

Том 60, Номер 4

ISSN 0016-6758
Апрель 2024



ГЕНЕТИКА



НАУКА
— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 4, 2024

Обзорные и теоретические статьи

- Роль мобильных генетических элементов в формировании долговременной памяти
Р. Н. Мустафин, Э. К. Хуснутдинова 3
- Происхождение, генетическое разнообразие и миграционные пути культурной полбы *Triticum dicoccum*
А. В. Фисенко, А. Ю. Драгович 20

Молекулярная генетика

- Функции хеликазы MLE *Drosophila melanogaster* вне дозовой компенсации: молекулярная природа и плейотропный эффект мутации *mle[9]*
Г. А. Ашниева, С. Г. Георгиева, Ю. В. Николенко 34

Генетика животных

- Цитохромы P450 2f и гены поведенческих черт: ковариации экспрессии в мозге человека и полиморфизм ортологов у домашних коз
А. К. Пискунов, П. М. Марченко, Г. Р. Свищева, Ж. В. Самсонова, А. В. Кудрявцева, Ю. А. Столповский, В. Н. Воронкова 47
- Филогеографическая структура *Alexandromys maximowiczii* Schrenk, 1859 (Rodentia, Cricetidae): сопоставление данных изменчивости контрольного региона мтДНК и полиморфизма хромосом
И. Н. Шереметьева, И. В. Картавцева, М. В. Павленко, У. В. Горобейко, Ю. А. Баженов, И. В. Морлодыев, Л. Л. Войта 58

Генетика человека

- Частые генетические варианты аутосомно-рецессивных несиндромальных форм наследственных заболеваний сетчатки у жителей Российской Федерации
Н. Ю. Огородова, А. А. Степанова, О. А. Щагина, В. В. Кадышев, А. В. Поляков 69
- Полиморфизм генов Толл-подобных рецепторов в выборке больных ВИЧ-инфекцией и туберкулезом из стран Восточной Европы и Центральной Азии
С. А. Саламайкина, В. И. Корчагин, К. О. Миронов, Е. И. Кулабухова, В. Н. Зимина, А. В. Кравченко 84
- Анализ вовлеченности генов предрасположенности к ишемической болезни сердца в реализацию сигнальных и метаболических путей
Н. Ю. Часовских, Е. Е. Шестакова 94
- Оценка скорости возникновения мутаций в STR-локусах Y-хромосомы в якутской популяции
Д. С. Адамов, С. А. Федорова 104
- Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 коррелирует с уровнем сестринских хроматидных обменов и частотой aberrаций хроматидного типа у персонала радиохимического производства с инкорпорированным плутонием-239
С. А. Васильев, Е. Н. Толмачева, Е. А. Саженова, Н. Н. Суханова, Ю. С. Яковлева, Н. Б. Торхова, М. Б. Плаксин, И. Н. Лебедев 114

Краткие сообщения

- Молекулярно-генетические и мейотические особенности дагестанских полевков *Microtus (Terricola) daghestanicus* восточной части Северного Кавказа
А. С. Богданов, М. М. Ацаева, Д. Д. Арсанукаев, С. Н. Матвеевский 123

Персоналии

- К 90-летию со дня рождения профессора Юрия Федоровича Богданова 128

УДК 159.953.3

РОЛЬ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ

© 2024 г. Р. Н. Мустафин^{1,*}, Э. К. Хуснутдинова²

¹Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия

²Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: ruji79@mail.ru

Поступила в редакцию 17.10.2023 г.

После доработки 24.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

В ряде экспериментальных исследований оспорено значение синаптической пластичности и доказана роль транспозонов в консолидации памяти. Это обусловлено *cis*-регуляторным влиянием активированных мобильных генетических элементов на экспрессию генов, а также инсерциями в новые локусы генома вблизи участвующих в функционировании головного мозга генов. Транскрипты и белки эндогенных ретровирусов транспортируются в области синапсов дендритов и передают информацию для изменения экспрессии генов в соседние клетки за счет формирования вирусоподобных частиц в составе везикул. Благодаря этому обеспечивается взаимосвязь синаптической пластичности с ядерным кодированием, поскольку мобильные генетические элементы являются также драйверами эпигенетической регуляции за счет взаимосвязи с произошедшими от них некодирующими РНК. Проведенный нами анализ научной литературы позволил выявить роль 17 возникших от транспозонов микроРНК в нормальном формировании памяти. При нейродегенеративных заболеваниях с нарушением памяти нами выявлено изменение экспрессии 44 произошедших от мобильных генетических элементов микроРНК. Это свидетельствует о возможностях таргетного воздействия на патологическую активацию транспозонов при нейродегенеративных болезнях для восстановления памяти с использованием микроРНК в качестве инструментов.

Ключевые слова: микроРНК, мобильные генетические элементы, память, ретроэлементы, эпигенетические механизмы.

DOI: 10.31857/S0016675824040015 **EDN:** CRQAPN

Консолидация памяти – это процесс, посредством которого вновь сформированная и нестабильная память превращается в стабильную долговременную память (ДП) [1]. Нейробиологическая природа следа памяти (инграммы) в настоящее время остается спорной. Наиболее распространенная гипотеза синаптической пластичности (СП) заключается в хранении ДП в виде стабильных изменений синаптических связей, вызванных обучением. Зависящая от активности СП индуцируется в соответствующих синапсах во время формирования памяти и одновременно необходима для кодирования и хранения следов памяти, опосредованной областью мозга, в которой она наблюдается [2]. Считается, что синаптическая активность обеспечивает хранение информации и консолидацию памяти в головного мозга. Для этого необходим быстрый синтез мРНК в ядре и белков в синапсах [3]. Долговременное потенцирование (LTP – long-term potentiation) синаптической передачи признано

клеточным механизмом обучения и хранения памяти [4].

В формирование ДП вовлечены различные гены, наиболее известным из которых является *CREB* (cAMP-responsive element binding protein). Мутации в гене *CREB* вызывают дефицит памяти у мышей [5]. Продукт гена *CREB* вместе с глюкокортикоидными рецепторами вовлечен во внутриклеточные механизмы влияния глюкокортикоидов на формирование ДП в гиппокампе [6]. В экспериментах на дрозофиле показана роль гена бета-катенина (*CTNNB1*) в консолидации ДП за счет воздействия на Wnt-сигнальные пути [7]. При исследовании здоровых людей определено влияние на ДП полиморфных вариантов генов дофаминергической системы: *DAT1*, *DRD4*, *CNR1* [8]. Систематические обзоры накопленных в научной литературе данных показали стимулирующее влияние на развитие памяти кодирующих транскрипционные факторы генов *NF-κB* [9],

Zif268, XBP1, Srf, Npas4, Foxp1, Crtc1, c-Rel [5]. Помимо необходимых для консолидации памяти генов, к которым относится также *NR2B* (кодирует субъединицу инотропного глутаматного рецептора *N*-метил-*D*-аспартата), важное значение в регуляции ДП имеют гены-супрессоры памяти, к которым относят *AIM2, ATF4, BChE, Bec1, CCR5, Cdk5, crt11, Diap1, Dicer1, DFF45, GABA α B3, GABAAR α 4, Gabra 4, Galectin-3, GAT1, QR2, np65, Hcn1, Hdac2, Mef2, Kv β 1.1, PDE1b, Paip2a, Pkr, GCN2, IRS2, RGS14, RARalpha, p75NTR, PDE4A, Ogg1, PERK, RPTPsigma, Piwi1, Piwi2, S100b, TLCN, Pde4d, Pde8b, 11b-HSD1* [10]. Исследование генетических механизмов формирования ДП перспективно для возможного воздействия на них с целью улучшения памяти в норме и при нейродегенеративной патологии. В данном отношении необходим поиск наиболее значимых путей с исключением спорных моментов в отношении объяснения формирования ДП. Для коррекции памяти подходящими инструментами являются эпигенетические факторы, влияющие на экспрессию специфических генов и носящие обратимый характер.

К эпигенетическим факторам относятся метилирование цитозина в молекуле ДНК, модификации гистонов и РНК-интерференция с участием некодирующих РНК (**нкРНК**). Метилирование ДНК под влиянием различных ДНК-метилтрансфераз преимущественно подавляет экспрессию генов. На данный процесс влияют ДНК-деметилазы (которые устраняют метки 5-метилцитозина) и другие белки, такие как *Gadd45b* (способствует деметилированию) [5]. Мыши с нокаутом гена *Gadd45d* проявляли нарушенную память о страхе [11]. Показана также роль в регуляции памяти метилцитозиндиоксигеназ *Tet* (*Ten-eleven translocation*). При старении в зубчатой извилине гиппокампа наблюдается снижение экспрессии *Tet2*, повышение которой способствует восстановлению памяти (контекстуальной обусловленности страха у мышей) [12]. На формирование памяти влияют модификации гистонов (*H2BK120ub, H3K9me2, H3K36me3, H3K27me3, H3K9me3, H3K4me3, H3K14ac, H3K9ac*) и специфические белки, вызывающие эти модификации (*UTX, SUV39H1, Sp3, L3MBTL1, KMT2B, KMT2A, HCAC7, HDAC4/5, HDAC3, HDAC1, G9a/GLP, Chd1*) [5]. Метилирование ДНК и модификации гистонов в специфических локусах зависят от влияния микроРНК, которые являются гидами, узнающими комплементарные последовательности не только мРНК, но и молекулы ДНК в механиз-

ме РНК-зависимого метилирования ДНК [13]. Данные молекулы наиболее перспективны для возможной коррекции памяти в норме и патологии.

ОСПАРИВАНИЕ РОЛИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В КОНСОЛИДАЦИИ ПАМЯТИ

В ряде исследований получены данные, свидетельствующие о консолидации ДП без участия синаптической пластичности. Например, было выявлено и подтверждено, что ДП в виде распознавания текстурированной поверхности для определения наличия пищи сохраняется у планарии после удаления головы и последующей регенерации, включая головной мозг. Планарии проявляют привыкание к окружающей среде, сохраняя об этом ДП не менее 14 дней, что достаточно для регенерации головного мозга [14]. Культуры двигательных и сенсорных нейронов брюхоногого моллюска, морского зайца *Aplysia*, тренировали с интервальными импульсами серотонина, который запускал долговременную сенсibilизацию. Блокада реконсолидации приводила к тому, что количество пресинаптических связей возвращалось к исходному значению до тренировки. Однако окончательная синаптическая структура не была достигнута. При этом ДП для сенсibilизации скрыто сохранялась после ее очевидного устранения анти-мнемоническими препаратами, которые стирают связанный с обучением рост синапсов [15].

В рамки гипотезы СП не укладываются также следующие факты. У насекомых во время метаморфоза происходит респецификация нейронов, способствующая общей реорганизации нервной системы. Многие вновь образованные нейроны в областях зрительной и хемосенсорной обработки головного мозга включаются в личиночную нервную систему. При этом происходит реорганизация морфологии дендритов и изменение взаимосвязей между нейронами. У мотылька *Manduca sexta* на стадии гусеницы формировали память о необходимости избегать специфический запах, которая сохранялась в течение метаморфоза (с реорганизацией синапсов) и определялась у зрелых мотыльков [16]. Сходные данные получены на других животных. При помощи клеточной маркировки, зависящей от обучения, было определено увеличение синаптической силы и плотности дендритных шипов, особенно в консолидированных клетках энграммы памяти. Эти свойства отсутствовали

в клетках энграмм при амнезии, вызванной ингибитором синтеза белка, однако прямая оптогенетическая активация этих клеток приводила к восстановлению памяти, что коррелировало с сохранением связей, специфичных для клеток энграммы. Мышей обучали памяти контекстуального обуславливания страха, после чего животным вводили ингибитор синтеза белка анизомицин, нарушающий консолидацию ДП. На следующий день обученные мыши не проявляли страха в тренировочной камере. Оптическая стимуляция восстанавливала память о страхе у мышей при реактивации клеток энграммы в отсутствие синаптических изменений [1].

В связи с вышеизложенными фактами о возможности сохранения ДП без участия СП актуально создание новой гипотезы, объясняющей механизмы консолидации ДП. Наиболее вероятно роль эпигенетических факторов, поскольку важной составной частью обучения и процесса запоминания являются модификации хроматина, а изменения активности влияющих на них ферментов влияют на когнитивные способности человека и животных [17]. Действительно, в исследованиях на крысах воздействие ингибитора ДНК-метилтрансферазы (DNMT – DNA methyltransferase) разрушало полностью консолидированную память о страхе через один месяц после контекстуального сохранения страха [18]. В экспериментах на мышах было показано, что приобретение и поддержание кратковременной памяти и ДП требуют изменений в модификации хроматина в нейронах и в других клетках головного мозга [17]. Систематический обзор научной литературы показал, что усиление ацетилирования гистонов за счет манипулирования активностью специфической изоформы ацетилтрансферазы гистонов (HDAC – Histone Acetyltransferase) и DNMT в нейронах ограничивает консолидацию памяти [19].

Причинами эпигенетических изменений при формировании ДП могут быть запрограммированные механизмы активации транспозонов (мобильных генетических элементов (МГЭ)), являющихся драйверами эпигенетической регуляции и управления экспрессии генов в онтогенезе [20]. Рассмотрение роли МГЭ в формировании ДП может объединить гипотезу ядерного кодирования информации на уровне модификации хроматина (за счет воздействия на эпигенетические факторы) и на уровне ДНК (за счет инсерций МГЭ в геном) с гипотезой синаптической пластичности, поскольку продукты транс-

крипции МГЭ являются переносчиками информации через синапсы при формировании памяти [21, 22]. В 2022 г. была опубликована основанная на РНК теория естественных универсальных вычислений, которая могла бы дополнить гипотезу СП [23]. Однако компьютерные программы неэффективны без знаний молекулярных механизмов, лежащих в основе консолидации памяти, поскольку РНК являются лишь инструментами в сложной системе ядерного кодирования. Основными же источниками РНК и эпигенетической информации, выражающейся в ДП в головном мозге, могут служить МГЭ. Согласно проведенным проектам FANTOM и ENCODE, 98% всех последовательностей генома транскрибируются с образованием функциональных нкРНК [24], которые образуются непосредственно из транскриптов МГЭ [25] или произошли от них в эволюции [26, 27]. Согласно подробному анализу ядерной ДНК человека, 69% всех ее последовательностей можно отнести к МГЭ и образованным из них повторам [28]. Более того, многие белок-кодирующие гены [29], в том числе гены транскрипционных факторов, а также сайты связывания с ними [30] произошли в эволюции от МГЭ.

ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ ТРАНСПОЗОНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПАМЯТИ

МГЭ являются структурными элементами генома человека, способными перемещаться в нем за счет кодируемых собственными генами ферментов (автономные МГЭ) или белковых продуктов других МГЭ (неавтономные). В зависимости от способа транспозиции МГЭ классифицируют на два класса. К первому из них относят ретроэлементы (РЭ). Они перемещаются с помощью механизма “копирования и вставки” путем обратной транскрипции собственных РНК. Этот класс подразделяется на содержащие длинные концевые повторы (LTR – long terminal repeats) – LTR-РЭ и на не содержащие их – nonLTR-РЭ (автономные LINE (Long Interspersed Elements), неавтономные SINE (Short Interspersed Elements) и SVA (SINE-VNTR-Alu)). Ко второму классу относятся ДНК-транспозоны, которые перемещаются путем “вырезания и вставки” [20]. Ключевую роль в обучении и памяти играет гиппокамп, патологические изменения в котором наблюдаются при различных нейродегенеративных болезнях человека и при старении [31]. Зубчатая извилина гиппокампа является центром нейрогенеза человека и экспериментальных животных, включая крыс и мышей. В данной области

в нейрональных стволовых клетках (НСК) в экспериментах на крысах были описаны активные перемещения LINE1, которые были предложены в качестве драйверов дифференцировки НСК в различные типы нейронов в связи с формированием соматического мозаицизма [32]. При исследовании головного мозга людей в двух независимых работах были доказаны перемещения LINE1 в НСК [33, 34].

У человека полногеномное профилирование Alu и LINE1 геномной ДНК из образцов мозжечка, лобной коры, субвентрикулярной зоны, зубчатой извилины и миокарда показало сотни соматических вставок каждой из этих тканей. Наибольшая концентрация инсерций РЭ была выявлена в зубчатой извилине гиппокампа [35], в которой количество новых инсерций наиболее активных LINE1 на одну клетку составляло в среднем 13.7. Транспозиции были обнаружены вблизи генов, необходимых для работы нейронов, что свидетельствует о влиянии этих инсерций на функционирование клеток [36]. Поскольку МГЭ являются высокочувствительными сенсорами генома на стрессовые воздействия [37] и на изменения внутренней среды в онтогенезе [20], логично предположить роль специфических активаций МГЭ в формировании памяти. Было доказано, что во взрослом головном мозге человека триггерами для экспрессии LINE1 в клетках гиппокампа являются стресс [38, 39], физические упражнения [40], прием кокаина [41], метамфетамина [42] и алкоголя [43].

Можно предположить, что в ходе эволюции использование РЭ в качестве инструментов для консолидации ДП было обусловлено значительным количеством и распространением МГЭ в геноме, что предполагает безграничное число их комбинаций со взаимодействием с произошедшими от них в эволюции белок-кодирующих генов [29], длинных нкРНК [26], микроРНК [27], транскрипционных факторов и сайтов связывания с ними [30]. Подобно VDJ рекомбинации в иммунной системе, сформированной благодаря ДНК-транспозонам, соматическая комбинация экспрессии генов под влиянием РЭ в головном мозге имеет возможности образования грандиозного разнообразия фенотипов нейронов [44]. ДНК-транспозоны составляют лишь 5% генома человека, тогда как LTR-РЭ занимают 10%, LINE1 – 17%, SINE1 – 10% [45]. Более того, ферменты РЭ могут быть использованы для создания ретрокопий белок-кодирующих генов [44].

Эксперименты на мышах показали, что воздействие новой среды приводит к увеличению количества двухцепочечных разрывов в нейронах многих областей головного мозга, особенно в зубчатой извилине гиппокампа. Оптогенетическая стимуляция нейронов полосатого тела также приводила к усилению двухцепочечных разрывов ДНК в стимулированных клетках [46]. Источниками двухцепочечных разрывов ДНК могут служить МГЭ в ходе их транспозиций в новые локусы генома [47], что позволяет предположить их роль в реакциях клеток гиппокампа на воздействие среды с формированием ДП. Действительно, в экспериментах на мышах при ингибировании LINE1 в гиппокампе была показана роль РЭ в консолидации ДП за счет геномного мозаицизма. Для этого мышью помещали на освещенную сторону, после чего разрешали перейти на темную сторону камеры, где били токком. Память об обучении отражалась в увеличении латентности мыши при переходе в темную сторону камеры. Введение ламивудина (который ингибирует обратную транскриптазу LINE1) в гиппокамп сразу и через один час после обучения не влияло на ДП. Однако через 72 ч память значительно ухудшалась [48].

На мышах были проведены также исследования реконсолидации контекстно-зависимой памяти о страхе. В камерах наблюдения путем измерения процента времени, затраченного на замирание в течение 5 мин, оценивалась память о страхе, далее образцы гиппокампа и префронтальной коры использовали для количественной RT-PCR мРНК LINE1-элементов. В результате была выявлена экспрессия мРНК LINE1 в гиппокампе и префронтальной коре при воспоминании о страхе. После реактивации памяти о страхе вводили ламивудин – реконсолидация памяти о страхе заметно подавлялась за счет ингибирования LINE1 [49]. Хотя активация РЭ в норме является основой для формирования памяти, их патологическая экспрессия может стать причиной нарушения ДП и развития нейродегенеративных болезней. Так, ингибитор обратной транскриптазы ламивудин в экспериментах на мышах P301S (смоделированных по болезни Альцгеймера (БА)) уменьшал типичные для таупатий гистопатологические признаки: фосфорилирование тау, воспаление, гибель нейронов, атрофию гиппокампа. Ламивудин ослаблял двигательные нарушения и улучшал кратковременную память. На линиях клеток HeLa была показана способность ламивудина подавлять инсерции LINE1 [50]. Ингибиторы обратной транскриптазы вли-

яют также на активацию HERV-K при нейродегенерации [51]. У трансгенных мышей с нейродегенерацией [52] и в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера [53, 54] патологическое накопление тау-белков ведет к прогрессирующей активации РЭ с возрастом. Посредниками данных изменений могут быть пиРНК, экспрессия которых при этом снижается, поскольку рiРНК являются ингибиторами РЭ [51].

В экспериментах на дрозофиле показано, что транспозиции в головном мозге происходят среди связанных с памятью нейронов, в которых экспрессируются взаимодействующие с пиРНК белки Aubergine и Argonaute-3 и подавляющие экспрессию РЭ (потеря этих белков коррелирует с активацией РЭ). Секвенирование отдельных нейронов показало более 200 *de novo* вставок РЭ в нейронах, связанных с памятью [55]. Согласно данным консорциумов ENCODE и FANTOM, активность МГЭ зависит от типа клеток и влияет на экспрессию соседних генов. Наибольшее значение МГЭ имеют в регуляции работы головного мозга, в котором, по сравнению с другими тканями, обнаруживается наибольшее количество соматических ретротранспозиций. При этом МГЭ обеспечивают разнообразные адаптивные функции ЦНС. Они реагируют на воздействия стероидов, эпигенетических и средовых факторов, изменяя работу нейромедиаторных систем для приспособления к меняющимся средовым условиям [56]. Инсерции РЭ играют регуляторную роль не только для НСК, но и в позднюю фазу дифференцировки нейронов [2]. В результате этого формируется специфический характер экспрессии генов в нейронах, расположенных в определенных областях головного мозга [57].

Помимо LINE1 причиной функционально разнообразия нейронов головного мозга могут быть и другие РЭ, особенно неавтономные, нуждающиеся в ферментах LINE1 для своей экспрессии. Проведенные RT-qPCR и RNA-seq ядер отдельных нейронов показали экспрессию РЭ с их собственного промотора. Было выявлено, что SINE в гиппокампе мыши характеризуются профилями экспрессии, специфичными для типа клеток. Более того, в ответ на кратковременное воздействие на животных нового стимула SINE активировались в зубчатых гранулярных нейронах с течением времени, сходным с таковым для белок-кодирующих генов [58]. Полученные данные указывают на роль не только LINE1, но также SINE и, вероятно, других РЭ в формировании памяти, что свидетельствует о сложности

процесса консолидации ДП, который представляет собой своеобразную тканеспецифическую кодировку, сформированную в ходе эволюции животных. О роли ERV в консолидации ДП свидетельствуют экспериментальные исследования на мышах, лишенных митохондриального противовирусного сигнального белка MAVS для стимулятора генов интерферона STING. У этих животных определено повышение экспрессии ERV, сопровождающееся значительным нарушением памяти, связанной с гиппокампом [45]. На клетках глиомы человека U251 было показано, что повышенная экспрессия гена *env* ретроэлемента HERV-w активирует BDNF (brain-derived neurotrophic factor) [59], который играет важную регуляторную роль в синаптической передаче и LTP в гиппокампе и других областях головного мозга для формирования различных форм памяти. Его эффекты опосредованы рецепторами тропомиозин-родственной киназы-B (TrkB), которые связаны с активацией путей фосфолипазы C- γ , фосфатидилинозитол-3-киназы и Ras/ERK. Белок BDNF регулирует транспорт мРНК вдоль дендритов и их активную трансляцию в синапсах, модулируя фазы инициации и элонгации белкового синтеза и воздействуя на специфические микроРНК [60].

При исследовании головного мозга дрозофилы [61] и отдельных клеток гиппокампа человека [31] было показано, что патологическая активация РЭ при старении является причиной нейродегенерации. Выявленные изменения отражают общие эпигенетические закономерности, лежащие в основе старения, когда, начиная с деления зиготы и до созревания организма, эволюционно запрограммированная последовательная активация специфических РЭ является основой для дифференцировки делящихся клеток [30]. Эволюционный отбор направлен на сохранение вида, что подразумевает эпигенетическую регуляцию до половозрелости, после чего отбор ослабевает, и активация РЭ становится в большей степени хаотичной, вызывающей патологические изменения, приводящие к старению и возраст-ассоциированной патологии, такой как злокачественные новообразования [62].

РОЛЬ ПРОИЗОШЕДШИХ ОТ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ПАМЯТИ

Важную роль в ДП играет белок Arc (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein), регулирующий СП в контроле сигнальных сетей при

обучении, поведении и консолидации памяти. Транскрипция гена *Arc* активируется короткими поведенческими реакциями, в результате чего его мРНК транспортируется в область синапса дендрита, где из нее синтезируется белок на рибосомах [21, 22]. В 2006 г. компьютерный анализ показал, что ген *Arc* у человека произошел от РЭ *Ty3/gypsy* [63]. Структура белка *Arc* сходна с GAG (group-specific antigen) ретровирусов. Филогенетический анализ подтвердил, что ген *Arc* произошел от РЭ *Ty3/Gypsy*. Более того, *Arc* может формировать капсид-подобную структуру. Она инкапсулирует ретровирусные частицы мРНК гена *Arc*, которые загружаются во внеклеточные везикулы и транспортируются к нейронам и мышечным клеткам, передавая генетическую информацию и регуляторные сигналы по нейронным сетям. Так реализуется нейротрансмиссия генетической информации в форме мРНК [21, 22].

В экспериментах на дрозофиле было показано, что без переноса мРНК через личиночные нервно-мышечные соединения с мотонейрона на концевую пластинку мышцы происходит ослабление синапсов [21]. Филогенетический ана-

лиз продемонстрировал возникновение гена *Arc* у дрозофилы также от РЭ [22]. У высших позвоночных N-область GAG-домена белка *Arc* приобрела гидрофобный связывающий карман, необходимый для канонической функции *Arc* по ослаблению возбуждающих синапсов. В экспериментах на мышцах, с помощью иммунной изоляции *Arc* из головного мозга и масс-спектрометрии, было показано, что *Arc* GAG приобрел сайты фосфорилирования, которые резко меняют его синаптическую функцию и необходимы для LTP. Мутантный *Arc*, не способный фосфорилироваться, усиливает зависимую от метаболитных рецепторов депрессию в гиппокампе [64].

МГЭ в эволюции оказались источниками различных белок-кодирующих генов, некоторые из которых, помимо *Arc*, также могут принимать участие в формировании памяти [29]. Поскольку происхождение от МГЭ подразумевает наличие комплементарных нуклеотидных последовательностей, можно предположить, что регуляция этих белков находится под контролем эпигенетических сетей, в которые вовлечены МГЭ. Это связано с происхождением от МГЭ различных генов микроРНК (рис. 1) [27]. В ге-

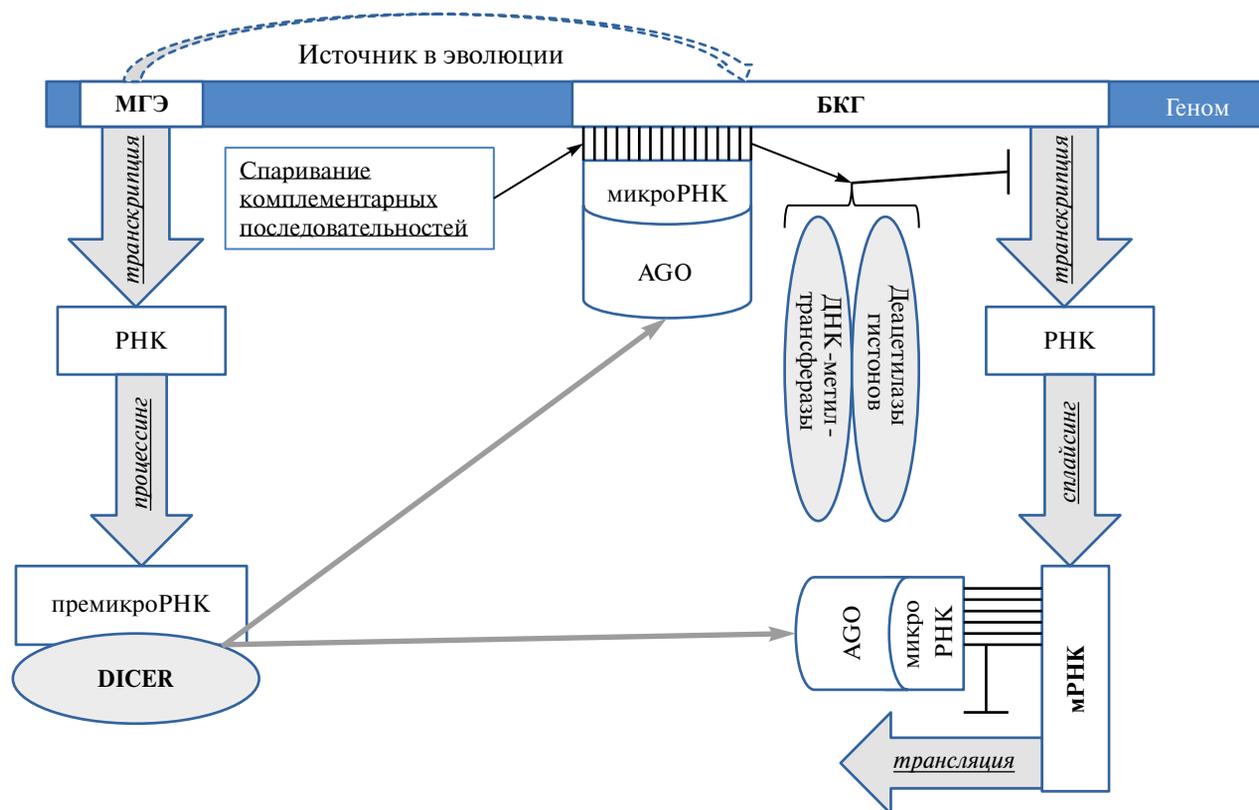


Рис. 1. Схема роли МГЭ в эпигенетическом контроле произошедших от них генов. БКГ – белок-кодирующий ген; МГЭ – мобильный генетический элемент.

номе человека содержится более 30 белок-кодирующих генов, возникших в эволюции от HERV. К ним относится ген *SIRH11/ZCCHC16*, кодирующий ССНС тип белка цинковых пальцев, который проявляет высокую идентичность белку Gag ретроэлементов ERV. Данный ген играет роль в формировании ДП, поскольку делеция *SIRH11/ZCCHC16* в экспериментах на мышах вызывает аномальное поведение, связанное с когнитивными способностями, включая рабочую память [65]. Участие белка Sirh11/Zcchc16 в формировании ДП в головном мозге обусловлено воздействием на норадренергическую систему. Филогенетический анализ показал, что ген *SIRH11/ZCCHC16* высоконсервативен у трех из четырех групп плацентарных (*Euarchontoglires*, *Laurasiatheria* и *Afrotheria*), но сильно мутировал у ленивцев и броненосцев надотряда млекопитающих *Xenarthra*. Это свидетельствует о роли гена в эволюции головного мозга различных животных [66]. От *GAG* эндогенных ретровирусов произошел ген *PEG10*, белковый продукт которого взаимодействует с ATXN2 и ATXN10 в стрессовых гранулах и внеклеточных везикулах. Предполагается роль *PEG10* в развитии головного мозга, поскольку его сверхэкспрессия изменяет миграцию нейронов [67].

От *GAG* ретроэлементов *Gypsy-like* в эволюции произошел ген фактора транскрипции основного белка миелина *MyEF-3* [68, 69], который экспрессируется в головном мозге, регулируя его развитие [70]. Гены фосфопротеинов *ma-1/map-1*, *ma-3*, экспрессия которых специфична для головного мозга, произошли от *GAG* ретроэлементов *Ty3/Gypsy* [68, 69]. Источником гена *RTL1* (Retrotransposons Gag like 1)/*PEG11* (Paternally expressed gene 11) в эволюции был ген *Gag* эндогенных ретровирусов. *RTL1/PEG11* характеризуется импринтингом материнского аллеля с экспрессией в плаценте и при эмбриональном развитии. В постнатальном периоде ген экспрессируется в стволе головного мозга, голубом пятне, таламусе и гипоталамусе. У мышей с нокаутом отцовского аллеля (*Rtl1m⁺/p⁻*) определено снижение возбудимости нейронов голубого пятна, а также тревожное и депрессивное поведение, нарушение обучения, социального доминирования и памяти [71]. От обратной транскриптазы ERV произошел белок Prp8, являющийся компонентом сплайсосомы эукариот [72]. В экспериментах на дрозофиле была показана ключевая роль Prp8 в контроле экспрессии нейропептида FMRFa в нейронах [73]. Возникший от обратной транскриптазы ретроэлементов

TERT [74] регулирует формирование пространственной памяти посредством модуляции развития нейронов в гиппокампе [75]. Поскольку у произошедших от РЭ белок-кодирующих генов имеются последовательности, комплементарные РЭ, вероятно роль РЭ в регуляции экспрессии этих генов при участии микроРНК и длинных нкРНК. Это обусловлено происхождением длинных нкРНК [26] и микроРНК [27] от МГЭ как в эволюции, так и непосредственно из транскриптов МГЭ [25, 76].

ВЗАИМОСВЯЗЬ ТРАНСПОЗОНОВ С МИКРОРНК В ФОРМИРОВАНИИ ПАМЯТИ В НОРМЕ

Около 70% всех микроРНК экспрессируются в головном мозге, при этом для каждой области характерен специфический паттерн активации микроРНК [77]. В нейронах гиппокампа индукция Dicer фактором BDNF приводит к усиленному синтезу miR-7a, -7b, -7f, -9, -107, -124a, -125b, -132, -134, -143, -375 [60]. Подобно генам, молекулы которых участвуют в регуляции памяти, микроРНК также можно подразделить на стимуляторы и супрессоры консолидации ДП. Согласно проведенному систематическому обзору научной литературы, к супрессорам ДП относятся miR-124, miR-134, miR-206; к стимуляторам – miR-9-3p, miR-92, miR-195, кластер miR-183/96/182 [78]. нкРНК обильно и специфически экспрессируются в головном мозге млекопитающих. Анализ секвенирования РНК с индукцией LTP в зубчатой извилине живых крыс через 30 мин, 2 ч и 5 ч после высокочастотной стимуляции перфорантного пути показал положительную и выраженную корреляцию динамической экспрессии длинных нкРНК с белок-кодирующими генами и ретроэлементами LINE1 и SINE [4].

Анализ базы данных о происхождении микроРНК от транспозонов MDTE DB [27] позволил нам определить 17 таких нкРНК (табл. 1), участвующих в механизмах формирования памяти. Так, возникшая от LINE2 [27] miR-1264 регулирует СП нейронов гиппокампа [79], miR-151 (произошедшей от LINE2 [27]) участвует в формировании контекстуальной памяти о страхе в гиппокампе. Люциферазный репортерный анализ продемонстрировал, что miR-151 нацелена на белок APH1a, ключевой фактор активности γ -секретазы [80]. Биоинформационный анализ показал, что miR-151 регулирует синаптическую реорганизацию и транскрипцию в зубчатой извилине гиппокампа головного мозга, участвуя

Таблица 1. Происшедшие от МГЭ микроРНК, участвующие в формировании памяти в норме

№	МикроРНК	Транспозон-источник	Роль микроРНК в консолидации памяти [ссылка]
1	miR-1264	LINE2	регулирует СП нейронов гиппокампа [79]
2	miR-151	LINE2	регулируют контекстуальную память о страхе [80] и СП в зубчатой извилине гиппокампа [81]
3	miR-192	LINE2	способствует когнитивным функциям за счет воздействия на Fbln2-опосредованный сигнальный путь TGF- β 1 [82]
4	miR-211	LINE2	регулирует миграцию и дифференцировку нейронов [83]
5	miR-224	MER135	регулирует формирование контекстуальной памяти [85]
6	miR-31	LINE2	способствует LTP, улучшает когнитивные процессы [86]
7	miR-325	LINE2	ингибирует сигналы Nupr1 и C/EBP β /IGFBP5 [88]
8	miR-326	hAT-Tip100	снижает экспрессию эндогенного белка Arc в ответ на обработку BDNF [89], регулирует гены, участвующие в СП [90], подавляет апоптоз нейронов [91]
9	miR-335	MIR	модулирует пространственную память и СП [92]
10	miR-384	Dong-R4	поддерживает зависимую от синтеза белка LTP [93]
11	miR-421	LINE2	способствует музыкальной памяти [94]
12	miR-4504	LINE1	модулирует метаболизм амилоида [95]
13	miR-4508	SINE	в экзосомах НСК участвует в формировании памяти [96]
14	miR-466	LINE1	в экзосомах участвуют в связях нейронов с астроглией [97]
15	miR-495	MaLR	участвует в формировании памяти в зубчатой извилине [99]
16	miR-584	hAT-Blackjack	регулирует BDNF, p-TrkB в формировании памяти [100]
18	miR-6842	SINE/MIR	участвует в когнитивных функциях головного мозга за счет регуляции экспрессии <i>SLC6A1</i> , <i>CHRNA7</i> [102]

в LTP [81]. Повышенная экспрессия miR-192, произошедшая от LINE2 [27], восстанавливает когнитивные нарушения и нервную функцию у мышей посредством Fbln2-опосредованного сигнального пути TGF- β 1 [82].

Анализ микрочипов показал, что miR-211 (произошла от LINE2 [27]) участвует в регуляции миграции и дифференцировки нейронов [83], что необходимо для формирования ДП. В экспериментах на мышах подтверждена роль miR-211 в формировании нейронов [84]. От ДНК-транспозона MER-135 произошла miR-224 [27], мишенью которой является 3'UTR мРНК гена *NPAS4*. Данная микроРНК экспрессируется из интрона гена *GABRE* (GABAA рецептор эILON) в гипоталамусе и среднем мозге. *NPAS4* – это фактор транскрипции, экспрессирующийся специфически в головном мозге и регулирующий гены тормозных синапсов для контроля гомеостатического баланса возбуждения и торможения в нейронах. Данный белок необходим для нормального социального взаимодействия и формирования контекстуальной памяти у мышей [85].

В экспериментах на мышах экспрессия произошедшей от LINE2 miR-31 [27] коррелировала с LTP [86]. Уровень данной микроРНК значи-

тельно снижен в гиппокампе и префронтальной коре у старых крыс по сравнению с контрольными молодыми [87]. У крыс miR-325, произошедшая от LINE2 [27], предотвращала индуцированное севофлураном ухудшение обучения и памяти путем ингибирования передачи сигналов Nupr1 и C/EBP β /IGFBP5 [88]. В первичных культурах нейронов гиппокампа крысы эктопическая экспрессия miR-326 (произошедшая от ДНК-транспозона hAT-Tip100 [27]) снижала экспрессию эндогенного белка Arc в ответ на обработку BDNF [89]. В гиппокампе крыс была показана роль miR-326 в регуляции генов, важных для СП и развития НСК, определено повышение ее уровня к 14-му дню постнатального развития [90]. На мышах было выявлено снижение фосфорилирования тау-белка и апоптоза нейронов под влиянием miR-326 путем ингибирования сигнального пути JNK за счет нацеливания на VAV1 [91]; miRNA-335, возникшая от SINE-MIR [27], модулировала пространственную память и СП гиппокампа [92].

От LINE/Dong-R4 произошла miR-384 [27], необходимая для зависимого от синтеза белка поддержания LTP [93]. Изучение влияния музыки на организм человека показало повышенный уровень miR-421, произошедшей от LINE2

[27], в группе людей с высокими музыкальными способностями [94]. Оценка функционального влияния генов и микроРНК на метаболизм APP (Amyloid Precursor Protein) показала, что белок FERMT2 (Kindlin-2) напрямую взаимодействует с APP, модулируя его метаболизм. Экспрессию FERMT2 подавляет miR-4504 [95] (возникла от LINE1 [27]). В экзосомах НСК выявлены повышенные концентрации miR-4508 [96], произошедшей от SINE/MIR [27], и miR-466 (произошедшая от LINE1 [27]), которые участвуют в связях нейронов с астроглией [97]. Это свидетельствует о возможной роли данных микроРНК в формировании ДП, поскольку продукты таких экзосом участвуют в восстановлении памяти [98].

Повышенные уровни miR-495, произошедшей от ERVL [27], в экспериментах на крысах определены в зубчатой извилине при внутривенной стимуляции, облегчающей у них обучение и память [99]. МикроРНК miR-584 участвует в регуляции памяти за счет ингибирования экспрессии BDNF, p-TrkB/TrkB и стимуляции Каспазы-3 [100]. MiR-584 произошла от ДНК-транспозона hAT-Blackjack [27]. В экзосомах плазмы крови пожилых людей снижается уровень miR-6842 (произошла от SINE/MIR [27]), которая подавляет экспрессию *SLC6A1* и *CHRNA7*, что может служить одним из факторов изменения памяти при старении [101].

АССОЦИАЦИЯ ПРОИЗОШЕДШИХ ОТ ТРАНСПОЗОНОВ микроРНК ПРИ БОЛЕЗНЯХ С НАРУШЕНИЕМ ПАМЯТИ

Перспективы исследований роли МГЭ в формировании памяти связаны с возможностью лечения заболеваний центральной нервной системы с нарушением памяти, таких как БА [102, 103], депрессия [82], рассеянный склероз [104], болезнь Паркинсона [105]. В связи с этим был проведен анализ литературных данных о роли произошедших от транспозонов микроРНК [27] в развитии данных болезней (табл. 2). В результате выявлено, что для БА характерны повышенные уровни 16 возникших от транспозонов микроРНК: miR-1202 (произошла от LINE1) [106], miR-1246 (от ERVL) [107], miR-151 (от LINE2) [108], miR-211 (от LINE2) [109], miR-28 (от LINE2) [110, 111], miR-320c (от LINE2) [112], miR-326 (от ДНК-транспозона hAT-Tip100) [113], miR-335 (от SINE/MIR) [114], miR-3646 (от SINE/MiR) [115], miR-378a (от SINE/MIR) [116], miR-384 (от LINE/Dong-R4) [117],

miR-4504 (от LINE1) [95], miR-545 (от LINE2) [118], miR-566 (от SINE/Alu) [119], miR-603 (от ДНК-транспозона TcMar-Mariner) [120], miR-659 (от LINE2) [102].

У пациентов с БА определено снижение экспрессии 20 произошедших от МГЭ микроРНК: miR-1271 (источник – LINE2) [121], miR-192 (LINE2) [122], miR-31 (LINE2) [123, 124], miR-3199 (LINE2) [125], miR-3200 (ERV-L) [108], miR-325 (LINE2) [126], miR-340 (DNA-TE/TcMar-Mariner) [127], miR-342 (SINE/tRNA-RTE) [128], miR-4286 (LTR/ERVL) [106], miR-4422 (LTR/Gypsy) [129], miR-4487 (LINE1) [130], miR-4772 (LINE1) [102], miR-502 (LINE2) [108], miR-511 (LINE1) [131], miR-576 (LINE1) [132, 133], miR-6087 (LINE1) [134], miR-619 (LINE1) [135], miR-664 (LINE1) [136], miR-708 (LINE2) [137, 138], miR-885 (SINE/MIR) [139].

При болезни Паркинсона происходит повышение экспрессии miR-585 (произошла от ERV-L) [140], miR-4317 (от SINE/MIR) [141] и miR-6088 (SINE/Alu) [142], снижение – miR-769 (от LINE/CR1) и miR-4293 (от SINE/tRNA) [141]. При депрессии определено снижение уровней miR-192 (источник – LINE2) [82], miR-625 (LINE1) [143]. У пациентов с рассеянным склерозом выявлено снижение экспрессии происходящих от TE miR-3200 [144], miR-652 [145], повышение – miR-942 [145].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрение роли МГЭ в формировании ДП может объединить гипотезу ядерного кодирования информации на уровне модификации хроматина (за счет воздействия на эпигенетические факторы) и на уровне ДНК (за счет инсерций МГЭ в геном) с гипотезой СП, поскольку продукты транскрипции эндогенных ретровирусов являются переносчиками информации через синапсы при формировании памяти. Описаны работы, подтверждающие участие МГЭ и происходящих от них белок-кодирующих генов и микроРНК в формировании памяти в гиппокампе. Предполагается, что это связано со значением МГЭ в регуляции экспрессии генов при дифференцировке и функционировании нейронов. Значение МГЭ и произошедших от них микроРНК в развитии нейродегенеративных процессов свидетельствует о возможностях таргетного воздействия на патологическую активацию транспозонов в лечении данных патологий.

Таблица 2. Изменение экспрессии произошедших от транспозонов микроРНК при нейродегенеративных болезнях с нарушением памяти

№	МикроРНК	Транспозон-источник	Изменение экспрессии микроРНК: болезнь [ссылка]
1	miR-1202	LINE1	повышение: БА [106]
2	miR-1246	ERVL	повышение: БА [107]
3	miR-1271	LINE2	снижение: БА [121]
4	miR-151	LINE2	повышение: БА [108]
5	miR-192	LINE2	снижение: БДР [82], БА [122]
6	miR-211	LINE2	повышение: БА [103]
7	miR-28	LINE 2	повышение: БА [110, 111]
8	miR-31	LINE2	снижение: БА [123, 124]
9	miR-3199	LINE2	снижение: БА [125]
10	miR-320c	LINE2	повышение: БА [112]
11	miR-3200	ERV-L	снижение: БА [125], РС [144]
12	miR-325	LINE2	снижение: БА [126]
13	miR-326	hAT-Tip100	повышение: БА [113]
14	miR-335	SINE/MIR	повышение: БА [114]
15	miR-340	TcMar-Mariner	снижение: БА [127]
16	miR-342	SINE	снижение: БА [128]
17	miR-3646	SINE/MIR	повышение: БА [115]
18	miR-378a	SINE/MIR	повышение: БА [116]
19	miR-384	LINE/Dong-R4	повышение: БА [117]
20	miR-4286	LTR/ERVL	снижение: БА [106]
21	miR-4293	SINE/tRNA	снижение: БП [141]
22	miR-4317	SINE/MIR	повышение: БП [141]
23	miR-4422	LTR/Gypsy	снижение: БА [129]
24	miR-4487	LINE1	снижение: БА [130]
25	miR-4504	LINE1	повышение: БА [95]
26	miR-4772	LINE1	снижение: БА [102]
27	miR-502	LINE2	снижение: БА [108]
28	miR-511	LINE1	снижение: БА [131]
29	miR-545	LINE2	снижение: БА [118]
30	miR-566	SINE/Alu	повышение: БА [119]
31	miR-576	LINE1	снижение: БА [132,133]
32	miR-585	ERV-L/MaLR	повышение: БП [140]
33	miR-603	TcMar-Mariner	повышение: БА [120]
34	miR-6087	LINE1	снижение: БА [134]
35	miR-6088	SINE/Alu	повышение: БП [142]
36	miR-619	LINE1	снижение: БА [135]
37	miR-625	LINE1	снижение: БДР [143]
38	miR-652	hAT-Tip100	снижение: РС [145]
39	miR-659	LINE2	повышение: БА [102]
40	miR-664	LINE1	снижение: БА [136]
41	miR-708	LINE2	снижение: БА [137, 138]
42	miR-769	LINE/CR1	снижение: БП [141]
43	miR-885	SINE/MIR	снижение: БА [139]
44	miR-942	LINE2	повышение: РС [145]

Примечание. БА – болезнь Альцгеймера; БДР – большое депрессивное расстройство; БП – болезнь Паркинсона; РС – рассеянный склероз.

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ryan T.J., Roy D.S., Pignatelli M. et al. Engram cells retain memory under retrograde amnesia // *Science*. 2015. V. 348. P. 1007–1013. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5542>
- Takeuchi T., Duzkiewicz A.J., Morris R.G. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2013. V. 369 (1633). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0288>
- Fila M., Diaz L., Szczepanska J. et al. mRNA Trafficking in the nervous system: A key mechanism of the involvement of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) in synaptic plasticity // *Neural Plast.* 2021. V. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3468795>
- Maag J.L.V., Panja D., Sporild I. et al. Dynamic expression of long noncoding RNAs and repeat elements in synaptic plasticity // *Front. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 351. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00351>
- Hegde A.N., Smith S.G. Recent developments in transcriptional and translational regulation underlying long-term synaptic plasticity and memory // *Learn. Mem.* 2019. V. 26. P. 307–317. <https://doi.org/10.1101/lm.048769.118>
- Buurstede J.C., van Weert L.T.C.M., Coucci P. et al. Hippocampal glucocorticoid target genes associated with enhancement of memory consolidation // *Eur. J. Neurosci.* 2022. V. 55. P. 2666–2683. <https://doi.org/doi:10.1111/ejn.15226>
- Tan Y., Yu D., Busto G.U. et al. Wnt signaling is required for long-term memory formation // *Cell Rep.* 2013. V. 4. № 6. P. 1082–1089. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.007>
- Lukel C., Schumann D., Kalisch R. et al. Dopamine related genes differentially affect declarative long-term memory in healthy humans // *Front. Behav. Neurosci.* 2020. V. 14. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.539725>
- Kaltschmidt B., Kaltschmidt C. NF-KappaB in long-term memory and structural plasticity in the adult mammalian brain // *Front. Mol. Neurosci.* 2015. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00069>
- Noyes N.C., Phan A., Davis R.L. Memory suppressor genes: modulating acquisition, consolidation, and forgetting // *Neuron*. 2021. V. 109. P. 3211–3227. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.08.001>
- Leach P.T., Poplawski S.G., Kenney J.W. et al. Gadd45b knockout mice exhibit selective deficits in hippocampus-dependent long-term memory // *Learn. Mem.* 2012. V. 19. P. 319–324. <https://doi.org/10.1101/lm.024984.111>
- Gontier G., Iyer M., Shea J.M. et al. Tet2 rescues age-related regenerative decline and enhances cognitive function in the adult mouse brain // *Cell. Rep.* 2018. V. 22. P. 1974–1981. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.001>
- Chalertpet K., Pin-On P., Aporntewan C. et al. Argonaute 4 as an effector protein in RNA-directed DNA methylation in human cells // *Front. Genet.* 2019. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00645>
- Shomrat T., Levin M. An automated training paradigm reveals long-term memory in planarians and its persistence through head regeneration // *J. Exp. Biol.* 2013. V. 216. P. 3799–3810.
- Chen S., Cai D., Pearce K. et al. Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in *Aplysia* // *eLife*. 2014. V. 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.03896>
- Levine R.B. Changes in neuronal circuits during insect metamorphosis // *J. Exp. Biol.* 1984. V. 112. P. 27–44. <https://doi.org/10.1242/jeb.112.1.27>
- Halder R., Hennion H., Vidal R.O. et al. DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. P. 102–110. <https://doi.org/10.1038/nn.4194>
- Miller C.A., Gavin C.F., White J.A. et al. Cortical DNA methylation maintains remote memory // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. P. 664–666.
- Jarome T.J., Lubin F.D. Epigenetic mechanisms of memory formation and reconsolidation // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2014. V. 115. P. 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.08.002>
- Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposons in epigenetic regulation of ontogenesis // *Russ. J. Developmental Biology.* 2018. V. 49.
- Ashley J., Cody B., Lucia D. et al. Retrovirus-like Gag protein Arc1 binds RNA and traffics across synaptic boutons // *Cell*. 2018. V. 172. P. 262–274.
- Pastuzyn E.D., Day C.E., Kearns R.B. et al. The neuronal gene *Arc* encodes a repurposed retrotransposon Gag protein that mediates intercellular RNA transfer // *Cell*. 2018. V. 172. P. 275–288.
- Akhlagpour H. An RNA-based theory of natural universal computation // *J. Theor. Biol.* 2022. V. 537.

- <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110984>
24. Kour S., Rath P.C. Long noncoding RNAs in aging and age-related diseases // *Ageing Res. Rev.* 2016. V. 26. P. 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.12.001>
 25. Lu X., Sachs F., Ramsay L. et al. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. P. 423–425. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2799>
 26. Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: Transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs // *RNA.* 2014. V. 20. P. 959–976.
 27. Wei G., Qin S., Li W. et al. MDTE DB: A database for microRNAs derived from Transposable element // *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* 2016. V. 13. P. 1155–1160.
 28. De Koning A.P., Gu W., Castoe T.A. et al. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome // *PLoS Genetics.* 2011. V. 7. e1002384.
 29. Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 397–405. <https://doi.org/10.1038/nrg2337>
 30. Mustafin R.N. The Relationship between transposons and transcription factors in the evolution of eukaryotes // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2019. V. 55. P. 14–22.
 31. Zhang H., Li J., Ren J. et al. Single-nucleus transcriptomic landscape of primate hippocampal aging // *Protein Cell.* 2021. V. 12. P. 695–716. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00852-9>
 32. Muotri A.R., Marchetto M.C., Coufal N.G. et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2 // *Nature.* 2010. V. 468. P. 443–446.
 33. Coufal N.G., Garcia-Perez J.L., Peng G.E. et al. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells // *Nature.* 2009. V. 460. P. 1127–1131.
 34. Baillie J.K., Barnett M.W., Upton K.R. et al. Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain // *Nature.* 2011. V. 479. P. 534–537. <https://doi.org/10.1038/nature10531>
 35. Kurnosov A.A., Ustyugova S.V., Nazarov V.I. et al. The evidence for increased L1 activity in the site of human adult brain neurogenesis // *PLoS One.* 2015. V. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117854>
 36. Upton K., Gerhardt D.J., Jesuadian J.S. et al. Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons // *Cell.* 2015. V. 161. P. 228–239.
 37. Mustafin R.N., Khusnutdinova E.K. The role of transposable elements in the ecological morphogenesis under influence of stress // *Vavilov J. Genetics and Breeding.* 2019. V. 23. P. 380–389.
 38. Ponomarev I., Rau V., Eger E.I. et al. Amygdala transcriptome and cellular mechanisms underlying stress-enhanced fear learning in a rat model of post-traumatic stress disorder // *Neuropsychopharmacology.* 2010. V. 35. P. 1402–1411.
 39. Hunter R.G., Murakami G., Dewell S. et al. Acute stress and hippocampal histone H3 lysine 9 trimethylation, a retrotransposon silencing response // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 17657–17662.
 40. Muotri A.R., Zhao C., Marchetto M.C., Gage F.H. Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus // *Hippocampus.* 2009. V. 19. P. 1002–1007. <https://doi.org/10.1002/hipo.20564>
 41. Maze I., Feng J., Wilkinson M.B. et al. Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 3035–3040. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015483108>
 42. Moszczynska A., Flack A., Qiu P. et al. Neurotoxic methamphetamine doses increase LINE-1 expression in the neurogenic zones of the adult rat brain // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 14356. <https://doi.org/10.1038/srep14356>
 43. Ponomarev I., Wang S., Zhang L. et al. Gene coexpression 312 networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. P. 1884–1897.
 44. Kaeser G., Chun J. Brain cell somatic gene recombination and its phylogenetic foundations // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. P. 12786–12795. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.009192>
 45. Sankowski R., Strohl J., Huerta T.S. et al. Endogenous retroviruses are associated with hippocampus-based memory impairment // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 25982–25990.
 46. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V. et al. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. P. 613–621. <https://doi.org/10.1038/nn.3356>
 47. Yenerall P., Zhou L. Identifying the mechanisms of intron gain: progress and trends // *Biol. Direct.* 2012. V. 7. P. 29.
 48. Bachiller S., del-Pozo-Martín Y., Carrion A.M. L1 retrotransposition alters the hippocampal genomic landscape enabling memory formation // *Brain Behav. Immun.* 2017. V. 64. P. 65–70.
 49. Zhang W.J., Huang Y.Q., Fu A. et al. The retrotransposition of L1 is involved in the reconsolidation of contextual fear memory in mice // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2021. V. 20. P. 273–284. <https://doi.org/10.2174/1871527319666200812225509>
 50. Valles-Saiz L., Avila J., Hernandez F. Lamivudine (3TC), a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, prevents the neuropathological alterations present in mutant tau transgenic mice // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 11144. <https://doi.org/10.3390/ijms241311144>
 51. Sun W., Samimi H., Gamez M. et al. Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death

- through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies // *Nat. Neurosci.* 2018. V. 21. P. 1038–1048.
52. Ramirez P., Zuniga G., Sun W. et al. Pathogenic tau accelerates aging-associated activation of transposable elements in the mouse central nervous system // *Prog. Neurobiol.* 2022. V. 208. P. 102181. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102181>
 53. Guo C., Jeong H.H., Hsieh Y.C. et al. Tau activates transposable elements in Alzheimer's disease // *Cell Rep.* 2018. V. 23. P. 2874–2880. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.004>
 54. 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. V. 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251611>
 55. Perrat P.N., DasGupta S., Wang J. et al. Transposon-driven genomic heterogeneity in the *Drosophila* brain // *Science.* 2013. V. 340. P. 91–95.
 56. Lapp H.E., Hunter R.G. The dynamic genome: transposons and environmental adaptation in the nervous system // *Epigenomics.* 2016. V. 8. P. 237–249.
 57. Singer T., McConnell M.J., Marchetto M.C.N. et al. LINE-1 retrotransposons: Mediators of somatic variation in neuronal genomes // *Trends Neurosci.* 2010. V. 33. P. 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.04.001>
 58. Linker S.B., Randolph-Moore L., Kottlilil K. et al. Identification of bona fide B2 SINE retrotransposon transcription through single-nucleus RNA-seq of the mouse hippocampus // *Genome Res.* 2020. V. 30. P. 1643–1654. <https://doi.org/10.1101/gr.262196.120>
 59. Huang W., Li S., Hu Y.M. et al. Implication of the *env* gene of the human endogenous retrovirus W family in the expression of BDNF and DRD3 and development of recent-onset schizophrenia // *Schizophr. Bull.* 2011. V. 37. P. 988–1000.
 60. Leal G., Comprido D., Duarte C.B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity // *Neuropharmacology.* 2014. V. 76Pt. P. 639–656.
 61. Li W., Prazak L., Chatterjee N. et al. Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila* // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. P. 529–531. <https://doi.org/10.1038/nn.3368>
 62. Mustafin R.N., Khusnutdinova E. Perspective for studying the relationship of miRNAs with transposable elements // *Curr. Iss. in Mol. Biology.* 2023. V. 45. P. 3122–3145.
 63. Campillos M., Doerks T., Shah P.K., Bork P. Computational characterization of multiple Gag-like human proteins // *Trends Genet.* 2006. V. 22. P. 585–589.
 64. Zhang W., Chuang Y.A., Na Y. et al. Arc oligomerization is regulated by CaMKII phosphorylation of the GAG domain: An essential mechanism for plasticity and memory formation // *Mol. Cell.* 2019. V. 75. P. 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.004>
 65. Kaneko-Ishino T., Ishino F. Evolution of brain functions in mammals and LTR retrotransposon-derived genes // *Uirusu.* 2016. V. 66. P. 11–20. <https://doi.org/10.2222/jsv.66.11>
 66. Irie M., Yoshikawa M., Ono R. et al. Cognitive function related to the *Sirh11/Zcchc16* gene acquired from an LTR retrotransposon in Eutherians // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005521>
 67. Pandya N.J., Wang C., Costa V. et al. Secreted retrovirus-like GAG-domain-containing protein PEG10 is regulated by UBE3A and is involved in Angelman syndrome pathophysiology // *Cell. Rep. Med.* 2021. V. 2. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100360>
 68. Volff J.N. Turning junk into gold: Domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes // *Bioessays.* 2006. V. 28. P. 913–922.
 69. Alzohairy A.M., Gyulai G., Jansen R.K., Bahieldin A. Transposable elements domesticated and neofunctionalized by eukaryotic genomes // *Plasmid.* 2013. V. 69. P. 1–15.
 70. Steplewski A., Krynska B., Tretiakova A. et al. MyEF-3, a developmentally controlled brain-derived nuclear protein which specifically interacts with myelin basic protein proximal regulatory sequences // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 243. P. 295–301. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7821>
 71. Chou M.Y., Hu M.C., Chen P.Y. et al. RTL1/PEG11 imprinted in human and mouse brain mediates anxiety-like and social behaviors and regulates neuronal excitability in the locus coeruleus // *Hum. Mol. Genet.* 2022. V. 31. P. 3161–3180. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac110>
 72. Dlakic M., Mushegian A. Prp8, the pivotal protein of the spliceosomal catalytic center, evolved from a retroelement – encoded reverse transcriptase // *RNA.* 2011. V. 17. P. 799–808.
 73. Cobeta I.M., Stadler C.B., Li J. et al. Specification of *Drosophila* neuropeptidergic neurons by the splicing component *brr2* // *PLoS Genet.* 2018. V. 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007496>
 74. Kopera H.C., Moldovan J.B., Morrish T.A. et al. Similarities between long interspersed element-1 (LINE-1) reverse transcriptase and telomerase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 20345–20350.
 75. Zhou Q.G., Liu M.Y., Lee H.W. et al. Hippocampal TERT regulates spatial memory formation through modulation of neural development // *Stem Cell Reports.* 2017. V. 9. P. 543–556. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.014>
 76. Honson D.D., Macfarlan T.S. A lncRNA-like role for LINE1s in development // *Dev. Cell.* 2018. V. 46. P. 132–134.

77. *Chen W., Qin C.* General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development // *RNA Biol.* 2015. V. 12. P. 701–708. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1048954>
78. *Grinkevich L.N.* The role of microRNAs in learning and long-term memory // *Vavilov J. Genetic and Breeding.* 2020. V. 24. P. 885–896. <https://doi.org/10.18699/VJ20.687>
79. *Zhang H., Yu G., Li J. et al.* Overexpressing lnc240 rescues learning and memory dysfunction in hepatic encephalopathy through miR-1264-5p/MEF2C axis // *Mol. Neurobiol.* 2023. V. 60. P. 2277–2294. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03205-1>
80. *Xu X.F., Wang Y.C., Zong L., Wang X.L.* miR-151-5p modulates APH1a expression to participate in contextual fear memory formation // *RNA Biol.* 2019. V. 16. P. 282–294. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1572435>
81. *Ryan B., Logan B.J., Abraham W.C., Williams J.M.* MicroRNAs, miR-23a-3p and miR-151-3p, are regulated in dentate gyrus neuropil following induction of long-term potentiation in vivo // *PLoS One.* 2017. V. 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170407>
82. *Tang C.Z., Yang J.T., Liu Q.H. et al.* Up-regulated miR-192-5p expression rescues cognitive impairment and restores neural function in mice with depression via the Fbln2-mediated TGF- β 1 signaling pathway // *FASEB J.* 2019. V. 33. P. 606–618. <https://doi.org/10.1096/fj.201800210RR>
83. *Mainigi M., Rosenzweig J.M., Lei J. et al.* Peri-implantation hormonal milieu: Elucidating mechanisms of adverse neurodevelopmental outcomes // *Reprod. Sci.* 2016. V. 23. P. 785–794. <https://doi.org/10.1177/1933719115618280>
84. *Li L., Miao M., Chen J. et al.* Role of Ten eleven translocation-2 (Tet2) in modulating neuronal morphology and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease // *J. Neurochem.* 2021. V. 157. P. 993–1012. <https://doi.org/10.1111/jnc.15234>
85. *Bersten D.C., Wright J.A., McCarthy P.J., Whitelaw M.L.* Regulation of the neuronal transcription factor NPAS4 by REST and microRNAs // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1839. P. 13–24.
86. *Parsons M.J., Grimm C., Paya-Cano J.L. et al.* Genetic variation in hippocampal microRNA expression differences in C57BL/6 J X DBA/2 J (BXD) recombinant inbred mouse strains // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-476>
87. *Shan L., Ma D., Zhang C. et al.* miRNAs may regulate GABAergic transmission associated genes in aged rats with anesthetics-induced recognition and working memory dysfunction // *Brain Res.* 2017. V. 1670. P. 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.06.027>
88. *Xu L., Xu Q., Xu F. et al.* MicroRNA-325-3p prevents sevoflurane-induced learning and memory impairment by inhibiting Nupr1 and C/EBP β /IGFBP5 signaling in rats // *Aging (Albany NY).* 2020. V. 12. P. 5209–5220. <https://doi.org/10.18632/aging.102942>
89. *Wibrand K., Pai B., Siripornmongkolchai T. et al.* MicroRNA regulation of the synaptic plasticity-related gene Arc // *PLoS One.* 2012. V. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041688>
90. *Cohen J.E., Lee P.R., Fields R.D.* Systematic identification of 3'-UTR regulatory elements in activity-dependent mRNA stability in hippocampal neurons // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2014. V. 369. P. 20130509.
91. *He B., Chen W., Zeng J. et al.* MicroRNA-326 decreases tau phosphorylation and neuron apoptosis through inhibition of the JNK signaling pathway by targeting VAV1 in Alzheimer's disease // *J. Cell. Physiol.* 2020. V. 235. P. 480–493. <https://doi.org/10.1002/jcp.28988>
92. *Capitano F., Camon J., Licursi V. et al.* MicroRNA-335-5p modulates spatial memory and hippocampal synaptic plasticity // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2017. V. 139. P. 63–68.
93. *Gu Q.H., Yu D., Hu Z. et al.* MiR-26a and miR-384-35p are required for LTP maintenance and spine enlargement // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6789.
94. *Nair P.S., Rajas P., Ahvenainen M. et al.* Misic-listening regulates human microRNA expression // *Epi-genetics.* 2021. V. 16. P. 554–566.
95. *Eysert F., Coulon A., Boscher E. et al.* Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner // *Mol. Psychiatry.* 2021. V. 26. P. 5592–5607. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00926-w>
96. *Stevanato L., Thanabalasundaram L., Vysokov N., Sindén J. D.* Investigation of content, stoichiometry and transfer of miRNA from human neural stem cell line derived exosomes // *PLoS One.* 2016. V. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146353>
97. *Men Y., Yelick J., Jin S. et al.* Exosome reporter mice reveal the involvement of exosomes in mediating neuron to astroglia communication in the CNS // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 4136. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11534-w>
98. *Cui G.H., Guo H.D., Li H. et al.* RVG-modified exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease // *Immun Ageing.* 2019. V. 16. P. 10. <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0150-2>
99. *Puig-Parnau I., Garcia-Brito S., Faghihi N. et al.* Intracranial self-stimulation modulates levels of SIRT1 protein and neural plasticity-related microRNAs // *Mol. Neurobiol.* 2020. V. 57. P. 2551–2562. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01901-w>
100. *Zhao J., Zhang W., Wang S. et al.* Sevoflurane-induced

- POCD-associated exosomes delivered miR-584-5p regulates the growth of human microglia HMC3 cells through targeting BDNF // *Aging* (Albany NY). 2022. V. 14. P. 9890–9907. <https://doi.org/10.18632/aging.204398>.
101. *Sfera A., Cummings M., Osorio C.* Dehydration and cognition in geriatrics: A hydromolecular hypothesis // *Front. Mol. Biosci.* 2016. V. 3. P. 18.
 102. *Lugli G., Cohen A.M., Bennett D.A. et al.* Plasma exosomal miRNAs in persons with and without Alzheimer disease: Altered expression and prospects for biomarkers // *PLoS One.* 2015. V. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139233>.
 103. *Sierksma A., Lu A., Salta E. et al.* Deregulation of neuronal miRNAs induced by amyloid- β or TAU pathology // *Mol. Neurodegener.* 2018. V. 13. P. 54.
 104. *Hulst H.E., Schoonheim M.M., Van Geest Q. et al.* Memory impairment in multiple sclerosis: relevance of hippocampal activation and hippocampal connectivity // *Mult. Scler.* 2015. V. 21. P. 1705–1712. <https://doi.org/10.1177/1352458514567727>
 105. *Bezdicek O., Ballarini T., Buschke H. et al.* Memory impairment in Parkinson's disease: The retrieval versus associative deficit hypothesis revisited and reconciled // *Neuropsychology.* 2019. V. 33. P. 391–405. <https://doi.org/10.1037/neu0000503>
 106. *Henriques A.D., Machado-Silva W., Leite R.E.P. et al.* Genome-wide profiling and predicted significance of post-mortem brain microRNA in Alzheimer's disease // *Mech. Ageing Dev.* 2020. V. 191. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111352>
 107. *Guo R., Fan G., Zhang J. et al.* A 9-microRNA signature in serum serves as a noninvasive biomarker in early diagnosis of Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2017. V. 60. P. 1365–1377. <https://doi.org/10.3233/JAD-170343>
 108. *Satoh J., Kino Y., Niida S.* MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data // *Biomark. Insight.* 2015. V. 10. P. 21–31.
 109. *Liu X.H., Ning F.B., Zhao D.P. et al.* Role of miR-211 in a PC12 cell model of Alzheimer's disease via regulation of neurogenin 2 // *Exp. Physiol.* 2021. V. 106. P. 1061–1071. <https://doi.org/10.1113/EP088953>
 110. *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. V. 59. P. 1449–1458.
 111. *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. V. 20. P. 2218–2226.
 112. *Boese A.S., Saba R., Campbell K. et al.* MicroRNA abundance is altered in synaptoneurosomes during progression on disease // *Mol. Cell. Neurosci.* 2016. V. 71. P. 13–24.
 113. *Cai Y., Sun Z., Jia H. et al.* Rpph1 upregulates CDC42 expression and promotes hippocampal neuron dendritic spine formation by competing with miR-330-5p // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00027>.
 114. *Bottero V., Potashkin J.A.* Meta-analysis of gene expression changes in the blood of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease dementia // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20215403>
 115. *Lu L., Dai W., Zhu X., Ma T.* Analysis of serum miRNAs in Alzheimer's disease // *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.* 2021. V. 36. <https://doi.org/10.1177/15333175211021712>.
 116. *Dong Z., Gu H., Guo Q. et al.* Profiling of serum exosome miRNA reveals the potential of a miRNA panel as diagnostic biomarker for Alzheimer's disease // *Mol. Neurobiol.* 2021. V. 58. P. 3084–3094.
 117. *Samadian M., Gholipour M., Hajiesmaeili M. et al.* The eminent role of microRNAs in the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Front. Aging Neurosci.* 2021. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.641080>
 118. *Cosin-Tomas M., Antonell A., Llado A. et al.* Plasma miR-34a-5p and miR-545-3p as early biomarkers of Alzheimer's disease: potential and limitations // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. P. 5550–5562. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0088-8>
 119. *Yaqub A., Mens M.M.J., Klap J.M. et al.* Genome-wide profiling of circulatory microRNAs associated with cognition and dementia // *Alzheimers Dement.* 2023. V. 19. P. 1194–1203. <https://doi.org/10.1002/alz.12752>
 120. *Zhang C., Lu J., Liu B. et al.* Primate-specific miR-603 is implicated in the risk and pathogenesis of Alzheimer's disease // *Aging.* 2016. V. 8. P. 272–290. <https://doi.org/10.18632/aging.100887>
 121. *Majumder P., Chanda K., Das D. et al.* A nexus of miR-1271, PAX4 and ALK/RYK influences the cytoskeletal architectures in Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes // *Biochem. J.* 2021. V. 478. P. 32. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210175>
 122. *Qin Z., Han X., Ran J. et al.* Exercise-mediated alteration of miR-192-5p is associated with cognitive improvement in Alzheimer's disease // *Neuroimmunomodulation.* 2022. V. 29. P. 36–43. <https://doi.org/10.1159/000516928>
 123. *Dong H., Li J., Huang L. et al.* Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease // *Dis. Markers.* 2015. V. 2015. P. 625659.
 124. *Barros-Viegas A.T., Carmona V., Ferreira E. et al.* MiRNA-31 improves cognition and abolishes amyloid- β pathology by targeting APP and BACE1 in an animal model of Alzheimer's disease // *Mol. Ther. Nucleic*

- Acids. 2020. V. 19. P. 1219-1236.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.01.010>
125. Sun C., Liu J., Duan F. et al. The role of the microRNA regulatory network in Alzheimer's disease: a bioinformatics analysis // Arch. Med. Sci. 2021. V. 18. P. 206–222.
 126. Barak B., Shvarts-Serebro I., Modai S. et al. Opposing actions of environmental enrichment and Alzheimer's disease on the expression of hippocampal microRNAs in mouse models // Transl. Psychiatry. 2013. V. 3. e304.
<https://doi.org/10.1038/tp.2013.77>
 127. Tan X., Luo Y., Pi D. et al. MiR-340 reduces the accumulation of amyloid- β through targeting BACE1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) in Alzheimer's disease // Curr. Neurovasc. Res. 2020. V. 17. P. 86–92.
<https://doi.org/10.2174/1567202617666200117103931>
 128. Dakterzada F., Benitez I.D., Targa A. et al. 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. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.705989>
 129. Hajjri S. N., Sadigh-Eteghad S., Mehrpour M. et al. Beta-amyloid-dependent mirnas as circulating biomarkers in Alzheimer's disease: a preliminary report // J. Mol. Neurosci. 2020. V. 70. P. 871–877.
<https://doi.org/10.1007/s12031-020-01511-0>
 130. Hu L., Zhang R., Yuan Q. et al. The emerging role of microRNA-4487/6845-3p in Alzheimer's disease pathologies is induced by A β 25-35 triggered in SH-SY5Y cell // BMC Syst. Biol. 2018. V. 12 (Suppl. 7). P. 119.
<https://doi.org/10.1186/s12918-018-0633-3>
 131. Wang T., Zhao W., Liu Y. et al. MicroRNA-511-3p regulates A β 1-40 induced decreased cell viability and serves as a candidate biomarker in Alzheimer's disease // Exp. Gerontol. 2023. V. 178.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112195>
 132. Liu Q.Y., Chang M.N.V., Lei J.X. et al. Identification of microRNAs involved in Alzheimer's progression using a rabbit model of the disease // Am. J. Neurodegener. Dis. 2014. V. 3. P. 33–44.
 133. Xu X., Gu D., Xu B. et al. 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. V. 29. P. 35934–35943.
 134. Lau P., Bossers K., Janky R. et al. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease // EMBO Mol. Med. 2013. V. 5. P. 1613–1634.
 135. Baek S.J., Ban H.J., Park S.M. et al. Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for poor sleep quality // Nat. Sci. Sleep. 2021. V. 13. P. 1001–1012. <https://doi.org/10.2147/NSS.S311541>
 136. Schonrock N., Ke Y.D., Humphreys D. et al. Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid- β // PLoS One. 2010. V. 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011070>
 137. Rahman M.R., Islam T., Zaman T. et al. Identification of molecular signatures and pathways to identify novel therapeutic targets in Alzheimer's disease: Insights from a systems biomedicine perspective // Genomics. 2020. V. 112. P. 1290–1299.
 138. Di Palo A.D., Siniscalchi C., Crescente G. et al. 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. V. 44. P. 5106–5116.
 139. Tan L., Yu J.T., Tan M.S. et al. Genome-wide serum microRNA expression profiling identifies serum biomarkers for Alzheimer's disease // J. Alzheimers Dis. 2014. V. 40. P. 1017–1027.
<https://doi.org/10.3233/JAD-132144>
 140. Zhang Y., Xia Q., Lin J. LncRNA H19 attenuates apoptosis in MPTP-induced Parkinson's disease through regulating miR-585-3p/PIK3R3 // Neurochem. Res. 2020. V. 45. P. 1700–1710.
<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03035-w>
 141. Soreq L., Salomonis N., Bronstein M. et al. Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation induced splicing changes that classify brain region transcriptomes // Front. Mol. Neurosci. 2013. V. 6. P. 10
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00010>
 142. Marsh A. G., Cottrell M. T., Goldman M. F. Epigenetic DNA methylation profiling with MSRE: A quantitative NGS approach using a Parkinson's disease test case // Front. Genet. 2016. V. 7.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00191>
 143. Honorato-Mauer J., Xavier G., Ota V.K. et al. Alterations in microRNA of extracellular vesicles associated with major depression, attention-deficit/hyperactivity and anxiety disorders in adolescents // Transl. Psychiatry. 2023. V. 13. P. 47.
 144. Goen K., Matby V.E., Lea R.A. et al. Erythrocyte microRNA sequencing reveals differential expression in relapsing-remitting multiple sclerosis // BMC Med. Genomics. 2018. V. 11. P. 48.
<https://doi.org/10.1186/s12920-018-0365-7>
 145. Liguori M., Nuzziello N., Licciulli F. et al. Combined microRNA and mRNA expression analysis in pediatric multiple sclerosis: An integrated approach to uncover novel pathogenic mechanisms of the disease // Hum. Mol. Genet. 2018. V. 27. P. 66–79.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddx385>

The Role of Transposable Elements in Long-Term Memory Formation

R. N. Mustafin^{1,*}, E. K. Khusnutdinova²

¹ *Bashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia*

² *Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

**e-mail: ruji79@mail.ru*

A number of experimental studies are described that challenge the significance of synaptic plasticity and prove the role of transposable elements in memory consolidation. This is due to the cis-regulatory influence of activated transposable elements on gene expression, as well as insertions into new genomic loci near the genes involved in brain functioning. RNAs and proteins of endogenous retroviruses are transported to dendritic synapses and transmit information to change gene expression in neighboring cells through the formation of virus-like particles in vesicles. Due to this, the relationship between synaptic plasticity and nuclear coding is ensured, since transposable elements are also drivers of epigenetic regulation due to relationship with the non-coding RNAs derived from them. Our analysis of the scientific literature allowed us to identify the role of 17 microRNAs derived from transposable elements in normal memory formation. In neurodegenerative diseases with memory impairment, we identified impaired expression of 44 microRNAs derived from transposable elements. This demonstrates the potential for targeting pathological transposon activation in neurodegenerative diseases for memory restoration using microRNAs as tools.

Keywords: microRNA, transposable elements, memory, retroelements, epigenetic mechanisms.

УДК 575.222.73:633.112.6:633.289

ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МИГРАЦИОННЫЕ ПУТИ КУЛЬТУРНОЙ ПОЛБЫ *Triticum dicoccum*

© 2024 г. А. В. Фисенко^{1,*}, А. Ю. Драгович^{1,**}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: fisenko800@mail.ru

**e-mail: dragova@mail.ru

Поступила в редакцию 20.11.2023 г.

После доработки 7.12.2023 г.

Принята к публикации 08.12.2023 г.

В период существенных климатических и экологических изменений и постоянного роста численности населения требуются новые эффективные подходы в селекции пшеницы, в частности углубленное изучение генетического и геномного разнообразия, а также происхождения и миграционных путей видов, генетически близких мягкой пшенице, которые могли бы быть донорами генов, контролирующими хозяйственно ценные признаки. К таким видам относится культурная полба *Triticum dicoccum* (Schrank) Schübl с субгеномами А и В ($2n = 28$), аналогичными соответствующим субгеномам гексаплоидной мягкой пшеницы. В обзоре рассматриваются вопросы генетического и геномного разнообразия культурной полбы, ее доместикиации и путей распространения. Дана характеристика некоторых генов *T. dicoccum*, интродуцированных в мягкую и твердую пшеницу, и перспективных для дальнейшего использования в селекции.

Ключевые слова: полба, *T. dicoccum*, биоразнообразие, доместикиация, миграционные пути.

DOI: 10.31857/S0016675824040022 **EDN:** CROYMR

Для решения проблемы глобальной продовольственной безопасности необходимы глубокие знания о биоразнообразии сельскохозяйственных культур. Как известно, пшеница – ключевая сельскохозяйственная культура мира, однако вопросы генетического разнообразия, происхождения и распространения различных видов пшеницы являются не до конца изученными. В частности, все возрастающий интерес для науки представляет широко распространенный в древности вид пшеницы – полба, *Triticum dicoccum* (Schrank) Schübl. Полба (эммер, двузернянка) – доместицированная форма дикой пшеницы *T. dicoccoides* (Koern. ex Aschers. et Graebn.) Schweinf, которая характеризуется пленчатым зерном с затрудненным обмолотом. Это старейшая злаковая культура, которая использовалась в пищу еще в эпоху Неолита и до начала нашей эры являлась одной из основных сельскохозяйственных культур Старого Света [1]. Ее доместикиация, по археологическим данным, происходила около 10000–8000 лет до н.э. на территории “Плодородного полумесяца” [2–5] (рис. 1) и считается определяющим фактором развития земледелия в целом [9].

Triticum dicoccum, как и его дикий предок *T. dicoccoides*, обладает геномом ВВА^uА^u, по-

служившим фундаментом для формирования геномов видов голозерной пшеницы: тетраплоидной твердой пшеницы *T. durum* (геном ВВА^uА^u) и гексаплоидной мягкой (хлебной) пшеницы *T. aestivum* (геном ВВА^uА^uDD). Оба вида голозерных пшениц характеризуются легким обмолотом и высокой зерновой продуктивностью, превосходящей продуктивность полбы [10–13]. В результате посевы голозерных видов в XX в. почти полностью вытеснили посевы полбы. В последние годы полба вновь приобретает популярность в связи с появившейся тенденцией использовать “древние” злаковые культуры для функционального питания [14]. Кроме того, неприхотливость культуры и устойчивость к болезням делают ее привлекательной как источник хозяйственно ценных генов для улучшения мягкой пшеницы. Биогеографическое моделирование предсказывает сокращение популяции культурных злаков в ближайшие десятилетия из-за их уязвимости к изменению климата [15], однако использование в селекции мягкой пшеницы генетического материала *T. dicoccum* и даже непосредственное применение улучшенных сортов этой культуры может стать одним из эффективных решений при нарастании экологических и климатических проблем в мире.

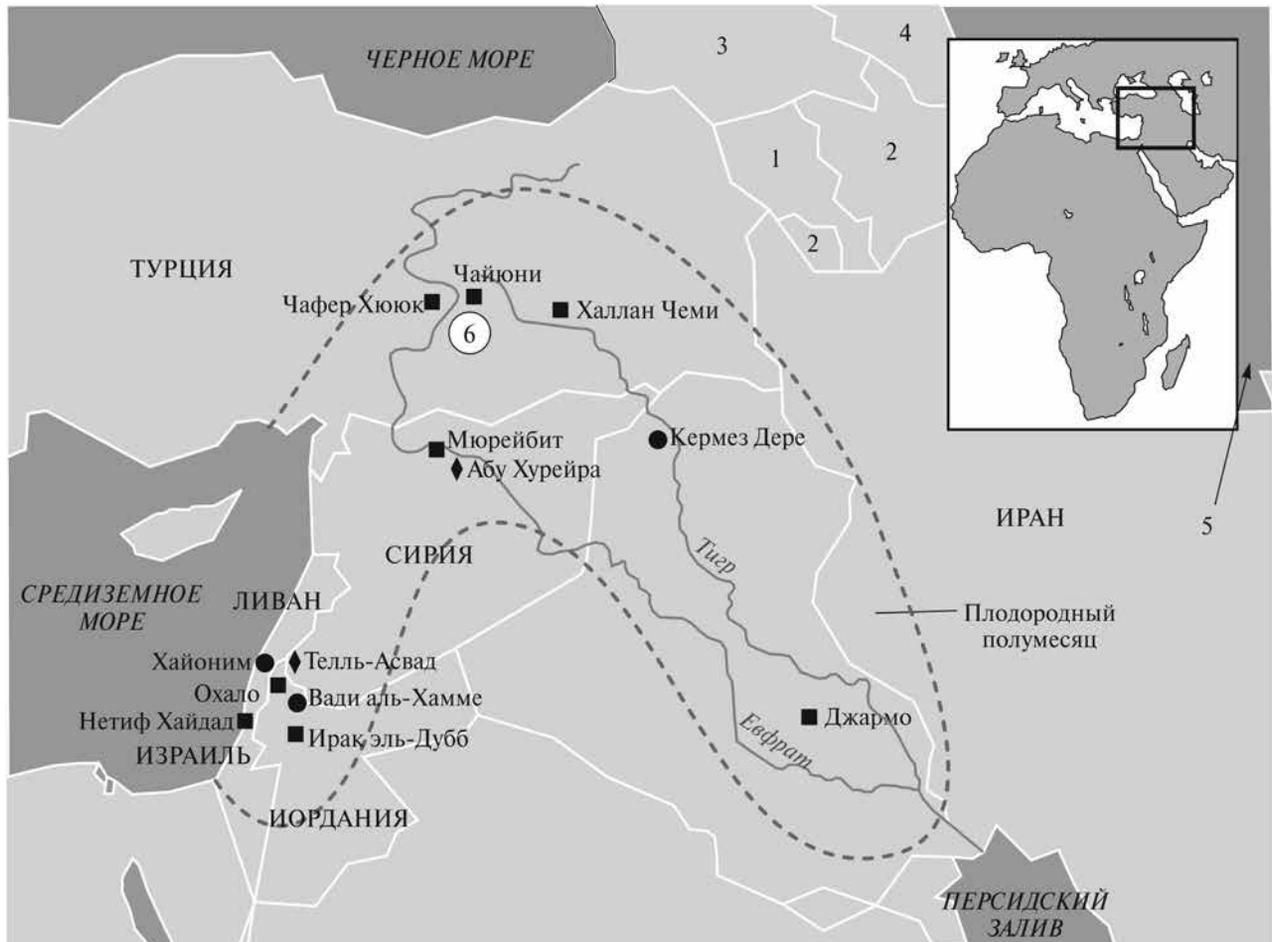


Рис. 1. Карта Передней Азии (использован рисунок из [6], с изменениями и добавлениями по [7, 8]). Пунктиром обозначены границы Плодородного Полумесяца; кружками обозначены места обнаружения только диких пшеницы и ячменя, квадратами – места обнаружения диких и доместичированных форм ячменя и пшеницы, ромбами – места обнаружения только возделываемых форм ячменя и пшеницы. 1 – Армения, 2 – Азербайджан, 3 – Грузия, 4 – Россия, 5 – Каспийское море, 6 – горный массив Каракадаг.

Исследования различных образцов полбы с помощью морфологических, генетических, геномных характеристик показали, что вид имеет высокий уровень разнообразия. Однако филогенетические отношения между образцами различного происхождения до сих пор остаются в значительной мере неопределенными, так же, как и центры доместикации полбы и пути ее распространения.

В этом обзоре мы рассматриваем наиболее разработанные версии филогенетических взаимоотношений между образцами полбы разного происхождения, центры доместикации и пути распространения культуры, включая также исторические и археологические данные наравне с морфо-экологическими, генетическими, цитогенетическими, геномными характеристиками.

ПРОЦЕСС ДОМСТИКАЦИИ, ВЕРОЯТНЫЕ РАЙОНЫ ДОМСТИКАЦИИ

Место доместикации полбы является предметом острой дискуссии. Наиболее ранняя находка дикорастущей полбы, собранной человеком, датируется 17400 гг. до н. э. (археологическая стоянка Ohalo II, на территории современного Израиля) [16]; исследование колосковых остатков с этой стоянки обнаружило у 36% колосков диагностические признаки, указывающие на наличие нерассыпающегося колосового стержня, что могло быть связано с началом процесса одомашнивания [17]. Однако затем колосья подобного типа в археологических слоях датируются только на 10 тыс. лет позднее, поэтому находки в Ohalo II рассматриваются как артефакт, не сыгравший существенной роли в доместикации пшеницы [18]. Систематически

же остатки культурной *T. dicocum* начинают встречаться начиная с конца X тысячелетия до н.э. [7]. Первые поселения, где зафиксировано появление одомашненной полбы – Iraq et-Dubb (9200–8800 лет до н. э.), Tell Qarassa (8700–8200 лет до н. э.), Mureybit (8500–7600 лет до н. э.), Tell Aswad (7700–7300 лет до н. э.), находятся на юго-западе Плодородного Полумесяца (территория современных Иордании и Сирии) [7, 19]. Только спустя тысячелетие одомашненная полба фиксируется на севере и востоке Плодородного Полумесяца (территории юго-восточной Турции и восточного Ирана) – поселения Chogha Golan (7800 лет до н. э.), Nevalı Çori (7250 лет до н. э.) и Çafar Höyük (7200–7000 лет до н. э.) [20–22], при этом в поселении Chogha Golan на востоке Ирана с самыми древними находками *T. dicocum* эта культура сразу фиксируется исключительно в одомашненной форме, без примеси дикорастущих форм, что предполагает ее завоз из других мест [22]. Такая хронология археологических находок дала основание ряду авторов [23, 24] считать юго-западную часть Плодородного полумесяца (южный Левант) основной областью доместикации культурных злаков.

Однако сравнительно-генетические исследования, проведенные на больших выборках образцов *T. dicoccoides* и *T. dicocum*, не подтвердили подобных выводов. Анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов AFLP-данных по 204 локусам показал, что 15 из 19 турецких образцов *T. dicocum* наиболее близкородственны популяции *T. dicoccoides*, собранной в горном массиве Каракадаг (Karaca Dağ) в вилайете Диярбакыр в юго-восточной Турции [25]. Отдельные образцы *T. dicoccoides*, генетически близкие к каракадагской популяции, встречались также в других районах юго-восточной Турции и в северо-восточном Ираке [25]. Исследования хлоропластной ДНК позволили выделить два микросателлитных гаплотипа *T. dicoccoides* – родоначальника культурной полбы, один из которых был локализован у горы Каргалдаги (Kartal Dağı) в районе Газиантеп, южная Турция, в 280 км к западу от Каракадага, а второй спорадически встречался в разных географических точках на юго-востоке Турции [26]. Анализ полиморфизма рестрикционных фрагментов (RFLP) подтвердил генетическое различие между южными и северными дикорастущими популяциями, а проведенная кластеризация поместила одомашненные полбы *T. dicocum* в одну группу с дикорастущей *T. dicoccoides* из юго-восточной Турции (север Плодородного

Полумесяца) [4]. Реконструкция филогении тетраплоидной пшеницы с использованием 150000 случайных SNP-меток также показала, что *T. dicoccoides* с северного Леванта кластеризуется с одомашненной полбой [15]. При использовании SNP-меток, локализованных в “локусах доместикации” *TtBtr1-A* и *TtBtr1-B* (3049 SNP для субгенома A1 и 4724 SNP для субгенома B1), были построены локальные филогении, оказавшие, что дикая полба из северного Леванта является наиболее близкой группой ко всей культурной пшенице [15]. В юго-восточной Турции были также обнаружены прямые дикорастущие предки еще одной важной в древности пшеницы – *T. monococum* [27], что привело к утверждению гипотезы о доместикации *T. dicocum* именно в этом регионе.

В попытке объяснить несоответствие между археологической хронологией и генетическими данными было высказано предположение, что после первоначальной доместикации на юге культура полбы была перенесена на север Плодородного Полумесяца, где произошло “одичание” части ранее доместичированных популяций, с этой точки зрения популяцию Каракадага, родственную культурной полбе, следовало бы рассматривать как раз в качестве “одичавшей” [24]. Однако более ранние работы большинства тритикологов с высокой степенью убедительности не соответствуют такой трактовке. Было показано, что процесс доместикации и распространения *T. dicocum* был не линейным, а сопровождался вторичной гибридизацией с *T. dicoccoides* и интрогрессией генов от дикой полбы к культурной при продвижении с севера в южную часть Плодородного Полумесяца [4, 28]. А отсутствие на севере археоботанических находок *T. dicocum*, хронологически более ранних или сопоставимых по времени с находками из южного Леванта, можно объяснить неполнотой археологической летописи и сложностью обнаружения наиболее древних палеолитических стоянок, где и технология устройства жилищ (отсутствие каменного строительства), и используемые в сельском хозяйстве орудия труда (серпы, орудия для обработки земли) обладали существенно меньшей технической сложностью и сохранностью.

Процесс вторичной гибридизации подтвердился в результате цитогенетических и геномных исследований [24, 29, 30], в которых было показано наличие у образцов *T. dicocum* генетического материала, привнесенного от *T. dicoccoides* с

юга Плодородного Полумесяца. Сравнительное изучение 158 тетраплоидных пшениц методом генотипирования посредством секвенирования (GBS) при разных вариантах статистической обработки материала (РСА-распределение на основе более 51 тыс. однонуклеотидных SNP-меток и построение NJ-дендрограммы на основе более 1.1 млн SNP-меток) однозначно подтвердило предположение о более близком генетическом родстве между дикими полбами с северной части Плодородного Полумесяца и одомашненной полбой, однако количественный вклад в генофонд культурной полбы аллелей, типичных для одной из “южных” популяций *T. dicoccoides*, оказался практически сопоставим с количеством аллелей, унаследованных *T. dicoccum* от “северных” популяций *T. dicoccoides* [24], что является аргументом существенного участия южно-levantийских популяций в формировании культурных полб. При использовании *fd*-статистики была дана оценка доли интрогрессии генома (proportion of genome introgression— PGI) южных популяций *T. dicoccoides* в одомашненной полбе, которая составила около 9% [31]. В итоге была предложена “дисперсионно-специфическая” гипотеза (dispersed-specific domestication model), постулирующая первоначальное распространение одомашненной полбы из районов юго-восточной Турции (север Плодородного Полумесяца) на юг, в южный Левант, но по пути движения обогатившейся новым генетическим материалом, полученным от местных популяций *T. dicoccoides* [4, 32].

ГЕНЫ ОДОМАШНИВАНИЯ

Длительный и непростой процесс одомашнивания *T. dicoccoides* был связан с постепенным накоплением генов, обеспечивающих “культурный” тип колоса, признаки которого следующие: а) утрата свободного рассеивания семян при созревании (неосыпаемость колоса); б) увеличение плотности колоса; в) уменьшение степени “спельтоидности”. Признаки, на которые направлены процессы одомашнивания у тетраплоидных форм, как известно, часто обладают полигенным контролем [33].

В отличие от дикорастущего родительского вида *T. dicoccoides* с очень ломким и рассыпающимся при созревании колосом, у культурного *T. dicoccum* присутствует признак “неломкая ось колоса”, позволяющая при созревании урожая убирать целые колоски. Признак неосыпаемости колоса контролируется рецессивными алле-

лями двух локусов *Br-A1* и *Br-B1* (от англ. *brittler achis*), локализованных на коротких плечах хромосом 3А и 3В соответственно и ортологичных генам *Btr1* и *Btr2*, определяющим культурный тип колоса у ячменя [34, 35] (рис. 2). Причиной появления рецессивных аллелей у этих локусов считаются: делеция в 2 пн (в 290 пн от стартового кодона) — для *Btr1* и вставка ~4 тпн (539 нуклеотидов от стартового кодона) — для *Btr2* [5]. При этом мутация по гену *Br-A1*, приводит к неосыпаемости колоса при созревании и определяет генеральное отличие дикорастущей полбы от всех ее культурных потомков. Система генов *Br-1* у тетраплоидных пшениц (включающая локусы *Br-A1* и *Br-B1*) определяет разлом колоса по “клиновидному типу”, т.е. с сохранением членика колосового стержня в нижней части колоска в виде клинышка. В отличие от тетраплоидов у пленчатых гексаплоидных пшениц ломкость колоса определяется другой генетической системой, унаследованной от донора генома D, при которой разлом колоса происходит по “бочковидному типу”, когда членик колосового стержня остается прикрепленным к внутренней части колоска [36].

Признак спельтоидности (длинный рыхлый колос), характерный для дикорастущего *T. dicoccoides*, контролируется моногенно доминантным аллелем, обозначенным как q^b [37]. *T. dicoccum* и другие тетраплоидные виды пшеницы с колосом средней плотности несут рецессивный аллель гена *q*. Считается, что у гексаплоидной пшеницы в процессе доместикации важнейшее значение имело появление комплексного фактора *Q*, ингибирующего спельтоидность и способствующего появлению целой группы голозерных видов [33]. Отдельный интерес представляют разновидности полбы с очень плотным колосом (“компактоидным” типом), например плотноколосая форма *T. dicoccum* var. *liguliforme* Körn несет дополнительно доминантный ген *Sp1* (*Compact plant 1*), локализованный в длинном плече хромосомы 5А дистальнее локуса *Q* [18, 38].

Еще один “ген одомашнивания”, рецессивная мутация по которому привела к появлению голозерных видов пшениц (например, *T. durum* и т.д.), — это ген *Tg2*, находящийся на хромосоме 2BS [39]. Однако этот тип мутации появился существенно позже возникновения *T. dicoccum* культурная полба так же, как и дикая полба, осталась пленчатым типом пшеницы с усложненным обмолотом, контролируемым доминантным геном *Tg2* [40] (рис. 2).

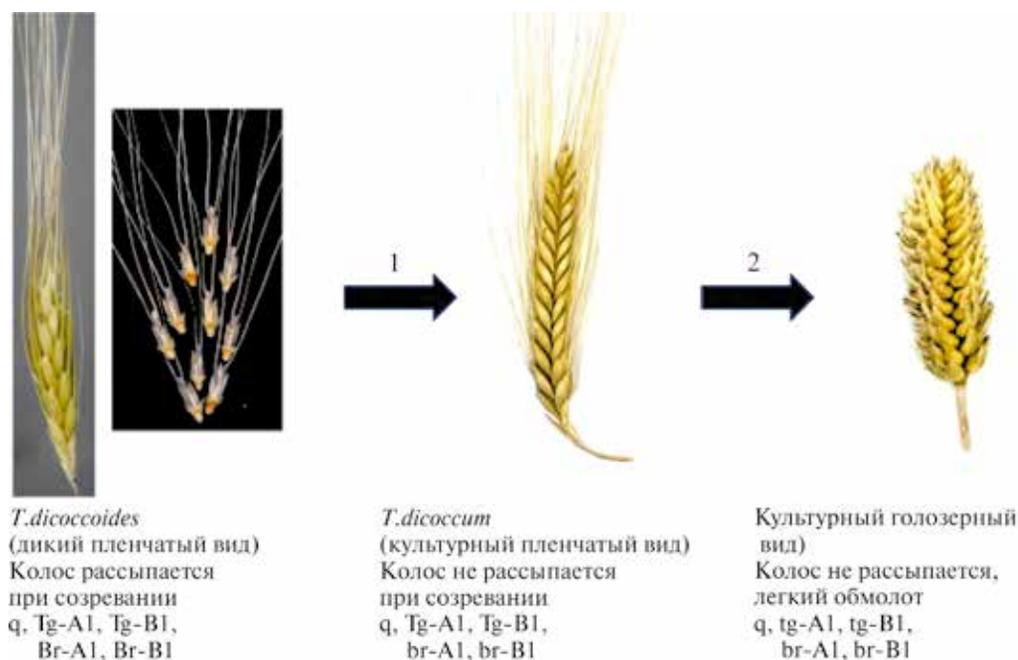


Рис. 2. Гены одомашнивания и морфотип колоса у тетраплоидных видов (по [13], с изменениями). 1 – мутации генов *Br-1* при переходе от *T. dicoccoides* к *T. dicoccum*; 2 – мутации генов *Tg* при переходе от *T. dicoccum* к голозерным видам тетраплоидов.

Помимо описанных выше признаков в процессе одомашнивания появились и другие признаки – повышение адаптивности растений в условиях культуры: уменьшение длины стебля повысило устойчивость растений к полеганию; увеличение ширины листовой пластинки и площади ее поверхности обеспечило повышение фотосинтетической активности растений, увеличение продуктивной кустистости, числа зерновок в колосе, а также увеличение общей зерновой продуктивности [41]. Как было установлено, изменение признаков продуктивности в процессе одомашнивания примерно на 70% обусловлено эффектами QTL, неслучайно распределенных между 14 хромосомами [42]; большая часть QTL была сгруппирована на хромосомах 4A, 5A и 5B, и в целом QTL преобладали в геноме A, полученном от *T. urartu* [42, 43]. Появление мутаций “культурного типа” колоса и накопление их в возделываемых популяциях, спонтанная гибридизация и рекомбинантный процесс на фоне постепенно повышающегося уровня агротехники способствовали отбору известных сейчас форм и разновидностей *T. dicoccum*.

Недавние исследования показали, что гены доместикации в геноме устойчивы к потоку генов из диких популяций из-за отбора, проводимого человеком и направленного против дедоместикации [15, 44, 45]. Поэтому интрогрессия

генов от дикорастущих форм не обязательно участвует в процессе одомашнивания [15].

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ПЕРИОДА ДОМСТИКАЦИИ.

Оценка времени доместикации растений является фундаментальной для понимания и реконструкции культурных процессов, лежащих в основе “неолитической революции”. Характерным примером является исследование диплоидных пшениц [46], которое показало, что частота встречаемости колосков однозернянок “культурного” типа среди всей совокупности обнаруженных колосков (включающей колоски как “культурного”, так и “дикого” типа) постепенно возрастает в разных по времени археологических слоях на протяжении почти четырех тысяч лет, с 0–24% в самых древних слоях (8200–7250 лет до н. э., поселения Nevali Çori и Qaramel) до 65–95% в более поздних (4500 лет до н. э., поселение Kosak Shamali). Аналогичные исследования по ячменю показали возрастание частоты встречаемости зерен культурного ячменя по отношению к дикорастущему от 30% (в слоях 7300–6500 лет до н. э., Tell Aswad) до 60% в слоях возрастом 6500–5500 лет до н. э., поселение Ramad [47].

Расчет скорости мутаций для тетраплоидной пшеницы, проведенный на основе SNP-меток,

показал, что отделение одомашненной полбы от дикорастущей произошло 10041 ± 160 лет назад, т.е. на рубеже VIII–IX тыс. до н. э., а отделение голозерных тетраплоидных видов от пленчатых произошло еще на 800 лет позже – 9269 ± 98 лет назад (в начале VIII тыс. до н. э.) [15]. Для *T. dicoccut* есть указание, что в одном из первых по хронологии поселений юга Леванта Tell Qarassa (8700–8200 лет. до н. э.) в смешанной популяции было зафиксировано 22.2% остатков пшеницы одомашненного типа [19]. Несовпадение по времени самых ранних находок *T. dicoccut* в южном Леванте (8200 лет до н. э. и более ранние находки) и теоретически рассчитанного отделения *T. dicoccut* от *T. dicoccoides* (около 8000 лет до н. э.) дало основание предположить, что первые южно-левантийские линии одомашненной полбы вымерли до возможного контакта с более поздними линиями из северного Леванта, и появление полбы в южном Леванте является “фальстартом” одомашнивания пшеницы [15]. Такое предположение, с одной стороны, снимает некоторые противоречия между генетическими и археологическими данными о происхождении вида, с другой, требует более тщательных вычислений обнаруженных датировок, так как расхождение в 200 и даже в 700 лет на 10000-летнем интервале истории не выглядит достаточно убедительным.

В чуть более поздних поселениях: Tell Aswad и Jericho на юге Леванта уже отмечается почти тысячелетний период (VIII–VII тыс. до н. э.), смешанного культивирования видов *T. dicoccut* и *T. dicoccoides* в археологических поселениях [48]; согласно некоторым предположениям, период вытеснения дикорастущих форм из смешанной популяции мог быть и гораздо дольше [49].

ВНУТРИВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И БОТАНИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ *T. dicoccut*

Дикорастущий *T. dicoccoides* характеризуется высоким внутривидовым полиморфизмом как по геномным, так и по молекулярным маркерам, в частности он обладает высоким полиморфизмом по рДНК [50], а также исключительным разнообразием SRAP- [51], EST-SSR- [52] и SSR-аллелей [41], значительно превосходящим разнообразие культивируемых видов пшеницы. В работе по сравнению уровней генетического разнообразия между дикорастущей полбой и культурными видами тетраплоидных пшениц у культурных форм была обнаружена су-

щественная потеря нуклеотидного разнообразия в 21 исследуемом локусе [53], причем, как было отмечено при обсуждении данной работы [54], потеря разнообразия была зафиксирована даже при численно ограниченной выборке *T. dicoccoides*. Одомашненная полба также уступает своему дикому предку по уровню полиморфизма, выявляемому методом С-бэндинга [29]. При этом среди других культурных тетраплоидных видов *T. dicoccut* выделяется наибольшим полиморфизмом по SNP-маркерам, уступая только своей дикорастущей форме [55]. Однако сокращение генетического разнообразия полбы при одомашнивании фиксируется не во всех работах. Одно из сравнительных исследований уровней нуклеотидного разнообразия у *T. dicoccoides* и *T. dicoccut* показало лишь незначительное его сокращение при переходе к культурному виду: среднее нуклеотидное разнообразие у одомашненной полбы $p = 1.1 \times 10^{-3}$, а у дикорастущих предков $p = 1.3 \times 10^{-3}$ [5]. В исследовании с использованием показателя гетерогенности Нея обнаружено, что разнообразие *T. dicoccut* составляет до 95% от разнообразия дикорастущего *T. dicoccoides* [56]. Следует учитывать, что часть разнообразия культурной полбы была сформирована уже после расхождения с дикорастущим прародителем в результате накопления “аллелей одомашнивания” и адаптивно-значимых мутаций при продвижении в новые природно-климатические зоны. При исследовании 198 образцов дикой и культурной полбы с помощью метода GBS было обнаружено 24799 аллелей, которые зафиксированы у *T. dicoccut*, но не обнаружены ни в одной из диких популяций; эти аллели играют важную роль в формировании доместичированного фенотипа и расширяют генетическое разнообразие *T. dicoccut* [24].

Широкая генетическая база, на основе которой сформировалось разнообразие культурной полбы, благоприятствовала появлению большого морфо-экологического разнообразия, описанного еще в начале прошлого века [57, 58]. Ряд исследователей даже разделили *T. dicoccut* на отдельные виды [59], однако в большинстве работ вид *T. dicoccut* подразделяется на несколько подвидов. В классификации ВИР в соответствии с морфолого-экологическими характеристиками и занимаемыми ареалами *T. dicoccut* разделяется на четыре подвида: эфиопский (Эфиопия, Йемен, Индия), европейский (Центральная и Западная Европа), марокканский (Марокко) и восточный [10]. При этом последний подвид подразделяется на волжско-балканскую (convar.

serbicum (A.Schulz) Flaksb.) и закавказскую (convar. *transcaucasicum* Flaksb.) группы [10, 58, 60].

В результате современных цитогенетических исследований [29] и секвенирования генома [5, 61] были выделены следующие группы полб: европейская (средиземноморская), восточноевропейская (включая балканскую и поволжскую группы), кавказская (азиатская) и эфиопская (индоокеанская). Марокканские образцы при этом не были выделены в отдельную группу, равнозначную по систематическому статусу четырем вышеперечисленным группам, но составили (совместно с несколькими алжирскими образцами) обособленный хромосомный тип, близкий к полбам Южной Европы [29]. Образцы *T. dicocum* из Поволжья в этих классификациях, так же как и в классификации ВИР, показали ближайшее родство с балканскими полбами [10, 29]. Исследование *T. dicocum* по SNP-меткам выявило разделение вида на две обособленные группы, в одну из которых вошли образцы из Европы, Кавказа, Закавказья и Ирана, а в другую — образцы из Эфиопии, Йемена и Индии [30]; вторая группа в этом исследовании фактически совпадает с эфиопской группой, выделенной и другими исследователями, но подчеркнута ее заметное обособление.

Начало внутривидовой дифференциации лежит, по-видимому, еще на стадии одомашнивания, когда первые полукультурные формы *T. dicoccoides* проникли из северной части Плодородного Полумесяца в южную его часть и в процессе спонтанной гибридизации с дикорастущими сородичами обогащались генетическим материалом, свойственным южным популяциям. Вслед за первичным центром разнообразия в северном Леванте возник вторичный центр разнообразия в южном Леванте, охватывающий территории современных Сирии, Ливана, Палестины [12, 54]. Возникновение подвидов *T. dicocum* — результат распространения полбы из этих двух центров в различных направлениях и дальнейшая дифференциация вида. Исследователями поднимался вопрос, почему базовыми популяциями для одомашнивания полбы стали популяции из северо-восточной и северной части Плодородного Полумесяца (Каракадаг, Каргалдаги), а не из южной его части [54]. При ответе на этот вопрос справедливо было отмечено важное значение географического фактора. Дело в том, что южный Левант в IX–VIII тыс. до н. э. был по сути географическим тупиком: путь на восток преграждали сирийские пустыни, на

западе лежало Средиземное море, и только на юге была долина Нила, которую, однако, начали осваивать только спустя тысячелетия — с появлением технологии пойменного земледелия и строительства оросительных каналов. В то же время с территории северного Леванта открывались естественные пути распространения на запад, восток и север, что и обусловило формирование в этом регионе первичного центра распространения [54]. Еще в одной работе, где полиморфизм по SNP-маркерам у тетраплоидных видов изучался методом секвенирования генома, южная часть Плодородного Полумесяца определена как центр разнообразия *T. dicoccoides* [62], что, по-видимому, повлияло и на популяции *T. dicocum*, которые выращивались в этом регионе и обогащались генетическим материалом, полученным от дикорастущих форм.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ПОЛБЫ

Важную роль в распространении вида и внутривидовой дифференциации играла географическая экспансия, связанная с миграциями человека [63]. Не менее важную роль на разных этапах распространения могли сыграть также эффекты изоляции и “бутылочного горлышка”, рельеф местности (наличие горных хребтов и водных преград), который напрямую определял направление движения генетических потоков, природно-климатические условия (широта местности и высота над уровнем моря), обусловившие формирование генотипов, максимально адаптированных к определенным условиям [54, 64]. Картина распространения полбы также ограничена неполнотой археологической летописи, имеет хронологические пробелы; кроме того, существуют трудности с идентификацией злаков по обугленному материалу [54]. Тем не менее многие этапы распространения полбы удалось проследить.

Исследование эфиопской полбы (методом SNP) позволило обнаружить у нее генетический материал южно-levantайского *T. dicoccoides* [30], что может указывать на прохождение потока полбы, ушедшей в Эфиопию, через юго-западные районы Плодородного Полумесяца. Цитогенетическими исследованиями установлено наличие генетического материала, полученного от дикорастущей полбы из южного Леванта (Ливан, Сирия), не только у эфиопской, но и у европейской культурной полбы, в частности у ряда “южных” образцов *T. dicoccoides* была обнаружена транслокация T7A:5B, широко распространен-

ная среди некоторых групп культурной полбы из Европы [29]. Нужно отметить, что цитогенетические исследования проводились на гораздо более обширном материале — более 400 образцов [29] по сравнению с работой по секвенированию генома, где было использовано менее 30 образцов [30], отчего обоснованность выводов об определенном участии генетического материала “южных” форм *T. dicoccoides* в происхождении как европейской, так и эфиопской полбы выглядит более основательно. Закавказская и волжско-балканская группы, по-видимому, не связаны в своем продвижении с районами южного Леванта, а европейская и эфиопская полбы еще на ранних этапах своей эволюции так или иначе соприкасались с этим регионом. В дальнейшем разные группы полбы распространяются сразу по нескольким направлениям: на запад и север в Средиземноморье и Европу, на юг в Эфиопию и на восток вплоть до Кавказа и Индии. Полба при этом была одной из основных, а местами и основной культурой, которую возделывали древние земледельцы.

При распространении в восточном направлении к началу VI тыс. до н. э. полба вышла на равнины Месопотамии, к середине VI тыс. достигает Туркменистана (Джейтунская культура, предгорья Копетдага) [65, 66], в это же время присутствие полбы зафиксировано в Пакистане (неолитическая стоянка Mehrgarh) [67]. В Индию она проникает в 4700–4500 гг. до н. э. [68]. Предполагается существование как минимум двух путей, по которым полба попала в Индию: сухопутный путь через Иран и Афганистан — в северо-западную Индию [69] и морской путь из северо-восточной Африки — в южную Индию [4].

В V тыс. до н. э. полба появляется в Египте (южное направление) и становится основной зерновой культурой вплоть до поздне-римского времени [70]. Около 3000 лет до н. э. полба завезена на Эфиопское нагорье [2]. Изучение по признакам морфологии колоса музейных образцов египетской полбы возрастом 1000 лет до н. э. [58], подтвержденное впоследствии и геномными исследованиями этих образцов [30, 61], позволило доказать родство древних египетских полб с эфиопскими, а также их принадлежность к одному подвиду subsp. *abyssinicum*. Основываясь на близком родстве старых египетских и эфиопских полб, М. Feldman предположил, что в Эфиопию полба пришла через Египет, двигаясь вверх по Нилу [2]. Другая точка зрения предполагает, что на Эфиопское нагорье полба могла

быть завезена из Йемена, где *T. dicoccum* присутствует в археологических памятниках Al-Raqlah и Al-Masannah (конец III тыс. до н. э.) [71].

Существенные расхождения существуют и в вопросе появления полбы в Омане и Южной Аравии: одни авторы предполагают завоз семенного материала из Эфиопии [70], другие же исследователи предположили путь интродукции полбы в Оман из Азии через Иран, а не из Африки через Йемен [72]. По экологическим характеристикам Н.И. Вавилов [73] подвид subsp. *abyssinicum* подразделял на группы *proprioabyssinicum* (Эфиопия, Эритрея), *yemenicum* (Йемен и Оман) и *indostanicum* (Индия). По-видимому, как йеменские, так и оманские полбы, имеющие близкие ареалы на юге Аравийского полуострова, могли формироваться под влиянием разнонаправленных торговых и миграционных потоков. На это может косвенно указывать исследование генов яровизации и фотопериода, проведенное на стародавних гексаплоидных пшеницах этого региона. Исследование генов *Vrn* и *Ppd* у йеменских аборигенных сортов мягкой пшеницы и обнаружение в этом регионе высокого аллельного разнообразия по указанным генам показало, что формирование этого разнообразия происходило при участии генетического материала, переносимого по торговым путям как с севера, из Передней Азии, так и из стран востока (Иран, Индия) [74]. Отличительной особенностью эфиопских и индийских полб является высокая частота встречаемости у них доминантного гена гибридного некроза *Ne1* (более 60%), тогда как в группах из европейских стран, Закавказья и Поволжья его частота встречаемости составляет только от 7 до 28% [75]; такой характер распространения генов *Ne1* подтверждает тесные связи, существовавшие между индийскими и эфиопскими полбами, но может и указывать на адаптивное значение доминантных аллелей гена *Ne1* в южных широтах.

Археолого-ботанические исследования позволили восстановить и пути распространения полбы в северо-западном направлении. Из южного Леванта, двигаясь на запад, полба через территорию южной Анатолии достигла Греции (6600 лет до н. э., начало культуры Балканского неолита) [1, 76], затем Болгарии и Среднего Дуная — 6050–5700 лет до н. э. (Центрально-Балканская группа и культура Винча) [76–79]. Почти сразу с территории Подунавья культура полбы распространяется на запад, север и восток Европы. Буго-Днестровской низменности полба достигает в VI–V тыс. до н. э. (Старчево-Криш

и Трипольская культура); начиная с 5600 г. до н. э. в степях северо-западного и северного Причерноморья появляются земледельческие поселения, где *T. dicocum* возделывается наряду с *T. monococum* и *T. spelta* (Буго-Днестровская, а затем Донецкая археологические культуры) [80]. Одновременно с 5500 г. до н. э. полба распространяется по территории центральной и западной Европы (Культура линейно-ленточной керамики) [81].

Также из южно-левантийского центра, как предполагается, морским путем полба распространилась по всему Средиземноморью [1, 67]. Распространение европейских полб из южного Леванта подтверждается на основе RFLP-анализа [4], а также результатами цитогенетических исследований – в генофонде европейских полб обнаружены транслокации, характерные для образцов из районов Ливана и Палестины [29]. Отдельный интерес представляет группа морфологически обособленных марокканских полб, среди которых с повышенной частотой встречаются формы с укороченным плотным колосом “компактоидного” типа [58]. Исследование марокканских образцов методом С-бэндинга обнаружило их генетическое родство, с одной стороны, с полбами из южной Европы, с другой, с некоторыми образцами из Алжира [29]. Можно предположить существование как минимум двух генетических потоков, сформировавших местный генофонд *T. dicocum* северо-западной Африки: поток материала из Испании и других стран Средиземноморья и, возможно, торговым путем из Эфиопии и оазисов Сахары.

Практически одновременно с Европой полба появляется и на Кавказе. Современные археоботанические исследования показали, что на территории Азербайджана полба начала возделываться уже в 5500 гг. до н. э., поселение Шомутепе [82], а в 5000 гг. до н. э. полба фиксируется в Дагестане (поселение Чох) и в Грузии (Арухло) [83].

В европейской части России исторической областью, где долгое время сохранялась культура полбы, являлось Поволжье. Возделывание *T. dicocum* начинается в Поволжье с VII в. н. э., вместе с приходом из Придонья болгарских племен, и достигает расцвета в X–XIII вв. в Волжской Булгарии [84]. В XVI–XIX вв. русское население, пришедшее на Среднюю Волгу, приносит с собой трехпольную систему земледелия и традиционные для этой системы озимую рожь, овес и ячмень. Посевные площади, занятые полбой,

начинают сокращаться. Тем не менее даже в начале XX в. сохранялись обширные посевы полбы в Прикамье, в Среднем и Нижнем Поволжье главным образом у чувашей, татар, удмуртов и мордвы [84]. Только во второй половине XX в. с приходом интенсивных технологий и повышением требований к урожайности возделываемых культур возделывание полбы в данном регионе почти сходит на нет.

Движение генетических потоков культуры не было строго линейным, возникающие торговые и миграционные потоки зачастую перемешивали разные популяции и задавали новый вектор их распространению. Так, известно, что в период расцвета античной Греции большие закупки полбы на регулярной основе осуществлялись греками в Крыму и Придонье у скифов [85], а историческая наследница греков – Византийская империя точно также продолжала закупать зерно полбы в северном Причерноморье у тюрского населения региона – болгар [57]. В эти исторические периоды могло происходить формирование генетически близких между собой популяций *T. dicocum* циркумпонтийского региона (Балкан, Малой Азии и северного Причерноморья); в совокупности эти популяции составляют волжско-балканский подвид полбы, обладающий своими уникальными генетическими характеристиками. В XX в. полба в северном Причерноморье и на нижнем Дону уже не зафиксирована, однако археологические и исторические свидетельства [84, 86, 87], а также морфогенетическое и цитогенетическое сходство поволжских полб с балканскими и малоазиатскими [10, 29, 58] свидетельствуют о возможности происхождения поволжских полб с территории Причерноморья (за исключением восточной его части, где доминирует уже закавказский подвид).

Расцвет использования полбы человеком приходится на период IV–III тыс. до н. э. В период со II до I тыс. н. э. полба постепенно замещается голозерными высокопродуктивными видами пшеницы – тетраплоидной *T. durum* и гексаплоидной *T. aestivum* [12, 67], сохранившись только в отдельных относительно изолированных регионах.

ПОЛБА В СОВРЕМЕННОМ СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ

В середине XX в. в СССР в Государственный реестр входил единственный сорт полбы – Пол-

ба 3, который был районирован на территории Нижней и Средней Волги вплоть до 1979 г. К концу XX в. полба в мире занимала не более 1% от всей посевных площадей пшеницы и культивировалась только в отдельных небольших районах Балкан, Эфиопии, Поволжья, Центральной Европы, Италии, Индии и Йемена [88, 89].

Однако в XXI в. происходит возрождение интереса к этой культуре, что связано с появившейся в последнее время тенденцией использования “древних” злаковых культур для функционального питания [14]. Появились новые современные сорта: в 2023 г. Госреестр Российской Федерации включал семь сортов *T. dicoccum* (Балда, Греммэ, Греммэ 2У, Здрава, Псковитянка, Руно, Янтара), созданных в нескольких ведущих селекционных центрах и районированных в различных природно-климатических зонах страны от Краснодарского края до Уральского региона [90].

Кроме того, *T. dicoccum* все чаще используется в селекции как вид-донор широкого спектра хозяйственно ценных генов для улучшения голозерных видов пшеницы. Установлено, что образец ярославской полбы (Vernal Emmer), попавший в Северную Америку и с начала XX в. активно использовавшийся там в селекционной работе [91, 92], послужил донором целого ряда эффективных генов устойчивости: *Pm5a* (к мучнистой росе), *Sr2*, *Sr9d*, *Sr17* (к стеблевой ржавчине), *Lr14a* (к бурой ржавчине), обогативших генофонд мягкой и твердой пшеницы [93–96]. Индийский сорт полбы Kharli, также использованный в селекции, послужил донором генов устойчивости *Pm4a*, *Sr13*, *Sr14* [97] для мягкой пшеницы. Среди разнообразия *T. dicoccum* обнаруживаются все новые гены устойчивости: к мучнистой росе – *Mlre* [98], к гессенской мухе – *Hdic* [99]. Сравнительно высокая устойчивость к различным заболеваниям, адаптивность к неблагоприятным условиям и одновременно достаточно ограниченное на сегодняшний день использование вида в селекционных работах делает *T. dicoccum* одним из наиболее перспективных видов для исследования, в рамках разнообразия которого возможен поиск и обнаружение еще большего количества эффективных генов хозяйственно ценных признаков, устойчивости и адаптивности.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zohary D., Hopf M., Weiss E. Domestication of plants in the Old World, 4th ed. Oxford: Oxford Univ. Press, 2012. 316 p.
2. Feldman M. The world wheat book. A history of wheat breeding. Paris: Lavoisier Publ. 2001. P. 3–56.
3. Ozkan H., Brandolini A., Pozzi C. et al. A reconsideration of the domestication geography of tetraploid wheats // Theor. Appl. Genet. 2005. V. 110. № 6. P. 1052–1060. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-1925-8>
4. Luo M.-C., Yang Z.-L., You F.M. et al. The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 114. № 6. P. 947–959. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0474-0>
5. Avni R. Nave M., Barad O. et al. Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication // Science. 2017. V. 357. P. 93–97. <https://doi.org/10.1126/science.aan0032>
6. Salamini F., Ozkan H., Brandolini A. et al. Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. P. 429–441. <https://doi.org/10.1038/nrg817>
7. Nesbitt M. When and where did domesticated cereals first occur in southwest Asia? // The Dawn of Farming in the Near East. Berlin: Ex oriente, 2002. P. 113–132.
8. Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я. Происхождение, доместикация и эволюция пшениц // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 1/2. С. 159–179.
9. Zohary D. Unconscious selection and the evolution of domesticated plants // Econ. Bot. 2004. V. 58(1). P. 5–10. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2004\)058\[0005:un-sateo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2004)058[0005:un-sateo]2.0.co;2)
10. Дорофеев В.Ф., Якубцинер М.М., Руденко М.И. и др. Пшеницы мира. Л.: Колос, 1976. 486 с.
11. Lev-Yadun S., Gopher A., Abbo S. The cradle of agriculture // Science. 2000. V. 288. № 5471. P. 1602–1603. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1602>
12. Dubcovsky J., Dvorak J. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication // Science. 2007. V. 316. № 5833. P. 1862–1866. <https://doi.org/10.1126/science.1143986>
13. Levy A. A., Feldman M. Evolution and origin of bread wheat // Plant Cell. 2022. V. 34. P. 2549–2567. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac130>
14. Arzani A., Ashraf M. Cultivated ancient wheats (*Triticum* spp.): A potential source of health-beneficial food

- products // *Comprehensive Rev. in Food Sci. and Food Safety*. 2017. V. 16. № 3. P. 477–488.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12262>
15. *Zhao X., Guo Y., Kang L. et al.* Population genomics unravels the Holocene history of bread wheat and its relatives // *Nat. Plants*. 2023. V. 9. P. 403–419.
<https://doi.org/10.1038/s41477-023-01367-3>
 16. *Weiss H., Wetterstrom W., Nadel D., Bar-Yosef O.* The board spectrum revisited: Evidence from plant remains // *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*. 2004. V. 101. P. 9551–9555.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0402362101>
 17. *Snir A., Nadel D., Groman-Yaroslavski I. et al.* The origin of cultivation and protoweeds, long before Neolithic farming // *PLoS One*. 2015. V. 10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131422>
 18. *Гончаров Н.П.* Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск: Гео, 2012. 523 с.
 19. *Arranz-Otaegui A., Colledge S., Ibanez J.J., Zapata L.* Crop husbandry activities and wild plant gathering, use and consumption at the EPPNB Tell Qarassa North (south Syria) // *Veget. Hist. Archaeobot.* 2016. V. 25. P. 629–645.
<https://doi.org/10.1007/s00334-016-0564-0>
 20. *Harlan J.R., Zohary D.* Distribution of wild wheats and barley // *Science*. 1966. V. 153. P. 1074–1080.
 21. *Bar-Yosef O.* The Natufian culture in the Levant, threshold to the origins of agriculture // *Evolut. Anthropol.* 1998. V. 6. P. 159–177. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6505\(1998\)6:5<159::aid-evan4>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6505(1998)6:5<159::aid-evan4>3.0.co;2-7)
 22. *Riehl S., Zeidi M., Conard N.J.* Emergence of agriculture in the foothills of the Zagros Mountains of Iran // *Science*. 2013. V. 341. P. 65–67. <https://doi.org/10.1126/science.1236743>
 23. *Jones M.K., Allaby R.G., Brown T.A.* Wheat domestication // *Science*. 1998. V. 279. № 5349. P. 302–303.
 24. *Oliveira H.R., Jacocks L., Czajkowska B.I. et al.* Multiregional origins of the domesticated tetraploid wheats // *PLoS One*. 2020. V. 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227148>
 25. *Ozkan H., Brandolini A., Schafer-Pregl R., Salamini F.* AFLP analysis of a collection of tetraploid wheat indicated the origin of emmer and hard wheat domestication in southeastern Turkey // *Mol. Biol. Evol.* 2002. V. 19. P. 1797–1801. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004002>
 26. *Mori N., Ishii T., Ishido T. et al.* Origins of domesticated emmer and common wheat inferred from chloroplast DNA fingerprinting // *Proc. 10th Intern. Wheat Genet. Symp.* (1–6 September 2003, Paestum, Italy). Rome: Istituto Sperimentale per la Cereali coltura, 2003. P. 25–28.
 27. *Heun M., Schafer-Pregl R., Klawan D. et al.* Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting // *Science*. 1997. V. 278. № 5341. P. 1312–1314.
<https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1312>
 28. *Civáň P., Ivaničová Z., Brown T.A.* Reticulated origin of domesticated emmer wheat supports a dynamic model for the emergence of agriculture in the fertile crescent // *PLoS One*. 2013. V. 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081955>
 29. *Badaeva E.D., Keilwagen J., Knüpfner H. et al.* Chromosomal passports provide new insights into diffusion of emmer wheat // *PLoS One*. 2015. V. 10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128556>
 30. *Iob A., Botigue L.* Genomic analysis of emmer wheat shows a complex history with two distinct domestic groups and evidence of differential hybridization with wild emmer from the western Fertile Crescent // *Veget. History and Archaeobotany*. 2023. V. 32. P. 545–558.
<https://doi.org/10.1007/s00334-022-00898-7>
 31. *Zhou Y., Zhao X., Li Y. et al.* *Triticum* population sequencing provides insights into wheat adaptation // *Nat. Genetics*. 2020. V. 52. P. 1412–1422.
<https://doi.org/10.1038/s41588-020-00722-w>
 32. *Cheng H., Liu J., Wen J. et al.* Frequent intra- and inter-species introgression shapes the landscape of genetic variation in bread wheat // *Genome Biol.* 2019. V. 20. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1744-x>
 33. *Мак Кей Дж.* Генетические основы систематики пшениц // *С.-х. биология*. 1968. Т. 3. № 1. С. 12–25.
 34. *Watanabe N., Ikebata N.* The effects of homoeologous group 3 chromosomes on grain colour dependent seed dormancy and brittle rachis in tetraploid wheat // *Euphytica*. 2000. V. 115. P. 215–220.
<https://doi.org/10.1023/A:1004066416900>
 35. *Watanabe N., Sugiyama K., Yamagishi Y., Sakata Y.* Comparative telosomic mapping of homoeologous genes for brittle rachis in tetraploid and hexaploid wheats // *Hereditas*. 2002. V. 137. P. 180–185.
<https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2002.01609.x>
 36. *Li W., Gill B.S.* Multiple genetic pathways for seed shattering in the grasses // *Funct. Integr. Genomics*. 2006. V. 6. P. 300–309.
<https://doi.org/10.1007/s10142-005-0015-y>
 37. *Tsujimoto H.* Production of near-isogenic lines and marked monosomic lines in common wheat (*Triticum aestivum*) cv. Chinese spring // *J. Heredity*. 2001. V. 92. P. 254–259.
<https://doi.org/10.1093/jhered/92.3.254>
 38. *Kosuge K., Watanabe N., Melnik V.M. et al.* New sources of compact spike morphology determined by the genes on chromosome 5A in hexaploid wheat // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012. V. 59. P. 1115–1124.
<https://doi.org/10.1007/s10722-011-9747-9>
 39. *Simonetti M.C., Bellomo M.P., Laghetti G. et al.* Quantitative trait loci influencing free-threshing habit in tetraploid wheats // *Genet. Resour. Crop Evol.* 1999. V. 46. P. 267–271.

- <https://doi.org/10.1023/A:1008602009133>
40. *Matsuoka Y.* Evolution of polyploid *Triticum* wheats under cultivation: The role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification // *Plant Cell Physiol.* 2011. V. 52. P. 750–764. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr018>
41. *Nevo E.* Evolution of wild emmer wheat and crop improvement // *J. Systematics and Evolution.* 2014. V. 52 № 6. P. 673–696. <https://doi.org/10.1111/jse.12124>
42. *Peng J., Ronin Y., Fahima T. et al.* Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 2489–2494. <https://doi.org/10.1073/pnas.252763199>
43. *Ling H.-Q., Zhao S., Liu D. et al.* Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu* // *Nature.* 2013. V. 496. P. 87–90. <https://doi.org/10.1038/nature11997>
44. *He F., Pasam R., Shi F. et al.* Exome sequencing highlights the role of wild-relative introgression in shaping the adaptive landscape of the wheat genome // *Nat. Genetics.* 2019. V. 51. P. 896–904. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0382-2>
45. *Nyine M., Adhikari E., Clinesmith M. et al.* Genomic patterns of introgression in interspecific populations created by crossing wheat with its wild relative // *Genes Genomes Genetics Early Online.* 2020. g3.401479.2020. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401479>
46. *Tanno K., Willcox G.* How fast was wild wheat domesticated? // *Science.* 2006. V. 311. № 5769. P. 1886. <https://doi.org/10.1126/science.1124635>
47. *van Zeist W., Bakker-Heeres J.A.H.* Archaeobotanical studies in the Levant. 1. Neolithic sites in the Damascus basin: Aswad, Ghoraife, Ramad // *Palaeohistoria.* 1975. V. 24. P. 165–256.
48. *Feldman M., Kislev M.E.* Domestication of emmer wheat and evolution of free-threshing tetraploid wheat // *Israel J. Plant Sci.* 2007. V. 55. P. 207–221. <https://doi.org/10.1560/IJPS.55.3-4.207>
49. *Lev-Yadun S., Gopher A., Abbo S.* How and when was wild wheat domesticated? // *Science.* 2006. V. 313. № 5785. P. 296–297. <https://doi.org/10.1126/science.313.5785.296b>
50. *Flavell R., O'dell M., Sharp P. et al.* Variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel // *Mol. Biol. Evol.* 1986. V. 3. P. 547–558.
51. *Dong P., Wei Y.-M., Chen G.-Y. et al.* Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) in Israel and its ecological association // *Biochem. Syst. Ecol.* 2010. V. 38. P. 1–11.
52. *Dong P., Wei Y.-M., Chen G.-Y. et al.* 2009. EST–SSR diversity correlated with ecological and genetic factors of wild emmer wheat in Israel // *Hereditas.* 2009. V. 146. P. 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2009.02098.x>
53. *Haudry A., Cenci A., Ravel C. et al.* Grinding up wheat: A massive loss of nucleotide diversity since domestication // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 1506–1517. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm077>
54. *Ozkan H., Willcox G., Graner A. et al.* Geographic distribution and domestication of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2011. V. 58. P. 11–53. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9581-5>
55. *Ganugi P., Palchetti E., Gori M. et al.* Molecular diversity within a mediterranean and European panel of tetraploid wheat (*T. turgidum* subsp.) landraces and modern germplasm inferred using a high-density SNP array // *Agronomy.* 2021. V. 11. P. 414. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030414>
56. *Thuillet A.C., Bataillon T., Poirier S. et al.* Estimation of long-term effective population sizes through the history of durum wheat using microsatellite data // *Genetics.* 2005. V. 169. P. 1589–1599. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029553>
57. *Столетова Е.А.* Полба-эммер, *Triticum dicoccum* Schrank // *Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции.* 1924. Т. 14. Вып. 1. С. 27–98.
58. *Фляксбергер К.А.* Пшеницы – род *Triticum* L. // *Культурная флора СССР. Т. 1. Хлебные злаки.* Л.: Сельхозгиз, 1935. С. 19–434.
59. *Цвелев Н.Н., Пробатова Н.С.* Злаки России. М.: КМК., 2019. 649 с.
60. *Вавилов Н.И.* Пшеницы Абиссинии и их положение в общей системе пшениц: к познанию 28-хромосомной группы культурных пшениц. Л.: ВИР., 1931. С. 221–228.
61. *Scott M.F., Botigué L.R., Brace S. et al.* 3000-year-old Egyptian emmer wheat genome reveals dispersal and domestication history // *Nat. Plants.* 2019. V. 5. P. 1120–1128. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0534-5>
62. *Yadav I.S., Singh N., Wu S. et al.* Exploring genetic diversity of wild and related tetraploid wheat species *Triticum turgidum* and *Triticum timopheevii* // *J. Adv. Research.* 2023. V. 48. P. 47–60. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.08.020>
63. *Cavalli-Sforza L.L., Menozzi P., Piazza P.* The history and geography of human genes. Princeton: Princeton Univ. Press, 1994.
64. *Вавилов Н.И.* Центры происхождения культурных растений // *Тр. По прикл. ботанике и селекции.* 1926. Т. 16. № 2. 248 с.
65. *Mellaart J.* The Neolithic of the Near East. London: ThamesandHudson, 1975. 101 p.
66. *Harris D.R., Masson V.M., Berezin Y.E. et al.* Investigating early agriculture in Central Asia: New research at Jeitun, Turkmenistan // *Antiquity.* 1993. V. 67. № 255. P. 324–338.

67. Zaharieva M., Ayana N.G., Al Hakimi A. et al. Cultivated emmer wheat (*Triticum dicoccon* Schrank), an old crop with promising future: a review // Genet. Resour. Crop Evol. 2010. V. 57. P. 937–962. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9572-6>
68. Stevens C.J., Murphy C., Roberts R. et al. Between China and South Asia: A middle Asian corridor of crop dispersal and agricultural innovation in the Bronze Age // Holocene. 2016. V. 26. P. 1541–1555. <https://doi.org/10.1177/0959683616650268>
69. Mani B. R. Further evidence on Kashmir Neolithic in the light of recent excavations at Kanishkapura // J. Interdisciplinary Studies in History and Archaeology. 2004. V. 1. P. 137–143.
70. Nesbitt M., Samuel D. From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheat // Hulled wheats: Promoting the Conservation and used of underutilized and neglected crops / Eds Padulosi S., Hammer K., Heller J. Rome: IPGRI, 1996. P. 40–99.
71. Mehra K.L. The origin, domestication and selection of crops for specific Yemeni environments // Indigenous Knowledge and Sustainable Agriculture in Yemen / Eds Al-Hakimi A., Pelat F. Sana: Centre Français d'Archéologie et de Sciences Sociales, Cahiers du CE-FAS, 2003. P. 9–14.
72. Hammer K., Gebauer J., Al Khanjari S., Buerkert A. Oman at the cross-road of inter-regional exchange of cultivated plants // Genet. Res. Crop Evol. 2009. V. 56. P. 547–560. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9385-z>
73. Вавилов Н.И. Мировые ресурсы сортов хлебных злаков, зерновых бобовых, льна и их использование в селекции. М.: Наука, 1964. 122 с.
74. Драгович А.Ю., Фисенко А.В., Янковская А.А. Гены яровизации (VRN) и фотопериода (PPD) у староместных яровых сортов гексаплоидной пшеницы // Генетика. 2021. Т. 57. № 3. С. 332–344. <https://doi.org/10.31857/S0016675821030061>
75. Пухальский В.А., Билинская Е.Н. Материалы по изучению генов гибридного некроза у сортообразцов вида *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl // Генетика. 1999. Т. 35. № 10. С. 1390–1395.
76. Weninger B., Clare L., Gerritsen F. et al. Neolithisation of the Aegean and Southeast Europe during the 6600–6000 calBC period of Rapid // Documenta Praehistorica XLI. 2014. V. 41. P. 1–31. <https://doi.org/10.4312/dp.41.1>
77. Палагута И.В. Мир искусства древних земледельцев Европы. Культуры балкано-карпатского круга в VII–III тыс. до н.э. СПб.: Алетейя, 2012. 336 с.
78. Peric S. Drenovac: A Neolithic settlement in the Middle Morava Valley, Serbia // Antiquity. 2017. V. 91. № 357. P. 11–33. <https://doi.org/10.15184/aqy.2017.41>
79. Marinova E. Archaeobotanical data from the early Neolithic of Bulgaria // The Origins and Spread of Domestic Plants in Southwest Asia and Europe / Eds Colledge S., Connelly J. London: Institute of Archaeology, 2007. P. 93–109.
80. Pashkevich G.F. Agriculture in East European steppe and forest-steppe in the Neolithic-Bronze Ages: paleoethnobotanical evidence // Stratum Plus. 2000. V. 2. P. 404–418.
81. Baldia M.O. The Central and North European Neolithic. Copper Age Chronology // The Comparative Archaeology Web. 2006. https://www.comp-archaeology.org/Central_European_Neolithic_Chronology.html
82. Тагиева Е.Н., Велиев С.С. Природные условия и первые земледельческо-скотоводческие культуры Азербайджана // Изв. РАН. Серия геогр. 2014. № 2. С. 103–115.
83. Lisitsina G.N. The Caucasus, a centre of ancient farming in Eurasia // Plants and Ancient Man. / Eds van Zeis W., Casparie W.A. Rotterdam: Balkema, 1984. P. 285–292.
84. Туганаев В.В., Туганаев А.В. Агроэкосистемы Предуралья и Среднего Поволжья: от начала земледелия до современности // Бюлл. бот. сада Саратовского гос. ун-та. 2009. № 8. С. 25–46.
85. Зинько В.Н., Пашкевич Г.А. Палеоботанические материалы из ранних комплексов Тиритаки // Боспорские исследования. 2010. Вып. XXIV. С. 65–83.
86. Артамонов М.И. История хазар. Л.: Изд-во Гос. Эрмитажа, 1962. 523 с.
87. Плетнева С.А. От кочевий к городам. Салтово-маяцкая культура. М.: Наука, 1967. 200 с.
88. Damania A.B., Valkoun J., Willcox G. et al. The origin of agriculture and crop domestication. Aleppo: ICARDA, 1998. 352 p.
89. Муслимов М.Г., Исмаилов А.Б. Полба – ценная зерновая культура // Зерновое хозяйство России. 2012. № 3. С. 40–42.
90. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т.1. “Сорта растений” (официальное издание). М., 2023. <https://reestr.gossortrf.ru/>
91. Clark J.A., Martin J.H., Ball C.R. Classification of American Wheat Varieties // Bull. USDAN 1074. Washington, 1922. 238 p.
92. Рабинович С.В. Современные сорта пшеницы и их родословные. Киев: Урожай, 1972. 327 с.
93. Hsam S.L.K., Huang X.Q., Zeller. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Alleles at the *Pm5* locus // Theor. Appl. Genetics. 2001. V. 102. P. 127–133.
94. Beuningen L.V., Bush R.H. Genetic diversity among North American spring wheat cultivars // Crop Sci. 1997. V. 37. P. 580–585. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1997.0011183X003700030046X>

95. *Luig N.H.* A survey of virulence genes in wheat stem rust, *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* // Suppl. to J. Plant Breed.: Advances in Plant Breeding. 1983. V. 11. 198 p.
96. *McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F.* Wheat rust. An atlas of resistance genes. Australia: CSIRO, 1995. 200 p.
97. Сорта зерновых культур с известными генами устойчивости к грибным болезням // Каталог мировой коллекции ВИР. Вып. 453. Л.: ВИР, 1988. 79 с.
98. *Robe P., Doussinault G.* Genetic analysis of powdery-mildew resistance of a winter wheat line, RE714, and identification of a new specific-resistance gene // Plant Breeding. 1995. V. 114. P. 387–391. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00817.x>
99. *Liu X., Brown-Guedira G.L., Hatchett J.O. et al.* Genetic characterization and molecular mapping of a Hessian fly-resistance gene transferred from *T. turgidum* ssp. *dicoccum* to common wheat // Theor. Appl. Genetics. 2005. V. 111. P. 1308–1315. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0059-3>

Origin, Genetic Diversity and Migration Routes of Cultivated Emmer *Triticum dicoccum*

A. V. Fisenko^{1,*}, A. Yu. Dragovich^{1,**}

¹Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: fisenko800@mail.ru

**e-mail: dragova@mail.ru

During the period of significant climatic and environmental changes and the constant growth of the human population, new effective approaches in wheat breeding are required, in particular, the study of genetic and genomic diversity, origin and migration routes of species genetically related to common wheat, which could be donors of genes controlling economically valuable characteristics. Such species include the cultivated emmer *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl. With subgenomes A and B ($2n = 28$), similar to the corresponding subgenomes of hexaploid common wheat. The review examines the issues of genetic and genomic diversity of cultivated emmer, its domestication and routes of distribution. The characteristics of some *T. dicoccum* genes introduced into common and durum wheat, or promising for further use in breeding, are given.

Keywords: emmer, *T. dicoccum*, biodiversity, domestication, migration routes.

УДК 575.164

ФУНКЦИИ ХЕЛИКАЗЫ MLE *Drosophila melanogaster* ВНЕ ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА И ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ МУТАЦИИ *mle[9]*

© 2024 г. Г. А. Ашников¹, С. Г. Георгиева¹, Ю. В. Николенко^{1, *}¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com

Поступила в редакцию 25.09.2023 г.

После доработки 16.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Хеликаза *Drosophila melanogaster* MLE – консервативный у высших эукариот белок, ортолог хеликазы DHX9 человека. У млекопитающих показано участие этой хеликазы на разных стадиях экспрессии генов. У *D. melanogaster* активно изучалась роль MLE как одного из компонентов видоспецифичного комплекса дозовой компенсации. Однако роль MLE в других процессах оставалась мало изученной. В данной работе впервые картирована на молекулярном уровне мутация *mle[9]* и показано, что она вызвана делецией, приводящей к утрате высококонсервативного мотива III в каталитическом “ядре” молекулы. Таким образом, мутация *mle[9]* специфически нарушает хеликазную активность белка, не затрагивая функции других доменов. Изучение фенотипических проявлений мутации у самок показало, что в гомозиготном состоянии она имеет плеiotропный эффект. Не оказывая влияния на выживаемость, она существенно снижает фертильность и продолжительность жизни. Кроме того, с высокой частотой наблюдается удвоение скутеллярных макрохет. Полученные результаты подтверждают, что у *D. melanogaster* хеликаза MLE вне дозовой компенсации вовлечена в широкий спектр процессов регуляции экспрессии генов.

Ключевые слова: MLE, хеликаза, продолжительность жизни, фертильность, плеiotропный фенотип, *Drosophila melanogaster*.

DOI: 10.31857/S0016675824040034 **EDN:** CRIPZ

MLE (Maleless) – консервативный в эволюции белок семейства DExH-хеликаз [1, 2]. Ген, кодирующий ортолог MLE, был обнаружен в геномах многих высших эукариот, включая млекопитающих и человека [3–5]. У разных организмов этот белок был известен под названиями NDHII (nuclear DNA helicase II) или RHA (RNA helicase A). В настоящее время эти белки, включая MLE, объединяют под общим названием DHX9. В клетках млекопитающих хеликазы DHX9 вовлечены в широкий спектр процессов, от поддержания стабильности генома до регуляции трансляции [6, 7].

MLE *D. melanogaster* и все DHX9 имеют сходный размер и мультидоменное строение. Наиболее консервативна центральная часть молекулы, так называемое каталитическое “ядро”, определяющее способность белка АТФ-зависимо расплетать разнообразные формы ДНК, РНК и ДНК-РНК-гибридов [1, 8]. Специфичность же функций, выполняемых MLE в клетках *in vivo*, определяется доменами, расположенными на N- и C-концах молекулы [9, 10]. Многие функции

DHX9 консервативны в эволюции, поэтому их детальное изучение в модельном организме может иметь большое практическое значение.

Изучение функций DHX9 у млекопитающих ограничено тем, что мутации, приводящие к потере функции этого белка, в гомозиготном состоянии приводят к эмбриональной летальности. Поэтому исследования проводятся в основном на линиях клеток. У *D. melanogaster* такие мутации не дают летального эффекта на эмбриональной стадии, что позволяет изучать функции MLE *in vivo* на протяжении всего онтогенеза у самок и до стадии куколки у самцов [11, 12]. На протяжении многих лет MLE у *D. melanogaster* рассматривалась почти исключительно как компонент видоспецифичного комплекса дозовой компенсации [13, 14]. Однако тот факт, что мутации MLE у самок *D. melanogaster* не дают летального эффекта, не означает, что MLE не выполняет важных функций вне дозовой компенсации. В последние годы появились данные о том, что в клетках *D. melanogaster* и в клетках млекопитающих хеликазы MLE и DHX9 вовлечены в одни и те же процессы. Также

мидный гель в равных количествах (1/2 объема полученной пробы, что соответствует экстракту из 10 особей, на одну лунку геля).

Анализ выживаемости самок

Параллельно было поставлено две серии скрещиваний: гомозиготных самок и гетерозиготных самок линии #5873 скрещивали с гетерозиготными самцами той же линии. Свежевылетевшие имаго были рассажены в пять пробирок с питательной средой (по пять самцов и пять самок в одну пробирку), пересадка на свежую среду проводилась ежедневно в течение пяти дней. Были подсчитаны потомки, произведенные самками за первые пять суток жизни. Эксперимент был проведен в двух биологических повторностях. Суммарно в каждой из двух серий скрещиваний было проанализировано не менее 200 самок каждого исследованного генотипа.

Анализ продолжительности жизни

Для получения одновозрастных самок в достаточном количестве, помещали в одну пробирку по пять самок и пять самцов линий #5873 (десять пробирок) и *Oregon R* (десять пробирок), отсаживали родителей через три дня. Свежевылетевших одновозрастных виргильных самок F1 каждого исследованного генотипа рассаживали по 20 штук в одну пробирку и пересаживали на свежую среду каждые два дня до конца жизни, одновременно ведя подсчет умерших особей. Эксперимент был проведен в двух биологических повторностях. Суммарно было проанализировано не менее 100 самок каждого исследованного генотипа. Особей, случайно потерянных при пересадке, исключали из финального расчета.

Анализ фертильности самок

Для получения одновозрастных самок в достаточном количестве помещали в одну пробирку по пять самок и пять самцов линий #5873 (десять пробирок) и *Oregon R* (десять пробирок), отсаживали родителей через три дня. Отбирали свежевылетевших одновозрастных виргильных самок F1. Рассаживали по пять самок каждого исследованного генотипа в пробирки с пятью самцами дикого типа, пересаживали на свежую среду ежедневно. Затем подсчитывали количество куколок, развившихся из яиц, отложенных самками за одни сутки, на 10–14 сут после кладки. Эксперимент был проведен в двух биологических повторностях. Суммарно было проанализировано потомство 50 самок каждого исследованного генотипа.

Анализ частоты удвоения скутеллярных макрохет

Эксперимент был проведен в двух биологических повторностях параллельно с анализом выживаемости самок. Одновременно с подсчетом количества гомо- и гетерозиготных самок проводили подсчет количества скутеллярных макрохет. Суммарно было проанализировано не менее 300 самок каждого исследованного генотипа.

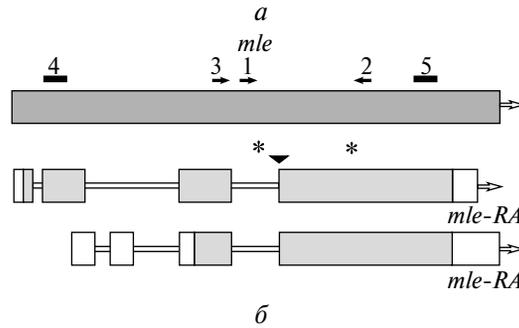
Статистический анализ

Статистический анализ проводился в программе RStudio <https://posit.co/products/open-source/rstudio/> (язык программирования R). Проверку полученных данных на нормальность проводили при помощи теста Шапиро-Уилка. Для анализа продолжительности жизни и фертильности сравнение экспериментальных групп с ненормальным распределением проводили с помощью теста Манна-Уитни. Отсутствие статистически значимых различий между биологическими повторностями в экспериментах было установлено с помощью теста Манна-Уитни. Для повышения статистической мощности метода далее проводились сравнения суммарных количеств мух из двух повторностей. Для анализа представленности фенотипа удвоения макрохет использовали критерий Хи-квадрат и точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Анализ последовательности ДНК гена *mle* в мутантах *mle[9]**

Схематическое изображение гена *mle* и его транскриптов представлено на рис.1,*a*. Согласно литературным данным [18] делеция *mle[9]* расположена в районе протяженностью примерно 1000 пн между двумя сайтами рестриктазы NincII. Для точного картирования делеции в настоящей работе были подобраны олигонуклеотидные зонды 1 и 2 (рис. 1,*a*) и соответствующая область генома была субклонирована для последующего секвенирования. Мы использовали геномную ДНК, выделенную из самок дикого типа (линия *Oregon R*) и из самок линии #5873, гомозиготных по мутации *mle[9]*. Чтобы исключить любую возможную примесь ДНК гена *mle* дикого типа, в эксперименте использовали только виргильных самок. Сравнение последовательности ДНК, полученной от мутантных самок, с референсным геномом и с последовательностью ДНК самок дикого типа, позволило нам точно картировать мутацию. Оказалось, что она представляет собой делецию 49 нуклеотидов и захватывает 8 нуклеотидов последнего интрона и 41 нуклеотид начала последнего экзона гена (рис. 1,*б*).



ДНК ...ttctattgcagTTATTCTTATGTCGGCCACTATTGATACAACGAAATTTTCCAAATATTTTGGCATCTGTCCC GTATTGGAAGTA
 С... кДНК ...TTATTCTTATGTCGGCCACTATTGATACAACGAAATTTTCCAAATATTTTGGCATCTGTCCC GTATTGGAAGTAC...

Рис. 1. Молекулярное картирование мутации *mle[9]* на уровне ДНК и мРНК.

а – схематическое изображение гена *mle* и его транскриптов. *mle-RA* – транскрипт, кодирующий полноразмерный белок; *mle-RC* – гипотетический транскрипт. Звездочками обозначены сайты эндонуклеазы рестрикции HincII; стрелками обозначено положение зондов 1, 2 и 3, использованных для картирования делеции; черным треугольником – установленное нами точное положение делеции. Черные отрезки указывают положение зондов для измерения уровня транскрипции *mle* “выше” (4) и “ниже” (5) делеции; *б* – фрагмент нуклеотидной последовательности в районе делеции *mle[9]* в ДНК и кДНК. В ДНК строчными буквами обозначена последовательность интрона, прописными буквами – экзона; последовательность, делетированная в мутации *mle[9]*, выделена серым цветом, подчеркнуты динуклеотиды AG – акцепторные сайты сплайсинга в гене дикого типа и в мутации.

Анализ последовательности мРНК гена mle в мутантах mle[9]

Поскольку делеция *mle[9]* затрагивает границу интрона и экзона гена *mle*, анализ последовательности был продолжен на уровне мРНК. Помимо полноразмерного транскрипта А, возможно существование и более короткого транскрипта С, однако затронутые мутацией *mle[9]* интрон и экзон входят в состав обоих транскриптов. Методом обратной транскрипции мы получили кДНК тотальной полиаденилированной РНК виргильных самок, гомозиготных по мутации *mle[9]* и самок дикого типа. Субклонировали и секвенировали последовательность *mle* при помощи зондов 2 и 3 (рис. 1,а). Сравнение последовательности кДНК мутантов с кДНК дикого типа и с референсными транскриптами, показало, что в мРНК делеция была более протяженной и захватывала 72 нуклеотида последнего экзона. Различие в длине делеции *mle[9]* в ДНК и мРНК легко объяснимо: поскольку делеция в ДНК вырезает 3'-сайт сплайсинга (AG) сплайсинг в мутантах идет по первому альтернативному сайту AG, и, таким образом, начало последнего экзона сдвигается (рис. 1,б).

Анализ последовательности белка MLE в мутантах mle[9]

Согласно полученным данным, в результате мутации *mle[9]* на уровне белка должно происхо-

дить вырезание 24 а.о. (а.о. 536–559) без сдвига открытой рамки считывания (рис. 2,а). Анализ на уровне доменной структуры белка показывает, что мутация затрагивает самую консервативную область молекулы – первый ResA-подобный домен каталитического “ядра”, полностью делетируется консервативный мотив III (рис. 2,б). Выравнивание этой части последовательности белка у представителей разных таксонов высших эукариот представлено на рис. 2,в. Видно, что 9 из 24 делетированных в мутации а.о. идентичны (и еще шесть подобны) у всех представленных организмов. Ранее было показано, что мотив III отвечает за хеликазную активность белка [28, 29]. Таким образом, на основании анализа последовательности следовало ожидать, что в мутантных особях будет экспрессирован белок, практически не отличимый по размеру и доменной структуре от белка дикого типа, но лишенный хеликазной активности.

Мутация mle[9] не нарушает экспрессию гена

Поскольку мутация в теле гена, затрагивающая границу экзона и интрона, потенциально может привести к нарушениям транскрипции, далее было исследовано влияние мутации *mle[9]* на транскрипцию гена *mle* у гомозиготных самок. В качестве контроля использовали гетерозиготных самок из той же линии #5873. Были использованы зонды как на 3'-концевую область мРНК (общую для обоих транскриптов), так и на 5'-концевую область мРНК (специфи-

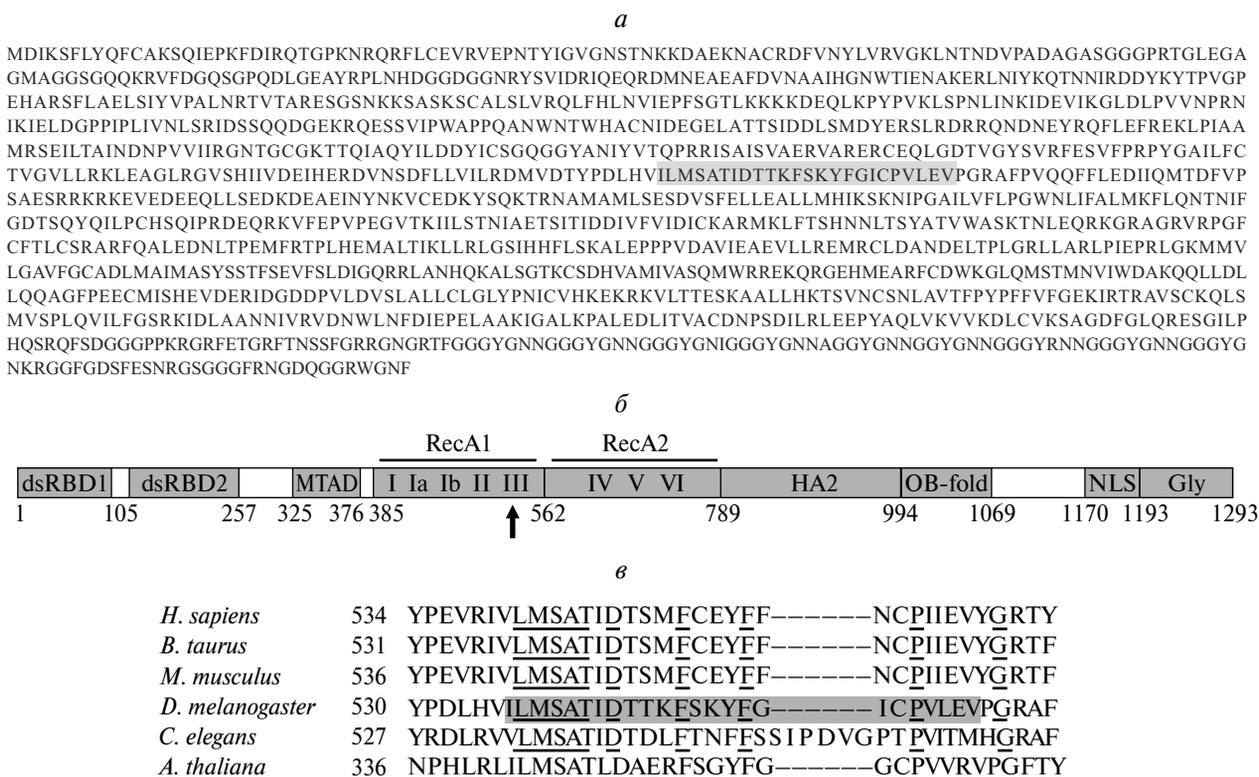


Рис. 2. Структура белка MLE в мутантах *mle[9]*. *a* – аминокислотная последовательность белка MLE. Делеция выделена серым цветом; *б* – доменное строение MLE (цит. по [7] с изменениями). Районы, соответствующие определенным доменам, обозначены серым цветом, линкерные участки – белым цветом. Представлены два домена связывания дцРНК – dsRBD1 и dsRBD2, минимальный домен трансактивации MTAD, каталитическое “ядро”, состоящее из доменов RecA1 и RecA2 и хеликаза-ассоциированного домена HA2, область связывания олигосахарида/олигонуклеотида OB-fold, сигнал ядерной локализации NLS, глицин-богатый С-концевой домен Gly. Консервативные мотивы обозначены римскими цифрами, положение делеции обозначено черной стрелкой; *в* – выравнивание последовательности, содержащей мотив III, у представителей разных видов. Подобные у разных видов а.о. выделены жирным шрифтом, идентичные а.о. выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Делеция *mle[9]* выделена серым цветом.

ческую для полноразмерного транскрипта А). По данным проекта modENCODE на стадии имаго в самках на самом высоком уровне ген *mle* транскрибируется в головах и также на заметном уровне – в яичниках. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени мы проанализировали экспрессию гена *mle* и установили, что в тканях гомозиготных мутантных самок делеция *mle[9]* не приводит к существенному нарушению транскрипции (рис. 3,а).

Белок MLE экспрессируется на протяжении всего онтогенеза у *D. melanogaster* обоего пола, однако уровень экспрессии на стадии имаго в самках очень невелик по сравнению с высоким уровнем экспрессии в самцах. Поэтому для исследования белка MLE в самках мы, ориентируясь на данные проекта modENCODE, выбрали стадии развития с самым высоким уровнем экспрессии, на кото-

рых мы могли при этом достоверно определить пол особей. Это стадии поздней (блуждающей) личинки L3 и ранней куколки. Для того чтобы получить возможность отличать гомозиготных по мутации *mle[9]* самок от гетерозиготных, было поставлено скрещивание, в результате которого несущая ген *mle* дикого типа балансерная хромосома *SuO* была заменена балансерной хромосомой *SuO, Tb[1]*. В результате гетерозиготные по мутации *mle[9]* особи имели укороченное тело и были легко отличимы от гомозиготных.

Антитела к MLE, полученные ранее в нашей лаборатории [16], специфичны для N-концевого домена, поэтому способны распознавать полноразмерный белок (~140 кДа) как дикого типа, так и с делецией. Ядерные экстракты [11], полученные из личинок и куколок, были проанализированы методом Вестерн-блот. Как мы и ожидали,

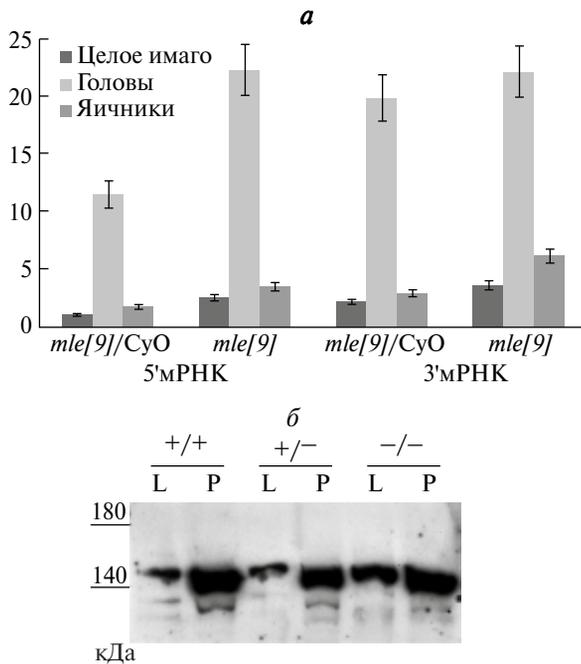


Рис. 3. Мутация *mle*[9] не нарушает экспрессию гена *in vivo* в гомозиготных самках. *а* – транскрипция *mle* в самках с мутацией *mle*[9]. Уровень транскрипции *mle* в имаго измерен относительно уровня транскрипции контрольного гена β -*Tubulin56D*. Используются зонды, расположенные “выше” (5’) и “ниже” (3’) делеции *mle*[9]. Гетерозиготные самки той же линии (+/-) используются в качестве положительного контроля. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку измерений; *б* – Вестерн-анализ экспрессии белка MLE в личинках и куколках. L – блуждающие личинки L3, P – куколки, возраст одни сутки; “-/-” – гомозиготные, “+/-” – гетерозиготные, “+/+” – *Oregon R*. На каждую дорожку геля нанесен ядерный экстракт из 10 особей.

мутантный белок был по размеру практически не отличим от белка дикого типа (рис. 3,б).

В совокупности полученные данные показывают, что в мутантах *mle*[9] действительно синтезируется белок MLE с делецией мотива III в первом ResA-подобном домене, почти не отличимый по размеру и доменному строению от белка дикого типа. Предположение, что мутант-

ный белок должен быть лишен хеликазной активности, согласуется с тем фактом, что мутация *mle*[9] у самцов летальна, т.е. нарушает дозовую компенсацию, для которой необходима хеликазная активность MLE [28].

Анализ фенотипических проявлений мутации mle[9] у самок на стадии имаго

1. Мутация *mle*[9] не снижает выживаемости самок. В первую очередь для того, чтобы удостовериться, что мутация *mle*[9] не снижает выживаемости самок, были поставлены параллельно два скрещивания: гомозиготных самок и гетерозиготных самок линии #5873 отдельно скрещивали с гетерозиготными самцами той же линии. Количество выживших до стадии имаго гомозиготных самок F1 сравнивали с количеством гетерозиготных самок, полученных в этом же скрещивании. Ожидаемое распределение гомо- и гетерозиготных самок в первом скрещивании составляло 1 : 1, во втором скрещивании – 1 : 2. Согласно данным, представленным в табл. 1, распределение самок, полученных в эксперименте, соответствовало ожидаемому, т.е. выживаемость гомозиготных по мутации *mle*[9] самок не снижается, вне зависимости от того, гомо- или гетерозиготными были их матери. Этот результат был ожидаем и согласуется с полученными ранее данными, характеризующими мутацию *mle*[9] как летальную только у самцов [18].

2. Мутация *mle*[9] снижает продолжительность жизни. Мы исследовали продолжительность жизни гомозиготных по мутации *mle*[9] виргильных самок при физиологической температуре 24°C. Положительным контролем служили самки дикого типа и самки, гетерозиготные по мутации *mle*[9]. По ходу проведения эксперимента было замечено, что гетерозиготные самки линии #5873, несущие хромосому *CyO*, а значит загнутые крылья, чаще при пересаживании гибли случайно или оказывались утраченными, чем самки других генотипов. Поэтому как дополнительный контроль были использованы самки, гетерозиготные по мутации *mle*[9] с прямыми кры-

Таблица 1. Гомозиготное состояние мутации *mle*[9] не снижает выживаемость самок до стадии имаго

P	♀F1		
	Ожидаемое распределение <i>mle</i> [9]/ <i>mle</i> [9] : <i>mle</i> [9]/ <i>CyO</i>	<i>mle</i> [9]/ <i>mle</i> [9]	<i>mle</i> [9]/ <i>CyO</i>
♀ <i>mle</i> [9]/ <i>mle</i> [9] ♂ <i>mle</i> [9]/ <i>CyO</i>	1 : 1	208	225
♀ <i>mle</i> [9]/ <i>CyO</i> ♂ <i>mle</i> [9]/ <i>CyO</i>	1 : 2	250	453

Примечание. Ожидаемое и полученное в эксперименте распределение самок, гомо- и гетерозиготных по мутации *mle*[9].

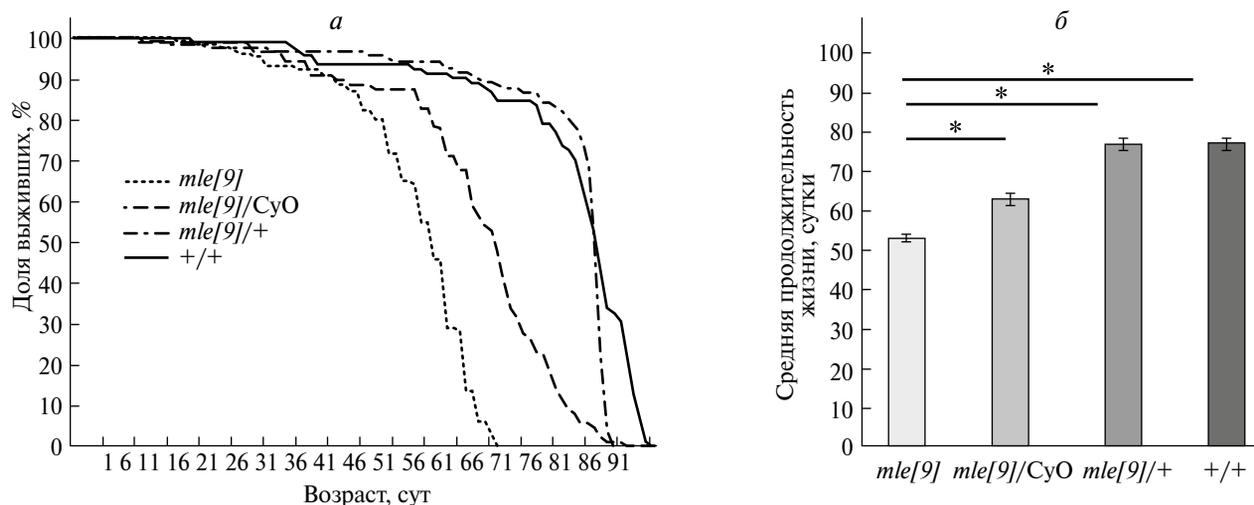


Рис. 4. Мутация *mle[9]* в гомозиготном состоянии снижает продолжительность жизни самок. *a* – кривые выживания при температуре 24°C. *mle[9]* – гомозиготные самки, *mle[9]/CyO* и *mle[9]/+* – гетерозиготные самки с загнутыми и с прямыми крыльями соответственно, *+/+* – самки линии *Oregon R*; *b* – средняя продолжительность жизни. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего, * – $p < 0.001$.

лями (*mle[9]/+*). Результаты представлены на рис. 4.: мутация *mle[9]* в гомозиготном состоянии значительно снижала продолжительность жизни самок. Средняя продолжительность жизни гомозиготных самок составила 53 ± 0.9 сут, гетерозиготных самок *mle[9]/CyO* – 63 ± 1.4 сут, гетерозиготных самок с прямыми крыльями 77 ± 1.5 и самок дикого типа – 77 ± 1.2 сут (рис. 4,б). Гибель 50% популяции гомозиготных самок (медианная продолжительность жизни) наблюдалась в возрасте между 55 и 56 сут, самок *mle[9]/CyO* – между 65 и 66 сут, самок *mle[9]/+* и самок дикого типа – между 81 и 82 сут (рис. 4,а).

3. Мутация *mle[9]* снижает фертильность самок. Для анализа влияния мутации *mle[9]* на раннюю фертильность самок, было подсчитано потомство, произведенное самками, гомозиготными и гетерозиготными по мутации, на протяжении первых трех недель жизни при скрещивании с самцами дикого типа. В качестве дополнительного положительного контроля использовали скрещивание самок дикого типа с самцами дикого типа. Родителей пересаживали на свежую среду ежедневно на всем протяжении эксперимента. Подсчет количества потомков F1 проводили по достижении стадии куколки. Более 95% куколок, полученных во всех скрещиваниях, развивались до стадии имаго (данные не представлены). Гомозиготное состояние мутации *mle[9]* значительно снижало фертильность самок (рис. 5). Начиная с третьего дня после вылупления и до конца эксперимента фертиль-

ность гомозиготных самок была снижена вдвое и более по сравнению с самками обеих контрольных линий (рис. 5,а). Среднее количество потомков F1 в пересчете на одну самку за первые 22 дня жизни имаго у гомозиготных самок также было вдвое меньше (104), чем у самок контрольных линий (228 у гетерозиготных самок и 254 у самок дикого типа) (рис. 5,б).

4. Мутация *mle[9]* влияет на формирование макрочет. В настоящей работе было обнаружено еще одно фенотипическое проявление мутации *mle[9]* у самок *D. melanogaster*. Было замечено, что у гомозиготных по мутации самок с повышенной частотой встречается фенотип удвоение передних скутеллярных макрочет, asc (ananterior scutellar bristle) (рис. 6,а). Этот фенотип встречается менее чем у 1% дрозофил дикого типа (результаты не представлены). Была подсчитана частота встречаемости этого фенотипа у гомо- и гетерозиготных по мутации *mle[9]* самок, результат представлен на рис. 6,б. У 38.4% гомозиготных самок наблюдалось удвоение передних скутеллярных макрочет, у гетерозиготных самок этот фенотип встречался у 3.5% особей, т.е. в 10 раз реже. У 6.7% гомозиготных самок наблюдалось удвоение обеих передних скутеллярных макрочет, этот фенотип никогда не встречался у гетерозиготных самок.

В итоге было показано, что мутация *mle[9]* у самок *D. melanogaster* имеет плеiotропный эффект, снижает продолжительность жизни и

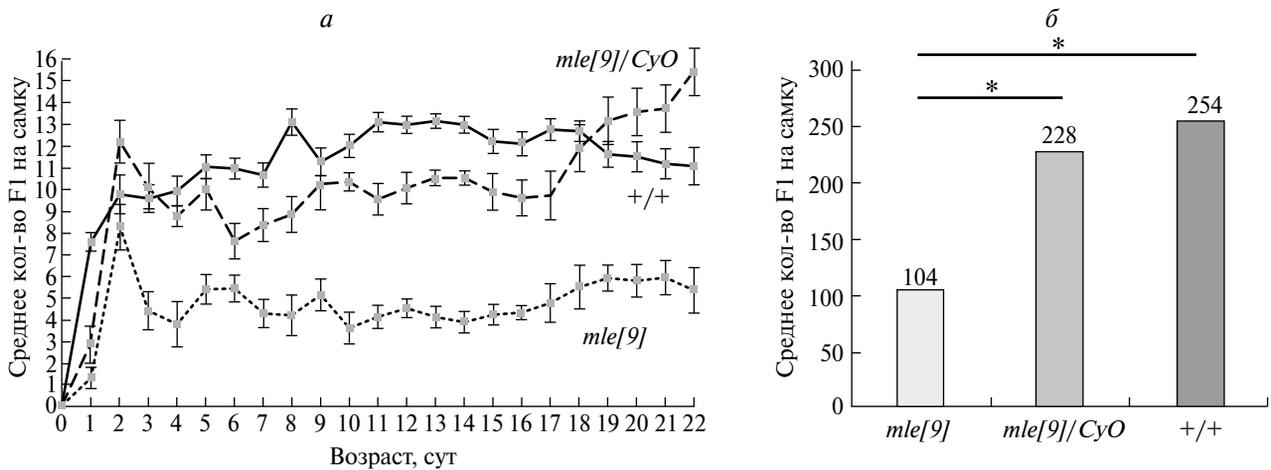


Рис. 5. Мутация *mle[9]* в гомозиготном состоянии снижает фертильность самок. *а* – динамика фертильности самок на протяжении первых трех недель жизни. *mle[9]* – гомозиготные самки, *mle[9]/CyO* – гетерозиготные самки, *+/+* – самки линии *Oregon R*. Планки погрешностей обозначают стандартную ошибку среднего; *б* – среднее количество потомков за первые 22 сут жизни, * – $p < 0.001$.

фертильность и влияет на формирование ма- крохет.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе была впервые картирова- на и описана на молекулярном уровне мутация *mle[9]* и исследованы ее фенотипические прояв- ления у самок *D. melanogaster*. Из литературных данных было известно лишь примерное положе- ние мутации. В настоящей работе было опреде- лено, что в ДНК делеция имеет протяженность 49 нуклеотидов и захватывает 8 нуклеотидов по- следнего интрона и 41 нуклеотид начала послед- ного экзона гена. Вследствие того, что делеция в ДНК вырезает акцепторный сайт сплайсинга, интрон в мутантном гене продолжается до первого альтернативного динуклеотида AG. Протяжен- ность делеции в мРНК при этом увеличивается до 72 нуклеотидов (рис. 1, б). На уровне белка это приводит к вырезанию 24 а.о. (а.о. 536–559) без сдвига открытой рамки считывания. В результате в мутантном белке полностью отсутствует мотив III первого RecA-подобного домена (рис. 2). При этом остаются интактными последовательности остальных мотивов каталитического “ядра” и доменов на N- и C-концах белка, отвечающих за взаимодействия MLE с белками и нуклеиновы- ми кислотами [9, 10].

Методом сайт-направленного мутагенеза ранее было показано, что мутации, нарушаю- щие связывание и гидролиз АТФ, например точечные замены в мотиве I, нарушают также и хеликазную функцию MLE, поскольку рас-

плетание происходит АТФ-зависимо. Но при этом есть мутации, избирательно нарушающие только хеликазную функцию и не затрагиваю- щие АТФазную. К таким мутациям относится замена двух консервативных а.о. S539A и T541A в мотиве III [28, 29]. Также было сделано на- блюжение, что в мутантах *mle[9]* комплексы дозовой компенсации, содержащие мутантный белок, остаются связанными с высокоафинны- ми сайтами и не распространяются по всей про- тяженности X-хромосомы [30]. Опираясь на эти исследования, мы ожидали, что белок в мутан- тах *mle[9]* почти не будет отличаться по размеру и конформации от белка дикого типа, но будет лишен мотива III, отвечающего за хеликазную активность. Вестерн-анализ показал, что белок в мутантах, как и в самках дикого типа, действи- тельно имел размер ~140 кДа (рис. 3, б).

Была замечена тенденция к усилению экс- прессии гена *mle* в гомозиготных самках, их головах и яичниках, по сравнению с гетерози- готными самками (рис. 3, а). Однако временной профиль экспрессии *mle*, как дикого типа, так и мутантного, в тканях самок имаго ранее не был изучен детально. Поэтому для точного количе- ственного сравнения уровней экспрессии в тка- нях и органах гомо- и гетерозиготных самок не- обходимы дальнейшие исследования, в которых будут проанализированы выборки самок строго одинакового возраста. В нашей предыдущей ра- боте было показано, что MLE участвует в регу- ляции транскрипции гена *ftz-f1* [17]. *ftz-f1* коди- рует ядерный рецептор, играющий важную роль в процессе онтогенеза *D. melanogaster*, является

поздним геном экдизонового каскада. Активация его транскрипции в начале метаморфоза ограничена узким промежутком времени, подвержена сложной регуляции и включает промежуточную стадию “задержки” РНК-полимеразы II [21]. Методом иммунопреципитации хроматина было показано, что в модельной системе в культуре клеток Schneider 2 (S2) MLE связывается с промотором и интронным энхансером этого гена, и связывание усиливается в процессе активации транскрипции. Исследования в модельной системе в клетках S2 и в гомозиготных самках на стадии формирования предкуколки показали, что нокдаун MLE и мутация *mle[9]* нарушают регуляцию транскрипции гена *ftz-f1* [17]. Возможно, изменение уровня транскрипции гена *mle* на фоне мутации *mle[9]* указывает на то, что MLE также задействован в прямой или косвенной регуляции транскрипции собственного гена. Можно предположить, что в обоих этих случаях (*ftz-f1* и *mle*) MLE выполняет сходную функцию, которая нарушается при мутации. Предположение о возможности влияния MLE на экспрессию собственного гена требует дальнейшей экспериментальной проверки.

В ходе изучения фенотипических проявлений мутации *mle[9]* в гомозиготном состоянии у самок на стадии имаго было обнаружено, что мутация имеет плейотропный эффект: снижает продолжительность жизни и фертильность и вызывает удвоение скутеллярных макрохет.

Средняя продолжительность жизни гомозиготных самок (53 сут) при нормальной температуре снижалась на 31% по сравнению с самками дикого типа и с гетерозиготными самками с прямыми крыльями (77 сут) (рис. 4,б). Отличие от гетерозиготных самок, несущих балансер *SuO* (средняя продолжительность жизни 63 сут), было не таким большим, но статистически значимым, и составляло 16%. Также значительно отличалась медианная продолжительность жизни, т.е. возраст, когда в живых оставалось ровно 50% особей (рис. 4,а). У гомозиготных самок этот возраст составлял 55–56 суток и был на 15–32% меньше, чем у самок трех контрольных линий (65–66 и 81–82 сут соответственно).

Полученные нами данные о влиянии мутации *mle[9]* на продолжительность жизни согласуются с данными, полученными ранее при изучении температурно-чувствительной мутации *mle[napts]* [31]. В этом исследовании было показано, что при повышенной температуре про-

должительность жизни имаго, гомозиготных по мутации *mle[napts]*, значительно снижается. Мутация представляет собой замену одного а.о. T415S в мотиве I, что при повышении температуры вызывает конформационные изменения, приводящие к снижению АТФазной активности MLE. Это приводит к нарушению редактирования и сплайсинга гена *para*, кодирующего белок Na⁺-каналов, и как следствие к резкому снижению его экспрессии [18, 32, 33]. В то же время у гомозигот по мутациям самого гена *para* продолжительность жизни не снижается. Это позволило исследователям предположить, что снижение продолжительности жизни у мутантов *mle[napts]* обусловлено не столько нарушением экспрессии гена *para*, сколько влиянием на экспрессию других, еще не известных, генов-мишеней [31]. Мы предполагаем, что влияние обеих мутаций в гене *mle* на продолжительность жизни обусловлено общим механизмом. Интересно, что функция MLE в поддержании нормальной продолжительности жизни может быть консервативна: потеря функции ДНХ9 в первичных фибробластах человека приводит к их преждевременному старению через активацию p53 и подавление репликации ДНК [34].

Поскольку согласно данным проекта modENCODE высокий уровень экспрессии *mle* наблюдается в головах имаго, а также в центральной нервной системе личинок, возникает предположение, что влияние MLE на продолжительность жизни обусловлено функциями этой хеликазы в ЦНС. Эти функции MLE на данный момент не изучены, однако на основании анализа данных высокопроизводительного секвенирования ген *mle* включен в каталог предполагаемых “синаптических генов”, т.е. генов, определяющих формирование и функционирование синапсов [35]. Надо отметить, что в самках имаго ген *ftz-f1* так же, как и *mle*, экспрессируется в головах на высоком уровне. Было показано, что *ftz-f1* имеет важные функции в формировании ЦНС и вовлечен в созревание и ремоделирование нейронов грибовидных тел головного мозга [36–38]. Эти данные позволяют предположить, что снижение продолжительности жизни у самок, гомозиготных по *mle[9]*, обусловлено влиянием мутации на экспрессию гена *ftz-f1* в нервной системе имаго. Поскольку на данный момент влияние MLE на экспрессию *ftz-f1* было показано только в культуре клеток и на уровне целого организма на стадии предкуколки, это предположение требует экспериментальной проверки.

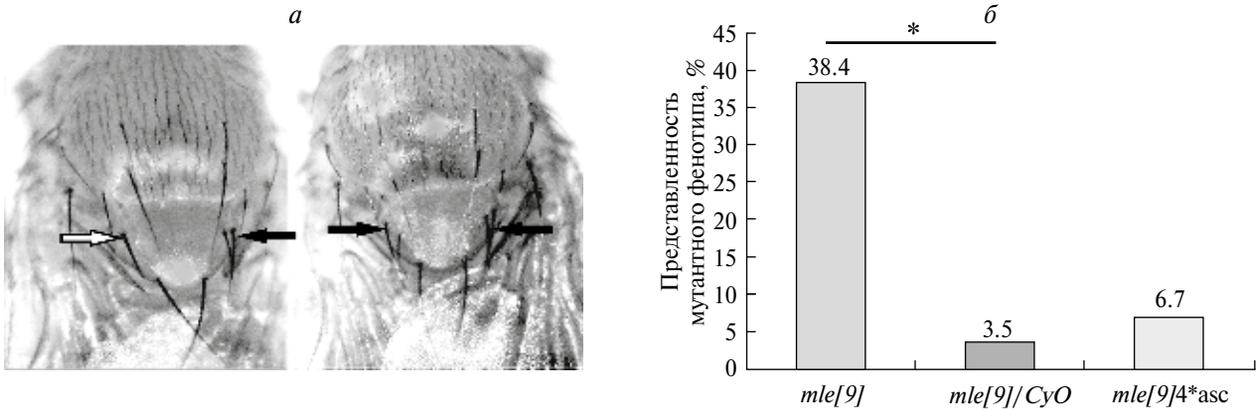


Рис. 6. Мутация *mle[9]* влияет на формирование скутеллярных макрохет (*asc*). *a* – удвоение передней скутеллярной макрохеты с одной (слева) или с обеих (справа) сторон груди у гомозиготных самок. Белой стрелкой обозначено нормальное расположение макрохет, черными стрелками – мутантный фенотип; *б* – частота встречаемости мутантного фенотипа у гомо- (*mle[9]*) и гетерозиготных (*mle[9]/CyO*) самок; 4**asc* – самки с удвоением макрохет с обеих сторон, * $p < 0.001$.

Недавние исследования указывают на то, что функции MLE в нервной системе могут быть консервативными у разных организмов. У человека были обнаружены ультра редкие *de novo* мутации DNX9, гетерозиготное состояние которых лежит в основе некоторых случаев наследственной моторно-сенсорной нейропатии (болезни Шарко-Мари-Тута) и нейродегенеративных заболеваний разной степени тяжести [39]. Также обнаружена роль DNX9 в развитии нейродегенеративных заболеваний, вызванных экспансией микросателлитных повторов [40].

В настоящей работе было обнаружено, что мутация *mle[9]* значительно, более чем в 2 раза, снижает фертильность гомозиготных самок (рис. 5). Эти данные хорошо согласуются с данными modENCODE Tissue Expression Data о высоком уровне экспрессии *mle* в яичниках самок на стадии имаго. Функции, которые MLE выполняет в клетках яичников, на данный момент не изучены, но они могут быть консервативными в эволюции. Так, было показано, что потеря функции ортолога MLE у *C. elegans* нарушает регуляцию транскрипции в герминальных клетках, что приводит к нарушениям митоза и мейоза и как следствие к стерильности [41].

В заключительной части работы мы показали, что у почти 40% гомозиготных по мутации *mle[9]* самок наблюдается удвоение скутеллярных макрохет с одной или даже (у 6%) с двух сторон (рис. 6). Макрохеты выполняют функции механорецепторов, являются частью периферической нервной системы *D. melanogaster* и образуются из единственной родительской клетки (РКСО –

родительская клетка сенсорного органа) [42, 43]. Ключевым событием, определяющим саму возможность формирования макрохеты, является обособление РКСО из массы эктодермальных клеток крылового имагинального диска. Делеции, удвоения или появление эктопических макрохет являются результатом нарушения правильного позиционирования РКСО. Особенность РКСО, определяющая ее нейральную детерминацию, состоит в повышенной экспрессии генов комплекса *achaete-scute* [44, 45]. Экспрессия этих генов подвержена сложной многостадийной регуляции, в которую вовлечены продукты генов *stripe (sr)*, *hairy (h)*, *extramacrochaetae (emc)* и др. [46]. Полученные в настоящей работе данные дают нам основание предполагать, что MLE также вовлечен в сложную регуляцию экспрессии генов, определяющую позиционирование РКСО.

В совокупности полученные в настоящей работе данные расширяют наши представления о функциях MLE в регуляции экспрессии генов и указывают направления дальнейших исследований. Изучение потенциально консервативных в эволюции функций MLE может иметь большое значение, поскольку DNX9 у человека необходим в эмбриональном развитии и вовлечен в канцерогенез и патогенез многих заболеваний [6].

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-24-00357.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы

ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singleton M.R., Dillingham M.S., Wigley D.B. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases // *Annu. Rev. Biochem.* 2007. V. 76. № 1. P. 23–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.115300>
2. Fairman-Williams M.E., Guenther U.-P., Jankowsky E. SF1 and SF2 helicases: family matters // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2010. V. 20. № 3. P. 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.03.011>
3. Lee C.G., Hurwitz J. Human RNA helicase A is homologous to the maleless protein of *Drosophila* // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 22. P. 16822–16830. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85490-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85490-X)
4. Wei W., Twell D., Lindsey K. A novel nucleic acid helicase gene identified by promoter trapping in *Arabidopsis* // *The Plant J.* 1997. V. 11. № 6. P. 1307–1314. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061307.x>
5. Zhang S., Maacke H., Grosse F. Molecular cloning of the gene encoding nuclear DNA helicase II. A bovine homologue of human RNA helicase A and *Drosophila* Mle protein // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 27. P. 16422–16427. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.27.16422>
6. Lee T., Pelletier J. The biology of DHX9 and its potential as a therapeutic target // *Oncotarget.* 2106. V. 7. № 27. P. 42716–42739. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8446>
7. Николенко Ю.В., Георгиева С.Г., Копытова Д.В. Разнообразие функций хеликазы MLE в регуляции экспрессии генов у высших эукариот // *Мол. биология.* 2023. Т. 57. № 1. С. 10–23. <https://doi.org/10.31857/S0026898423010123>
8. Prabu J.R., Müller M., Thomae A.W. et al. Structure of the RNA helicase MLE reveals the molecular mechanisms for uridine specificity and RNA-ATP coupling // *Mol. Cell.* 2015. V. 60. № 3. P. 487–499. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.011>
9. Aratani S., Kageyama Y., Nakamura A. et al. MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in *Drosophila* // *Int. J. Mol. Med.* 2008. V. 21. № 4. P. 469–476. <https://doi.org/10.3892/ijmm.21.4.469>
10. Izzo A., Regnard C., Morales V. et al. Structure-function analysis of the RNA helicase maleless // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 3. P. 950–962. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1108>
11. Kuroda M.I., Kernan M.J., Kreber R. et al. The maleless protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in *Drosophila* // *Cell.* 1991. V. 66. № 5. P. 935–947. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90439-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90439-6)
12. Lee C.-G. The NTPase/helicase activities of *Drosophila maleless*, an essential factor in dosage compensation // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 10. P. 2671–2681. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2671>
13. Kuroda M.I., Hilfiker A., Lucchesi J.C. Dosage compensation in *Drosophila* – a model for the coordinate regulation of transcription // *Genetics.* 2016. V. 204. № 2. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185108>
14. Samata M., Akhtar A. Dosage compensation of the X chromosome: A complex epigenetic assignment involving chromatin regulators and long noncoding RNAs // *Annu. Rev. Biochem.* 2018. V. 87. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011816>
15. Cugusi S., Kallappagoudar S., Ling H., Lucchesi J.C. The *Drosophila* helicase Maleless (MLE) is implicated in functions distinct from its role in dosage compensation // *Mol. Cell. Proteomics.* 2015. V. 14. № 6. P. 1478–1488. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.040667>
16. Николенко Ю.В., Куршакова М.М., Краснов А.Н. Мультифункциональный белок ENY2 взаимодействует с РНК-хеликазой MLE // *ДАН.* 2019. Т. 489. С. 637–640. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524896637-640>
17. Николенко Ю.В., Куршакова М.М., Краснов А.Н., Георгиева С.Г. Хеликаза MLE – новый участник регуляции транскрипции гена *fitz-f1*, кодирующего ядерный рецептор у высших эукариот // *ДАН. Науки о жизни.* 2021. Т. 496. С. 48–51. <https://doi.org/10.31857/S2686738921010182>
18. Kernan M.J., Kuroda M.I., Kreber R. et al. *naps*, a mutation affecting sodium channel activity in *Drosophila*, is an allele of *mle* a regulator of X chromosome transcription // *Cell.* 1991. V. 66. № 5. P. 949–959. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90440-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90440-A)
19. Николенко Ю.В., Краснов А.Н., Воробьева Н.Е. Ремоделирующий хроматин комплекс SWI/SNF влияет на пространственную организацию локуса гена *fitz-f1* // *Генетика.* 2019. Т. 55. С. 156–164. <https://doi.org/10.1134/S0016675819020115>
20. Николенко Ю.В., Краснов А.Н., Мазина М.Ю. и др. Изучение свойств нового экдизонзависимого энхансера // *ДАН.* 2017. Т. 474. С. 756–759. <https://doi.org/10.7868/S0869565217180219>
21. Vorobyeva N.E., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N. et al. SAYP and Brahma are important for “repressive” and “transient” Pol II pausing // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 15. P. 7319–7331. <https://doi.org/10.1093/nar/gks472>
22. Фурсова Н.А., Николенко Ю.В., Сошникова Н.В. и др. Белок CG9890 с доменами цинковых пальцев – новый компонент ENY2-содержащих комплексов

- дрозофилы // Acta Naturae. 2018. Т. 10. С. 110–114. <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-110-114>
23. Николенко Ю.В., Вдовина Ю.А., Фефелова Е.И. и др. Деубиквитирующий (DUB) модуль SAGA участвует в Pol III-зависимой транскрипции // Мол. биология. 2021. Т. 55. С. 1–10. <https://doi.org/10.31857/S0026898421030137>
 24. Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V. et al. ENY2: couple, triple...more? // Cell Cycle. 2010. V. 9. № 3. P. 479–481. <https://doi.org/10.4161/cc.9.3.10610>
 25. Gurskiy D., Orlova A., Vorobyeva N. et al. The DUBm subunit Sgf11 is required for mRNA export and interacts with Cbp80 in *Drosophila* // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. № 21. P. 10689–10700. <https://doi.org/10.1093/nar/gks857>
 26. Popova V.V., Orlova A.V., Kurshakova M.M. et al. The role of SAGA coactivator complex in snRNA transcription // Cell Cycle. 2018. V. 17. № 15. P. 1859–1870. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1489175>
 27. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N. et al. Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA // Genes Dev. 2010. V. 24. № 1. P. 86–96. <https://doi.org/10.1101/gad.550010>
 28. Morra R., Smith E.R., Yokoyama R., Lucchesi J.C. The MLE subunit of the *Drosophila* MSL complex uses its ATPase activity for dosage compensation and its helicase activity for targeting // Mol. Cell. Biol. 2008. V. 28. № 3. P. 958–966. <https://doi.org/10.1128/MCB.00995-07>
 29. Pause A., Sonenberg N. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: The mammalian translation initiation factor eIF-4A // EMBO J. 1992. V. 11. № 7. P. 2643–2654. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05330.X>
 30. Figueiredo M.L.A., Kim M., Philip P. et al. Non-coding roX RNAs prevent the binding of the MSL-complex to heterochromatic regions // PLoS Genet. 2014. V. 10. № 12. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004865>
 31. Fergestad T., Ganetzky B., Palladino M.J. Neuropathology in *Drosophila* membrane excitability mutants // Genetics. 2006. V. 172. № 2. P. 1031–1042. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.105.050625>
 32. Reenan R.A., Hanrahan C.J., Ganetzky B. The *mle* RNA helicase mutation in *Drosophila* results in a splicing catastrophe of the para Na⁺ channel transcript in a region of RNA editing // Neuron. 2000. V. 25. № 1. P. 139–149. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80878-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80878-8)
 33. Hanrahan C.J., Palladino M.J., Ganetzky B., Reenan R.A. RNA editing of the *Drosophila* para Na⁺ channel transcript: evolutionary conservation and developmental regulation // Genetics. 2000. V. 155. № 3. P. 1149–1160. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.3.1149>
 34. Lee T., Di Paola D., Malina A. et al. Suppression of the DHX9 helicase induces premature senescence in human diploid fibroblasts in a p53-dependent manner // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 33. P. 22798–22814. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.56853535>
 35. Pazos Obregón F., Palazzo M., Soto P. et al. An improved catalogue of putative synaptic genes defined exclusively by temporal transcription profiles through an ensemble machine learning approach // BMC Genomics. 2019. V. 20. № 1. P. 1011. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6380-z>
 36. Lin S., Huang Y., Lee T. Nuclear receptor unfulfilled regulates axonal guidance and cell identity of *Drosophila* mushroom body neurons // PLoS One. 2009. V. 4. № 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008392>
 37. Iyer E.P., Iyer S.C., Sullivan L. et al. Functional genomic analyses of two morphologically distinct classes of *Drosophila* sensory neurons: post-mitotic roles of transcription factors in dendritic patterning // PLoS One. 2013. V. 8. № 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072434>
 38. Boulanger A., Clouet-Redt C., Farge M. et al. ftz-fl and Hr39 opposing roles on EcR expression during *Drosophila* mushroom body neuron remodeling // Nat. Neurosci. 2011. V. 14. № 1. P. 3–44. <https://doi.org/10.1038/nn.2700>
 39. Calame D. G., Guo T., Wang C. et al. Monoallelic variation in DHX9, the gene encoding the DEXH-box helicase DHX9, underlies neurodevelopment disorders and Charcot–Marie–Tooth disease // Am. J. Hum. Genet. 2023. V. 110. № 8. P. 1394–1413. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.06.013>
 40. Castelli L. M., Benson B. C., Huang W.-P. et al. RNA helicases in microsatellite repeat expansion disorders and neurodegeneration // Front. Genet. 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.886563>
 41. Walstrom K.M., Schmidt D., Bean C.J., Kelly W.G. RNA helicase A is important for germline transcriptional control, proliferation, and meiosis in *C. elegans* // Mech. Dev. 2005. V. 122. № 5. P. 707–720. <https://doi.org/10.1016/J.MOD.2004.12.002>
 42. Campuzano S., Modolell J. Patterning of the *Drosophila* nervous system: The *achaete–scute* gene complex // Trends in Genetics. 1992. V. 8. № 6. P. 202–208. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(92\)90234-U](https://doi.org/10.1016/0168-9525(92)90234-U)
 43. Cubas P., De Celis J.F., Campuzano S., Modolell J. Pro-neural clusters of *achaete–scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc // Genes Dev. 1991. V. 5. № 6. P. 996–1008. <https://doi.org/10.1101/GAD.5.6.996>
 44. Villares R., Cabrera C.V. The *achaete–scute* gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc // Cell. 1987. V. 50. № 3. P. 415–424. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90495-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90495-8)

45. *Cabrera C.V., Alonso M.C.* Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete-scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila* // EMBO J. 1991. V. 10. № 10. P. 2965–2974.
<https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1991.TB07847.X>
46. *Usui K., Goldstone C., Gibert J.-M., Simpson P.* Redundant mechanisms mediate bristle patterning on the *Drosophila* thorax. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 51. P. 20112–20117.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0804282105>

***Drosophila melanogaster* MLE Helicase Functions Beyond Dosage Compensation: Molecular Nature and Pleiotropic Effect of *mle[9]* Mutation**

G. A. Ashniev¹, S. G. Georgieva¹, J. V. Nikolenko^{1,*}

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com*

MLE of *D. melanogaster* is a conserved protein in higher eukaryotes, an ortholog of human DHX9 helicase. In mammals, this helicase has been shown to participate in different stages of gene expression. In *D. melanogaster*, the role of MLE as one of the components of the species-specific Dosage Compensation Complex has been extensively studied. However, the role of MLE in other processes has remained poorly understood. In this work, for the first time, the *mle[9]* mutation is mapped at the molecular level and shown to be caused by a deletion resulting in the loss of a highly conserved motif III in the catalytic core of the molecule. Thus, *mle[9]* specifically disrupts the helicase activity of the protein without affecting the function of other domains. The study of phenotypic manifestations of the mutation in females showed that in the homozygous state it has a pleiotropic effect. Without affecting survival, it significantly reduces fertility and lifespan. In addition, the duplication of scutellar macrochaetae was observed with high frequency. These results confirm that in *D. melanogaster* MLE helicase is involved in a wide range of gene expression regulation processes distinct from its role in dosage compensation.

Keywords: MLE, helicase, lifespan, fertility, pleiotropic phenotype, *Drosophila melanogaster*.

УДК 575.174.015.3

ЦИТОХРОМЫ P450 2F И ГЕНЫ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ЧЕРТ: КОВАРИАЦИИ ЭКСПРЕССИИ В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА И ПОЛИМОРФИЗМ ОРТОЛОГОВ У ДОМАШНИХ КОЗ

А. К. Пискунов^{1, *}, П. М. Марченко¹, Г. Р. Свищева¹, Ж. В. Самсонова^{1, 2},
А. В. Кудрявцева³, Ю. А. Столповский¹, В. Н. Воронкова¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия,

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: aleksei.piskunov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принята к публикации 14.11.2023 г.

Цитохром P450 2F1 человека, как и его ортолог 2F3 домашней козы, считают довольно необычным ферментом. Описан единственный тип катализируемых им реакций: превращение скатола, продукта анаэробного обмена триптофана, в легочный токсин. Эндогенные субстраты CYP2F неизвестны, и хотя с открытия фермента прошло больше 30 лет, его биологическая роль остается невыясненной. Мы предположили, что физиологические функции CYP2F могут точно реализовываться в головном мозге, оставаясь ранее незамеченными вследствие высокой компартментализации органа. Используя открытые данные, мы изучили ковариацию экспрессии *CYP2F1* и генов поведенческих черт в мозге человека, а также полиморфизм их ортологов и *CYP2F3* в 180 популяциях домашних коз (*Capra hircus*). В гене *CYP2F3* было обнаружено два SNP, один из которых имел выраженные следы отбора, причем частота гомозигот увеличивалась по мере географического удаления от центра доместикиции. Экспрессия мРНК *CYP2F1* в мозге человека также имела региональную специфичность. У обоих видов путем факторного анализа была выявлена взаимосвязь *CYP2F1/3* и ряда генов, регулирующих поведение: транспортера серотонина *SLC6A4* и его рецептора *HTR2A3*, транспортера *ABC1*, рецептора пуринов *P2RX7*, рецептора ГАМК *GABRA4*, регулятора циркадных ритмов *PER3* и Т-кадгерина *CDH13*. Анализ геномных данных домашней козы и транскриптомных данных человека выявил эволюционные и функциональные связи цитохромов CYP2F и нейрохимических систем регуляции поведения. Эти доказательства церебральной функции фермента являются косвенными, поскольку основаны на корреляционном анализе, однако свидетельствуют о перспективности дальнейшего поиска в данном направлении.

Ключевые слова: цитохром, мозг, личность, поведение, доместикиция, серотонин, коза.

DOI: 10.31857/S0016675824040042 **EDN:** CRFVBL

Цитохромы P450 катализируют перенос атома кислорода на небольшие органические молекулы, позволяя получать энергию, а также осуществлять взаимные превращения таких молекул. Благодаря цитохромам возникли аэробные организмы. С цитохромами тесно связана эволюция и функционирование нервной и эндокринной систем. Однако основное внимание эти ферменты получили за способность окислять ксенобиотики, в частности токсины и лекарства. Физиологическая роль многих представителей суперсемейства исследована значительно менее полно. Один из наиболее загадочных представителей принадлежит семейству 2F и описан у человека (*CYP2F1*), мыши (*CYP2F2*) и коз (*CYP2F3*) как легочно-специфичный фермент, для которого известен единственный тип

катализируемых реакций – частичное окисление 3-метилиндола(скатола), приводящее к избирательной пневмотоксичности этого исходно безвредного вещества [1]. Эндогенные субстраты и физиологическая функция CYP2F не описаны.

При анализе генома коз в нашей предыдущей работе [2] было замечено, что распределение аллелей *CYP2F3* у древних и современных пород отличается от случайного. Это наблюдение послужило стимулом к поиску возможной физиологической роли фермента. Связь гена *CYP2F3* с одомашниванием может указывать на его роль в церебральных процессах, поскольку изменение поведения лежит в основе доместикиции. Закономерный вопрос, почему таковая до сих пор не была обнаружена, может быть адресован

к классическим методам изучения нового фермента. Среди них одним из основных служит поиск клеток и тканей с усиленной экспрессией мРНК изучаемого соединения. Исследования обычно проводятся на грызунах, причем в качестве образцов используют относительно крупные анатомические структуры. Однако следует учитывать, что в сравнении с другими органами головной мозг отличается высокой компартиментализацией, то есть поделен на множество микроанатомических структур. Например, у человека относительный объем гипоталамуса составляет около 1.5% от общего объема мозга, а сам гипоталамус состоит из более чем 50 пар ядер. Можно посчитать, что условное 100-кратное повышение уровня экспрессии фермента в одном из ядер увеличит общий уровень экспрессии менее чем на 1%, что ниже погрешности измерения [3]. Существуют и другие предпосылки возможной церебральной функции CYP2F. Так, одни из наиболее древних сигнальных молекул мозга, серотонин, мелатонин и кинуренин, как и субстраты CYP2F, являются производными триптофана [1]. Это позволяет предположить, что физиологическая роль CYP2F может быть связана с нейромедиаторными системами.

В настоящей работе для изучения возможной вовлеченности CYP2F1/3 в нейрохимические процессы были использованы два набора открытых данных, удачно соответствующих поставленной задаче. Первый набор содержит полногеномные SNP-генотипы более 5000 домашних коз (*Capra hircus*) из 188 пород и популяций, расположенных по всему земному шару. Этот набор унифицированных данных является одним из наиболее масштабных по числу генотипов и географическому распределению среди всех млекопитающих. С его помощью были изучены популяционно-географические и эволюционные связи полиморфизма гена *CYP2F3* и генов нейрохимических систем. Второй набор содержит данные об уровнях мРНК сотен тысяч генов в головном мозге человека на уровне микроструктур, полученные с помощью микрочипов. Он позволил исследовать функционально-анатомические особенности и регионарные профили экспрессии *CYP2F1* и других генов. Преимущества этих наборов данных связаны с популяционно-мировым масштабом геномных данных домашней козы и с высокой анатомической детализацией транскриптомных данных человека, а также с тем, что генетическая последовательность и каталитическая активность фермента у этих видов наиболее близки [1].

Выбор генов, связанных с нейрохимическими процессами в случае человека, не являлся сложной задачей, поскольку уровни экспрессии мРНК определялись в собственно головном мозге. В случае домашней козы имелись данные об однонуклеотидных заменах в геномной ДНК, привязанные к хромосомным координатам. Требовалось идентифицировать гены с функционально-значимым для работы мозга полиморфизмом, обусловленным одной из представленных замен с высокой частотой встречаемости в популяции. Таким образом, соответствующие имфенотипические признаки должны обладать популяционной вариацией, иметь высокую наследуемость, а также быть измеримыми для того, чтобы их вариацию можно было сопоставить с генотипической.

Одним из непосредственных продуктов мозговой активности является поведение. Для многих поведенческих признаков характерны индивидуальные отличия в их выраженности, стабильные в течение жизни и в различных контекстах. Такие отличия составляют устоявшееся формальное академическое определение черт личности.

Стоит отметить, что личность в большинстве пониманий – это больше, чем просто совокупность черт личности; последние, однако, составляют ее часть, которая потенциально измерима и таким образом может быть исследована математическими методами. Наличие черт личности, в данном определении, показано для человека и многих других животных с развитым мозгом и социальной структурой, и особенно хорошо исследовано у одомашненных видов, в частности у домашней козы.

Выраженность черт личности вариабельна, при этом имеет высокую наследуемость, а в их основе лежат нейрохимические процессы. Исходя из этого, в качестве генов, связанных с нейрохимическими процессами, в настоящей работе были выбраны гены, полиморфизм которых связан с выраженностью черт личности [4], а в случае коз – ортологи этих генов. Наличие и распространенность полиморфных вариантов этих генов обуславливают возможность подтвердить (или опровергнуть) предположение о том, что их полиморфность может быть неслучайным образом ассоциирована с полиморфностью гена *CYP2F1/3*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рабочая база полногеномных данных домашней козы

Был использован массив данных из нашей предыдущей работы [2], включающий: 1) геноти-

пы животных из проекта AdaptMap, описанного в статье L. Colli с соавт. [5]; 2) данные из исследования Т.Е. Денисковой и соавт. [6], представляющие генотипы семи пород коз из России; 3) генотипы шести популяций из пяти регионов Китая, описанные Н. Verihulay с соавт. [7]; 4) данные пяти популяций монгольских коз, генотипированные в нашем исследовании. Генотипирование всех популяций проведено с помощью Goat 50K BeadChip (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Итоговый комбинированный набор данных содержал 38276 SNP от 5176 животных 188 популяций [2].

Поиск полиморфизмов ДНК у коз

С помощью PLINK 1.9 был проведен поиск SNP в гене *CYP2F3* и ортологах 18 генов (табл. 1), связанных с личностью человека, также недавно идентифицированных в геноме лошади [7]. Хромосомные координаты были получены из генома козы, аннотированного в Ensembl (табл. 1). Была использована сборка генома ARS1 (ASM170441v1). Ген *CYP2F3* был расположен на 18-й хромосоме и имел два SNP-мар-

кера (snp21618-scaffold2118-550706, snp21617-scaffold2118-498278). Частоты минорных аллелей (MAF) были рассчитаны для идентифицированных SNP-маркеров в мировой популяции, а также для каждой популяции животных, состоящей не менее чем из 10 особей. Число таких популяций составило 158, со средним числом животных 50 ± 2.2 ($M \pm SEM$). Для всех популяций минорным всегда считали один и тот же аллель, исходя из его частоты в мировой выборке, даже если он являлся преобладающим в конкретной популяции.

Распределение ДНК-вариантов у коз

Статистическое распределение частот аллелей SNP визуализировали гистограммами с MAF по оси X и количеством популяций коз по оси Y. Среднее значение (M), стандартное отклонение (SD), асимметрия и эксцесс были рассчитаны для представления численных данных о распределении аллелей.

Географическое распределение частот аллелей визуализировали с помощью ArcGis 10.8,

Таблица 1. SNP в генах коз – ортологах генов черт личности человека

Ген	Белок	Положение на хромосоме	Идентификатор SNP на чипе
<i>FAAH</i>	Fatty acid amide hydrolase	3: 21,026,588-21,047,140	snp17501-scaffold181-440831 snp17502-scaffold181-510286
<i>PER3</i>	Period circadian regulator 3	16: 44,082,685-44,149,046	snp44080-scaffold597-1100913
<i>CDH13</i>	Cadherin 13	18: 10,713,157-11,547,248	snp6116-scaffold1216-1475632
<i>NPY</i>	Neuropeptide Y	4: 48,587,984-48,618,665	snp27655-scaffold295-4443665
<i>LEP</i>	Leptin	4: 27,665,917-27,682,282	snp24940-scaffold2551-297044 snp7099-scaffold1264-42116
<i>HSD11B1</i>	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	16: 72192303-72232521	snp23279-scaffold2329-257953 snp23276-scaffold2329-78243
<i>ANKK1</i>	Ankyrin repeat and kinase domain containing 1	15: 58404829-58418257	snp57901-scaffold937-1037722
<i>DRD2</i>	Dopamine receptor D2	15: 58322506-58393525	snp57902-scaffold937-1074027
<i>BDNF</i>	Brain derived neurotrophic factor	15: 24503417-24569735	snp54722-scaffold837-1900767
<i>COMT</i>	Catechol-O-methyltransferase	1: 547660-553624	snp2811-scaffold1082-402075 snp2810-scaffold1082-348665
<i>P2RX7</i>	Purinergic receptor P2X 7	17: 17203049-17255098	snp29995-scaffold327-1964517 snp30001-scaffold327-2285684
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	18: 58979223-58984704	snp46071-scaffold632-588199 snp46070-scaffold632-517251
<i>CNR1</i>	Cannabinoid receptor 1	9: 49082848-49084266	snp47005-scaffold657-454462 np47003-scaffold657-348206
<i>SLC6A4</i>	Solute carrier family 6 member 4	19: 21107560-21127442	snp6455-scaffold1229-2653423
<i>GABRA6</i>	Gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha 6	7: 37186194-37207432	snp41489-scaffold54-1527889 snp41488-scaffold54-1473617
<i>HTR2A</i>	5-Hydroxytryptamine receptor 2A	12: 69719711-69785162	snp24155-scaffold246-2237548
<i>DGKH</i>	Diacylglycerol kinase eta	12: 74178634-74373984	snp52847-scaffold792-1018579 snp52845-scaffold792-943854

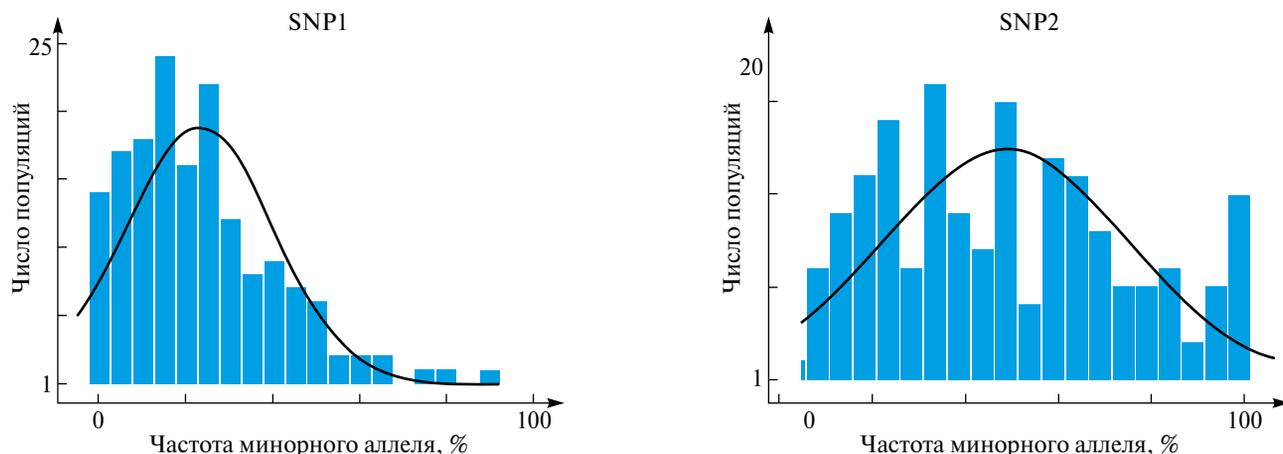


Рис. 1. Распределение частот минорных аллелей (MAF) SNP1 и SNP2 гена *CYP2F3* в популяциях коз.

используя интенсивность цвета маркера как отображение MAF для каждой популяции.

Анализ экспрессии мРНК в мозге человека

Данные об экспрессии мРНК в головном мозге шести доноров были предоставлены Allen Human Brain Atlas [8]. Образцы ткани для выделения мРНК получали путем последовательной диссекции. На первом этапе были получены срезы головного мозга толщиной 0.5–1 см, которые разделяли на блоки и сохраняли при -80°C . Далее в криостатах получали срезы толщиной 25 мкм. Срезы (через один) использовали для гистологического окрашивания либо дальнейшей диссекции. Макродиссекция вручную использовалась для относительно крупных и легко идентифицируемых структур мозга, лазерную микродиссекцию использовали для более мелких структур и структур неправильной формы, которые требовали микроскопической визуализации. Области, в которых образцы отбирали с помощью макродиссекции, включали кору головного мозга и мозжечка, а также крупные подкорковые ядра правильной формы, такие как хвостатое тело, скорлупа и бледный шар. Образцы других подкорковых ядер, в частности миндалевидных тел, таламуса и гипоталамуса, а также ядер мозжечка были отобраны с помощью лазерной микродиссекции. Нейроанатомические структуры были идентифицированы на основе гистологического окрашивания оставшихся срезов по Нисслию или серебром. При макродиссекции иссекали от 50 до 200 мг ткани в зависимости от региона. Масса корковых образцов в среднем составляла 100 мг. При лазерной микродиссекции извлекались образцы со средним объемом 3.6 мм^3 . Всего на каждое полушарие головного мозга было около 500 образцов. Более подробно эти проце-

дуры, методы выделения мРНК, использование микрочипов, нормализация данных экспрессии, а также данные доноров доступны на интернет-странице проекта (Allen Human Brain Atlas, раздел Documentation). Онтология и номенклатура микроструктур были составлены в соответствии с несколькими источниками, и описываются на сайте проекта в подразделе “Ontology and Nomenclature”.

Для получения численных данных на главной странице атласа мозга выбирали опцию “Human brain”, затем “Microarray”, в поисковом окне вводили названия интересующих генов и для результатов поиска выбирали вид цветовой шкалы интенсивности экспрессии с разрешением до микроструктур, затем выбирали опцию “Download data”. На первом этапе были извлечены значения экспрессии *CYP2F1* в основных отделах и микроструктурах мозга. Далее были отобраны гены, ассоциированные с чертами личности, и загружены данные, связанные с экспрессией генов. Значения экспрессии представлены в виде нормализованных величин.

Факторный анализ проводили в SPSS Statistics v26. В использованных матрицах строки (“наблюдения”) соответствовали микроструктурам мозга, а столбцы (“переменные”) – генам (их транскриптам). В качестве метода выделения факторов использовали метод максимального правдоподобия с вращением промакс с нормализацией Кайзера. Число итераций при вращении было ограничено до 15. Для проверки выборочной адекватности использовали критерий Кайзера–Мейера–Олкина (КМО). График собственных значений использовали для определения числа выделяемых факторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ полиморфизма CYP2F3 у коз

С помощью PLINK 1.9 в пределах хромосомных координат гена *CYP2F3* было обнаружено два SNP с частотами минорных аллелей (MAF) 0.224 и 0.491 (далее – SNP1 и SNP2) (табл. 2). MAF были также рассчитаны для каждой популяции животных.

Таблица 2. Параметры статистического распределения частот минорных аллелей гена *CYP2F3* в популяциях коз

Параметр	SNP1	SNP2
М	0.23	0.48
SD	0.17	0.26
Асимметрия	1.12	0.35
Экссесс	1.62	–0.83
Минимум	0.00	0.03
Максимум	0.90	1.00

Примечание. М – среднее, SD – среднее квадратичное отклонение.

Как видно из гистограммы (рис. 1), распределение аллелей несколько отличается от нормального. SNP2 отличается тенденцией к фиксации крайних вариантов: гомозигот по минорному и мажорному аллелям, а SNP1 демонстрирует смещение распределения в сторону минорного аллеля.

Географическое распределение аллелей CYP2F3

На карте мира (рис. 2) отображены распределения частот аллелей *CYP2F3* по SNP1 и SNP2. Для каждой популяции доля минорного аллеля отображена с помощью цветового градиента. Здесь аллель также считали минорным исходя из частоты во всей мировой выборке. Частота минорных аллелей SNP1 и SNP2 у дикого предка (безоарового козла) составила 1 и 0.64 соответственно.

Для частоты встречаемости SNP1 в популяциях животных заметна выраженная географическая зависимость. В европейских популяциях фактически зафиксирован мажорный аллель, в азиатских – минорный, причем у дикого предка (безоарового козла) встречается только минорный аллель. Аллели SNP2 не имеют настолько выраженного географического паттерна распределения, однако заметно, что по мере удаления от очага первичной доместикиации в древней Анатолии (на территории современного Пакистана) происходит “заострение” генетической вариации: то есть появление популяций с все большим преобладанием одного из аллелей.

Далее исследовали взаимосвязь аллелей гена *CYP2F3* и аллелей ключевых генов, связанных с поведением. Основная часть SNP использованных генов поведения была идентифицирована путем поиска в пределах хромосомных координат генов, ортологичных генам, связанным с выраженностью черт личности у человека в соответствии с моделью “Большой пятерки”, как в работе Т. Yokomogi и соавт. [7] (табл. 1). В этой модели личность определяется как совокупность стабильных индивидуальных особенностей поведения. Таким образом, ассоциированные с чертами личности гены могут рассматриваться как регуляторы поведения. Семь SNP с наибольшими значениями модуля корреляции MAF с MAF *CYP2F3* были выявлены в генах *GABRA6*, *CDH13*, *HSD11B1*, *HTR2A* и *LEP*. Затем был проведен факторный анализ, в качестве переменных в котором были использованы частоты минорных аллелей в отдельных популяциях (табл. 3). Частота минорного аллеля *CYP2F3* оказалась одной из наиболее “сильных” переменных, войдя в состав первого фактора, объясняющего 26% совокупной дисперсии. Это довольно интересный результат, учитывая, что данный ген ранее не был замечен в связи с нейробиологическими процессами. Помимо него в первый фактор вошли гены *HTR2A*, *LEP*, *ABC_B1*, *ANKK1*, *CDH13*, *PER3*, *BDNF*. Второй аллель гена *CYP2F3* вошел в состав V и VII факторов, совместно объясняющих 6% общей дисперсии, вместе с *SLC6A4* и *ABC_B1* – генами, кодирующими одни из основных транспортеров серотонина [9], и *P2RX7* – пуриновым рецептором, служащим модулятором серотонинэргической передачи [9].

Анализ экспрессии CYP2F1 в мозге человека по данным атласа экспрессии Института Алена

Анализ экспрессии мРНК *CYP2F1* был проведен на основе открытых данных Института Алена (Сиэтл, США). Уровни мРНК в этом исследовании определялись с помощью микрочипа в предварительно изолированных микроанатомических структурах головного мозга, представляющих основные корковые и ядерные элементы всех его отделов. Уровни экспрессии *CYP2F1* были определены в головном мозге шести доноров в возрасте от 25 до 57 лет, пять из которых были мужчины. Число микроструктур составило 169 на один мозг; общее количество образцов составило 1014. Было выявлено два транскрипта гена *CYP2F1*, общая информация о которых содержится в табл. 4. Регионарные профили экспрессии транскриптов *CYP2F1* были не идентичны: корреляция между средними значениями

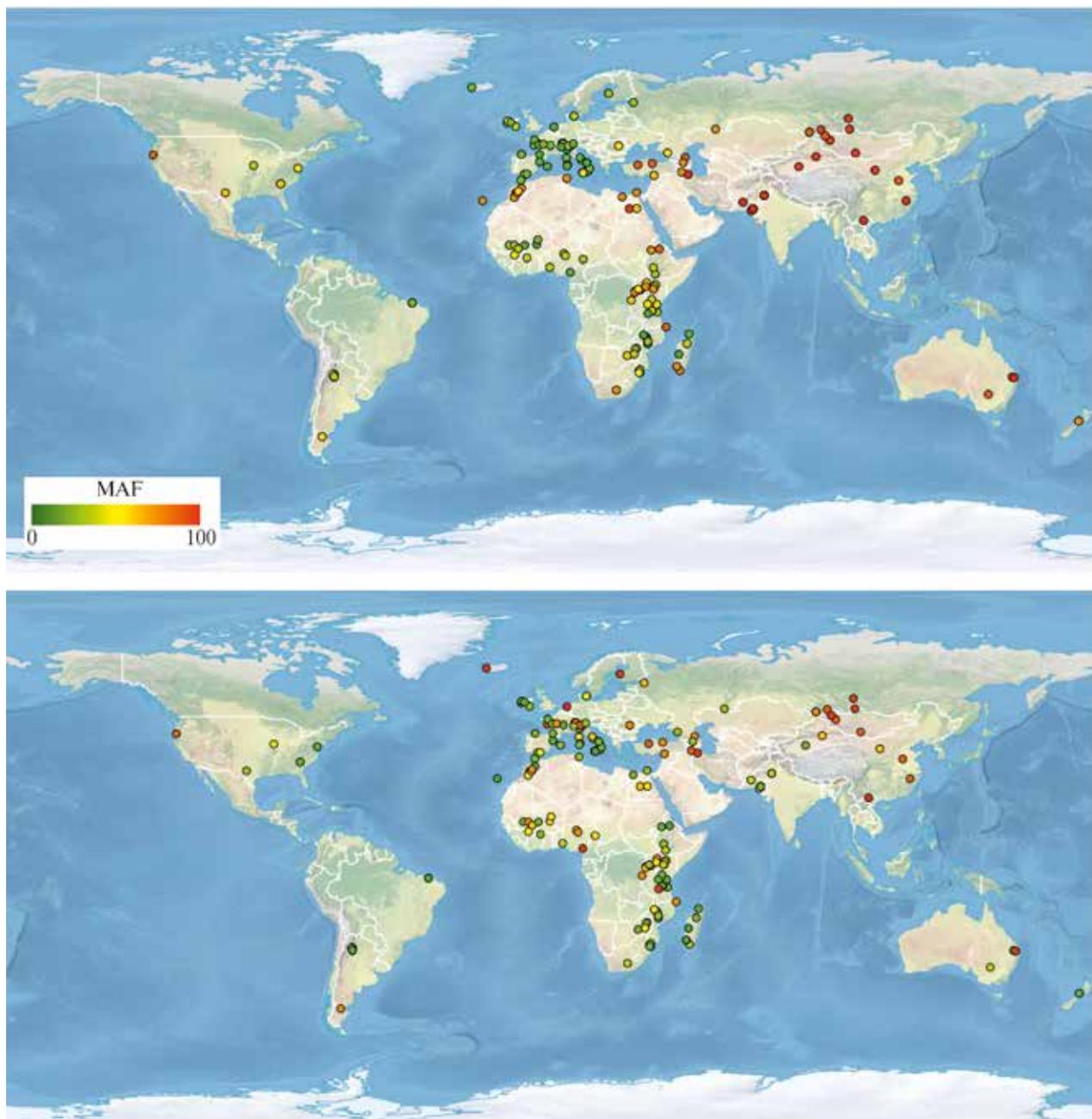


Рис. 2. Распределение частот минорных аллелей гена *CYP2F3* по SNP1 (сверху) и SNP2 (снизу) в популяциях домашней козы.

уровня мРНК двух транскриптов в 145 структурах мозга составила $r = 0.17$. Далее были отобраны гены, ассоциированные с чертами личности, ортологи которых были исследованы у коз (см. выше). Был проведен факторный анализ, используя те же параметры извлечения латентных переменных (факторов).

Как видно из табл. 5, транскрипты *CYP2F1* вошли в состав первого и третьего факторов, вместе с генами *ABCB*, *ANK1*, *BDNF*, *CDH13*,

CNR1, *FAAH2*, *GABRA4*, *HSD11B1*, *HTR2A3*, *LEP*, *P2RX7*, *PER3*, *SLC6A4*. Гены *SLC6A4* и *HTR2A* – транспортера и рецептора серотонина имели нагрузку на оба фактора. Причем один из транскриптов имел положительную, а второй отрицательную связь с экспрессией как *SLC6A4*, так и *HTR2A3*.

В табл. 6 сравниваются гены, ассоциированные с *CYP2F* по данным факторного анализа их полиморфизма и экспрессии соответственно у

Таблица 3. Факторный анализ частот минорных аллелей генов поведения и *CYP2F3* в популяциях коз (приведены факторные нагрузки)

Аллель	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<i>HTR2A</i>	0.89	0.26	0.27	-0.11	0.10	0.09	-0.31	0.18
<i>CDH13_6</i>	-0.86	0.18	-0.09	0.03	0.08	0.03	-0.36	-0.15
<i>CYP2F3_SNP2</i>	0.69	-0.25	0.08	0.04	0.03	0.36	0.15	-0.06
<i>PER3</i>	0.65	0.14	-0.18	-0.11	-0.07	0.10	0.08	0.18
<i>LEP_2</i>	0.60	-0.25	0.00	0.21	-0.12	-0.10	0.05	0.01
<i>BDNF</i>	0.59	0.15	0.00	-0.21	-0.06	-0.02	-0.03	0.00
<i>ANKK1</i>	0.52	0.24	-0.38	-0.06	-0.12	-0.03	-0.26	-0.13
<i>GABRA6_1</i>	0.40	-0.38	0.01	0.02	0.21	0.06	-0.24	0.09
<i>CNR1_1</i>	0.27	0.78	0.07	0.01	-0.35	-0.09	0.06	0.18
<i>DGKH_2</i>	0.03	0.67	-0.13	0.07	-0.21	-0.04	-0.01	-0.13
<i>P2RX7_1</i>	-0.16	0.67	0.02	-0.04	-0.03	0.05	0.18	0.24
<i>LEP_1</i>	-0.02	-0.57	-0.01	-0.18	-0.20	-0.26	-0.13	0.10
<i>CNR1_2</i>	-0.05	0.56	0.24	0.06	0.13	0.15	-0.10	0.12
<i>HSD11B1_1</i>	0.00	-0.53	0.13	0.07	-0.13	0.19	-0.01	-0.08
<i>FAAH_2</i>	0.20	0.52	0.19	-0.07	0.03	-0.30	0.08	-0.11
<i>APOE_1</i>	0.30	-0.34	-0.17	0.10	-0.01	0.19	-0.08	0.25
<i>HSD11B1_2</i>	-0.11	0.04	0.63	-0.19	0.10	-0.07	0.14	0.16
<i>ABC_B1_SNP1</i>	-0.28	0.04	0.62	-0.13	-0.15	0.42	0.05	-0.27
<i>FAAH_1</i>	-0.14	-0.05	0.62	0.07	0.34	-0.18	-0.19	0.43
<i>DRD2_1</i>	-0.11	-0.08	-0.57	-0.02	-0.04	-0.07	0.03	-0.01
<i>APOE_2</i>	0.09	0.14	-0.46	0.00	0.43	0.18	0.14	0.14
<i>COMT_2</i>	0.05	0.25	0.06	1.01	-0.18	0.00	0.11	0.21
<i>COMT_1</i>	-0.30	-0.12	-0.10	0.86	0.07	0.08	0.02	0.11
<i>SLC6A4</i>	-0.14	-0.11	0.13	-0.03	0.85	-0.09	0.21	0.09
<i>CYP2F3_SNP1</i>	0.14	0.05	-0.23	-0.11	0.53	-0.05	0.52	-0.15
<i>ABC_B1_SNP2</i>	0.15	0.14	0.23	0.19	0.38	-0.24	0.05	-0.24
<i>NPY</i>	-0.08	0.13	-0.06	-0.05	0.12	-0.65	-0.04	0.08
<i>P2RX7_2</i>	-0.07	0.16	-0.04	0.10	0.25	0.07	0.77	-0.10
<i>DRD2_2</i>	-0.23	-0.10	-0.10	-0.20	-0.07	0.07	0.09	-0.46

Таблица 4. Транскрипты *CYP2F1* в головном мозге человека

	Транскрипт 1	Транскрипт 2
№ в NCBI	NM_000774.3	NM_000774.3
Длина, пн	60	60
Последовательность	TCTTTTGTACCCACAGAGCTTGTCT ATGGCACGCCCTTTTCTGGGCTTTT GTATCAT	AGAGGAGAAGGAGGACCCACTGAGCCA CTTCCACATGGATACCCTGCTGATGACC ACACA
GC, %	43	55

коз и человека. Из 13 таких генов восемь были общими для двух видов, два оказались связанными только с *CYP2F1* человека, и три – только с *CYP2F3* коз.

Сравнительный анализ уровня экспрессии транскриптов CYP2F1 в микроструктурах мозга человека

Наиболее высокие уровни экспрессии первого транскрипта *CYP2F1* были выявлены в верхней

Таблица 5. Факторный анализ уровня экспрессии мРНК генов поведения и *CYP2F1* в микроструктурах головного мозга человека (приведены факторные нагрузки)

Ген	I	II	III	IV	V
<i>HSD11B1</i>	0.77	0.46	0.17	-0.52	-0.01
<i>P2RX7</i>	0.76	0.18	-0.13	-0.34	0.2
<i>SLC6A4</i>	-0.74	-0.42	-0.46	-0.01	0.02
<i>CYP2F1_2</i>	-0.7	-0.33	-0.28	0.14	0.12
<i>LEP</i>	-0.66	-0.27	-0.33	-0.17	0.01
<i>PER3</i>	0.62	0.85	0.31	-0.37	-0.03
<i>ABCB1</i>	0.51	0.84	0.46	-0.19	0.05
<i>COMT</i>	0.31	0.76	0.22	-0.19	0.13
<i>FAAH2</i>	0.54	0.75	0.46	-0.08	-0.09
<i>BDNF</i>	0.17	0.60	0.46	0.09	-0.04
<i>DGKH</i>	0.06	-0.56	0.29	0.21	0.16
<i>GABRA4</i>	0.52	0.63	0.77	0.04	-0.15
<i>CNR1</i>	0.35	0.31	0.74	0.21	-0.24
<i>CYP2F1_1</i>	-0.09	-0.19	-0.72	0.15	-0.1
<i>HTR2A3</i>	0.56	0.31	0.67	0.31	-0.08
<i>DRD2</i>	-0.2	-0.17	0.17	0.85	0.03
<i>DRD2_2</i>	-0.11	-0.27	-0.24	0.59	-0.09
<i>NPY</i>	0.01	-0.07	-0.18	-0.05	0.91
<i>CDH13</i>	0.07	0.29	0.54	-0.02	0.62

лобной извилине, поле IV Аммонова рога, в паравермисе, в миндалевидно-гиппокампальной переходной зоне, в парацентральной дольке, в поясной извилине, в прецентральной извилине (табл. 7); второго транскрипта – в двигательном ядре тройничного нерва, в сосцевидном теле, в ядрах улитки, в моторном ядре лицевого нерва, в черной субстанции, в ретикулярной формации, в подъязычном ядре, в интерстициальном ядре Кахаля (табл. 7).

Таблица 6. Гены, связанные с *CYP2F1* человека и *CYP2F3* коз по данным факторного анализа их полиморфизма и экспрессии

	Человек (mRNA)	Коза (SNPs)
<i>ABCB1</i>	+	+
<i>ANK1</i>		+
<i>BDNF</i>		+
<i>CDH13</i>	+	+
<i>CNR1</i>	+	
<i>FAAH2</i>	+	
<i>GABRA4</i>	+	+
<i>HSD11B1</i>	+	
<i>HTR2A3</i>	+	+
<i>LEP</i>	+	+
<i>P2RX7</i>	+	+
<i>PER3</i>	+	+
<i>SLC6A4</i>	+	+

Примечание. “+” указывает на вхождение в гена в состав одной латентной переменной с *CYP2F1/3*.

Поскольку по данным факторного анализа экспрессия второго транскрипта отрицательно связана с экспрессией рецептора серотонина, были также определены зоны минимальной экспрессии данного транскрипта. Они оказались в зоне VIIIA Бродмана, в медиальном надмамиллярном ядре, в нижнем дорсомедиальном ядре гипоталамуса и некоторых других участках лимбической системы в новой коре. В этих же структурах наблюдалась высокая экспрессия рецептора серотонина *HTR2A3*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Статистическое и географическое распределение аллелей *CYP2F3* в популяциях домашней козы оказалось неслучайным и имело выраженные паттерны, которые свидетельствуют о том, что у гена есть функции, связанные с одомашниванием. Градуальное изменение частот аллелей гена по мере удаления от очага одомашнивания вдоль древних путей миграции, а также фиксация гомозиготных вариантов в современных популяциях, по-видимому, свидетельствуют о том, что функции гена *CYP2F3* не только играли важную роль на ранних этапах одомашнивания, но и значимы в текущее время для адаптации к создаваемым человеком условиям.

Выраженная статистическая связь обнаружилась при анализе корреляций и совместной

Таблица 7. Уровни экспрессии транскриптов *CYP2F1* в мозге человека (нормализованные значения)

Структура	Число образцов	Транскрипт 1		Транскрипт 2	
		М	SEM	М	SEM
Вентральный таламус	67	2.67	0.58	3.40	0.58
Средний мозг	51	2.45	0.66	2.89	0.66
Продолговатый мозг	48	2.42	0.67	2.72	0.67
Ядра мозжечка	337	2.39	0.27	2.78	0.27
Покрышка	31	2.38	0.82	2.83	0.82
Базальные ядра моста	148	2.37	0.40	2.69	0.40
Миндалина	47	2.31	0.68	3.04	0.68
Дорсальный таламус	175	2.26	0.37	2.85	0.37
Бледный шар	15	2.26	1.12	2.77	1.12
Клауструм	537	2.24	0.21	3.23	0.21
Гиппокамп	39	2.08	0.74	3.23	0.74
Эпиталамус	188	2.05	0.35	2.60	0.35
Гипоталамус	102	2.02	0.47	2.50	0.47
Полосатое тело	182	1.95	0.36	2.78	0.36
Базальный передний мозг	279	1.92	0.29	2.73	0.29
Парагиппокампальная извилина	212	1.91	0.33	2.67	0.33
Лобная доля	58	1.84	0.62	3.14	0.62
Теменная доля	290	1.77	0.29	2.96	0.29
Височная доля	170	1.75	0.37	3.05	0.37
Кора мозжечка	14	1.75	1.15	3.09	1.15
Поясная извилина	5	1.72	2.00	2.72	2.00
Затылочная доля	470	1.71	0.23	3.00	0.23
Белое вещество	34	1.69	0.79	2.53	0.79
Островковая кора	15	1.66	1.12	2.93	1.12

Примечание. М – среднее, SEM – стандартная ошибка.

дисперсии *CYP2F3* и генов, гомологичных генам человека, которые по данным полногеномного анализа [8] в наибольшей степени связаны с выраженностью личностных черт, т.е. индивидуальных отличий в поведении.

Данные об экспрессии гена *CYP2F1* в мозге человека выявили регионарную специфичность экспрессии двух транскриптов с наибольшими уровнями экспрессии первого транскрипта в ядрах лимбической системы, опосредующих эмоциональные реакции [9, 10], и в основных серотонинэргических структурах – ядре шва, красном ядре, оказывающих множественное влияние на высшие отделы. Высокие уровни экспрессии также обнаружены в интегративных отделах новой коры, связанных с осознанностью, целенаправленным поведением, объемом оперативной памяти [11]. Высокие уровни второго транскрипта *CYP2F* обнаружены также в ядрах и корковых структурах, связанных с регуляцией пищевого поведения, пищеваре-

ния и циркадных ритмов. Последняя закономерность гипотетически может быть связана с тем, что бактерии кишечника продуцируют производные триптофана [12], которые могли бы выступать в роли сигнальных соединений, а также являться субстратами *CYP2F*. Более того, поскольку нам неизвестны метаболические пути, которые напрямую связывали бы серотонинэргическую передачу с субстратной специфичностью *CYP2F* в отношении индольных соединений, есть основание предполагать, что активность *CYP2F* в мозге может быть связана с существованием альтернативной (ко)медиаторной системы индольных соединений, которые гипотетически могли бы опосредовать влияние микробиоты кишечника на пищевое поведение. Корреляционный анализ уровней экспрессии мРНК *CYP2F1* в мозге человека также показал вовлеченность гена в функциональные сети регуляции поведения. Как и у коз, наиболее сильные связи обнаружены с генами серотонинэргической системы. Интересно, что по данным

факторного анализа и сравнения регионарных уровней мРНК один из транскриптов *CYP2F1* и рецептор серотонина *HTR2A3* были экспрессированы в противофазе. Если предположить, что один из предшественников или метаболитов серотонина может подвергаться биоактивации в токсин под действием *CYP2F1*, то снижение уровня экспрессии последнего можно рассматривать как механизм защиты от токсического действия в структурах мозга, богатых серотонином.

Получены новые и достаточно убедительные данные, которые свидетельствуют об участии *CYP2F1/3* в нейрохимических процессах регуляции поведения. Насколько нам известно, это первые свидетельства существования физиологической роли цитохромов семейства *CYP2F*.

Полученные доказательства физиологической функции *CYP2F* достаточно многообразны, но в то же время являются косвенными, поскольку основаны на дисперсионно-корреляционном анализе. В дальнейшем прямые доказательства и уточнение роли *CYP2F* в мозге могут быть получены, например, с использованием инструментов измерения и ингибирования активности фермента. Однако необходимо учесть, что в случае если функция фермента реализуется не конститутивно, а связана с определенными функциональными состояниями, такие эксперименты могут оказаться малоинформативными. Поэтому, вероятно, имеет смысл далее углубиться в корреляционный анализ, а также использовать моделирование ферментативной активности *CYP2F* в зависимости от полиморфности гена и его транскриптов.

В целом выводы о физиологической роли *CYP2F* должны делаться с осторожностью, поскольку цитохромы в силу древнего происхождения могут служить точкой взаимодействия многих сигнальных путей. Наблюдаемые процессы могут быть в целом более сложными и многомерными, чем те понятия, которыми способен оперировать человек.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-76-10053).

Данное исследование было рассмотрено и одобрено на заседании комитета биоэтической комиссии ИОГен РАН 14.09.2020 г., протокол № 47.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lanza D.L., Yost G.S. Selective dehydrogenation/oxidation of 3-methylindole by cytochrome p450 enzymes // *Drug Metabolism and Disposition: The biol. Fate of Chemicals*. 2001. V. 29. № 7. P. 950–953.
2. Mukhina V., Svishcheva G., Voronkova V. et al. Genetic Diversity, Population Structure and Phylogeny of Indigenous Goats of Mongolia Revealed by SNP Genotyping // *Animals*. 2022. T. 12. № 3. <https://doi.org/10.3390/ani12030221>
3. Toni R., Malaguti A., Benfenati F., Martini L. The human hypothalamus: a morpho-functional perspective // *J. Endocrinol. Invest.* 2004. V. 27. № 6. P. 73–94.
4. Yokomori T., Ohnuma A., Tozaki T. et al. Identification of personality-related candidate genes in thoroughbred racehorses using a bioinformatics-based approach involving functionally annotated human genes // *Animals*. 2023. V. 13. P. 769. <https://doi.org/10.3390/ani13040769>
5. Colli L., Nicolazzi E.L., Bertolini F. et al. AdaptMap project: Exploring worldwide goat diversity and adaptation // *37. Int. Soc. for Animal Genet. Conf. (ISAG)*. 2019
6. Deniskova T.E., Dotsev A.V., Selionova M.I. et al. SNP-based genotyping insight into the West Asian origin of Russian local goats // *Front. Genet.* 2021. V. 12. 708740. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.708740>
7. Berihulay H., Li Y., Liu X. et al. Genetic diversity and population structure in multiple Chinese goat populations using a SNP panel // *Anim. Genet.* 2019. V.50. P. 242–249. <https://doi.org/10.1111/age.12776>
8. Harris J.A., Mihalas S., Hirokawa K.E. et al. Hierarchical organization of cortical and thalamic connectivity // *Nature*. 2019. V. 575. P. 195–202. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1716-z>
9. Göllöncsér F., Baranyi M., Balázsfi D. et al. Regulation of hippocampal 5-HT release by P2X7 receptors in response to optogenetic stimulation of median raphe terminals of mice // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. 325. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00325>
10. Roxo M.R., Franceschini P.R., Zubaran C. et al. The limbic system conception and its historical evolution // *Sci. World J.* 2011. V. 11. P. 2428–2441. <https://doi.org/10.1100/2011/157150>
11. Wang S., Zhao Y., Li J. et al. Brain structure links trait conscientiousness to academic performance // *Sci. Reports*. 2019. V. 9. № 1. 12168.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48704-1>
12. Maes M., Lin A., Bosmans E. et al. Serotonin-immune interactions in detoxified chronic alcoholic patients without apparent liver disease: activation of

the inflammatory response system and lower plasma total tryptophan // *Psychiatry Res.* 1998. V. 78. № 3. P. 151–161.
[https://doi.org/10.1016/s0165-1781\(98\)00010-9](https://doi.org/10.1016/s0165-1781(98)00010-9)

Cytochromes P450 2F and Behavioral Traits Genes: Covariations of Expression in the Human Brain and Polymorphism of the Orthologues in Domestic Goats

A. K. Piskunov^{1,*}, P. M. Marchenko¹, G. R. Svishcheva¹, J. V. Samsonova^{1,2}, A. V. Kudryavtseva³,
Yu. A. Stolpovsky¹, V. N. Voronkova¹

¹Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 11999 Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: aleksei.piskunov@gmail.com

Human cytochrome P450 2F1, as well as its orthologue 2F3 in domestic goat, is considered to be a rather unusual enzyme. The only type of reaction it catalyzes has been described: the conversion of skatole, a product of anaerobic tryptophan metabolism, into a pulmonary toxin. Endogenous substrates of CYP2F are unknown, and although more than 30 years have passed since the discovery of the enzyme, its biological role remains unclear. We hypothesized that the physiological functions of CYP2F can be specifically implemented in the brain, remaining previously unnoticed due to the high compartmentalization of the organ. Using open data, we studied the covariation of the expression of *CYP2F1* and genes for behavioral traits: in the human brain, as well as the polymorphism of their orthologues and *CYP2F3* in 180 populations of domestic animals goats (*Capra hircus*). Two SNPs were found in the *CYP2F3* gene, one of which had pronounced traces of selection, and the frequency of homozygotes increased with geographic distance from the center of domestication. Expression of *CYP2F1* mRNA in the human brain also had regional specificity. In both species, factor analysis revealed the relationship between CYP2F1/3 and a number of genes regulating behavior: the serotonin transporter *SLC6A4* and its receptor *HTR2A3*, the *ABCB1* transporter, the purine receptor *P2RX7*, the GABA receptor *GABRA4*, the circadian rhythm regulator *PER3* and T-cadherin *CDH13*. Thus, analysis of the genomic data of the domestic goat and human transcriptomic data revealed the evolutionary and functional relationships of CYP2F cytochromes and neurochemical systems for regulating behavior. This evidence of the cerebral function of the enzyme is indirect, since it is based on correlation analysis, but indicates the promise of further search in this direction.

Keywords: cytochrome, brain, personality, behavior, domestication, serotonin, goat.

УДК 575.22:599.323.5

ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
***Alexandromys maximowiczii* Schrenk, 1859 (Rodentia, Cricetidae):**
СОПОСТАВЛЕНИЕ ДАННЫХ ИЗМЕНЧИВОСТИ КОНТРОЛЬНОГО
РЕГИОНА мтДНК И ПОЛИМОРФИЗМА ХРОМОСОМ

© 2024 г. И. Н. Шереметьева^{1,*}, И. В. Картавцева¹, М. В. Павленко¹, У. В. Горобейко¹,
Ю. А. Баженов², И. В. Моролдоев³, Л. Л. Войта⁴

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

²Институт природных ресурсов, экологии и криологии Сибирского отделения Российской академии наук,
Чита, 672014 Россия

³Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630091 Россия

⁴Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: sheremet76@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.10.2023 г.

После доработки 27.11.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

В результате исследования генетической структуры полевки Максимовича *Alexandromys maximowiczii* по данным изменчивости контрольного региона мтДНК обнаружен высокий уровень генетической изменчивости для вида в целом. Выявлено три филогенетические группы “east”, “west” и “south”, а в пределах группы “east” три субклады “Chit”, “Amur” и “Khab”. Все филогенетические группы и субклады имеют в основном аллопатрическое географическое распределение по ареалу, но обнаружена одна “гибридная” выборка в окрестностях поселка Савво-Борзя (Забайкальский край), особи в которой имеют разные варианты мт-генотипа: одна особь имеет вариант “west”, а вторая – “east”/“Amur”. Выявленная филогеографическая структура в целом коррелирует с картиной дифференциации по хромосомным формам, но не согласуется с принятой ранее подвидовой системой. Сложная внутривидовая подразделенность полевки Максимовича, обнаруженная на разных уровнях организации (молекулярно-генетическом и хромосомном) отражает не только сложную географию района исследования, но и историю динамического изменения природной среды.

Ключевые слова: филогеография, контрольный регион мтДНК, полевка Максимовича, *Alexandromys maximowiczii*, изменчивость.

DOI: 10.31857/S0016675824040056 **EDN:** CRFSXM

Полевка Максимовича *Alexandromys maximowiczii* (Schrenk, 1859) широкоареальный вид, обитатель лесной и лесостепной зон Восточной Азии. В последних таксономических сводках данный вид рассматривают как полувид надвида “*maximowiczii*” [1], куда помимо полевки Максимовича включают также эворонскую *Alexandromys evoronensis* (Kovalskaya et Sokolov, 1980) и муйскую *Alexandromys muijanensis* (Orlov et Kovalskaja, 1975) полевок. Это было сделано на основании того, что между представителями надвида “*maximowiczii*” выявлен низкий уровень дифференциации согласно морфологического, аллозимного и молекулярно-генетического анализов [2–7]. Тем не менее данные об изменчивости кариотипов, экспериментальной гибридиза-

ции и сперматогенеза свидетельствуют в пользу самостоятельности всех трех видов [8–9]. Согласно биологической концепции в данной работе мы рассматриваем полевку Максимовича как самостоятельный вид.

Ареал *A. maximowiczii* простирается от оз. Байкал на западе и до западного склона Сихотэ-Алиня на востоке, имеет сложную мозаичную структуру, что обусловлено географией района, наличием большого числа горных хребтов и крупных рек. До конца прошлого века для вида выделяли три подвида [8]: *A. m. maximowiczii* (Schrenk, 1858), описанный из верхнего Амура в устье р. Омутная и распространенный в Приамурье и Северо-восточном Китае; *A. m.*

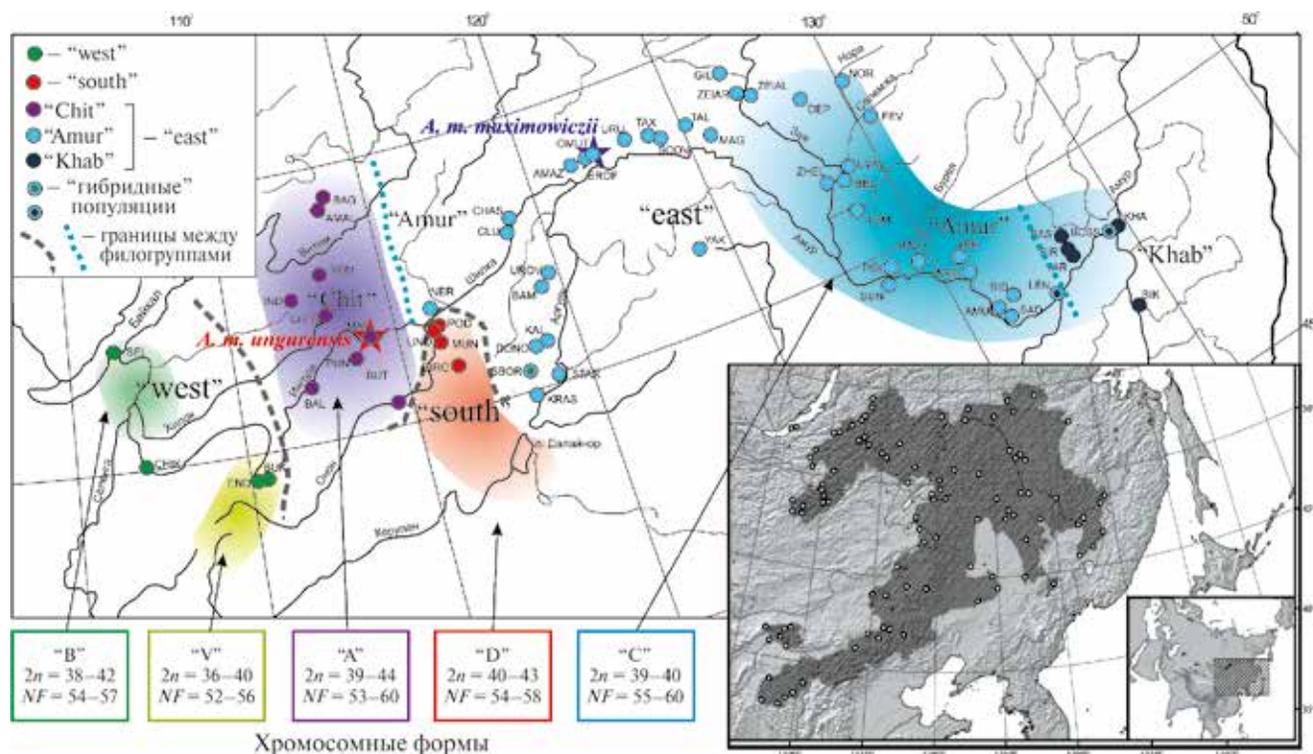


Рис. 1. Ареал, места сбора материала, филогенетическая структура и распространение хромосомных форм ("А", "В", "V», "С" и "D") полевки Максимовича *Alexandromys maximowiczii*. "west", "south" и "east" филогенетические группы. "Chit", "Khab" и "Amur" географические подгруппы в филогенетической группе "west". Пунктирной чертой указаны границы между филогенетическим группами и подгруппами. Коды выборки соответствуют табл. 1. Звездочкой отмечены места описания подвидов.

ungurensis (Kastchenko, 1913), описанный из Читинской обл., р. Унгур и обитающий в Забайкалье и Северо-восточной Монголии, а также *A. m. gromovi* (Vorontsov et al., 1988) с юго-востока Якутии (восточный берег оз. Большое Токо). Однако в дальнейшем исследования позволили повысить таксономический статус последнего до видового [10], а в конечном итоге вид *Alexandromys gromovi* был синонимизирован с *Alexandromys shantaricus* (Ognev, 1929), описанным С.И. Огневым с Шантарских островов [11], что подтвердилось и по молекулярным данным [12, 13].

Для полевки Максимовича, как и для других представителей надвида "*maximowiczii*", отмечен чрезвычайно сложный хромосомный полиморфизм [8, 14–17]. Диплоидные числа варьируют от 36 до 44 за счет структурных перестроек хромосом, включающих как тандемные, так и центромерные слияния. Помимо этого, увеличение числа двуплечих хромосом происходит и в результате инверсий/смещений центромер [8, 15]. В результате множественных перестроек число плеч хромосом варьирует от 52 до 62 [17]. На ос-

новании хромосомных характеристик – $2n$ и NF , полевок из различных географических регионов в Забайкалье и Монголии было выделено пять хромосомных форм (рис. 1) [15]. Хромосомная форма "А" – из Северного и Центрального Забайкалья, имела максимальные диплоидные числа хромосом ($2n = 39–44$, $NF = 53–62$). Хромосомная форма "В" – из северо-восточного Забайкалья: низовья р. Селенга и средней части р. Онон – средние диплоидные числа хромосом ($2n = 38–42$, $NF = 54–57$). Хромосомная форма "V" – со склонов Хэнтэйских гор в Монголии – минимальные ($2n = 36–40$, $NF = 52–56$). Позже хромосомные характеристики форм "А" и "В" были нами дополнены, а также было выделено еще две хромосомные формы, в Забайкалье и на юге Дальнего Востока России [17]: "D" из Юго-Восточного Забайкалья и Восточной Монголии ($2n = 40–43$, $NF = 54–58$) и "С" с территории юга Дальнего Востока России, верхнего и среднего Амура ($2n = 39–42$, $NF = 55–60$).

Несмотря на то, что полевка Максимовича достаточно часто была включена в филогенети-

ческие анализы рода [2, 5, 18], внутривидовая генетическая структура исследована недостаточно. Наиболее детальный филогеографический анализ проведен для среднего Приамурья, где было обнаружено две филогенетические линии с зоной контакта в междуречье рек Биры и Биджана [19]. Тогда как обширная территория, от Байкала до слияния рек Зея и Амур, осталась не охваченной (ранее с этой территории исследовано не более 20 особей).

Цель настоящего исследования — оценить филогеографическую структуру полевки Максимовича с использованием последовательностей контрольного региона митохондриальной ДНК и сопоставить полученные результаты с доступными данными о хромосомной изменчивости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы образцы тканей мышц и печени полевки Максимовича, фиксированные в 96%-ном этаноле. Всего было исследовано 122 новых образца от полевок, отловленных из природных популяций (табл. 1). Кроме того в эту работу были включены образцы, исследованные нами ранее и хранящиеся в базе данных Genbank/NCBI под номерами HM135863–HM135873 и HM135875–HM135890 [2], KM403496–KM403564 [19] KJ857292–KJ857294, KJ857303–KJ857310 и KJ857295–KJ857296 [20]. В целом в анализ вошли 233 полевки из 61 локалитета (табл. 1, рис. 1), представляющих большую часть ареала и относящиеся к двум подвидам: *A. m. maximowiczii* ($n = 157$) и *A. m. unguensis* ($n = 76$).

Выделение ДНК осуществляли методом солевой экстракции [21]. Фрагмент контрольного региона был амплифицирован методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием прямого Pro+ (5'-ACCATCAGCACCCAAAGCTG-3') и обратного Phe- (5'-AAGCATTTTCAGTGCTTTGCTT-3') праймеров при условиях описанных ранее [19]. От всех вновь исследованных образцов полевки Максимовича были получены полные нуклеотидные последовательности контрольного региона, которые внесены в Genbank/NCBI под номерами OR453407–OR453528. Продукты амплификации подвергали циклическому секвенированию с помощью набора Big Dye Terminator версия 3.1 (Applied Biosystems, США), с использованием прямого (Pro+) и обратного (Phe-) праймера. Нуклеотидную последовательность

прочитывали на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 3130 на базе центра коллективного пользования “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток).

Редактирование и выравнивание полученных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit 7.0.9.0 [22]. Построение филогенетических деревьев методом ближайшего соседа (NJ), максимального правдоподобия (ML), максимальной экономии (MP) выполнено в программе MEGA X [23]. В качестве внешней группы использована гомологичная последовательность дальневосточной полевки (*Alexandromys fortis*) MZ056589. Для ML-филогенетических реконструкций в программе MEGA X выбрана модель Hasegawa–Kishino–Yano (BIC = 18635.579) с G-распределением (0.52), со значением эволюционной нейтральности сайтов (+I) равного 0.38 и максимальным логарифмом правдоподобия – 3653.352. Достоверность кластеризации оценивалась с помощью бутстрэп-анализа (1000 повторностей), достоверными считали значения выше 70. Сеть гаплотипов построена при помощи программы Network 10.0.0.0 с использованием метода “Median joining” [24]. Показатели генетического разнообразия и дифференциации популяций рассчитаны с помощью DnaSP 6.00 [25]. Расчет статистик нейтральности (Tajima' D и Fu's Fs), анализ демографической и пространственной экспансии проводили в программе Arlequin 3.5 [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В выборке из 122 особей полевки Максимовича, не исследованных ранее, обнаружено 116 гаплотипов (табл. 2). С учетом описанных ранее [2, 19, 20], общее число гаплотипов для вида составляет 213 (на 232 особи), а число вариабельных сайтов – 296. Из них 151 сайт был парсимониально информативен. Среднее число различий между сиквенсами составило 16.19. В целом для вида отмечено высокое гаплотипическое (99%) и нуклеотидное (1.98%) разнообразие.

Реконструкция филогенетических отношений между гаплотипами исследованных полевок методом ближайшего соседа (NJ), максимального правдоподобия (ML) и максимальной экономии (MP) привела к идентичной топологии дерева, согласно которой все исследованные экземпляры *A. maximowiczii* разделились на три филогенетические группы (рис. 2) с высокой до-

Таблица 1. Материал для исследования контрольного региона мтДНК *Alexandromys maximowiczii*

Код выборки	Выборка (число образцов)	Координаты	Филогруппа
<i>Microtus maximowiczii maximowiczii</i> Schrenk, 1858			
КНА***	Хабаровский край, окр. пос. Галкино (n=10)	42.78° N, 134.28° E	«east»/«Khab»
ВІК***	Хабаровский край, окр. пос. Оренбургское (n=2)	46.79° N, 134.25° E	«east»/«Khab»
BAS***	ЕАО, з-к "Бастак" (n=4)	49.02° N, 133.02° E	«east»/«Khab»
BIR***	ЕАО, окр. г. Биробиджан (n=5)	48.73° N, 133.04° E	«east»/«Khab»
YAR*	ЕАО, окр. пос. Желтый Яр (n=1)	48.57° N, 133.05° E	«east»/«Khab»
LEN***	ЕАО, окр. пос. Ленинское (n=3)	47.94° N, 132.59° E	«east»/«Khab» (2) «east»/«Amur» (1)
BUSS**	Китайская территория острова Большой Уссурийский (n=11)	48.48° N, 134.95° E	«east»/«Khab» (10) «east»/«Amur» (1)
SAD***	ЕАО, окр. с. Садовое (n=9)	47.77° N, 131.45° E	«east»/«Amur»
AMU***	ЕАО, окр. пос. Амурзет (n=3)	47.69° N, 131.08° E	«east»/«Amur»
ВІD*	ЕАО, окр. пос. Биджан (n=1)	47.97° N, 131.91° E	«east»/«Amur»
ARH***	АО, окр. пос. Архара (n=3)	49.45° N, 130.08° E	«east»/«Amur»
POI***	АО, окр. пос. Поярково (n=2)	49.64° N, 128.64° E	«east»/«Amur»
NOR*/***	АО, Норский з-к (n=15)	52.57° N, 130.04° E	«east»/«Amur»
BEL***	АО, окр. пос. Белоярово (n=4)	51.59° N, 128.78° E	«east»/«Amur»
ULAI***	АО, окр. пос. Новокиевский Увал (n=6)	51.69° N, 128.94° E	«east»/«Amur»
TOM***	АО, окр. г. Белогорск, р. Томь (n=1)	50.89° N, 128.65° E	«east»/«Amur»
ZEIAI***	АО, окр. г. Зея, левый берег реки (n=5)	53.75° N, 127.35° E	«east»/«Amur»
KAS*	АО, окр. пос. Касаткино (n=2)	48.97° N, 130.08° E	«east»/«Amur»
DEP	АО, р. Деп (n=3)	53.41° N, 128.45° E	«east»/«Amur»
FEV	АО, окр. пос. Февральск (n=3)	52.47° N, 130.86° E	«east»/«Amur»
BUR	АО, нижнее течение р. Бурея (n=7)	49.49° N, 129.56° E	«east»/«Amur»
SUN***	Китай, окр. пос. Сюнке (n=2)	49.57° N, 128.52° E	«east»/«Amur»
ZEIAr	АО, окр. г. Зея, правый берег реки (n=6)	53.79° N, 127.16° E	«east»/«Amur»
OMUT#	АО, жд ст. Б. Омутная (n=11)	54.05° N, 122.28° E	«east»/«Amur»
EROF	АО, окр. пос. Ерофей Павлович (n=3)	53.97° N, 121.94° E	«east»/«Amur»
ZHEL	АО, окр. с. Желтоярово (n=1)	51.52° N, 128.43° E	«east»/«Amur»
AMAZ	АО, окр. пос. Амазар (n=4)	53.84° N, 120.89° E	«east»/«Amur»
MAG	АО, окр. пос. Магдагачи (n=3)	53.45° N, 125.78° E	«east»/«Amur»
MAL	АО, окр. с. Малиновка (n=3)	52.02° N, 127.76° E	«east»/«Amur»
SCOV	АО, окр. пос. Сковородино (n=6)	53.98° N, 123.91° E	«east»/«Amur»
TAL	АО, окр. пос. Талдан (n=13)	53.71° N, 124.79° E	«east»/«Amur»
TAX	АО, окр. пос. Тахтамыгда (n=4)	54.11° N, 123.59° E	«east»/«Amur»
GIL	АО, долина р. Гелюй, ниже устья р. Степанак (n=1)	54.23° N, 126.94° E	«east»/«Amur»
URU	АО, окр. пос. Уруша (n=4)	54.04° N, 122.89° E	«east»/«Amur»
YAK**	Китай, окр. пос. Якеши (n=2)	49.32° N, 121.26° E	«east»/«Amur»
<i>Microtus maximowiczii unguurensis</i> Kastchenko, 1913			
NER	ЗК, окр. г. Нерчинск (n=1)	51.97° N, 116.52° E	«east»/«Amur»
SBOR	ЗК, окр. пос. Савво-Борзя (n=2)	50.73° N, 118.34° E	«east»/«Amur» (1) «west» (1)
KAL	ЗК, окр. пос. Калга (n=2)	50.92° N, 118.88° E	«east»/«Amur»
STAR	ЗК, окр. пос. Староцурухайтуй (n=2)	50.21° N, 119.24° E	«east»/«Amur»
CHAS	ЗК, р. Шилка, пос. Часовинка, р-н Могочи (n=1)	53.49° N, 120.05° E	«east»/«Amur»
UROV	ЗК, р. Уров, напротив р. Камара (n=1)	51.74° N, 119.84° E	«east»/«Amur»
CLU	ЗК, Могочинский р-н, пос. Ключевский, устье р. Прямые Ключи (n=1)	53.54° N, 119.49° E	«east»/«Amur»
BAM	ЗК, р. Малая Бамбуя (n=3)	51.46° N, 119.08° E	«east»/«Amur»
DONO	ЗК, окр. пос. Доно (n=1)	50.87° N, 118.58° E	«east»/«Amur»

Таблица 1. Продолжение

Код выборки	Выборка (число образцов)	Координаты	Филогруппа
KRAS	ЗК, окр. г. Краснокаменск ($n=1$)	49.99° N, 118.23° N	«east»/«Amur»
BAL	ЗК, окр. пос. Бальзино ($n=3$)	51.00° N, 113.57° E	«east»/«Amur»
BUT	ЗК, Ононский р-н, Цасучейский бор оз. Бутывкен ($n=1$)	50.44° N, 114.92° E	«east»/«Chita»
ROM	Бурятия, Баунтовский р-н, окр. пос. Романовка ($n=5$)	53.22° N, 112.81° E	«east»/«Chita»
CHIT*	ЗК, берег озера Малый Ундугун ($n=4$)	52.12° N, 112.59° E	«east»/«Chita»
MAC#	ЗК, окр. пос. Маккавеево ($n=2$)	51.79° N, 114.09° E	«east»/«Chita»
AMAL	Бурятия, р. Мал. Амалат ($n=1$)	54.29° N, 113.44° E	«east»/«Chita»
IND	Бурятия, Еравнинский р-он, долина р. Индола ($n=7$)	52.60° N, 111.39° E	«east»/«Chita»
BAG	Бурятия, Баунтовский р-он, на правом берегу р. Багдарин, окр. пос. Багдарин ($n=7$)	54.44° N, 113.57° E	«east»/«Chita»
PUN	ЗК, окр. пос. Пундук ($n=1$)	51.10° N, 114.28° E	«east»/«Chita»
POD	ЗК, окр. с. Подойничино ($n=8$)	51.65° N, 116.77° E	«south»
UND	ЗК, окр. пос. Ундино-Поселье ($n=1$)	51.41° N, 116.13° E	«south»
BIRC	ЗК, Борзинский р-он, окр. с. Передняя Бырка ($n=1$)	50.70° N, 116.76° E	«south»
MUN	ЗК, долина р. Мунга ($n=1$)	51.66° N, 116.96° E	«south»
SEL*	Бурятия, окр. с. Истомно ($n=5$)	52.14° N, 106.29° E	«west»
END*	ЗК, Сохондинский з-к, р. Енда ($n=9$)	49.44° N, 110.85° E	«west»
BUK*	ЗК, Сохондинский з-к, р. Букукун ($n=4$)	49.47° N, 111.13° E	«west»

Примечание. ЕАО – Еврейская автономная область, АО – Амурская обл., ЗК – Забайкальский край, * – материал из выборки частично использован также в работе Е. Харинг с соавт. [2], ** – данные из работы К. Ванга с соавт. [20], *** – материал использован также в работе И. Шереметьевой с соавт. [19], # – места первоописания подвидов.

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия филогрупп *Alexandromys maximowiczii*

Исследуемые показатели	“west”	“south”	“east”			
			“Chita”	“Amur”	“Khab”	Все
n	20	11	26	141	34	201
N	12	10	25	135	31	191
V_s	28	31	52	236	58	281
$h \pm S.D.$	0.91 \pm 0.016	0.98 \pm 0.039	0.99 \pm 0.01	0.99 \pm 0.001	0.99 \pm 0.012	0.99 \pm 0.0005
k	7.34	7.91	7.63	13.04	9.19	16.03
$\pi \pm S.D.$	0.0083 \pm 0.005	0.0089 \pm 0.006	0.0086 \pm 0.006	0.0149 \pm 0.009	0.0104 \pm 0.006	0.0185 \pm 0.009
Tajima's $D (P)$	-0.27(0.437)	-1.13(0.143)	-1.74(0.018)	-2.17(0.001)	-1.59(0.037)	-2.15(0.000)
Fu's $F(P)$	-13.14(0.000)	-4.31(0.018)	-21(0.000)	-23.89(0.001)	-16.67(0.000)	-23.75(0.000)
<i>Показатели пространственной экспансии</i>						
τ	10.39	0.79	9.7	12.414	2.41	14.3
θ	3.814	12.348	0.904	5.192	7.884	4.425
M	3.069	99999	263.170	682.388	99999	589.107
SSD(P)	0.018(0.7)	0.024(0.3)	0.019(0.0)	0.001(0.4)	0.006(0.9)	0.001(0.4)
<i>Показатели демографической экспансии</i>						
τ	13.6	0.79	10.7	13.26	2.43	15.26
θ_0	0.002	12.347	0.016	4.222	7.857	3.36
θ_1	22.82	99999	101.03	137.97	901.25	142.23
SSD(P)	0.02254(0.45)	0.02398(0.85)	0.01881(0.00)	0.00044(0.85)	0.00566(0.8)	0.00038(0.85)

Примечание. n – объем выборки, N – число гаплотипов, V_s – число варибельных сайтов, h – гаплотипическое разнообразие, π – нуклеотидное разнообразие, Tajima's D – тест Таджимы; Fu's F – тест Фу; τ – время экспансии в мутационных единицах, θ – мутационные параметры на начальном и конечном этапах роста численности, M – межпопуляционный обмен мигрантами, SSD – сумма квадратов отклонений между наблюдаемым и ожидаемым распределением парных нуклеотидных различий, S.D. – стандартное отклонение S.E. – стандартная ошибка, P – p -значение.

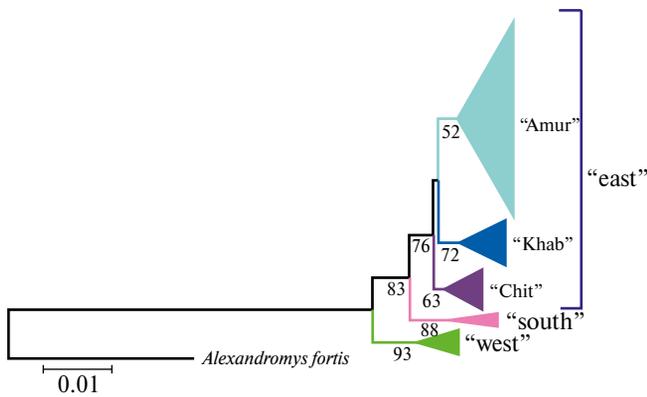


Рис. 2. ML-дендрограмма филогенетических отношений полевки Максимовича *Alexandromys maximowiczii*. В узлах ветвления указаны бутстреп-значения.

стоверностью: “west”, “south” и “east”. При этом в пределах группы “east” выделяется три субклады: “Chit”, “Khab” и “Amur”. С целью проведения более точной кластеризации гаплотипов была построена медианная сеть (рис. 3), которая в целом подтверждает данные, полученные при построении деревьев другими методами, показывая разделение всех гаплотипов на три филогенетические группы. Различия между гаплотипами групп “west” и “south” с одной стороны и “east” с другой были обнаружены по 17 фиксированным нуклеотидным позициям, а между гаплотипами “west” и “south” по 34. Различия между субкладами “Chit”, “Khab” и “Amur” выявлены по 6–8 заменам.

Самые высокие показатели гаплотипического (0.99 ± 0.0005) и нуклеотидного (0.0185 ± 0.009) разнообразия были обнаружены у фило-

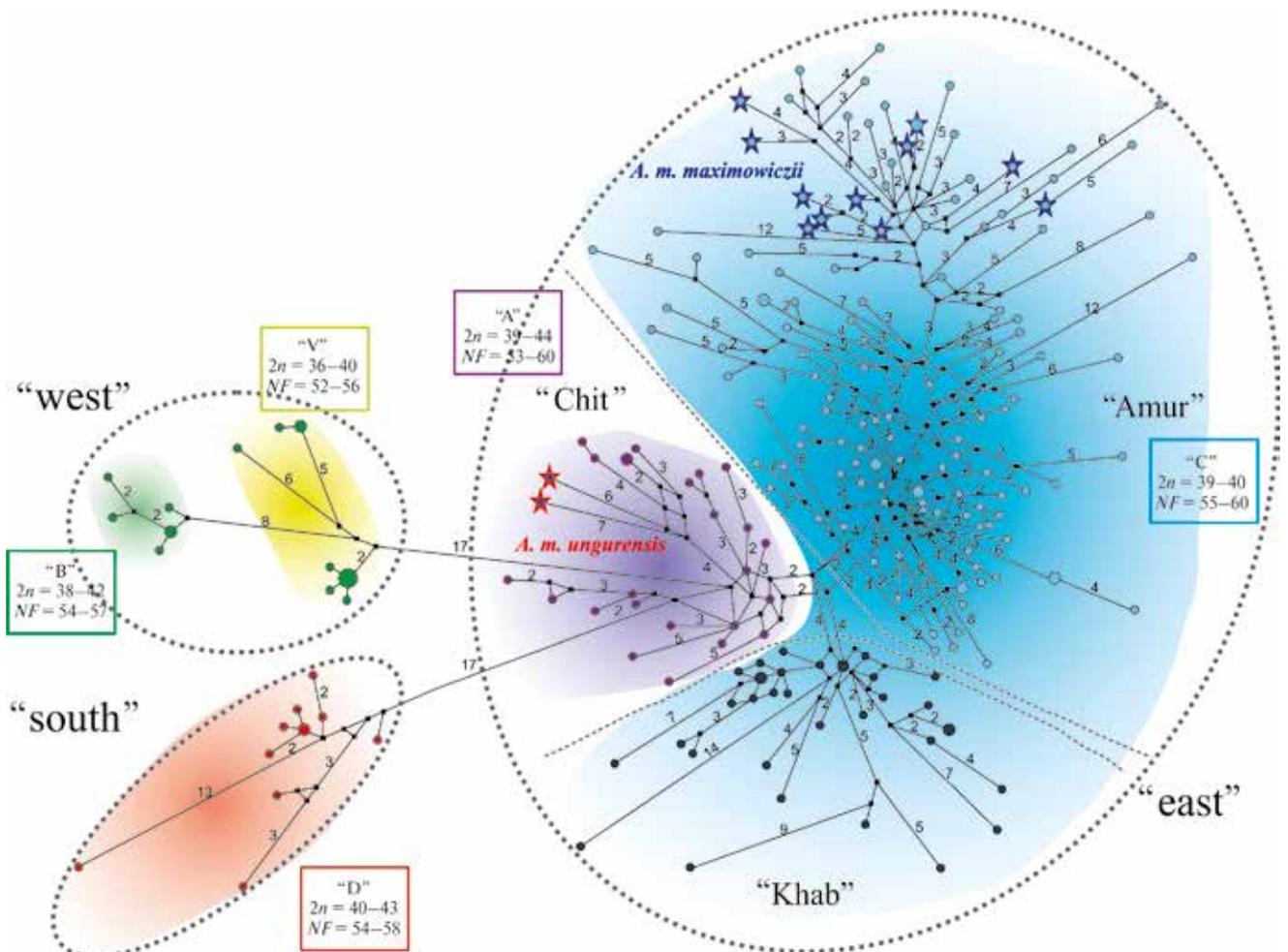


Рис. 3. Филогенетическая сеть гаплотипов мтДНК полевки Максимовича *Alexandromys maximowiczii*. Размеры кружков пропорциональны количеству образцов с данным гаплотипом. Цифры на ветвях сети соответствуют числу нуклеотидных замен больше 2. Звездочкой помечены образцы из мест первоописания подвидов.

группы “east”, которые незначительно отличались от видового в целом. Большинство гаплотипов в этой группе были уникальными, то есть встречались только у одной особи. Исключение составили десять гаплотипов, которые были встречены у двух особей. Среднее число попарных нуклеотидных различий между гаплотипами внутри группы “east” составило 16.03. Значения D Tajima и результаты теста Фу (F_u ’s F_s) на селективную нейтральность для этой филогруппы были не только отрицательными, но и высоко достоверно отличались от нуля, что может указывать на рост численности в прошлом (табл. 2). Для всех субклад этой группы характерно высокое гаплотипическое разнообразие (99%), при этом нуклеотидное было различно. Наибольшее было у субклады “Amur” (0.0149 ± 0.009), тогда как у субклад “Chit” и “Khab” оно было значительно ниже 0.0086 ± 0.006 и 0.0104 ± 0.006 соответственно. Значения D Tajima для всех субклад были отрицательными, но только для субклады “Amur” оно было значимым. При этом результаты теста Фу для всех субклад были не только отрицательными, но и высоко достоверно отличались от нуля.

Филогенетическая группа “west” имеет самое низкое гаплотипическое (0.91 ± 0.016) и нуклеотидное (0.0083 ± 0.005) разнообразие. Всего для этой филогруппы обнаружено 12 гаплотипов на 19 особей. При этом 9 гаплотипов были уникальны, тогда как 2 встречены у двух и 1 у шести особей. Среднее число попарных нуклеотидных различий между гаплотипами внутри группы составило 7.34. Внутри группы “west” на сети гаплотипы особей из выборок долины р. Селенга и Сохондинского заповедника (долина р. Онон) различаются между собой минимум 12 нуклеотидными заменами (рис. 3), что больше, чем отличия между субкладами “Chit”, “Khab” и “Amur” в филогруппе “east”. При этом гаплотипы особей Сохондинского заповедника расположены базально. Значение D Tajima для филогруппы “west” было отрицательным и незначимым, а тест Фу – высоко достоверным. Это, наряду с низкими значениями гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, указывает на рост численности в прошлом. Следует отметить, что еще одна особь, имеющая мт-генотип филогруппы “west”, была обнаружена нами значительно восточней, в окрестностях поселка Савво-Борзя (бассейн р. Аргунь).

Для филогенетической группы “south” отмечено относительно высокое гаплотипическое

(0.98 ± 0.039) и относительно низкое нуклеотидное разнообразие (0.0089 ± 0.006). Всего для этой филогруппы было обнаружено 10 гаплотипов на 11 особей. Среднее число попарных нуклеотидных различий между гаплотипами внутри группы было 7.91. Значения D Tajima и тест Фу для филогруппы “south” были отрицательными и незначимыми.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа контрольного региона митохондриальной ДНК полевки Максимовича был отмечен высокий уровень генетической изменчивости для вида в целом. При этом каждая отдельная локальная популяция может иметь значительное снижение нуклеотидного разнообразия (более чем в 1.5 раза) [19], что обусловлено особенностью биологии вида. Так, для полевки Максимовича характерны достаточно глубокие депрессии численности, когда вид сохраняется в отдельных небольших удаленных друг от друга колониях. Кроме этого, полевка Максимовича – представитель лесной и лесостепной зоны, предпочитающий влажные биотопы. Распространение вида, прежде всего, приурочено к речным долинам, а преодоление высоких горных хребтов и больших сухих пространств затруднено. Эти особенности биологии наряду с разнообразной и динамической географией района исследования оказали влияние на сложную филогеографическую структурированность и подразделенность вида. Всего для вида выделено три филогенетические группы – “east”, “west” и “south”.

Географическое распределение филогенетических групп

Наиболее широко распространены по ареалу вида представители группы “east”, которые встречаются на территории, ограниченной бассейнами рек Витим и Ингода (на западе) и нижнего Приамурья (на востоке). Внутри этой филогруппы выделяется три субклады “Chit”, “Amur” и “Khab”. При этом особи с мт-генотипом “Chit” встречаются, в основном, в бассейне рек Витим и Ингода, проникая на юг до среднего течения р. Онон в Забайкалье. Особи с мт-генотипом “Khab” обитают на территории нижнего Амура, проникая в долину среднего течения до р. Биждан в Еврейской АО. Особи субклады “Amur” имеют широкое распространение, обитая в долинах рек Шилка и Аргунь, а также верхнего и среднего Амура (рис. 1). Группа “west” имеет не столь широкое распространение, как филогруппа “east”. Представители этой группы об-

наружены на территории долины реки Селенга и в Сохондинском заповеднике. Не исключено обнаружение в дальнейшем особей с мт-гаплотипом “west” на территории долины р. Ингода, которая берет свое начало с Хэнтей-Чикойского нагорья, расположенного между государственной границей России и Монголии, где находится Сохондинский заповедник. Представители филогруппы “south” в ареале вида распространены очень ограничено, обитая в долинах рек Унда и Борзя (правых притоков р. Онон).

Частичными географическими барьерами между филогруппой “west” (с одной стороны) и “east” и “south” (с другой) вероятно служили системы горных хребтов, расположенных параллельно оз. Байкал на границе Забайкальского края и Бурятии. Эти горы и сейчас частично ограничивают перемещение особей между разными популяциями. Географической преградой между филогруппами “east” и “south” могут служить даурские степные районы, расположенные южнее р. Шилка. Роль самой р. Шилка в качестве географической преграды для данного вида вряд ли существенна, поскольку реки более крупные, такие как Амур, в своем среднем течении не являются барьером. Более того, речные долины, как интерзональные элементы, способствуют проникновению вида в не типичные для него биотопы.

Таким образом, географическое распределение филогенетических групп и субклад группы “east” у полевки Максимовича в основном аллопатрическое (рис. 1). Тем не менее нами была обнаружена одна “гибридная” выборка в окрестностях поселка Савво-Борзя (**SBOR**), особи в которой имеют разные варианты мт-генотипа: одна особь имеет вариант “west”, а вторая — “east”/“Amur”. Ранее нами были уже описаны “гибридные” выборки в Еврейской автономной области (**LEN** и **BUSS**) в междуречье рек Бира и Биджан (табл. 1) [19], где встречаются особи, имеющие мт-генотип “Khab” и “Amur” филогруппы “east”. Вероятно, эти зоны контакта не единственные, и при дальнейшем более детальном исследовании могут быть выявлены и другие.

Сопоставление филогрупп с хромосомными формами

Анализ результатов изменчивости контрольного региона с хромосомными формами, выделенными И. Картавцевой с соавт. [17] у полевки Максимовича показал, что распространение особей с гаплотипом филогруппы “south” соответствует распространению особей хромосо-

мною формы “D”. Распространение особей с гаплотипом “Chit” коррелируют с обитанием особей хромосомной формы “A”, а особей с гаплотипами “Khab” и “Amur” — с хромосомной формой “C” (рис. 1). При этом следует отметить, что во многих частях ареала недостаточно изучена хромосомная изменчивость вида. Обитание особей с гаплотипом “west” соответствует распространению хромосомной формы “V” (для полевки Сохондинского заповедника) и “B” (для животных, отловленных в дельте р. Селенга). Таким образом, прослеживается корреляция между выделенными хромосомными формами и филогенетическими группами. Следует отметить, что в литературе имеются примеры, демонстрирующие как соответствие, так и отсутствие согласованности между картинами кариологической дифференциации (хромосомными расами) и филогенетическими группами, выделяемыми на основе молекулярно-генетических маркеров у разных видов хромосомно полиморфных животных и растений [27].

Сопоставление филогеографической структуры и подвидовой систематики

Подвидовая систематика полевки Максимовича разработана слабо. Описание подвидов проведено формально, по морфологическим признакам, границы между подвидами не были определены [8, 28–30]. При сопоставлении изменчивости контрольного региона мтДНК с литературными данными о двух подвидах полевки Максимовича [8, 28–30] явно прослеживается несогласованность географического распределения филогеографических групп и подвидов. Согласно ныне существующей подвидовой системе, оба подвида относятся к одной филогруппе “east”, но к разным субкладам. Гаплотипы полевки, отловленных в месте описания *A. m. maximowiczii* (**OMUT**), на филогенетических деревьях попадают в субкладу “Amur”, и распространены должны быть только в Приамурье и Восточном Забайкалье. Тогда как полевки из места первоописания *A. m. unguensis* (**MAC**) имеют генотипы субклады “Chit” и, соответственно, обитать должны только на территории северо-западного Забайкалья. Согласно полученным в настоящей работе генетическим данным было бы логично выделять три подвида, которые бы соответствовали трем филогенетическим линиям “west”, “east” и “south”.

Отметим, что ранее нами был проведен краниометрический анализ четырех выборок *A. m. unguensis* и двух *A. m. maximowiczii*, в резуль-

тате которого предварительно было обнаружено достоверное отличие особей Сохондинского заповедника от полевков как центрального (Читинская обл., Читинский р-н, оз. Арахлей) и северного Забайкалья (Бурятия, Еравненский р-н, окр. с. Романовка и Баунтовский р-н, оз. Баунт), так и от Амурской области (Амурская обл., Зейский и Норский заповедники). При этом статистически значимых различий между выборками особей Амурской области, с одной стороны, и центрального и северного Забайкалья, с другой, не выявлено [10]. Однако позже в работе А.А. Лисовского и Е.В. Оболенской [31] наши результаты не были подтверждены, так как авторами не было выявлено географической подразделенности по краниометрическим признакам у вида. Очевидно, что для корректной ревизии подвидовой структуры полевки Максимовича в дальнейшем следует провести более детальное исследование внутривидовой морфологической изменчивости с учетом новых данных, полученных в результате анализа контрольного региона мтДНК.

Таким образом, мы наблюдаем сложную внутривидовую подразделенность полевки Максимовича, которая проявляется как на молекулярно-генетическом, так и хромосомном уровне. Следует отметить, что схожие картины изменчивости, обнаруженные на разных уровнях, были отмечены и у других представителей мелких млекопитающих в этом регионе [32, 33]. Вероятно, это отражает не только сложную географию района исследования, но и историю динамично изменяющейся природной среды в позднечетвертичное время.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ 15-04-03871, 12-04-10047-к в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №121031500274-4 “Эволюционные аспекты формирования наземной биоты востока Азии” и № 0309-2021-0001 “Механизмы обеспечения экономической устойчивости и экологической безопасности в новой модели развития регионов востока РФ в условиях трансграничных отношений и глобальных вызовов 21 в.”).

Исследование проведено в соответствии с правилами проведения научных исследований с использованием экспериментальных животных, утвержденных распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980, № 12000-496 и приказом Минвуза СССР от 13 сентября 1984, № 22, а

также утверждено комиссией по биоэтике ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (протокол № 1 от 20 мая 2021 г.).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pavlinov I.Ya., Lisovsky A.A. The Mammals of Russia: A Taxonomic and Geographic Reference. Moscow: KMK Sci. Press Publ., 2012. 604 p.
2. Haring E., Sheremetyeva I., Kryukov A. Phylogeny of Palearctic vole species (genus *Microtus*, Rodentia) based on mitochondrial sequences // Mammalian Biology. 2011. V. 76. P. 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.04.006>
3. Лисовский А.А., Оболенская Е.В. Структура краниометрического разнообразия серых полевков *Microtus* подрода *Alexandromys* // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2011. Т. 315. № 4. С. 461–477. https://www.zin.ru/journals/trudyzin/doc/vol_315_4/tz_315_4_lisovsky.pdf
4. Лисовский А.А., Кадетова А.А., Оболенская Е.В. Морфологическое определение видов восточноазиатских серых полевков *Alexandromys* (Rodentia, Cricetidae) России и сопредельных территорий // Зоологический журнал. 2018. Т. 97. № 1. С. 101–113. <https://doi.org/10.7868/S0044513418010099>
5. Lisovsky A.A., Petrova T.V., Yatsentyuk S.P. et al. Multilocus phylogeny and taxonomy of East Asian voles *Alexandromys* (Rodentia, Arvicolinae) // Zoologica Scripta. 2018. V. 47. № 1. P. 9–20. <https://doi.org/10.1111/zsc.12261>
6. Фрисман Л.В., Коробицына К.В., Картавецова И.В. и др. Серые полевки (*Microtus* Shrank, 1798) Дальнего Востока России: аллозимная и кариологическая дивергенция // Генетика. 2009. Т. 45. № 6. С. 804–812.
7. Фрисман Л.В., Картавецова И.В., Шереметьева И.Н. и др. Аллозимная дифференциация и кариотипические особенности восточноазиатских полевков Дальнего Востока России // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2016. № 3. С. 93–103. <https://doi.org/10.31433/2618-9593-2019-22-2-13-25>
8. Мейер М.Н., Голенищев Ф.Н., Раджабли С.И., Саблина О.Л. Серые полевки фауны России и сопредельных территорий. Санкт Петербург: Зоол. ин-т РАН, 1996. 320 с.
9. Bikchurina T., Pavlenko M., Kizilova E. et al. Chromosome asynapsis is the main cause of male sterility in the interspecies hybrids of East Asian voles (*Alexandromys*, Rodentia, Arvicolinae) // Genes 2023. V. 14. № 5. <https://doi.org/10.3390/genes14051022>
10. Sheremetyeva I.N., Kartavtseva I.V., Voyta L.L. et al. Morphometric analysis of intraspecific variation in *Mi-*

- crotus maximowiczii* (Rodentia, Cricetidae) in relation to chromosomal differentiation with reinstatement of *Microtus gromovi* Vorontsov, Boeskorov, Lyapunova et Revin, 1988, stat. nov. // J. Zool. Syst. and Evol. Res. 2009. V. 47. № 1. P. 42–48.
https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2008.00511.x
11. Dokuchaev N.E. Far-eastern grey voles (Rodentia: Cricetidae: *Alexandromys*) from Bolshoi Shantar Island // Russian Journal of Theriology. 2014. V. 13. № 2. P. 65–70. https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.13.2.02
 12. Dokuchaev N.E., Sheremetyeva I.N. The identity of gray voles (Cricetidae, Rodentia) from Bolshoi Shantar Island, Sea of Okhotsk, with Gromov's vole (*Alexandromys gromovi* Vorontsov et al., 1988) // Biol. Bull. 2018. V. 45. № 7. P. 783–787.
https://doi.org/10.1134/S1062359018070051
 13. Dokuchaev N.E., Solovyeva E.N., Lebedev V.S. A molecular study of the holotype of *Microtus oeconomus shantaricus* Ognev, 1929 (Rodentia, Cricetidae) // Zoologicheskii Zhurnal. 2022, V. 101. № 1. P. 117–120.
https://doi.org/10.31857/s0044513421110040
 14. Ковальская Ю.М. Хромосомный полиморфизм полевки Максимовича *Microtus maximowiczii*, Schrek, 1858 (Rodentia, Cricetidae) // Бюлл. МОИП. Биология. 1977. Т. 82. № 2. С. 38–48.
 15. Ковальская Ю.М., Хотолху Н., Орлов В.Н. Географическое распространение хромосомных мутаций и структура вида *Microtus maximowiczii* (Rodentia, Cricetidae) // Зоол. журнал. 1980. Т. 59. № 12. С. 1862–1869.
 16. Коробицына К.В., Картавцева И.В., Фрисман Л.В. и др. Хромосомный полиморфизм и аллозимная дифференциация полевки Максимовича (*Microtus maximowiczii*, SCHRENK, 1858) в Забайкалье // Экосистемы Монголии и приграничных территорий соседних стран: природные ресурсы, биоразнообразие и экологические перспективы. Мат. Междунар. конф. 2005. Улан-Удэ: С. 287–289.
 17. Kartavtseva I.V., Sheremetyeva I.N., Korobitsina K.V. et al. Chromosomal forms of *Microtus maximowiczii* (Schrenk, 1858) (Rodentia, Cricetidae): variability in $2n$ and NF in different geographic regions // Russ. J. of Theriology. 2008. V. 7. № 2. P. 89–97.
 18. Vannikova A., Lebedev V., Lissovskii A. et al. Molecular phylogeny and evolution of the Asian lineage of vole genus *Microtus* (Rodentia: Arvicolinae) inferred from mitochondrial cytochrome b sequence // Biol. J. of the Linnean Society. 2010. № 99. P. 595–613.
https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01378.x
 19. Шереметьева И.Н., Картавцева И.В., Фрисман Л.В. и др. Полиморфизм и генетическая структура полевки Максимовича *Microtus maximowiczii* (Schrenk, 1858) (Rodentia, Cricetidae) Среднего Приамурья по данным секвенирования контрольного региона мтДНК // Генетика. 2015. Т. 51. № 10. С. 1154–1162.
https://doi.org/10.7868/S0016675815100161
 20. Wanga C.Q., Gaoc J.H., Lic M. et al. Co-circulation of Hantaan, Kenkeme, and Khabarovsk hantaviruses in Bolshoy Ussuriysky Island, China // Virus Research. 2014. № 191. P. 51–58.
https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.021
 21. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCRbased techniques // Nucl. Ac. Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693. https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692
 22. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 // Nucl. Ac. Symp. Series. 1999. V. 41. № 41. P. 95–98.
https://doi.org/10.1021/bk-1999-0734.ch008
 23. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096
 24. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring ntraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
 25. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C. et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets // Mol. Biol. Evol. 2017. V. 34. P. 3299–3302. https://doi.org/10.1093/molbev/msx248
 26. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Resources. 2010. № 10. P. 564–567.
https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
 27. Kavalco K.F., Pasa R. Chromosomal Radiation: A model to explain karyotypic diversity in cryptic species // Gen. and Mol. Biol. 2023. V. 46. № 1.
https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2023-0116
 28. Огнев С.И. Звери СССР и прилежащих стран. Т. 7. Грызуны. Москва–Ленинград: Госиздат, 1950. 706 с.
 29. Павлинов И.Я., Россолимо О.Л. Систематика млекопитающих СССР / под ред. Соколова В.Е.. Москва: Изд-во Московского университета, 1987. 281 с.
 30. Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. Санкт Петербург: И-во Зоол. ин-та РАН, 1995. 520 с.
 31. Лисовский А.А., Оболенская Е.В. Структура крапивомерического разнообразия серых полевок *Microtus* подрода *Alexandromys* // Тр. Зоол. ин-та РАН. 2011. Т. 315. № 4. С. 461–477.
 32. Poplavskaya N.S., Vannikova A.A., Neumann K. et al. Phylogeographic structure in the chromosomally polymorphic rodent *Cricetulus barabensis* sensu lato (Mammalia, Cricetidae) // J. of Zool. Syst. and Evol. Res. 2019. V. 57. № 3. P. 679–694.

- https://doi.org/10.1111/jzs.12251
33. Petrova T.V., Zakharov E.S., Samiya R., Abramson N.I. Phylogeography of the narrow-headed vole *Lasiopodomys (Stenocranius) gregalis* (Cricetidae, Rodentia) inferred from mitochondrial cytochrome b sequences: an echo of Pleistocene prosperity // J. of Zool. Syst. and Evol. Res. 2015. № 53. P. 97–108. https://doi.org/10.1111/jzs.12082

Phylogeographic Structure in the *Alexandromys maximowiczii* Schrenk, 1859 (Rodentia, Cricetidae): Comparison of Data on mtDNA Control Region Variability and Chromosome Polymorphism

I. N. Sheremetyeva^{1,*}, I. V. Kartavtseva¹, M. V. Pavlenko¹, U. V. Gorobeiko¹, Yu. A. Bazhenov², I. V. Moroldoev³, L. L. Voyta⁴

¹Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity in the Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

²Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology in the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Chita, 672014 Russia

³Institute of Systematics and Ecology of Animals in the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630091 Russia

⁴Zoological Institute of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: sheremet76@yandex.ru

Based on the study of the mtDNA control region variability, a high level of genetic diversity and described genetic structure for the species as a whole are revealed for *Alexandromys maximowiczii*. Three phylogenetic groups “east”, “west” and “south” are identified, and within the “east” group three subclades “Chit”, “Amur” and “Khab” are distinguished. All phylogenetic groups and subclades have a mainly allopatric geographical distribution across the range. Nevertheless, in the vicinity of the village of Savvo-Borzya (Zabaykalsky Krai) one “hybrid” sample is found, individuals in which have different variants of the mt genotype: one individual has a “west” variant and the second has an “east”/“Amur” one. The revealed phylogenetic structure generally correlates with the previously described chromosomal forms, but does not correspond to the subspecific forms. The complex intraspecific subdivision of *Alexandromys maximowiczii*, discovered at different organization levels (molecular genetics and chromosomal), reflects not only the complex geography of the study area, but also the history of dynamic changes in the natural environment.

Keywords: phylogeography, mtDNA control region, Maximowicz’s vole, *Alexandromys maximowiczii*, variability.

УДК 617.735-007.23

ЧАСТЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНЫХ НЕСИНДРОМАЛЬНЫХ ФОРМ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕТЧАТКИ У ЖИТЕЛЕЙ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

© 2024 г. Н. Ю. Огородова^{1,*}, А. А. Степанова¹, О. А. Щагина¹, В. В. Кадышев¹,
А. В. Поляков¹

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

*e-mail: ogorodova@med-gen.ru

Поступила в редакцию 25.09.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Наследственные заболевания сетчатки (НЗС) представляют собой клинически гетерогенную группу патологий сетчатки, сопровождающихся потерей зрения вследствие дисфункции или дегенерации фоторецепторных клеток и клеток пигментного эпителия сетчатки. На долю аутосомно-рецессивных форм НЗС в среднем в мире приходится более 55% всех заболеваний этой группы. В настоящем исследовании представлены частые патогенные и вероятно патогенные варианты в генах, ответственных за аутосомно-рецессивные НЗС, полученные на основе ретроспективного анализа данных высокопроизводительного секвенирования большой российской когорты пациентов с подозрением на наследственную несиндромальную патологию сетчатки. Были проанализированы данные 1470 неродственных пациентов. У 643 (43,74%) были выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты в зиготности, необходимой для развития заболевания. Установлено, что на долю девяти генов (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CER290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) приходится 73,3% всех молекулярно-подтвержденных случаев НЗС у российских пациентов. Был проведен анализ спектров нуклеотидных вариантов данных генов и выявлено 17 вариантов, встречающихся с аллельной частотой более 1% для каждого из генов. На основании полученных данных были разработаны диагностические системы на основе аллель-специфичной мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции (MLPA). Информативность двух систем для диагностики аутосомно-рецессивных несиндромальных форм наследственных заболеваний сетчатки составляет 16,4%, информативность для всех форм несиндромальных заболеваний сетчатки превышает 7%. Для группы пациентов с ахроматопсией исследование с использованием одной из систем позволит установить диагноз в 62,5% случаев.

Ключевые слова: наследственные заболевания сетчатки, частые рецессивные варианты, ахроматопсия, врожденный амавроз Лебера, болезнь Штаргардта.

DOI: 10.31857/S0016675824040065 EDN: CREOVS

Наследственные заболевания сетчатки (НЗС) – гетерогенная группа заболеваний органов зрения. НЗС являются основной причиной потери зрения у детей и взрослых трудоспособного возраста из-за прогрессирующих дегенеративных изменений в сетчатке. Распространенность НЗС различается в разных странах и составляет в среднем 1 на 1380 человек [1].

На сегодняшний день известно более 280 ядерных и митохондриальных генов, патогенные варианты в которых могут приводить к различным формам НЗС (<https://sph.uth.edu/Retnet/>). На долю аутосомно-рецессивных форм НЗС (АР НЗС) приходится более 55% [2–4]. Было показано, что один из трех человек во всем мире является гетерозиготным носителем по крайней

мере одного рецессивного патогенного варианта в гене, вызывающем НЗС [1, 5].

Применение методов высокопроизводительного секвенирования (ВПС) в диагностике НЗС значительно расширило представление о молекулярно-генетических причинах патологий сетчатки в различных популяциях мира.

Наиболее распространенными генами АРНЗС во всем мире являются *ABCA4* (30% всех случаев НЗС), *USH2A* (12%) и *EYS* (8%) [1]. Однако частоты встречаемости различных генетических вариантов и спектры мутаций отдельных генов имеют существенные различия в разных странах и выборках. В испанской когорте пациентов значительная доля случаев НЗС приходится на гены

USH2A (21.2%), *CRB1* и *ABCA4* (по 7%), *CERKL* и *EYS* (по 4%) [6]. В большой китайской когорте пациентов с пигментным ретинитом ген *CYP4V2* (15%) был вторым частым геном после *USH2A* (18%) [7]. Варианты в гене *EYS* (44.9%) были более частой причиной заболевания, чем варианты *USH2A* (18.8%), у японских пациентов [8]. Патогенные варианты в гене *FAM161A* составляют значительную долю случаев (6%) в большой израильской когорте пациентов [3]. А в финской популяции самым частым геном, ответственным за амавроз Лебера, был *GUCY2D* (9.4%) [9]. В немецкой выборке пациентов на долю мутаций в гене *ABCA4* приходится 10.4% всех мутантных аллелей, за ним следует ген *USH2A* (8.4%) [4, 10]. На долю *RPE65*-зависимых форм НЗС в России приходится 5.8% случаев среди всех пациентов с направляющим диагнозом “пигментная дегенерация сетчатки” или “врожденный амавроз Лебера” (ВАЛ) [11]. Случаи ВАЛ, обусловленные патогенными вариантами в гене *RPE65*, чаще регистрируются в европейских и американских семьях, редко – у китайских пациентов [12].

Однако, несмотря на имеющиеся на сегодняшний день данные о спектре мутаций в генах, ответственных за конкретные нозологические формы патологий сетчатки у российских пациентов с клиническими диагнозами “болезнь Штаргардта”, “*RPE65*-ассоциированные дистрофии сетчатки”, “синдром Ашера”, исследования по определению частых рецессивных вариантов среди различных генов НЗС на большой российской когорте пациентов не проводились.

Накопление частых аутосомно-рецессивных вариантов в различных популяциях и знание об особенностях генетической этиологии патологий сетчатки у российских пациентов позволяют повысить эффективность и скорость диагностики за счет разработки систем поиска частых патогенных вариантов [13, 14].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для поиска частых вариантов в генах АР НЗС у российских пациентов был проведен ретроспективный анализ данных высокопроизводительного секвенирования 1470 образцов крови. В исследование были включены пациенты с подозрением на наследственную патологию сетчатки со следующими входящими диагнозами: “пигментная дегенерация сетчатки”, “болезнь Штаргардта”, “ахроматопсия”, “врожденный амавроз Лебера”, “колбочковая/колбочко-па-

лочковая дистрофия сетчатки”. Среди пациентов были 699 женского (47.6%) и 771 (52.4%) мужского пола. От пациентов получено информированное добровольное согласие на исследование и обработку персональных данных.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов для выделения QIAamp DNA MiniKit, Qiagen по протоколу производителя.

Всем пациентам проведен анализ генной панели “Ophthalmology” на основе метода ВПС, включающей 211 генов. Панель “Ophthalmology” протяженностью 822786 пн включает 4423 ампликона размером от 125 до 275 пн. Расчетное покрытие кодирующих областей по данным программы Ion AmpliSeq Designer составляет 97.73%. Обработка результатов секвенирования проведена с использованием программного обеспечения “NGS-Data” (<http://www.ngs-data.ru> (Бескорвайный Н.С.) (дата обращения: 31.07.2023)).

Название выявленных изменений в генах присваивалось в соответствии с международной номенклатурой HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Клиническую значимость ранее не описанных вариантов нуклеотидной последовательности оценивали на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования [15].

Для разработки диагностических систем детекции наиболее частых патогенных и вероятно патогенных вариантов в восьми генах, ответственных за наследственную несиндромальную дистрофию сетчатки, использовалась аллель-специфичная мультиплексная проба-зависимая лигазная реакция с последующей амплификацией (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). Последовательность проб, входящих в реакции, подобрана согласно базе GeneBank (табл.1). Длина амплифицированных фрагментов составляет от 94 до 145 пн.

Реакция лигирования проводилась в 5 мкл реакционной смеси, содержащей 1× реакционный буфер (20 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 20 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0.1% Igepal, 0.01 мМ rATP, 0.1 мМ DTT), 26/24 специфичных проб, 0.04 ед. активности термофильной ДНК-лигазы, 0.1–1 мкг геномной ДНК. Условия лигирования были следующими: первоначальная денатурация при 95°C – 5 мин, затем лигирование при 64°C –

Таблица 1. Олигонуклеотиды, входящие в MLPA-системы детекции частых вариантов в восьми генах (*ABCA4*, *CNGB3*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*)

Ген	Детектируемый вариант	Последовательность олигонуклеотидов (5'→3')
Первая система		
<i>ABCA4</i>	p.Leu541Pro	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACCACCCAACGTGCCCTCTCTCT FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACCACCCAACGTGCCCTCTCTCC R:ACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG
	p.Ala1038Val	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCTTATTGGCTTCCATCTCCAGCTGG FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCTTTATTCATGGCTTCCATCTC-CAGCTGGA R:CCTCCTCCTGGGACTTTCCTTTCTTATTTATTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG
	p.Arg653Cys	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACCACCATGAAGATAGGGAAACAGCG FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTGCACCATGAAGATAGGGAAACAGCA R:GTTTCAGGATGATCATGAAACTAAAGCAAAAAGTTTTCGATGCGATCCGATG-CCTTCATG
	p.Cys1490Tyr	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTCCTTACCATCCTGCAGGTG FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTCCCTTACCATCCTGCAGGTA R:CAGCACCAGGGAGAAGCTCACTTTGTTTATTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG
	p.Gly1961Glu	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACACCTCTCCAGGGCGAACTC FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTCCACCTCTCCAGGGCGAACTT R:CGACACACAGCCTGTCCACTGGATGCGATCCGATGCCTTCATG
<i>RPE65</i>	p.Arg124*	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTCTTTATTGCATTGTCAGTAACCTC-TACTCCTCG FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTCTTTATTTGGCATTGTCAGTA-ACCTTACTCCTCA R:AAAGTAAGAAAAAACCTGTAGAAACAAATGAATTTTCTTTTCGATGCGATC-CGATGCCTTCATG
	p.Arg91Gln p.Glu102*	91FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTCCGCACTGATGCTTACGTACG 91FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTTCATCCGCACTGATGCTTACG-TACA 91/102L:GGCAATGACTGAGAAAAGGATCGTCATAACA 102RN:GAATTTGGCACCTGTGCTTTCCTTTGTTTATTCGATGCGATCCGATG-CCTTCATG 102RM:TAATTTGGCACCTGTGCTTTCCTTTATTTGTTTATTCGATGCGATCCGAT-GCCTTCATG
	c.11+5G>A	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTGAAGGTGTTTTAAAAAAGTCTCCA-GAGATAC FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCATGAAGGTGTTTTAAAAAAGTCTC-CCAGAGATAT R:TTACTGGATAGACATTTTCTTCCAGTTTCAGGTTTGTTTATTCGATGCGATCCGAT-GCCTTCATG
Вторая система		
<i>CEP290</i>	c.2991+1655A>G	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTCTGGCCCCAGTTGTAATTGTGAA FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTGGCCCCAGTTGTAATTGTGAG R:TATCTCATACCTATCCCTATTGGCAGTGATGCGATCCGATGCCTTCATG

1.5 ч. Постановка реакции проводилась на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по следующей схеме: к 15 мкл реакционной смеси, содержащей 1× реакционный буфер

(67 мМ TrisHCl (pH 8.8), 16.5 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Twin-20); 0.25 мкМ каждого олигопрайма, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1.5 ед. активности термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 5 мкл лигата. ПЦР-реакцию проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использо-

Таблица 1. Окончание

Ген	Детектируемый вариант	Последовательность олигонуклеотидов (5'→3')
<i>CNGB3</i>	p.Thr383Ilefs*13	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATCTTCTTCCCATCATACACCCATCTAG FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCTTATCCTTCCCATCATACAC- CCATCTA R:TAGTGCCAATTCCTTCATAGTTTGAAGCTATTTATTCGATGCGATCCGATG- CCTTCATG
	p.Arg274Valfs*13	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATCTTGATATGCTATTTATCCAGC- CCAGACTCC FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCATCTACCTTTATGATATGC- TATTTATCCAGCC R:AGTTTGTAAGAGGAGGAGACATAATAGTAAGTGGTTTTTTCGATGCGATCCGATG- CCTTCATG
<i>CNGA3</i>	p.Phe547Leu	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTCTCAGCGATGGCAGCTACTTC FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTTGTCTCAGCGATGGCAGCTACTTA R:GGGGAGATCAGCATTCTGAACATCTTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG
<i>CRB1</i>	p.Gly827Val	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTGGCCACCAATGTAGATGACATCTC FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTGGTAGGCCACCAATGTAGATGA- CATCTA R:CCTTTTCGATTTTCCACGTAGAAGCTTTTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG
	p.Cys948Tyr	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTGATTTAATAAAGTTATTGATTATTAT- CACCTTCTCTCATTAGG FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTATAGATTTAATAAAGTTATTGATTATTAT- CACCTTCTCTCATTAGA R:TATTGCAAATGCTGTTTTTAATGGACAAAGCTATTTATTCGATGCGATCCGATG- CCTTCATG
<i>GUCY2D</i>	c.2944+1del	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGCATAGGCCTGCACTCGG FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTCCGCATAGGCCTGCACTCG R:GTAACCTCCCGGGTCTTCCCAGATGCGATCCGATGCCTTCATG
<i>PDE6H</i>	p.Ser12*	FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGGGTGGTAGGACCCTGGTTTG FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTGGGTGGTAGGACCCTGGTTTC R:AAGCTGGAGCAGGCAGAGTAGTGATGCGATCCGATGCCTTCATG

Таблица 2. Универсальные праймеры и условия, применяемые на этапе ПЦР

Последовательность праймеров (5'→3')	Температура отжига
F*: GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC R: CATGAAGGCATCGGATCGCATC	66°C

ванием ДНК-полимеразы Biotaq (БиоМастер) и пары универсальных праймеров, где прямой мечен флуоресцентной меткой (табл. 2), в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C – 1 мин, затем 30 циклов смены температур: 94°C – 2 с, температуры отжига праймеров 66°C – 2 с, элонгация цепи 72°C – 2 с, заключительная элонгация 72°C – 1 мин.

Детекцию продуктов реакции осуществляли методом капиллярного-гель электрофореза на генетическом анализаторе Honor 1616 (Nanjing Superyears Gene Technology, Китай). Определение длин аллелей проводили в программе Gene

Mapper v3.7. Информативность систем была рассчитана исходя из частот встречаемости вариантов, входящих в диагностические системы, у пациентов с наследственными заболеваниями сетчатки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами были проанализированы данные ВПС 1470 неродственных пациентов с подозрением на наследственную несиндромальную патологию сетчатки. Из них у 643 (43.7%) пациентов были выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты в генах НЗС. Среди них у 72%

Таблица 3. Варианты, встреченные с частотой более 1% среди всех причинных вариантов данного гена у пациентов с аутосомно-рецессивной несиндромальной патологией сетчатки

Ген	Вариант	Число пациентов с вариантами в данном гене (в скобках указан % от всех AP НЗС)	Число хромосом с данным вариантом	Аллельная частота варианта среди больших с данным геном (%)
<i>ABCA4</i> (<i>NM_000350</i>)	c.[1622T>C;3113C>T] (p.[Leu541Pro;Ala1038Val]/ p.Leu541Pro)	168 (36.1)	133	39.6
	c.5882G>A (p.Gly1961Glu)		29	8.6
	c.4469G>A (p.Cys1490Tyr)		13	3.9
	c.1957C>T (p.Arg653Cys)		7	2.1
<i>CNGB3</i> (<i>NM_019098</i>)	c.1148del (p.Thr383Ilefs*13)	52 (11.2%)	76	73.1
	c.819_826del (p.Arg274Valfs*13)		14	13.5
<i>USH2A</i> (<i>NM_206933</i>)	c.11864G>A (p.Trp3955*)	27 (5.8)	12	22.2
	c.13335_13347delinsCTTG (p.Glu4445_ Ser4449delinsAspLeu)		6	11.1
<i>RPE65</i> (<i>NM_000329</i>)	c.304G>T (p.Glu102*)	26 (5.6)	13	25.0
	c.370C>T (p.Arg124*)		7	13.5
	c.272G>A (p.Arg91Gln)		4	7.7
	c.11+5G>A		2	3.8
<i>CRB1</i> (<i>NM_201253</i>)	c.2480G>T (p.Gly827Val)	25 (5.4)	14	28.0
	c.2843G>A (p.Cys948Tyr)		10	20.0
<i>CNGA3</i> (<i>NM_001298</i>)	c.1641C>A (p.Phe547Leu)	16 (3.4)	8	25.0
<i>CEP290</i> (<i>NM_025114</i>)	c.2991+1655A>G	12 (2.6)	6	25.0
<i>GUCY2D</i> (<i>NM_000180</i>)	c.2944+1del	11 (2.4%)	14	63.6
<i>PDE6H</i> (<i>NM_006205</i>)	c.35C>G (p.Ser12*)	4 (0.9)	8	100.0

(465 пациентов) были молекулярно-генетически подтверждены болезни сетчатки с аутосомно-рецессивным наследованием. Варианты нуклеотидной последовательности, выявленные у пациентов этой группы с аллельной частотой более 1% для конкретного гена, представлены в табл. 3.

Значительная доля (36.1%) выявленных вариантов приходится на ген *ABCA4*, биаллельные варианты в котором встретились у 168 пациентов нашей выборки. Наиболее частыми в гене *ABCA4* были ранее описанные как патогенные миссенс-варианты: c.1622T>C (p.Leu541Pro) (133 хромосомы), c.3113C>T (p.Ala1038Val) (132 хромосомы), c.5882G>A (p.Gly1961Glu) (29 хромосом), c.4469G>A (p.Cys1490Tyr) (13 хромосом), c.1957C>T (p.Arg653Cys) (7 хромосом). Варианты p.Leu541Pro и p.Ala1038Val у российских пациентов встречались в составе гаплотипа, представляющего из себя комплексный аллель p.[Leu541Pro;Ala1038Val], частота которого составила 39.3%. Лишь на одной из хро-

мосом патогенный вариант p.Leu541Pro встретился отдельно в компаунд-гетерозиготном состоянии с патогенным вариантом p.Arg653Cys. Вариант p.[Leu541Pro;Ala1038Val] встретился в гомозиготном состоянии у 37 пациентов, в компаунд-гетерозиготном состоянии с вариантом p.Gly1961Glu встретился у 10 человек, с вариантом p.Cys1490Tyr – у пяти и с вариантом p.Arg653Cys – у трех.

На долю биаллельных вариантов в генах ахроматопопии – *CNGA3*, *CNGB3*, *PDE6H* у российских пациентов приходится 15.5% (72 пробанда). Самая частая причина ахроматопозий – патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *CNGB3* (72.2%). В гене *CNGB3* были выявлены частые патогенные варианты, ранее описанные в литературе у пациентов из Европы, приводящие к делеции со сдвигом рамки считывания: c.1148del (p.Thr383Ilefs*13) (76 хромосом) и c.819_826del (p.Arg274Valfs*13) (14 хромосом). Вместе оба варианта были выявлены в компа-

унд-гетерозиготном состоянии у 10 пробандов. Что интересно, вариант с.1148del выявлен в гомозиготном состоянии у 26 пациентов, а вариант с.819_826del лишь у одного. Вторым по частоте выявленных каузативных вариантов среди случаев ахроматопсий является ген *CNGA3* (22.2%). Наиболее частым вариантом в гене *CNGA3* был описанный как патогенный вариант с.1641C>A (p.Phe547Leu) (8 хромосом), выявленный у двух пациентов в гомозиготном состоянии. Незначительная доля случаев приходится на ген *PDE6H*, где у четырех человек был выявлен нонсенс-вариант с.35C>G (p.Ser12*) в гомозиготном состоянии. Все пациенты с данным вариантом были разного этнического происхождения.

Другими генами, патогенные варианты в которых – частая причина НЗС у российских пациентов, являются *RPE65*, *CEP290*, *CRB1*, *GUCY2D*. Данные гены ответственны за развитие врожденного амавроза Лебера – наиболее тяжелой формы наследственных дистрофий сетчатки, связанной с чрезвычайно ранним началом и приводящей к потере зрения в детском возрасте. В исследовании у 26 пациентов были выявлены биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *RPE65*. Обнаружены следующие частые ранее описанные патогенные варианты в этом гене: с.304G>T (p.Glu102*) (13 хромосом), с.370C>T (p.Arg124*) (7 хромосом), с.272G>A (p.Arg91Gln) (4 хромосомы), с.11+5G>A (2 хромосомы). Первые два варианта выявлены в гомозиготном состоянии у четырех и двух пациентов соответственно, в компаунд-гетерозиготном состоянии оба варианта были обнаружены у одного пробанда.

Патогенные варианты в гене *USH2A* являются причиной синдрома Ашера (OMIM:276901) и пигментной дегенерации сетчатки 39-го типа (OMIM:613809). В исследовании у 27 пациентов (5.8% среди всех случаев АР НЗС) были выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *USH2A*. На 12 хромосомах был выявлен патогенный вариант с.11864G>A (p.Trp3955*) и на 6 хромосомах –с.13335_13347delinsCTTG (p.Glu4445_Ser4449delinsAspLeu) (у одного человека в гомозиготном состоянии). Оба патогенных варианта описаны у пациентов с пигментной дегенерацией сетчатки или синдромом Ашера [16]. Ген *USH2A* ответственен за проявление как синдромальной, так и несиндромальной наследственной патологии сетчатки, а также находки в этом гене по данным предыдущих исследований встречаются при изолированной потере

слуха [17], где вариант с.11864G>A (p.Trp3955*) также является частым. Так как у пациентов настоящего исследования предполагается изолированная форма патологии сетчатки, варианты в гене *USH2A* не были включены в системы для диагностики рецессивной патологии сетчатки.

В гене *CEP290*, варианты в котором встретились у 12 пациентов, самым частым вариантом был вариант, расположенный в глубокой интронной области с.2991+1655A>G, неоднократно описанный в литературе как патогенный, приводящий к нарушению механизма сплайсинга [18]. Данный вариант встретился на шести хромосомах в компаунд-гетерозиготном состоянии с LOF-вариантами с.289G>T (p.Glu97*), с.6119_6123delinsTATGTA (p.Thr2040Ilefs*4), с.2641G>T (p.Glu881*), с.7341_7344dup (p.Ser2449Thrfs*8), с.4405G>T (p.Glu1469*) и вариантом с.4661_4663del (p.Glu1554del). В гене *CRB1* биаллельные варианты были выявлены в 5.4% случаев, частыми вариантами были с.2480G>T (p.Gly827Val) (ранее не описанный в литературе) и с.2843G>A (p.Cys948Tyr), встретившиеся на 14 и 10 хромосомах соответственно. Вариант p.Gly827Val был выявлен в гомозиготном состоянии у четырех пациентов, вариант p.Cys948Tyr – у одного. У двух человек оба варианта встретились в компаунд-гетерозиготном состоянии. В гене *GUCY2D* патогенные варианты были выявлены у 11 пробандов, где один из них – с.2944+1del, описанный неоднократно как патогенный, встретился на 14 хромосомах (у четырех пациентов вариант выявлен в гомозиготном состоянии).

Таким образом, у российских пациентов с подозрением на наследственную патологию сетчатки с помощью панельного секвенирования удалось выявить частые гены, ответственные за аутомно-рецессивные формы дистрофий сетчатки, а также частые генетические варианты. Среди пациентов с АР НЗС (465 пациентов) на долю девяти генов (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) приходится 73.3% всех молекулярно подтвержденных случаев патологий сетчатки. Мы выявили 17 частых патогенных и вероятно патогенных вариантов в генах *ABCA4*, *CNGB3*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*, которые обнаруживаются на 38.5% хромосом с мутациями.

Для оптимизации первого этапа диагностики НЗС и проведения популяционных исследова-

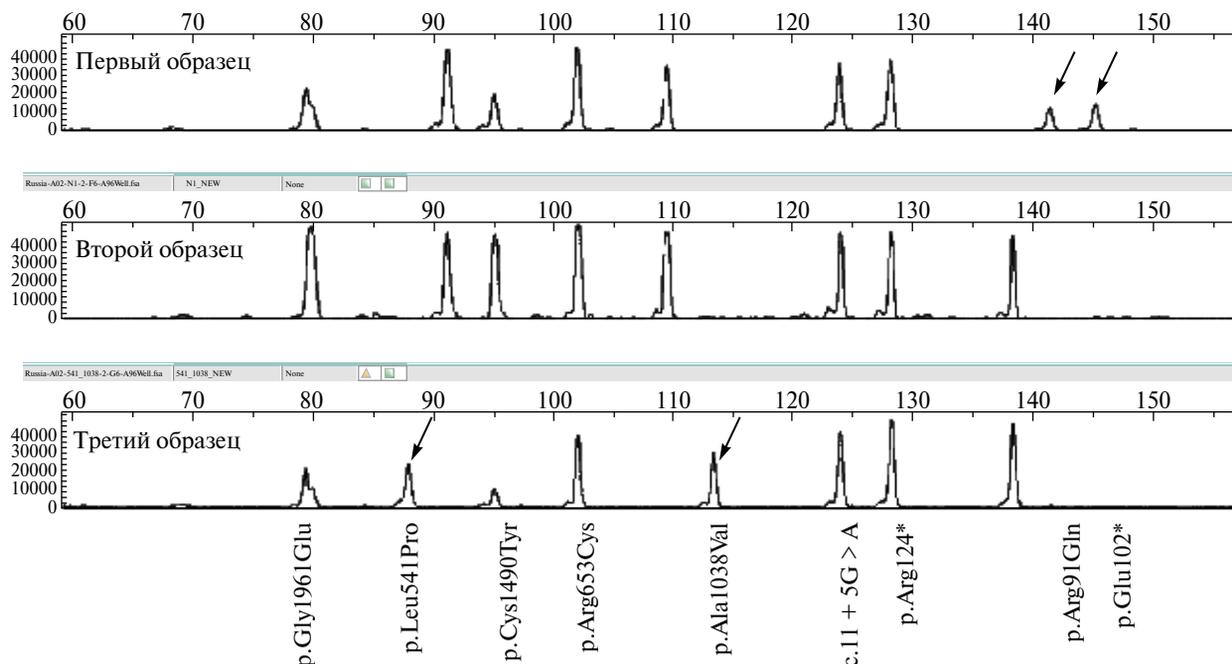


Рис. 1. Визуализация результатов фрагментарного анализа ПЦР-продуктов MLPA-систем детекции частых вариантов в генах *ABCA4* и *RPE65*. Первый образец: в гене *RPE65* обнаружены варианты p.Arg91Gln и p.Glu102* в гетерозиготном состоянии; второй образец – норма; третий образец: в гене *ABCA4* обнаружен комплексный аллель p.[Leu541Pro;Ala1038Val] в гомо-/гемизиготном состоянии.

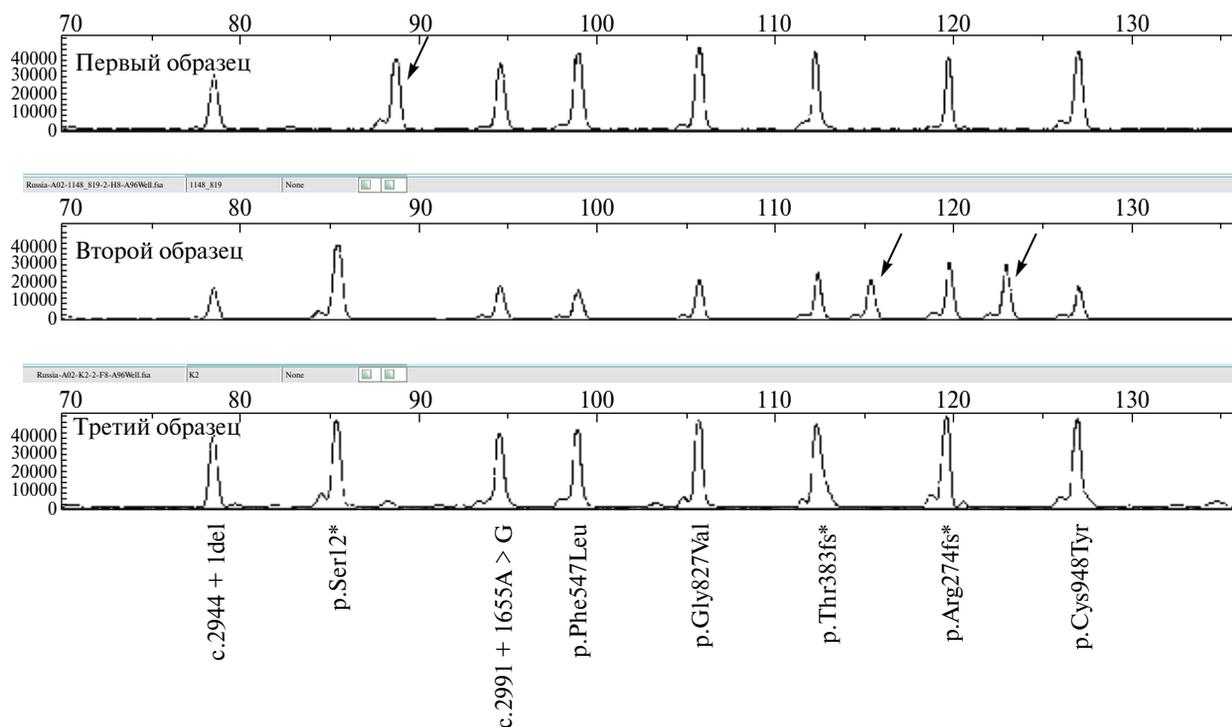


Рис. 2. Визуализация результатов фрагментарного анализа ПЦР-продуктов MLPA-систем детекции частых вариантов в генах *CNGB3*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D* и *PDE6H*. Первый образец: в гене *PDE6H* обнаружен вариант p.Ser12* в гомо-/гемизиготном состоянии; второй образец: в гене *CNGB3* обнаружены варианты p.Thr383Ilefs*13 и p.Arg274Valfs*13 в гетерозиготном состоянии; третий образец – норма.

ний были разработаны системы поиска данных вариантов на основе метода аллель-специфичной мультиплексной лигазной реакции с последующей амплификацией.

В первую молекулярно-генетическую систему вошли частые варианты в генах *ABCA4* (p.Leu541Pro, p.Ala1038Val, p.Gly1961Glu, p.Cys1490Tyr, p.Arg653Cys) и *RPE65* (p.Glu102*, p.Arg124*, p.Arg91Gln, c.11+5G>A) (рис. 1). Ретроспективный анализ показал, что для пациентов с подозрением на пигментную дегенерацию сетчатки/болезнь Штаргардта или ВАЛ данная система позволит установить причину болезни (выявить оба причинных варианта) у 34% пациентов с НЗС, обусловленной патогенными вариантами гена *ABCA4*, и у 34.6% пациентов с НЗС, обусловленной патогенными вариантами гена *RPE65*, т.е. у 14.2% пациентов с рецессивной патологией сетчатки причина болезни будет установлена на данном этапе обследования.

Так как на клиническом этапе исследования, как правило, удается дифференцировать ахроматопсию как отдельную форму патологии сетчатки – частые варианты в генах ахроматопсии были объединены во вторую молекулярно-генетическую систему. В систему вошли варианты: p.Thr383Ilefs*13 и p.Arg274Valfs*13 гена *CNGB3*, p.Phe547Leu гена *CNGA3* и p.Ser12* гена *PDE6H* (рис. 2). Также в систему включены частые варианты в генах, ответственных за амавроз Лебера/пигментную дегенерацию сетчатки: *CRB1* (p.Gly827Val, p.Cys948Tyr), *CEP290* (c.2991+1655A>G) и *GUCY2D* (c.2944+1del). Ретроспективный анализ показал, что для пациентов с подозрением на ахроматопсию данные системы позволят установить причину болезни (выявить оба причинных варианта в одном из трех генов) в 62.5% случаев. Для пациентов с подозрением на пигментную дегенерацию сетчатки или ВАЛ данные системы позволят установить причину болезни (выявить оба причинных варианта) у 36.4% пациентов с НЗС, обусловленным патогенными вариантами гена *GUCY2D* и у 28% пациентов с НЗС, связанным с геном *CRB1*, т.е. у 2.4% пациентов с АР НЗС причина болезни будет установлена на данном этапе обследования.

Согласно полученным данным информативность двух систем для диагностики аутосомно-рецессивных несиндромальных форм наследственных заболеваний сетчатки составляет 16.6%, информативность для всех форм несиндромальных заболеваний сетчатки превышает

7%. Для группы пациентов с ахроматопсией исследование с использованием одной из систем позволит установить диагноз в 62.5% случаев. Таким образом, для каждого 14-го пациента с НЗС и половины пациентов с ахроматопсией диагностика будет завершена уже на данном этапе обследования, что позволяет существенно сократить время и трудоемкость исследования.

С использованием данной системы проанализировано 40 образцов крови пациентов с входящими диагнозами “пигментная дегенерация сетчатки” и “болезнь Штаргардта”, которым ранее не проводилось исследование другими методами молекулярно-генетического анализа. У двух пациентов в гене *ABCA4* был выявлен патогенный вариант p.[Leu541Pro;Ala1038Val] в компаунд-гетерозиготном состоянии с вариантом p.Gly1961Glu или p.Arg653Cys. У пяти пациентов в гене *ABCA4* был выявлен вариант p.Gly1961Glu в гетерозиготном состоянии, варианты p.Arg653Cys и p.[Leu541Pro;Ala1038Val] в той же зиготности были выявлены по одному разу. Полученные данные подтверждают расчетную информативность разработанных диагностических систем.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании у 465 (72%) российских пациентов были выявлены биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в генах аутосомно-рецессивных НЗС, где мутации в девяти генах (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) являются наиболее частой причиной наследственных заболеваний сетчатки, таких как болезни Штаргардта, ахроматопсии, амавроза Лебера, пигментной дегенерации сетчатки.

У российских пациентов самой частой причиной наследственной патологии сетчатки являются биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *ABCA4* (36.1%), мутации в котором приводят к болезни Штаргардта (OMIM:248200), колбочко-палочковой дистрофии (OMIM:604116) и пигментной дегенерации сетчатки (OMIM:601718). Значительная доля молекулярно подтвержденных случаев приходится на гены ахроматопсии: *CNGB3* (11.2%), патогенные варианты в котором являются частой причиной ахроматопсии 3-го типа (OMIM:262300), *CNGA3* (3.4%) и *PDE6H* (0.9%), ответственные за ахроматопсию 2-го (OMIM:216900) и 6-го (OMIM:610024) типа соответственно. На ген

USH2A, мутации в котором могут приводить как к изолированной патологии сетчатки, так и к синдромальной форме с нарушением слуха (синдром Ашера), приходится 5.8% случаев среди всех форм НЗС. Для других генов, мутации в которых могут приводить к амаврозу Лебера/пигментной дегенерации сетчатки, наблюдается следующее распределение частот: биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *RPE65* были выявлены в 5.6% случаев, в гене *CRB1* – 5.4%, в гене *CEP290* – 2.6%, в гене *GUCY2D* – 2.4%.

По литературным данным спектр генов, ответственных за АР НЗС, различается в разных странах, как и спектры и аллельные частоты патогенных вариантов нуклеотидной последовательности. Так, в исследовании испанской когорты пациентов с подозрением на наследственную патологию сетчатки наибольшее число молекулярно подтвержденных случаев приходится на гены *USH2A* (21.2%), *CRB1* (7%), *ABCA4* (7%), *CERKL* (5.2%), *EYS* (5.2%) [6]. Наиболее частым патогенным вариантом в гене *CERKL* у испанских пациентов был нонсенс-вариант с.847C>T (р.Arg283*) (91% мутантных аллелей гена). Вариант с.375C>G (р.Cys125Trp) встретился на 72% мутантных аллелей гена *CERKL* у пациентов из Финляндии, у которых патогенные варианты в гене *CERKL* (22%) являются самой частой причиной наследственной дистрофии сетчатки [19]. У российских пациентов биаллельные патогенные варианты в гене *CERKL* встретились лишь у пяти человек.

В литературе описаны патогенные “специфичные для дистрофии сетчатки” варианты в гене *USH2A* у пациентов без нарушения слуха в раннем детстве, однако в различных популяциях наблюдается свой спектр таких вариантов и не для каждого из них эта связь может быть точно установлена [20]. В исследовании у российских пациентов в гене *USH2A* были выявлены два частых варианта с.11864G>A (р.Trp3955*) и с.13335_13347delinsCTTG (р.Glu4445_Ser4449delinsAspLeu), описанных в литературе как при пигментном ретините, так и при синдроме Ашера. На 12 хромосомах был выявлен патогенный вариант р.Trp3955*, впервые описанный у нидерландских пациентов с синдромом Ашера [21]. По данным отечественных публикаций на долю данного варианта приходится половина мутантных аллелей гена *USH2A* у пациентов с подозрением на несиндромальную потерю слуха [17], тогда как у пациентов с подозрением на синдром Ашера данный вариант был выявлен на 30%

мутантных аллелей [22]. Вторым частым вариантом в гене *USH2A* – р.Glu4445_Ser4449delinsAspLeu встретился на шести хромосомах (у одного человека в гомозиготном состоянии). В гене *USH2A* у пациентов с наследственной ретинальной дистрофией из Италии частыми вариантами были с.2276G>T (р.Cys759Phe) (26%) [16], у пациентов из Восточной Азии частыми вариантами был с.8254G>A(р.Gly2752Arg) (14.1%) и с.2802T>G (р.Cys934Trp) (32.6%), где только последний встретился на трех хромосомах россиян.

У китайских пациентов самым частым геном, ответственным за АР НЗС, был также ген *USH2A* (18%), однако вторым наиболее распространенным геном был *CYP4V2* (15%) [7], ответственный за развитие кристаллической корнеоретинальной дистрофии Биетти (ОМIM:210370). Пациенты с данным заболеванием были зарегистрированы по всему миру, однако в странах Восточной Азии, особенно в Китае, таких пациентов значительно больше [23]. У российских пациентов биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *CYP4V2* не были обнаружены.

Другими частыми генами НЗС у китайских пациентов были *EYS* (7%), *ABCA4* (3%) и *CRB1* (3%), тогда как у японских пациентов с подозрением на дистрофию сетчатки на ген *EYS* приходится наибольшая доля молекулярно подтвержденных случаев (44.9%), где варианты с.4957dup(р.Ser1653Lysfs*2) (46.8%) и с.8805C>A (р.Tyr2935*) (21.3%) являются мажорными [8]. У японских пациентов биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в генах *USH2A* (18.8%), *RPIL1* (6.9%) и *PDE6B* (6.1%) также являются частой причиной НЗС. В нашем исследовании биаллельные патогенные варианты в гене *PDE6B* были выявлены у одного пробанда, в гене *RPIL1* таких вариантов не было обнаружено.

В исследовании большой израильской когорты пациентов с подозрением на НЗС были также установлены частые гены АР НЗС: *ABCA4* (14%), *USH2A* (7%), *FAM161A* (6%), *CNGA3* (5%) и *EYS* (4%) [3]. У немецких пациентов с подозрением на НЗС наиболее распространенным геном был *ABCA4*, где патогенные варианты были обнаружены в 10.4% случаев, за ним следуют гены *USH2A* (8.4%), *EYS* (2.5%), *CNGB3* (2.3%) и *CRB1* (1.9%)[4].

Если сравнить спектр генетических вариантов в гене *ABCA4* у российских пациентов с мировыми выборками, то наблюдается схожая картина с европейскими данными по двум са-

мым частым вариантам p.[Leu541Pro;Ala1038Val] и p.Gly1961Glu пациентов из Германии [24]. У польских пациентов на долю комплексного аллеля p.[Leu541Pro;Ala1038Val] приходится 33.7% мутантных аллелей, у венгерских – 14% [25], у российских пациентов эта частота составила 3.,3%. Вариант в гене *ABCA4* с.5882G>A (p.Gly1961Glu) также был обнаружен у словенских, итальянских, голландских, испанских пациентов с частотой аллеля от 6.5 до 21%. У российских пациентов данный вариант встретился с аллельной частотой 8.6%. Вариант с.4469G>A (p.Cys1490Tyr), встретившийся на 3.9% мутантных аллелей в российской выборке, наиболее распространен был у южноафриканских пациентов (14.9%) [26]. Вариант с.1957C>T (p.Arg653Cys) ранее был описан у пациентов из Великобритании [27], где встретился на 0.71% хромосом с мутациями, и у пациентов из Германии (0.44%) (в российской выборке частота аллеля составила 2.1%). В испанской популяции мажорной мутацией в гене *ABCA4* является с.3386G>T (p.Arg1129Leu) (24%) [28], которая у российских пациентов в данном исследовании не встретилась.

Патогенные и вероятно патогенные варианты в генах *CNGA3*, *CNGB3*, *GNAT2*, *PDE6C*, *PDE6H* описаны у пациентов с ахроматопсией и колбочковой дистрофией [29]. Около 90% случаев ахроматопсий связаны с мутациями в двух генах *CNGA3* и *CNGB3*, которые кодируют альфа- и бета-субъединицы гетеротетрамерного циклического нуклеотид-управляемого (cyclic nucleotide-gated channels, CNG) канала, участие которого необходимо в процессах фототрансдукции. Варианты в гене *CNGB3* являются более распространенной причиной ахроматопсий в Европе и США (на долю *CNGB3* приходится более 50%) [30], тогда как мутации в гене *CNGA3* наиболее распространены на Ближнем Востоке и в Китае (более 80%) [31]. По данным европейских исследований на долю вариантов с.1148del и с.819_826del в гене *CNGB3* приходится около 70 и 4.5% всех мутантных аллелей гена соответственно, причем первый вариант встретился в половине случаев в гомозиготном состоянии [32]. У российских пациентов гомозиготный вариант с.1148del также встретился в 50% случаях, а на долю второго варианта с.819_826del приходится 13.5% мутантных аллелей гена. В гене *CNGA3* патогенный вариант с.1641C>A (p.Phe547Leu) встречается на 10% мутантных европейских аллелей [33], тогда как в российской выборке данный вариант встретился на 25%

аллелях. Описано, что миссенс-варианты гена *CNGA3*, влияющие на аминокислотные остатки p.Arg277 и p.Arg283, были распространены среди европейцев, тогда как варианты, влияющие на p.Val529, были распространены среди азиатов [31]. У российских пациентов в гене *CNGA3* вариант с.829C>T (p.Arg277Cys) был выявлен на двух хромосомах, как и вариант с.847C>T (p.Arg283Trp), тогда как варианты с.830G>A (p.Arg277His), с.848G>A (p.Arg283Gln) затрагивали по одной хромосоме. Перечисленные варианты описаны неоднократно как патогенные у пациентов с ахроматопсией. Следует отметить, что большинство патогенных вариантов в гене *CNGB3* приходится на нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания или мутации сайта-сплайсинга. Напротив, большинство патогенных вариантов в гене *CNGA3* представляют собой миссенс-замены, затрагивающие только отдельные аминокислотные остатки белка [29].

Незначительная доля молекулярно подтвержденных случаев приходится на ген *PDE6H* (0.9%). На сегодняшний день в гене *PDE6H*, ссылаясь на базу данных The Human Gene Mutation Database (HGMD®2022.1), описан лишь один патогенный вариант с.35C>G (p.Ser12*), выявленный у четырех человек данного исследования в гомозиготном состоянии. В своей публикации S. Kohl с соавт. подтвердили гипотезу о том, что данная нонсенс-замена является результатом общего наследственного мутационного события в голландской и бельгийской семьях [34]. Вариант p.Ser12* также встречался у пациентов из Норвегии [35] и Пакистана [36]. В других генах ахроматопсии (*GNAT2*, *PDE6C*) у российских пациентов биаллельные патогенные варианты не были выявлены.

Врожденный амавроз Лебера представляет собой генетически гетерогенную группу НЗС преимущественно с аутосомно-рецессивным типом наследования, причина которого обусловлена мутациями более чем в 20 генах. Патогенные варианты в четырех генах – *RPE65* (5.6%), *CRB1* (5.4%), *CEP290* (2.6%) и *GUCY2D* (2.4%) являются частой причиной ВАЛ у российских пациентов.

Мутации в гене *RPE65* приводят к развитию врожденного амавроза Лебера 2-го типа (ОМIM:204100) и тяжелой дистрофии сетчатки с ранним началом (ОМIM:613794). По литературным данным доля *RPE65*-ретинопатий среди пациентов с НЗС в регионах Европы и

Америки составляла от 3% в США и Испании до 9.98% в Нидерландах [37, 38], что согласуется с полученными данными в российской когорте пациентов (5.6%). У российских пациентов в гене *RPE65* выявлены частые патогенные варианты p.Glu102* (25%), p.Arg124* (13.5%), p.Arg91Gln (7.7%) и c.11+5G>A (3.8%). Если сравнить спектр мутаций в гене *RPE65* с другими странами, то у итальянцев самым частым вариантом был c.292_311del (p.Ile98Hisfs*26) (частота аллеля 11%), не встретившийся ни разу в российской выборке, тогда как на варианты p.Arg91Gln, p.Arg124* и c.11+5G>A приходится по 4% мутантных аллелей [37]. В немецкой когорте пациентов частым вариантом в гене *RPE65* был c.1451G>Tp.Gly484Val (33.3%) [39], обнаруженный всего лишь на одной хромосоме россиянина. Стоит отметить, что в российской выборке вариант c.304G>T (p.Glu102*) встретился на 25% мутантных аллелей, и ни в одной популяционной когорте пациентов не зафиксирована столь высокая частота данного патогенного аллеля. Впервые вариант описан S.R. Dharmaraj с соавт. в 2000 г. у американских пациентов с ВАЛ [40].

Другими частыми генами, ответственными за проявление ВАЛ, являются гены *GUCY2D*, *CRB1*, *CEP290*. Так, в китайской когорте пациентов с подозрением на ВАЛ на долю мутаций в этих генах приходится 10, 7, 4% всех молекулярно подтвержденных случаев соответственно [41]. В немецкой же выборке пациентов на долю мутаций в генах *CEP290* и *CRB1* приходится по 21% [39], а у польских пациентов 37 и 16% соответственно [42]. *CRB1* является основным геном, ответственным за ВАЛ в испанской популяции (70% мутантных аллелей), за ним следуют гены *RPGRIP1* (20%), *AIPL1* (5%), *RPE65* (5%) [43]. У австралийских пациентов патогенные варианты в генах *CEP290* (19.2%), *GUCY2D* (19.2%), *RPE65* (7.7%), *TULP1* (7.7%), *CRB1* (7.7%) являются частой причиной ВАЛ [44].

В гене *CEP290*, ответственном за развитие врожденного амавроза Лебера 10-го типа (OMIM:611755) и заболеваний из группы цилиопатий, патогенный вариант c.2991+1655A>G, который вызывает вставку дополнительного псевдоэкзона в мРНК *CEP290* из-за активации сильного донорного сайта сплайсинга, что приводит к образованию преждевременного стоп-кодона (p.Cys998*), является частым в российской популяции (частота аллеля 25%), а также в популяции Северной Европы (49%) [45], тогда как значительно менее распространен в

Южной Европе (6%) [46] и отсутствовал у корейских и индийских пациентов [47, 48]. Остальные варианты в гене *CEP290* встретились по одному разу в исследуемой выборке.

Мутации в гене *CRB1* в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии описаны у пациентов с амаврозом Лебера 8-го типа (OMIM:613835) и пигментной дегенерацией сетчатки 12-го типа (OMIM:600105). В исследовании на большой немецкой когорте пациентов наиболее частым патогенным вариантом в гене *CRB1* был c.2843G>A (p.Cys948Tyr), который составлял 22% патогенных аллелей, приводящий к тяжелому фенотипу пациентов [39]. Этот же вариант также является частым у пациентов с ВАЛ из Испании (31%) [49] и у российских пациентов (20%). Вариант c.2480G>T (p.Gly827Val) (частота аллеля 28%), ранее не описанный в литературе, встретился в гомозиготном состоянии у четырех пациентов российской выборки. Данная нуклеотидная замена расположена в “горячем” экзоне гена *CRB1*. Экзон 7 кодирует второй G-подобный домен ламинина А, являющийся особенно важным для функционирования белка CRB1 [50]. В этом же положении белка также описан как патогенный вариант c.2480G>A, приводящий к замене на другую аминокислоту p.(Gly827Glu)[51]. Таким образом, данный вариант был расценен нами как вероятно патогенный.

В гене *GUCY2D* патогенный вариант c.2944+1del, находящийся в области донорного сайта сплайсинга, впервые упоминается в публикации S. Hanein с соавт. в 2002 г., где авторы установили финское происхождение выявленного варианта [52]. Данный вариант был выявлен в компаунд-гетерозиготном состоянии у шести человек российской выборки, в гомозиготном – у четырех пациентов (суммарная частота аллеля составила 63.6%). Наиболее распространенным вариантом в гене *GUCY2D* у пациентов с ВАЛ из Великобритании был c.307G>A (p.Glu103Lys), встретившийся на 11.9% мутантных аллелей [53], отсутствующий на хромосомах российских пациентов, тогда как финский вариант сплайсинга встретился у британцев лишь на одной хромосоме. У польских пациентов на долю мутаций в гене *GUCY2D* приходится 14% молекулярно подтвержденных случаев ВАЛ, где вариант c.2302C>T (p.Arg768Trp) был частым, встретившимся в трех из семи неродственных семей [42], только у одного пациента из России данный вариант встретился в гомозиготном состо-

янии. Биаллельные патогенные варианты в гене *GUCY2D* описаны у пациентов с врожденным амаврозом Лебера 1-го типа (OMIM:204000), врожденной стационарной ночной слепотой типа II (OMIM:618555) и колбочко-палочковой дистрофией 6-го типа (OMIM:601777).

Таким образом, настоящее исследование впервые дает подробную генетическую характеристику российской когорты пациентов с подозрением на наследственную патологию сетчатки. На аутосомно-рецессивные формы НЗС приходится значительная доля молекулярно подтвержденных случаев дистрофий сетчатки (72%), где на биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в девяти генах (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) приходится 73.3% всех подтвержденных случаев. Результаты исследования показали, что спектр наиболее частых форм НЗС у российских пациентов схож с европейским. Однако стоит отметить, что частые варианты с.304G>T (p.Glu102*) в гене *RPE65* и с.2480G>T (p.Gly827Val) в гене *CRB1* (ранее не описанный в литературе), а также комплексный аллель в гене *ABCA4* p.[Leu541Pro;Ala1038Val] были зафиксированы у российских пациентов с наибольшей частотой по сравнению с другими популяционными исследованиями, что свидетельствует в пользу этнического разнообразия частых патогенных вариантов в генах НЗС.

17 патогенных и вероятно патогенных вариантов в восьми генах (*ABCA4*, *CNGB3*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) были включены в разработанные диагностические системы детекции частых вариантов АР НЗС, которые могут быть использованы для диагностики наследственных патологий сетчатки у российских пациентов на начальном этапе, где преимуществом данных систем являются дешевизна и относительно короткие сроки проведения анализа, не сопоставимые с массовым параллельным секвенированием.

Работа выполнена в рамках Государственного бюджетного финансирования.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ “Медико-генетический научный центр” (протокол № 2021-3 от 12.03.2021).

Письменное информированное согласие было получено от законных представителей всех пациентов в возрасте до 18 лет. Было получено письменное информированное согласие от пациентов старше 18 лет.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanany M., Rivolta C., Sharon D. Worldwide carrier frequency and genetic prevalence of autosomal recessive inherited retinal diseases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. № 5. P. 2710–2716. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913179117>
2. Jespersgaard C., Fang M., Bertelsen M. et al. Molecular genetic analysis using targeted NGS analysis of 677 individuals with retinal dystrophy // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1219. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38007-2>
3. Sharon D., Ben-Yosef T., Goldenberg-Cohen N. et al. A nationwide genetic analysis of inherited retinal diseases in Israel as assessed by the Israeli inherited retinal disease consortium (IIRDC) // Hum. Mutat. 2020. V. 41. № 1. P. 140–149. <https://doi.org/10.1002/humu.23903>
4. Weisschuh N., Obermaier C.D., Battke F. et al. Genetic architecture of inherited retinal degeneration in Germany: A large cohort study from a single diagnostic center over a 9-year period // Hum. Mutat. 2020. V. 41. № 9. P. 1514–1527. <https://doi.org/10.1002/humu.24064>
5. Rivolta C., Sharon D., DeAngelis M.M., Dryja T.P. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns // Hum. Mol. Genet. 2002. V. 11. № 10. P. 1219–1227. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.10.1219>
6. Martin-Merida I., Avila-Fernandez A., Del Pozo-Valero M. et al. Genomic landscape of sporadic retinitis pigmentosa: Findings from 877 Spanish cases // Ophthalmology. 2019. V. 126. № 8. P. 1181–1188. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.03.018>
7. Gao F.J., Li J.K., Chen H. et al. Genetic and clinical findings in a large cohort of Chinese patients with suspected retinitis pigmentosa // Ophthalmology. 2019. V. 126. № 11. P. 1549–1556. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.04.038>
8. Koyanagi Y., Akiyama M., Nishiguchi K.M. et al. Genetic characteristics of retinitis pigmentosa in 1204 Japanese patients // J. Med. Genet. 2019. V. 56. № 10. P. 662–670.

- <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105691>
9. Avela K., Salonen-Kajander R., Laitinen A. et al. The genetic aetiology of retinal degeneration in children in Finland – new founder mutations identified // *Acta Ophthalmol.* 2019. V. 97. № 8. P. 805–814. <https://doi.org/10.1111/aos.14128>
 10. Jaakson K., Zernant J., Klm M. et al. Genotyping microarray (gene chip) for the *ABCR (ABCA4)* gene // *Hum. Mutat.* 2003. V. 22. № 5. P. 395–403. <https://doi.org/10.1002/humu.10263>
 11. Степанова А.А., Кадышев В.В., Шагина О.А., Поляков А.В. Селективный скрининг больных наследственными дегенерациями сетчатки для выявления целевой группы для генотерапии воретигеном непарвовекком // *Медицинская генетика.* 2022. Т. 21. № 10. С. 51–55. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.10.51-55>.
 12. Zhong Z., Rong F., Dai Y. et al. Seven novel variants expand the spectrum of *RPE65*-related Leber congenital amaurosis in the Chinese population // *Mol. Vis.* 2019. V. 25. P. 204–214.
 13. Вассерман Н.Н., Шагина О.А., Поляков А.В. Результаты использования новой медицинской технологии “Система детекции наиболее частых мутаций гена *FGFR3*, ответственного за ахондроплазию и гипохондроплазию” в ДНК-диагностике // *Мед. генетика.* 2016. Т. 15. № 2. С. 37–41.
 14. Гундорова П., Степанова А.А., Шагина О.А., Поляков А.В. Результаты использования новых медицинских технологий “Детекция основных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции” и “Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции” в ДНК-диагностике фенилкетонурии // *Мед. генетика.* 2016. Т. 15. № 2. С. 29–36.
 15. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // *Мед. генетика.* 2019. Т. 18. № 2. С. 3–23. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
 16. Colombo L., Maltese P.E., Castori M. et al. Molecular epidemiology in 591 Italian probands with nonsyndromic retinitis pigmentosa and Usher syndrome // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2021. V. 62. № 2. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.2.13>
 17. Shatokhina O., Galeeva N., Stepanova A. et al. Spectrum of genes for non-*GJB2*-related non-syndromic hearing loss in the Russian population revealed by a targeted deafness gene panel // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 24. P. 15748. <https://doi.org/10.3390/ijms232415748>
 18. den Hollander A.I., Koenekoop R.K., Yzer S. et al. Mutations in the *CEP290 (NPHP6)* gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis // *Am. J. Hum. Genet.* 2006. V. 79. № 3. P. 556–561. <https://doi.org/10.1086/507318>
 19. Avela K., Sankila E.M., Seitsonen S. et al. A founder mutation in *CERKL* is a major cause of retinal dystrophy in Finland // *Acta Ophthalmol.* 2018. V. 96. № 2. P. 183–191. <https://doi.org/10.1111/aos.13551>
 20. Lenassi E., Vincent A., Li Z. et al. A detailed clinical and molecular survey of subjects with nonsyndromic *USH2A* retinopathy reveals an allelic hierarchy of disease-causing variants // *Eur. J. Hum. Genet.* 2015. V. 23. № 10. P. 1318–1327. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.283>
 21. van Wijk E., Pennings R.J., teBrinke H. et al. Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (*USH2A*) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. № 4. P. 738–744. <https://doi.org/10.1086/383096>
 22. Ivanova M.E., Trubilin V.N., Atarshchikov D.S. et al. Genetic screening of Russian Usher syndrome patients toward selection for gene therapy // *Ophthalmic Genet.* 2018. V. 39. № 6. P. 706–713. <https://doi.org/10.1080/13816810.2018.1532527>
 23. Nakamura M., Lin J., Nishiguchi K. et al. Bietti crystal-line corneoretinal dystrophy associated with *CYP4V2* gene mutations // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006. V. 572. P. 49–53. https://doi.org/10.1007/0-387-32442-9_8
 24. Rivera A., White K., Sthr H. et al. A comprehensive survey of sequence variation in the *ABCA4 (ABCR)* gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. № 4. P. 800–813. <https://doi.org/10.1086/303090>
 25. Ścieżżyńska A., Oziębło D., Ambroziak A.M. et al. Next-generation sequencing of *ABCA4*: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe // *Exp. Eye Res.* 2016. V. 145. P. 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.11.011>
 26. Roberts L.J., Nossek C.A., Greenberg L.J., Ramesar R.S. Stargardt macular dystrophy: Common *ABCA4* mutations in South Africa-establishment of a rapid genetic test and relating risk to patients // *Mol. Vis.* 2012. V. 18. P. 280–289.
 27. Fujinami K., Sergouniotis P.I., Davidson A.E. et al. Clinical and molecular analysis of Stargardt disease with preserved foveal structure and function // *Am. J. Ophthalmol.* 2013. V. 156. № 3. P. 487–501. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2013.05.003>
 28. Valverde D., Riveiro-Alvarez R., Bernal S. et al. Microarray-based mutation analysis of the *ABCA4* gene in Spanish patients with Stargardt disease: Evidence of a prevalent mutated allele // *Mol. Vis.* 2006. V. 12.

- P. 902–908.
29. Hirji N., Aboshiha J., Georgiou M. et al. Achromatopsia: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options // *Ophthalmic Genet.* 2018. V. 39. № 2. P. 149–157.
<https://doi.org/10.1080/13816810.2017.1418389>
 30. Kohl S., Varsanyi B., Antunes G.A. et al. *CNGB3* mutations account for 50% of all cases with autosomal recessive achromatopsia // *Eur. J. Hum. Genet.* 2005. V. 13. № 3. P. 302–308.
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201269>
 31. Sun W., Li S., Xiao X., et al. Genotypes and phenotypes of genes associated with achromatopsia: A reference for clinical genetic testing // *Mol. Vis.* 2020. V. 26. P. 588–602.
 32. Mayer A.K., Van Cauwenbergh C., Rother C. et al. *CNGB3* mutation spectrum including copy number variations in 552 achromatopsia patients // *Hum. Mutat.* 2017. V. 38. № 11. P. 1579–1591.
<https://doi.org/10.1002/humu.23311>
 33. Wissinger B., Gamer D., Jägle H. et al. *CNGA3* mutations in hereditary cone photoreceptor disorders // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 69. № 4. P. 722–737.
<https://doi.org/10.1086/323613>
 34. Kohl S., Coppieters F., Meire F. et al. A nonsense mutation in *PDE6H* causes autosomal-recessive incomplete achromatopsia // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. V. 91. № 3. P. 527–532.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.07.006>
 35. Holtan J.P., Selmer K.K., Heimdal K.R., Bragadóttir R. Inherited retinal disease in Norway – a characterization of current clinical and genetic knowledge // *Acta Ophthalmol.* 2020. V. 98. № 3. P. 286–295.
<https://doi.org/10.1111/aos.14218>
 36. Pedurupillay C.R., Landsend E.C., Vigeland M.D. et al. Segregation of incomplete achromatopsia and alopecia due to *PDE6H* and *LPAR6* variants in a consanguineous family from Pakistan // *Genes (Basel)*. 2016. V. 7. № 8. <https://doi.org/10.3390/genes7080041>
 37. Lopez-Rodriguez R., Lantero E., Blanco-Kelly F. et al. *RPE65*-related retinal dystrophy: Mutational and phenotypic spectrum in 45 affected patients // *Exp. Eye Res.* 2021. V. 212.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108761>
 38. Sallum J.M.F., Kaur V.P., Shaikh J. et al. Epidemiology of Mutations in the 65-kDa Retinal Pigment Epithelium (*RPE65*) Gene-Mediated Inherited Retinal Dystrophies: A Systematic Literature Review // *Adv. Ther.* 2022. V. 39. № 3. P. 1179–1198.
<https://doi.org/10.1007/s12325-021-02036-7>
 39. Zobor D., Brühwiler B., Zrenner E. et al. Genetic and clinical profile of retinopathies due to disease-causing variants in Leber congenital amaurosis (LCA)-associated genes in a large German cohort // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 10.
<https://doi.org/10.3390/ijms24108915>
 40. Dharmaraj S.R., Silva E.R., Pina A.L. et al. Mutation-al analysis and clinical correlation in Leber congenital amaurosis // *Ophthalmic Genet.* 2000. V. 21. № 3 P. 135–150.
[https://doi.org/10.1076/1381-6810\(200009\)2131-ZFT135](https://doi.org/10.1076/1381-6810(200009)2131-ZFT135)
 41. Chen Y., Zhang Q., Shen T. et al. Comprehensive mutation analysis by whole-exome sequencing in 41 Chinese families with Leber congenital amaurosis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013. V. 54. № 6. P. 4351–4357.
<https://doi.org/10.1167/iovs.13-11606>
 42. Skorczyk-Werner A., Sowińska-Seidler A., Wawrocka A. et al. Molecular background of Leber congenital amaurosis in a Polish cohort of patients—novel variants discovered by NGS // *J. Appl. Genet.* 2023. V. 64. № 1. P. 89–104.
<https://doi.org/10.1007/s13353-022-00733-9>
 43. Vallespin E., Cantalapiedra D., Riveiro-Alvarez R. et al. Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. № 12. P. 5653–5661.
<https://doi.org/10.1167/iovs.07-0007>
 44. Thompson J.A., De Roach J.N., McLaren T.L. et al. The genetic profile of Leber congenital amaurosis in an Australian cohort // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2017. V. 5. № 6. P. 652–667.
<https://doi.org/10.1002/mgg3.321>
 45. Coppieters F., Casteels I., Meire F. et al. Genetic screening of LCA in Belgium: Predominance of *CEP290* and identification of potential modifier alleles in *AH11* of *CEP290*-related phenotypes // *Hum. Mutat.* 2010. V. 31. № 10. P. E1709–1766.
<https://doi.org/10.1002/humu.21336>
 46. Vallespin E., Lopez-Martinez M.A., Cantalapiedra D. et al. Frequency of *CEP290* c.2991_1655A>G mutation in 175 Spanish families affected with Leber congenital amaurosis and early-onset retinitis pigmentosa // *Mol. Vis.* 2007. V. 13. P. 2160–2162.
 47. Sundaresan P., Vijayalakshmi P., Thompson S. et al. Mutations that are a common cause of Leber congenital amaurosis in northern America are rare in southern India // *Mol. Vis.* 2009. V. 15. P. 1781–1787.
 48. Seong M.W., Kim S.Y., Yu Y.S. et al. Molecular characterization of Leber congenital amaurosis in Koreans // *Mol. Vis.* 2008. V. 14. P. 1429–1436.
 49. Corton M., Tatu S.D., Avila-Fernandez A. et al. High frequency of *CRB1* mutations as cause of Early-Onset Retinal Dystrophies in the Spanish population // *Orphanet J. Rare Dis.* 2013. V. 8.
<https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-20>
 50. Bujakowska K., Audo I., Mohand-Saïd S. et al. *CRB1* mutations in inherited retinal dystrophies // *Hum. Mutat.* 2012. V. 33. № 2. P. 306–315.
<https://doi.org/10.1002/humu.21653>
 51. Huang X.F., Huang F., Wu K.C. et al. Genotype–phe-

- notype correlation and mutation spectrum in a large cohort of patients with inherited retinal dystrophy revealed by next-generation sequencing // *Genet. Med.* 2015. V. 17. № 4. P. 271–278.
<https://doi.org/10.1038/gim.2014.138>
52. Hanein S., Perrault I., Olsen P. et al. Evidence of a founder effect for the *RETGC1* (*GUCY2D*) 2943DelG mutation in Leber congenital amaurosis pedigrees of Finnish origin // *Hum. Mutat.* 2002. V. 20. № 4. P. 322–323. <https://doi.org/10.1002/humu.9067>
53. Bouzia Z., Georgiou M., Hull S. et al. *GUCY2D*-associated Leber congenital amaurosis: A retrospective natural history study in preparation for trials of novel therapies // *Am. J. Ophthalmol.* 2020. V. 210. P. 59–70.
<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2019.10.019>

Frequent Genetic Variants of Autosomal Recessive Non-Syndromic Forms of Inherited Retinal Diseases in the Russian Federation

N. Yu. Ogorodova^{1,*}, A. A. Stepanova¹, O. A. Shchagina¹, V. V. Kadyshev¹, A. V. Polyakov¹

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

*e-mail: ogorodova@med-gen.ru

Inherited retinal diseases (IRDs) are a clinically heterogeneous group of retinal pathologies associated with vision loss due to dysfunction or degeneration of photoreceptor and retinal pigment epithelium. Autosomal recessive forms of IRDs account for more than 55% of all diseases in this group on average worldwide. This study presents data on frequent pathogenic and likely pathogenic variants in recessive IRDs genes obtained from a retrospective analysis of high-throughput sequencing data from a large Russian cohort of patients with suspected hereditary non-syndromic retinal pathology. Data from 1470 unrelated patients were analyzed. Pathogenic and likely pathogenic variants were identified in the zygosity required for the development of the disease in 643 patients (43.74%). It was found that 9 genes (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) account for 73.3% of all molecularly confirmed cases of IRDs in Russian patients. An analysis of the spectrum of nucleotide variants of these genes was carried out, and 17 variants were identified that occur with an allelic frequency of more than 1% for each gene. In light of obtained data, the diagnostic systems based on the multiplex ligation-dependent probe amplification reaction (MLPA) were developed. The informativity of the two systems for diagnosing autosomal recessive non-syndromic forms of inherited retinal diseases is 16.4%, the informativity for all forms of non-syndromic retinal diseases exceeds 7%. For a group of patients with achromatopsia, a study using one of the systems will make it possible to establish a diagnosis in 62.5% of cases.

Keywords: inherited retinal diseases, frequent recessive variants, achromatopsia, Leber congenital amaurosis, Stargardt disease.

УДК 575.174.015.3

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ВЫБОРКЕ БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ И ТУБЕРКУЛЕЗОМ ИЗ СТРАН ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ И ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ

© 2024 г. С. А. Саламайкина^{1,2,*}, В. И. Корчагин¹, К. О. Миронов¹, Е. И. Кулабухова^{1,3},
В. Н. Зимина⁴, А. В. Кравченко¹

¹Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, 111123 Россия

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Московская область,
Долгопрудный, 141701 Россия

³Российский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия

⁴Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, 650056 Россия

*e-mail: salamaykina@cmd.su

Поступила в редакцию 06.10.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 24.11.2023 г.

Полиморфные варианты генов иммунного ответа могут быть ассоциированы с особенностями реакции организма на инфекционные агенты и вносят вклад в генетическое разнообразие популяций человека. В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов Толл-подобных рецепторов *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* и *TLR8* в выборках пациентов с ВИЧ и туберкулезом, проживающих на территории стран Восточной Европы и Центральной Азии. В исследование включено 680 неродственных индивидов из восточнославянской ($n = 308$), армянской ($n = 137$), таджикской ($n = 138$) и киргизской ($n = 97$) выборок пациентов с установленными диагнозами ВИЧ и туберкулез. Для сравнения использованы данные международного проекта 1000 Genomes – выборки европеоидов (EUR) и представителей стран Восточной (EAS) и Южной (SAS) Азии. Обнаружено, что, несмотря на низкий уровень генетического разнообразия и межпопуляционных различий по частотам аллелей анализируемых генов, исследуемые выборки тем не менее различались по ряду локусов между собой и отличались как от популяций европеоидов, так и от жителей стран Восточной и Южной Азии.

Ключевые слова: гены иммунного ответа, Толл-подобные рецепторы, однонуклеотидный полиморфизм, популяции человека, ВИЧ, туберкулез.

DOI: 10.31857/S0016675824040071 **EDN:** CRDRPP

Лавинообразное накопление результатов ассоциативных исследований, подтверждающих или опровергающих наличие связей полиморфных вариантов генов с заболеваниями абсолютно разной этиологии на выборках из разных стран и этнических групп, диктует необходимость валидации найденных ассоциаций на независимых выборках, поскольку на распределение аллелей риска могут влиять факторы, не учтенные в исходном исследовании. Одними из таких факторов являются межпопуляционные различия. В исследованиях предрасположенности к инфекционным заболеваниям у носителей разных аллелей полиморфных генов иммунной системы, в частности генов Толл-подобных рецепторов (TLR), часто наблюдается невозможность воспроизвести полученные результаты на независимых выборках. Толл-подобные ре-

цепторы – рецепторы адаптивного иммунитета, расположенные на поверхности и внутри клеток, отвечают за распознавание патогенов, проникающих в организм.

Нами проведен анализ научных публикаций и отобрано шесть наиболее часто упоминаемых однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах TLR: rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*), rs3804100 (*TLR2*), rs4986790 (*TLR4*), rs5743810 (*TLR6*), rs3764880 (*TLR8*), для которых показана ассоциация с риском развития серьезных инфекционных патологий, включая туберкулез и ВИЧ [1]. rs5743551-А *TLR1* в иранской популяции ассоциирован с риском возникновения туберкулеза легких [2], однако для этого же полиморфизма в популяции, проживающей на территории США (штат Вашингтон), повышенная

восприимчивость к возникновению осложнений на фоне инфекционных заболеваний выявлена у носителей rs5743551-*G TLR1* [3]. По результатам мета-анализа генотип rs3804100-*C/C TLR2* связан с повышенным риском развития туберкулеза [4]. В другом исследовании получены доказательства непосредственного влияния полиморфизма *TLR2* rs5743708-*A* на риск развития сепсиса, особенно у лиц европейского происхождения [5]. Анализ *TLR2* rs5743708 в подгруппах из разных популяций выявил, что аллель *A* ассоциирован с повышенной восприимчивостью к туберкулезу в азиатской этнической группе, но имеет протективный характер в группе латинского происхождения [4]. Полиморфизм rs4986790-*G TLR4* ассоциирован с риском развития активного туберкулеза у ВИЧ-инфицированных пациентов в Танзании и Испании, несмотря на то что у больных туберкулезом, не инфицированных ВИЧ, связь не подтверждается [6, 7]. rs5743810-*T TLR6* оказывает протективный эффект к развитию туберкулеза во всех этнических группах [4]. В ряде исследований показана ассоциация SNP в локусе rs3764880 *TLR8* с туберкулезом у жителей Индонезии, России, Молдавии, Турции и в двух индийских когортах как для легочного, так и для внелегочного туберкулеза [8–13]. Аллель rs3764880-*G TLR8* связан с восприимчивостью к туберкулезу и бактериальной нагрузкой среди жителей Пакистана, генотип rs3804100-*C/C TLR2* – с восприимчивостью к латентной туберкулезной инфекции в китайской популяции, SNP в локусе rs4986790 *TLR4* – к легочному туберкулезу у жителей Ирана [14, 15].

Большая часть исследований генетической предрасположенности проводится внутри определенных этнических или национальных групп, что связано с необходимостью учитывать различия в частотах аллелей, характерные для них. В этой связи исследование генетического разнообразия популяций человека, в том числе малоизученных, и особенно исследование полиморфных генов иммунной системы представляются актуальными и необходимыми для проведения в дальнейшем эпидемиологических и медико-биологических исследований.

Цель работы – определить популяционные особенности распространенности шести полиморфных вариантов генов TLR (rs5743551 *TLR1*, rs5743708 *TLR2*, rs3804100 *TLR2*, rs4986790 *TLR4*, rs5743810 *TLR6*, rs3764880 *TLR8*) среди пациентов с ВИЧ и туберкулезом в странах Восточной Европы и Центральной Азии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые выборки

В исследовании использовались образцы биологического материала (цельная кровь), полученные на территории Российской Федерации, Республики Беларусь, Республики Киргизия, Республики Армения и Республики Таджикистан. В качестве целевой группы были отобраны пациенты с диагнозами ВИЧ-инфекция и туберкулез (ТБ), не имеющие родственных связей. Критериями включения в исследование были: 1) для группы ВИЧ-положительных пациентов – диагноз ВИЧ-инфекции, подтвержденный иммуноферментным анализом и иммуноблоттингом; 2) для группы ТБ и ВИЧ/ТБ – диагноз туберкулез, подтвержденный обнаружением *Mycobacterium tuberculosis* в биологическом материале. Принадлежность индивида к этнической группе основывалась на самоопределении.

Для проведения сравнительного анализа нами были использованы данные из базы проекта “1000 Геномов” (The 1000 Genomes Project Phase 3) [16] по частотам полиморфных локусов в объединенных выборках европеоидов (EUR, $n = 503$), жителей стран Южной (SAS, $n = 489$) и Восточной (EAS, $n = 504$) Азии. В базе данных отсутствует информация о наличии у индивидов каких-либо заболеваний, поэтому этот фактор не учитывался как значимо влияющий на популяционные частоты.

Выбор и генотипирование SNP

На основе анализа опубликованных результатов научных исследований выбраны наиболее часто изучаемые SNP в генах TLR, ассоциированные с туберкулезом и ВИЧ-инфекцией, и проверены на неравновесие по сцеплению с использованием калькулятора LDlink Tool [17]. Для генотипирования исследуемых выборок использовались образцы периферической венозной крови, антикоагулированные ЭДТА. Геномную ДНК выделяли с помощью набора РИБОпреп (АмплиСенс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Генотипирование образцов проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием референсных последовательностей из базы данных SNP [18] разработаны и апробированы методики для определения аллелей в исследуемых локусах [19].

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием среды R (версия 4.3.1), включающей

Таблица 1. Характеристики выборок из стран ВЕЦА.

Страна	SLV	ARM	KGZ	TJK
Структура выборок				
Российская Федерация	124	2	–	–
Республика Беларусь	147	1	–	–
Республика Армения	1	134	–	–
Республика Киргизия	35	–	97	1
Республика Таджикистан	1	–	–	137
Итого	308	137	97	138
Характеристика выборок				
Пол, м/ж	203/105	107/30	67/30	109/29
Возраст, лет, среднее (SD)	41.7 (8.1)	44.9 (11.3)	44.3 (10.3)	41.8 (10.0)

встроенные функции для анализа таблиц сопряженности (χ^2 -тест Пирсона и точный тест Фишера) и межгрупповых различий (тест Стьюдента). Генетические характеристики выборок анализировали с помощью пакетов Hardy–Weinberg [20], poprg [21–23], adegenet [24]. Для введения поправки на множественные сравнения использовали метод Бонферрони. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0.05$. Информативность локусов оценивали, рассчитывая показатель *PIC* (информационное содержание полиморфизма) [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика выборок

Выборки населения стран Восточной Европы и Центральной Азии (ВЕЦА) были гетерогенны по национальному составу, в связи с чем были перераспределены на группы в зависимости от этнической принадлежности: восточнославянскую (обозначена по преобладающим этносам SLV, $n = 308$), включающую русских ($n = 162$), белорусов ($n = 140$), украинцев ($n = 4$), литовцев ($n = 1$) и поляков ($n = 1$); армянскую (ARM, армяне, $n = 137$), киргизскую (KGZ, киргизы, $n = 97$) и таджикскую (TJK, таджики, $n = 138$). Структура и демографические характеристики сформированных выборок приведены в табл. 1. Во всех выборках наблюдается преобладание мужчин (SLV и KGZ – в 2 раза; ARM и TJK – более чем в 3.5 раза). Однако попарное сравнение выборок обнаруживает статистически значимые различия по соотношению мужчин/женщин только между выборками SLV и TJK ($p_{\text{bonferroni}} = 0.03$). Однако статистически значимых различий по частотам аллелей между мужчинами и женщинами по анализируемым локусам не обнаружено ни в одной из выборок. Средний возраст статистически зна-

чительно различался между выборками SLV и ARM ($p_{\text{bonferroni}} = 0.02$).

Проведено сравнение частот аллелей в исследуемых группах и популяционных частот EUR, EAS и SAS (табл. 2). Распределение генотипов в популяциях в большинстве случаев соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (ПХВ). Статистически значимое отклонение наблюдается только в выборке TJK по полиморфным локусам rs3804100 *TLR2* и rs3764880 *TLR8*. При этом отклонение от ПХВ локуса rs3764880 *TLR8* в выборке TJK связано с тем, что он локализуется на X-хромосоме, а в данной выборке наблюдается значительное превышение числа мужчин над женщинами. Для ряда локусов частота аллелей в анализируемых выборках не отличалась значимо от частот в географически близких выборках из базы 1000 Genomes. Так, выборка SLV не отличалась от популяции EUR по частотам локусов rs5743708 *TLR2*, rs3804100 *TLR2* и rs3764880 *TLR8* ($p > 0.05$) и значимо отличалась от EAS и SAS ($p < 0.01$). Также по ряду локусов выборки ARM, KGZ и TJK характеризовались сходными частотами с популяциями EAS и SAS, но в то же время по другим локусам (rs5743708 *TLR2*, rs4986790 *TLR4*) не отличались по частотам аллелей от EUR. Для выборок из стран Центральной Азии характерно, что частоты локусов rs5743551 *TLR1*, rs3804100 *TLR2*, rs3764880 *TLR8* в них оказались ближе к SAS, чем к EAS. Для полиморфного варианта rs5743810 *TLR6* распределение аллелей во всех выборках оказалось уникальным и значимо ($p < 0.001$) отличалось от популяций из базы 1000 Genomes.

Сравнение выборок из стран ВЕЦА между собой показало, что для полиморфных вариантов гена *TLR2* (rs5743708, rs3804100) не характерна популяционная специфичность, и наоборот для

Таблица 2. Сравнительная характеристика SNP в локусах rs5743551 (*TLR1*), rs5743708 (*TLR2*), rs3804100 (*TLR2*), rs4986790 (*TLR4*), rs5743810 (*TLR6*), rs3764880 (*TLR8*) в выборках стран ВЕЦА и популяциях EUR, EAS и SAS базы данных 1000 Genomes

rs-номер в базе данных NCBI (ген)	Выборки стран ВЕЦА	Аллель (%)	HWE, p^*	Выборки из базы данных 1000 Genomes					
				EUR		EAS		SAS	
				аллель (%)	p^{***}	аллель (%)	p	аллель (%)	p
rs5743551 (<i>TLR1</i>)	SLV	G (18.7)	0.06		<0.001		<0.001		<0.001
	ARM	G (45.3)	1.00		<0.001		<0.001	G (48.3)	0.412
	KGZ	A (44.8)	1.00	G (28.5)	<0.001	A (39.8)	0.202		0.168
	TJK	G (45.7)	0.30		<0.001		<0.001		0.454
rs5743708 (<i>TLR2</i>)	SLV	A (4.06)	0.08		0.072		<0.001		<0.001
	ARM	A (2.55)	1.00	A (2.4)	0.826	A (0.1)	<0.001	A (0.1)	<0.001
	KGZ	A (2.06)	1.00		1.000		0.009		0.009
	TJK	A (0.72)	1.00		0.281		0.281		0.281
rs3804100 (<i>TLR2</i>)	SLV	C (8.60)	0.48		0.090		<0.001		0.005
	ARM	C (10.6)	0.36	C (6.4)	0.050	C (23.9)	<0.001	C (13.7)	0.200
	KGZ	C (15.5)	0.46		<0.001		0.022		0.500
	TJK	C (14.1)	0.03		<0.001		<0.001		0.800
rs4986790 (<i>TLR4</i>)	SLV	G (9.09)	0.15		0.023		<0.001		0.034
	ARM	G (1.46)	1.00	G (5.7)	<0.001	G (0.0)	<0.001	G (12.6)	<0.001
	KGZ	G (2.06)	1.00		0.033		0.001		<0.001
	TJK	G (6.16)	0.08		0.771		<0.001		<0.001
rs5743810 (<i>TLR6</i>)	SLV	A (28.4)	0.78		<0.001		<0.001		<0.001
	ARM	A (19.3)	0.78	A (40.9)	<0.001	A (0.0)	<0.001	A (1.7)	<0.001
	KGZ	A (7.73)	0.44		<0.001		<0.001		<0.001
	TJK	A (10.9)	0.05		<0.001		<0.001		<0.001
rs3764880 (<i>TLR8</i>)	SLV	G (25.9)	0.58**		0.730		<0.001		<0.001
	ARM	G (44.9)	0.40	G (26.9)	<0.001	A (19.2)	<0.001	A (41.9)	0.002
	KGZ	A (52.8)	0.34		<0.001		<0.001		0.285
	TJK	G (37.1)	0.0017		0.011		<0.001		<0.001

*Статистическая значимость отклонения от равновесия Харди–Вайнберга (PXB). **Статистическая значимость отклонения от PXB для X-сцепленных локусов. *** Статистическая значимость различий выборок по частоте аллелей/генотипов, точный тест Фишера с поправкой Бонферрони.

rs5743810 *TLR6* обнаружены значимые различия ($p < 0.05$) в частотах генотипов при сравнении выборок SLV/ARM, SLV/KGZ, SLV/TJK, ARM/KGZ и ARM/TJK (рис. 1). При этом имеющие сходные частоты генотипов rs5743810 *TLR6* выборки KGZ и TJK значимо различались при сравнении частот генотипов rs5743551 *TLR1* и аллелей rs3764880 *TLR8*. Последнее, впрочем, может быть объяснено тем, что в выборке TJK женщин в 3.76 раз меньше чем мужчин, а в выборке KGZ это соотношение составляет 2.23. Для восточнославянской выборки SLV обнаружены наибольшие отличия от остальных выборок по частотам генотипов rs5743551 *TLR1*, rs4986790 *TLR4*, rs5743810 *TLR6*.

Уровень генетического разнообразия исследуемых выборок оценивали по показателям H_E (средняя ожидаемая гетерозиготность), H_O

(средняя наблюдаемая гетерозиготность) и H_T (показатель общего генетического разнообразия) (табл. 3). Среднее значение наблюдаемой гетерозиготности по всем изученным локусам составило 0.21. Наименьший уровень этой гетерозиготности показан для локуса rs5743708 в выборке TJK – 0.0145. Наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие ($G_{ST} = 0.074$) вносят различия в частотах аллелей rs5743551 *TLR1*, который единственный из анализируемых характеризуется высоким значением средней ожидаемой гетерозиготности (достигает 0.45). При этом выборки ARM, KGZ и TJK показывают наиболее высокое значение индекса среднего внутривнутрипопуляционного разнообразия (>0.49). Для остальных полиморфных локусов характерны низкое генетическое разнообразие (0.014–0.407) во всех анализируемых выборках и незначительный вклад в межпопуляционное

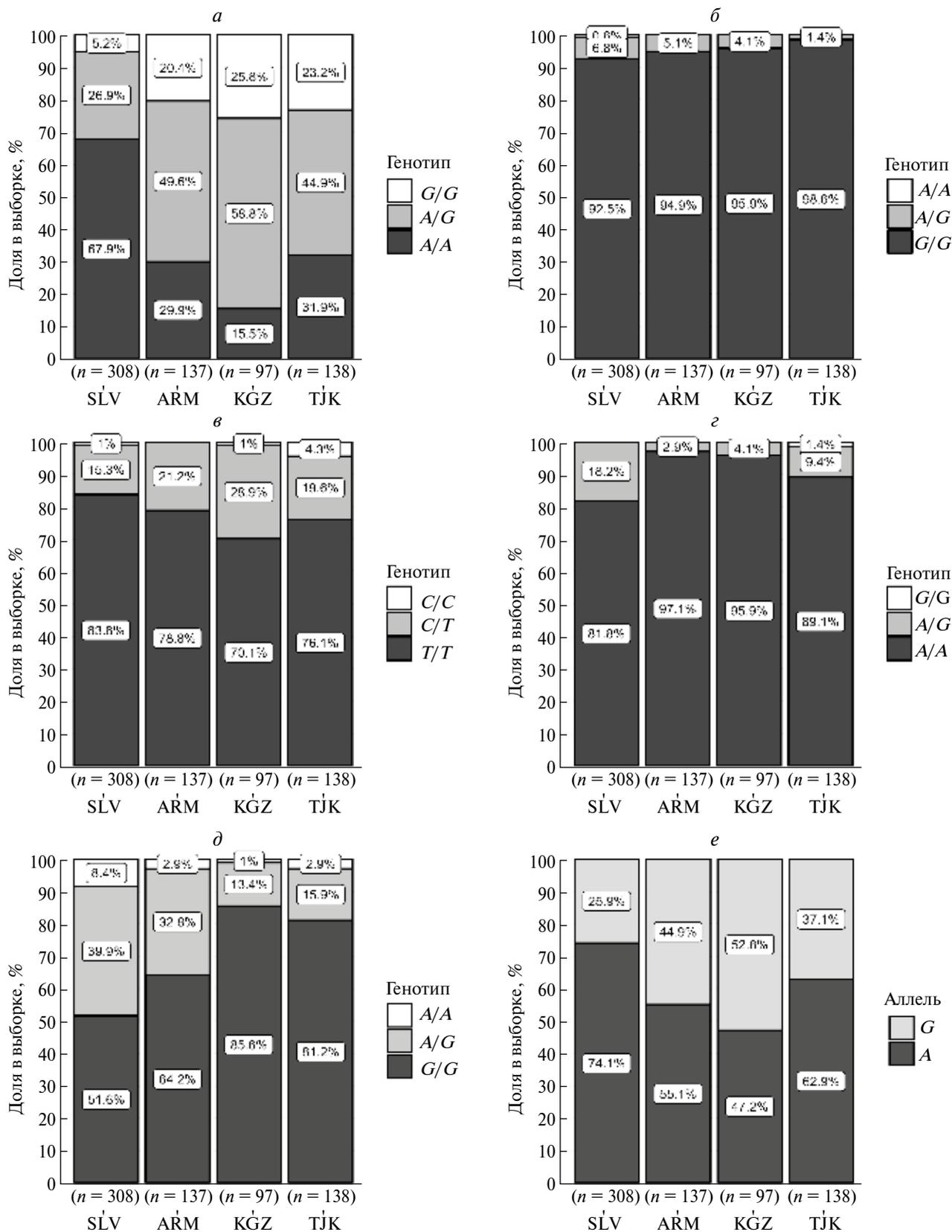


Рис. 1. Распределение частот генотипов полиморфных вариантов генов TLR в исследуемых выборках: *а* – *rs5743551 (TLR1)*, *б* – *rs5743708 (TLR2)*, *в* – *rs3804100 (TLR2)*, *г* – *rs4986790 (TLR4)*, *д* – *rs5743810 (TLR6)*, *е* – *rs3764880 (TLR8)*.

Таблица 3. Характеристика внутри- и межпопуляционного разнообразия выборок стран ВЕЦА по полиморфным вариантам генов TLR

	SLV		ARM		KGZ	
	H_o	H_e/H_T	H_o	H_e/H_T	H_o	H_e/H_T
rs5743551 (<i>TLR1</i>)	0.2695	0.3042	0.4964	0.4973	0.5876	0.4968
rs5743708 (<i>TLR2</i>)	0.0682	0.0780	0.0511	0.0500	0.0412	0.0406
rs3804100 (<i>TLR2</i>)	0.1526	0.1575	0.2117	0.1899	0.2887	0.2627
rs4986790 (<i>TLR4</i>)	0.1818	0.1655	0.0292	0.0289	0.0412	0.0406
rs5743810 (<i>TLR6</i>)	0.3994	0.4074	0.3285	0.3131	0.1340	0.1435
Суммарно	0.2143	0.2225	0.2234	0.2158	0.2186	0.1968

	TJK		Суммарные показатели			
	H_o	H_e/H_T	H_o	H_e/H_T	G_{ST}	<i>PIC</i>
rs5743551 (<i>TLR1</i>)	0.4493	0.4982	0.4507	0.4491/0.4848	0.0737	0.3505
rs5743708 (<i>TLR2</i>)	0.0145	0.0144	0.0438	0.0458/0.0459	0.0036	0.0528
rs3804100 (<i>TLR2</i>)	0.1957	0.2437	0.2121	0.2134/0.2144	0.0044	0.1779
rs4986790 (<i>TLR4</i>)	0.0942	0.1161	0.0866	0.0878/0.0895	0.0191	0.1057
rs5743810 (<i>TLR6</i>)	0.1594	0.1946	0.2553	0.2648/0.2770	0.0441	0.2694
Суммарно	0.1826	0.2134	0.2097	0.2122/0.2223	0.0457	–

Примечание. H_o – средняя наблюдаемая гетерозиготность; H_e – показатель среднего внутривнутрипопуляционного разнообразия; H_T – показатель общего генетического разнообразия; G_{ST} – показатель межпопуляционного разнообразия [26, 27]; *PIC* – информационное содержание полиморфизма (*PIC*, polymorphism information content).

разнообразии ($G_{ST} = 0.004–0.044$). Рассчитанное по шести локусам SNP генетическое расстояние [26] между выборками составило 0.0064–0.1482. Выборка SLV – наиболее удаленная от остальных популяций, дистанция по Нею между этой популяцией и всеми остальными варьирует от 0.07 до 0.1482 (между SLV и KGZ). Значение показателя информативности *PIC* варьирует от 0.05 (низко информативный локус) до 0.35 (средняя информативность) и в среднем для шести локусов составляет 0.19 (± 0.12).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдаемые различия частот SNP генов TLR между анализируемыми выборками из стран ВЕЦА и популяциями EUR, EAS и SAS коррелируют с их этногеографическим положением. Белорусы вместе с украинцами и русскими представляют восточнославянскую языковую группу, крупнейшую как по численности, так и по территории, проживающую в Восточной Европе наряду с балтийскими, финно-пермскими и тюркоязычными народами [28]. Для восточнославянских популяций не характерна высокая изолированность. По результатам молекулярного дисперсионного анализа во всех группах наблюдается высокая диверсификация гаплотипов, но низкая межпопуляционная дисперсия [29]. Согласно результатам, полученным другими исследовательскими

группами, генетические расстояния между восточнославянскими популяциями могут оказаться значительными [29]. В настоящем исследовании выборка SLV отличалась не только от KGZ, TJK и ARM, но и от EUR по локусам rs5743551 *TLR1*, rs4986790 *TLR4*, rs5743810 *TLR6*. Это можно рассматривать как следствие того, что на формирование генофонда восточнославянских популяций повлияли потоки генов между западом и востоком Евразии. В то же время выборка ARM показывает отличия как от центральноазиатских выборок KGZ и TJK (rs5743810 *TLR6*), так и от SLV и EUR (rs5743551 *TLR1*, rs4986790 *TLR4*, rs5743810 *TLR6*). Распределение гаплотипов и структура генетических расстояний свидетельствуют о высокой степени генетической изоляции в горных южных и восточных регионах Армении, в то время как в северных, центральных и западных регионах наблюдалось более значительное смешение с популяциями из соседних стран Ближнего Востока [30]. Расположенное на стыке Европы и Ближнего Востока, Армянское нагорье служило переходным коридором для крупных волн миграций [31]. Популяции, проживающие в Центральной Азии, так же, как и армянские популяции, находятся на месте большого количества торговых путей. Генетическая самобытность этих народностей может быть объяснена языковыми и культурными различиями, которые возникли относительно недавно и действуют как барьеры для потока генов между

этническими группами с вероятно общей демографической историей [32]. Полученные нами результаты показывают различия между выборками KGZ и TJK и восточнославянской (SLV) по локусам rs5743551 *TLR1* и rs5743810 *TLR6*, что согласуется с данными, полученными ранее с использованием других генетических маркеров, а в выборках TJK, KGZ (как и ARM) значение индекса среднего внутривнутрипопуляционного разнообразия локуса rs5743551 *TLR1* подтверждает, что в этих странах наблюдается уровень генетической вариабельности более характерный для азиатских популяций [33, 34]. Масштабное генотипирование этнических киргизов по 246544 сайтам аутосомных SNP и последующий анализ главных компонент (PCA) установили, что они образуют разреженный кластер, не пересекающийся ни с EAS, ни с SAS [33], что подтверждает высокий уровень миграции, характерный для Киргизстана, и соответствует полученным нами результатам по локусам rs5743708 *TLR2*, rs4986790 *TLR4* и rs5743810 *TLR6*. Генетические исследования показали, что миграции из Восточной Азии способствовали распространению тюркско-монгольского населения (казахи, киргизы) в Центральной Азии и частичной замене индоиранского населения (таджики), существовавшего на этих территориях задолго до тюркско-монгольского [35]. Однако по данным Б. Мартинез-Круз и соавт. [36] в геноме таджиков содержание восточноазиатского (тюркско-монгольского) компонента остается низким.

В настоящем исследовании это находит подтверждение в значимых различиях частот аллелей и генотипов полиморфных генов *TLR1* (rs5743551) и *TLR8* (rs3764880) между выборками KGZ и TJK и в то же время в отсутствии различий по остальным генам TLR. По данным исследований, относительно недавний поток генов из популяций Южной Азии в Центральную Азию привел к генетическому сближению этих популяций [37]. Наблюдаемые различия в частотах аллелей генов TLR могут быть связаны не только с этническими и географическими особенностями выборок, но и с тем, что в выборку стран ВЕЦА включены не случайные популяционные образцы, а группы пациентов с тяжелыми инфекционными заболеваниями — ВИЧ-инфекция и туберкулез. Масштабный мета-анализ показал, что полиморфные варианты *TLR1* (rs4833095, rs5743557, rs5743596, rs5743618), *TLR2* (rs3804099, rs5743704, rs5743708), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs5743810) и *TLR8* (rs3764879) значимо ассоциированы с туберкулезом в определенных этнических группах [38]. Ге-

терогенность, наблюдаемая между исследованиями rs4506565 *TLR1*, rs4986790 *TLR4*, rs4986791 *TLR4* и rs5743836 *TLR9* в мета-анализе, указывает на то, что распределение аллелей этих полиморфных генов значительно различается в разных популяциях. Поэтому генетические ассоциации между этими полиморфными вариантами генов TLR и риском развития туберкулеза могут быть этнически специфичными и не должны обобщаться на более широкую популяцию. Результаты исследования генетической предрасположенности, проведенные на выборке населения г. Москвы, установили, что аллель rs4986790-*TLR4* ассоциирован с повышенным риском развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных [39]. В то же время по результатам исследования проведенного на независимой выборке, этот аллель ассоциирован с протективным эффектом по отношению к риску туберкулеза у ВИЧ-инфицированных [19]. Наблюдаемые прямо противоположные результаты могут быть связаны как с тем, что в нашем исследовании [19] использовалась выборка иного этнического состава, чем в работе [39], так и со значительными различиями в размерах самих выборок между этими исследованиями. Несмотря на низкую информативность (значение показателя *PIC* 0.05–0.35) анализируемых полиморфных вариантов, обнаруженные различия в частотах аллелей риска могут не совпадать между выборками, что важно учитывать при проведении генетических и эпидемиологических исследований [40, 41].

Исследование не получало внешнего финансирования.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФБУН “Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии”: дата 26.03.2019, номер протокола 90.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Все обследованные — совершеннолетние.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саламайкина С.А., Миронов К.О. Однонуклеотидные полиморфизмы генов толл-подобных рецепторов, ассоциированные с риском развития туберкулеза и другими заболеваниями нижних дыхательных путей // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2023. Т. 4. С. 57–61.
2. Naderi M., Hashemi M., Mirshekari H. et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increased the risk of pulmonary tuberculosis in an Iranian population sample // BES. 2016. V. 29. № 11. P. 825–828. <https://doi.org/10.3967/bes2016.110>
3. Thompson C.M., Holden T.D., Rona G. et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms and associated outcomes in sepsis after traumatic injury: A candidate gene association study // Annals of Surgery. 2014. V. 259. № 1. P. 179–185. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31828538e8>
4. Schurz H., Daya M., Möller M. et al. TLR1, 2, 4, 6 and 9 variants associated with tuberculosis susceptibility: A systematic review and meta-analysis // PLoS One. 2015. V. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139711>
5. Gao J., Zhang A., Wang X. et al. Association between the TLR2 Arg753Gln polymorphism and the risk of sepsis: a meta-analysis // Critical Care. 2015. V. 19. № 1. P. 416. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-1130-3>
6. Ferwerda B., Kibiki G., Netea M. et al. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania // AIDS. 2007. V. 21. № 10. P. 1375–1377. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32814e6b2d>
7. Pulido I., Leal M., Genebat M. et al. The TLR4 AS-P299GLY polymorphism is a risk factor for active tuberculosis in Caucasian HIV-infected patients // Curr. HIV Res. 2010. V. 8, № 3. P. 253–258. <https://doi.org/10.2174/157016210791111052>
8. Wang C.-H., Eng H.-L., Lin K.-H. et al. Functional polymorphisms of *TLR8* are associated with hepatitis C virus infection // Immunology. 2014. V. 141. № 4. P. 540–548. <https://doi.org/10.1111/imm.12211>
9. El-Bendary M., Neamatallah M., Elalfy H. et al. The association of single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 3, Toll-like receptor 7 and Toll-like receptor 8 genes with the susceptibility to HCV infection // British J. Biomedical Science. 2018. V. 75. № 4. P. 175–181. <https://doi.org/10.1080/09674845.2018.1492186>
10. Davila S., Hibberd M., Hari Dass R. et al. Genetic association and expression studies indicate a role of Toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis // PLoS Genet. 2008. V. 4. № 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000218>
11. Varzari A., Deyneko I., Vladei I. et al. Genetic variation in TLR pathway and the risk of pulmonary tuberculosis in a Moldavian population // Infection, Genetics and Evolution. 2019. V. 68. P. 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.005>
12. Dalgic N., Tekin D., Kayaalti Z. et al. Relationship between Toll-like receptor 8 gene polymorphisms and pediatric pulmonary tuberculosis // Disease Markers. 2011. V. 31. № 1. P. 33–38. <https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0800>
13. Ugolini M., Gerhard J., Burkert S. et al. Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses // Nat. Immunol. 2018. V. 19. № 4. P. 386–396. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0068-4>
14. Selvaraj P., Harishankar M., Singh B. et al. Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India // Tuberculosis. 2010. V. 90. № 5. P. 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.08.001>
15. Harishankar M., Selvaraj P., Bethunaikkan R. Influence of genetic polymorphism towards pulmonary tuberculosis susceptibility // Front. Med. 2018. V. 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00213>
16. The 1000 Genomes Project Consortium et al. A global reference for human genetic variation // Nature. 2015. V. 526. № 7571. P. 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
17. Machiela M.J., Chanoock S.J. LDlink: A web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants // Bioinformatics. 2015. V. 31. № 21. P. 3555–3557. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv402>
18. dbSNP Summary [электронный ресурс]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi (accessed: 05.10.2023).
19. Salamaikina S., Korchagin V., Kulabukhova E. et al. Association of Toll-like receptor gene polymorphisms with tuberculosis in HIV-positive participants // Epigenomes. 2023. V. 7. № 3. <https://doi.org/10.3390/epigenomes7030015>
20. Graffelman J. Exploring diallelic genetic markers: the Hardy–Weinberg package // J. Stat. Soft. 2015. V. 64. № 3. <https://doi.org/10.18637/jss.v064.i03>
21. Kamvar Z.N., Tabima J.F., Grünwald N.J. Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction // PeerJ. 2014. V. 2. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00208>
22. Jombart T. adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers // Bioinformatics. 2008. V. 24. № 11. P. 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
23. Jombart T., Ahmed I. adegenet 1.3-1: New tools for the analysis of genome-wide SNP data // Bioinformatics. 2011. V. 27. № 21. P. 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
24. Winter D.J. MMod: An R library for the calculation of population differentiation statistics // Mol. Ecol. Re-

- sources. 2012. V. 12. № 6. P. 1158–1160.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x>
25. *Serrote C.M.L., Reiniger L., Silva K.B. et al.* Determining the polymorphism information content of a molecular marker // *Gene*. 2020. V. 726.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175>
 26. *Nei M.* Molecular evolutionary genetics // *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, 2019.
 27. *Nei M., Chesser R.K.* Estimation of fixation indices and gene diversities // *Ann. Human. Genet.* 1983. V. 47. № 3. P. 253–259.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1983.tb00993.x>
 28. *Kushniarevich A., Sivitskaya L., Danilenko N. et al.* Uniparental genetic heritage of Belarusians: encounter of rare Middle Eastern matrilineages with a Central European mitochondrial DNA pool // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066499>
 29. *Roewer L., Willuweit S., Krüger C. et al.* Analysis of Y chromosome STR haplotypes in the European part of Russia reveals high diversities but non-significant genetic distances between populations // *Int. J. Legal. Med.* 2008. V. 122. № 3. P. 219–223.
<https://doi.org/10.1007/s00414-007-0222-2>
 30. *Weale M.E., Yepiskoposyan L., Jager R. et al.* Armenian Y chromosome haplotypes reveal strong regional structure within a single ethno-national group // *Hum. Genet.* 2001. V. 109. № 6. P. 659–674.
<https://doi.org/10.1007/s00439-001-0627-9>
 31. *Yepiskoposyan L., Hovhannisyan A., Khachatryan Z.* Genetic structure of the Armenian population // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2016. V. 64. № 1. P. 113–116.
<https://doi.org/10.1007/s00005-016-0431-9>
 32. *Heyer E., Balaesque P., Jobling M. et al.* Genetic diversity and the emergence of ethnic groups in Central Asia // *BMC Genetics*. 2009. V. 10. № 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-49>
 33. *Xing J., Watkins W., Shlien A. et al.* Toward a more uniform sampling of human genetic diversity: A survey of worldwide populations by high-density genotyping // *Genomics*. 2010. V. 96. № 4. P. 199–210.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.07.004>
 34. *Guarino-Vignon P., Marchi N., Bendezu-Sarmiento J. et al.* Genetic continuity of Indo-Iranian speakers since the Iron Age in southern Central Asia // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 733.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-04144-4>
 35. *Palstra F.P., Heyer E., Austerlitz F.* Statistical inference on genetic data reveals the complex demographic history of human populations in Central Asia // *Mol. Biol. and Evolution*. 2015. V. 32. № 6. P. 1411–1424.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msv030>
 36. *Martínez-Cruz B., Vitalis R., Séguérel L. et al.* In the heartland of Eurasia: The multilocus genetic landscape of Central Asian populations // *Eur. J. Hum. Genet.* 2011. V. 19. № 2. P. 216–223.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.153>
 37. *Narasimhan V.M., Patterson N., Moorjani P. et al.* The formation of human populations in South and Central Asia // *Science*. 2019. V. 365. № 6457.
<https://doi.org/10.1126/science.aat7487>
 38. *Zhou Y., Zhang M.* Associations between genetic polymorphisms of TLRs and susceptibility to tuberculosis: A meta-analysis // *Innate Immun.* 2020. V. 26. № 2. P. 75–83.
<https://doi.org/10.1177/1753425919862354>
 39. *Кулабухова Е.И., Миронов К.О., Дунаева Е. А. и др.* Ассоциация полиморфизмов в генах Toll-подобных рецепторов и маннозосвязывающего лектина с риском развития туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией // *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2020. Т. 11. № 4. С. 61–69.
<https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-61-69>
 40. *Martin A.R., Gignoux C., Walters R. et al.* Human demographic history impacts genetic risk prediction across diverse populations // *Am. J. Hum Genet.* 2017. V. 100. № 4. P. 635–649.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.03.004>
 41. *Peterson R.E., Kuchenbaecker K., Walters R. et al.* Genome-wide association studies in ancestrally diverse populations: opportunities, methods, pitfalls, and recommendations // *Cell*. 2019. V. 179. № 3. P. 589–603.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.051>

Toll-Like Receptor Gene Polymorphisms in a Population-Based Study of Hiv and Tuberculosis Patients from Eastern Europe and Central Asia

S. A. Salamaikina^{1,2,*}, V. I. Korchagin¹, K. O. Mironov¹, E. I. Kulabukhova^{1,3}, V. N. Zimina⁴,
A. V. Kravtchenko¹

¹Central Research Institute of Epidemiology Federal service for surveillance on consumer rights protection and human wellbeing,
Moscow, 111123 Russia

²Moscow institute of physics and technology, Dolgoprudny, 141701 Russia

³Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, 117198 Russia

⁴Kemerovo state medical university of the ministry of health of the Russian Federation, Kemerovo, 650056 Russia

*e-mail: salamaykina@cmd.su

Genetic diversity of human populations is determined by polymorphic variants of immune response genes and can be linked to the variation in responses to infectious agents. This study compared allele and genotype frequencies of polymorphic variants of *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6* and *TLR8* genes between samples from Eastern Europe and Central Asia. We included 680 unrelated individuals from Eastern Slavic ($n = 308$), Armenian ($n = 137$), Tajik ($n = 138$) and Kyrgyz ($n = 97$) samples of patients with confirmed diagnoses of HIV and tuberculosis. The international 1000 Genomes Project data - samples of Caucasians (EUR) and countries of eastern (EAS) and southern (SAS) Asia – were used for comparison. Despite the lack of genetic diversity and population differences in allele frequencies of the analyzed genes, the samples differed in a number of loci both from each other and from EAS, SAS samples.

Keywords: immune response genes, toll-like receptors, single nucleotide polymorphism, human populations, HIV, tuberculosis.

УДК 575.112

АНАЛИЗ ВОВЛЕЧЕННОСТИ ГЕНОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА В РЕАЛИЗАЦИЮ СИГНАЛЬНЫХ И МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

© 2024 г. Н. Ю. Часовских¹, Е. Е. Шестакова^{1, *}

¹Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: evgenika06@gmail.com

Поступила в редакцию 17.10.2023 г.

После доработки 16.11.2023 г.

Принята к публикации 28.11.2023 г.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является распространенной патологией, и ее развитие опосредуется большим числом генетических факторов, факторов внешней среды и их комбинаций. В связи с этим задачей исследования явился биоинформационный анализ вовлеченности генов предрасположенности к ИБС в реализацию сигнальных и метаболических путей. Список генов предрасположенности был составлен при помощи баз данных GWAS, DisGeNET и GeneCards. Анализ обогащения путей проводился с использованием плагина ClueGO v2.5.9 Cytoscape v3.9.1. В результате проведенного исследования установлено, что данные гены вовлечены в реализацию различных механизмов развития ИБС, включая нарушения липидного метаболизма, изменения активности элементов системы комплемента, функции эндотелия. Наследственные факторы могут оказывать влияние на процессы регуляции тромбообразования, тонус сосудов, баланс про- и антиокислительных факторов, проницаемость эндотелия, адсорбцию воды и натрия, а также процессы ангиогенеза. При этом исследуемые гены могут быть вовлечены в реализацию одного либо нескольких сигнальных/метаболических путей.

Ключевые слова: ИБС, гены предрасположенности, анализ обогащения путей, Cytoscape, ClueGO.
DOI: 10.31857/S0016675824040087 EDN: CRCOУH

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) представляет собой серьезную проблему для современного здравоохранения. По оценке исследования GBD (глобального бремени болезней) на 2020 г. данной патологией страдают более 126 млн человек по всему миру, что составляет примерно 1.72% населения [1].

Данное заболевание является комплексным и проявляется как следствие влияния большого числа генетических факторов, факторов внешней среды и их сочетания. В свое время были идентифицированы факторы риска для ИБС, которые включают курение, пожилой возраст, мужской пол, сахарный диабет, гипертонию, ИБС или инфаркт миокарда в семейном анамнезе, ожирение, повышенный уровень общего холестерина и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в плазме крови, повышенный уровень триглицеридов и пониженный уровень липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) в плазме крови [2–8].

Многочисленные исследования наследственных факторов ИБС выявили гены, ответственные

за разнообразные функции [9], при этом значительный вклад в идентификацию данных факторов вносит полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) между фенотипическими характеристиками и генетическими маркерами. Вместе с тем комплексного анализа совокупного влияния генов предрасположенности к ИБС на механизмы заболевания, в том числе опосредованные через реализацию сигнальных и метаболических путей, на данный момент не проведено. Биоинформационные инструменты позволяют изучить вовлеченность исследуемых генов в механизмы молекулярных взаимодействий сигнальных и метаболических путей. Результаты таких исследований могут послужить отправной точкой для дальнейшего изучения выявленных молекулярных механизмов экспериментальными методами, а в последующем – поиска молекулярных терапевтических мишеней.

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования – биоинформационный анализ вовлеченности генов предрасположенности к ИБС в реализацию сигнальных и метаболических путей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Используемые в настоящем исследовании гены предрасположенности к ИБС были получены из баз данных GWAS [10], DisGeNET [11] и GeneCards [12], которые содержат информацию о связях между однонуклеотидными полиморфизмами и заболеваниями.

Для проведения анализа обогащения путей использовался плагин ClueGO v2.5.9 Cytoscape v3.9.1 [13]. Каждый ген аннотировался путями из KEGG – базы данных Киотского университета [14] и REACTOME – открытой базы данных биологических путей [15] с применением гипергеометрического теста с $p < 0.05$ и значением каппа-статистики, $K = 0.4$ [16]. Дополнительно обогащенные пути объединялись в группы со

сходным биологическим значением и составом генов предрасположенности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Список генов предрасположенности к ИБС, содержащий в себе 390 генов, был сформирован на основании баз данных GWAS, DisGeNET и GeneCards и представлен в табл. 1.

Проведенный анализ обогащения путей выявил шесть групп путей AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, cholesterol metabolism, non-integrin membrane-ECM interactions, RHO GTPase cycle, synthesis of IP3 and IP4 in the cytosol, vascular smooth muscle contraction и 32 негруппированных пути, которые содержат гены предрасположенности к ИБС (табл. 2).

Таблица 1. Список генов предрасположенности к ИБС

№	Ген	№	Ген	№	Ген	№	Ген	№	Ген
1	<i>ABCA1</i>	79	<i>CFDP1</i>	157	<i>GLCCI1</i>	235	<i>NCOA6</i>	313	<i>SERPINH1</i>
2	<i>ABCA12</i>	80	<i>CFTR</i>	158	<i>GMDS</i>	236	<i>NDUFA12</i>	314	<i>SEZ6L</i>
3	<i>ABCA8</i>	81	<i>CHRD1</i>	159	<i>GPR149</i>	237	<i>NEDD9</i>	315	<i>SH2B3</i>
4	<i>ABCG8</i>	82	<i>CHRN4</i>	160	<i>GRHL1</i>	238	<i>NEK9</i>	316	<i>SHROOM3</i>
5	<i>ABHD15-AS1</i>	83	<i>CKB</i>	161	<i>GUCY1A1</i>	239	<i>NFIB</i>	317	<i>SIK3</i>
6	<i>ACAD10</i>	84	<i>CLTCL1</i>	162	<i>GUK1</i>	240	<i>NME7</i>	318	<i>SKI</i>
7	<i>ACAD11</i>	85	<i>CNNM2</i>	163	<i>HDAC9</i>	241	<i>NOA1</i>	319	<i>SLC22A2</i>
8	<i>ACTR2</i>	86	<i>CNPY4</i>	164	<i>HECTD4</i>	242	<i>NOS3</i>	320	<i>SLC22A3</i>
9	<i>ACTRT2</i>	87	<i>COG5</i>	165	<i>HEMGN</i>	243	<i>NPC1</i>	321	<i>SLC25A21</i>
10	<i>ADAMTS7</i>	88	<i>COL4A1</i>	166	<i>HERPUD1</i>	244	<i>NRBP1</i>	322	<i>SLC2A12</i>
11	<i>ADAMTS9-AS2</i>	89	<i>COL4A2</i>	167	<i>HGFAC</i>	245	<i>NRP1</i>	323	<i>SLC30A3</i>
12	<i>ADAMTSL4-AS1</i>	90	<i>COL4A3BP</i>	168	<i>HHIPL1</i>	246	<i>OCRL</i>	324	<i>SLC39A8</i>
13	<i>ADI1P1</i>	91	<i>COL4A4</i>	169	<i>HIF1A1</i>	247	<i>OSM</i>	325	<i>SLK</i>
14	<i>AGT</i>	92	<i>CORO6</i>	170	<i>HIRA</i>	248	<i>PALLD</i>	326	<i>SMAD2</i>
15	<i>AHDC1</i>	93	<i>CUX2</i>	171	<i>HIVEP2</i>	249	<i>PCNX3</i>	327	<i>SMAD3</i>
16	<i>AKAP13</i>	94	<i>CWF19L2</i>	172	<i>HLA-DQB1</i>	250	<i>PCSK9</i>	328	<i>SMAD9</i>
17	<i>ALDH1A2</i>	95	<i>CYP1A1</i>	173	<i>HNFA</i>	251	<i>PDLIM5</i>	329	<i>SMARCA4</i>
18	<i>ALDH2</i>	96	<i>CYP1A2</i>	174	<i>HNFA-AS1</i>	252	<i>PDS5B</i>	330	<i>SMG6</i>
19	<i>ANGPTL4</i>	97	<i>CYP46A1</i>	175	<i>HNRNPM</i>	253	<i>PECAM1</i>	331	<i>SOX6</i>
20	<i>ANKRD13B</i>	98	<i>DAB1</i>	176	<i>HSF2BP</i>	254	<i>PGF</i>	332	<i>SRFBP1</i>
21	<i>ANKRD26</i>	99	<i>DAB2IP</i>	177	<i>HTRA1</i>	255	<i>PHACTR1</i>	333	<i>ST3GAL4</i>
22	<i>ANKRD31</i>	100	<i>DCLK2</i>	178	<i>IFT140</i>	256	<i>PHB</i>	334	<i>STAG1</i>
23	<i>ANKRD50</i>	101	<i>DENND5A</i>	179	<i>IGF2BP2</i>	257	<i>PIPSL</i>	335	<i>STK32B</i>
24	<i>ANKS1A</i>	102	<i>DHX58</i>	180	<i>IGF2R</i>	258	<i>PKD1L3</i>	336	<i>STN1</i>
25	<i>ANP32B</i>	103	<i>DNAH2</i>	181	<i>IL6R</i>	259	<i>PKD2L1</i>	337	<i>SUGP1</i>
26	<i>APLN</i>	104	<i>DNAJC13</i>	182	<i>ING1</i>	260	<i>PKN2</i>	338	<i>SUSD2</i>
27	<i>APOA5</i>	105	<i>DNAJC5B</i>	183	<i>INHBC</i>	261	<i>PLA2G7</i>	339	<i>SVEP1</i>
28	<i>APOB</i>	106	<i>DOCK5</i>	184	<i>INO80</i>	262	<i>PLCE1</i>	340	<i>SWAP70</i>
29	<i>APOC1</i>	107	<i>DOK7</i>	185	<i>INPP5D</i>	263	<i>PLCG1</i>	341	<i>TAB2</i>
30	<i>APOC1P1</i>	108	<i>DPYD</i>	186	<i>ITGB5</i>	264	<i>PLCG2</i>	342	<i>TBX20</i>

Таблица 1. Окончание

№	Ген	№	Ген	№	Ген	№	Ген	№	Ген
31	АРОЕ	109	<i>EDEM2</i>	187	<i>ITPK1</i>	265	<i>PLCL1</i>	343.	<i>TBXAS1</i>
32	АРОН	110	<i>EDN1</i>	188	<i>JCAD</i>	266	<i>PLEKHA7</i>	344.	<i>TCF21</i>
33	ARHGAP15	111	<i>EDNRA</i>	189	<i>KANK2</i>	267	<i>PLEKHG1</i>	345.	<i>TCF7L2</i>
34	ARHGAP26	112	<i>EEF1E1P1</i>	190	<i>KAT2A</i>	268	<i>PLEKHH2</i>	346.	<i>TDRD15</i>
35	ARHGAP42	113	<i>EFCAB13</i>	191	<i>KCNAB1</i>	269	<i>PLG</i>	347.	<i>TDRKH</i>
36	ARHGEF12	114	<i>EHBP1</i>	192	<i>KCNH7</i>	270	<i>PLPP3</i>	348.	<i>TEK</i>
37	ARHGEF26	115	<i>EHBP1L1</i>	193	<i>KCNK5</i>	271	<i>POC5</i>	349.	<i>TENT4A</i>
38	ARID4A	116	<i>EIF2B2</i>	194	<i>KLF14</i>	272	<i>POLK</i>	350.	<i>TGFB1</i>
39	ARL15	117	<i>ELL</i>	195	<i>KSR2</i>	273	<i>PPFIA1</i>	351.	<i>THADA</i>
40	ARNTL	118	<i>EML1</i>	196	<i>LDLR</i>	274	<i>PPHLN1</i>	352.	<i>THSD7A</i>
41	AS3MT	119	<i>EPB41L4A</i>	197	<i>LIPA</i>	275	<i>PPM1G</i>	353.	<i>TMEM106B</i>
42	ASZ1	120	<i>ERG</i>	198	<i>LIPC</i>	276	<i>PPP1R12B</i>	354.	<i>TMEM204</i>
43	ATF3	121	<i>ETV1</i>	199	<i>LIPC-AS1</i>	277	<i>PRDM16</i>	355.	<i>TMPRSS2</i>
44	ATP2B1	122	<i>EXOC3L2</i>	200	<i>LIPG</i>	278	<i>PRDM6</i>	356.	<i>TNS1</i>
45	ATXN2	123	<i>EXOC6</i>	201	<i>LMOD1</i>	279	<i>PRDM8</i>	357.	<i>TP53BP1</i>
46	ATXN2-AS	124	<i>FADD</i>	202	<i>LOXL1</i>	280	<i>PRIM2</i>	358.	<i>TRIB1</i>
47	BAZ1B	125	<i>FADS1</i>	203	<i>LPA</i>	281	<i>PRKCE</i>	359.	<i>TRIM5</i>
48.	<i>BCAP29</i>	126	<i>FADS2</i>	204	<i>LPAL2</i>	282	<i>PRKD2</i>	360.	<i>TSPAN14</i>
49.	<i>BCAS3</i>	127	<i>FAM114A1</i>	205	<i>LPL</i>	283	<i>PRKG1</i>	361.	<i>TSPAN9</i>
50.	<i>BCL3</i>	128	<i>FAM238C</i>	206	<i>LRFN2</i>	284	<i>PRMT5P1</i>	362.	<i>TTC39B</i>
51.	<i>BDNF</i>	129	<i>FAT4</i>	207	<i>LRP1</i>	285	<i>PROCR</i>	363.	<i>TWIST1</i>
52.	<i>BDNF-AS</i>	130	<i>FBXL20</i>	208	<i>LYRM2</i>	286	<i>PSD3</i>	364.	<i>UBE2Z</i>
53.	<i>BMP1</i>	131	<i>FES</i>	209	<i>MAML3</i>	287	<i>PSRC1</i>	365.	<i>UHRF1BP1</i>
54.	<i>BMPR1B</i>	132	<i>FGD6</i>	210	<i>MAP1S</i>	288	<i>PTK7</i>	366.	<i>UMPS</i>
55.	<i>BRAP</i>	133	<i>FGF5</i>	211	<i>MAP3K7CL</i>	289	<i>QRICH1</i>	367.	<i>UNC5C</i>
56.	<i>BSND</i>	134	<i>FHIT</i>	212	<i>MARK3</i>	290	<i>R3HDM2</i>	368.	<i>USP43</i>
57.	<i>BSX</i>	135	<i>FHL5</i>	213	<i>MARK4</i>	291	<i>RAB23</i>	369.	<i>VAMP5</i>
58.	<i>BTBD11</i>	136	<i>FKBP5</i>	214	<i>MAST4</i>	292	<i>RAB37</i>	370.	<i>VAMP8</i>
59.	<i>BTD</i>	137	<i>FLT1</i>	215	<i>MAT2A</i>	293	<i>RAI1</i>	371.	<i>VPS11</i>
60.	<i>BUD13</i>	138	<i>FMN2</i>	216	<i>MCF2L</i>	294	<i>RAPGEF2</i>	372.	<i>VPS37D</i>
61.	<i>C1GALT1</i>	139	<i>FN1</i>	217	<i>MCTP2</i>	295	<i>RBPMS2</i>	373.	<i>VWDE</i>
62.	<i>C1S</i>	140	<i>FNDC1</i>	218	<i>MERTK</i>	296	<i>REST</i>	374.	<i>WDR12</i>
63.	<i>C2</i>	141	<i>FNDC3B</i>	219	<i>MIA3</i>	297	<i>RF00019</i>	375.	<i>WDR33</i>
64.	<i>C5</i>	142	<i>FOXB2</i>	220	<i>MLXIPL</i>	298	<i>RF00285</i>	376.	<i>WNT3</i>
65.	<i>C9orf84</i>	143	<i>FOXC1</i>	221	<i>MMP13</i>	299	<i>RGL3</i>	377.	<i>XKR4</i>
66.	<i>CARF</i>	144	<i>FRMD5</i>	222	<i>MORF4L1</i>	300	<i>RHOA</i>	378.	<i>ZBTB20</i>
67.	<i>CARMIL1</i>	145	<i>FTMT</i>	223	<i>MORN1</i>	301	<i>RN7SKP66</i>	379.	<i>ZC3H12D</i>
68.	<i>CASC4</i>	146	<i>FTO</i>	224	<i>MRAS</i>	302	<i>RNU7-159P</i>	380.	<i>ZCCHC8</i>
69.	<i>CATSPER2P1</i>	147	<i>FURIN</i>	225	<i>MRV1</i>	303	<i>RRBP1</i>	381.	<i>ZEB2</i>
70.	<i>CCDC92</i>	148	<i>GABRB1</i>	226	<i>MTCO3P1</i>	304	<i>SAYSD1</i>	382.	<i>ZFHX3</i>
71.	<i>CCDC97</i>	149	<i>GALNT13</i>	227	<i>MTHFD1L</i>	305	<i>SBF2-AS1</i>	383.	<i>ZFPM2</i>
72.	<i>CCM2</i>	150	<i>GALNT2</i>	228	<i>MTHFR</i>	306	<i>SCAF11</i>	384.	<i>ZFPM2-AS1</i>
73.	<i>CD300LF</i>	151	<i>GCKR</i>	229	<i>MX1</i>	307	<i>SCARB1</i>	385.	<i>ZHX3</i>
74.	<i>CDH13</i>	152	<i>GDPD5</i>	230	<i>MYH11</i>	308	<i>SELENOI</i>	386.	<i>ZNF335</i>
75.	<i>CDKN2B-AS1</i>	153	<i>GGCX</i>	231	<i>MYL2</i>	309	<i>SEMA5A</i>	387.	<i>ZNF652</i>
76.	<i>CELSR2</i>	154	<i>GGT7</i>	232	<i>MYO9B</i>	310	<i>SEMA5B</i>	388.	<i>ZNF827</i>
77.	<i>CEP120</i>	155	<i>GIGYF2</i>	233	<i>N4BP2L2</i>	311	<i>SERPINA1</i>	389.	<i>ZNF831</i>
78.	<i>CETP</i>	156	<i>GIP</i>	234	<i>NAT2</i>	312	<i>SERPINA2</i>	390.	<i>ZPR1</i>

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящий момент накопленная информация об исследовании патогенеза ИБС свидетельствует, что в развитие данной патологии серьезный вклад вносят такие факторы как нарушения липидного обмена, атеросклероз, дисфункция эндотелия, наследственность [17]. Настоящее исследование выявило участие генов предрасположенности к ИБС в реализации механизмов воздействия перечисленных факторов.

Известно, что транспорт липопротеидов через барьер в субэндотелиальное пространство сосудов с накоплением там липопротеидов низкой плотности играет важную роль в патогенезе атеросклероза [18–21]. В настоящем исследовании выявлены группы генов, которые вовлечены в реализацию сигнальных путей Regulation of lipid metabolism by PPARalpha, Cholesterol metabolism, Linoleic acid (LA) metabolism. Кроме того, ряд генов предрасположенности к ИБС участвует в регуляции мембранного транспорта липидов, в частности клатрин-опосредованного эндоцитоза (clathrin-mediated endocytosis) липопротеинов низкой плотности, а также связан с транспортерами, обеспечивающими активный транспорт липидов (путь ABC transporters). Выявленный при анализе обогащения путь PPARA activates gene expression также связан с продукцией жирных кислот, липопротеинов низкой плотности, метаболизмом глюкозы.

Помимо изменений липидного обмена установлено, что уровень компонентов комплемента, его ингибитора (C1-ингибитор), а также фагоцитарной активности клеток свидетельствует о значительной активности данных систем у больных ИБС [22]. По полученным нами данным оказалось, что гены C2 и C5 ассоциированы с ИБС и вовлечены в сигнальный путь активации системы комплемента (activation of C3 and C5).

Показано, что под воздействием ряда факторов при развитии ИБС нарушается такая функция эндотелиальных клеток, как предотвращение активации процессов тромбообразования за счет ингибиторов тромбина и рецепторов для активации протеина C [23]. В норме эндотелий регулирует механизм свертывания крови через контроль экспрессии сайтов связывания для анти- и прокоагулянтных факторов на поверхности клетки [24]. В этот процесс вовлечены различные гены и сигнальные пути, в том числе системы, препятствующие наработке активных

форм кислорода: Txnrd2, ATG7 [25–28]. Sirt1/FoxO1 pathway играет важную роль в регуляции клеточной аутофагии для эндотелиоцитов, что уменьшает явления тромбоза [28]. Показано, что Card10 (caspase recruitment domain family member 10) является регулятором тромбин-индуцированной активации эндотелиоцитов и тромбоза, в то время как miR-181b ингибирует тромбин-индуцированную активацию сигналинга NF- κ B связыванием Card10.

По полученным нами данным, гены предрасположенности к ИБС вовлечены в сигнальные пути, связанные с регуляцией тромбообразования (complement and coagulation cascades, platelet activation, platelet homeostasis, hemostasis). Также исследуемые гены вовлечены в реализацию пути nitric oxide stimulates guanylate cyclase, который влияет на способность тромбоцитов к усилению агрегации. Учитывая, что тромбоциты активируются гемом, и макрофаги переключаются на воспалительный тип [29, 30], важное значение имеет выявленное в ходе исследования участие генов предрасположенности к ИБС в реализации сигналинга гема (heme signaling), и процессе коагуляции (путь gamma-carboxylation, transport, and amino-terminal cleavage of proteins).

Другой важный аспект развития ИБС – изменение регуляции тонуса сосудов, связанное с такими факторами вазодилатации как NO, prostacyclin (PGI₂) и endothelium-derived hyperpolarization factor (EDHF) [31], изменение концентрации кальция в цитоплазме эндотелия. Последнее, в свою очередь, модулируется несколькими сигнальными путями: активация эндотелиальных каналов TRPV4 включает расширение сосудов через увеличение концентрации Ca²⁺ и активацию рецепторов инозитол 1,4,5-трифосфата, которые освобождают Ca²⁺ из эндоплазматического ретикулума [32]. Нами выявлена группа генов, участвующая в процессах сокращения гладкой мускулатуры (smooth muscle contraction, vascular smooth muscle contraction). Также обнаружены гены, участвующие в процессах синтеза инозитол-3-фосфата и инозитол-4-фосфата в цитозоле, что также способствует выходу кальция из эндоплазматического ретикулума (путь synthesis of IP₃ and IP₄ in the cytosol).

В части изменений сосудистой стенки при ИБС пристально изучается накопление иммунных клеток (как воспалительный ответ) в субэндотелиальном слое коронарных артерий

Таблица 2. Группы выявленных путей, включающих гены предрасположенности к ИБС

№ п/п	Группы путей	Гены
1	ABC transporters	<i>ABCA1, ABCA12, ABCA8, ABCG8, CFTR</i>
2	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	<i>AGT, APOB, APOE, BMP1, COL4A1, COL4A2, COL4A4, EDN1, FHIT, FLT1, FN1, FURIN, HTRA1, ITGB5, LOXL1, MMP13, MYL2, NOS3, PECAM1, PGF, PLCE1, PLCG1, PLCG2, PLG, POLK, PPP1R12B, PRKCE, RHOA, SERPINH1, SMAD2, SMAD3, TGFB1</i>
3	Activation of C3 and C5	<i>C2, C5</i>
4	Aldosterone synthesis and secretion	<i>AGT ATP2B1, LDLR, PRKCE, PRKD2, SCARB1</i>
5	Biosynthesis of protectins	<i>CYP1A1, CYP1A2</i>
6	Caffeine metabolism	<i>CYP1A2, NAT2</i>
7	Cholesterol metabolism	<i>ABCA1, ABCA12, ABCA8, ABCG8, ALDH2, ANGPTL4, APOA5, APOB, APOC1, APOE, APOH, ATP2B1, BMP1, BSND, BTD, CETP, CFTR, CHRDL1, COL4A1, COL4A2, COL4A4, FN1, FTMT, FURIN, LDLR, LIPA, LIPC, LIPG, LOXL1, LPA, LPL, LRP1, MIA3, MMP13, MTHFD1L, MTHFR, NOS3, NPC1, PCSK9, PHB1, PLG, PLPP3, SCARB1, SERPINA1, SERPINH1, SLC22A2, SLC22A3, SLC2A12, SLC30A3, SLC39A8</i>
8	Clathrin-mediated endocytosis	<i>ACTR2, APOB, CFTR, CLTCL1, IGF2R, LDLR, OCRL, VAMP8</i>
9	Cohesin loading onto chromatin	<i>PDS5B, STAG1</i>
10	Complement and coagulation cascades	<i>C1S, C2, C5, PLG, PROCR, SERPINA1</i>
11	Establishment of sister chromatid cohesion	<i>PDS5B, STAG1</i>
12	Gamma-carboxylation, transport, and amino-terminal cleavage of proteins	<i>FURIN, GGCX</i>
13	Heme signaling	<i>APOB, ARNTL, NCOA6, RAI1</i>
14	Hemostasis	<i>APOB, APOH, ATP2B1, CARMIL1, DOCK5, FN1, GUCY1A1, INPP5D, IRAG1, ITPK1, MERTK, NOS3, PECAM1, PLCG1, PLCG2, PLG, PRKCE, PRKG1, PROCR, RHOA, SERPINA1, SH2B3, TEK, TGFB1, ZFPM2</i>
15	Linoleic acid (LA) metabolism	<i>FADS1, FADS2</i>
16	Methylation	<i>AS3MT, CYP1A2, MAT2A</i>
17	Neurophilin interactions with VEGF and VEGFR	<i>FLT1, NRP1</i>
18	Neurotransmitter clearance	<i>ALDH2, SLC22A2</i>
19	Nitric oxide stimulates guanylate cyclase	<i>GUCY1A1, IRAG1, NOS3, PRKG1</i>
20	Non-integrin membrane-ECM interactions	<i>BMP1, COL4A1, COL4A2, COL4A4, FN1, FURIN, HTRA1, ITGB5, LOXL1, MMP13, PECAM1, PLG, RHOA, SERPINH1, SKI, SMAD2, SMAD3, TGFB1</i>
21	O-glycosylation of TSR domain-containing proteins	<i>ADAMTS7, SEMA5A, SEMA5B, THSD7A</i>
22	O-linked glycosylation	<i>ADAMTS7, C1GALT1, GALNT13, GALNT2, SEMA5A, SEMA5B, ST3GAL4, THSD7A</i>
23	Organic cation transport	<i>SLC22A2, SLC22A3</i>
24	PPARA activates gene expression	<i>ABCA1, AGT, ANGPTL4, APOA5, ARNTL, CYP1A1, FADS1, GRHL1, NCOA6</i>
25	Peptide hormone metabolism	<i>AGT, EXOC6, GIP, INHBC, PLA2G7, TCF7L2</i>
26	Platelet activation	<i>ARHGEF12, GUCY1A1, NOS3, PLCG2, PRKG1, RHOA, TBXAS1, VAMP8</i>
27	Platelet homeostasis	<i>APOB, ATP2B1, GUCY1A1, IRAG1, NOS3, PECAM1, PRKG1</i>

Таблица 2. Окончание

№ п/п	Группы путей	Гены
28	RHOC GTPase cycle	<i>AKAP13, ANKRD26, ARHGAP15, ARHGAP26, ARHGAP42, ARHGEF12, ARHGEF26, CFTR, CKB, DOCK5, MCF2L, MYO9B, OCRL, PKN2, PLEKHG1, RHOA, SLK, SWAP70</i>
29	Rap1 signaling pathway	<i>FGF5, FLT1, MRAS, PGF, PLCE1, PLCG1, PRKD2, RAPGEF2, RHOA, TEK</i>
30	Ras signaling pathway	<i>BDNF, BRAP, FGF5, FLT1, KSR2, MRAS, PGF, PLCE1, PLCG1, PLCG2, RHOA, TEK</i>
31	Regulation of lipid metabolism by PPARalpha	<i>ABCA1, AGT, ANGPTL4, APOA5, ARNTL, CYP1A1, FADS1, GRHL1, NCOA6</i>
32	SLIT2:ROBO1 increases RHOA activity	<i>MYO9B, RHOA</i>
33	Signaling by receptor tyrosine kinases	<i>APOE, BDNF, COL4A1, COL4A2, COL4A4, FES, FGF5, FLT1, FN1, FURIN, GABRB, HGFAC, HNRNPM, NOS3, NRPI, PGF, PLCG1, PLG, PRKCE, REST, RHOA, SH2B3, TAB2, TRIB1</i>
34	Smooth muscle contraction	<i>GUCY1A1, ITGB5, LMOD1, MYH11</i>
35	Synthesis of IP3 and IP4 in the cytosol	<i>ACTR2, APOB, BDNF, EDN1, FLT1, FN1, IL6R, INPP5D, ITPK1, MERTK, NOS3, OCRL, PECAM1, PLCE1, PLCG1, PLCG2, PLPP3, PRKCE, PROCR, TEK, TGFBI</i>
36	VEGF binds to VEGFR leading to receptor dimerization	<i>FLT1, PGF</i>
37	VEGF ligand-receptor interactions	<i>FLT1, PGF</i>
38	Vascular smooth muscle contraction	<i>AGT, ARHGEF12, BMPR1B, EDN1, EDNRA, FES, GUCY1A1, IRAG1, MYH11, NRPI, PLCG1, PLCG2, PPP1R12B, PRKCE, PRKG1, RHOA, SEMA5A, SEMA5B, UNC5C</i>

[33–35]. Воспаление сосудистой стенки может индуцироваться такими факторами риска как артериальная гипертензия, гиперлипидемия, гипергликемия, активные формы кислорода. Цитокины TNF- α , IL-6, IL-8 и IL-18 усиливают воспалительный ответ, и, в результате связывания с соответствующими рецепторами и активации NF- κ B индуцируют экспрессию молекул адгезии в клетках эндотелия и лейкоцитах (E-селектин и P-селектин, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) и vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)), что усугубляет эндотелиальную дисфункцию [36, 37].

Дисбаланс между выработкой активных форм кислорода и системами антиоксидантной защиты также является важной причиной эндотелиальной дисфункции, приводящей к повреждению сосудов [38]. Окислительный стресс приводит к изменению регуляции сигнальных и метаболических путей, ответственных за выработку цитокинов, клеточный цикл, реализацию апоптоза. Полученные нами результаты свидетельствуют об участии генов предрасположенности к ИБС в данных процессах – AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, biosynthesis of protectins (регулирует синтез протектинов, обладающих мощным противовоспалительным действием).

Артериальная гипертензия как один из факторов описанных выше нарушений может возникать вследствие альдостерон-опосредованных изменений в системе адсорбции натрия и воды [39]. В настоящем исследовании выявлено, что гены предрасположенности к ИБС (в частности, гены ангиотензиногена и рецептора липопротеинов низкой плотности) вовлечены в сигнальный путь синтеза и секреции альдостерона (aldosterone synthesis and secretion), а также в метаболический путь peptide hormone metabolism. Ген цитохрома P450 *IA2* (CYP1A2), в свою очередь, вовлечен в реализацию метаболических путей methylation и caffeine metabolism, поскольку является важнейшим ферментом детоксикации и ответствен за расщепление кофеина, повышающего артериальное давление [40].

По полученным нами данным, гены переносчиков органических катионов *SLC22A2, SLC22A3* вовлечены в процессы organic cation transport. Установлено, что дефицит *SLC22A3* при ИБС значительно снижает липополисахарид-индуцированную воспалительную реакцию моноцитов путем прерывания сигнальных каскадов NF- κ B и MAPK гистаминзависимым образом [41].

Ген алкогольдегидрогеназы, являющийся геном предрасположенности к ИБС, по результа-

там исследования может оказывать влияние на сигналинг, связанный с клиренсом нейротрансмиттеров (neurotransmitter clearance) (в частности этанола) [42].

Помимо описанных выше факторов, также значительный вклад в развитие ИБС вносит нарушение функции полупроницаемого барьера эндотелия. Известно, что в норме гликокаликс благодаря отрицательному заряду, отталкивает тромбоциты, эритроциты и лейкоциты [43–46], а протеинсвязывающий комплекс поддерживает целостность эндотелия [47–51]. Гликокаликс включает в себя протеогликаны, гликозаминогликаны, гликопротеины. В состав последних входят три семейства молекул адгезии (селектинов, интегринов и суперсемейство иммуноглобулинов), экспрессия которых зависит от микроокружения. По результатам проведенного нами исследования, гены предрасположенности к ИБС участвуют в передаче сигнальной трансдукции *Rap1* и *Ras*, влияющих на процессы и молекулы адгезии. Так, *Ras signaling pathway* регулирует процессы клеточной пролиферации, выживаемости, апоптоза и роста, миграции и движений цитоскелета, задействуя пути регуляции актина цитоскелета, PI3K-Akt сигнальный путь, MAPK сигнальный путь, сигналинг Ca^{2+} , эндоцитоз. *Rap1 signaling pathway* (является частью предыдущего пути) контролирует процессы клеточной адгезии, образование межклеточных соединений и клеточную полярность. *Rap1* играет доминирующую роль в контроле взаимодействий клетка–клетка и клетка–матрикс, регулируя функцию интегринов и других молекул адгезии в различных типах клеток [52].

Вышеуказанные пути являются частью сигнальной трансдукции *signaling by receptor tyrosine kinases*, имея общие гены предрасположенности к ИБС *FGF5* (фактор роста фибробластов 5, влияет на митогенную активность и выживаемость клеток, вовлечен в процессы эмбрионального развития, клеточного роста, морфогенеза, восстановления тканей), *FLT1* (рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста 1 – участвует в стимулировании васкулогенеза и ангиогенеза), *PGF* (плацентарный фактор роста, вырабатывается эндотелиальными клетками), *PLCG1* (фосфолипаза C, гамма 1 – участвует в росте, миграции, апоптозе и пролиферации клеток), *RHOA* (вовлечен в регуляцию цитоскелета, связанную с образованием стресс-волокон актина и сократительной способностью актомиозина). Последний ген, по результатам проведенного анализа

обогащения путей, также вовлечен в реализацию сигнального пути *SLIT2:ROBO1 increases RHOA activity*, повышающего активность RHOA, и пути *RHO GTPase cycle*.

Оказалось, что гены, ассоциированные с ИБС, вовлечены также в реализацию сигнального пути *non-integrin membrane-ECM interactions*, когда мембранные белки (не интегрины) взаимодействуют с белками внеклеточного матрикса. Они могут связываться с интегринами и рецепторами факторов роста, влияя на их функцию, либо непосредственно оказывать влияние на актиновый цитоскелет.

Установлено, что у пациентов с ИБС имеются признаки повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови [53]. По результатам нашего исследования, гены предрасположенности к ИБС вовлечены в пути, регулирующие процессы репарации ДНК – *cohesin loading onto chromatin, establishment of sister Chromatid cohesion*.

Эндотелиальные клетки являются основным элементом для воздействия сосудистого эндотелиального фактора роста (*VEGF, vascular endothelial growth factor*) [54]. *VEGF* вырабатывается для стимулирования роста сосудов (как в эмбриональном развитии, так и в уже существующей сосудистой системе). Нами обнаружено, что ген предрасположенности к ИБС белка *VEGF* влияет на реализацию данных процессов через участие в сигнальных путях *neurophilin interactions with VEGF and VEGFR, VEGF binds to VEGFR leading to receptor dimerization, VEGF ligand-receptor interactions*.

За регуляцию ангиогенеза ответственны и метаболический путь пост трансляционной модификации белков – *O-linked glycosylation* и его часть – метаболический путь *O-glycosylation of TSR domain-containing proteins* [55], которые, по полученным данным, включают продукты генов предрасположенности к ИБС и ответственны за регуляцию воспаления, ангиогенеза.

Таким образом, гены предрасположенности к ИБС совместно вовлечены в реализацию различных механизмов развития данного заболевания, включая нарушения липидного метаболизма, изменения активности элементов системы комплемента, функции эндотелия. Наследственные факторы могут оказывать влияние на процессы регуляции тромбообразования, тонус сосудов,

баланс про- и антиокислительных факторов, проницаемость эндотелия, адсорбцию воды и натрия, а также процессы ангиогенеза. При этом исследуемые гены могут быть вовлечены в реализацию одного либо нескольких сигнальных/метаболических путей.

Выявление *in silico* генов, влияющих на процессы сигнальной трансдукции и метаболизма у больных ИБС, поможет сформировать новые знания о патогенезе данного заболевания. Последующие исследования, в том числе экспериментальные, будут использоваться для выявления новых молекулярных механизмов и в дальнейшем мишеней для фармакологической коррекции ИБС.

Финансовая поддержка при подготовке статьи не осуществлялась.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khan M.A., Hashim M.J., Mustafa H. et al. Global epidemiology of ischemic heart disease: Results from the global burden of disease study // *Cureus*. 2020. V. 12. № 7. <https://doi.org/10.7759/cureus.9349>
2. Colditz G.A., Stampfer M.J., Willett W.C. et al. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women // *Am. J. Epidemiol.* 1986. V. 123. P. 48–58. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114223>
3. Lewis D., Wang Q., Topol E.J. Ischaemic heart disease // *Nat. Encyclopedia Life Sciences*. 2002. V. 10. P. 508–515.
4. Shen G., Archacki S.R., Wang Q. The molecular genetics of coronary artery disease and myocardial infarction // *Acute Coronary Syndrome*. 2004. V. 6. P. 129–141. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000160373.77190.f1>
5. Slack J., Evans K.A. The increased risk of death from ischaemic heart disease in first degree relatives of 121 men and 96 women with ischaemic heart disease // *J. Med. Genet.* 1966. V. 2. P. 239–257. <https://doi.org/10.1136/jmg.3.4.239>
6. Wang Q., Pyeritz R.E. Molecular genetics of cardiovascular disease // *Textbook of Cardiovascular Medicine*. Edn 1. N. Y. Lippincott Williams & Wilkins, 2000. P. 1–12.
7. Wang Q., Chen Q. Cardiovascular disease and congenital defects // *Nat. Encyclopedia Life Sciences*. 2000. V. 3. P. 646–657.
8. Wang Q., Chen Q. Cardiovascular disease and congenital heart defects // *Nat. Encyclopedia Human Genome*. 2003. V. 1. P. 396–411.
9. Wang Q. Molecular genetics of coronary artery disease // *Curr. Opin. Cardiol.* 2005. V. 20. № 3. P. 182–188. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000160373.77190.f1>
10. MacArthur J., Bowler E., Cerezo M. et al. The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog) // *Nucl. Ac. Res.* 2017. V. 45. P. D896–D901. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1133>
11. Pinero J., Bravo A., Rosinach N.Q. et al. DisGeNET: A comprehensive platform, integrating information on human disease-associated genes and variants // *Nucl. Ac. Res.* 2017. V. 45. P. D833–D839. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw943>
12. Safran M., Dalah I., Alexander J. et al. GeneCards version 3: The human gene integrator // *Database (Oxford)*. 2010. <https://doi.org/10.1093/database/baq020>
13. Bindea G., Mlecnik B., Hackl H. et al. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 8. P. 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
14. Kanehisa M., Goto S., Kawashima S., Nakaya A. The KEGG databases at GenomeNet // *Nucl. Ac. Res.* 2002. V. 30. № 1. P. 42–46. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.42>
15. Fabregat A., Jupe S., Matthews L. et al. The reactome pathway knowledgebase // *Nucl. Ac. Resh.* 2018. V. 46. № D1. P. D649–D655. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1132>
16. Tang W., Hu J., Zhang H. et al. Kappa coefficient: A popular measure of rater agreement // *Shanghai Archives of Psychiatry*. 2015. V. 27. № 1. P. 62–67. <https://doi.org/10.11919/j.issn.1002-0829.215010>
17. Wilson P.W., D'Agostino R.B., Levy D. et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories // *Circulation*. 1998. V. 97. № 18. P. 1837–1847. <https://doi.org/10.1161/01.cir.97.18.1837>
18. Zhang X., Sessa W.C., Fernandez-Hernando C. Endothelial transcytosis of lipoproteins in atherosclerosis // *Front. Cardiovasc. Med.* 2018. V. 5. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00130>
19. Mehta D., Malik A.B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability // *Physiol. Rev.* 2006. V. 86. P. 279–367. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2005>
20. Rahimi N. Defenders and challengers of endothelial barrier function // *Front. Immunol.* 2017. V. 8.

- <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01847>
21. *Fung K.Y.Y., Fairn G.D., Lee W.L.* Transcellular vesicular transport in epithelial and endothelial cells: Challenges and opportunities // *Traffic*. 2018. V. 19. P. 5–18. <https://doi.org/10.1111/tra.12533>
 22. *Лапунова Л.Л.* Иммунологические изменения при некоторых заболеваниях сердечно-сосудистой системы // *Мед. новости*. 1996. № 11. С. 3–8.
 23. *van Hinsbergh V.W.* Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation // *Semin. Immunopathol.* 2012. V. 34. № 1. P. 93–106. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0285-5>
 24. *Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J. et al.* The vascular endothelium and human diseases // *Int. J. Biol. Sci.* 2013. V. 9. P. 1057–1069. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>
 25. *Kirsch J., Schneider H., Pagel J.-I. et al.* Endothelial dysfunction, and a prothrombotic, proinflammatory phenotype is caused by loss of mitochondrial thioredoxin reductase in endothelium // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016. V. 36. P. 1891–1899. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307843>
 26. *Lin J., He S., Sun X. et al.* MicroRNA-181b inhibits thrombin-mediated endothelial activation and arterial thrombosis by targeting caspase recruitment domain family member 10 // *FASEB J.* 2016. V. 30. P. 3216–3226. <https://doi.org/10.1096/fj.201500163R>
 27. *Yau J.W., Singh K.K., Hou Y. et al.* Endothelial-specific deletion of autophagy-related 7 (ATG7) attenuates arterial thrombosis in mice // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2017. V. 154. P. 978–988. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.02.058>
 28. *Wu Q., Hu Y., Jiang M. et al.* Effect of autophagy regulated by sirt1/foxo1 pathway on the release of factors promoting thrombosis from vascular endothelial cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20174132>
 29. *Donegan R.K., Moore C.M., Hanna D.A., Reddi A.R.* Handling heme: The mechanisms underlying the movement of heme within and between cells // *Free Radic. Biol. Med.* 2019. V. 133. P. 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.005>
 30. *Gouveia Z., Carlos A.R., Yuan X. et al.* Characterization of plasma labile heme in hemolytic conditions // *FEBS J.* 2017. V. 284. № 19. P. 3278–3301. <https://doi.org/10.1111/febs.14192>
 31. *Sandoo A., van Zanten J.J., Metsios G.S. et al.* The endothelium and its role in regulating vascular tone // *Open Cardiovasc. Med. J.* 2010. V. 4. P. 302–312. <https://doi.org/10.2174/1874192401004010302>
 32. *Heathcote H.R., Lee M.D., Zhang X. et al.* Endothelial TRPV4 channels modulate vascular tone by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release at inositol 1,4,5-trisphosphate receptors // *Br. J. Pharmacol.* 2019. V. 176. P. 3297–3317. <https://doi.org/10.1111/bph.14762>
 33. *Gao W., Liu H., Yuan J. et al.* Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF-alpha mediated NF-kappaB pathway // *J. Cell. Mol. Med.* 2016. V. 20. P. 2318–2327. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12923>
 34. *Herrero-Fernandez B., Gomez-Bris R., Somovilla-Crespo B., Gonzalez-Granado J.M.* Immunobiology of atherosclerosis: A complex net of interactions // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20215293>
 35. *Marchio P., Guerra-Ojeda S., Vila J.M. et al.* Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019. V. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8563845>
 36. *Nafisa A., Gray S.G., Cao Y. et al.* Endothelial function and dysfunction: Impact of metformin // *Pharmacol. Ther.* 2018. V. 192. P. 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.007>
 37. *Silva I.V.G., de Figueiredo R.C., Rios D.R.A.* Effect of different classes of antihypertensive drugs on endothelial function and inflammation // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20143458>
 38. *Incalza M.A., D'Oria R., Natalicchio A.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases // *Vascul. Pharmacol.* 2018. V. 100. P. 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
 39. *Guagliardo N.A., Yao J., Hu C., Barrett P.Q.* Mini review: Aldosterone biosynthesis: Electrically gated for our protection // *Endocrinology.* 2012. V. 153. № 8. P. 3579–3586. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1339>
 40. *Palatini P., Ceolotto G., Ragazzo F. et al.* CYP1A2 genotype modifies the association between coffee intake and the risk of hypertension // *J. Hypertens.* 2009. V. 27. № 8. P. 1594–1601. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32832ba850>
 41. *Li L., He M., Zhou L. et al.* A solute carrier family 22 member 3 variant rs3088442 G→A associated with coronary heart disease inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 9. P. 5328–5340. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.584953>
 42. *Abraham K.P., Salinas A.G., Lovinger D.M.* Alcohol and the brain: Neuronal molecular targets, synapses, and circuits // *Neuron.* 2017. V. 96. № 6. P. 1223–1238. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.032>
 43. *Pries A.R., Secomb T.W., Gaetgens P.* The endothelial surface layer // *Pflug. Arch.* 2000. V. 440. P. 653–666. <https://doi.org/10.1007/s004240000307>
 44. *Buonassisi V.* Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures // *Exp. Cell Res.* 1973. V. 76. P. 363–368. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(73\)90388-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(73)90388-1)
 45. *Gerrity R.G., Richardson M., Somer J.B. et al.* Endothe-

- lial cell morphology in areas of *in vivo* Evans blue uptake in the aorta of young pigs. II. Ultrastructure of the intima in areas of differing permeability to proteins // *Am. J. Pathol.* 1977. V. 89. P. 313–334.
46. Baldwin A.L., Winlove C.P. Effects of perfusate composition on binding of ruthenium red and gold colloid to glycocalyx of rabbit aortic endothelium // *J. Histochem. Cytochem.* 1984. V. 32. P. 259–266.
<https://doi.org/10.1177/32.3.6198357>
47. Schnittler H.J. Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium // *Basic Res. Cardiol.* 1998. V. 93. № 3. P. 30–39.
<https://doi.org/10.1007/s003950050205>
48. Lampugnani M.G. Endothelial cell-to-cell junctions: adhesion and signaling in physiology and pathology // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. V. 2.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006528>
49. Simionescu M., Simionescu N., Palade G.E. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature // *J. Cell Biol.* 1975. V. 67. P. 863–885.
<https://doi.org/10.1083/jcb.67.3.863>
50. Dejana E., Corada M., Lampugnani M.G. Endothelial cell-to-cell junctions // *FASEB J.* 1995. V. 9. P. 910–918.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.9.10.7615160>
51. Simionescu M., Antohe F. Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies // *The Vascular Endothelium I.* Berlin; Heidelberg: Springer. 2006. P. 41–69.
https://doi.org/10.1007/3-540-32967-6_2
52. Boettner B., Van Aelst L. Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009. V. 21. P. 684–693.
<https://doi.org/10.1016/j.cceb.2009.06.004>
53. Shah N., Meira L.B., Elliott R.M. et al. DNA damage and repair in patients with coronary artery disease: Correlation with plaque morphology using optical coherence tomography (decode study) // *Cardiovasc. Res.* 2019. V. 20. № 9. P. 812–818.
<https://doi.org/10.1016/j.carrev.2019.04.028>
54. Melincovici C.S., Boşca A.B., Şuşman S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2018. V. 59. № 2. P. 455–467.
55. Adams J.C., Tucker R.P. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: Diverse proteins with related roles in neuronal development // *Dev. Dyn.* 2000. V. 218. № 2. P. 280–299.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200006\)218:2<280::AID-DVDY4>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<280::AID-DVDY4>3.0.CO;2-0)

Analysis of the Involvement of Susceptibility Genes to to Coronary Heart Disease in Implementation Signaling and Metabolic Pathways

N. Yu. Chasovskikh¹, E. E. Shestakova¹, *

¹Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: evgenika06@gmail.com

Coronary heart disease (CHD) is a common pathology, and its development is mediated by a large number of genetic factors, environmental factors and their combinations. In this regard, the objective of the study was a bioinformatic analysis of the involvement of susceptibility genes to CHD in the implementation of signaling and metabolic pathways. The list of susceptibility genes was compiled using GWAS, DisGeNET and GeneCards databases. Pathway enrichment analysis was performed using the ClueGO v2.5.9 Cytoscape v3.9.1 plugin. As a result of the study, it was established that these genes are involved in the implementation of various mechanisms of development of CHD, including disorders of lipid metabolism, changes in the activity of elements of the complement system, and endothelial function. Hereditary factors can influence changes in the processes of regulation of thrombus formation, vascular tone, the balance of pro- and antioxidant factors, endothelial permeability, water and sodium adsorption, as well as the processes of angiogenesis. In this case, the genes under study may be involved in the implementation of one or several signaling/metabolic pathways.

Keywords: CHD, susceptibility genes, pathway enrichment analysis, Cytoscape, ClueGO.

УДК 575.174

ОЦЕНКА СКОРОСТИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ МУТАЦИЙ В STR-ЛОКУСАХ Y-ХРОМОСОМЫ В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

© 2024 г. Д. С. Адамов¹, С. А. Федорова^{1,*}

¹Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677013 Россия

*e-mail: sardaanafedorova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После доработки 25.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Впервые описана тонкая структура гаплогруппы N3a2-M1982 Y-хромосомы по данным полного секвенирования 23 мужчин, коренных жителей Якутии, с учетом как SNP-, так и STR-мутаций. Скорость мутирования STR-маркеров Y-хромосомы в якутской популяции была откалибрована по радиоуглеродной датировке образца средневекового мужчины Yana Young, найденного в нижнем течении р. Яна в Якутии. Полученные нами оценки константы интенсивности STR-мутаций в 23-маркерных гаплотипах ветви N3a2-M1991 с применением трех различных вариантов расчета (0.0032, 0.0024, 0.0032) оказались несколько ниже общемирового среднего значения по данным YHRD (0.0033), и выше усредненной “генеалогической” скорости мутирования (0.0021), но в пределах доверительного интервала не противоречат современным представлениям о скорости возникновения STR-мутаций в Y-хромосоме.

Ключевые слова: Y-хромосома, саха (якуты), STR-локусы, скорость мутирования.

DOI: 10.31857/S0016675824040099 **EDN:** CQYBUR

Якутская популяция уникальна по своим генетическим характеристикам: от известных в мире генетических изолятов она отличается выраженным эффектом основателя по отцовской линии – более 80% всех линий Y-хромосомы мужчин-саха принадлежат к гаплогруппе N3a2 [1–3] (или N1a1a1a1a4a1 по номенклатуре Международного общества генетической генеалогии 2019–2020 гг., <https://isogg.org/tree/>.) Эта гаплогруппа, возникшая в эпоху неолита (~7.1 тыс. лет назад согласно [2], ~6.2 тыс. лет назад по данным YFull), имеет очень широкий ареал распространения. Помимо Сибири, Средней Азии и Монголии, гаплогруппа N3a2 встречается в Китае и Корее, а также на Ближнем Востоке и в Европе, с максимумом частот в популяциях Якутии ([2]; <https://www.yfull.com/tree/>).

“Якутская” ветвь гаплогруппы N3a2 определяется маркерами M1982, M1995, M2003, M2032, M2038, M2103, M2108, M2122, Y25014 и по данным полногеномного секвенирования, опубликованным в базе <https://www.yfull.com/tree/>, имеет относительно небольшой возраст ~2000 лет (95%ДИ 2700–1400 лет назад). При этом время возникновения ближайшего общего предка (TMRCA) для мужчин-саха составляет ~1.35 тыс. лет (95%ДИ 1800–900 лет назад).

Структура этой ветви была частично реконструирована нами на основе SNP-маркеров и TMRCA оценен в ~1270 ± 250 лет назад [4]. В настоящей работе мы впервые описали тонкую структуру “якутской” N3a2-1982 гаплогруппы Y-хромосомы по данным полного секвенирования 23 мужчин, коренных жителей Якутии, с учетом как SNP-, так и STR-мутаций, и провели оценку скорости возникновения STR-мутаций в якутской популяции в сравнении с показателями скорости мутирования, предложенными другими авторами.

Для оценки скорости мутирования STR-маркеров Y-хромосомы в нашей работе применен оригинальный подход с использованием радиоуглеродной датировки образца средневекового мужчины Yana Young [8], который расположен на филогенетическом дереве близко к общему предку большинства современных якутов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для реконструкции тонкой структуры N3a2-M1982 ветви Y-хромосомы были использованы данные полного секвенирования 16 образцов мужчин-саха (HGDP00960, HGDP00964, HGDP00968, HGDP00953, HGDP00948,

HGDP00952, HGDP00961, HGDP00954,
 HGDP00965, HGDP00945, HGDP00969,
 HGDP00951, HGDP00950, HGDP00946,
 HGDP00949, HGDP00947), доступных из открытой базы данных HGDP (Human Genome Diversity Project) [5] а также одного эвенка SRR1822287 и одного эвена SRR1822619 из работы [6], трех саха и одного эвена Yak22076, Yak14333, Yak20490, Even16166 из работы [7], одного саха YF01684 из работы [4] и одного древнего образца Yana Young средневекового мужчины, обнаруженного в нижнем течении р. Яна на северо-востоке Якутии [8]. Число tandemных повторов в STR-локусах проверялось по инсерциям или делециям STR-мотива против референсного значения в BAM файле.

Длины поколений в якутской популяции были рассчитаны на основании анализа генеалогий 712 семей из Намского, Верхнеколымского, Среднеколымского, Нижнеколымского и Эльгетского улусов, восстановленных по ревизским сказкам от 1768, 1795, 1816, 1858 гг., церковным метрическим книгам за период с 1768 по 1918 гг. и материалам переписи 1917 г. [9]. Длина мужского поколения у якутов составляет в среднем 35.7 лет [9].

При расчете скорости возникновения STR-мутаций исходили из радиоуглеродной датировки образца Yana Young, располагающегося близко к корню одной из ветвей гаплогруппы N3a2-1982, диагностируемой маркером M1991. Возраст древнего образца Yana Young был определен в работе [8] методом ускорительной масс-спектрометрии в 862 ± 26 лет и с учетом калибровки составляет ~ 766 календарных лет с момента смерти. Образец представляет собой левую малоберцовую кость мужчины 20–35 лет, ростом около 160 см.

Скорость возникновения STR-мутаций Y-хромосомы в якутской популяции была подсчитана тремя способами.

Оценка константы интенсивности STR-мутаций (μ) при первом и втором вариантах расчета проводилась по формуле:

$$\mu = \frac{N_{STR}}{lM},$$

где N_{STR} – количество STR-мутаций относительно предкового гаплотипа, зависящее от способа подсчета; l – число STR-локусов, M – общее число мейозов.

При прямом способе подсчет STR-мутаций проводился от STR-гаплотипа каждого образца до STR-гаплотипа ближайшего общего предка ветви N3a2-M1991. Общее число мейозов равно:

$$M = nT,$$

где n – объем выборки, T – число поколений до точки калибровки ~ 800 лет назад (примерная дата рождения средневекового мужчины Yana Young).

Второй вариант расчета был основан на подсчете числа STR-мутаций на ветвях филогенетического дерева N3a2-M1991. Число независимых мейозов оценивалось по числу SNP-мутаций, произошедших в участках combBED Y-хромосомы, в которых однонуклеотидные мутации надежно идентифицируются [4]:

$$M = N_{SNP}t,$$

где N_{SNP} – число SNP мутаций на ветвях N3a2-M1991, t – среднее число поколений, приходящееся на одну SNP мутацию:

$$t = \frac{nT}{N_T},$$

где N_T – общее число накопленных SNP-мутаций от гаплотипов всех образцов до гаплотипа ближайшего общего предка гаплогруппы N3a2-M1991.

Третий вариант расчета основывался на ρ -статистике одношаговых STR-мутаций, реализованной в программе для построения медианных сетей Network 10.2. Средняя скорость STR-мутаций была определена при значении TMRCA равном ~ 800 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Структура “якутской” N3a2-M1982 – гаплогруппы Y-хромосомы, построенная по SNP-маркерам 23 современных мужчин и одного древнего образца Yana Young, представлена на рис. 1. Для каждого из современных образцов было проведено сопоставление с 23-маркерными Y-STR гаплотипами PowerPlex Y23 (рис. 1,б), что позволило определить положение STR-мутаций на ветвях филогенетического дерева. Всего на филогенетическом дереве N3a2-1982 выявлено 23 независимых одношаговых STR-мутаций в 23 локусах (рис. 1,а), из них 14 – на ветви N3a2-M1991.

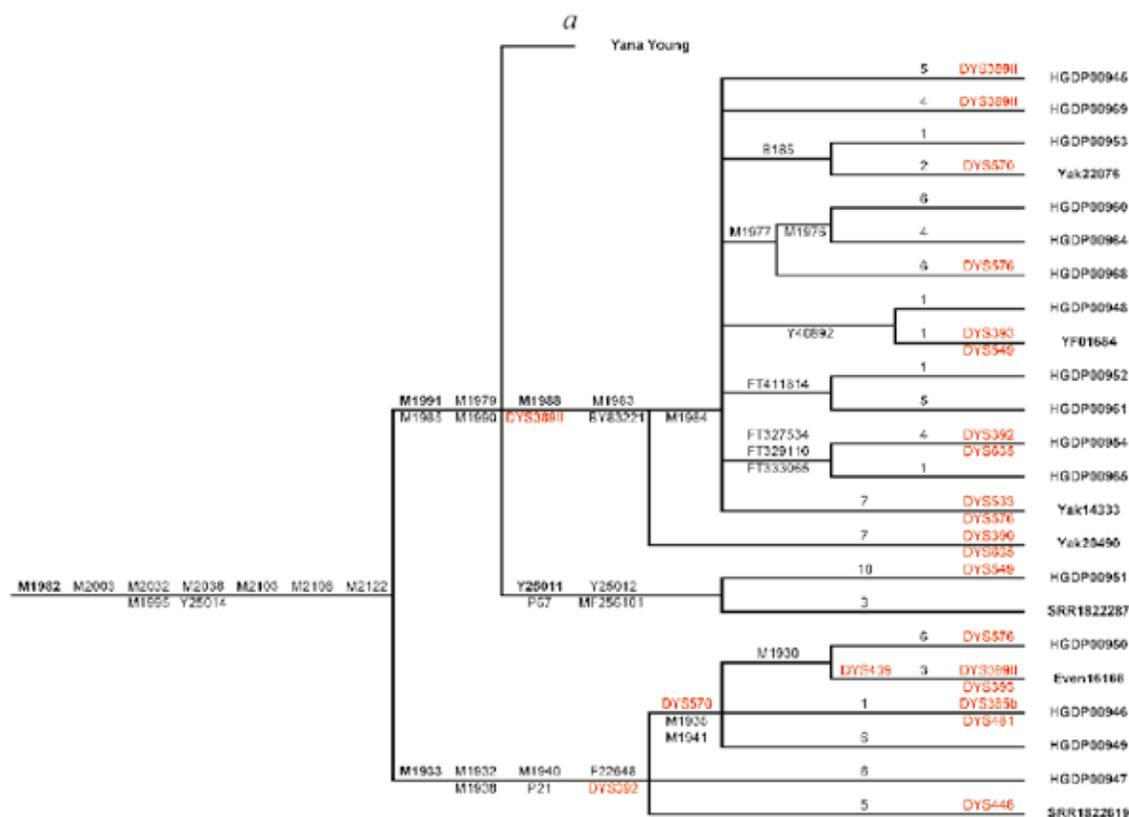


Рис. 1. Филогенетическое дерево гаплогруппы N3a2-M1982. *a* – структура филогенетического дерева, реконструированная по данным полного секвенирования Y-хромосом 23 мужчин, коренных жителей Якутии. SNP-мутации указаны на ветвях черным шрифтом, STR-мутации – красным.

Первый вариант расчета. При расчете константы интенсивности мутаций в STR-локусах в качестве предкового был выбран гаплотип Ht3 [10], как наиболее близкий к линии древнего мужчины Yana Yang (рис. 1, б). Количество мутаций было подсчитано относительно предкового гаплотипа Ht3, который в формате записи локусов *DYS19*, *DYS385a*, *DYS385b*, *DYS389I*, *DYS389II*, *DYS390*, *DYS391*, *DYS392*, *DYS393*, *DYS437*, *DYS438*, *DYS439*, *DYS448*, *DYS456*, *DYS458*, *DYS481*, *DYS533*, *DYS549*, *DYS570*, *DYS576*, *DYS635*, *DYS643*, *GATA H4* выглядит следующим образом: 14-11-13-14-31-23-11-16-14-14-11-10-19-14-16-20-11-12-19-16-22-12-12.

В 17 образцах гаплогруппы N3a2-M1991 было накоплено 28 одношаговых STR-мутаций относительно предкового гаплотипа. Длина поколения у якутов, рассчитанная по генеалогическим данным 712 семей якутов XVIII–XX вв., составляет ~35.7 лет [9]. Мейоз у древнего мужчины произошел ~800 лет назад соответственно, число поколений до предкового гаплотипа по данной модели равно $800/35.7 = 22.4$. Таким

образом, при прямом расчете константа интенсивности STR-мутаций составляет $28/(17 \times 23 \times 22.4) = 0.0032$ мутаций на локус на поколение (95%ДИ: 0.0006–0.0079). Погрешность, рассчитанная по гамма-распределению [11], при данном способе расчета велика, поскольку половина мутаций не является независимой. Основной вклад в величину ковариации вносит локус *DYS389II* (рис. 1).

Второй вариант расчета. С целью определения совокупного времени, за которое возникли мутации, было построено модельное дерево, основанное на SNP-мутациях, которые обнаружены во всех образцах данной выборки в пределах участков combBED Y-хромосомы. Однуклеотидные мутации образуют на этом дереве 23 сегмента, отмеченных желтым цветом (рис. 2). Всего на дереве идентифицировано 77 SNP-мутаций, попадающих в участки combBED. На рис. 1 число их указано поверх линий ветвей дерева в желтых сегментах. Каждая SNP-мутация определяет независимый сегмент модельного дерева (является аналогом числа поколений). Число STR-мутаций, соответствующих каждому

б

	DYS19	DYS385a	DYS385b	DYS389I	DYS389II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	DYS437	DYS438	DYS439	DYS448	DYS456	DYS458	DYS481	DYS533	DYS549	DYS570	DYS576	DYS635	DYS643	GATAH4
Yakut	14	11	13	14	31	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	31	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	18	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	17	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	13	14	11	10	19	14	16	20	11	13	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	15	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	23	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	12	12	19	17	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	32	24	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	21	12	12
Yakut	14	11	13	14	31	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	13	19	16	22	12	12
Evenk	14	11	13	14	31	23	11	16	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	31	23	11	15	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	18	17	22	12	12
Even	14	11	13	14	30	23	11	15	15	14	11	11	19	14	16	20	11	12	18	16	22	12	12
Yakut	14	11	14	14	31	23	11	15	14	14	11	10	19	14	16	21	11	12	18	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	31	23	11	15	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	18	16	22	12	12
Yakut	14	11	13	14	31	23	11	15	14	14	11	10	19	14	16	20	11	12	19	16	22	12	12
Even	14	11	13	14	31	23	11	15	14	14	11	10	18	14	16	20	11	12	no	16	22	12	12

Рис. 1. Окончание. Филогенетическое дерево гаплогруппы N3a2-M1982. б – 23-маркерные STR-гаплотипы 23-х мужчин, включенных в выборку. Справа указаны доминирующие в якутской популяции гаплотипы Ht1, Ht2, Ht3.

из желтых сегментов, отмечено зеленым цветом. Всего на дереве 14 независимых одношаговых STR-мутаций.

Среднее расстояние от каждого из 17 образцов до точки калибровки равно в среднем 6.647 SNP-мутаций. Если число поколений до предкового гаплотипа по данной модели равно $800/35.7 = 22.4$, то на одну SNP-мутацию приходится в среднем $22.4/6.647 = 3.37$ поколений. Следовательно, общая длина ветвей модельного дерева составляет $77 \times 3.37 = 259$ поколений.

Константа интенсивности STR-мутаций при данном способе расчета составляет: $14/(23 \times 259) = 0.0024$ мутаций на локус на поколение (95%ДИ: 0.0013–0.0039).

Преимущество этого подхода заключается в том, что расчет сделан исключительно по независимым событиям, точность оценки при этом значительно выше, чем при расчете первым способом. Вероятно, что одной из причин расхождения с результатами первого варианта расчета является статистическая погрешность, обусловленная относительно небольшим объемом исследованной нами выборки.

Третий вариант расчета. Третий вариант оценки константы интенсивности STR-мутаций основывался на алгоритме программы Network 10.2. Из составленной нами базы данных, включающей 562 гаплотипа гаплогруппы N3a2-M2019, были отобраны 39 образцов, у которых было известно максимальное число повторов по STR-маркерам построенного нами

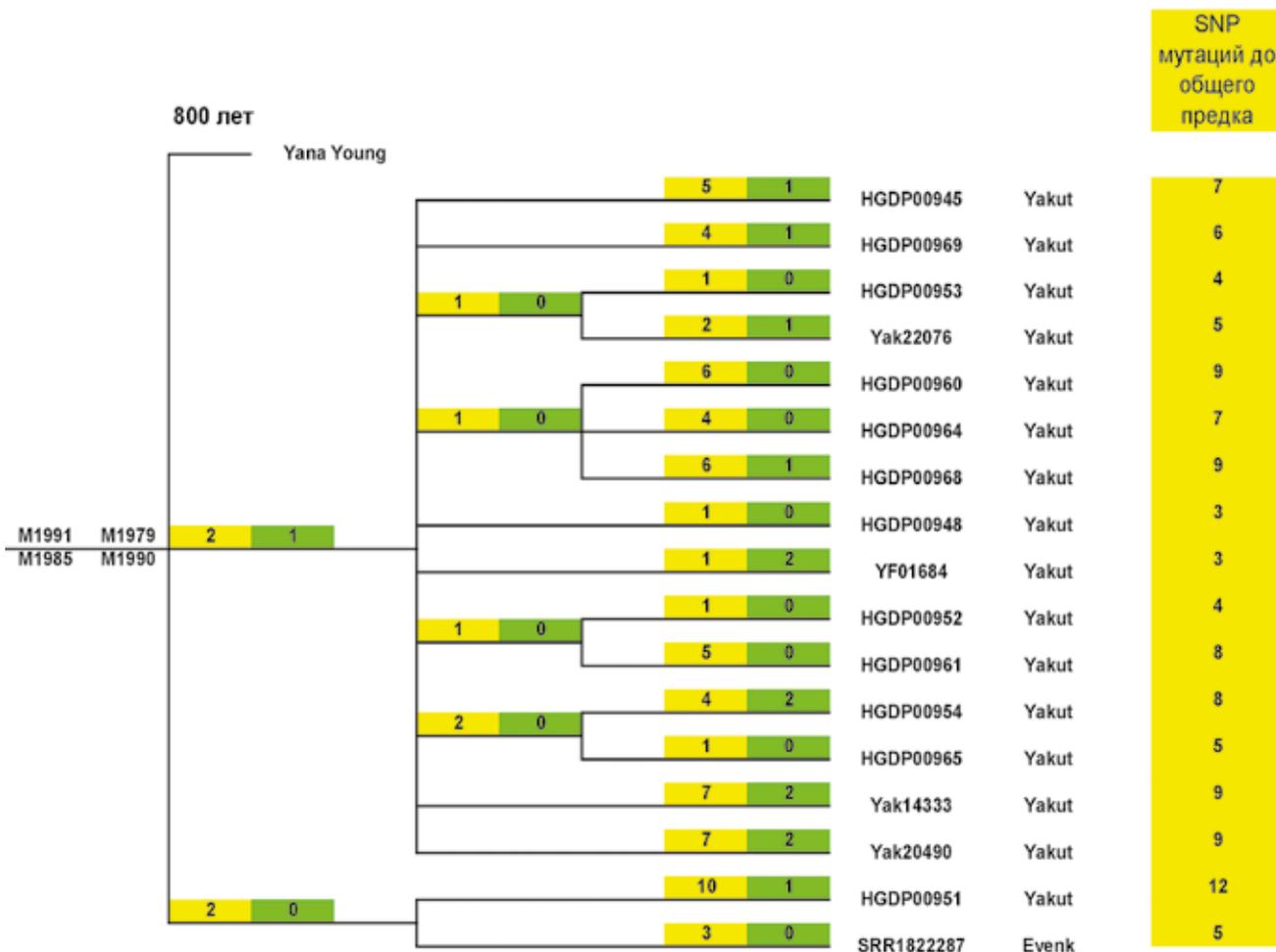


Рис. 2. Модельное дерево гаплогруппы N3a2-M1991. На ветвях дерева на желтом фоне указано число SNP-мутаций, на зеленом – число STR-мутаций.

филогенетического дерева. В том числе 21 образец – 23-маркерные гаплотипы из работ: [4] – 1, [7] – 3, [12] – 15, [6] – 1, [13] – 1; 18 гаплотипов – 21-маркерные из работы [14]. Филогенетическая сеть была построена по принципу median-joining с одинаковым весом для всех локусов, равным 10, и параметром $\epsilon = 0$ (рис. 3). Путем изменения переменной “скорости мутации” установили предельный возраст дерева 800 лет. Константа скорости STR-мутаций при данном подходе оказалась равной 0.0032 на локус на поколение продолжительностью 35.7 лет (95%ДИ: 0.0008–0.0071). Способ расчета, реализованный в программе Network, близок к нашему первому варианту, соответственно, погрешность при оценке третьим способом также велика.

ОБСУЖДЕНИЕ

Скорость мутирования STR-маркеров является наиболее важным параметром при расчете

времени коалесценции кластеров Y-хромосомы. Различия между скоростями мутирования, предложенными разными авторами, до недавнего времени представляли собой предмет оживленных дискуссий. Подробный анализ ранних работ, касающихся определения скорости мутаций и генетических датировок, был сделан в обзоре [15]. Подсчитанная по родословным “генеалогическая” скорость мутирования для разных наборов STR-локусов, в том числе 17 локусов набора Yfiler, составила в среднем ~0.0021 мутаций на локус на поколение [16–18]. Позднее скорость мутирования среднестатистического локуса была рассчитана по 170 STR в работе [19] и получено то же значение – 0.0021. С другой стороны, “эволюционная” скорость возникновения мутаций, откалиброванная по популяциям с документированной историей (маори Новой Зеландии и островов Кука, цыгане Болгарии) имела значение 0.00069 [20]. Компромиссное решение вопроса столь больших различий было пред-

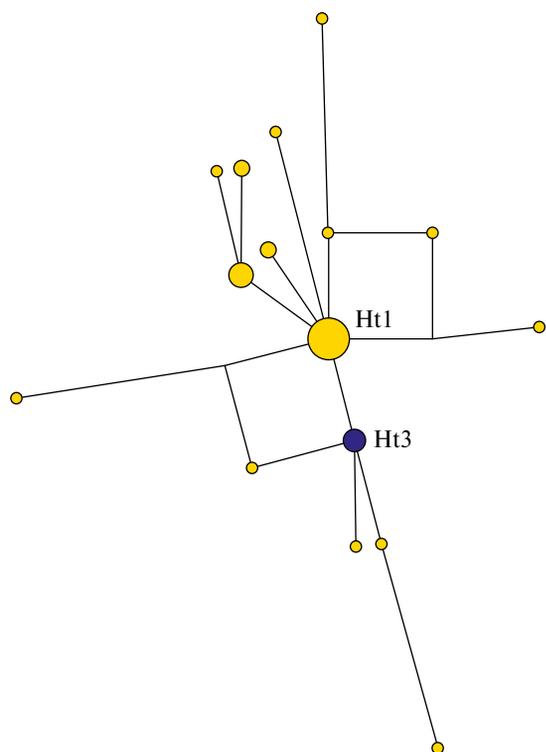


Рис. 3. Филогенетическая сеть 23-маркерных STR-гаплотипов ($n = 39$) ветви N3a2-M1991. Предковый гаплотип Ht3 изображен синим цветом.

ложено в работе [7]: авторами было выдвинуто предположение, что “эволюционная” скорость подходит для более древних гаплогрупп возрастом порядка 30 тыс. лет, а “генеалогическая” — для молодых гаплогрупп возрастом в пределах 5–10 тыс. лет.

Наиболее полная подборка научных сведений о скорости Y-STR мутаций в настоящее время содержится в базе данных Y Chromosome Haplotype Reference Database (YHRD) [21]. Для набора из 23 локусов PowerPlex Y23 константа интенсивности STR-мутаций составляет в среднем 0.0033 мутаций на локус на поколение (95%ДИ 0.0031–0.0035), что намного больше, чем описанная выше среднестатистическая “генеалогическая” скорость.

В настоящей работе нами впервые был применен редкий подход оценки скорости мутирования в Y-STR-локусах, основанный на построении генеалогического дерева по данным массового параллельного секвенирования, с использованием калибровки возраста по радиоуглеродному датированию древнего образца. До сих пор калибровка по древним образцам была использована только в двух рецензируемых работах при оценке

Таблица 1. Показатели скорости возникновения STR-мутаций в Y-хромосоме по данным различных авторов

	Константа интенсивности STR-мутаций в Y-хромосоме	Количество STR-локусов, набор	Популяция	Авторы
1	0.0032 (95%ДИ: 0.0006–0.0079) 0.0024 (95%ДИ: 0.0013–0.0039) 0.0032 (95%ДИ: 0.0008–0.0071)	23 STR локуса, PowerPlex Y23	саха (якуты)	[Настоящее исследование]
2	~0.00069 “эволюционная” скорость	10 STR-локусов	маори Новой Зеландии и островов Кука, цыгане Болгарии	[20]
3	~0,0021 “генеалогическая” скорость	170 STR-локусов	Аргентина, Бразилия, Колумбия, Португалия, Испания, Венесуэла, США и др.	[16-19]
4	0.0033 (95%ДИ 0.0031–0,0035)	23 STR-локуса, PowerPlex Y23	Общепринятые данные Y Chromosome Haplotype Reference Database (YHRD)	[21]
5	0.00217 (95%ДИ 0.0015–0.0031)	23 STR-локуса, PowerPlex Y23	корейцы	[23]
6	0.0041 (95%ДИ: 0.0029–0.0058).	23 STR-локуса, PowerPlex Y23	корейцы	[24]
7	0.00285 (95%ДИ: 0.00243–0.00332)	23 STR-локуса, PowerPlex Y23	северные китайцы	[25]
8	0.00535 (95%ДИ: 0.00485–0.00589) для “R1b”; 0.0043 (95%ДИ: 0.00347–0.00465) для “I & J”	42 STR-локуса	Бельгия	[26]
9	0.0056 (95%ДИ: 0.0035–0.0086)	21 STR-локус из набора PowerPlex Y23 (без <i>DYS549</i> и <i>DYS643</i>)	японцы	[27]

Таблица 2. Средняя длина аллелей в Y-STR-локусах набора PowerPlex Y23

Y-STR-локус	Средняя скорость мутирования по YHRD	Предковый гаплотип гаплогруппы N3a2-M1991	Проект 1000 Genomes, <i>n</i> = 576	Проект HGDP, <i>n</i> = 669	Различия в длинах STR-повторов, в среднем
<i>DYS19</i>	0.0022	14	14.8	14.7	
<i>DYS385a</i>	0.0028	11	13.1	12.9	-2
<i>DYS385b</i>	0.0028	13	16.2	15.9	-3.1
<i>DYS389I</i>	0.0024	14	13.0	13.0	+1
<i>DYS389II</i>	0.0050	32	29.5	29.5	+2.5
<i>DYS390</i>	0.0020	23	23.3	23.2	
<i>DYS391</i>	0.0023	11	10.3	10.2	
<i>DYS392</i>	0.0004	16	12.2	12.1	+3.9
<i>DYS393</i>	0.0013	14	13.1	13.1	
<i>DYS437</i>	0.0012	14	14.5	14.4	
<i>DYS438</i>	0.0004	11	10.7	10.5	
<i>DYS439</i>	0.0045	10	11.7	11.4	-1.6
<i>DYS448</i>	0.0012	19	19.5	19.6	
<i>DYS456</i>	0.0041	14	15.2	15.2	-1.2
<i>DYS458</i>	0.0065	16	16.7	16.7	
<i>DYS481</i>	0.0037	20	23.7	23.4	-3.6
<i>DYS533</i>	0.0027	11	11.4	11.2	
<i>DYS549</i>	0.0030	12	12.1	11.9	
<i>DYS570</i>	0.0080	19	17.9	17.9	+1.1
<i>DYS576</i>	0.0116	16	17.6	17.4	-1.5
<i>DYS635</i>	0.0044	22	21.7	21.7	
<i>DYS643</i>	0.0010	12	11.2	10.7	
<i>GATAH4</i>	0.0025	12	11.5	11.5	

скорости мутирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в Y-хромосоме [22, 7]. Результаты расчетов константы по первому и второму вариантам в настоящей работе находятся ниже среднемирового значения (0.0033) [21], но в пределах погрешности не противоречат величине константы интенсивности мутаций YHRD (табл. 1). Наиболее точная оценка по второму варианту расчета – 0.0024 мутаций на локус на поколение (95%ДИ: 0.0013–0.0039) – составляет всего 70% от скорости по данным YHRD и ближе к “генеалогической” скорости.

Похожий результат был получен в работе [23], рассчитанный по генеалогиям 620 пар “отец–сын” у корейцев. Для константы интенсивности мутаций в 23-маркерных гаплотипах авторы получили значение 0.00217 на локус на поколение, 95%ДИ 0.0015–0.0031. При этом в другой работе [24] оценка константы по 363 парам “отец–сын” для популяции корейцев существенно выше – 0.0041 мутаций на локус на поколение (95%ДИ: 0.0029–0.0058). У северных хань (Китай) константа интенсивности мутаций для STR локусов PowerPlex Y23 была измерена по генеалогиче-

ским данным 2548 пар “отец–сын” и составила 0.00285 мутаций на локус на поколение (95%ДИ: 0.00243–0.00332) [25] (табл. 1).

Кроме того, могут существовать и другие причины различий в константе интенсивности STR-мутаций. Известно, что STR-мутации возникают с разной скоростью в Y-хромосомах из разных гаплогрупп. В работе [26] опубликованы данные о достоверной разнице в константах для гаплогрупп R1b и I&J. Скорость возникновения STR-мутаций у японцев, у которых доминируют гаплогруппы O-M268 и D-M64.1, оказалась выше, чем у европейцев [27]. Авторы объясняют причину расхождений разной длиной STR-повторов: чем больше tandemных повторов в локусе, тем выше вероятность мутации [28].

С целью определения различий в длинах STR-повторов в табл. 2 приведены данные по средней длине tandemных повторов в образцах проектов 1000 Genomes [29] и HGDP [30] в сравнении с предковым гаплотипом Ht3 “якутской” ветви N3a2-M1991. Различия между гаплотипом Ht3 и средними значениями STR-повторов

в базах данных международных проектов, превышающие один мутационный шаг, наблюдаются в следующих локусах: положительные – в четырех локусах *DYS389I*, *DYS389II*, *DYS392* и *DYS570*, отрицательные – в шести локусах *DYS385a*, *DYS385b*, *DYS439*, *DYS456*, *DYS481* и *DYS576*. При этом совокупная скорость мутирования в локусах с отрицательными различиями превышает совокупную скорость мутирования в локусах с положительными различиями – 0.0295 против 0.0158 по сводным данным YHRD (табл. 2). Баланс этих показателей указывает на более низкую скорость мутирования STR-локусов гаплогруппы N3a2-M1991 в сравнении с общемировыми данными YHRD, что соответствует нашим расчетам константы интенсивности мутаций.

Таким образом, полученные нами оценки константы интенсивности мутаций STR-локусов в 23-маркерных гаплотипах ветви N3a2-M1991 с применением трех различных вариантов расчета (0.0032, 0.0024, 0.0032) оказались несколько ниже общемирового среднего значения по данным YHRD (0.0033) и выше “генеалогической” скорости мутирования (0.0021), но в пределах доверительного интервала не противоречат современным представлениям о скорости возникновения STR-мутаций в Y-хромосоме.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FSRG-2023-0003) “Генетические особенности населения Северо-Востока России: реконструкция генетической истории, механизмы адаптации и старения, возраст-зависимые и наследственные заболевания”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fedorova S.A., Reidla M., Metspalu E. et al. Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): Implications for the peopling of Northeast Eurasia // BMC Evol. Biology. 2013. V. 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-127>
2. Ilumäe A.M., Reidla M., Chukhryaeva M. et al. Human Y chromosome haplogroup N: A non-trivial time-resolved phylogeography that cuts across language families // Am. J. Hum. Genet. 2016, V. 99. P. 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.025>
3. Федорова С.А., Хуснутдинова Э.К. Особенности структуры генофонда и генетическая история саха (якутов) // Генетика. 2022. Т. 58. № 12. С. 1349–1366. <https://doi.org/10.1134/S1022795422120031>
4. Адамов Д.С. Якутская ветвь игрек-хромосомы в составе гаплогруппы N-M2016 // Сибирские исследования. 2022. Т. 2. № 8. С. 6–14. <http://doi.org/10.33384/26587270.2022.08.02.01r>
5. Bergström A., McCarthy S., Hui R. et al. Insights into human genetic variation and population history from 929 diverse genomes // Science. 2020. V. 367(6484). <https://doi.org/10.1126/science.aay5012>
6. Wong E., Khrunin A., Nichols L. et al. Reconstructing genetic history of Siberian and Northeastern European populations // Genome Res. 2015. V. 27. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1101/gr.202945.115>
7. Karmin M., Saag L., Vicente M. et al. A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture // Genome Res. 2015. V. 25. P. 459–466. <https://doi.org/10.1101/gr.186684.114>
8. Sikora M., Pitulko V., Sousa V. et al. The population history of Northeastern Siberia since the Pleistocene // Nature. 2019. V. 570 (7760). P. 182–188. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1279-z>
9. Федорова С.А., Попова С.А., Мордосова М.Л., Старостина М.И. Длина поколения в якутской популяции в XVIII–XIX вв. // Якутский мед. журнал. 2023. Т. 3 (83). С. 21–24. <https://doi.org/10.25789/YMJ.2023.83.05>
10. Zvenigorosky V., Duchesne S., Romanova L. et al. The genetic legacy of legendary and historical Siberian chieftains // Communication Biology. 2020. V. 3(1). P. 581. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01307-3>
11. Shi W., Ayub Q., Vermeulen M. et al. A worldwide survey of human male demographic history based on Y-SNP and Y-STR data from the HGDP-CEPH populations // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. № 2. P. 385–393. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp243>
12. Gao T., Yun L., Gu Y. et al. Phylogenetic analysis and forensic characteristics of 12 populations using 23 Y-STR loci // Forensic Sci. Int. Genet. 2015. V. 19. P. 130–133. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.07.006>
13. Davis C., Ge J., Chidambaram A. et al. Y-STR loci diversity in native Alaskan populations // Int. J. Legal Med. 2011. V. 125. № 4. P. 559–563. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0568-3>
14. Zvenigorosky V., Crubézy E., Gibert M. et al. The genetics of kinship in remote human groups // Forensic Sci. Int. Genet. 2016. V. 25. P. 52–62.

- <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.07.018>
15. *Балановский О.П., Запороженко В.В.* Хромосома-летописец: датировки генетики, события истории, соблазн ДНК-генеалогии January // *Генетика*. 2016. Т. 52. № 7. С. 810–830.
<https://doi.org/10.7868/S0016675816070043>
 16. *Gusmão L., Sánchez-Diz P., Calafell F. et al.* Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites // *Hum. Mutat.* 2005. V. 26. № 6. P. 520–528.
<https://doi.org/10.1002/humu.20254>
 17. *Sánchez-Diz P., Alves C., Carvalho E. et al.* Population and segregation data on 17 Y-STRs: Results of a GEPISFG collaborative study // *Int. J. Legal Med.* 2008. V. 122. № 6. P. 529–533.
<https://doi.org/10.1007/s00414-008-0265-z>
 18. *Ge J., Budowle B., Aranda X.G. et al.* Mutation rates at Y chromosome short tandem repeats in Texas populations // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2009. V. 3. № 3. P. 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.01.007>
 19. *Burgarella C., Navasques M.* Mutation rate estimates for 110 Y-chromosome STRs combining population and father-son pair data // *Eur. J. Hum. Genet.* 2011. V. 19. № 1. P. 70–75. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.154>
 20. *Zhivotovsky L.A., Underhill P.A., Cinnioglu C. et al.* The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. № 1. P. 50–61. <https://doi.org/10.1086/380911>
 21. *Willuweit S., Roewer L.* The new Y Chromosome Haplotype Reference Database // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V. 15. P. 43–48.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.024>
 22. *Fu Q., Li H., Moorjani P. et al.* Genome sequence of a 45000-year-old modern human from Western Siberia // *Nature*. 2014. V. 514. P. 445–449.
<https://doi.org/10.1038/nature13810>
 23. *Lee D.G., Kim S.J., Cho W.C. et al.* Analysis of mutation rates and haplotypes of 23 Y-chromosomal STRs in Korean father-son pairs // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2023. V. 65. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102875>
 24. *Oh Y.N., Lee H.Y., Lee E.Y. et al.* Haplotype and mutation analysis for newly suggested Y-STRs in Korean father-son pairs // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V. 15. P. 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.023>
 25. *Liu Z., Long G., Lang Y. et al.* Sequence-based mutation patterns at 41 Y chromosomal STRs in 2 548 father-son pairs // *Forensic Sci. Res.* 2023. V. 8. № 2. P. 152–162. <https://doi.org/10.1093/fsr/owad016>
 26. *Claerhout S., Vandenbosch M., Nivelles K. et al.* Determining Y-STR mutation rates in deep-rooting genealogies: Identification of haplogroup differences // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018. V. 34. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.01.005>
 27. *Otagiri T., Sato N., Asamura H. et al.* RMplex reveals population differences in RM Y-STR mutation rates and provides improved father-son differentiation in Japanese // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2022. V. 61. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102766>
 28. *Ralf A., Gonzalez D.M., Zandstra D. et al.* Large-scale pedigree analysis highlights rapidly mutating Y-chromosomal short tandem repeats for differentiating patrilineal relatives and predicting their degrees of consanguinity // *Hum. Genet.* 2023. V. 142. № 1. P. 145–160.
<https://doi.org/10.1007/s00439-022-02493-2>
 29. *Willems T., Gymrek M., Poznik G.D. et al.* Population-scale sequencing data enable precise estimates of Y-STR mutation rates // *Am. J. Hum. Genet.* 2016. V. 98. № 5. P. 919–933.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.04.001>
 30. *Ballantyne K.N., Keerl V., Wollstein A. et al.* A new future of forensic Y-chromosome analysis: Rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012. V. 6. № 2. P. 08–218. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.017>

Mutation Rate Estimates for Y Chromosomal STRs in the Yakut Population

D. S. Adamov¹, S. A. Fedorova^{1, *}

¹*Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, 677013 Russia*

**e-mail: sardanaafedorova@mail.ru*

The fine structure of the Y chromosome haplogroup N3a2-M1982 has been described, based on complete sequencing data of 23 men, indigenous residents of Yakutia, taking into account both SNP and STR mutations. The rate of mutation of STR markers of the Y chromosome in the Yakut population was calibrated using radiocarbon dating of a sample of a medieval man, Yana Young, found in the lower reaches of the Yana River in Yakutia. Our estimates of the mutation intensity constant of STR loci in 23 marker haplotypes of the N3a2-M1991 branch using 3 different calculation options (0.0032, 0.0024, 0.0032) turned out to be slightly lower than the global average value according to YHRD data (0.0033), and higher than the average over frequently used for STR loci a “genealogical” mutation rate (0.0021), but within the confidence interval do not contradict modern ideas about STR mutations rate of the Y chromosome.

Keywords: Y chromosome, Sakha (Yakuts), STR loci, mutation rate.

УДК 575.224.23

ИНДЕКС МЕТИЛИРОВАНИЯ РЕТРОТРАНСПОЗОНА LINE-1 КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ СЕСТРИНСКИХ ХРОМАТИДНЫХ ОБМЕНОВ И ЧАСТОТОЙ АБЕРРАЦИЙ ХРОМАТИДНОГО ТИПА У ПЕРСОНАЛА РАДИОХИМИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА С ИНКОРПОРИРОВАННЫМ ПЛУТОНИЕМ-239

© 2024 г. С. А. Васильев^{1,*}, Е. Н. Толмачева¹, Е. А. Саженова¹, Н. Н. Суханова¹,
Ю. С. Яковлева^{1,2}, Н. Б. Торхова¹, М. Б. Плаксин³, И. Н. Лебедев^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

³Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства, Северск, 636035 Россия

*e-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 03.11.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Уровень хромосомных аномалий в соматических клетках взрослых индивидов характеризуется значительной межиндивидуальной изменчивостью, на которую частично могут влиять генетические и эпигенетические факторы. При этом эпигенетический ландшафт в клетках в значительной степени определяется метилированием генома. Цель настоящего исследования – анализ взаимосвязи между глобальным метилированием генома и частотой хромосомных аномалий в лимфоцитах работников, работавших с плутонием. В лимфоцитах 40 мужчин-работников радиохимического предприятия (Северск, Россия) с инкорпорированным плутонием-239 и 49 здоровых мужчин-добровольцев, которые не подвергались профессиональному воздействию ионизирующего излучения, были проанализированы частоты хромосомных aberrаций, микроядер, анеуплоидии хромосом 2, 7, 8, 12, X и Y и уровень сестринских хроматидных обменов. Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 был оценен как хорошо известный маркер глобального метилирования генома. В группе работников по сравнению с контролем были достоверно выше частоты центромеро-негативных микроядер ($4.74 \pm 2.26\%$ против $3.02 \pm 1.69\%$), aberrаций хромосомного типа (0.81 ± 0.79 против $0.44 \pm 0.69\%$) и суммарного хромосомного нерасхождения (0.93 ± 0.43 против $0.50 \pm 0.25\%$) ($p < 0.05$). Индекс метилирования LINE-1 достоверно не отличался между группой работников и контрольной группой (74.93 ± 3.63 против $73.92 \pm 4.62\%$). В контрольной группе наблюдалась корреляция между метилированием LINE-1 и частотой микроядер ($R = -0.35, p = 0.031$), тогда как в группе работников отмечались корреляции между индексом метилирования LINE-1 и частотой aberrаций хроматидного типа ($R = -0.42, p = 0.012$) (но не aberrаций хромосомного типа) и уровнем сестринских хроматидных обменов ($R = -0.53, p = 0.004$). Таким образом, гипометилирование LINE-1 после воздействия плутония связано главным образом с репарированными или неправильно репарированными разрывами хроматид.

Ключевые слова: работники радиохимического производства, метилирование LINE-1, aberrации хроматидного типа, сестринские хроматидные обмены, микроядерный тест, анеуплоидия.

DOI: 10.31857/S0016675824040106 EDN: CQPQMJ

Уровень хромосомных аномалий в соматических клетках взрослых индивидов характеризуется значительной межиндивидуальной изменчивостью [1], на которую частично могут влиять генетические и эпигенетические факторы. При этом одним из основных компонентов эпигенетического ландшафта в клетке является метилирование ДНК.

Ретротранспозон LINE-1 наиболее распространен в геноме человека, и индекс метили-

рования его промотора является хорошо известным маркером глобального метилирования генома [2]. В нескольких исследованиях было показано, что индекс метилирования LINE-1 может снижаться после воздействия различных мутагенов, включая ионизирующее излучение [3–9], при этом промоторы отдельных генов в этом случае гиперметилируются [10]. Однако неизвестно, пропорциональны ли эти изменения уровня метилирования генома частоте структур-

ных и численных хромосомных аномалий, которые возникают в соматических клетках человека после мутагенного воздействия.

Ранее мы наблюдали повышенную частоту анеуплоидии и хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови индивидов с инкорпорированным плутонием-239 [11]. Цель настоящего исследования – анализ взаимосвязей между глобальным метилированием генома и частотами хромосомных aberrаций, анеуплоидии и сестринскими хроматидными обменами в лимфоцитах работников, работающих на радиохимическом производстве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования и культивирование

Образцы периферической цельной крови были получены у 40 мужчин-пенсионеров радиохимического предприятия (Северск, Россия) с инкорпорированным плутонием-239 (средний возраст 57.0 ± 8.3 , 36–67 лет, 22 курящих, 18 некурящих) и 49 здоровых мужчин-добровольцев из Томска и Северска (Россия), которые не подвергались профессиональному воздействию ионизирующего излучения (средний возраст 52.8 ± 9.9 , 22–69 лет, 26 курящих, 23 некурящих). Среди участников не было лиц, злоупотребляющих алкоголем. У работников радиохимического производства активность инкорпорированного плутония-239 составляла от 43 до 9028 Бк (1974 ± 2426 Бк). Всеми участниками исследования было подписано информированное согласие. Анализируемые группы не отличались по возрасту ($p > 0.05$).

Образцы цельной крови (1.5 мл) здоровых индивидов отбирали в вакуумных пробирках с гепарином натрия (Greiner, Германия) и культивировали в 6 мл среды RPMI 1640 (Панэко, Россия) с 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS) (HyClone, США) в присутствии 20 мкг/мл фитогемагглютинаина. Для метафазного анализа культуры обрабатывали 0.06 мкг/мл демекольцина через 70 ч и фиксировали в метанол : уксусной кислоте (3 : 1) на 72 ч. Для анализа уровня сестринских хроматидных обменов в культуральную смесь добавляли 0.24 мкМ 5'-бром-2'-дезоксисуридина (BrdU) (Sigma, США) (10 мкг/мл) с последующей обработкой демекольцином через 70 ч и фиксацией через 72 ч после начала культивирования. Для анализа частоты микроядер, хромосомного нерасхождения и отставания в

двухядерных клетках добавляли цитохалазин В (Sigma, США) в концентрации 6 мкг/мл через 44 ч культивирования и фиксировали клетки через 72 ч в метанол : уксусной кислоте (3 : 1).

Высушенные предметные стекла с метафазными пластинками окрашивали 5%-ным раствором красителя Гимза в течение 10 мин. Микроскопический анализ более 300 метафаз на образец при увеличении в 1000 раз был проведен с помощью светового микроскопа Axio Imager M1 (Zeiss, Германия), а изображения были получены с помощью CCD-камеры (Applied Spectrum Imaging, США).

Анализ сестринских хроматидных обменов

Препараты для исследования сестринских хроматидных обменов (СХО) готовили из стимулированных ФГА-стимулированных культур клеток периферической крови. Для дифференциального окрашивания СХО на начальном этапе в культуральную смесь добавляли 5-бромдезоксисуридин в конечной концентрации 10 мкг/мл. Клетки для анализа СХО собирали через 72 ч культивирования путем трипсинизации, центрифугировали и ресуспендировали в 0.075 М KCl при 37°C в течение 40 мин перед фиксацией в метанол : уксусной кислоте (3 : 1). Препараты метафазных хромосом готовили на холодных влажных предметных стеклах перед окрашиванием красителем Гимза в течение 15 мин и воздействием ультрафиолетового излучения в течение 12 мин. Окрашенные метафазы визуализировали с помощью светового микроскопа Axio Imager M1 (Zeiss, Германия), а изображения получали с помощью CCD-камеры (Applied Spectrum Imaging, США). На каждой метафазной пластинке регистрировали количество хромосом и обменов. Хромосомы, которые явно перекрывались или скручивались, были исключены из подсчета. Подсчет СХО проводили на 50 метафазных пластинках для каждого индивида.

Микроядерный тест в комбинации с флуоресцентной in situ гибридизацией

Микроядерный тест проводили в сочетании с флуоресцентной *in situ* гибридизацией (FISH) с панцентромерными и центромеро-специфичными ДНК-зондами. Панцентромерный ДНК-зонд был сгенерирован методом ПЦР, как описано [12], и помечен TAMRA-dUTP (БиоСан, Россия) с использованием ник-трансляции. Центромеро-специфичные ДНК-зонды для хромосом 2, 7, 8, 12, X и Y были получе-

ны с использованием клонов плазмид *E. coli*. Флуоресцентную метку (TAMRA-dUTP или Fluorescein-dUTP) включали в ДНК-зонды с использованием стандартной реакции ник-трансляции [13]. Специфичность полученных ДНК-зондов оценивали на нормальных метафазных пластинках человека.

FISH проводили следующим образом. Предметные стекла с фиксированными лимфоцитами трижды промывали в $2\times$ SSC по 5 мин при 37°C и в 0.01%-ном пепсине (Sigma, США) в течение 10 мин при 37°C . Затем предметные стекла подвергали фиксации в 1%-ном параформальдегиде (Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре, промывали PBS в течение 5 мин и обезвоживали в 70-, 80-, 100%-ном этаноле по 5 мин в каждом. Панцентромерные ДНК-зонды или два центромерно-специфичных ДНК-зонда, меченных различными флуорофорами, в буфере для гибридизации (50%-ного деионизированного формамида (Sigma, США), 12.5%-ного декстрансульфата (Sigma, США), 0.1 мкг/мкл ДНК спермы лосося (Sigma, США)) добавляли на предметные стекла с последующей денатурацией в течение 5 мин при 75°C и гибридизацией в течение ночи при температуре 37°C во влажной камере (ThermoBrite, Германия). После промывки в $0.4\times$ SSC, 0.3%-ным Nonidet P-40 (Amresco, США) в течение 2 мин при 70°C и $2\times$ SSC, 0.1%-ным Nonidet P-40 в течение 5 мин при комнатной температуре клетки окрашивали и заключали в Vectashield с красителем DAPI (VectorLabs, США) под покровным стеклом.

Частоты микроядер и анеуплоидий анализировали с помощью микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия) с фильтрами для DAPI, TAMRA и FITC в 2000 и 1000 двухъядерных клеток соответственно. Микроядро считалось центромерно-позитивным (MnC+) или центромерно-негативным (MnC-) в зависимости от наличия или отсутствия флуоресцентного сигнала панцентромерного ДНК-зонда. Комбинации сигналов 3 : 1, 4 : 0 для аутосом и 2 : 0 для половых хромосом в двухъядерных клетках рассматривались как результаты нерасхождения хромосом. Хромосомное отставание оценивали как частоту хромосомоспецифичных центромерно-позитивных микроядер.

Анализ метилирования LINE-1

Геномную ДНК выделяли из цельной крови стандартным методом фенол-хлороформной

экстракции. Бисульфитную конверсию ДНК проводили с использованием набора EZ DNA methylation Direct Kit (Zymo Research, США) в соответствии с протоколом производителя. Индекс метилирования ретротранспозона LINE-1 определяли методом пиросеквенирования с использованием набора PyroMark Q24 CpG LINE-1 (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Образцы для ПЦР содержали буфер (1.5 мм MgCl_2 , 0.2 мм каждого dNTP, по 1 мкл прямого и обратного праймеров (по 10 мкм каждый)), 2 единицы HotStart Taq-полимеразы и 1 мкл ДНК (после бисульфитной конверсии) общим объемом 25 мкл. Условия ПЦР были следующими: первичная денатурация, 15 мин при 95°C ; 45 циклов: 20 с при 95°C , 20 с при 50°C и 20 с при 72°C ; и финальная элонгация, 5 мин при 72°C . Размер продукта ПЦР составил 149 пн. Биотинилированный продукт ПЦР был очищен, и одноцепочечная ДНК была иммобилизована в соответствии с рекомендациями производителя. Затем к каждому образцу добавляли 0.3 мкм праймера для пиросеквенирования и проводили реакцию с использованием пиросеквенатора PyroMark Q24 (Qiagen, Германия). Индекс метилирования рассчитывали как отношение метилированного цитозина к сумме метилированных и неметилированных цитозинов с использованием программного обеспечения PyroMark Q24 в трех CpG-сайтах промоторной области LINE-1 (позиции 318, 321 и 328 в GenBank X58075.1).

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения STATISTICA 8.0 (Statsoft, США). Сравнение между группами проводилось с помощью *U*-критерия Манна–Уитни. Корреляции были проанализированы с использованием теста ранговой корреляции Спирмена. Для всех анализов различия были приняты как статистически значимые при $p < 0.05$. Числовые данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группе работников радиохимического производства частота центромерно-негативных микроядер, aberrаций хромосомного типа и суммарной частоты нерасхождения хромосом 2, 7, 8, 12, X и Y были достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0.001$) (табл. 1). Однако индекс метилирования LINE-1 существенно не различался между группами.

Индекс метилирования LINE-1 и частота каких-либо хромосомных аномалий не коррелировали ни с возрастом индивидов как в группе работников радиохимического производства ($R = 0.12, p = 0.61$), так и в контрольной группе ($R = -0.04, p = 0.77$), ни с активностью плутония-239 в группе работников.

В группе работников радиохимического производства индекс метилирования LINE-1 значимо коррелировал с частотой aberrаций хроматидного типа (рис. 1,б). Однако не было обнаружено корреляции между индексом метилирования LINE-1 и частотой aberrаций хромосомного типа (рис. 1,з). Более того, была также обнаружена корреляция между индексом метилирования LINE-1 и уровнем сестринских хроматидных обменов в группе работников радиохимического производства (рис. 1,е). В контрольной группе не было обнаружено корреляции частот хромосомных aberrаций и уровня сестринских хроматидных обменов с индексом метилирования LINE-1 (рис. 1,а, в, д).

В контрольной группе наблюдалась корреляция между индексом метилирования LINE-1 и общей частотой микроядер ($R = -0.35, p = 0.031$) (рис. 1,ж). Корреляции между индексом метилирования LINE-1 и частотами отдельно MnC- и MnC+ были статистически незначимыми ($R = -0.26, p = 0.10$ и $R = -0.19, p = 0.23$ соответственно). В группе работников радиохимического производства значимых корреляций не наблюдалось ($R = 0.07, p = 0.75$ и $R = -0.02, p = 0.94$ для MnC- и MnC+ соответственно) (рис. 1,з). Суммарная частота хромосомного нерасхождения незначительно снижалась с увеличением индекса метилирования LINE-1 как в группе работников плутониевого производства, так и в контрольной группе, но различия были статистически незначимыми.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы наблюдали повышенную частоту aberrаций хромосомного типа, микроядер и анеуплоидии в группе работников радиохимического про-

Таблица 1. Индекс метилирования LINE-1 и частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах работников радиохимического производства и индивидов контрольной группы

Маркер	Работники радиохимического производства		Контрольная группа		Значение p
	n	Среднее \pm станд. отклон.; мин–макс	n	Среднее \pm станд. отклон.; мин–макс	
Индекс метилирования LINE-1, %	40	74.93 \pm 3.63; 64.67–81.67	49	73.92 \pm 4.62; 58.00–81.33	0.446
Частота микроядер, ‰	25	6.93 \pm 2.88; 2.50–13.50	38	5.45 \pm 2.13; 1.82–12.50	0.032
MnC-, ‰	25	4.74 \pm 2.26; 1.00–9.23	38	3.02 \pm 1.69; 0.91–9.50	0.001
MnC+, ‰	25	2.19 \pm 1.96; 0.00–8.00	38	2.44 \pm 1.19; 0.50–5.50	0.158
Aberrации хромосомного типа, %	35	0.81 \pm 0.79; 0.00–2.67	22	0.44 \pm 0.69; 0.00–2.33	0.046
Дицентрические хромосомы, %	35	0.15 \pm 0.25; 0.00–1.00	22	0.06 \pm 0.17; 0.00–0.67	0.210
Кольцевые хромосомы, %	35	0.04 \pm 0.11; 0.00–0.33	22	0.08 \pm 0.14; 0.00–0.33	0.451
Парные фрагменты, %	35	0.48 \pm 0.66; 0.00–2.33	22	0.20 \pm 0.37; 0.00–1.00	0.071
Aberrации хроматидного типа, %	35	0.71 \pm 0.53; 0.00–2.00	22	0.67 \pm 0.57; 0.00–1.67	0.725
Сестринские хроматидные обмены, на клетку	29	5.39 \pm 0.77; 3.94–6.94	17	5.38 \pm 1.16; 4.33–8.30	0.406
Хромосомное нерасхождение, %	16	0.93 \pm 0.43; 0.47–1.66	32	0.50 \pm 0.25; 0.06–1.17	0.000
Хромосомное отставание, %	16	0.19 \pm 0.21; 0.00–0.60	32	0.17 \pm 0.18; 0.00–0.61	1.000

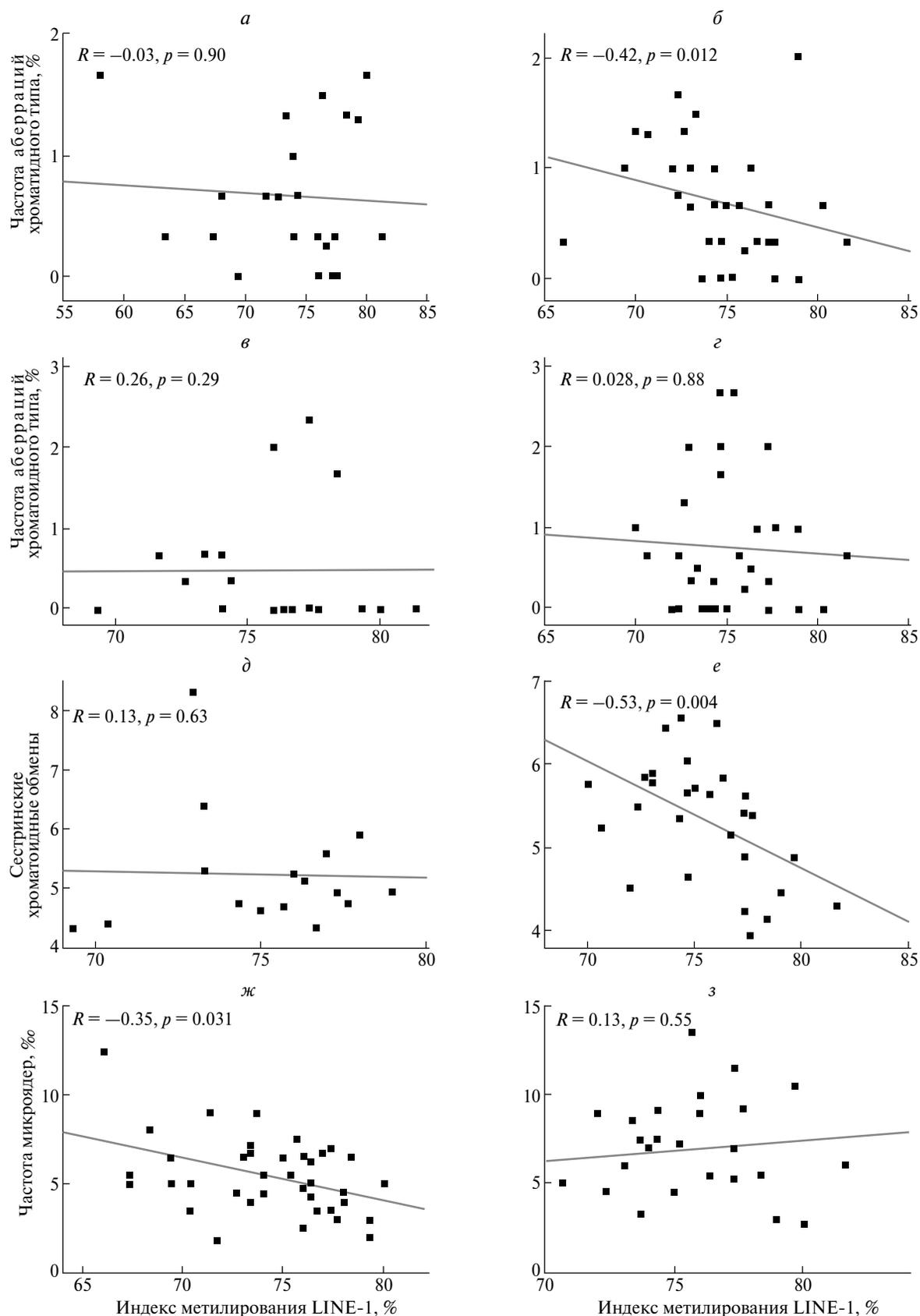


Рис. 1. Корреляции между индексом метилирования LINE-1 и частотами aberrаций хроматидного и хромосомного типов, уровнем сестринских хроматидных обменов и частотой микроядер в контрольной группе (*a, в, д, ж*) и группе работников радиохимического производства (*б, г, е, з*).

изводства. Результаты настоящего исследования подтверждают опубликованные данные о влиянии инкорпорированного плутония на частоту хромосомных aberrаций [14–18] и отсутствии влияния на уровень сестринских хроматидных обменов [14]. Однако ни один из этих маркеров не коррелировал с индексом метилирования LINE-1 в группе работников. Более того, в группе с инкорпорированным плутонием не наблюдалось дифференциального метилирования LINE-1. Это позволяет предположить, что инкорпорированный плутоний приводит к повышению уровня окислительных повреждений и однонитевых разрывов ДНК индуцирует двунитевые разрывы ДНК в лимфоцитах *in vivo*, которые трансформируются в aberrации хромосомного типа и микроядра. Повышенный уровень анеуплоидии может быть объяснен неправильной сегрегацией aberrантных хромосом.

Индекс метилирования LINE-1 коррелировал с частотами aberrаций хроматидного типа и сестринских хроматидных обменов в группе работников радиохимического производства, которые были незначительно выше, чем в контрольной группе. Оба этих маркера образуются в результате репарации двунитевых разрывов ДНК в G₂-фазе клеточного цикла при культивировании лимфоцитов *in vitro*. Часть этих двунитевых разрывов ДНК может быть обусловлена превращением однонитевых разрывов ДНК в лимфоцитах в фазе G₀, подвергшихся воздействию инкорпорированного плутония *in vivo*, в замершие вилки репликации ДНК [19]. Возможно, этот эффект более выражен в клетках индивидов с гипометилированием LINE-1, но недостаточен для значительного увеличения частоты хроматидных аномалий в клетках работников с инкорпорированным плутонием.

Корреляция индекса метилирования LINE-1 с хромосомными aberrациями была обнаружена ранее в других исследованиях. В когорте норвежских здоровых лиц мужского пола, как и в нашем исследовании, индекс метилирования LINE-1 был более тесно связан с частотой aberrаций хроматидного типа, а связь с частотой aberrаций хромосомного типа была незначительной [20]. Напротив, в другом исследовании, проведенном на работниках атомных электростанций, частота aberrаций хромосомного типа была значительно выше в подгруппе с гипометилированием LINE-1, в то время как частота aberrаций хроматидного типа была лишь незначительно повышена [21].

С 1980-х годов было известно, что деметилирующие агенты могут вызывать сестринские хроматидные обмены [22–27]. Позже было показано, что в отличие от мутагенов, непосредственно вызывающих увеличение уровня сестринских хроматидных обменов сразу после воздействия (таких как митомицин-С, ультрафиолетовое излучение и перекись водорода), деметилирующие агенты приводят к увеличению частоты обмена сестринскими хроматидами только через два клеточных цикла после самого воздействия. Это указывает на то, что их влияние на возникновение сестринских хроматидных обменов опосредовано снижением метилирования ДНК, которое достигается за два клеточных цикла [28]. Более того, недавно было непосредственно обнаружено, что действие 5-аза-2'-дезоксцитидина вызывает образование разрывов хроматид в клетках, связанных с прохождением репликационной вилки, и требует для их восстановления участия механизма гомологичной рекомбинации, приводящего к образованию сестринских хроматидных обменов [29]. Это указывает на то, что корреляция между индексом метилирования LINE-1, маркером глобального уровня метилирования генома, и частотами хроматидных aberrаций и сестринских хроматидных обменов может отражать не только ассоциативные связи, но и нарушение метилирования ДНК может непосредственно приводить к двунитевым разрывам ДНК и образованию aberrаций хроматидного типа.

Недавно появилось сообщение о том, что воздействие ионизирующего излучения в низких дозах и с низкой мощностью дозы приводит к преимущественному восстановлению двунитевых разрывов ДНК с использованием механизма гомологичной рекомбинации [30]. Следовательно, воздействие ионизирующего излучения в малых дозах должно приводить к увеличению частоты aberrаций хроматидного типа и сестринских хроматидных обменов. Наши результаты, полученные на выборке работников радиохимического производства, подтверждают эти данные. Кроме того, этот эффект подтверждается повышением уровня сестринских хроматидных обменов *in vitro* при дозах до 100–150 мГр [31] и в условиях профессионального облучения [32–35]. Особый интерес представляют исследования, которые показывают увеличение уровня сестринских хроматидных обменов в зависимости от линейного переноса энергии и дозы заряженных частиц [36, 37].

В настоящем исследовании мы показали корреляцию между индексом метилирования LINE-1 и частотой микроядер в контрольной группе. Ранее показано, что частота центромеро-позитивных микроядер коррелирует с возрастом и индексом метилирования LINE-1 в лимфоцитах здоровых добровольцев [38]. Однако в нашем исследовании ни индекс метилирования LINE-1, ни частота микроядер не коррелировали с возрастом доноров. Это позволяет предположить, на индекс метилирования LINE-1 и микроядра в лимфоцитах могут влиять другие факторы.

Таким образом, была обнаружена связь между метилированием LINE-1 и частотой хроматидных повреждений в лимфоцитах человека. Ключевым механизмом возникновения таких аномалий является увеличение частоты ошибок гомологичной рекомбинации, приводящее как к образованию аббераций хроматидного типа, так и к сестринским хроматидным обменам.

Исследование выполнено при поддержке темы Государственного задания № 122112800024-7.

Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра (протокол № 3 от 02.06.2015).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Все обследованные – совершеннолетние.

Исследование проводилось с использованием оборудования центра коллективного пользования “Медицинская геномика” Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук с использованием биоресурсной коллекции “Биобанк Северной Евразии” Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Allshire R.C., Madhani H.D.* Ten principles of heterochromatin formation and function // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 19. № 4. P. 229–244. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.119>
2. *Ostertag E.M., Kazazian H.H., Jr.* Biology of mammalian L1 retrotransposons // *Annu. Rev. Genet.* 2001. V. 35. №. P. 501–538. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.091032>
3. *Lu K.P., Ramos K.S.* Identification of genes differentially expressed in vascular smooth muscle cells following benzo[a]pyrene challenge: Implications for chemical atherogenesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 253. № 3. P. 828–833. [https://doi.org/S0006-291X\(98\)99866-7](https://doi.org/S0006-291X(98)99866-7)
4. *Lu K.P., Ramos K.S.* Redox regulation of a novel L1Md-A2 retrotransposon in vascular smooth muscle cells // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 30. P. 28201–28209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303888200>
5. *Lu K.P., Hallberg L.M., Tomlinson J. et al.* Benzo(a)pyrene activates L1Md retrotransposon and inhibits DNA repair in vascular smooth muscle cells // *Mutat. Res.* 2000. V. 454. № 1–2. P. 35–44. [https://doi.org/S0027-5107\(00\)00095-6](https://doi.org/S0027-5107(00)00095-6)
6. *Farkash E.A., Kao G.D., Horman S.R. et al.* Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay // *Nucl. Ac. Res.* 2006. V. 34. № 4. P. 1196–1204. <https://doi.org/34/4/1196>
7. *Stribinskis V., and Ramos K.S.* Activation of human long interspersed nuclear element 1 retrotransposition by benzo(a)pyrene, an ubiquitous environmental carcinogen // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 5. P. 2616–2620. <https://doi.org/66/5/2616>
8. *Teneng I., Stribinskis V., Ramos K.S.* Context-specific regulation of LINE-1 // *Genes Cells.* 2007. V. 12. № 10. P. 1101–1110. <https://doi.org/GTC1117>
9. *Wright R.O., Schwartz J., Wright R.J. et al.* Biomarkers of lead exposure and DNA methylation within retrotransposons // *Environ. Health. Perspect.* 2010. V. 118. № 6. P. 790–795. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901429>
10. *D’Urso A., Brickner J.H.* Mechanisms of epigenetic memory // *Trends Genet.* 2014. V. 30. № 6. P. 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.004>
11. *Vasilyev S.A., Timoshevsky V.A., Lebedev I.N.* Cytogenetic mechanisms of aneuploidy in somatic cells of chemonuclear industry professionals with incorporated plutonium-239 // *Rus. J. of Genet.* 2010. V. 46. № 11. P. 381–1385. <https://doi.org/10.1134/s1022795410110141>
12. *Muller S., Neusser M., Kohler D. et al.* Preparation of complex DNA probe sets for 3D FISH with up to six

- different fluorochromes // *CSH Protoc.* 2007. V. 2007. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4730>
13. *Pembrey M., Golding J., Connelly J.* ZNF277 microdeletions, specific language impairment and the meiotic mismatch methylation (3M) hypothesis // *Eur. J. Hum. Genet.* 2015. V. 23. № 9. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.262>
14. *Brandom W.F., McGavran L., Bistline R.W. et al.* Sister chromatid exchanges and chromosome aberration frequencies in plutonium workers // *Int. J. Radiat. Biol.* 1990. V. 58. № 1. P. 195–207. <https://doi.org/352K8BG4CLW1K5PW>
15. *Tawn E.J., Whitehouse C.A., Tarone R.E.* FISH chromosome aberration analysis on retired radiation workers from the Sellafield nuclear facility // *Radiat. Res.* 2004. V. 162. № 3. P. 249–256.
16. *Tawn E.J., Whitehouse C.A., Riddell A.E.* FISH chromosome analysis of plutonium workers from the Sellafield nuclear facility // *Radiat. Res.* 2006. V. 165. № 5. P. 592–597. <https://doi.org/RR3530>
17. *Hande M.P., Azizova T.V., Burak L.E. et al.* Complex chromosome aberrations persist in individuals many years after occupational exposure to densely ionizing radiation: An mFISH study // *Genes Chrom. Cancer.* 2005. V. 44. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1002/gcc.20217>
18. *Anderson R.M., Tsepenko V.V., Gasteva G.N. et al.* mFISH analysis reveals complexity of chromosome aberrations in individuals occupationally exposed to internal plutonium: A pilot study to assess the relevance of complex aberrations as biomarkers of exposure to high-LET alpha particles // *Radiat. Res.* 2005. V. 163. № 1. P. 26–35. <https://doi.org/RR3286>
19. *Kuzminov A.* DNA replication meets genetic exchange: Chromosomal damage and its repair by homologous recombination // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 15. P. 8461–8468. <https://doi.org/10.1073/pnas.151260698>
20. *Li H., Hilmarsen H.T., Hossain M.B. et al.* Telomere length and LINE-1 methylation is associated with chromosomal aberrations in peripheral blood // *Genes Chrom. Cancer.* 2013. V. 52. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1002/gcc.22000>
21. *Lee Y., Kim Y.J., Choi Y.J. et al.* Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. V. 91. № 2. P. 142–149. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.969847>
22. *Chambers J.C., and Taylor J.H.* Induction of sister chromatid exchanges by 5-fluorodeoxycytidine: Correlation with DNA methylation // *Chromosoma.* 1982. V. 85. № 5. P. 603–609.
23. *Hori T.A.* Induction of chromosome decondensation, sister-chromatid exchanges and endoreduplications by 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation // *Mutat. Res.* 1983. V. 121. № 1. P. 47–52.
24. *Ikushima T.* SCE and DNA methylation // *Basic Life Sci.* 1984. V. 29. Pt. A. P. 161–172.
25. *Lavia P., Ferraro M., Micheli A. et al.* Effect of 5-azacytidine (5-azaC) on the induction of chromatid aberrations (CA) and sister-chromatid exchanges (SCE) // *Mutat. Res.* 1985. V. 149. № 3. P. 463–467.
26. *Shipley J., Sakai K., Tantravahi U. et al.* Correspondence between effects of 5-azacytidine on SCE formation, cell cycling and DNA methylation in Chinese hamster cells // *Mutat. Res.* 1985. V. 150. № 1–2. P. 333–345.
27. *Bianchi N.O., Larramendy M., and Bianchi M.S.* The asymmetric methylation of CG palindromic dinucleotides increases sister-chromatid exchanges // *Mutat. Res.* 1988. V. 197. № 1. P. 151–156.
28. *Albanesi T., Polani S., Cozzi R. et al.* DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells *in vitro* // *Mutat. Res.* 1999. V. 429. № 2. P. 239–248.
29. *Orta M.L., Calderon-Montano J.M., Dominguez I. et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine causes replication lesions that require Fanconi anemia-dependent homologous recombination for repair // *Nucl. Ac. Res.* 2013. V. 41. № 11. P. 5827–5836. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt270>
30. *Osipov A.N., Grekhova A., Pustovalova M. et al.* Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 29. P. 26876–26885. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4946>
31. *Gundy S., Varga L., Bender M.A.* Sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes exposed to ionizing radiation *in vivo* and *in vitro* // *Radiat. Res.* 1984. V. 100. № 1. P. 47–54.
32. *Shubber E.K., al-Shaikhly A.W.* Cytogenetic analysis of blood lymphocytes from X-ray radiographers // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1989. V. 61. № 6. P. 385–389.
33. *al-Sabti K., Lloyd D.C., Edwards A.A. et al.* A survey of lymphocyte chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens // *Mutat. Res.* 1992. V. 280. № 3. P. 215–223.
34. *Bozkurt G., Yuksel M., Karabogaz G. et al.* Sister chromatid exchanges in lymphocytes of nuclear medicine physicians // *Mutat. Res.* 2003. V. 535. № 2. P. 205–213.
35. *Santovito A., Cervella P., Delpero M.* Increased frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of radiology technicians chronically exposed to low levels of ionizing radiations // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014. V. 37. № 1. P. 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.12.009>

36. *Geard C.R.* Induction of sister chromatid exchange as a function of charged-particle linear energy transfer // *Radiat. Res.* 1993. V. 134. № 2. P. 187–192.
37. *Schmid E., Roos H.* Dose dependence of sister chromatid exchanges in humans lymphocytes induced by *in vitro* alpha-particle irradiation // *Radiat. Environ. Biophys.* 1996. V. 35. № 4. P. 311–314.
38. *Cho Y.H., Woo H.D., Jang Y. et al.* The association of LINE-1 hypomethylation with age and centromere positive micronuclei in human lymphocytes // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133909>

LINE-1 Methylation Index Correlates with Sister Chromatid Exchanges and Chromatid but not Chromosome Aberrations in Personnel from a Nuclear Chemical Facility with Incorporated Plutonium-239

S. A. Vasilyev^{1,*}, E. N. Tolmacheva¹, E. A. Sazhenova¹, N. N. Sukhanova¹,
Yu. S. Yakovleva^{1,2}, N. B. Torkhova¹, M. B. Plaksin³, I. N. Lebedev^{1,2}

¹*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia*

²*Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

³*Seversk Clinical Hospital, Siberian Federal Clinical Center of the Federal Biomedical Agency, Seversk, 636035 Russia*

*e-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

The level of chromosomal abnormalities in the somatic cells of adult individuals is characterized by significant interindividual variability, which may be partly affected by the genetic and epigenetic background. The epigenetic landscape in cells is largely determined by genome methylation. This study aimed to analyse the relationships between global genome methylation and the frequencies of chromosome abnormalities in lymphocytes of plutonium workers. The frequencies of chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy of chromosomes 2, 7, 8, 12, X and Y and sister chromatid exchanges were analysed in the lymphocytes of 40 male workers from a nuclear chemical facility (Seversk, Russia) with incorporated plutonium-239 and 49 healthy male volunteers who had no occupational exposure to ionizing radiation. The long interspersed nuclear elements-1 (LINE-1) methylation index was assessed as a well-known marker of global genome methylation. The frequencies of centromere-negative micronuclei ($4.74 \pm 2.26\%$ vs. $3.02 \pm 1.69\%$), chromosome-type aberrations (0.81 ± 0.79 vs. $0.44 \pm 0.69\%$) and total chromosome non-disjunction (0.93 ± 0.43 vs. $0.50 \pm 0.25\%$) were significantly higher in the group of workers than in controls ($p < 0.05$). The LINE-1 methylation index did not differ significantly between the worker and control groups (74.93 ± 3.63 vs. $73.92 \pm 4.62\%$). Correlations between LINE-1 methylation and the frequency of micronuclei ($R = -0.35$, $p = 0.031$) were observed in the control group, whereas correlations of LINE-1 methylation with chromatid-type aberrations ($R = -0.42$, $p = 0.012$) (but not chromosome-type aberrations) and with sister chromatid exchanges ($R = -0.53$, $p = 0.004$) were observed only in the group of plutonium workers. Thus, LINE-1 hypomethylation after plutonium exposure is associated mainly with chromatid breaks, either repaired or misrepaired.

Keywords: plutonium workers, LINE-1 methylation, chromatid-type aberrations, sister chromatid exchanges, micronucleus assay, aneuploidy.

УДК 575.858:575.224.232.3:599.323.43

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И МЕЙОТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДАГЕСТАНСКИХ ПОЛЕВОК *Microtus (Terricola)* *daghestanicus* ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

© 2024 г. А. С. Богданов¹, М. М. Ацаева^{2,3}, Д. Д. Арсанукаев⁴, С. Н. Матвеевский³, *¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия²Комплексный научно-исследовательский институт им. Х.И. Ибрагимова Российской академии наук, Грозный, 344051 Россия³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия⁴Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: sergey8585@mail.ru

Поступила в редакцию 27.11.2023 г.

После доработки

Принята к публикации

У дагестанской полевки *Microtus daghestanicus* отмечен высокий уровень кариотипической и молекулярно-генетической изменчивости, однако популяции этого вида в восточной части Северного Кавказа изучены фрагментарно. С целью выявления их генетических особенностей и филогенетических связей с другими конспецифичными популяциями нами исследована выборка дагестанских полевок с юга Чеченской Республики (гора Дайхох). Иммуноцитохимическое исследование синаптомембранных комплексов в профазе I мейоза продемонстрировало принадлежность указанной популяции к наиболее широко распространенной 54-хромосомной форме *M. daghestanicus*. Анализ полной последовательности митохондриального гена цитохрома *b* показал объединение на филогенетическом древе в один компактный кластер экземпляров из Чечни и изученной ранее дагестанской полевки из Северной Грузии, что указывает на их принадлежность к обособленной генетической форме. В пределах исследованной выборки из Чечни выявлена изменчивость нуклеотидных последовательностей ядерных генов *BRCA1* и *XIST*, что предположительно отражает сложную историю этой популяции, связанную с чередованием событий ее изоляции от соседних популяций и возобновлением контактов между ними.

Ключевые слова: *Microtus daghestanicus*, синаптомембранный комплекс, молекулярно-генетическая изменчивость, гены *cytb*, *BRCA1*, *XIST*.

DOI: 10.31857/S0016675824040118 EDN: CQKWYB

Виды животных, населяющие высокогорья, представляют собой весьма интересные объекты для изучения генетического полиморфизма и дифференциации. Фрагментарность местообитаний, пригодных для жизни, экстремальные климатические условия и наличие разнообразных труднопреодолимых ландшафтных преград (горных рек, ледников, оползней и пр.), способствующих периодической изоляции популяций, способны значительно ускорить процесс накопления мутаций из-за сокращения эффективной численности особей, а также привести к неравномерной скорости эволюции разных генетических структур – хромосомных наборов, ядерных и митохондриальных геномов. Наиболее зависимы от сложных ландшафтно-климатических условий высокогорий виды, имеющие в силу своей биологии ограниченную способность к быстрым миграциям, например, обитающие под землей постоянно или значительную часть времени [1, 2].

Дагестанская полевка *Microtus daghestanicus* Shidlovsky, 1919 – один из представителей подрода кустарниковых полевок *Terricola* Fatio, 1867, ведущих полуподземный образ жизни. Этот вид обитает на Северном Кавказе и в Закавказье, населяет луга субальпийского пояса гор и характеризуется значительной кариотипической и молекулярно-генетической изменчивостью. У *M. daghestanicus* выявлено 11 кариоморф ($2n = 54, 53, 52, 46, 45, 44, 43, 42$ “А”, 42“В”, 40, 38; $NF = 58$), которые возникли в результате робертсоновских транслокаций хромосом [3, 4]. Зона хромосомной изменчивости охватывает, однако, лишь южную часть ареала вида (юг Закавказья), кроме одной формы с $2n = 52$, обнаруженной на западе Дагестана [4, 5]. Хромосомные формы $2n = 38$ и 42“А” с Карабахского и Зангезурского хребтов Закавказья, соответственно, предлагалось рассматривать в качестве самостоятельного вида *M. nasarovi* Shidlovsky, 1938 [5, 6].

Ранее молекулярно-генетический анализ митохондриального гена цитохрома *b* (*cytb*) показал дифференциацию *M. daghestanicus* по крайней мере на четыре внутривидовые группы, несмотря на их сходство по кариотипу ($2n = 54$): одна из них выявлена в западной части Северного Кавказа (в Кабардино-Балкарии и Карачаево-Черкесии), другая – в центральной части Северного Кавказа (в Северной Осетии), третья была представлена единственным экземпляром из Северной Грузии, а четвертая – популяциями Малой Азии [7]. Исследование фрагментов трех ядерных генов – *BRCA1* (breast and ovarian cancer susceptibility protein 1, экзон 11), *IRBP* (interphotoreceptor retinoid-binding protein, экзон 1) и *XIST* (*X*-inactive specific transcript) – подтвердило генетическое своеобразие лишь дагестанских полевков из Северной Осетии. Все прочие популяции *M. daghestanicus* показали изменчивость, не имеющую отчетливой связи с их географическим происхождением. Однако неожиданное выявление заметной внутривидовой изменчивости генов *BRCA1* и *XIST* у экземпляров из Кабардино-Балкарии и Северной Осетии (наряду с обилием особей, гетерозиготных по ряду нуклеотидных сайтов), может указывать на активный обмен особями и генами между соседними популяциями в указанных регионах Кавказа [7, 8].

Тем не менее, для значительной части ареала *M. daghestanicus* (особенно территории Северного Закавказья и восточной части Северного Кавказа) имеются лишь отрывочные данные по единичным экземплярам и отдельным маркерам [4, 7, 9], что существенно усложняет оценку характера изменчивости вида и доказательство дискретности выявленных молекулярно-генетическими методами внутривидовых форм дагестанской полевки. Для решения этой проблемы необходимо изучение дополнительного материала. Весьма скудные сведения имеются и в отношении особенностей мейоза у особей *M. daghestanicus*: опубликовано лишь электронно-микроскопическое описание профазы I у гибридов 38-хромосомной и 48-хромосомной форм, без изучения родительских особей [4, 10].

Цель настоящей работы – молекулярно-генетический анализ полиморфизма и филогенетических связей одной из популяций *M. daghestanicus* из восточной части Северного Кавказа, а также иммуноцитохимическое исследование сперматозоитов данных животных.

Материалом для данной работы послужили 4 экземпляра *M. daghestanicus*, №№ T23-01 (♂),

T23-19 (♀), T23-20 (♂), T23-21 (♀), отловленные в 2023 г. на горе Дайхох, в Шатойском р-не Чеченской Республики. Впервые для “чистых” кариоморф данного вида, из семенников обоих самцов были получены препараты хромосом на стадии пахитены профазы I мейоза и проведены исследования синаптонемных комплексов (СК) – мультибелковых комплексов, соединяющих гомологичные хромосомы на данном этапе мейотического деления [11]. Получение СК в распластанных ядрах сперматозоитов выполнялось по стандартной методике [12] с некоторыми модификациями [13]. Процедура иммуноцитохимического окрашивания была идентична ранее описанной [14]. Тотальная ДНК была получена от всех особей из фиксированных в этаноле измельченных образцов печени или сердца после их обработки протеиназой К, фенол-хлороформной депротеинизации и последующего осаждения изопропанолом [15]. Праймеры, применявшиеся для амплификации и секвенирования полного гена *cytb* (1143 пн), двух перекрывающихся фрагментов экзона 11 гена *BRCA1* с итоговой протяженностью 1698 пн и двух неперекрывающихся участков гена *XIST* (413 и 585 пн), которые впоследствии были объединены и проанализированы как единая последовательность (998 пн), а также условия проведения ПЦР и статистической обработки полученных данных, идентичны опубликованным ранее [7]. Кроме того, в анализ были включены все доступные в базе GenBank последовательности перечисленных генов дагестанских полевков, а также двух подземных полевков *M. subterraneus* и двух кустарниковых полевков *M. majori* в качестве аутгруппы [7, 9]. Построение дендрограмм по методу Maximum Likelihood (ML) выполнено с помощью компьютерной программы IQTree, версия 2.0-rc2 [16], а обработка их изображений – с помощью программы FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Данное исследование проводится в рамках Государственных заданий № 0088-2024-0011 (ИБР РАН) и № 0092-2022-0002 (ИОГен РАН). При выполнении экспериментальной работы нами использовалось оборудование “Сектора анализа генома” в составе ЦКП “Группа геномных технологий” (ИБР РАН) и ЦКП ОБН РАН “Генетический полиморфизм”.

Имуноцитохимический анализ выявил 26 СК аутосом и асинаптические половые хромосомы, X и Y (рис. 1). Благодаря идентификации центромер было установлено, что 25 СК и Y являются акроцентриками, X-хромосома – крупный субметацентрик, а аутосомы самой маленькой пары (№ 26) – метацентрики

(рис. 1, б, г). Данный набор хромосом определяет количество хромосомных плеч $NF = 58$. Примечательно, что некоторые участки хроматина между СК окрашивались “центромерными” антителами (рис. 1, г).

Анализ изменчивости гена *cytb* (рис. 2, а) показал, что особи *M. daghestanicus* из Чечни объединяются на филогенетическом древе в одну отчет-

ливую, компактную кладу вместе с дагестанской полевой из Северной Грузии. Несмотря на умеренную генетическую p -дистанцию (0.022) между этой кладой и “сестринской”, объединяющей экземпляры *M. daghestanicus* из Северной Осетии, обе имеют высокую бутстреп-поддержку (99–100%). По ядерным генам получены противоречивые данные: по гену *XIST* три из четырех дагестанских полевок с горы Дайхох объедини-

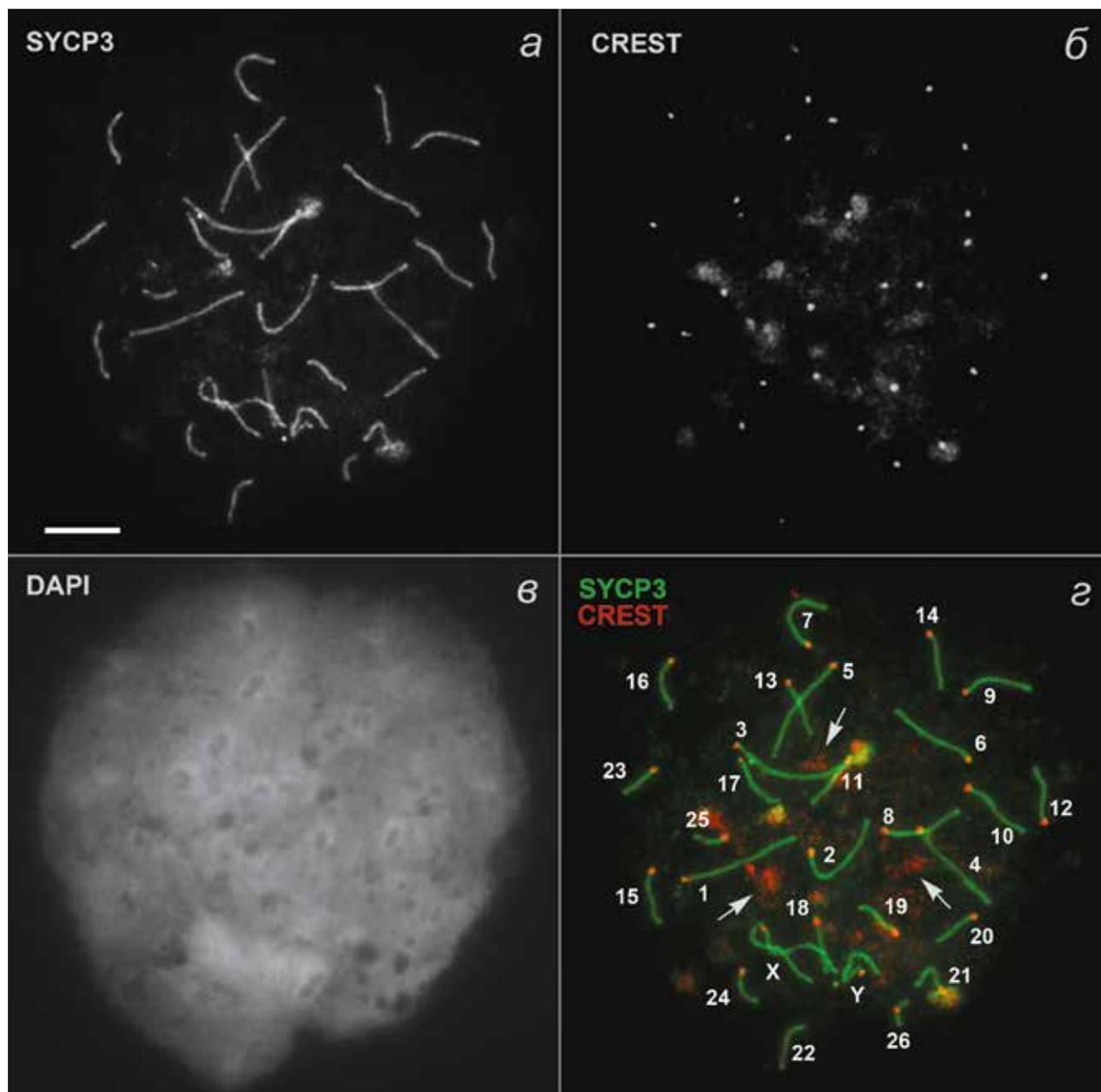


Рис. 1. Распластанное ядро сперматоцита дагестанской полевки *M. daghestanicus* (№ T23-01), стадия пахитены. Проведена иммунодетекция белка латеральных элементов СК – SYCP3 (а), белка кинетохор (центромеры) с помощью антител CREST (б). Хроматин окрашен DAPI (в). Совмещенное изображение белков SYCP3 и центромеры представлено отдельно (г). Некоторые участки хроматина между СК являются CREST-позитивными (отмечены стрелками). Масштаб – 5 мкм.

лись с североосетинскими (рис. 2,б). По гену *BRCA1* все изученные особи из Чечни оказались сходными с большинством конспецифичных экземпляров из западной части Северного Кавказа (рис. 2,в). Интересно, что как по гену *XIST*, так и по гену *BRCA1* проявляется заметная изменчивость выборки из Чечни, несмотря на малочисленность составляющих ее животных.

Итак, благодаря анализу СК, который позволяет определить количество хромосом и уточнить их морфологию [17], нами для кариотипов дагестанских полевков из Чечни были впервые установлены диплоидное число ($2n = 54$) и количество хромосомных плеч ($NF = 58$), что соответствует большинству популяций этого вида на Северном Кавказе. Дагестанская полевка относится к тем многочисленным видам полевочных, у которых выявлены асиноптические половые хромосомы [18], такие же, как и обнаруженные ранее у особей *M. daghestanicus* с “гибридным” кариотипом [4, 10]. Таким образом, асинопсис половых хромосом – это видовая характеристика, а не проявление гибридной стерильности. Необычное соединение “центромерных” антител с участ-

ками хроматина между СК, вероятно, связано с некоторыми его формами или конформациями, поскольку известно, что белок CENP-A является центромерным вариантом гистона H3 [19].

Несмотря на отсутствие кариотипической изменчивости во всех популяциях, которые были исследованы молекулярно-генетическими методами, дагестанские полевки, отловленные в Чечне на горе Дайхох, продемонстрировали отчетливое своеобразие по митохондриальной ДНК. Так как они образуют единый кластер вместе с экземпляром из Северной Грузии – из локалитета, географически достаточно удаленного от Чеченской Республики, можно с большой вероятностью предполагать, что в данном случае мы имеем дело не с индивидуальной изменчивостью или особенностью отдельной популяции, а с обособленной генетической формой, имеющей сравнительно широкое распространение. Генетическая структура вида по ядерным генам прослеживается менее отчетливо, по-видимому, из-за меньшей скорости их эволюции в сравнении с митохондриальным геномом. Однако полиморфизм генов *XIST* и *BRCA1* в изученной

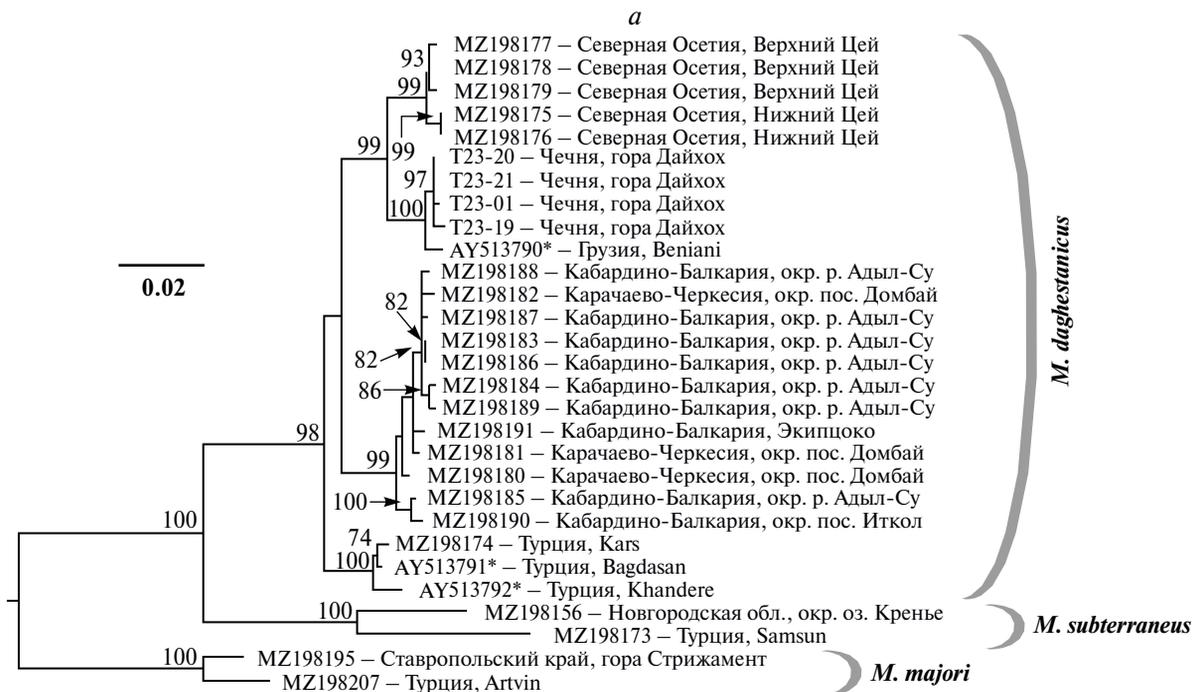


Рис. 2. ML-дендрограммы, построенные при сравнении дагестанских полевков из разных популяций и нескольких особей *M. subterraneus* и *M. majori* по полной последовательности митохондриального гена *cytb* (а), объединенной последовательности двух неперекрывающихся фрагментов ядерного гена *XIST* (б) и фрагменту 11-го экзона ядерного гена *BRCA1* (в). В узлах ветвления древ даны значения бутстреп-индекса, превышающие 70%. Для ранее опубликованных последовательностей указаны номера базы GenBank; номера без дополнительных обозначений взяты из публикации [7], номера, отмеченные звездочкой – из статьи [9]. Для гена *XIST* через запятую представлены номера, соответствующие его первому и второму отдельно секвенированным фрагментам.

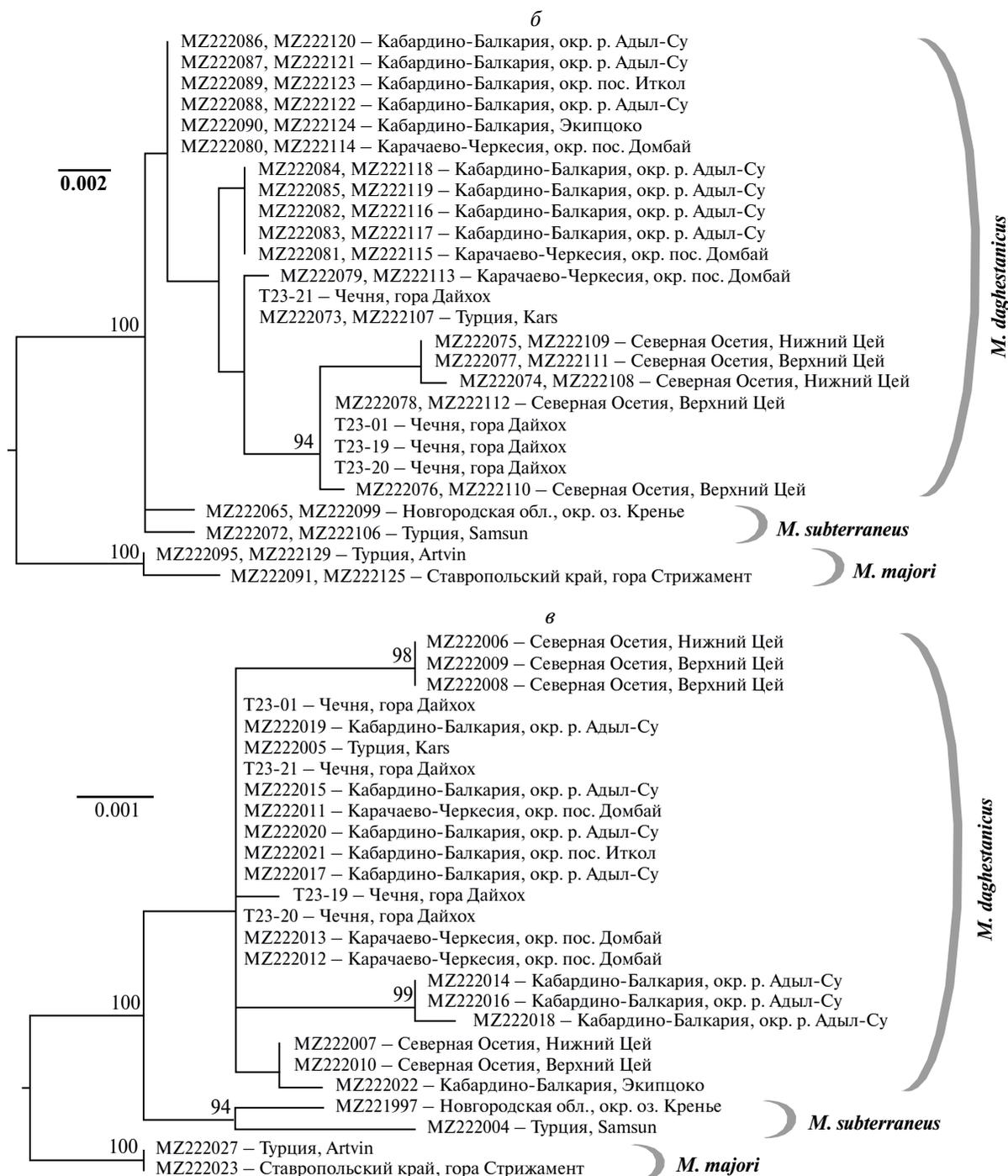


Рис. 2. Окончание.

популяции дагестанских полевков из Чечни может отражать ее сложную историю, связанную с чередованием этапов изоляции от соседних популяций и возобновлением контактов между ними. Похожий сценарий предполагался ранее для других популяций *M. daghestanicus* Северного Кавказа и Малой Азии [7, 8].

Авторы глубоко признательны Сапарбаевой

Ларисе Маасовне (КНИИ РАН) за помощь в лабораторной обработке материала.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 23-24-00329).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы

ухода за животными и их использования были соблюдены.

Исследование одобрено Этическим комитетом ИБР РАН (протокол № 37 от 25.06.2020).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tambovtseva V., Bakloushinskaya I., Matveevsky S., Bogdanov A.* Geographic mosaic of extensive genetic variations in subterranean mole voles *Ellobius alaicus* as a consequence of habitat fragmentation and hybridization // *Life*. 2022. V. 12. <https://doi.org/10.3390/life12050728>
2. *Bogdanov A., Tambovtseva V., Matveevsky S., Bakloushinskaya I.* Speciation on the roof of the World: parallel fast evolution of cryptic mole vole species in the Pamir-Alay–Tien Shan region // *Life*. 2023. V. 13. <https://doi.org/10.3390/life13081751>
3. *Ляпунова Е.А., Ахвердян М.Р., Воронцов Н.Н.* Робертсоновский веер изменчивости хромосом у субальпийских полевок Кавказа (*Pitymys*: *Microtinae*, *Rodentia*) // *ДАН СССР*. 1988. Т. 298. С. 480–484.
4. *Ахвердян М.Р., Ляпунова Е.А., Воронцов Н.Н.* Кариология и систематика кустарниковых полевок Кавказа и Закавказья (*Terricola*, *Arvicolinae*, *Rodentia*) // *Зоол. журнал*. 1992. Т. 71. Вып. 3. С. 96–110.
5. *Хатухов А.М., Дзуев Р.И., Темботов А.К.* Новые кариотипические формы кустарниковых полевок (*Pitymys*) Кавказа // *Зоол. журнал*. 1978. Т. 57. Вып. 10. С. 1566–1570.
6. *Загороднюк И.В.* Кариотип, систематическое положение и таксономический статус *Pitymys ukrainicus* (*Rodentia*) // *Вестник зоологии*. 1988. № 4. С. 50–55.
7. *Bogdanov A.S., Khlyap L.A., Kefelioğlu H. et al.* High molecular variability in three pine vole species of the subgenus *Terricola* (*Microtus*, *Arvicolinae*) and plausible source of polymorphism // *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2021. V. 59. I. 8. P. 2519–2538. <https://doi.org/10.1111/jzs.12539>
8. *Богданов А.С., Хляп Л.А., Баскевич М.И.* Дифференциация и филогенетические связи трех видов полевок подрода *Terricola* (*Rodentia*, *Arvicolinae*, *Microtus*): результаты анализа фрагментов ядерных генов *BRCA1* и *XIST* // *Известия РАН. Серия биол.* 2020. № 6. С. 575–580. <https://doi.org/10.31857/S0002332920060028>
9. *Jaarola M., Martínková N., Gündüz İ. et al.* Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (*Arvicolinae*, *Rodentia*) inferred from mitochondrial DNA sequences // *Mol. Phylog. and Evol.* 2004. V. 33. P. 647–663. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.07.015>
10. *Малыгин В.М., Левенкова Е.С., Ахвердян М.Р., Сафронова Л.Д.* Сравнение синаптомемных комплексов самцов-гибридов кавказских кустарниковых полевок (*Rodentia*, *Microtinae*, *Terricola*) в контексте изучения гибридной стерильности // *Зоол. журнал*. 2000. Т. 79. Вып. 3. С. 348–356.
11. *Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л.* Синаптомемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Т-во научн. изданий КМК, 2007. 358 с.
12. *Peters A.H.F.M., Plug A.W., van Vugt M.J., de Boer P.* A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germ line // *Chromosome Res.* 1997. V. 5. P. 66–71. <https://doi.org/10.1023/A:1018445520117>
13. *Page J., Berríos S., Rufas J.S. et al.* The pairing of X and Y chromosomes during meiotic prophase in the marsupial species *Thylamys elegans* is maintained by a dense plate developed from their axial elements // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 551–560. <https://doi.org/10.1242/jcs.00252>
14. *Matveevsky S., Chassovnikarova T., Grishaeva T. et al.* Kinase CDK2 in mammalian meiotic prophase I: Screening for hetero- and homomorphic sex chromosomes // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22041969>
15. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular cloning: A laboratory manual*. N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 398 p.
16. *Minh B.Q., Trifinopoulos J., Schrempf D., Schmidt H.A.* IQ-TREE version 2.0: Tutorials and manual phylogenomic software by maximum likelihood. 2019, december 1. <http://www.iqtree.org>
17. *Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л.* Кариотипирование на основе синаптомемных комплексов и применение этого метода в цитогенетике // *Генетика*. 1985. Т. 21. № 5. С. 793–802.
18. *Borodin P.M., Basheva E.A., Torgasheva A.A. et al.* Multiple independent evolutionary losses of XY pairing at meiosis in the grey voles // *Chrom. Res.* 2012. V. 20. P. 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9261-0>
19. *Earnshaw W.C., Allshire R.C., Black B.E. et al.* Esperanto for histones: CENP-A, not CenH3, is the centromeric histone H3 variant // *Chrom. Res.* 2013. V. 21. P. 101–106. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9347-y>

Molecular Genetic and Meiotic Peculiarities of Caucasus Pine Voles *Microtus (Terricola) daghestanicus* in the Eastern Part of the Greater Caucasus

A. S. Bogdanov¹, M. M. Atsaeva^{2,3}, D. D. Arsanukaev⁴, S. N. Matveevsky^{3,*}

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

²Ibragimov Complex Institute of the Russian Academy of Sciences, Grozny, 344051 Russia

³Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

⁴Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: sergey8585@mail.ru

The high level of karyotypic and molecular genetic variability was previously detected in the Caucasus pine vole *Microtus daghestanicus*. However, populations of this species were poorly studied in the eastern part of the Greater Caucasus. To reveal their genetic peculiarities and phylogenetic relationships with other conspecific populations we analyzed a sample of Caucasus pine voles from the south of the Chechen Republic (Daikhokh Mount). The immunocytochemical study of synaptonemal complexes in meiotic prophase I demonstrated that the population belongs to the most distributed 54-chromosomal form of *M. daghestanicus*. The entire mitochondrial cytochrome *b* gene analysis showed close clustering specimens from Chechen Republic and previously studied Caucasus pine vole from northern Georgia. It indicates that all these specimens belong to a discrete genetic form. In the studied sample from Chechen Republic we revealed variability of the nuclear *BRCA1* and *XIST* genes that probably reflects a complicated history of the population associated with alternation of its isolation from neighbor populations and restoring contacts between them.

Keywords: *Microtus daghestanicus*, synaptonemal complex, molecular genetic variability, the *cytb*, *BRCA1*, *XIST* genes.

К 90-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ПРОФЕССОРА ЮРИЯ ФЕДОРОВИЧА БОГДАНОВА



Заслуженный деятель науки Российской Федерации, профессор Юрий Федорович Богданов – признанный специалист в области цитогенетики, клеточной биологии и исследований мейоза, 17 апреля отметил свое 90-летие. Еще относительно недавно мы отмечали 70-летие, и поздравления были отражены на страницах журнала “Генетика” (№ 6, 2004 г.). Время идет, и вот мы отмечаем новую торжественную дату знаменитого генетика. Остановимся на некоторых этапах научной жизни и знаменательных открытиях Юрия Федоровича.

В 1957 г. Юрий Федорович закончил кафедру общей и сравнительной физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. В этом же году Ю.Ф. Богданов поступил в аспирантуру только что созданного Института цитологии АН СССР в Ленин-

граде и начал исследования под руководством профессора А.С. Трошина в области сорбционной теории клеточной проницаемости. Прослушивание увлекательных лекций Н.В. Тимофеева-Ресовского и А.А. Прокофьевой-Бельговской на кафедре генетики Ленинградского университета стали своеобразным водоразделом научной жизни Ю.Ф. Богданова – переходом от исследований в области физиологии к исследованиям в области цитогенетики, которыми он занимается и по сей день.

В 1960 г. Юрий Федорович перешел в заочную аспирантуру и стал младшим научным сотрудником Института радиационной и физико-химической биологии АН СССР (позднее – Институт молекулярной биологии АН СССР) в Москве. Ю.Ф. Богданов одним из первых в СССР использовал метод автордиографии с тимидином,

меченного тритием, и выявил зависимость некоторых типов хромосомных перестроек от времени синтеза ДНК (репликации хромосом) при облучении рентгеновскими лучами. Результаты этой пионерской работы легли в основу его кандидатской диссертации “Синтез ДНК и состав клеточной популяции в зародышах семян в связи с типами хромосомных мутаций: на примере *Pisum sativum*”, успешно защищенной в 1967 г. под руководством А.А. Прокофьевой-Бельговской в Объединенном ученом совете по биологическим наукам Сибирского отделения АН СССР в Новосибирске по специальности ВАК “Цитология”. На тот момент в московских институтах не было такой специальности, а в Новосибирске было больше специалистов по структуре хромосом, чем в Ленинграде; именно поэтому защита прошла на базе Института цитологии и генетики АН СССР (ИЦиГ).

С 1962 по 1972 гг. Юрий Федорович принимал активное участие в образовательном спецкурсе по цитогенетике (в качестве ассистента и экзаменатора), который читала А.А. Прокофьева-Бельговская на кафедре генетики и селекции биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. В 1967–1970 гг. он открыл и описал явление отставания синтеза гистонов от синтеза ДНК в цикле мейоза у трех видов животных и двух видов растений и постулировал всеобщий характер этой закономерности для мейоза. Это исследование было выполнено методами цитофотометрии и включения аминокислот, меченных тритием, во все фракции гистонов. Кроме того в 1977 г. Ю.Ф. Богданов опубликовал свое первое исследование в области электронной микроскопии мейотических хромосом и открыл явление самосборки комплексов, подобных синаптонемному, в цитоплазме мейотических клеток у аскариды на стадии, которая предшествовала формированию настоящих синаптонемных комплексов в ядре. Эти исследования легли в основу его докторской диссертации “Исследование гистонов и ультраструктурной организации хромосом в процессе мейоза”, защищенной в 1978 г. в Институте цитологии и генетики АН СССР в Новосибирске.

Юрий Федорович проработал 22 года в Институте молекулярной биологии, а в 1982 г. был приглашен в Институт общей генетики АН СССР в качестве заместителя директора по науке и заведующего лабораторией цитогенетики, которой он руководил до 2006 г., а затем передал руководство д.б.н. О.Л. Коломиец.

Совместно с О.Л. Коломиец и коллегами из ИБР РАН (Н.Н. Воронцов, Е.А. Ляпунова, И.Ю. Баклушинская) Ю.Ф. Богдановым были открыты эксклюзивные цепочки хромосом – объединения СК-тривалентов в единую цепь за счет гетерохроматиновых участков акроцентриков, которые обуславливали снижение фертильности у гибридных слепушонок. Это открытие было опубликовано в серии статей и стало классикой цитогенетики, было включено в учебники по цитогенетике и монографии. При непосредственном участии профессоров Ю.Ф. Богданова и О.Л. Коломиец направление исследований по цитогенетике мейоза животных активно развивается и сейчас (С.Н. Матвеевский, В.Е. Спангенберг). В конце 1980-х под руководством Ю.Ф. Богданова его сотрудниками О.И. Карповой и С.Я. Дадашевым было установлено, что в состав синаптонемных комплексов входят специфические последовательности ДНК, которые были названы СКАР ДНК (SCARDNA, Synaptonemal Complex Associated Regions).

Одним из основных направлений исследований в 1980–1990-е годы было изучение генетического контроля мейоза. Под руководством Ю.Ф. Богданова Т.М. Гришаевой были проведены исследования по генетическому контролю формирования синаптонемных комплексов у дрозофилы; а Ю.С. Федотовой совместно с коллегами из Санкт-Петербурга (С.П. Соснихина) было изучено фенотипическое проявление мейотических мутаций у ржи.

В 2001–2003 гг. Ю.Ф. Богданов сформулировал положение о том, что сходство признаков мейоза у эволюционно далеких таксонов обусловлено сходством вторичной и третичной структуры функционально важных доменов формообразовательных белков мейотических клеток. Это положение было доказано биоинформатически (совместно с Т.М. Гришаевой и С.Я. Дадашевым) в лаборатории цитогенетики ИОГен РАН им. Н.И. Вавилова, а затем и экспериментально – в американской лаборатории группой ученых под руководством Скотта Хаули.

Юрий Федорович – автор более двухсот научных публикаций в отечественных и зарубежных научных журналах, включая ведущие профильные мировые издания: “*Chromosoma*”, “*Experimental Cell Research*”, “*Cytogenetic and Genome Research*”, “*Caryologia*”, “*Genome*”, “*Mutation Research Letters*” и многие другие.

Ранние научные результаты были обобщены в двух главах коллективной монографии “Цитология и генетика мейоза” (1975 г., под редакцией В.В. Хвостовой и Ю.Ф. Богданова). Исследования Ю.Ф. Богданова в лаборатории цитогенетики были подытожены в его многочисленных монографиях, из них особое место занимают такие фундаментальные труды как “Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом” (совместно с О.Л. Коломиец, 2007 г.) и “Консерватизм, изменчивость и эволюция мейоза” (совместно с Т.М. Гришаевой, 2020 г.).

Особо хотелось бы отметить автобиографическую монографию “Очерки о биологах второй половины XX века” (2012 г.), где Юрий Федорович приводит интереснейшие сведения из своей жизни, описывает многочисленные перипетии,

сопровождая отечественную биологию второй половины XX в., и подробно знакомит читателя с коллегами, с которыми имел возможность общаться, дружить и сотрудничать. За большой вклад в отечественную науку Юрию Федоровичу в 2011 г. было присвоено почетное звание заслуженного деятеля науки Российской Федерации.

В настоящее время Юрий Федорович работает в должности главного научного сотрудника ИОГен РАН и активно участвует в научной деятельности лаборатории цитогенетики. Коллеги и друзья Юрия Федоровича поздравляют его с замечательным юбилеем и желают крепкого здоровья, долголетия, неисчерпаемого вдохновения, новых творческих вершин и открытий в исследовании увлекательного и сложного процесса – мейоза.