/jacs.8b04457
- Chen Y., Li P., Modica J.A., Drou R.J., Farha O.K. Acid-resistant mesoporous metal-organic framework toward oral insulin delivery: protein encapsulation, protection, and release. *J. Am. Chem. Soc.* 2018;140(17):5678-5681. DOI 10.1021/jacs.8b02089
- Corella-Ochoa M.N., Tapia J.B., Rubin H.N., Lillo V., Gonzalez-Cobos J., Nunez-Rico J.L., Balestra S.R.G., Almora-Barrios N., Lledos M., Guell-Bara A., Cabezas-Gimenez J., Escudero-Adan E.C., Vidal-Ferran A., Calero S., Reynolds M., Marti-Gastaldo C., Galan-Mascaros J.R. Homochiral metal-organic frameworks for enantioselective separations in liquid chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 2019;141(36):14306-14316. DOI 10.1021/jacs.9b06500
- Doyle L.M., Wang M.Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*. 2019;8(7):727. DOI 10.3390/cells8070727
- Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Immunological properties of gold nanoparticles. *Chem. Sci.* 2017;8(3):1719-1735. DOI 10.1039/c6sc03631g
- Eygeris Y., Gupta M., Kim J., Sahay G. Chemistry of lipid nanoparticles for RNA delivery. *Acc. Chem. Res.* 2022;55(1):2-12. DOI 10.1021/acs.accounts.1c00544
- Fant K., Esbjörner E.K., Lincoln P., Nordén B. DNA condensation by PAMAM dendrimers: self-assembly characteristics and effect on transcription. *Biochemistry*. 2008;47(6):1732-1740. DOI 10.1021/bi7017199
- Farha O.K., Eryazici I., Jeong N.C., Hauser B.G., Wilmer C.E., Sarjeant A.A., Snurr R.Q., Nguyen S.T., Yazaydin A.O., Hupp J.T. Metal-organic framework materials with ultrahigh surface areas: is the sky the limit? *J. Am. Chem. Soc.* 2012;134(36):15016-15021. DOI 10.1021/ja3055639
- Furukawa H., Cordova K.E., O'Keeffe M., Yaghi O.M. The chemistry and applications of metal-organic frameworks. *Science*. 2013;341(6149):1230444. DOI 10.1126/science.1230444
- Glass Z., Li Y., Xu Q. Nanoparticles for CRISPR-Cas9 delivery. *Nat. Biomed. Eng.* 2017;1(11):854-855. DOI 10.1038/s41551-017-0158-x
- Hanlon K.S., Kleinstiver B.P., Garcia S.P., Zaborowski M.P., Volak A., Spirig S.E., Muller A., Sousa A.A., Tsai S.Q., Bengtsson N.E., Loo C., Ingelsson M., Chamberlain J.S., Corey D.P., Aryee M.J., Joung J.K., Breakefield X.O., Maguire C.A., Gyorgy B. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat. Commun.* 2019;10(1):4439. DOI 10.1038/s41467-019-12449-2
- Horcajada P., Gref R., Baati T., Allan P.K., Maurin G., Couvreur P., Ferey G., Morris R.E., Serre C. Metal-organic frameworks in biomedicine. *Chem. Rev.* 2012;112(2):1232-1268. DOI 10.1021/cr200256v
- Huang Y., Liu X., Dong L., Liu Z., He X., Liu W. Development of viral vectors for gene therapy for chronic pain. *Pain Res. Treat.* 2011;2011:968218. DOI 10.1155/2011/968218
- Jia C., Chen H., Wei M., Chen X., Zhang Y., Cao L., Yuan P., Wang F., Yang G., Ma J. Gold nanoparticle-based miR155 antagonist macrophage delivery restores the cardiac function in ovariectomized diabetic mouse model. *Int. J. Nanomedicine*. 2017;12:4963-4979. DOI 10.2147/IJN.S138400
- Kalimiraki M., Thermos K., Chaniotakis N.A. Dendrimers as tunable vectors of drug delivery systems and biomedical and ocular applications. *Int. J. Nanomedicine*. 2016;11:1-12. DOI 10.2147/IJN.S93069
- Kamerkar S., LeBleu V.S., Sugimoto H., Yang S., Ruivo C.F., Melo S.A., Lee J.J., Kalluri R. Exosomes facilitate therapeutic targeting of on-

- cogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*. 2017;546(7659):498-503. DOI 10.1038/nature22341
- Kanada M., Bachmann M.H., Hardy J.W., Frimannson D.O., Bronsart L., Wang A., Sylvester M.D., Schmidt T.L., Kaspar R.L., Butte M.J., Matin A.C., Contag C.H. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112(12):E1433-1442. DOI 10.1073/pnas.1418401112
- Kim D., Le Q.V., Wu Y., Park J., Oh Y.K. Nanovesicle-mediated delivery systems for CRISPR/Cas genome editing. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1233. DOI 10.3390/pharmaceutics12121233
- Lee B., Lee K., Panda S., Gonzales-Rojas R., Chong A., Bugay V., Park H.M., Brenner R., Murthy N., Lee H.Y. Nanoparticle delivery of CRISPR into the brain rescues a mouse model of fragile X syndrome from exaggerated repetitive behaviours. *Nat. Biomed. Eng.* 2018;2(7):497-507. DOI 10.1038/s41551-018-0252-8
- Li H., Wang K., Sun Y., Lollar C.T., Li J., Zhou H.-C. Recent advances in gas storage and separation using metal-organic frameworks. *Materials Today*. 2018;21(2):108-121. DOI 10.1016/j.mattod.2017.07.006
- Li Y., Chen Y., Li J., Zhang Z., Huang C., Lian G., Yang K., Chen S., Lin Y., Wang L., Huang K., Zeng L. Co-delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy. *Cancer Sci*. 2017;108(7):1493-1503. DOI 10.1111/cas.13267
- Li Y., Zhang K., Liu P., Chen M., Zhong Y., Ye Q., Wei M.Q., Zhao H., Tang Z. Encapsulation of plasmid DNA by nanoscale metal-organic frameworks for efficient gene transportation and expression. *Adv. Mater*. 2019;31(29):e1901570. DOI 10.1002/adma.201901570
- Liang K., Richardson J.J., Cui J., Caruso F., Doonan C.J., Falcaro P. Metal-organic framework coatings as cytoprotective exoskeletons for living cells. *Adv. Mater*. 2016;28(36):7910-7914. DOI 10.1002/adma.201602335
- Lin L., Fan Y., Gao F., Jin L., Li D., Sun W., Li F., Qin P., Shi Q., Shi X., Du L. UTMd-promoted co-delivery of gemcitabine and miR-21 inhibitor by dendrimer-entrapped gold nanoparticles for pancreatic cancer therapy. *Theranostics*. 2018;8(7):1923-1939. DOI 10.7150/thno.22834
- Liu C., Wan T., Wang H., Zhang S., Ping Y., Cheng Y. A boronic acid-rich dendrimer with robust and unprecedented efficiency for cytosolic protein delivery and CRISPR-Cas9 gene editing. *Sci. Adv.* 2019; 5(6):eaaw8922. DOI 10.1126/sciadv.aaw8922
- Liu J., Chang J., Jiang Y., Meng X., Sun T., Mao L., Xu Q., Wang M. Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo* enabled by bio-reducible lipid and messenger RNA nanoparticles. *Adv. Mater*. 2019;31(33):e1902575. DOI 10.1002/adma.201902575
- Lokugamage M.P., Vanover D., Beyersdorf J., Hatit M.Z.C., Rotolo L., Echeverri E.S., Peck H.E., Ni H., Yoon J.K., Kim Y., Santangelo P.J., Dahlman J.E. Optimization of lipid nanoparticles for the delivery of nebulized therapeutic mRNA to the lungs. *Nat. Biomed. Eng.* 2021; 5(9):1059-1068. DOI 10.1038/s41551-021-00786-x
- Lopez-Vidal E.M., Schisse C.K., Mohapatr S., Bellovoda K., Wu C.L., Woo J.A., Malmberg A.B., Loas A., Gomez-Bombarelli R., Pentelute B.L. Deep learning enables discovery of a short nuclear targeting peptide for efficient delivery of antisense oligomers. *JACS Au*. 2021;1(11):2009-2020. DOI 10.1021/jacsau.1c00327
- Lu S., Bao X., Hai W., Shi S., Chen Y., Yu Q., Zhang M., Xu Y., Peng J. Multi-functional self-assembled nanoparticles for pVEGF-shRNA loading and anti-tumor targeted therapy. *Int. J. Pharm.* 2020;575:118898. DOI 10.1016/j.ijpharm.2019.118898
- Lu Z.R., Laney V.E.A., Hall R., Ayat N. Environment-responsive lipid/siRNA nanoparticles for cancer therapy. *Adv. Healthc. Mater*. 2021; 10(5):e2001294. DOI 10.1002/adhm.202001294
- Luo Y.L., Xu C.F., Li H.J., Cao Z.T., Liu J., Wang J.L., Du X.J., Yang X.Z., Gu Z., Wang J. Macrophage-specific *in vivo* gene editing using cationic lipid-assisted polymeric nanoparticles. *ACS Nano*. 2018;12(2):994-1005. DOI 10.1021/acsnano.7b07874
- Lyu Y., Yang C., Lyu X., Pu K. Active delivery of CRISPR system using targetable or controllable nanocarriers. *Small*. 2021;17(24): e2005222. DOI 10.1002/sml.202005222
- Mbatha L.S., Maiyo F., Daniels A., Singh M. Dendrimer-coated gold nanoparticles for efficient folate-targeted mRNA delivery *in vitro*. *Pharmaceutics*. 2021;13(6):900. DOI 10.3390/pharmaceutics13060900
- Mintzer M.A., Simanek E.E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* 2009;109(2):259-302. DOI 10.1021/cr800409e
- Moscoco C.G., Steer C.J. The evolution of gene therapy in the treatment of metabolic liver diseases. *Genes (Basel)*. 2020;11(8):915. DOI 10.3390/genes11080915
- Mout R., Ray M., Lee Y.W., Scaletti F., Rotello V.M. *In vivo* delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. *Bioconjug. Chem.* 2017a;28(4):880-884. DOI 10.1021/acs.bioconjchem.7b00057
- Mout R., Ray M., Yesilbag Tonga G., Lee Y.W., Tay T., Sasaki K., Rotello V.M. Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for efficient gene editing. *ACS Nano*. 2017b;11(3):2452-2458. DOI 10.1021/acsnano.6b07600
- Nagasaki T., Shinkai S. The concept of molecular machinery is useful for design of stimuli-responsive gene delivery systems in the mammalian cell. *J. Incl. Phenom. Macrocy. Chem.* 2007;58(3-4):205-219. DOI 10.1007/s10847-007-9303-6
- Niggemann P., Gyorgy B., Chen Z.Y. Genome and base editing for genetic hearing loss. *Hear. Res.* 2020;394:107958. DOI 10.1016/j.heares.2020.107958
- Osorio-Toribio G., Velasquez-Hernandez M.J., Mileo P.G.M., Zarate J.A., Aguila-Rosas J., Leyva-Gomez G., Sanchez-Sanchez R., Magana J.J., Perez-Diaz M.A., Lazaro I.A., Forgan R.S., Maurin G., Lima E., Ibarra I.A. Controlled transdermal release of antioxidant ferulate by a porous Sc(III) MOF. *iScience*. 2020;23(6):101156. DOI 10.1016/j.isci.2020.101156
- Patel S., Ashwanikumar N., Robinson E., Xia Y., Mihai C., Griffith J.P., Hou S., Esposito A.A., Ketova T., Welsher K., Joyal J.L., Almarsson Ö., Sahay G. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA. *Nat. Commun.* 2020;11(1):983. DOI 10.1038/s41467-020-14527-2
- Paz F.A., Klinowski J., Vilela S.M., Tomé J.P., Cavaleiro J.A., Rocha J. Ligand design for functional metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41(3):1088-1110. DOI 10.1039/C1CS15055C
- Peng S., Bie B., Sun Y., Liu M., Cong H., Zhou W., Xia Y., Tang H., Deng H., Zhou X. Metal-organic frameworks for precise inclusion of single-stranded DNA and transfection in immune cells. *Nat. Commun.* 2018;9(1):1293. DOI 10.1038/s41467-018-03650-w
- Peng S., Liu J., Qin Y., Wang H., Cao B., Lu L., Yu X. Metal-organic framework encapsulating hemoglobin as a high-stable and long-circulating oxygen carriers to treat hemorrhagic shock. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019;11(39):35604-35612. DOI 10.1021/acsmi.9b15037
- Qiao J., Sun W., Lin S., Jin R., Ma L., Liu Y. Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chem. Commun. (Camb)*. 2019; 55(32):4707-4710. DOI 10.1039/c9cc00010k
- Ramakrishna S., Kwaku Dad A.B., Beloor J., Gopalappa R., Lee S.K., Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 2014;24(6): 1020-1027. DOI 10.1101/gr.171264.113
- Ranjbar M., Pardakhty A., Amanatfard A., Asadipour A. Efficient drug delivery of beta-estradiol encapsulated in Zn-metal-organic framework nanostructures by microwave-assisted coprecipitation method. *Drug Des. Devel. Ther.* 2018;12:2635-2643. DOI 10.2147/DDDT.S173324
- Rui Y., Wilson D.R., Choi J., Varanasi M., Sanders K., Karlsson J., Lim M., Green J.J. Carboxylated branched poly(beta-amino ester) nanoparticles enable robust cytosolic protein delivery and CRISPR-


- Cas9 gene editing. *Sci. Adv.* 2019;5(12):eaay3255. DOI 10.1126/sciadv.aay3255
- Samuel M.S., Suman S., Venkateshkannan, Selvarajan E., Mathmani T., Pugazhendhi A. Immobilization of Cu<sub>3</sub>(btc)<sub>2</sub> on graphene oxide-chitosan hybrid composite for the adsorption and photocatalytic degradation of methylene blue. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2020;204:111809. DOI 10.1016/j.jphotobiol.2020.111809
- Shcharbin D., Shakhbazov A., Bryszewska M. Poly(amidoamine) dendrimer complexes as a platform for gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013;10(12):1687-1698. DOI 10.1517/17425247.2013.853661
- Shukla R., Bansal V., Chaudhary M., Basu A., Bhonde R.R., Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.* 2005;21(23):10644-10654. DOI 10.1021/la0513712
- Singh A.V. Biopolymers in drug delivery: a review. *Pharmacology-online.* 2011;1:666-674
- Singh D., Sternberg S.H., Fei J., Doudna J.A., Ha T. Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9. *Nat. Commun.* 2016;7:12778. DOI 10.1038/ncomms12778
- Somani S., Laskar P., Altawajry N., Kewcharoenpong P., Irving C., Robb G., Pickard B.S., Dufès C. PEGylation of polypropylenimine dendrimers: effects on cytotoxicity, DNA condensation, gene delivery and expression in cancer cells. *Sci. Rep.* 2018;8(1):9410. DOI 10.1038/s41598-018-27400-6
- Stolzenburg L.R., Harris A. Microvesicle-mediated delivery of miR-1343: impact on markers of fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2018;371(2):325-338. DOI 10.1007/s00441-017-2697-6
- Su H., Sun F., Jia J., He H., Wang A., Zhu G. A highly porous medical metal-organic framework constructed from bioactive curcumin. *Chem. Commun.* 2015;51(26):5774-5777. DOI 10.1039/c4cc10159f
- Tang M.X., Redemann C.T., Szoka F.C., Jr. *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 1996;7(6):703-714. DOI 10.1021/bc9600630
- Tao Y., Yi K., Hu H., Shao D., Li M. Coassembly of nucleus-targeting gold nanoclusters with CRISPR/Cas9 for simultaneous bioimaging and therapeutic genome editing. *J. Mater. Chem. B.* 2021;9(1):94-100. DOI 10.1039/d0tb01925a
- Taylor R.E., Zahid M. Cell penetrating peptides, novel vectors for gene therapy. *Pharmaceutics.* 2020;12(3):225. DOI 10.3390/pharmaceutics12030225
- Teplensky M.H., Fantham M., Poudel C., Hockings C., Lu M., Guna A., Aragones-Anglada M., Moghadam P.Z., Li P., Farha O.K., Fernández S.B.Q., Richards F.M., Jodrell D.I., Kaminski Schierle G., Kaminski C.F., Fairen-Jimenez D. A highly porous metal-organic framework system to deliver payloads for gene knockdown. *Chem.* 2019;5(11):2926-2941. DOI 10.1016/j.chempr.2019.08.015
- Vader P., Mager I., Lee Y., Nordin J.Z., Andaloussi S.E., Wood M.J. Preparation and isolation of siRNA-loaded extracellular vesicles. *Methods Mol. Biol.* 2017;1545:197-204. DOI 10.1007/978-1-4939-6728-5\_14
- Valtchev V., Mintova S., Tsapatsis M. (Eds.). *Ordered Porous Solids. Recent Advances and Prospects.* Oxford, Amsterdam: Elsevier, 2009. DOI 10.1016/B978-0-444-53189-6.X0001-7
- Vinogradov V.V., Drozdov A.S., Mingabudinova L.R., Shabanova E.M., Kolchina N.O., Anastasova E.I., Markova A.A., Shtil A.A., Milichko V.A., Starova G.L., Precker R.L.M., Vinogradov A.V., Hey-Hawkins E., Pidko E.A. Composites based on heparin and MIL-101(Fe): the drug releasing depot for anticoagulant therapy and advanced medical nanofabrication. *J. Mater. Chem. B.* 2018;6(16):2450-2459. DOI 10.1039/c8tb00072g
- Wang C., Zhang Y., Dong Y. Lipid nanoparticle-mRNA formulations for therapeutic applications. *Acc. Chem. Res.* 2021;54(23):4283-4293. DOI 10.1021/acs.accounts.1c00550
- Wang H.X., Li M., Lee C.M., Chakraborty S., Kim H.W., Bao G., Leong K.W. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery. *Chem. Rev.* 2017;117(15):9874-9906. DOI 10.1021/acs.chemrev.6b00799
- Wang Y., Shahi P.K., Xie R., Zhang H., Abdeen A.A., Yodsanit N., Ma Z., Saha K., Pattnaik B.R., Gong S. A pH-responsive silica-metal-organic framework hybrid nanoparticle for the delivery of hydrophilic drugs, nucleic acids, and CRISPR-Cas9 genome-editing machineries. *J. Control. Release.* 2020;324:194-203. DOI 10.1016/j.jconrel.2020.04.052
- Wang Z., Cohen S.M. Postsynthetic modification of metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* 2009;38(5):1315-1329. DOI 10.1039/b802258p
- Yadav S., Sharma A.K., Kumar P. Nanoscale self-assembly for therapeutic delivery. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020;8:127. DOI 10.3389/fbioe.2020.00127
- Yan Y., Liu X.Y., Lu A., Wang X.Y., Jiang L.X., Wang J.C. Non-viral vectors for RNA delivery. *J. Control. Release.* 2022;342:241-279. DOI 10.1016/j.jconrel.2022.01.008
- Yang J., Zhang Q., Chang H., Cheng Y. Surface-engineered dendrimers in gene delivery. *Chem. Rev.* 2015;115(11):5274-5300. DOI 10.1021/cr500542t
- Yang X., Tang Q., Jiang Y., Zhang M., Wang M., Mao L. Nanoscale ATP-responsive zeolitic imidazole Framework-90 as a general platform for cytosolic protein delivery and genome editing. *J. Am. Chem. Soc.* 2019;141(9):3782-3786. DOI 10.1021/jacs.8b11996
- Yang Z., Xie J., Zhu J., Kang C., Chiang C., Wang X., Wang X., Kuang T., Chen F., Chen Z., Zhang A., Yu B., Lee R.J., Teng L., Lee L.J. Functional exosome-mimic for delivery of siRNA to cancer: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J. Control. Release.* 2016;243:160-171. DOI 10.1016/j.jconrel.2016.10.008
- Yeh W.H., Chiang H., Rees H.A., Edge A.S.B., Liu D.R. *In vivo* base editing of post-mitotic sensory cells. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2184. DOI 10.1038/s41467-018-04580-3
- Yu X., Liang X., Xie H., Kumar S., Ravinder N., Potter J., de Mollerat du Jeu X., Chesnut J.D. Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol. Lett.* 2016;38(6):919-929. DOI 10.1007/s10529-016-2064-9
- Yu Y., Ren Y., Shen W., Deng H., Gao Z. Applications of metal-organic frameworks as stationary phases in chromatography. *Trends Anal. Chem.* 2013;50:33-41. DOI 10.1016/j.trac.2013.04.014
- Zarebkohan A., Najafi F., Moghimi H.R., Hemmati M., Deevband M.R., Kazemi B. Synthesis and characterization of a PAMAM dendrimer nanocarrier functionalized by SRL peptide for targeted gene delivery to the brain. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015;78:19-30. DOI 10.1016/j.ejps.2015.06.024
- Zhang S., Shen J., Li D., Cheng Y. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics.* 2021;11(2):614-648. DOI 10.7150/thno.47007
- Zhang Y., Sun C., Wang C., Jankovic K.E., Dong Y. Lipids and lipid derivatives for RNA delivery. *Chem. Rev.* 2021;121(20):12181-12277. DOI 10.1021/acs.chemrev.1c00244
- Zheng Q., Li W., Mao L., Wang M. Nanoscale metal-organic frameworks for the intracellular delivery of CRISPR/Cas9 genome editing machinery. *Biomater. Sci.* 2021;9(21):7024-7033. DOI 10.1039/d1bm00790d

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.09.2022. После доработки 21.07.2023. Принята к публикации 12.09.2023.

DOI 10.18699/vjgb-24-29


## Проблемы создания фаговых библиотек антител и пути их решения

В.С. Арипов , Н.В. Волкова , А.А. Ильичев , Д.Н. Щербаков Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия  
 aripov\_vs@vector.nsc.ru

**Аннотация.** Фаговый дисплей стал эффективной, надежной и востребованной молекулярной техникой для создания библиотек, содержащих миллионы или даже миллиарды клонов, экспонирующих различающиеся пептиды или белки. В основе этого метода лежит соответствие между генотипом и фенотипом фага, обеспечивающее презентацию на поверхности фаговых частиц рекомбинантных белков с известным аминокислотным составом. Использование процедуры аффинной селекции позволяет проводить отбор из фаговых библиотек вариантов, обладающих сродством к различным мишеням. Внедрение технологии фагового дисплея антител имело революционное значение в области клинической иммунологии, как для создания инструментов диагностики инфекционных заболеваний, так и для получения терапевтических агентов. Она стала также основной эффективной и относительно недорогой методикой исследования белок-белковых взаимодействий, сайтов связывания рецепторов, идентификации эпитопов и мимотопов. Технология фагового дисплея антител включает в себя ряд этапов, от успешной реализации которых зависит финальный результат. Основа любой библиотеки – разнообразие, природное или полученное при помощи методов комбинаторной химии. Критически важным является подбор молекулярных техник, обеспечивающих сохранение этого разнообразия на этапе получения библиотек фагмидов и на этапе трансформации клеток *E. coli*. После добавления фага-помощника к суспензии трансформированных клеток *E. coli* происходит формирование библиотеки бактериофагов, которая служит рабочим инструментом для проведения процедуры аффинной селекции и поиска индивидуальных молекул. Несмотря на кажущуюся простоту создания фаговых библиотек антител, существует ряд тонкостей, которые необходимо учитывать. В первую очередь это особенности подготовки фагмидного вектора. В настоящее время разработано большое количество фагмидных векторов, и их выбор также имеет большое значение. Ключевым этапом считается подготовка компетентных клеток *E. coli* и технология их трансформации. Немаловажен выбор фага-помощника и способа его подготовки. Статья посвящена основным проблемам, с которыми сталкиваются исследователи при создании фаговых библиотек антител. Ключевые слова: фаговая библиотека; репликативная форма бактериофага; моноклональные антитела; фаг-помощник; компетентные клетки.

**Для цитирования:** Арипов В.С., Волкова Н.В., Ильичев А.А., Щербаков Д.Н. Проблемы создания фаговых библиотек антител и пути их решения. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(2):249-257. DOI 10.18699/vjgb-24-29

## Problems of creating antibody phage libraries and their solutions

V.S. Aripov , N.V. Volkova , A.A. Ilyichev , D.N. Shcherbakov State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia  
 aripov\_vs@vector.nsc.ru

**Abstract.** Phage display has become an efficient, reliable and popular molecular technique for generating libraries encompassing millions or even billions of clones of divergent peptides or proteins. The method is based on the correspondence between phage genotype and phenotype, which ensures the presentation of recombinant proteins of known amino acid composition on the surface of phage particles. The use of affinity selection allows one to choose variants with affinity for different targets from phage libraries. The implementation of the antibody phage display technique has revolutionized the field of clinical immunology, both for developing tools to diagnose infectious diseases and for producing therapeutic agents. It has also become the basis for efficient and relatively inexpensive methods for studying protein-protein interactions, receptor binding sites, as well as epitope and mimotope identification. The antibody phage display technique involves a number of steps, and the final result depends on their successful implementation. The diversity, whether natural or obtained by combinatorial chemistry, is the basis of any library. The choice of molecular techniques is critical to ensure that this diversity is maintained during the phage library preparation step and during the transformation of *E. coli* cells. After a helper phage is added to the suspension of transformed *E. coli* cells, a bacteriophage library is formed, which is a working tool for performing the affinity selection procedure and searching for individual molecules. Despite the apparent simplicity of generating phage antibody libraries, a number of subtleties need to be taken into account. First, there are the features of phage vector preparation. Currently, a large number of phagemid vectors have been developed, and their selection is also of great

importance. The key step is preparing competent *E. coli* cells and the technology of their transformation. The choice of a helper phage and the method used to generate it is also important. This article discusses the key challenges faced by researchers in constructing phage antibody libraries.

Key words: phage library; bacteriophage replicative form; monoclonal antibodies; helper phage; competent cells.

**For citation:** Aripov V.S., Volkova N.V., Ilyichev A.A., Shcherbakov D.N. Problems of creating antibody phage libraries and their solutions. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(2):249-257. DOI 10.18699/vjgb-24-29

## Введение

В 1985 г. Smith впервые описал технологию фагового дисплея, продемонстрировав, что нитчатые фаги способны экспонировать интересующий пептид на своей поверхности после вставки чужеродного фрагмента ДНК в ген белка оболочки (Smith, 1985). Впоследствии Parmley и Smith описали процесс селекции и обогащения фаговых библиотек на основе аффинного связывания, получивший название «биоэ́ннинг» (Parmley, Smith, 1988). А в 1991 г. McCafferty и Winter первыми применили технологию фагового дисплея для получения антител, создав их комбинаторные библиотеки с помощью нитчатых бактериофагов, которые использовались для поиска антиген-специфических моноклональных антител (McCafferty et al., 1990).

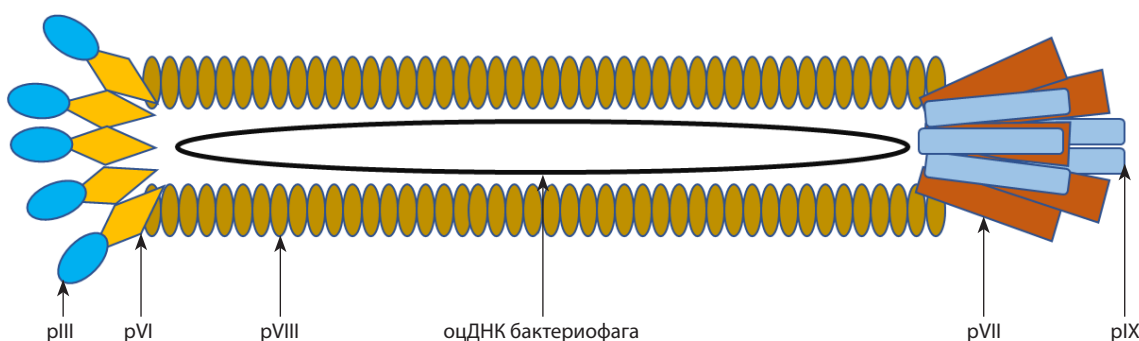
Основными инструментами технологии фагового дисплея стали нитевидные бактериофаги M13, f1, fd. Они стабильны в различных растворах, в том числе при экстремальных значениях pH и высокой температуре (Brigati, Petrenko, 2005), а также малочувствительны к литическим ферментам (включая ДНКазы и протеазы) (Larocca et al., 2002).

Нитчатый бактериофаг M13 (рис. 1) – один из наиболее используемых бактериофагов для фагового дисплея антител (Sokullu et al., 2019). Фаг M13 обладает высокой способностью к репликации, а в его геноме методами генетической инженерии можно встраивать большие чужеродные фрагменты ДНК. Этот бактериофаг является нелитическим, инфицирует и размножается в штаммах *Escherichia coli*, несущих F<sup>+</sup>, которые формируют половые ворсинки (O’Callaghan et al., 1973). Основная масса вириона состоит из одноцепочечной ДНК, покрытой пятью копиями основного белка оболочки pVIII. Каждый из концов фага сформирован пятью копиями двух различных белков: pVII и pIX – на одном

конце, pIII и pVI – на другом (см. рис. 1). Длина вириона зависит от длины упакованного в фаговую частицу генома. При этом к геному дикого типа могут быть добавлены до 12000 нуклеотидов без нарушения упаковки фага (Rasched, Oberer, 1986).

В ходе репликативного цикла нитчатых бактериофагов их геном в бактериальной клетке одновременно присутствует в виде большого числа копий репликативной формы (двухцепочечная кольцевая) и одноцепочечной ДНК (ssDNA). Присутствие ssDNA в образце ДНК мешает проведению клонирования, поскольку создает «фон» из клонов, не имеющих встройку целевого гена. Используя очищенную репликативную форму, можно осуществить клонирование фрагментов ДНК в составе участков, кодирующих интересующий белок бактериофага (в основном это белки pIII и pVIII). Такие векторные системы обозначаются как системы 3 и 8 соответственно (Kay et al., 1996).

Основные различия при использовании белков pIII и pVIII заключаются в длине чужеродных пептидов, а также в представленности химерных белков на поверхности фагов-потомков и влиянии на их жизнеспособность (Ильичев и др., 1989; Bass et al., 1990; Barbas et al., 1991). По сравнению с белком pVIII, белок pIII может обеспечивать дисплей более протяженных аминокислотных последовательностей (Näkelä et al., 1978). Для небольших пептидов принято использовать систему с белком pVIII. Более крупные полипептиды влияют на функцию белка pVIII, поэтому для них используют систему с белком pIII. Из-за структурных свойств фагов Ff использование в системе фагового дисплея белка pIII приводит к включению менее пяти копий слитых белков в фагах-потомках. Только при отсутствии гена pIII в геноме фага-помощника в фагах-потомках будут присутствовать пять копий этого белка (Smith, 1993).



**Рис. 1.** Схематическое изображение нитчатого бактериофага M13.

Нитчатый фаг M13 имеет размер около 880 нм в длину и 6.5 нм в ширину, кольцевую одноцепочечную ДНК. Капсид бактериофага M13 образован пятью копиями различных минорных оболочечных белков (pIII, pVI, pVII, pIX), однако большую часть его капсида составляет мажорный оболочечный белок pVIII, представленный ~2700 копиями (Chung et al., 2011).

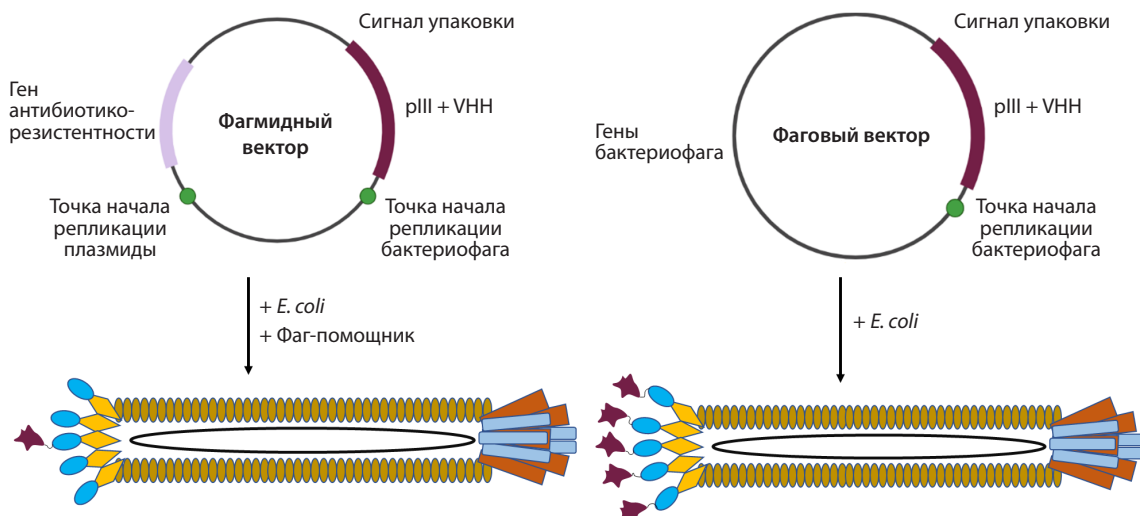


Рис. 2. Отличие фагмиды от фагового вектора.

Использование рVIII позволяет получать фаговые частицы, включающие намного больше, чем пять, копий химерных белков – сотни или даже тысячи (Veronese et al., 1994). Однако из-за множественных копий химерных белков заметную роль начинает играть эффект avidности, что может затруднить отбор вариантов белков с отличающейся аффинностью. Поэтому рVIII используют в фаговом дисплее, чтобы расширить круг потенциальных лигандов, а рIII – для уменьшения или устранения эффекта avidности для селекции высокоаффинных белков. Кроме того, N-концевой домен белка оболочки рIII участвует в инфицировании клеток-хозяев. Чтобы заразить *E. coli*, нитчатые фаги используют нитевидные бактериальные структуры, известные как F-пили. Концевая часть фага с белком рIII взаимодействует с белком TolA на бактериальной поверхности. Несмотря на то что белок рIII обладает относительно большими размерами, чрезмерное вмешательство в его структуру может приводить к нарушению его взаимодействия с белками F-пилей. Это может оказывать значительное влияние на жизнеспособность фагов потомков, поэтому использование белка рIII для дисплея фрагментов белков имеет ограничение. В случае белка рVIII подобные проблемы отсутствуют.

Что касается других белков бактериофага, то до сих пор опубликовано лишь несколько работ, в которых сообщалось о возможности использования белков рVII и рIX (Gao et al., 1999, 2002). Белки рVII и рIX образуют комплекс на конце фаговой частицы, противоположному концу, несущему широко используемый белок рIII. Для демонстрации возможности использования этих белков для дисплея был разработан вариант фагмиды, в котором переменные области тяжелой и легкой цепей антител слиты с N-концами рVII и рIX соответственно. Примечательно, что слитые белки взаимодействуют с образованием функционального Fv-связывающего домена на поверхности фага. Данный подход выглядит перспективным для дисплея комплексных библиотек пептидов и белков, которые могли бы формировать комбинаторные гетеродимерные структуры Fv-области антитела, однако он не получил широкого распространения.

Помимо фаговых векторов, для создания библиотек используют фагмиды. Фагмиды – это векторные молекулы, сочетающие свойства плазмиды и фагового вектора (Kau et al., 1996). Главное их отличие от фаговых векторов заключается в том, что фагмиды представляют собой векторы, полученные из Ff-фага, содержащие точку начала репликации (ori) плазмиды для двуцепочечной репликации и упаковки в фаговые частицы (рис. 2). Они обычно не кодируют или кодируют только один вид белков оболочки, тогда как другие структурные и функциональные белки, необходимые для завершения жизненного цикла бактериофага, предоставляются фагом-помощником (Ledsgaard et al., 2018).

Альтернативный подход предложен Chasteen и его командой, разработавшими «линии бактериальных упаковывающих клеток», которые содержат хелперные плазмиды на основе M13 (Chasteen et al., 2006). Наличие этих клеток обеспечивает синтез белков упаковки фага, которые собирают фаговые частицы так же эффективно, как и при заражении фагом-помощником; тем самым исключается стадия заражения бактериальных клеток фагом-помощником.

В фагмиды вводят и другие элементы, такие как молекулярные метки и селективные маркеры, для облегчения последующих операций, например очистки белков. Также могут быть введены метки для упрощения скрининга библиотеки.

Небольшой размер фагмид позволяет клонировать в их составе более крупные фрагменты генов, кодирующие слитые белки. Эффективность трансформации фагмидами выше, чем фаговыми векторами, что позволяет конструировать библиотеки с большим репертуаром (Qi et al., 2012).

Существует огромное количество вариантов фагмид. С фагмидами типов III и VIII можно ознакомиться подробнее в обзоре (Qi et al., 2012). Наиболее популярными являются фагмиды рHEN, рComb, рSEX, рADL, у каждой из которых есть несколько производных. Каждая фагмида представляет собой оригинальную конструкцию, выбор которой зависит от цели исследователя. Например, фагми-

да рADL-10b имеет fl ori для включения одноцепочечной репликации и упаковки в фаговые частицы, копию LacI для обеспечения репрессии lac промотора с сильным терминатором транскрипции для предотвращения нежелательной и токсичной экспрессии во время клонирования. Такая конструкция обеспечивает надежное клонирование переменных генов антител и повышение стабильности библиотеки во время скрининга (Krebber et al., 1997). Этот вектор рекомендуется для дисплея scFv и лучше всего подходит, когда предполагается этап повторного клонирования для синтеза белка в растворимой форме.

Включение амбер стоп-кодона (TAG) между целевым белком и белком оболочки фага инициирует экспрессию слитого белка в супрессорных штаммах *E. coli*, таких как TG1. При этом кодон TAG будет транслироваться как остаток глутамина. Однако в несупрессорных штаммах, например HB2151, будет продуцироваться растворимая форма рекомбинантного белка, поскольку в таких штаммах не будут включать глутамин в амбер стоп-кодон. В данном случае TAG будет обычным стоп-кодоном (Hoogenboom et al., 1991).

Уровень экспрессии, обеспечиваемый фагидами серии рADL, эквивалентен уровню экспрессии фагмид рComb3 и значительно ниже, чем у фагмид рНЕН. Чрезмерная экспрессия приводит к токсичности, что делает библиотеки антител генетически нестабильными и способствует сильному смещению в сторону потери разнообразия. В этом отношении фагмиды серии рADL обеспечивают хороший баланс между токсичностью и синтезом целевых антител в периплазматическом пространстве в штаммах бактерий (Ishina et al., 2020).

Наиболее популярным производным вектора рComb является рComb3XSS. Он содержит два сайта гидролиза рестриктазы SfiI, узнающей последовательность GGCC NNNNNGGCC. Отсутствие специфичности в отношении пяти центральных пар нуклеотидов позволяет проводить встройку ПЦР продуктов, кодирующих фрагменты антител, в необходимой ориентации. Направленность ориентации определяется дизайном прямого и обратного праймеров, тоже содержащих сайт SfiI. Вектор Comb3XSS также содержит метки 6×His и HA, с помощью которых можно проводить очистку и обнаружение белков, и имеет амбер стоп-кодон для выключения экспрессии слитого белка рIII путем переключения на несупрессорный штамм *E. coli*, позволяющий производить растворимый белок без субклонирования.

Ключевыми моментами в работе с фаговыми библиотеками являются подготовка вектора, приготовление клеток с хорошей компетентностью, проведение электропорации, а также амплификация фага-помощника. Ниже рассмотрен каждый из этих пунктов и даны некоторые рекомендации.

### Подготовка фагмиды

Один из определяющих моментов получения фаговых библиотек – подготовка вектора для встройки целевых последовательностей ДНК. Основная сложность заключается в очистке препарата фагмидной ДНК от одноцепочечной и линейной форм ДНК. Эти формы ДНК создают «фон» на контрольной чашке при электропорации, что

затрудняет оценку «представленности» фаговой библиотеки. Самое главное, что они могут оказывать негативное влияние на уровень разнообразия библиотеки. Для решения этой проблемы используют различные протоколы очистки фагмидной ДНК. После того, как ДНК выделили, можно очистить препарат от одноцепочечной и линейной формы с помощью фенольного способа. Данный метод является классическим, однако имеет ряд недостатков, таких как большие потери репликативной формы ДНК. Также для работы с фенолом нужны специальные условия; нередко выделение ДНК фенольным методом зависит от мастерства исполнителя (Маниатис и др., 1984).

Существует метод выделения репликативной формы ДНК фага с помощью ацетата аммония. Этот метод не требует особых условий работы, в отличие от фенольного способа, но достаточно затратен по времени (Маниатис и др., 1984).

Альтернативой является очистка препарата ДНК с помощью сорбентов, например с использованием сорбента HiTrap PlasmidSelect Xtra. Основные этапы очистки ДНК с помощью сорбента представлены на рис. 3.

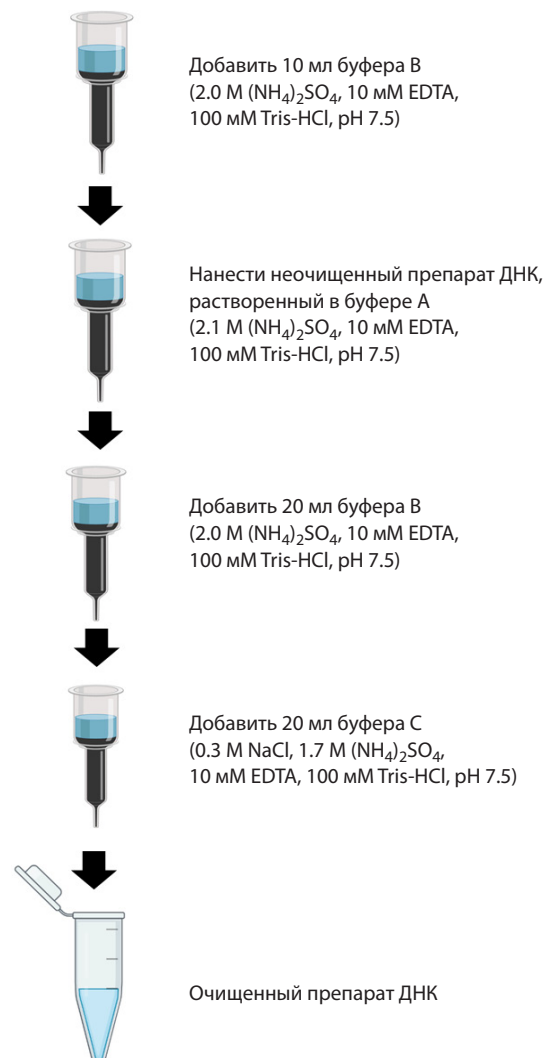


Рис. 3. Схема очистки фагового вектора от одноцепочечной и линейной форм ДНК.



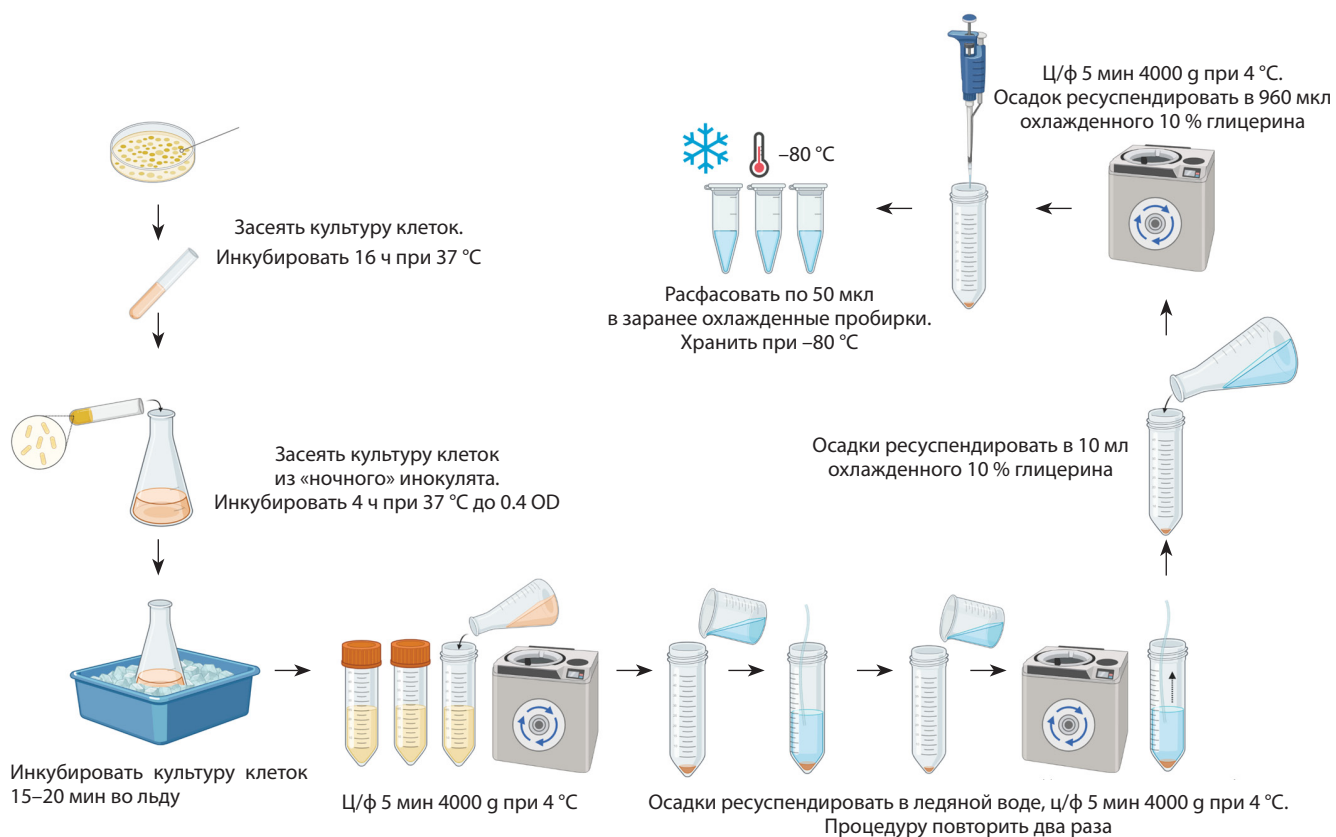


Рис. 4. Типичная схема получения компетентных клеток.

Данный метод тоже неидеален, однако он не требует особых условий для выполнения процедуры очистки. После очистки на сорбенте надо быть готовым к большим потерям ДНК. В лучшем случае выход от общего количества ДНК будет составлять 10 %. В то же время такого количества ДНК, очищенной от сателлитных форм, вполне достаточно для получения фаговой библиотеки.

### Компетентные клетки

Наличие клеток, обладающих высокой компетентностью, является принципиальным моментом получения фаговой библиотеки, обладающей высокой представленностью. Одной из лучших клеточных линий для получения больших библиотек фагов считаются клетки TG1 (Tu et al., 2005; Chai et al., 2020). Это производные штамма *E. coli* JM101, который не имеет модификации. В настоящее время TG1 – одни из самых быстрорастущих клонов *E. coli*, что, несомненно, играет важную роль в постановке эксперимента.

Существуют коммерческие компании, предоставляющие готовые клетки с компетентностью  $\geq 4 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мкг ДНК. Однако поставка таких клеток не всегда возможна, а процесс транспортировки приводит к колебаниям температуры, что снижает компетентность клеток. Поэтому разработка протокола получения высокоэффективных клеток для создания фаговых библиотек антител является принципиальной задачей (рис. 4).

Чтобы получить большое разнообразие фаговой библиотеки ( $10^{10-11}$  КОЕ), необходимо учитывать простые,

но важные условия в подготовке компетентных клеток. Прежде всего, это соблюдение условий культивирования, особенно температуры. Рекомендуемая температура составляет +37 °С. Также необходимо следить, чтобы плотность культуры клеток не превышала значения 0.4 OD. Клетки должны находиться в начальной – средней логарифмической фазе роста. Использование клеток в поздней логарифмической или стационарной фазе значительно уменьшает эффективность электропорации. Очень важно не допускать перепада температур. После того, как ваша культура доросла до заданной плотности, все манипуляции надо проводить в «мокром» льду.

Также необходимо аккуратно ресуспендировать клетки на каждой из стадий, поскольку клетки очень чувствительны и легко подвержены разрушению. Полученные клетки рекомендуется хранить при –80 °С (Chai et al., 2020), при этой температуре они дольше сохраняют компетентность. Однако следует учитывать, что компетентность клеток со временем становится хуже, поэтому для сохранения разнообразия фаговых библиотек необходимо использовать свежеприготовленные клетки.

### Электропорация

Перед проведением электропорации (рис. 5) при создании фаговой библиотеки оценивают эффективность полученных клеток с использованием ДНК плазмиды pUC19 с известной концентрацией (Chai et al., 2020).

Перед началом электропорации необходимо разморозить компетентные клетки во льду. Данная манипуля-

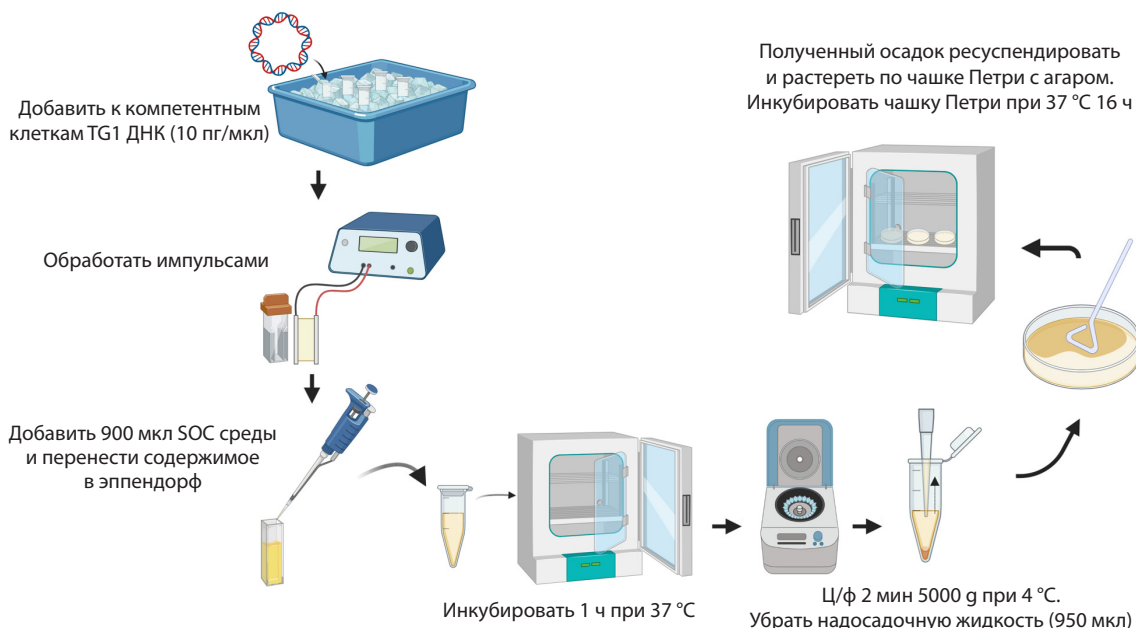


Рис. 5. Схема проведения электропорации.

ции позволит сохранить жизнеспособность клеток. Параллельно с размораживанием клеток прогреваем любую питательную среду до +37 °С.

Манипуляции следует проводить четко и быстро. Сначала добавляем 1 мкл ДНК (10 пг/мкл). Такое количество необходимо для контрольной плазмиды pUC19 к предварительно замороженным электрокомпетентным клеткам. При проведении электропорации с лигазной смесью, предварительно очищенной от буфера для лигирования, надо брать намного больше ДНК, в 15–25 раз (Pardon et al., 2014).

Важно также контролировать напряжение в соответствии с размером кюветы. После электрического импульса необходимо сразу добавить 1 мл восстанавливающей SOC среды и инкубировать клетки без перемешивания в термостате при +37 °С в течение 1 ч. После инкубации надо центрифугировать трансформированные клетки, убрать 950 мкл надосадочной жидкости, осадок ресуспендировать и распределить по чашке Петри с агаром и селективным антибиотиком и 2 % глюкозой. Инкубировать при +37 °С 16 ч.

На следующий день оценивается эффективность электропорации. Она определяется как количество колониеобразующих единиц, полученных путем электропорации 1 мкг плазмиды, на данный объем компетентных клеток. Чем выше компетентность полученных клеток, тем большее разнообразие фаговой библиотеки будет получено. Клетки считаются высококомпетентными начиная с  $10^{10}$  КОЕ.

### Фаг-помощник

Наряду с фагмидой важной составляющей успешного получения разнообразных библиотек является фаг-помощник. Он требуется для сборки фаговых частиц путем инфицирования клеток, содержащих фагмиду. Фаг-помощник несет все гены, необходимые для инфицирования, репли-

кации, сборки и почкования, и таким образом обеспечивает фагмиду, которая несет ген, кодирующий слитый белок рIII-scFv, белками, необходимыми для амплификации.

Фаг-помощник инфицирует бактерию, сначала прикрепляясь к ее F-пилям, а затем, после присоединения, транспортирует свой геном в цитоплазму клетки-хозяина. Внутри клетки геном фага инициирует выработку фагмидной одноцепочечной ДНК в цитоплазме. Затем фагмидная ДНК упаковывается в фаговые частицы. Фаговые частицы, содержащие одноцепочечную ДНК, высвобождаются из бактериальной клетки во внеклеточную среду. Нитевидные фаги тормозят рост бактерий, но, в отличие от фага  $\lambda$  и фага T7, не лизируют клетки «хозяина». Фаги-помощники, как правило, разработаны таким образом, что упаковка ДНК в них идет менее эффективно, чем упаковка фагмид, так, что полученные фаговые частицы содержат преимущественно фагмидную ДНК. Это происходит за счет дефектного сайта начала репликации (Lund et al., 2010).

В настоящее время в качестве основного фага-помощника в лабораториях используют M13KO7 (Russel et al., 1986; Vieira, Messing, 1987; Du, Zhang, 2009). Все другие фаги-помощники являются его производными. Фаг-помощник M13KO7 представляет собой производное фага M13, несет гетерологичную, низкокопийную точку начала репликации p15A. Когда в бактерии-хозяине присутствует только фаг M13KO7, репликации достаточно для достижения его высоких титров. Однако если присутствует большое количество копий фагмиды, она будет вытеснять геном фага-помощника во время упаковки, а это означает, что большинство собирающихся фаговых частиц будут нести ДНК фагмиды (Vieira, Messing, 1987). В состав капсида получаемых фаговых частиц будут входить рIII, кодируемый геномом фага-помощника, а также химерный белок рIII-scFv, кодируемый фагмидой. На практике происходит предпочтительное включение рIII

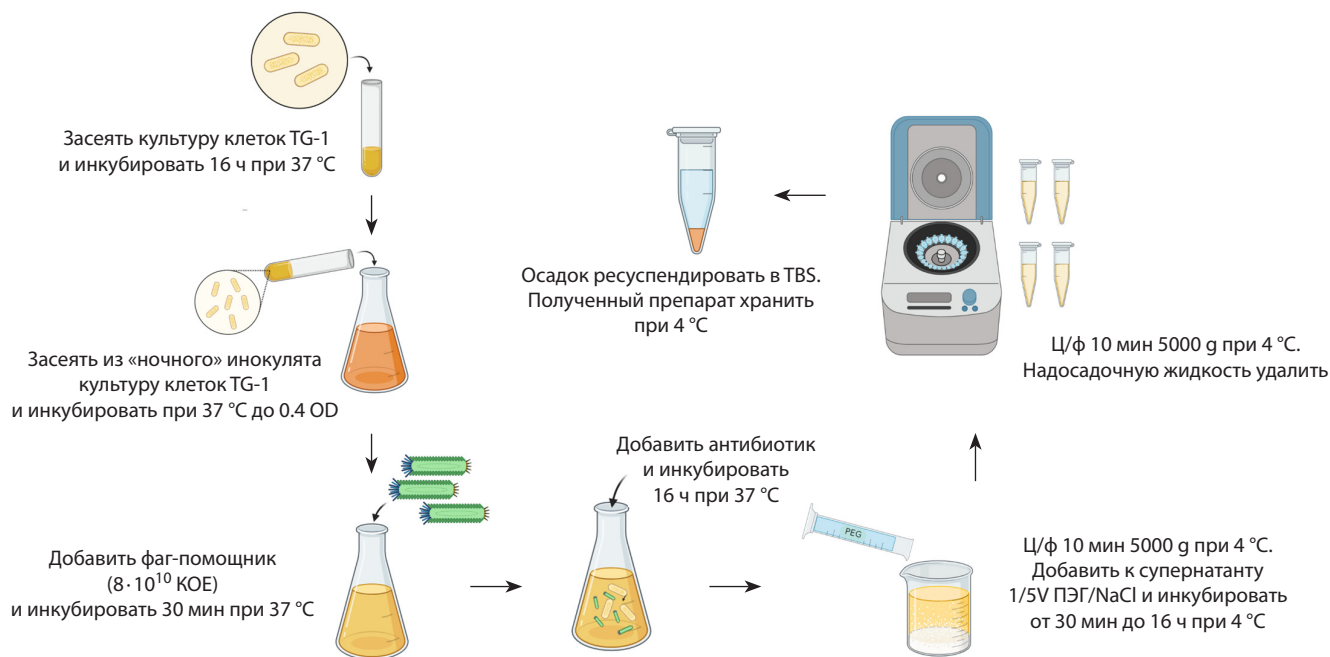


Рис. 6. Схема амплификации фага-помощника.

дикого типа из фага-помощника. Это означает, что большинство фаговых частиц будут «лысыми» (без химерного рПШ-scFv). Предпочтительный дисплей рПШ, а не слитого рПШ-scFv, вероятно, обусловлен комбинацией различий в уровнях экспрессии/трансляции и тем фактом, что часть слитого рПШ-scFv, по всей видимости, деградирует.

Выбор конкретного фага-помощника для работы достаточно сложен. Несмотря на заявленную разницу в свойствах, на практике некоторые производные фага-помощника M13KO7 ничем не отличаются друг от друга. Так, например, все производные фага-помощника CM13 дают более крупные бляшки и более высокие титры (в два раза больше КОЕ/мл), поэтому его легче подготовить. Фаг-помощник CM13 постоянно обеспечивает хорошие выходы, даже при низкой множественности заражения, но имеет более низкий коэффициент упаковки. В то же время фаг-помощник M13KO7 дает аналогичные выходы фагов, требует точного соблюдения плотности культуры бактерии (около 0.5 OD<sub>600</sub>) для лучшего заражения клеток и обеспечивает высокий коэффициент упаковки. M13KO7 рекомендуется для получения одноцепочечной ДНК, например для мутагенеза по Кункелю, из-за лучшего коэффициента упаковки. Фаг-помощник R408 является производным f1, не несет устойчивости к антибиотикам и, возможно, улучшает упаковку одноцепочечной ДНК (Dotto et al., 1981).

Весьма привлекательной заменой «традиционным» фагам-помощникам является гиперфаг (Rondot et al., 2001). Гиперфаги содержат геном с делецией гена рПШ. Для их получения используют пакующие клетки *E. coli*, синтезирующие функциональный рПШ, необходимый для формирования полноценной частицы и упаковки фагового генома. Образующиеся гиперфаги несут на своей поверхности функциональный рПШ, но их геном дефектен по гену рПШ. Каждый из полученных фагов несет на своей

поверхности несколько копий антитела или пептида, что значительно повышает эффективность пэннинга.

Несмотря на то что получение фага-помощника коммерчески доступно, для удобства работы полезно проводить амплификацию фага-помощника, который по биологическому титру не будет уступать коммерческому. Одним из важных критериев наработки фага-помощника является оптическая плотность инфицируемой культуры клеток *E. coli*; оптимальным считается значение 0.4 OD (рис. 6). Более высокие плотности приводят к тому, что множество нетрансдуцированных бактерий не будет продуцировать вирионы, тогда как более низкие плотности могут усилить несоответствия, вызванные различиями в скорости роста фагов и более низкой продукцией фагов, а также экспрессией токсичных слитых белков, ограничивающих рост бактерий. Критической также является инфицирующая доза фага-помощника. Ее оптимальная величина  $8 \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл, избыток, как правило, приводит к перерасходу препарата.

При заражении клеток фагом-помощником необходимо проводить инкубацию без перемешивания. Перемешивание способствует росту клеток, следовательно, не все клетки будут заражены фагом-помощником. Важно также соблюдать временные интервалы: инкубирование культуры клеток с фагом-помощником при +37 °C проводят не более 30 мин. Обеспечение исключительного роста клеток, зараженных фагом-помощником, достигается добавлением антибиотика (в зависимости от того, какой антибиотик заложен в геноме фага-помощника), в большинстве случаев это канамицин.

При осаждении фага-помощника раствором ПЭГ/NaCl препарат инкубируют 16 ч при +4 °C. Это способствует лучшему осаждению фага-помощника. Осаждение желательнее провести дважды, так как после первого раза остается какое-то количество препарата в супернатанте.

Полученный препарат необходимо растворить в буфере TBS. Количество буфера TBS для каждого случая индивидуально и зависит от размера осадка. Препарат следует хранить при +4 °С.

### Заключение

В настоящей статье мы попытались отразить основные проблемы, возникающие у исследователей, имеющих дело с созданием фаговых библиотек, и способы их решения. Одной из главных проблем в создании фаговых библиотек антител, на наш взгляд, является подготовка фагмидного вектора к встройке разнообразия генов антител, от чего в дальнейшем критически зависит разнообразие библиотеки. Не менее важны амплификация и получение очищенного препарата фага-помощника, а также получение высококомпетентных клеток для проведения электропорации.

Несмотря на существующие методические проблемы, технология фагового дисплея продолжает успешно развиваться. Эта технология привлекательна по ряду причин, таких как относительная простота в исполнении, возможности скрининга большого количества образцов за малый промежуток времени и отбора антител против широкого круга антигенов. Фаговый дисплей открыл новую сферу возможностей в обнаружении и разработке антител. Использование фаговых библиотек фрагментов антител человека позволяет отказаться от применения для терапии химерных или гуманизированных антител и, таким образом, избежать проблем, связанных с иммуногенностью препаратов.

Хотелось бы отметить, что данная статья не является идеальным пособием, однако может помочь в решении некоторых проблем в получении фаговой библиотеки антител, обладающей большим репертуаром.

### Список литературы / References

Ильичев А.А., Миненкова О.О., Татьков С.И., Карпышев Н.Н., Ерошкин А.М., Петренко В.А., Сандакчиев Л.С. Получение жизнеспособного варианта фага M13 со встроенным чужеродным пептидом в основной белок оболочки. *Докл. АН СССР*. 1989;307(2):481-483  
[Ilyichev A.A., Minenkova O.O., Tatkov S.I., Karpishev N.N., Eroshkin A.M., Petrenko V.A., Sandakchiev L.S. Creation of a viable variant of phage M13 by inserting foreign peptide in major coat protein. *Doklady AN SSSR* = *Doklady Biological Sciences*. 1989;307(2):481-483 (in Russian)]  
Маниатис Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984  
[Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982]  
Barbas C.F., Kang A.S., Lerner R.A., Benkovic S.J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene-III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88(18):7978-7982. DOI 10.1073/pnas.88.18.7978  
Bass S., Greene R., Wells J.A. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding-properties. *Proteins*. 1990; 8(4):309-314. DOI 10.1002/prot.340080405  
Brigati J.R., Petrenko V.A. Thermostability of landscape phage probes. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005;382(6):1346-1350. DOI 10.1007/s00216-005-3289-y  
Chai D., Wang G., Fang L., Li H., Liu S., Zhu H., Zheng J. The optimization system for preparation of TG1 competent cells and electrotransformation. *MicrobiologyOpen*. 2020;9(7):e1043. DOI 10.1002/mbo3.1043

Chasteen L., Ayriss J., Pavlik P., Bradbury A.R. Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(21):e145. DOI 10.1093/nar/gkl772  
Chung W.J., Oh J.W., Kwak K., Lee B.Y., Meyer J., Wang E., Hexter A., Lee S.W. Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature*. 2011;478(7369):364-368. DOI 10.1038/nature10513  
Dotto G.F., Enea V., Zinder N.D. Functional analysis of bacteriophage fl intergenic region. *Virology*. 1981;114(2):463-473. DOI 10.1016/0042-6822(81)90226-9  
Du D., Zhang R. Application and progress of helper phage in phage display. *Microbiology*. 2009;36(2):261-266  
Gao C., Mao S., Lo C.H., Wirsching P., Lerner R.A., Janda K.D. Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999;96(11):6025-6030. DOI 10.1073/pnas.96.11.6025  
Gao C.S., Mao S.L., Kaufmann G., Wirsching P., Lerner R.A., Janda K.D. A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(20):12612-12616. DOI 10.1073/pnas.192467999  
Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Johnson K.S., Chiswell D.J., Hudson P., Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(15):4133-4137. DOI 10.1093/nar/19.15.4133  
Ishina I.A., Filimonova I.N., Zakharova M.Y., Ovchinnikova L.A., Mamedov A.E., Lomakin Y.A., Belogurov A.A., Jr. Exhaustive search of the receptor ligands by the CyCLOPS (Cytometry Cell-Labeling Operable Phage Screening) technique. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(17):6258. DOI 10.3390/ijms21176258  
Kay B., Winter J., McCafferty J. (Eds.). *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*. N.Y.: Acad. Press, 1996. DOI 10.1016/B978-0-12-402380-2.X5000-X  
Krebber A., Bornhauser S., Burmester J., Honegger A., Willuda J., Bosshard H.R., Pluckthun A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods*. 1997;201(1):35-55. DOI 10.1016/S0022-1759(96)00208-6  
Larocca D., Burg M.A., Jensen-Pergakes K., Ravey E.P., Gonzalez A.M., Baird A. Evolving phage vectors for cell targeted gene delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2002;3(1):45-57. DOI 10.2174/1389201023378490  
Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A.H. Basics of antibody phage display technology. *Toxins*. 2018; 10(6):236. DOI 10.3390/toxins10060236  
Lund P.E., Hunt R.C., Gottesman M.M., Kimchi-Sarfaty C. Pseudovirions as vehicles for the delivery of siRNA. *Pharm Res*. 2010; 27(3):400-420. DOI 10.1007/s11095-009-0012-2  
McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990;348(6301):552-554. DOI 10.1038/348552a0  
Näkelä O., Kaartinen M., Pelkonen J.L., Karjalainen K. Inheritance of antibody specificity V. Anti-2-phenylloxazalone in the mouse. *J. Exp. Med.* 1978;148(6):1644-1660. DOI 10.1084/jem.148.6.1644  
O'Callaghan R., Bradley R., Paranchych W. The effect of M13 phage infection upon the F pili of *E. coli*. *Virology*. 1973;54(1):220-229. DOI 10.1016/0042-6822(73)90131-1  
Pardon E., Laeremans T., Triest S., Rasmussen S.G.F., Wohlkönig A., Ruf A., Muyldermans S., Hol W.G.J., Kobilka B.K., Steyaert J. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* 2014;9(3):674-693. DOI 10.1038/nprot.2014.039  
Parmley S.F., Smith G.P. Antibody-selectable filamentous FD phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*. 1988;73(2):305-318. DOI 10.1016/0378-1119(88)90495-7  
Qi H., Lu H., Qiu H.J., Petrenko V., Liu A. Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *J. Mol. Biol.* 2012;417(3):129-143. DOI 10.1016/j.jmb.2012.01.038

- Rasched I., Oberer E. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol. Rev.* 1986;50(4):401-427. DOI 10.1128/mr.50.4.401-427.1986
- Rondot S., Koch J., Breitling F., Dübel S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat. Biotechnol.* 2001;19(1):75-78. DOI 10.1038/83567
- Russel M., Kidd S., Kelley M.R. An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene.* 1986; 45(3):333-338. DOI 10.1016/0378-1119(86)90032-6
- Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985; 228(4705):1315-1317. DOI 10.1126/science.4001944
- Smith G.P. Preface (Surface display and peptide libraries. Cold Spring Harbor Laboratory, April 4–7, 1992. Proceedings). *Gene.* 1993; 128(1):1-2. DOI 10.1016/0378-1119(93)90145-s
- Sokullu E., Soleymani Abyaneh H., Gauthier A.M. Plant/bacterial virus-based drug discovery, drug delivery, and therapeutics. *Pharmaceutics.* 2019;11(5):211. DOI 10.3390/pharmaceutics11050211
- Tu Z., He G., Li K.X., Chen M.J., Chang J., Chen L., Yao Q., Dongping P., Ye H., Shi J., Wu X. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electron. J. Biotechnol.* 2005; 8(1):113-120. DOI 10.2225/vol8-issue1-fulltext-8
- Veronese F.D.M., Willis A.E., Boyerthompson C., Appella E., Perham R.N. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J. Mol. Biol.* 1994;243(2):167-172. DOI 10.1006/jmbi.1994.1643
- Vieira J., Messing J. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 1987;153:3-11. DOI 10.1016/0076-6879(87)53044-0

---

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках темы ГЗ-23/21 плана основных мероприятий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на 2024 г.

**Благодарности.** Авторы выражают искреннюю благодарность заведующему отделом молекулярной иммунологии, доктору биологических наук Таранину Александру Владимировичу, старшим научным сотрудникам, кандидатам биологических наук Чикаеву Николаю Андреевичу и Наякшину Александру Матвеевичу за консультации при работе с фаговыми библиотеками.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 27.07.2023. После доработки 18.01.2024. Принята к публикации 19.01.2024.

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» – 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  
на платформе Web of Science, 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](http://elibrary.ru/title_about.asp?id=32440)

англоязычная версия – на сайте [vavilov.elpub.ru/index.php/jour](http://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](mailto: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 28.03.2024. Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 18.1.

