

Том 60, Номер 10

ISSN 0016-6758

Октябрь 2024



ГЕНЕТИКА



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 10, 2024

Обзорные и теоретические статьи

- Эпигенетические механизмы влияния физической активности на развитие атеросклероза
Р. Н. Мустафин, Э. К. Хуснутдинова 3
- Мейотический драйв: внутригеномные конкуренция и отбор
И. А. Захаров 22

Генетика растений

- Полногеномная идентификация и характеристика генов, кодирующих транспортеры сахаров у березы повислой
М. А. Корженевский, Ю. Л. Мощенская, Т. В. Тарелкина, Н. А. Галибина 31
- Сравнительный анализ мутаций генов гиногенеза кукурузы
Е. М. Моисеева, В. В. Фадеев, Ю. В. Фадеева, С. И. Мазилев, М. И. Чумаков 47
- Гены цистеин-богатых пептидов пырея *Thinopyrum elongatum*
М. П. Слезина, Е. А. Истомина, А. Н. Шиян, Т. И. Одинцова 56

Генетика животных

- Особенности филогеографической структуры и популяционно-генетического полиморфизма *D. cristata* Sars и *D. longiremis* Sars (Anomopoda: Daphniidae) в Северной Евразии
Е. И. Зуйкова, Л. П. Слепцова, Л. В. Андреева, Я. А. Кучко, Н. А. Бочкарев, Е. С. Захаров 71

Генетика человека

- Неравномерность притока специфичных для европейцев аллелей генов *SLC45A2*, *SLC24A5*, *TYRP1*, *DRD2*, *EDAR* и *OCA2* в генофонд коряков
Б. А. Малярчук, А. Н. Литвинов 83
- Динамика популяционной структуры населения юга Центральной России за 130-летний период. Возраст вступления в брак
К. Н. Сергеева, Ю. И. Гончарова, А. С. Невинных, И. В. Батлуцкая, С. Н. Сокорев, И. Н. Сорокина 90
- Гиперметилирование генов длинных некодирующих РНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* как фактор развития и прогрессии метастатического рака молочной железы
Е. А. Филиппова, С. С. Лукина, В. И. Логинов, А. М. Бурдённый, И. В. Пронина, Н. А. Аржанухина, Т. П. Казубская, Э. А. Брага 103

Краткие сообщения

Тетрациклиновая индукция природной лекарственной устойчивости к бедаквилину у *Mycobacterium smegmatis* mc2 155

А. А. Ватлин, Д. А. Цыбизов, В. С. Летвинова, В. Н. Даниленко

111

Тестирование микросателлитных локусов крыжовника на черной и красной смородине

А. В. Пикунова, А. А. Павленко, М. А. Должикова, О. Д. Голяева, С. Д. Князев

117

Ген *shaggy*, кодирующий протеинкиназу GSK3, контролирует зависимое от пола влияние отдельных кластеров дофаминергических нейронов *D. melanogaster* на продолжительность жизни

Н. В. Рощина, Е. Р. Веселкина, М. В. Тростников, Е. Г. Пасюкова

122

Геном *Staphylococcus epidermidis* из казеозного некроза туберкулемы

В. В. Синьков, Е. А. Орлова, О. Б. Огарков, А. Е. Суздальницкий, И. Г. Кондратов, Н. Л. Белькова, Л. В. Рычкова, Л. И. Колесникова

129

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ФИЗИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НА РАЗВИТИЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА

© 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 02.04.2024 г.

После доработки 03.05.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Данная работа является аналитическим обзором, посвященным поиску драйверных механизмов эпигенетических изменений в патогенезе атеросклероза. Заболевание поражает сердечно-сосудистую систему у взрослого населения, главным образом пожилого и старческого возраста. Атеросклероз сопровождается прогрессирующим отложением в интиме сосудов холестерина и липопротеинов с воспалением, сужением просвета и нарушением кровоснабжения тканей и органов. При этом меняется экспрессия генов *CACNA1C*, *GABBR2*, *TCF7L2*, *DCK*, *NRP1*, *PBX1*, *FANCC*, *CCDC88C*, *TCF12*, *ABLI1*. Профилактикой атеросклероза является физическая нагрузка, механизмы реализации которой до конца не изучены. На экспериментальных моделях показано, что регулярные тренировки оказывают не только протективное действие на развитие атеросклероза, но также ингибируют прогрессирование уже развившейся болезни с уменьшением стеноза сосудов, повышением концентрации в бляшках коллагена и эластина, матриксных металлопротеиназ. Полученные результаты были подтверждены клиническими исследованиями. Целью настоящего обзора было систематизировать накопленные данные о причинах эпигенетических изменений, в том числе под влиянием регулярных тренировок, вызывающих изменение экспрессии специфических микроРНК при атеросклерозе. Выявлено, что физические упражнения у Apo-/- мышей повышают экспрессию miR-126 и miR-146a (ингибирующих гены *TLR4* и *TRAF*), miR-20a (воздействующая на *PTEN*), miR-492 (подавляющая мРНК гена *RETN*). Клинические исследования показали увеличение уровней miR-146a, miR-126, miR-142-5p, miR-424-5p и снижение транскрипции miR-15a-5p, miR-93-5p, miR-451 под влиянием аэробных тренировок. Сделано предположение, что драйверами эпигенетических изменений при атеросклерозе являются патологически активированные при старении транспозоны, транскрипция которых может меняться под влиянием физических тренировок, что сопровождается нарушением экспрессии произошедших от транспозонов длинных некодирующих РНК и микроРНК. Анализ литературных данных позволил выявить 36 таких микроРНК, для 25 из которых показано идентичное изменение уровней при старении и атеросклерозе.

Ключевые слова: атеросклероз, аэробные тренировки, воспаление, микроРНК, ретроэлементы, старение, транспозоны, физические упражнения.

DOI: 10.31857/S0016675824100014 **EDN:** WGFNMR

Атеросклероз (АС) является самым распространенным сердечно-сосудистым заболеванием в мире, поражающим сосуды сердца, головного мозга и периферических артерий [1]. Частота встречаемости болезни значительно увеличивается с возрастом [2] в связи с воспалением стенок сосудов при старении [3–5]. Развитие АС характеризуется отложением в стенках артерий холестерина и липопротеинов с образованием бляшек, которые постепенно сужают просвет сосудов и нарушают

кровоснабжение тканей и органов. На развитие болезни влияют как средовые факторы (неправильное питание, лишний вес, курение, прием алкоголя, гиподинамия), так и генетическая предрасположенность [1]. Согласно результатам метаанализов, АС достоверно ассоциирован с аллельными вариантами генов интерлейкина *IL-10* (–1082G>A), бета-хемокинов *CCR5* (rs333), циклооксигеназы *COX2* (–765G>C), *FLAP* (–336G>A), липооксигеназы *5-LO* (–1078G>A), маренострина

MEFV (694M>V), Толл-подобных рецепторов *TLR-4* (+896A>G) [6]. Для АС определенных локализаций метаанализы показали ассоциацию полиморфизмов специфических генов при АС периферических артерий (*CYP2B6*, *SYTL3* и *TCF7L2*) [7], при АС артерий головного мозга (*GP1BA*, *F11*, *LAMC2*, *VCAM1*, *PROC*, *KLKB1*) [8], при АС коронарных артерий (варианты 57 различных полиморфизмов, расположенных главным образом в межгенных и интронных областях, а также в генах *BCAS3*, *KSR2*, *NOA1*, *NOS3*, *SMAD3*, *SWAP70*) [9].

Развитие АС сопровождается изменением экспрессии генов в тканях пораженных сосудов, что обусловлено влиянием эпигенетических факторов, к которым относятся метилирование ДНК, модификации гистонов и РНК-интерференция с помощью микроРНК и длинных некодирующих РНК (нкРНК) [10]. Это сопровождается изменением участвующих в патогенезе АС фенотипов клеток, в том числе эндотелиоцитов (ЭЦ) [4, 11, 12], гладкомышечных клеток сосудов (ГМКС) [13, 14]

и клеток иммунной системы [15], а также нарушением метаболизма липидов и воспаления [16] (рис. 1). Проведенное в 2022 г. сравнительное исследование роли эпигенетических факторов в развитии АС показало 47 активированных (гипометилированных) и 90 инактивированных (гиперметилированных) генов при АС, а также 10 ключевых генов АС (*CACNA1C*, *GABBR2*, *TCF7L2*, *DCK*, *NRP1*, *PBX1*, *FANCC*, *CCDC88C*, *TCF12*, *ABLI1*), дифференциально экспрессируемых под влиянием микроРНК и патологического метилирования [17]. Метилирование ДНК осуществляют ферменты ДНК-метилтрансферазы DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, деметилирование – Tet-метилцитозиндиоксидазы TET1, TET2, TET3, ацетилирование гистонов – ацетилтрансферазы [10]. Нарушения экспрессии микроРНК описаны как патогенетические факторы развивающегося при старении АС [4, 5], поскольку они изменяют метилирование ДНК по механизмам РНК-направленного ДНК-метилирования, влияя на транскрипцию специфических генов. В данных механизмах микроРНК играют роль

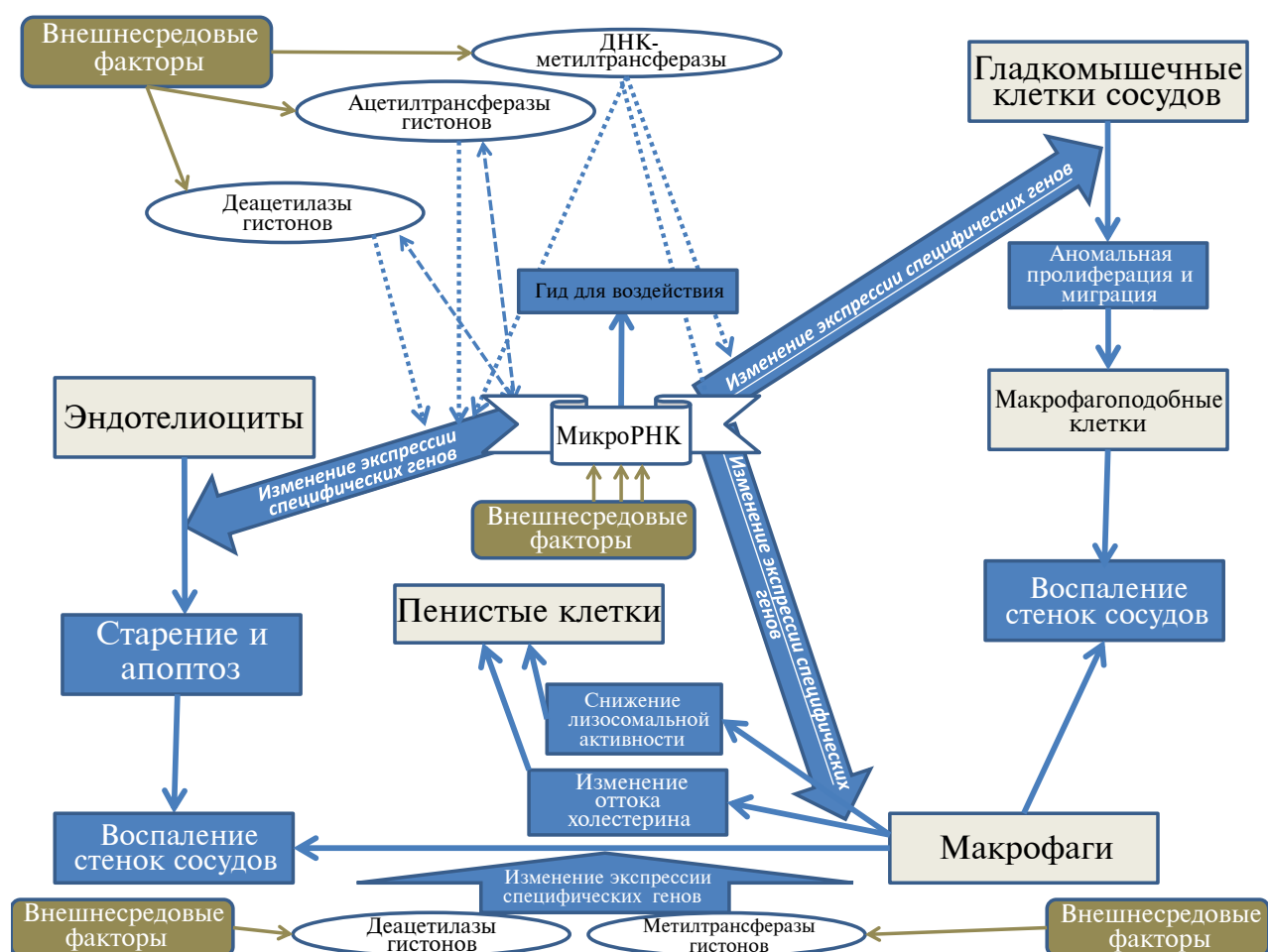


Рис. 1. Схема роли микроРНК в механизмах развития атеросклероза.

гидов для изменения эпигенетических факторов в специфических локусах генома [18], следствием чего являются обнаруживаемые при АС влияния ДНК-метилтрансфераз DNMT1/3a/3b, TET1/2/3, гистоновых ацетилтрансфераз НАТ и деацетилаз HDAC на экспрессию специфических генов [10].

Эндотелиальное воспаление при АС ассоциировано с повышенными уровнями miR-126, miR-221/222 и низкими уровнями miR10a, miR-155, miR-181a, miR-221/222, что ведет к апоптозу, остановке клеточного цикла, выработке активных форм кислорода. При старении эндотелия наблюдается усиление экспрессии miR-217, miR-34, снижение выработки miR-92a, miR-216a, что сопровождается повышением концентраций провоспалительных хемокинов MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1), CXCL12 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12), VCAM (vascular cell adhesion protein), ICAM (intercellular adhesion molecule) [4]. Со старением ЭЦ в патогенезе АС ассоциированы miR-146a [11] и miR-200c (в ответ на активные формы кислорода) [12]. Ассоциированная со старением miR-217 оказалась вовлеченной в развитие АС и сердечно-сосудистой дисфункции путем подавления сети активаторов эндотелиальных синтетаз оксида азота, включая VEGF (vascular endothelial growth factor) и пути рецептора апелина [5].

Проведенный в 2018 г. систематический обзор научной литературы показал, что микроРНК способны контролировать воспаление сосудистой стенки, регулируя ее инфильтрацию активированными лейкоцитами. К ним относятся miR-19a, miR-19b, miR-21. Ключевой микроРНК в данных механизмах АС является miR-126, которая ингибирует VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) и провоспалительный TNF- α . В связи с этим снижение экспрессии miR-126 повышает активность NF- κ B, усиливая взаимодействие лейкоцитов с ЭЦ и способствуя АС [15]. На функции макрофагов при АС оказывает влияние miR-33, которая регулирует зависимый от ABCA1 (АТФ-связывающий кассетный транспортер А1) отток холестерина. Также miR-33 ингибирует гены *TFFB* и *FOXO3*, снижая лизосомальную активность и фагоцитоз макрофагов. Поэтому воздействие анти-miR-33 повышает эффероцитоз, лизосомальный биогенез и деградацию апоптотического материала макрофагов [19]. Изменение эпигенетической регуляции играет важную роль в поляризации макрофагов в M1-подобные (под влиянием деацетилаз гистонов HDAC3, HDAC7, HDAC9, модификаций гистонов H3K9me3, H3K36me3), что способствует воспалению сосудистой стенки [20]. Воспалительные макрофаги секретируют везикулы, содержащие специфические микроРНК (такие как miR-28, miR-146a, miR-185, miR-365, miR-503), которые используются для коммуникации между клетками атеросклеротических сосудов [15].

Аномальная пролиферация и миграция ГМКС вовлечены в формирование неоинтимы, способствуя рестенозу [14] и образованию бляшек при АС. При этом ГМКС могут переходить к менее дифференцированным формам, в которых отсутствуют маркеры ГМКС, в том числе в макрофагоподобные клетки, способствующие прогрессированию АС и воспалению [13]. Влиянием на ГМКС в патогенезе АС охарактеризованы miR-1 (мишенями являются мРНК генов *KLF4*, *PIM1*), miR-10a (влияет на мРНК *HDAC4*), miR-126 (ингибирует мРНК генов *BCL2*, *IRS1*, *FOXO3*), miR-22 (влияет на гены *MECP2*, *HDAC4*, *EVII*), miR-143 и miR-145 (воздействуют на гены *ACE*, *ELK1*, *KLF4/5*), miR-21 (мишени – мРНК генов *DOCK*, *PDCD4*), miR-26a, miR-34a, miR-130a, miR-221 [15]. Среди циркулирующих микроРНК наиболее специфичными для АС являются miR-17, miR-17-5p, miR-29b, miR-30, miR-92a, miR-126, miR-143, miR-145, miR-146a, miR-212, miR-218, miR-221, miR-222 и miR-361-5p, которые были предложены в качестве биомаркеров для диагностики болезни [21].

Следует отметить, что причинами нарушений экспрессии микроРНК при АС может служить активация мобильных генетических элементов (МГЭ) с возрастом [22], способствующих воспалительным процессам в организме человека при старении [3–5]. Это обусловлено возникновением от МГЭ в эволюции множества некодирующих РНК (нкРНК), в том числе микроРНК. Еще в 2016 г. была опубликована база данных MDTE DB (miRNAs derived from transposable elements database) о происхождении 661 специфической микроРНК от МГЭ [23]. К МГЭ относятся ретровирусы (РЭ) HERV (Human Endogenous Retroviruses) [24] и LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Elements-1), транспозиция которых происходит по механизму “копирования и вставки”, и ДНК-транспозоны, перемещающиеся путем “вырезания и вставки” [25]. В связи с наличием комплементарных последовательностей микроРНК с МГЭ активация последних при старении и под воздействием средовых факторов может отразиться на экспрессии микроРНК. Кроме того, обнаружение многочисленных полиморфизмов, расположенных в межгенных областях и интронах [9], ассоциированных с АС, также свидетельствует о влиянии МГЭ на патогенез болезни, поскольку многие МГЭ расположены в межгенных областях и интронах. Сходным распределением в геноме человека характеризуются и гены микроРНК [23].

Влияние физических упражнений на атеросклероз и старение

В развитии АС важную роль играет ассоциированное со старением воспаление стенок сосудов [5], на которое могут воздействовать средовые факторы, в том числе выполнение достаточного

количества аэробных физических упражнений, которые изменяют метаболизм в организме [26]. В то же время гиподинамия стимулирует НАДФН-оксидазы, способствуя сосудистой дисфункции за счет усиления окислительного стресса [27]. Регулярные тренировки ингибируют экспрессию провоспалительной молекулы TNF- α [28]. Под воздействием аэробных упражнений у пожилых людей снижаются концентрации IL-18, IL-6, СРБ в крови [29], а при АС предотвращается образование пенистых клеток из макрофагов [30]. Таким образом, описаны молекулярные механизмы влияния физических тренировок на развитие АС, однако наиболее перспективно исследование регуляторов эпигенетических факторов, вызывающих данные изменения. Такими драйверами могут служить МГЭ, патологическая активация которых является ключевым механизмом старения [22].

Для подтверждения эффекта воздействий различных факторов на развитие атеросклероза в экспериментах используют специально модифицированные линии мышей ApoE $^{-/-}$, при исследовании которых в ряде опубликованных работ было достоверно показано не только протективное действие физических упражнений на развитие АС, но и ингибирование прогрессирования самой болезни, что свидетельствует о рациональности рекомендаций внедрения регулярных занятий физкультурой пациентам даже с уже развившимся АС. Так, 6-недельный бег мышей линии ApoE $^{-/-}$ после 16-недельной диеты с повышенным содержанием жира способствовал уменьшению стеноза бляшек и повышению в них содержания коллагена и эластина [31]. Аналогичные результаты получены в другой работе на мышах линии ApoE $^{-/-}$ с развившимся тяжелым АС: 8-недельный бег снижал стеноз бляшек, повышал концентрацию в них эластина и коллагена [32]. Определено также подавление воспаления и миграции клеток иммунной системы в стенках сосудов с уменьшением количества лейкоцитов в АС бляшках в результате шести недель добровольного бега мышей ApoE $^{-/-}$ [33]. Выявлено снижение уровней липидов, уменьшение стеноза бляшек с повышением в них концентрации эластина и коллагена и матриксных металлопротеиназ MMP2 (которые разрушают матрикс бляшек) у ApoE $^{-/-}$ мышей с ранним (возраст 12 нед.) и поздним (возраст 40 нед.) АС после 10 нед. добровольного бега [34].

Полученные в экспериментах на животных результаты о лечебном воздействии аэробных нагрузок на развитие АС были подтверждены в клинических исследованиях на пациентах. Было выявлено, что длительные (4 ч) физические упражнения низкой интенсивности приводят к усиленному окислению триглицеридов во время тренировки и снижению скорости появления свободных жирных кислот во время восстановления, причем в

большей степени у тренированных лиц [35]. Исследование возрастных пациентов (58–70 лет) с АС показало, что 16-недельные тренировки с использованием устройств с виброотдачей для стимуляции физической активности снижают продукцию интерлейкинов IL-1 β , IL-8, IL-10 в периферических мононуклеарах [26]. Поскольку в патогенезе АС важную роль играет ассоциированное со старением воспаление стенок сосудов, полученные данные свидетельствуют о протективном влиянии регулярных физических упражнений на развитие АС. Рандомизированное исследование на пожилых добровольцах (средний возраст 69 лет) с АС периферических артерий показало, что высокоинтенсивные тренировки в течение 12 мес. значительно более эффективно воздействовали на развитие АС по сравнению с низкоинтенсивными [36]. Проведенный в 2023 г. метаанализ 12 рандомизированных контролируемых и семи когортных исследований показал, что физические упражнения у пациентов с окклюзивным АС периферических артерий оказывают лечебный эффект и снижают риск смерти после 12 мес. регулярных занятий [37].

Влияние физических упражнений на экспрессию микроРНК и сигнальные пути при атеросклерозе

Воздействие физических упражнений на развитие АС может быть связано с изменением эпигенетических факторов. Об этом свидетельствуют опубликованные результаты экспериментов на самцах мышей C57BL/6J с нулевым ApoE в возрасте 10 нед. На данных животных продемонстрирован эффект физических упражнений на снижение экспрессии miR-155 и повышение — miR-126, miR-146a. Мышей помещали в камеру с беговой дорожкой на 10 мин перед началом бега, после чего в течение 1 ч животные бегали со скоростью 13 м/мин. По сравнению с контрольными мышами (с отсутствием физических упражнений, с воздействием статинов и без него) у опытной группы повышение уровней miR-126 и miR-146a снижало воспалительное повреждение сосудов за счет ингибирующего воздействия на экспрессию генов *TRAF* и *TLR4* [38]. В экспериментах на крысах линий ApoE $^{-/-}$ и LDLR $^{-/-}$ в 2017 г. было выявлено, что регулярные упражнения в виде плавания способствуют повышению экспрессии miR-20a клетками эндотелия. MiR-20a подавляет транскрипцию и трансляцию генов *PTEN* (кодирует белок фосфатазу, супрессор опухолей, предотвращающий быструю пролиферацию клеток), *ANGII* (кодирует ангиотензин), *ET-1* (ген эндотелина 1), *TxA2* (тромбоксан A2) [39]. Плавание также значительно уменьшало тяжесть течения АС у Apo $^{-/-}$ мышей за счет повышения уровней miR-492, которая ингибирует экспрессию гена резистина (*RETN*) [40].

В клинических исследованиях на пациентах с АС коронарных артерий было выявлено снижение

уровней miR-15a-5p, miR-93-5p, miR-451a и повышение miR-146a-5p в крови под влиянием физических упражнений. Проведенный биоинформационный анализ показал роль генов miR-15a-5p, miR-93-5p в механизмах биосинтеза и метаболизма жирных кислот [41]. В отношении miR-146a полученные результаты совпадают с данными экспериментов на мышах [38]. Регулярные тренировки в виде ходьбы у пациентов с АС периферических артерий способствовали экспрессии miR-126, которая играет роль в ангиогенезе и адаптации за счет ингибирования *PI3KR2*, благодаря чему активируется сигнальный путь фактора роста эндотелия сосудов VEGF [42]. Умеренные физические тренировки возрастных пациентов (72 ± 7 лет) с АС периферических артерий способствовали повышению уровней miR-142-5p и miR-424-5p, которые воздействуют на VEGF и mTOR сигнальные пути, препятствуя развитию АС [43]. На рис. 2 представлена схема влияния физических тренировок (согласно данным экспериментальных и клинических исследований) на экспрессию специфических микроРНК, вовлеченных в патогенез АС.

Поскольку даже одна микроРНК влияет на множество различных генов, логично предположить, что изменение экспрессии этих молекул оказывает

воздействие на специфические вовлеченные в патогенез АС механизмы. Действительно, в экспериментах на мышах аэробные тренировки приводили к повышению экспрессии SESN1. Белки SESN подавляют сигнальные пути воспаления со снижением уровней провоспалительных факторов [44]. Упражнения по плаванию у C57BL/6J мышей в возрасте 24 мес. усиливали выработку и другого представителя этих белков — SESN2, способствуя повышению чувствительности к инсулину [45]. Физические упражнения влияют также на сигналинг АМФ-активируемой протеинкиназы (АМРК). Это способствует восстановлению метаболизма липидов и нормализации функции ЭЦ за счет взаимодействия АМРК с рецепторами, активирующими пролифераторы пероксисом [46]. Помимо мутаций гена *ApoE*-/- для моделирования АС, у экспериментальных животных моделируют развитие АС путем нокаута (инактивации) обоих аллелей гена рецепторов липопротеинов низкой плотности (*LDLR*-/-). Эксперименты на таких мышах показали, что регулярные аэробные физические упражнения в течение четырех недель усиливают выработку пероксида водорода и оксида азота, препятствуя эндотелиальной дисфункции [47].

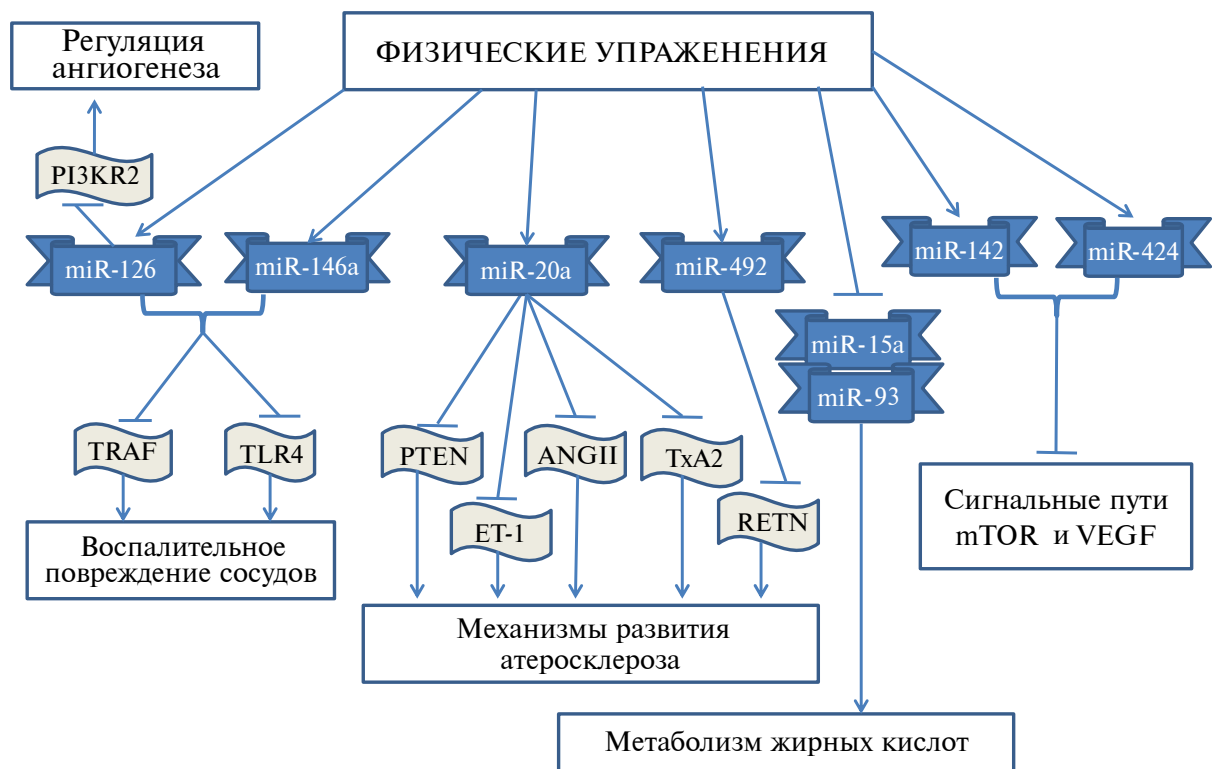


Рис. 2. Схема воздействия физических упражнений на экспрессию микроРНК, вовлеченных в патогенез атеросклероза.

Роль транспозонов и длинных некодирующих РНК в патогенезе атеросклероза

Эффект воздействия физических тренировок может быть обусловлен влиянием на активированные при АС транспозоны (МГЭ), поскольку продукты экспрессии МГЭ при старении стимулируют гиперпродукцию интерферона и вторичные хронические воспалительные процессы в организме [24, 48]. Для макрофагов характерна экспрессия HERV-K HML-2, коррелирующая с иммунной активацией макрофагов (поляризация в M1-клетки) и ответом на интерферон-I [49]. При старении дисфункциональные LB-пенистые макрофаги (CD14+CD16+) продуцируют частицы HERV-K102, высвобождаемые для стимуляции обучаемого врожденного иммунитета [50], что может быть причиной нарушенной экспрессии генов при АС в данных клетках [51]. Макрофаги экспрессируют также ген *ERVpbl*, произошедший от *Env* эндогенных РЭ HERV-P [52]. Действительно, проведенное в 2019 г. исследование изменений эпигенетических факторов в лейкоцитах периферической крови у людей под влиянием физических упражнений показало усиление метилирования *Alu* и *LINE1*, а также генов *TNFA*, *NOS2*, *EDN1*, что сопровождалось снижением артериального давления [53]. В скелетной мускулатуре физические упражнения усиливают метилирование *LINE1*, в норме сниженное при физиологическом старении [54]. В экспериментах на трансгенных мышах, получавших диету с высоким содержанием жира, показано повышение транскриптов РЭ с их снижением под влиянием аэробных упражнений [55].

Роль МГЭ в инициации и развитии АС обусловлена не только опосредованным интерфероном воспалением [24, 48], но и участием в функционировании иммунной системы. Об этом свидетельствует возникновение необходимых для V(D)J рекомбинации *RAG1* и *RAG2* от транспозонов [56]. Дисбаланс в активации РЭ с возрастом [22], способствующий старению и воспалению стенок сосудов [3–5], может отражаться на дисрегуляции ДНК-транспозонов и происходящих от них генов V(D)J рекомбинации с последующим изменением функционирования иммунной системы [57], что отражается на развитии АС. Активация РЭ при старении способствует иммунной патологии также в связи с использованием ERV в качестве энхансеров генов *HLA-G* [58] и интерферон-индуцибельных генов (формируя транскрипционные сети интерферонового ответа [59]). Согласно результатам метаанализов, дисрегуляция РЭ имеет значение в этиопатогенезе аутоиммунных болезней [60], с которыми достоверно ассоциирован АС [61].

Роль МГЭ в развитии АС опосредована также тесной взаимосвязью их функционирования с нкРНК, которые произошли от МГЭ в эволюции,

включая не только микроРНК [23], но и длинные нкРНК [62]. За счет этого МГЭ служат драйверами эпигенетической регуляции как на посттранскрипционном, так и на транскрипционном уровнях [63] за счет механизма РНК-направленного ДНК-метилирования [18]. Кроме того, МГЭ являются важнейшими источниками возникновения транскрипционных факторов [64] и сайтов связывания с ними [65], что свидетельствует о существовании дополнительного механизма влияния транспозонов на эпигенетические факторы, поскольку транскрипционные факторы влияют на различные деацетилазы гистонов [66]. Определена также взаимосвязь *miR-148* с ДНК-метилтрансферазами *DNMT1*, *DNMT3a*, *miR-140* – с деацетилазой гистонов *HDAC4* [67].

Длинные нкРНК относятся к эпигенетическим факторам, и изменения их уровней в патогенезе АС могут быть отражением особенностей экспрессии МГЭ, являющихся источниками нкРНК в эволюции [62]. Это обусловлено высокой чувствительностью РЭ к влиянию средовых воздействий [68] и гиперактивацией МГЭ при старении [22]. Продукты экспрессии HERV [69] и *LINE-1* [70] сами функционируют в качестве длинных нкРНК. Описана роль взаимодействий РЭ с длинными нкРНК в патогенезе АС. *Alu*-элементы (относятся к неавтономным РЭ) связываются с длинной нкРНК *ANRIL*, вовлеченной в развитие АС [71]. *ANRIL* взаимодействует непосредственно с последовательностями *Alu* в геноме [72], которые оказывают проатерогенный эффект, располагаясь в областях промоторов генов-мишеней [73], кодирующих белки группы поликомб *PRC-1* и *PRC-2*. Данные белки рекрутируются с помощью *ANRIL* и используются для модификации эпигенетических факторов с ингибированием генной экспрессии в цис-регуляции апоптоза, пролиферации и адгезии клеток, воспаления и развития АС [72].

Длинные нкРНК *VINAS* [74] и *H19* [75] влияют на развитие АС за счет регуляции сигнальных путей *MAPK* и *NF-κB*, участвующих в воспалении. Нокдаун *VINAS* снижает экспрессию ключевых воспалительных маркеров, таких как *MCP-1*, *COX-2*, *TNF-α*, *IL-1β* в эндотелиоцитах [74]. В плазме крови и в бляшках больных АС определен повышенный уровень длинной нкРНК *AK136714*, ингибирование которой в экспериментах подавляет формирование АС, воспаление ЭЦ и защищает эндотелиальный барьер. *AK136714* стимулирует транскрипцию *Bim*, а также напрямую связывается с *HuR*, повышая стабильность мРНК генов *TNF-α*, *IL-1β* и *IL-6* [76]. Длинная нкРНК *RAP1A* экспрессируется макрофагами при прогрессировании АС, стимулируя их пролиферацию и подавляя апоптоз. Ингибирование *RAP1A in vivo* подавляет прогрессирование АС [77]. Экспрессия специфичной для макрофагов длинной нкРНК

MAARS (Macrophage-Associated Atherosclerosis IncRNA Sequence) в интиме аорты увеличивается в 270 раз при прогрессировании АС и снижается при регрессе на 60%. В экспериментах на LDLR^{-/-} (с обоими инактивированными аллелями рецепторов липопротеинов низкой плотности) мышей нокдаун MAARS снижал образование АС бляшек на 52% за счет уменьшения воспаления, апоптоза макрофагов и увеличения эффероцитоза в стенках сосудов [74].

Модифицированные транскрипты *Alu*-элементов при АС контролируют стабильность провоспалительной длинной нкРНК NEAT1, экспрессия которой выше у больных АС коронарных артерий и усиливается под влиянием TNF- α . Подавление NEAT1 приводит к ослаблению вызванной TNF- α провоспалительной реакции эндотелиоцитов с характерной для нее экспрессией хемокинов CXCL8, CCL2, иммуноглобулинов VCAM1 и ICAM1 [78]. При инфаркте миокарда с симптомами нестабильной атеросклеротической бляшки в сыворотке больных значительно повышается уровень длинной нкРНК MIAT, которая действует в качестве губки для miR-149-5p, способствуя экспрессии антифагоцитарной молекулы CD47 [79]. Т. е. механизм влияния длинных нкРНК на развитие АС может быть связан с регуляцией микроРНК, что, вероятно, обусловлено происхождением в эволюции от МГЭ как длинных нкРНК [62, 80], так и микроРНК [23] (общее происхождение способствует наличию комплементарных последовательностей). Поэтому логично предположить, что наблюдаемые изменения экспрессии нкРНК при АС являются следствием патологической активации МГЭ при старении [22, 24, 25], которые оказывают не только прямое воздействие на развитие АС [3–5], но и опосредованное, за счет взаимодействий произошедших от них микроРНК и длинных нкРНК (рис. 3).

Роль произошедших от транспозонов микроРНК в развитии атеросклероза и старения

Анализ научной литературы позволил нам выявить изменение экспрессии 35 произошедших от транспозонов микроРНК, экспрессия которых изменяется как при старении, и при атеросклерозе. Так, уровень возникшей от LTR-ERV1 и частично комплементарной ее последовательности [23] miR-1246 повышается как при АС [81], так и при старении (в фибробластах человека) [82, 83]. При атеросклерозе miR-1246 способствует пролиферации, инвазии и дифференцировке ГМКС [81]. Поскольку miR-1248 (произошла от SINE/Alu [23]) подавляет экспрессию тромбомодулина в предшественниках ЭЦ, снижение ее уровня способствует развитию АС [84]. Низкие концентрации miR-1248 определяются также при старении [85]. У больных инфарктом миокарда в экзосомах, полученных из

макрофагов, определены высокие уровни miR-1271 [86], произошедшей от LINE2 [23]. При исследовании образцов коронарных артерий больных АС определено значительное повышение экспрессии miR-1273 [87], семейство которой произошло в эволюции от РЭ LINE, SINE, ERVL [23]. При старении экспрессия miR-1271 и miR-1273 также повышается [82, 83]. Повышенные уровни miR-1290, возникшей от SINE/MiR [23], наблюдаются при старении [83] и при осложненном инсультом АС у пациентов молодого возраста [88].

Произошедшая от LINE2 miR-151 [23] подавляет апоптоз ЭЦ в развитии АС. Данная микроРНК влияет на выработку белков BAX, IL-17A, с-каспазы 3 и 9. Как при АС [89], так и при старении снижается уровень miR-151 [85], что отражается на активации воспалительных процессов при обоих процессах. Экспрессия miR-192 (возникла от LINE2 [23]) значительно выше в сыворотке крови больных АС. MiR-192 способствует пролиферации и миграции ГМКС [90]. При старении также наблюдается повышение экспрессии miR-192 [91]. В сыворотке больных АС выявлено значительное снижение уровня miR-211 [92], произошедшей от LINE2 [23]. Экспрессия miR-211 достоверно уменьшена у людей с более низкой продолжительностью жизни по сравнению с долгожителями [93]. От ДНК-транспозона MER-135 в эволюции возникла miR-224 [23], для которой определена обратная корреляция с АС коронарных артерий у человека [94]. MiR-224 ассоциирована со старением головного мозга. Ее мишенью является ген *CHOP*, который вовлечен в регуляцию митохондриальных белков [95].

Повышенная экспрессия miR-31 (произошла от LINE2 [23]) способствует прогрессированию АС за счет воздействия на оксидазу NOX4, которая регулирует миграцию ГМКС [96]. MiR-31 действует как ключевой драйвер старения фолликулярных стволовых клеток волос путем прямого нацеливания на мРНК гена *Clock* (основной ген циркадных часов, нарушение регуляции которого активирует каскад MAPK/ERK), вызывая истощение HFSC посредством трансэпидермальной элиминации. Условная абляция miR-31 обеспечивает эффективную защиту кожи от старения [97]. У больных с АС коронарных артерий значительно повышена экспрессия miR-320b, которая регулирует отток холестерина из макрофагов. Введение miR-320b экспериментальным животным увеличивало размеры АС бляшек, содержание поврежденных макрофагов и уровни провоспалительных цитокинов за счет усиления фосфорилирования NF- κ B [98]. Источником miR-320b в эволюции является LINE2 [23]. Повышенный уровень miR-320b ассоциирован также со старением [99].

В образовании окисленных пенистых клеток при АС определена роль miR-326 (произошла от

ДНК-транспозона hAT-Tip100 [23]), вовлеченной в сеть взаимодействий кольцевых РНК с длинными нкРНК [100]. Усиленная экспрессия miR-326 определяется в фибробластах кожи при старении [101]. Концентрация возникшей от SINE/MIR miR-335 [23] повышена в плазме крови больных АС [102]. Высокие концентрации miR-335 способствуют старению ЭЦ за счет ингибирования экспрессии гена *sKlotho* [103]. Транскрипция miR-335 повышается также в гиппокампе стареющего головного мозга [104]. В макрофагах, ГМКС и ЭЦ при атерогенезе определяется усиление экспрессии miR-340, произошедшей от ДНК-транспозона TcMar-Mariner [105]. Низкая продолжительность жизни ассоциирована с высокими уровнями miR-340 [93]. В сыворотке больных АС определено значительное повышение экспрессии miR-374 (произошла от LINE2 [23]), которая стимулирует пролиферацию и миграцию ГМКС [106]. Быстрые темпы старения ассоциированы с высокими уровнями miR-374 [93].

Снижение оттока свободного холестерина из макрофагов и усиленный приток окисленных липопротеинов низкой плотности являются важным фактором развития АС. В метаболических путях, регулирующих эти процессы, участвует произошедшая от SINE/MIR и LINE2 [23] miR-378 [107], активируемая комплексом AP-1, ингибируемым коэнзимом Q10 [108]. Повышение экспрессии miR-378 определено у людей старческого возраста при регенерации мышц. Мишенями miR-378 являются мРНК генов сигнальных путей инсулиноподобного фактора роста (*IGF-1*) [109]. MiR-384, произошедшая от LINE-Dong-R4 [23], негативно регулирует возрастную остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, что свидетельствует о роли данной микроРНК в старении [110]. MiR-384 ускоряет развитие АС за счет ингибирования генов аутофагии макрофагов [111].

У больных АС коронарных артерий низкий уровень miR-421 (произошла от LINE2 [23]) в сыворотке, бляшках и ГМКС сопровождается усилением экспрессии хемокина CXCL2 [112]. Старение также ассоциировано со снижением транскрипции miR-421 [113]. MiR-4487 (произошла от LINE1 [23]) стимулирует миграцию и выживаемость ГМКС и ингибирует их апоптоз путем целевого воздействия на RASA1 (регулятор сигнального пути RAS/MAPK) [114]. Со старением кожи определена ассоциация повышения экспрессии miR-4487 [115]. У больных с АС крупных сосудов определено достоверное снижение экспрессии miR-493 по сравнению с контролем [116]. Данная микроРНК произошла от LINE2 [23]. При старении снижается экспрессия miR-493 в скелетной мускулатуре. Мишенью данной микроРНК является ген бета-субъединицы фибриногена *FGB* [117]. У пациентов с АС коронарных артерий в жировой ткани вокруг пораженных сосудов определено снижение экспрессии

miR-548. Представители семейства данной микроРНК произошли в эволюции от различных РЭ (LINE1, LINE2, LTR-ERVL, LTR-Gypsy, LTR-ERV1, SINE/MIR) и ДНК-ТЕ (TcMar, hAT Charlie) [23]. MiR-548 регулирует экспрессию гена *HMGB1* (кодирует негистоновый белок, связывающий хроматин и участвующий в контроле транскрипции, репликации и репарации ДНК) [118]. При старении также определено снижение уровня miR-548 [82, 83].

Повышенная экспрессия miR-552 (произошла от LINE1 [23]) под влиянием PDGF-bb определена в ГМКС, что ведет к стимуляции их пролиферации, инвазии и миграции. Мишенями miR-552 являются мРНК протоонкогена *SKI* и гена транскрипционного фактора *ATF4* [119]. При старении у людей определено увеличение уровней miR-552, в 124 раза большее в сравнении с молодыми людьми [120]. Кольцевая РНК circ_0086296 индуцирует АС через петлю обратной связи IFIT1/STAT1, действуя как губка для miR-576 (возникла от LINE1 [23]), которая ингибирует экспрессию гена, индуцируемого интерфероном белка с тетраэрикопептидными повторами *IFIT1* и гена цитокин-регулируемого транскрипционного фактора *STAT1*, препятствуя развитию АС [121]. Для старения фибробластов человека определено снижение уровня miR-576 [82, 83].

Произошедшая от ДНК-ТЕ hAT-Blackjack [23] miR-584 ингибирует мРНК эндотелиальной синтазы оксида азота eNOS, связываясь с ее 3'UTR, что характерно для воспалительных реакций и прогрессирования роста бляшек при АС. Белок eNOS является главным регулятором эндотелиального гомеостаза [122]. Низкие уровни miR-584 ассоциированы также со старением [82, 83]. От LINE2 в эволюции возникла miR-708 [23], которая экспрессируется на высоком уровне в ЭЦ неоинтимы в поврежденных сосудах при физиологическом потоке крови, однако не экспрессируется при застое. Данная микроРНК обладает противовоспалительным свойством, подавляя экспрессию связанной с рецептором IL-1 киназы, рецептора IL-6, консервативной вездесущей киназы типа “спираль–петля–спираль” и ингибитора субъединицы-γ киназы ядерного фактора κB [123]. Снижение экспрессии miR-708 ассоциировано и со старением [124]. В табл. 1 представлены 25 микроРНК, произошедшие от транспозонов, характер изменения которых идентичен для старения и АС. МикроРНК miR-1248, -151, -211, -224, -421, -493, -548, -576, -708 и их миметики могут быть использованы для патогенетической терапии АС и продления жизни. МикроРНК miR-1246, -1271, -1273, -1290, -192, -31, -320b, -326, -335, -340, -374, -378, -384, -4487, -552, -584, для которых определена повышенная экспрессия, могут служить объектами для таргетной

Таблица 1. Идентичное изменение экспрессии произошедших от транспозонов микроРНК при атеросклерозе и старении

№	МикроРНК	Транспозон-источник	Изменение экспрессии микроРНК при атеросклерозе (повышение — ↑, снижение — ↓) [примеч. автора]	Изменение экспрессии микроРНК при старении (повышение — ↑, снижение — ↓) [примеч. автора]
1	miR-1246	LTR-ERVL	↑ [81]	↑ [82, 83]
2	miR-1248	SINE/Alu	↓ [84]	↓ [85]
3	miR-1271	LINE2	↑ [86]	↑ [82, 83]
4	miR-1273	LINE, SINE, ERVL	↑ [87]	↑ [82, 83]
5	miR-1290	SINE/MIR	↑ [88]	↑ [83]
6	miR-151	LINE2	↓ [89]	↓ [85]
7	miR-192	LINE2	↑ [90]	↑ [91]
8	miR-211	LINE2	↓ [92]	↓ [93]
9	miR-224	MER-135	↓ [94]	↓ [95]
10	miR-31	LINE2	↑ [96]	↑ [97]
11	miR-320b	LINE2	↑ [98]	↑ [99]
12	miR-326	hAT-Tip100	↑ [100]	↑ [101]
13	miR-335	SINE/MIR	↑ [102]	↑ [103, 104]
14	miR-340	TcMar-Mariner	↑ [105]	↑ [93]
15	miR-374	LINE2	↑ [106]	↑ [93]
16	miR-378	SINE/MIR, LINE2	↑ [107, 108]	↑ [109]
17	miR-384	LINE-Dong-R4	↑ [111]	↑ [110]
18	miR-421	LINE2	↓ [112]	↓ [113]
19	miR-4487	LINE1	↑ [114]	↑ [115]
20	miR-493	LINE2	↓ [116]	↓ [117]
21	miR-548	LINE, LTR, SINE, TcMar, hAT Charlie	↓ [118]	↓ [82, 83]
22	miR-552	LINE1	↑ [119]	↑ [120]
23	miR-576	LINE1	↓ [121]	↓ [82]
24	miR-584	hAT-Blackjack	↑ [122]	↑ [82, 83]
25	miR-708	LINE2	↓ [123]	↓ [124]

терапии АС и для замедления процессов старения с помощью антисмысловых олигонуклеотидов [125].

Для ряда микроРНК характерен разный характер экспрессии при старении и АС. Это свидетельствует о том, что при болезнях нарушается физиологический ход развития организма вследствие патологической активации транспозонов, что отражается на изменении эпигенетической регуляции тканей и органов. Поэтому такие микроРНК являются наиболее перспективными объектами для проведения таргетной терапии болезни. Так, ассоциированная со старением (снижение уровня) [85] miR-1248 проявляет повышенную экспрессию

при АС, подавляя экспрессию тромбомодулина в эндотелиальных клетках-предшественниках, что свидетельствует о ее возможном участии в патогенезе АС [84]. MiR-1248 возникла в эволюции от SINE/Alu [23]. У пациентов с АС коронарных артерий выявлен повышенный уровень произошедшей от ERVL [23] miR-1257, участвующей в путях сборки белков главного комплекса гистосовместимости МНС и регулирующей экспрессию генов *CALR*, *POMC*, *TLR4*, *IL10*, *ATF6* [126]. При старении фибробластов человека экспрессия miR-1257 снижается [82]. Уровень miR-1261, произошедшей от ДНК-транспозона Tc-Mar [23], повышен при

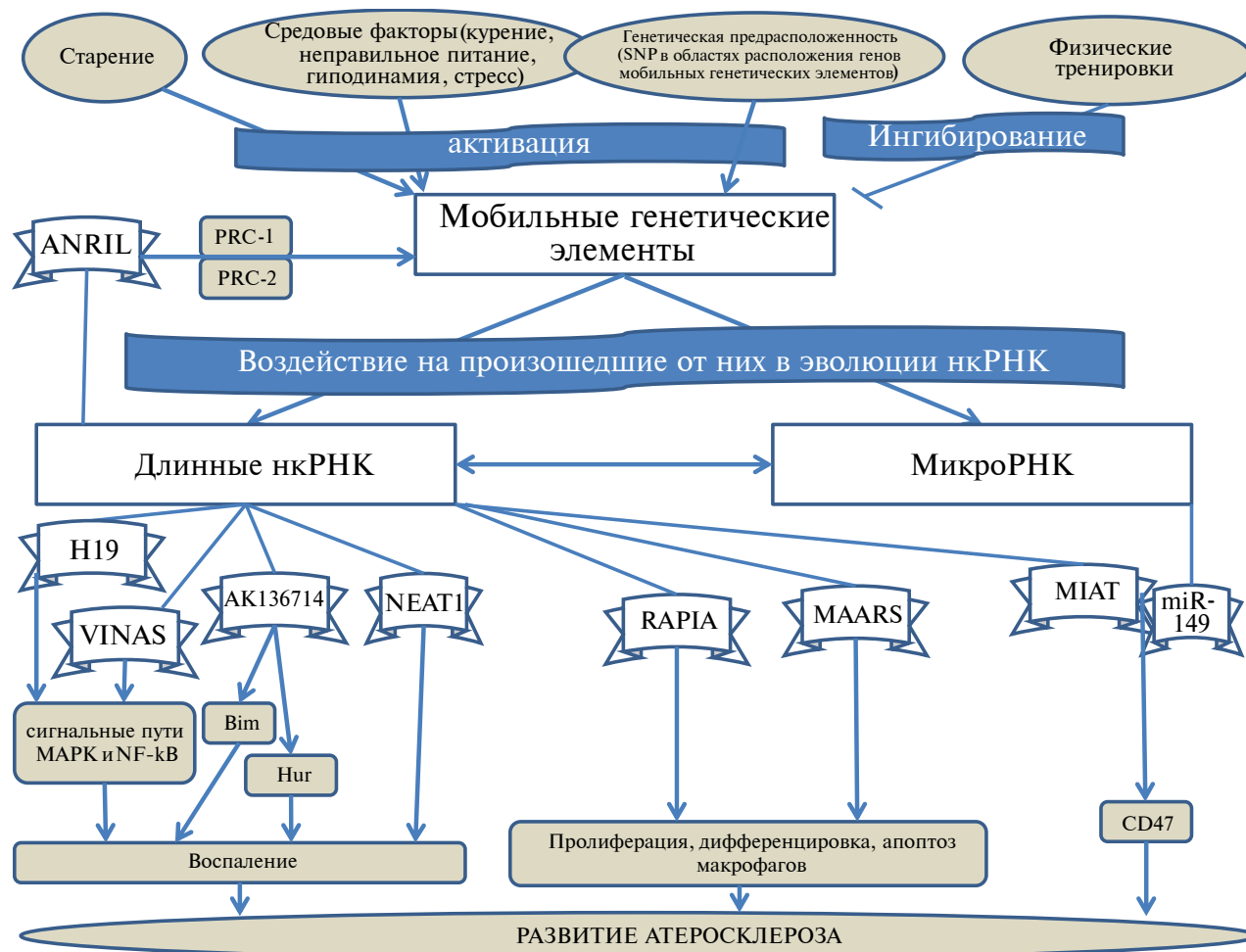


Рис. 3. Схема взаимодействия мобильных генетических элементов с некодирующими РНК (нкРНК) в патогенезе атеросклероза.

осложненном АС сосудов головного мозга [88] и снижен при старении [83].

Источником miR-147 в эволюции является LINE1 [23]. Данная микроРНК обладает атерогенными свойствами, индуцируя экспрессию гена молекулы адгезии *ICAM-1* [127]. Однако со старением ассоциированы низкие уровни miR-147 [128]. В плазме крови пациентов с нестабильной стенокардией определено значительное повышение уровней miR-28, которая усиливает экспрессию гена АТФ-связывающего транспортера *ABCA1*, что коррелирует с активацией трансляции мРНК гена *LXRα* в макрофагах [129]. Данная микроРНК, произошедшая от LINE2 [23], считается потенциальным биомаркером нестабильной стенокардии [129]. Уровень miR-28 значительно ниже у пожилых людей [130]. Произшедшая от LINE2 miR-325 способствует развитию АС за счет подавления экспрессии деметилазы гистонов *KDM1A*, уменьшая уровни SREBF1 и ингибируя активацию пути PPARγ-LXR-ABCA1 [131]. В то же время снижение

уровней miR-325 способствует старению хондроцитов за счет активации путей p53/p21 [132]. При старении в мононуклеарах периферической крови определено снижение экспрессии miR-342 (возникшей от SINE/tRNA-RTE [23]), нацеленной на мРНК гена деацетилазы гистонов *SIRT6* [133]. В периферических мононуклеарах определены высокие уровни miR-342, что положительно коррелировало с концентрациями в сыворотке крови IL-6 и TNF-α, способствуя развитию воспаления [134].

MiR-495 (источник — ERVL [23]) участвует в патогенезе АС путем связывания с кольцевой РНК *hsa_circ_0126672* [135]. MiR-495 ингибирует образование атеросклеротических бляшек за счет снижения экспрессии Круппель-подобного транскрипционного фактора KLF5 [136]. В экспериментах на клеточных линиях человека miR-495 способствовала старению мезенхимальных стволовых клеток за счет воздействия на мРНК протоонкогена *BMI1* [137]. MiR-520d (произошла от SINE/Alu [23]) ингибирует экспрессию *PCSK9*, вызывающего

Таблица 2. Разнонаправленное изменение экспрессии произошедших от транспозонов микроРНК при атеросклерозе и старении

№	МикроРНК	Транспозон-источник	Изменение экспрессии микроРНК при атеросклерозе (повышение – ↑, снижение – ↓) [примеч. автора]	Изменение экспрессии микроРНК при старении (повышение – ↑, снижение – ↓) [примеч. автора]
1	miR-1248	SINE/Alu	↑ [84]	↓ [85]
2	miR-1257	ERVL	↑ [126]	↓ [82]
3	miR-1261	Tc-Mar	↑ [88]	↓ [83]
4	miR-147	LINE1	↑ [127]	↓ [128]
5	miR-28	LINE2	↑ [129]	↓ [130]
6	miR-325	LINE2	↑ [131]	↓ [132]
7	miR-342	SINE/tRNA-RTE	↑ [134]	↓ [133]
8	miR-495	ERVL	↓ [135, 136]	↑ [137]
9	miR-520d	SINE/Alu	↓ [138]	↑ [139]
10	miR-633	SINE/MIR	↓ [140]	↑ [128]
11	miR-641	SINE/MIR	↓ [141]	↑ [83]
12	miR-652	hAT-Tip100	↑ [142, 143]	↓ [124]

деградацию рецепторов липопротеинов низкой плотности. Соответственно, miR-520d усиливает экспрессию этих рецепторов и связывание с атерогенными липопротеинами, подавляя развитие АС [138]. В то же время miR-520d способствует старению скелетной мускулатуры за счет влияния на регуляторные факторы *MyoD*, *MyoG*, *Mef2c*, *Myf5*. Длинная нкРНК GPRC5D-AS1, ингибирующая miR-520d, предложена в качестве терапевтической мишени для лечения саркопении [139].

Уровень miR-633 (произошедшей от SINE/MIR [23]) снижается при АС. Данная микроРНК регулирует CDC20B (белок, регулирующий анафазу митоза) и является мишенью для кольцевой РНК hsa_circ_0008896, влияющей на ГМКС [140]. Со старением ассоциировано повышение экспрессии miR-633 [128]. Экспрессия miR-641 (произошла от SINE/MIR [23]) снижена в индуцированных окисленными липопротеинами низкой плотности ГМКС. С данной микроРНК взаимодействует длинная нкРНК MIAT [141]. При старении фибробластов человека уровень miR-641 снижается [83]. Старение ассоциировано со снижением экспрессии miR-652 [124]. Источником miR-652 в эволюции является ДНК-ТЕ hAT-Tip100 [23]. Ингибирование этой микроРНК уменьшает прогрессирование АС и усиливает восстановление эндотелия за счет стимуляции экспрессии циклина D2 [142]. Кроме того, ингибирование miR-652 нормализует метаболизм липидов и снижает секрецию провоспалительных цитокинов макрофагами путем

восстановления экспрессии TP53 [143]. В табл. 2 представлены 12 произошедших от транспозонов микроРНК, для которых характерно разнонаправленное изменение экспрессии при старении и АС.

Анализ полученных данных показал, что произошедшие от транспозонов микроРНК, ассоциированные со старением, влияют на развитие АС посредством нарушения функционирования генов в ГМКС (способствуя патологической пролиферации, дифференцировке, инвазии и апоптозу клеток) [14, 81, 84, 90, 106, 141], в эндотелиоцитах [84, 89, 102, 115, 123] и макрофагах [98, 100, 107], а также влияя на иммунные процессы (miR-1257 [126]; miR-28 [96]), эпигенетические факторы за счет взаимодействия с длинными нкРНК [100, 101, 136, 141], модификаторами гистонов [131, 133] и кольцевыми РНК [135, 140].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Атеросклероз является многофакторным заболеванием, ассоциированным с аллельными вариантами множества генов. Согласно метаанализу, наибольшее влияние на развитие болезни оказывают аллельные варианты генов, участвующих в функционировании иммунной системы, и расположенные в межгенных и интронных областях полиморфизмы, где находятся МГЭ и нкРНК. Анализ научной литературы позволил выявить роль активированных МГЭ в развитии атеросклероза как непосредственно за счет стимуляции интерферонового ответа продуктами экспрессии транспозонов,

так и за счет взаимодействия с некодирующими РНК, произошедшими от МГЭ в эволюции и содержащими комплементарные им последовательности нуклеотидов. Помимо генетической предрасположенности (замена нуклеотидов в областях расположения МГЭ), на активацию транспозонов влияют старение (характеризующееся повышенной экспрессией МГЭ) и внешнесредовые факторы, в том числе физические нагрузки. Это объясняет эффективность регулярных тренировок в профилактике и лечении АС, отражающихся на изменении экспрессии специфических микроРНК. Проведенный анализ научной литературы показал идентичное изменение экспрессии 25 произошедших от транспозонов микроРНК при старении и АС, что свидетельствует о том, что механизмы старения, обусловленные возраст-ассоциированной активацией МГЭ, лежат в основе заболевания. Однако не все эпигенетические механизмы старения идентичны патогенезу АС, о чем свидетельствуют полученные данные о разнонаправленном изменении экспрессии 12 микроРНК, произошедших от транспозонов. Выявленные микроРНК — перспективные мишени для проектирования таргетной терапии АС.

Исследование проведено без внешнего финансирования.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Herrington W., Lacey B., Sherliker P. et al.* Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of Atherothrombotic Disease // *Circ. Res.* 2016. V. 118. P. 535–546. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307611
2. *Wang J.C., Bennett M.* Aging and atherosclerosis: Mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence // *Circ. Res.* 2012. V. 111. P. 245–259. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261388
3. *Franceschi C., Bonafe M., Valensin S. et al.* Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000. V. 908. P. 244–254. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x
4. *Menghini R., Stohr R., Federici M.* MicroRNAs in vascular aging and atherosclerosis // *Ageing Res. Rev.* 2014. V. 17. P. 68–78. doi: 10.1016/j.arr.2014.03.005
5. *De Yebenes V.G., Briones A.M., Martos-Folgado I. et al.* Aging-associated miR-217 aggravates atherosclerosis and promotes cardiovascular dysfunction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020. V. 40. P. 2408–2424. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314333
6. *Incalcaterra E., Accardi G., Balistreri C.R. et al.* Pro-inflammatory genetic markers of atherosclerosis // *Curr. Atheroscler. Rep.* 2013. V. 15. doi: 10.1007/s11883-013-0329-5
7. *Wassel C.L., Lamina C., Nambi V. et al.* Genetic determinants of the ankle-brachial index: A meta-analysis of a cardiovascular candidate gene 50K SNP panel in the candidate gene association resource (CARE) consortium // *Atherosclerosis.* 2012. V. 222. P. 138–147. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.039
8. *Mishra A., Malik R., Hachiya T. et al.* Stroke genetics informs drug discovery and risk prediction across ancestries // *Nature.* 2022. V. 611. P. 115–123. doi: 10.1038/s41586-022-05165-3
9. *Nikpay M., Goel A., Won H.H. et al.* A comprehensive 1,000 genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease // *Nat. Genet.* 2015. V. 47. P. 1121–1130. doi: 10.1038/ng.3396
10. *Xu S., Pelisek J., Jin Z.G.* Atherosclerosis is an epigenetic disease // *Trends. Endocrinol. Metab.* 2018. V. 29. P. 739–742. doi: 10.1016/j.tem.2018.04.007
11. *Deng S., Wang H., Jia C. et al.* MicroRNA-146a induces lineage-negative bone marrow cell apoptosis and senescence by targeting polo-like kinase 2 expression // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017. V. 37. P. 280–290.
12. *Nowak W.N., Deng J., Ruan X.Z. et al.* Reactive oxygen species generation and atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017. V. 37.
13. *Bennett M.R., Sinha S., Owens G.K.* Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis // *Circ. Res.* 2016. V. 118. P. 692–702. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361
14. *Chen C., Yan Y., Liu X.* MicroRNA-612 is downregulated by platelet-derived growth factor-BB treatment and has inhibitory effects on vascular smooth muscle cell proliferation and migration via directly targeting AKT2 // *Exp. Ther. Med.* 2018. V. 15. P. 159–165. doi: 10.3892/etm.2017.5428
15. *Lu Y., Thavarajah T., Gu W. et al.* Impact of miRNA in atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018. V. 38. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310227
16. *Arora M., Kaul D., Sharma Y.P.* Human coronary heart disease: Importance of blood cellular miR-2909 RNomics // *Mol. Cell. Biochem.* 2014. V. 392. P. 49–63. doi: 10.1007/s11010-014-2017-3

17. Cui Y., Wang L., Huang Y. *et al.* Identification of key genes in atherosclerosis by combined DNA methylation and miRNA expression analyses // *Anatol. J. Cardiol.* 2022. V. 26. P. 818–826. doi: 10.5152/AnatolJCardiol.2022.1723
18. 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. doi: 10.3389/fgene.2019.00645
19. Ouimet M., Ediriweera H., Afonso M.S. *et al.* MicroRNA-33 regulates macrophage autophagy in atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017. V. 37. P. 1058–1067.
20. Yang H., Sun Y., Li Q. *et al.* Diverse epigenetic regulations of macrophages in atherosclerosis // *Front. Cardiovasc. Med.* 2022. V. 9. doi: 10.3389/fcvm.2022.868788
21. Sharma A.R., Sharma G., Bhattacharya M. *et al.* Circulating miRNA in atherosclerosis: A clinical biomarker and early diagnostic tool // *Curr. Mol. Med.* 2022. V. 22. P. 250–262. doi: 10.2174/1566524021666210315124438
22. Gorbunova V., Seluanov A., Mita P. *et al.* The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases // *Nature.* 2021. V. 596. P. 43–53. doi: 10.1038/s41586-021-03542-y
23. 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. doi: 10.1109/TCBB.2015.2511767
24. Autio A., Nevalainen T., Mishra B.H. *et al.* Effect of aging on the transcriptomic changes associated with the expression of the HERV-K (HML-2) provirus at 1q22 // *Immun. Ageing.* 2020. V. 17. P. 11. doi: 10.1186/s12979-020-00182-0
25. Cardelli M. The epigenetic alterations of endogenous retroelements in aging // *Mech. Ageing Dev.* 2018. V. 174. P. 30–46. doi: 10.1016/j.mad.2018.02.002
26. Noz M.P., Hartman Y.A.W., Hopman M.T.E. *et al.* Sixteen-week physical activity intervention in subjects with increased cardiometabolic risk shifts innate immune function towards a less proinflammatory state // *J. Am. Heart. Assoc.* 2019. V. 8. doi: 10.1161/JAHA.119.013764
27. Laufs U., Wassmann S., Czech T. *et al.* Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2005. V. 25. P. 809–814.
28. Starkie R., Ostrowski S.R., Jauffred S. *et al.* Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans // *FASEB J.* 2003. V. 17. P. 884–886.
29. Kohut M.L., McCann D.A., Russell D.W. *et al.* Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults // *Brain Behav. Immun.* 2006. V. 20. P. 201–209.
30. Pinto P.R., Rocco D.D., Okuda L.S. *et al.* Aerobic exercise training enhances the in vivo cholesterol trafficking from macrophages to the liver independently of changes in the expression of genes involved in lipid flux in macrophages and aorta // *Lipids Health Dis.* 2015. V. 14. P. 109.
31. Kadoglou N.P., Kostomitsopoulos N., Kapelouzou A. *et al.* Effects of exercise training on the severity and composition of atherosclerotic plaque in apoE-deficient mice // *J. Vasc. Res.* 2011. V. 48. P. 347–356. doi: 10.1159/000321174
32. Moustardas P., Kadoglou N.P., Katsimpoulas M. *et al.* The complementary effects of atorvastatin and exercise treatment on the composition and stability of the atherosclerotic plaques in ApoE knockout mice // *PLoS One.* 2014. V. 9. doi: 10.1371/journal.pone.0108240
33. Frodermann V., Rohde D., Courties G. *et al.* Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells // *Nat. Med.* 2019. V. 25. P. 1761–1771. doi: 10.1038/s41591-019-0633-x
34. Stanton K.M., Liu H., Kienzle V. *et al.* The effects of exercise on plaque volume and composition in a mouse model of early and late life atherosclerosis // *Front. Cardiovasc. Med.* 2022. V. 9. doi: 10.3389/fcvm.2022.837371
35. Klein S., Coyle E.F., Wolfe R.R. Fat metabolism during low-intensity exercise in endurance-trained and untrained men // *Am. J. Physiol.* 1994. V. 267. doi: 10.1152/ajpendo.1994.267.6.E934.
36. McDermott M.M., Spring B., Tian L. *et al.* Effect of low-intensity vs high-intensity home-based walking exercise on walk distance in patients with peripheral artery disease: The LITE randomized clinical trial // *JAMA.* 2021. V. 325. P. 1266–1276. doi: 10.1001/jama.2021.2536
37. Ingwersen M., Kunstmann I., Oswald C. *et al.* Exercise training for patients with peripheral arterial occlusive disease // *Dtsch. Arztebl. Int.* 2023. V. 120. P. 879–885. doi: 10.3238/arztebl.m2023.0231
38. Wu X.D., Zeng K., Liu W.L. *et al.* Effect of aerobic exercise on miRNA-TLR4 signaling in atherosclerosis // *Int. J. Sports Med.* 2014. V. 35. P. 344–350. doi: 10.1055/s-0033-1349075
39. Wang D., Wang Y., Ma J. *et al.* MicroRNA-20a participates in the aerobic exercise-based prevention of coronary artery disease by targeting PTEN //

- Biomed. Pharmacother. 2017. V. 95. P. 756–763.
doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.086
40. Cai Y., Xie K.L., Zheng F., Liu S.X. Aerobic exercise prevents insulin resistance through the regulation of miR-492/resistin axis in aortic endothelium // J. Cardiovasc. Transl. Res. 2018. V. 11. P. 450–458.
doi: 10.1007/s12265-018-9828-7
 41. Taraldsen M.D., Wiseth R., Videm V. et al. Associations between circulating microRNAs and coronary plaque characteristics: potential impact from physical exercise // Physiol. Genomics. 2022. V. 54. P. 129–140.
doi: 10.1152/physiolgenomics.00071.2021
 42. Da Silva N.D. Jr., Andrade-Lima A., Chehuen M.R. et al. Walking training increases microRNA-126 expression and muscle capillarization in patients with peripheral artery disease // Genes (Basel). 2022. V. 14.
doi: 10.3390/genes14010101
 43. Sieland J., Niederer D., Engeroff T. et al. Changes in miRNA expression in patients with peripheral arterial vascular disease during moderate- and vigorous-intensity physical activity // Eur. J. Appl. Physiol. 2023. V. 123. P. 645–654.
doi: 10.1007/s00421-022-05091-2
 44. Sun Y., Wu Y., Jiang Y., Liu H. Aerobic exercise inhibits inflammatory response in atherosclerosis via Sestrin 1 protein // Exp. Gerontol. 2021. V. 155.
doi: 10.1016/j.exger.2021.111581
 45. Lenhare L., Crisol B.M., Silva V.R.R. et al. Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice // Exp. Gerontol. 2017. V. 97. P. 17–21.
doi: 10.1016/j.exger.2017.07.009
 46. Narkar V.A., Downes M., Yu R.T. et al. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics // Cell. 2008. V. 134. P. 405–415.
doi: 10.1016/j.cell.2008.06.051
 47. Guizoni D.M., Dorighello G.G., Oliveira H.C.F. et al. Aerobic exercise training protects against endothelial dysfunction by increasing nitric oxide and hydrogen peroxide production in LDL receptor-deficient mice // J. Translational Med. 2016. V. 14. P. 213.
 48. De Cecco M., Ito T., Petrashen A.P. et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation // Nature. 2019. V. 566. P. 73–78.
doi: 10.1038/s41586-018-0784-9
 49. Russ E., Mikhalkovich N., Iordanskiy S. Expression of human endogenous retrovirus group K (HERV-K) HML-2 correlates with immune activation of macrophages and type I interferon response // Microbiol. Spectr. 2023. V. 11.
doi: 10.1128/spectrum.04438-22
 50. Laderoute M. The paradigm of immunosenescence in atherosclerosis-cardiovascular disease (ASCVD) // Discov. Med. 2020. V. 29(156). P. 41–51.
 51. Chai J.T., Ruparel N., Goel A. et al. Differential gene expression in macrophages from human atherosclerotic plaques shows convergence on pathways implicated by genome-wide association study risk variants // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2018. V. 38. P. 2718–2730.
doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311209
 52. Matsuzawa A., Lee J., Nakagawa S. et al. HERV-Derived Ervpbl is conserved in simiiformes, exhibiting expression in hematopoietic cell lineages including macrophages // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22.
doi: 10.3390/ijms22094504
 53. Ferrari L., Vicenzi M., Tarantini L. et al. Effects of physical exercise on endothelial function and DNA methylation // Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2019. V. 16.
doi: 10.3390/ijerph16142530
 54. Romero M.A., Mumford P.W., Roberson P.A. et al. Translational significance of the LINE-1 jumping gene in skeletal muscle // Exerc. Sport. Sci. Rev. 2022. V. 50. P. 185–193.
doi: 10.1249/JES.0000000000000301
 55. Wahl D., Cavalier A.N., Smith M. et al. Healthy aging interventions reduce repetitive element transcripts // J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 2021. V. 76. P. 805–810.
doi: 10.1093/gerona/glaa302
 56. Huang S., Tao X., Yuan S. et al. Discovery of an active RAG transposon illuminates the origins of V(D)J recombination // Cell. 2016. V. 166. P. 102–114.
doi: 10.1016/j.cell.2016.05.032
 57. Rivera-Munoz P., Malivert L., Derdouch S. et al. DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes // Eur. J. Immunol. 2007. V. 37. P. S71–S82.
doi: 10.1002/eji.200737396
 58. Chuong E.B. The placenta goes viral: Retroviruses control gene expression in pregnancy // PLoS Biol. 2018. V. 16.
doi: 10.1371/journal.pbio.3000028
 59. Chuong E.B., Elde N.C., Feschotte C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses // Science. 2016. V. 351. P. 1083–1087.
 60. De la Hera B., Varade J., Garcia-Montojo M. et al. Role of the human endogenous retrovirus HERV-K18 in autoimmune disease susceptibility: Study in the Spanish population and meta-analysis // PLoS One. 2013. V. 8.
doi: 10.1371/journal.pone.0062090.
 61. Martinez-Ceballos M.A., Rey J.C.S., Alzate-Granados J.P. et al. Coronary calcium in autoimmune diseases: A systematic literature review and meta-analysis // Atherosclerosis. 2021. V. 335. P. 68–76.
doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.09.017

62. Johnson R., Guigo R. The RIDL hypothesis: Transposable elements as functional domains of long noncoding RNAs // RNA. 2014. V. 20. P. 959–976. doi: 10.1261/rna.044560.114
63. Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Некодирующие части генома как основа эпигенетической наследственности // Вавил. журн. генетики и селекции. 2017. Т. 21. С. 742–749.
64. Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks // Nat. Rev. Genet. 2008. V. 9. P. 397–405.
65. Мустафин Р.Н. Взаимосвязь транспозонов с транскрипционными факторами в эволюции эукариот // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2019. Т. 55. № 1. С. 14–22.
66. Lee D.Y., Chiu J.J. Atherosclerosis and flow: Roles of epigenetic modulation in vascular endothelium // J. Biomed. Sci. 2019. V. 26. P. 56. doi: 10.1186/s12929-019-0551-8
67. Samantarrai D., Dash S., Chhetri B. et al. Genomic and epigenomic cross-talks in the regulatory landscape of miRNAs in breast cancer // Mol. Cancer Res. 2013. V. 11. P. 315–328.
68. Мустафин Р.Н., Хуснутдинова Э.К. Стресс-индуцированная активация транспозонов в экологическом морфогенезе // Вавил. журн. генетики и селекции. 2019. Т. 23. С. 380–389.
69. 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. doi: 10.1038/nsmb.2799
70. Honson D.D., Macfarlan T.S. A lncRNA-like role for LINE1s in development // Dev. Cell. 2018. V. 46. P. 132–134. doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.022
71. Hueso M., Cruzado J.M., Torras J. et al. ALU minating the path of atherosclerosis progression: Chaos theory suggests a role for alu repeats in the development of atherosclerotic vascular disease // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. doi: 10.3390/ijms19061734
72. Chi J.S., Li J.Z., Jia J.J. et al. Long non-coding RNA ANRIL in gene regulation and its duality in atherosclerosis // J. Huazhong. Univ. Sci. Technol. Med. Sci. 2017. V. 7. P. 816–822. doi: 10.1007/s11596-017-1812-y
73. Holdt L.M., Hoffmann S., Sass K. et al. Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks // PLoS Genet. 2013. V. 9. doi: 10.1371/journal.pgen.1003588
74. Simion V., Zhou H., Haemming S. et al. A macrophage-specific lncRNA regulates apoptosis and atherosclerosis by tethering HuR in the nucleus // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 6135. doi: 10.1038/s41467-020-19664-2
75. Pan J.X. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF-κB signaling pathway // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2017. V. 21. P. 322–328.
76. Bai J., Liu J., Fu Z. et al. Silencing lncRNA AK136714 reduces endothelial cell damage and inhibits atherosclerosis // Aging. 2021. V. 13. P. 14159–14169. doi: 10.18632/aging.203031
77. Sun C., Fu Y., Gu X. et al. Macrophage-enriched lncRNA RAPIA: A novel therapeutic target for atherosclerosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2020. V. 40. P. 1464–1478. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313749
78. Vlachogiannis N.I., Sachse M., Georgiopoulos G. et al. Adenosine-to-inosine Alu RNA editing controls the stability of the pro-inflammatory long noncoding RNA NEAT1 in atherosclerotic cardiovascular disease // J. Mol. Cell. Cardiol. 2021. V. 160. P. 111–120. doi: 10.1016/j.yjmcc.2021.07.005
79. Ye Z.M., Yang S., Xia Y. et al. LncRNA MIAT sponges miR-149-5p to inhibit efferocytosis in advanced atherosclerosis through CD47 upregulation // Cell. Death. Dis. 2019. V. 10. P. 138. doi: 10.1038/s41419-019-1409-4
80. Kapusta A., Kronenberg Z., Lynch V.J. et al. Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs // PLoS Genet. 2013. V. 9. doi: 10.1371/journal.pgen.1003470
81. Pan D., Liu G., Li B. et al. MicroRNA-1246 regulates proliferation, invasion, and differentiation in human vascular smooth muscle cells by targeting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) // Pflugers. Arch. 2021. V. 473. P. 231–240. doi: 10.1007/s00424-020-02498-8
82. Marasa B.S., Srikantan S., Martindale J.L. et al. MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence // Aging (Albany NY). 2010. V. 2. P. 333–343. doi: 10.18632/aging.100159
83. Dhahbi J.M., Atamna H., Boffelli D. et al. Deep sequencing reveals novel microRNAs and regulation of microRNA expression during cell senescence // PLoS One. 2011. V. 6. doi: 10.1371/journal.pone.0020509
84. Lin F.Y., Tsai Y.T., Huang C.Y. et al. GroEL of *Porphyromonas gingivalis*-induced microRNAs accelerate tumor neovascularization by downregulating thrombomodulin expression in endothelial progenitor cells // Mol. Oral. Microbiol. 2023. V. 39. P. 47–61. doi: 10.1111/omi.12415

85. *Noren Hooten N., Fitzpatrick M., Wood W.H. et al.* Age related changes in microRNA levels in serum // *Aging* (Albany NY). 2013. V. 5. P. 725–740.
86. *Long R., Gao L., Li Y. et al.* M2 macrophage-derived exosomes carry miR-1271-5p to alleviate cardiac injury in acute myocardial infarction through down-regulating SOX6 // *Mol. Immunol.* 2021. V. 136. P. 26–35.
doi: 10.1016/j.molimm.2021.05.006
87. *Wang R., Dong L.D., Meng X.B. et al.* Unique microRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 464. P. 574–579.
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.010
88. *Tan K.S., Armugam A., Sepramaniam S. et al.* Expression profile of microRNAs in young stroke patients // *PLoS One.* 2009. V. 4. e7689.
89. *Chen F., Ye X., Jiang H. et al.* MicroRNA-151 attenuates apoptosis of endothelial cells induced by oxidized low-density lipoprotein by targeting interleukin-17A (IL-17A) // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2021. 14. P. 400–408.
doi: 10.1007/s12265-020-10065-w
90. *Zhao L., Wang B., Sun L. et al.* Association of miR-192-5p with atherosclerosis and its effect on proliferation and migration of vascular smooth muscle cells // *Mol. Biotechnol.* 2021. V. 63. P. 1244–1251. doi: 10.1007/s12033-021-00376-x
91. *Tsukamoto H., Kouwaki T., Oshiumi H.* Aging-associated extracellular vesicles contain immune regulatory microRNAs alleviating hyperinflammatory state and immune dysfunction in the Elderly // *iScience.* 2020. V. 23.
doi: 10.1016/j.isci.2020.101520
92. *Zhang Y., Wang H., Xia Y.* The expression of miR-211-5p in atherosclerosis and its influence on diagnosis and prognosis // *BMC Cardiovasc. Disord.* 2021. V. 21. P. 371.
doi: 10.1186/s12872-021-02187-z
93. *Smith-Vikos T., Liu Z., Parsons C.* A serum miRNA profile of human longevity: Findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA) // *Aging* (Albany NY). 2016. V. 8(11). P. 2971–2987.
doi: 10.18632/aging.101106
94. *Miller C.L., Haas U., Diaz R. et al.* Coronary heart disease-associated variation in TCF21 disrupts a miR-224 binding site and miRNA-mediated regulation // *PLoS Genet.* 2014. V. 10.
doi: 10.1371/journal.pgen.1004263
95. *Francisco S., Martinho V., Ferreira M. et al.* The role of microRNAs in proteostasis decline and protein aggregation during brain and skeletal muscle aging // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 3232.
96. *Liu D., Sun X., Ye P.* MiR-31 overexpression exacerbates atherosclerosis by targeting NOX4 in apoE(-/-) Mice // *Clin. Lab.* 2015. V. 61. P. 1617–1624.
doi: 10.7754/clin.lab.2015.150322
97. *Yu Y., Zhang X., Liu F. et al.* A stress-induced miR-31-CLOCK-ERK pathway is a key driver and therapeutic target for skin aging // *Nat. Aging.* 2021. V. 1. P. 795–809.
doi: 10.1038/s43587-021-00094-8
98. *Lu X., Yang B., Yang H. et al.* MicroRNA-320b modulates cholesterol efflux and atherosclerosis // *J. Atheroscler. Thromb.* 2022. V. 29. P. 200–220.
doi: 10.5551/jat.57125
99. *Dalmaso B., Hatse S., Brouwers B. et al.* Age-related microRNAs in older breast cancer patients: Biomarker potential and evolution during adjuvant chemotherapy // *BMC Cancer.* 2018. V. 18. P. 1014.
doi: 10.1186/s12885-018-4920-6
100. *Wang L., Zheng Z., Feng X. et al.* CircRNA/lncRNA-miRNA-mRNA network in Oxidized, Low-Density, Lipoprotein-Induced Foam Cells // *DNA Cell. Biol.* 2019. V. 38. P. 1499–1511.
doi: 10.1089/dna.2019.4865
101. *Yang X., Tan J., Shen J. et al.* Endothelial cell-derived extracellular vesicles target TLR4 via miRNA-326-3p to regulate skin fibroblasts senescence // *J. Immunol. Res.* 2022. V. 2022.
doi: 10.1155/2022/3371982
102. *Hildebrandt A., Kirchner B., Meidert A.S. et al.* Detection of atherosclerosis by small RNA-sequencing analysis of extracellular vesicle enriched serum samples // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9.
doi: 10.3389/fcell.2021.729061
103. *Liu Y., Lai P., Deng J. et al.* Micro-RNA335-5p targeted inhibition of sKlotho and promoted oxidative stress-mediated aging of endothelial cells // *Biomark. Med.* 2019. V. 13. P. 457–466.
doi: 10.2217/bmm-2018-0430
104. *Raihan O., Brishti A., Molla M.R. et al.* The Age-dependent elevation of miR-335-3p Leads to reduced cholesterol and impaired memory in brain // *Neuroscience.* 2018. V. 390. P. 160–173.
doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.08.003
105. *Schiano C., Benincasa G., Franzese M. et al.* Epigenetic-sensitive pathways in personalized therapy of major cardiovascular diseases // *Pharmacol. Ther.* 2020. V. 210.
doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107514
106. *Wang W., Ma F., Zhang H.* MicroRNA-374 is a potential diagnostic biomarker for atherosclerosis and regulates the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells // *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 2020. V. 10. P. 687–694.
doi: 10.21037/cdt-20-444
107. *Shao D., Lian Z., Di Y. et al.* Dietary compounds have potential in controlling atherosclerosis by modulating macrophage cholesterol metabolism and inflammation via miRNA // *NPJ Sci. Food.* 2018.

- V. 2. P. 13.
doi: 10.1038/s41538-018-0022-8
108. Allen R.M., Vickers K.C. Coenzyme Q10 increases cholesterol efflux and inhibits atherosclerosis through microRNAs // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014. V. 34. P. 1795–1797.
 109. Proctor C.J., Goljanek-Whysall K. Using computer simulation models to investigate the most promising microRNAs to improve muscle regeneration during ageing // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 12314.
doi: 10.1038/s41598-017-12538-6
 110. Li X., Wu J., Zhang K. et al. MiR-384-5p Targets Gli2 and negatively regulates age-related osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells // *Stem. Cells Dev.* 2019. V. 28. P. 791–798.
doi: 10.1089/scd.2019.0044
 111. Wang B., Zhong Y., Huang D. et al. Macrophage autophagy regulated by miR-384-5p-mediated control of Beclin-1 plays a role in the development of atherosclerosis // *Am. J. Transl. Res.* 2016. V. 8. P. 606–614.
 112. Yang J., Liu H., Cao Q. et al. Characteristics of CXCL2 expression in coronary atherosclerosis and negative regulation by microRNA-421 // *J. Int. Med. Res.* 2020. V. 48.
doi: 10.1177/0300060519896150
 113. Li G., Song H., Chen L. et al. TUG1 promotes lens epithelial cell apoptosis by regulating miR-421/caspase-3 axis in age-related cataract // *Exp. Cell. Res.* 2017. V. 356. P. 20–27.
doi: 10.1016/j.yexcr.2017.04.002
 114. Liang X., Hu M., Yuan W. et al. MicroRNA-4487 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration and apoptosis by targeting RAS p21 protein activator 1 // *Pathol. Res. Pract.* 2022. V. 234.
doi: 10.1016/j.prp.2022.153903
 115. Wang L., Si X., Chen S. et al. A comprehensive evaluation of skin aging-related circular RNA expression profiles // *J. Clin. Lab. Anal.* 2021. V. 35.
doi: 10.1002/jcla.23714
 116. Niu M., Li H., Li X. et al. Circulating exosomal miRNAs as novel biomarkers perform superior diagnostic efficiency compared with plasma miRNAs for large-artery atherosclerosis stroke // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12.
doi: 10.3389/fphar.2021.791644
 117. Chen J., Zou Q., Lv D. et al. Comprehensive transcriptional landscape of porcine cardiac and skeletal muscles reveals differences of aging // *Oncotarget.* 2018. V. 9. P. 1524–1541.
 118. Konwerski M., Gromadka A., Arendarczyk A. et al. Atherosclerosis pathways are activated in pericoronary adipose tissue of patients with coronary artery disease // *J. Inflamm. Res.* 2021. V. 14. P. 5419–5431.
doi: 10.2147/JIR.S326769
 119. Fang M., Zhou Q., Tu W. et al. ATF4 promotes brain vascular smooth muscle cells proliferation, invasion and migration by targeting miR-552-SKI axis // *PLoS One.* 2022. V. 17.
doi: 10.1371/journal.pone.0270880
 120. Breunig S., Wallner V., Kobler K. et al. The life in a gradient: Calcium, the lncRNA SPRR2C and mir542/mir196a meet in the epidermis to regulate the aging process // *Aging (Albany NY).* 2021. V. 13. P. 19127–19144.
doi: 10.18632/aging.203385
 121. Zhang M., Zhu Y., Zhu J. et al. Circ_0086296 induced atherosclerotic lesions via the IFIT1/STAT1 feedback loop by sponging miR-576-3p // *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2022. V. 27. P. 80.
doi: 10.1186/s11658-022-00372-2
 122. Kim T.K., Jeon S., Park S. et al. 2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1 (OASL1) protects against atherosclerosis by maintaining endothelial nitric oxide synthase mRNA stability // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 6647.
doi: 10.1038/s41467-022-34433-z
 123. Chen L.J., Chuang L., Huang Y.H. et al. MicroRNA mediation of endothelial inflammatory response to smooth muscle cells and its inhibition by atheroprotective shear stress // *Circ. Res.* 2015. V. 116. P. 1157–1169.
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305987
 124. Castanheira C.I.G.D., Anderson J.R., Fang Y. et al. Mouse microRNA signatures in joint ageing and post-traumatic osteoarthritis // *Osteoarthr. Cartil Open.* 2021. V. 3.
doi: 10.1016/j.ocarto.2021.100186
 125. Saenz-Pipaon G., Dichek D.A. Targeting and delivery of microRNA-targeting antisense oligonucleotides in cardiovascular diseases // *Atherosclerosis.* 2023. V. 374. P. 44–54.
doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2022.12.003
 126. Xu X., Li H. Integrated microRNA-gene analysis of coronary artery disease based on miRNA and gene expression profiles // *Mol. Med. Rep.* 2016. V. 13. P. 3063–3073.
 127. Xu D., Liu T., He L. et al. LncRNA MEG3 inhibits HMEC-1 cells growth, migration and tube formation via sponging miR-147 // *Biol. Chem.* 2020. V. 401. P. 601–615.
doi: 10.1515/hsz-2019-0230
 128. Maes O.C., Sarojini H., Wang E. Stepwise up-regulation of microRNA expression levels from replicating to reversible and irreversible growth arrest states in WI-38 human fibroblasts // *J. Cell. Physiol.* 2009. V. 221. P. 109–119.
doi: 10.1002/jcp.21834.
 129. Liu J., Liu Y., Sun Y.N. et al. MiR-28-5p involved in LXR-ABCA1 pathway is increased in the plasma of unstable angina patients // *Heart. Lung. Circ.* 2015.

- V. 24. P. 724–730.
doi: 10.1016/j.hlc.2014.12.160
130. *Morsiani C., Bacalini M.G., Collura S. et al.* Blood circulating miR-28-5p and let-7d-5p associate with premature ageing in Down syndrome // *Mech. Ageing Dev.* 2022. V. 206.
doi: 10.1016/j.mad.2022.111691
 131. *Pu Y., Zhao Q., Men X. et al.* MicroRNA-325 facilitates atherosclerosis progression by mediating the SREBF1/LXR axis via KDM1A // *Life Sci.* 2021. V. 277.
doi: 10.1016/j.lfs.2021.119464.
 132. *Zhao J., Li C., Qin T. et al.* Mechanical overloading-induced miR-325-3p reduction promoted chondrocyte senescence and exacerbated facet joint degeneration // *Arthritis Res. Ther.* 2023. V. 25. P. 54.
doi: 10.1186/s13075-023-03037-3
 133. *Owczarz M., Polosak J., Domaszewska-Szostek A. et al.* Age-related epigenetic drift deregulates SIRT6 expression and affects its downstream genes in human peripheral blood mononuclear cells // *Epigenetics.* 2020. V. 15. P. 1336–1347.
doi: 10.1080/15592294.2020.1780081
 134. *Ahmadi R., Heidarian E., Fadaei R. et al.* MiR-342-5p expression levels in coronary artery disease patients and its association with inflammatory cytokines // *Clin. Lab.* 2018. V. 64. P. 603–609.
doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.171208
 135. *Rafiq M., Dandare A., Javed A. et al.* Competing endogenous RNA regulatory networks of hsa_circ_0126672 in pathophysiology of coronary heart disease // *Genes (Basel).* 2023. V. 14.
doi: 10.3390/genes14030550
 136. *Fu D.N., Wang Y., Yu L.J. et al.* Silenced long non-coding RNA activated by DNA damage elevates microRNA-495-3p to suppress atherosclerotic plaque formation via reducing Krüppel-like factor 5 // *Exp. Cell. Res.* 2021. V. 401.
doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112519
 137. *Li X., Song Y., Liu D. et al.* MiR-495 promotes senescence of mesenchymal stem cells by targeting Bmi-1 // *Cell. Physiol. Biochem.* 2017. V. 42. P. 780–796.
doi: 10.1159/000478069
 138. *Salerno A.G., van Solingen C., Scotti E. et al.* LDL receptor pathway regulation by miR-224 and miR-520d // *Front. Cardiovasc. Med.* 2020. V. 7. P. 81.
 139. *Yu M., He X., Liu T. et al.* lncRNA GPRC5D-AS1 as a ceRNA inhibits skeletal muscle aging by regulating miR-520d-5p // *Aging (Albany NY).* 2023. V. 15. P. 13980–13997.
doi: 10.18632/aging.205279.
 140. *Hou X., Dai H., Zheng Y.* Circular RNA hsa_circ_0008896 accelerates atherosclerosis by promoting the proliferation, migration and invasion of vascular smooth muscle cells via hsa-miR-633/CDC20B (cell division cycle 20B) axis // *Bioengineered.* 2022. V. 13. P. 5987–5998.
doi: 10.1080/21655979.2022.2039467
 141. *Ma G., Bi S., Zhang P.* Long non-coding RNA MIAT regulates ox-LDL-induced cell proliferation, migration and invasion by miR-641/STIM1 axis in human vascular smooth muscle cells // *BMC Cardiovasc. Disord.* 2021. V. 21. P. 248.
doi: 10.1186/s12872-021-02048-9
 142. *Huang R., Hu Z., Cao Y. et al.* MiR-652-3p inhibition enhances endothelial repair and reduces atherosclerosis by promoting Cyclin D2 expression // *EBioMedicine.* 2019. V. 40. P. 685–694.
doi: 10.1016/j.ebiom.2019.01.032
 143. *Liu H., Zuo C., Cao L. et al.* Inhibition of miR-652-3p regulates lipid metabolism and inflammatory cytokine secretion of macrophages to alleviate atherosclerosis by improving TP53 expression // *Mediators Inflamm.* 2022. V. 2022.
doi: 10.1155/2022/9655097

Epigenetic Mechanisms of the Influence of Physical Activity on the Development of Atherosclerosis

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*

This work is an analytical review dedicated to the search for driver mechanisms of epigenetic changes in atherosclerosis pathogenesis. The disease affects the cardiovascular system in the adult population, mainly the elderly and senile. Atherosclerosis is accompanied by progressive deposition of cholesterol and lipoproteins in vessels intima with inflammation, narrowing of the lumen and impaired blood supply to tissues and organs. These processes are characterized by changes in the expression of *CACNA1C*, *GABBR2*, *TCF7L2*, *DCK*, *NR1P1*, *PBX1*, *FANCC*, *CCDC88C*, *TCF12*, *ABLIM1* genes. Prevention of atherosclerosis is physical activity, the mechanisms of which are not fully understood. Experimental models have shown that regular training not only has a protective effect on the development of atherosclerosis, but also inhibits the progression of an already developed disease with a decrease in vascular stenosis, an increase in the concentration of collagen and elastin and matrix metalloproteinases in plaques. These results have been confirmed by clinical studies. The purpose of this review was to systematize the accumulated results on the causes of epigenetic changes, including those under the influence of regular training, causing changes in the expression of specific microRNAs in atherosclerosis. It was found that physical exercise in Apo^{-/-} mice increases the expression of miR-126 and miR-146a (inhibiting the *TLR4* and *TRAF* genes), miR-20a (affecting *PTEN*), miR-492 (suppressing *RETN* gene mRNA). Clinical studies have shown an increase in the levels of miR-146a, miR-126, miR-142-5p, miR-424-5p and a decrease in the transcription of miR-15a-5p, miR-93-5p, miR-451 under the influence of aerobic training. It has been suggested that the drivers of epigenetic changes in atherosclerosis are transposons pathologically activated during aging, the transcription of which can change under the influence of physical training, which is accompanied by impaired expression of long non-coding RNAs and microRNAs derived from transposons. Analysis of the literature data allowed us to identify 36 such microRNAs, 25 of which showed identical changes in levels during aging and atherosclerosis.

Keywords: atherosclerosis, aerobic training, inflammation, microRNA, retroelements, aging, transposons, physical exercise.

УДК 575.113

МЕЙОТИЧЕСКИЙ ДРАЙВ: ВНУТРИГЕНОМНЫЕ КОНКУРЕНЦИЯ И ОТБОР

© 2024 И. А. Захаров^{1, *}

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

*e-mail: iaz34@mail.ru

Поступила в редакцию 06.05.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

В статье рассмотрены распространение, механизмы и эволюционное значение мейотического драйва как явления, проявляющегося у гетерозигот в неравной передаче при мейозе в гаметы аллелей гена и/или гомологичных хромосом. Наиболее подробно мейотический драйв изучен у дрозофил, мышей, кукурузы и у грибов-аскомицетов родов *Neurospora* и *Podospora*. Следствием мейотического драйва является сдвиг частот аллелей в генофонде популяции и сохранение в популяции неадаптивных признаков.

Ключевые слова: мейотический драйв, ген, центромера, хромосома, *Drosophila*, мышь, кукуруза, *Mimulus*, аскомицеты, *Neurospora*, *Podospora*, внутригеномный отбор.

DOI: 10.31857/S0016675824100022 **EDN:** WGEPOF

Начиная с Ч. Дарвина, большинство эволюционистов считало особь единственным или главным объектом естественного отбора. Вместе с тем еще в XIX в. делались попытки расширить представление об объектах отбора в обе стороны: признав возможность отбора групп особей либо отбора неких единиц внутри организма. Обсуждение проблемы объектов естественного отбора (по состоянию на конец XX в.) было начато Е. Мауг [1]. Для объектов отбора — особи или группы особей, Е. Мауг предложил специальный термин “селекцион”. В своей публикации он подчеркнул, что отбор всегда происходит по фенотипу, а тот или иной генотип отбирается, поскольку реализуется в благоприятном для выживания или репродуктивного успеха фенотипе. Возможность отбора внутри организма или внутри генома (отбора генов) Е. Мауг упомянул, но подробно не рассматривал. В конце XIX в. А. Вейсман выдвинул гипотезу об отборе клеток внутри развивающегося организма. В той конкретной форме, как она была представлена им, идея Вейсмана о внутриорганизменном отборе была отвергнута в ходе дальнейшего развития биологии.

В настоящее время отбор внутри клеточных популяций, в частности тех, которые представляют собой опухоли, отрицать невозможно. Анализ молекулярно-генетической организации клеток показал, что и внутри клеток может иметь место конкуренция неких реплицирующихся единиц, а следовательно, может действовать естественный отбор. Относящиеся сюда явления (от конкуренции

генетически различающихся митохондриальных ДНК до взаимоотношений транспозонов со всем геномом клетки) слишком многочисленны, чтобы все они были здесь рассмотрены.

В настоящем обзоре я ограничусь рассмотрением лишь одного явления, где легко заметить конкуренцию внутригеномных генетических элементов, ведущую к отбору некоторых из них, а именно мейотического драйва — явления, широко распространенного среди грибов, растений, животных [2].

ОТКРЫТИЕ МЕЙОТИЧЕСКОГО ДРАЙВА, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТОГО ЯВЛЕНИЯ

Обзоры, посвященные мейотическому драйву (например [3]) до сих пор нередко начинаются со ссылки на публикацию 1928 г. С.М. Гершензона [4], в которой молодой московский генетик описал свои опыты, проводившиеся им с 1925 г. (когда С. Гершензон был еще студентом Московского университета им. М.В. Ломоносова и работал под руководством С.С. Четверикова). Работа была выполнена на “диких” дрозофилах, отловленных в лесу в Подмоскowie, в районе Звенигорода, и определенных как *Drosophila obscura* Fallen (вероятно, сейчас изученный вид был бы определен по-другому). В потомстве 2 из 19 оплодотворенных в природе самок были обнаружены семьи с ненормальным соотношением полов: наблюдалось не обычное соотношение, близкое к 1 : 1, а искаженное — в сумме на 96% самок приходилось только 4% самцов.

За такое отклонение оказался ответственен один ген, локализованный в X-хромосоме. Этот ген не проявляется у самок — ни в гетеро-, ни в гомозиготе, но у самцов в гемизиготе сказывается на их потомстве, обуславливая резкое преобладание в нем самок. Производимые самцами, носителями этого гена, гаметы с Y-хромосомой функционально не активны и обычно не участвуют в оплодотворении. В современной литературе старая публикация С.М. Гершензона цитируется как основополагающая (seminal — плодотворная [3]).

В дальнейшем явления, по своим последствиям подобные описанному С.М. Гершензоном и позднее названные мейотическим драйвом, были обнаружены у ряда других видов дрозофил: *D. pseudoobscura*, *D. affinis*, *D. athabasca* [5], *D. melanogaster* [6], *D. paramelanica* [7], *D. testacea* [8], а также у позвоночных животных, у растений и у грибов.

Термин “мейотический драйв” в 1957 г. ввели L. Sandler и E. Novitsky [9]. В дальнейшем это явление было определено как любое изменение процесса мейоза, которое приводит к тому, что гетерозигота по двум альтернативным факторам (аллелям гена, хромосомам) производит совокупность гамет с избытком одного из этих аллельных вариантов; такое явление может приводить к резкому изменению частот аллелей в популяции в пользу благоприятствуемого варианта, несмотря на его возможный вредный физиологический эффект [10]. Мейотический драйв (МД) привлек и привлекает к себе большое внимание как цитологический механизм отклонения от основы менделевских законов — равного попадания в гаметы гомологичных хромосом, приводящий к изменению генных частот в популяциях.

МЕХАНИЗМЫ МЕЙОТИЧЕСКОГО ДРАЙВА У ДРОЗОФИЛ

Схематически механизм мейотического драйва может быть представлен следующим образом [3]. В одной из хромосом свойственного данному виду набора присутствует так называемый драйвер (*D*), в транс-положении к нему, т. е. в гомологичной хромосоме, находится локус-мишень (target — *T*), на который направлено действие драйвера, инактивирующее всю хромосому с локусом *T*. Мейотический драйвер может быть определен как эгоистичный генетический элемент, который благоприятствует собственной передаче в гаметы гетерозиготной особи в ущерб альтернативной аллели [3].

В хромосоме, несущей *D*-локус, гомологичный *T*, представлен толерантным к действию *D*-аллелем *T^R*, т. е. генотип может быть изображен как

$$\frac{DT^R}{dT^S}.$$

Важно, чтобы рекомбинация между локусами *D* и *T* не происходила, так как это привело бы к появлению хромосомы-самоубийцы с набором аллелей *D* и *T^S*. Во многих изученных случаях локусы *D* и *T* располагаются в половых хромосомах X и Y, рекомбинация между которыми не происходит. При локализации обеспечивающих мейотический драйв локусов в аутосомах *D* и *T* обычно находятся в районах инверсий или в участках хромосом с затрудненной рекомбинацией (вблизи центромера и теломера). Так, у *D. melanogaster* система аутосомного мейотического драйва Segregation Distorter (SD) включает два локуса — драйвер (*Sd*) в проксимальном районе хромосомы 2 (2L) и мишень (*Rsp* — Responder), локализирующуюся в блоке tandemных повторов в прицентрическом гетерохроматине хромосомного плеча 2R.

Под термином “мейотический драйв” объединяются явления, которые приводят к одинаковому результату, но механизмы достижения этого результата (нарушение нормального соотношения гамет) могут быть совсем разными, даже в пределах видов одного рода *Drosophila*. С цитологической точки зрения эффект драйвера может проявляться как в процессе мейоза, так и на постмейотических стадиях. У *Drosophila simulans* в случае системы МД, названной по месту ее обнаружения (Paris SD), наблюдается aberrантная сегрегация Y-хромосомы в анафазе II: в одних случаях две хроматиды Y-хромосомы мигрируют к одному и тому же полюсу деления, в других эти хроматиды остаются растянутыми между полюсами, и два дочерних ядра оказываются связанными хромосомным мостом [11]. При МД нарушения могут наблюдаться и на пост-мейотических стадиях — при дифференциации сперматид в зрелые спермии. Так дело обстоит у *D. simulans* в другой системе МД (Wintes SR) [12] и у *D. affinis* [13].

Естественно возникает вопрос о молекулярных механизмах действия драйвера. Вероятнее всего, что в разных случаях МД эти механизмы не одинаковы. С. Cougret с соавт. [3], обсуждая эту проблему, пишут о трех возможностях. Первая из них — участие связывающихся с гетерохроматином белков. Один из двух генов-драйверов системы МД Paris SR у *D. simulans* — ген *HP1D2*, продуктом которого является белок, специфически связывающийся с гетерохроматином Y-хромосомы. Этот ген экспрессируется в сперматогониях. У самцов, проявляющих МД, аллель гена *HP1D2* слабо транскрибируется, хроматиды Y-хромосомы не расходятся нормально во II делении мейоза. Нокдаун этого гена у нормальных самцов сопровождается проявлением МД [3].

Второй возможный механизм действия драйвера или их исключения предполагает участие малых РНК. Подтверждающие такой механизм факты были получены при изучении другой системы МД у

D. simulans, а именно Winter SR. В этом случае действие X-хромосомного драйвера *Dox* может быть подавлено аутосомным супрессором *Nmy*. Ген *Nmy* кодирует малую РНК (hpRNA), которая процессируется в интерферирующую РНК, выключающую действие драйвера [14].

Наконец, третий возможный механизм МД связан с ядерным транспортом. В случае хорошо изученной аутосомной системы МД у *D. melanogaster* имеет место нарушение ядерного транспорта. Драйвер *Sd* кодирует укороченный RanGTPase-активирующий белок (RanGAP). Ran — это ГТП-аза, локализуемая в ядре, которая совместно с кофактором RanGAP обеспечивает транспорт через мембрану ядра, а также регуляцию клеточного цикла и образование веретена при митотических делениях. У мутантного белка RanGAP изменена его локализация в ядре, что нарушает осуществление функций этого белка [15], в частности приводит к проявлению МД.

Этот краткий обзор известных или предполагаемых механизмов МД в разных системах у дрозофил показывает, что один и тот же конечный эффект — нарушение равной представленности в гаметах двух аллелей или двух гомологичных хромосом — может быть связан с различными нарушениями клеточных процессов. Вместе с тем общая схема МД реализуется во всех случаях — появление в благоприятной хромосоме гена-драйвера, который тем или иным способом воздействуя на локус-мишень, препятствует образованию функционирующей гаметы с исключаемым из процесса нормальной передачи геном или хромосомой. Ниже описываемые случаи МД у других организмов могут иметь совсем другие цитологические механизмы.

МЕЙОТИЧЕСКИЙ ДРАЙВ У МЫШЕЙ

Короткохвостые мыши были описаны в 1927 г. Н. Добровольской-Завадской и Н. Кобозиевым [16]. От исходных короткохвостых была получена линия мышей с полным отсутствием хвоста. Позднее проведенный генетический анализ бесхвостых мышей [16] показал, что они гетерозиготны по двум предположительно аллельным летелям — *T* (проявляется как доминантная короткохвостость *Brachyury*) и *t*⁰ (леталь в гомозиготе, в гетерозиготе с аллелью дикого типа не проявляется). Эти две мутации в компаунде приводят к бесхвостости. В скрещиваниях, в которых мать несла аллель *t*⁰, в потомстве наблюдались ожидаемые соотношения; однако, если отец был гетерозиготен по *t*⁰, в потомстве бесхвостые особи появлялись чаще, чем в потомстве гетерозиготных самок. Так было обнаружено нарушение в передаче потомству гетерозиготных самцов аллелей локуса *T*.

В последующие годы огромное число работ было посвящено изучению генетики, цитологии и

эмбриологии мышей с мутациями в *T*-локусе. Основные результаты этих исследований были представлены в обзорах Л.Д. Сафроновой [17, 18] и могут быть кратко изложены следующим образом.

В хромосоме 17 у некоторых мышей, принадлежащих ко всем четырем известным подвидам *Mus musculus* и обитающих на разных континентах, был выявлен занимающий около 20 сМ (единиц карты) проксимально расположенный регион с подавленной рекомбинацией, названный *t*-гаплотипом и наследуемый как единый комплекс. В этом регионе выявлены четыре инверсии, три гена-дистортера *Ted* (от которых зависит нарушение передачи потомству всего гаплотипа), один респондер *Tcr*, отвечающий на действие дистортеров, ген брахиурии *T*, а также локус главного комплекса гистосовместимости. МД под влиянием дистортеров *t*-гаплотипа наблюдается только в потомстве самцов-гетерозигот $+ / t$: до 90% потомков получают гаплотип *t* при полном наборе дистортеров; при отсутствии 1–2 из них передача *t*-гаплотипа снижается до 40–60%. Отсутствие в пределах гаплотипа респондера *Tcr* возвращает характер расщепления к нормальному, менделевскому. *Tcr* экспрессируется в позднем сперматогенезе, производит со сниженной активностью одну из протеинкиназ, которая обеспечивает подвижность сперматозоидов. Другим хорошо изученным случаем МД у мышей является неправильное расщепление в потомстве цитологических вариантов первой хромосомы *Mus musculus*. Явление это было открыто и изучено новосибирскими генетиками (С.И. Агульником, А.О. Рувинским, П.М. Бородиным и др.).

В европейских популяциях подвида *M. musculus domesticus* встречаются особи с гомогенно окрашивающимся блоком (HSR) на хромосоме 1. В скрещиваниях такие хромосомы передаются нормально. В сибирских и среднеазиатских популяциях другого подвида, *M. m. musculus*, была обнаружена другая форма этой хромосомы: блок HSR был расщеплен на два, разделенных инверсией. Этот двойной блок, отсутствующий в хромосоме дикого типа, имеет размер до 50 Mb [19]. Изучение передачи сибирского варианта HSR-хромосомы показало, что в потомстве гетерозиготных самок наблюдается преимущественная передача HSR-хромосомы (соотношение в потомстве 247 : 39), в то время как в потомстве гетерозиготных самцов расщепление нормальное (99 : 90) [20]. Наблюдаемое неменделевское расщепление есть результат МД — преимущественного расхождения в мейозе II хромосомы HSR в яйцеклетку, а нормальной хромосомы — во второе направительное тельце [20]. В слабой степени хромосома HSR имеет преимущество и в I делении мейоза. Инверсия в районе HSR выступает как респондер; дистортер находится в той же хромосоме, дистальнее респондера; он действует ин транс [21].

Частота хромосомы HSR в разных выборках из популяций Сибири и Средней Азии — от 0 до 51,1% при достаточно высокой частоте гомозигот по этой хромосоме, достигающей до 26,7%. Значительная частота гомозигот наблюдается, несмотря на то, что жизнеспособность гомозигот снижена по сравнению с нормой до 55%, а фертильность гомозиготных самок еще ниже, до 10% [22]. Мыши остаются основным объектом изучения МД у млекопитающих. Выявленные случаи нарушения соотношения аллелей при передаче (TRD — transmission ratio distortion) у сельскохозяйственных животных и человека суммированы в обзоре [23]. Вероятно, не все описанные случаи TRD связаны именно с мейотическим драйвом.

МЕЙОТИЧЕСКИЙ ДРАЙВ И ЭВОЛЮЦИЯ КАРИОТИПА

Если мейотический драйв такого же типа, что и у дрозофил и мыши, у млекопитающих наблюдается редко, то драйв не в мужском, а в женском мейозе, проявляющийся в неслучайном расхождении хромосом, по-видимому, достаточно частое явление. Более того, МД рассматривается как важный механизм, определяющий в эволюции морфологию и число хромосом.

В случаях МД у животных, описанных в предыдущих разделах, те или иные измененные локусы хромосом оказываются драйверами, вызывающими неслучайное расхождение хромосом-гомологов. У растений факторами, приводящими к МД, являются измененная центромера (*Mimulus*) или локус, берущий на себя роль центромеры (*Zea mays*) (см. ниже). Другой механизм обеспечивает неслучайное расхождение хромосом при хромосомных перестройках: преимущественное расхождение хромосом происходит под влиянием не качественного изменения центромеры, а количества центромер. В случае так называемых робертсоновских транслокаций перестроенная хромосома состоит из двух объединившихся хромосом и имеет одну центромеру. При спаривании хромосом в мейозе такая составная хромосома конъюгирует с двумя гомологичными ее плечам хромосомами, каждая из которых имеет свою центромеру. Соответственно, к одному полюсу деления при мейозе должна отходить одна, а к другому — две центромеры. Предполагается, что в женском мейозе, когда только одно из ядер тетрады попадет в функционирующую гамету, а три — в нефункциональные направительные тельца, имеет место конкуренция за переход именно в будущую яйцеклетку, и более “сильная” пара центромер (в паре их две) чаще попадает именно в ядро будущей яйцеклетки. Такой механизм может обеспечить преимущественное сохранение в потомстве несоединенных хромосом и преимущественную элиминацию хромосом с транслокацией.

Было проанализировано 1170 кариотипов млекопитающих, на основании чего было выведено правило [24]: “Партнер [гомолог] с большим числом центромер предпочтительно прикрепляется к тому полюсу, который наиболее эффективно захватывает центромеры”. Такая полярность свойственна женскому мейозу; ее, естественно, не может быть в мужском мейозе, где все четыре ядра — продукты мейоза — попадают в функционирующие гаметы. Авторы собрали данные по передаче 33 робертсоновских транслокаций у мышей: в женском мейозе соотношение гамет с 39 (то есть с транслокацией) и с 40 хромосомами — 3283 : 4839, а в мужском — 3494 : 3529, то есть близкое к 1 : 1. Авторы сделали вывод, что неравное расхождение хромосом (то есть МД) — единственный фактор, определяющий преобладающую морфологию хромосом в кариотипах млекопитающих.

Н. Blackmon с соавт. [25] проанализировали 1059 кариотипов млекопитающих, обратив внимание на число одноплечих и двухплечих хромосом в кариотипе. Среди изученных кариотипов наблюдается двувёршинное распределение: преобладают кариотипы либо с малой, либо с близкой к единице долей одноплечих хромосом. Предполагается, что смешанные кариотипы (с одно- и двухплечими хромосомами) в эволюционном плане находятся в неустойчивом, переходном состоянии и эволюционируют к преобладанию одно- или двухплечих хромосом. Таким образом, авторы пришли к заключению, что МД — фактор, влияющий на направление эволюции кариотипов. О роли МД в закреплении хромосомных перестроек см. также [26].

МЕЙОТИЧЕСКИЙ (ЦЕНТРОМЕРНЫЙ) ДРАЙВ У РАСТЕНИЙ

У растений хорошо изучены два случая мейотического драйва — у кукурузы и декоративного растения *Mimulus* (губастик). В обоих случаях неравное расхождение гомологичных хромосом происходит в женском мейозе.

У кукурузы (*Zea mays*) было обнаружено неслучайное расхождение гомологов одной пары хромосом в мегаспорогенезе [27]. Материалом для исследования послужили особые линии кукурузы, у которых хромосома 10 имела на конце длинного плеча хроматиновый блок, отсутствующий у большинства линий. В скрещиваниях хромосома с блоком передавалась в яйцеклетку не в 50, а в более чем в 70%. Тесно сцепленный с хроматиновым блоком ген *R/r* (семена окрашенные или неокрашенные) показал в бэккроссах расщепление не 1 : 1, а 1881 *Rr* и 4441 *rr*, т. е. явно отличающееся от нормального соотношения. Проведенные генетический и цитологический анализы показали, что за отклонение от нормального расщепления ответственен именно хроматиновый блок на конце

хромосомы 10. При мужском гаметогенезе (образовании пыльцы) хромосома с хроматиновым блоком, напротив, попадала в пыльцу с меньшей вероятностью, чем ее нормальный гомолог. Описанное в цитированной статье предпочтительное попадание в мегаспору одной пары гомологичных хромосом было первым, ставшим известным, случаем МД у растений.

Открытое в 1942 г. явление на протяжении последующих 80 лет было детально изучено [28–31]. Было показано, что гетерохроматиновый блок на конце хромосомы 10 в анафазе I берет на себя роль центромеры, а в анафазе II направляет несущую его хромосому в ту мегаспору, которая превратится в яйцеклетку. Хромосома 10 с блоком гетерохроматина оказывается “эгоистической” и потомству передается чаще, чем нормальный гомолог. Гетерохроматиновый блок сложен тандемными повторами ДНК, которые в мейозе взаимодействуют со специфическими кинезинами (моторными белками).

Другим растением, у которого было изучено сходное с вышеописанным явление, был *Mimulus* (губастик, сем. Phrymaceae) [32]. МД был обнаружен при изучении последствий межвидовой гибридизации двух видов — *M. guttatus* и *M. nasutus*. Локализованный в хромосоме 11, так называемый драйв-локус (*D*), показал почти 100%-ную передачу в гибридное потомство. Нормальная передача гомологов хромосомы 11 нарушается только тогда, когда гетерозиготный гибрид F1 выступает в качестве женского родителя и скрещивается с любым из родительских видов. Изучение потомства бэк-кроссов на *M. nasutus* показало, что для нарушения нормальной передачи необходимо сохранение гетерозиготности только по локусу *D*.

В дальнейшем драйв-локус *D* был отождествлен с центромерой хромосомы 11, и была предложена следующая схема эволюции центромер у *Mimulus* и роли центромер в проявлении МД [32]. Существует три варианта центромеры хромосомы 11: *D*, *D*⁻, *d*. Первые два свойственны виду *M. guttatus*, нарушение расхождения хромосом при сегрегации у гибридов происходит только при участии *D*; *d* — вариант центромеры *M. nasutus*. Вариант *D* возник в результате накопления в центромерном локусе неких последовательностей ДНК, придавших хромосоме с такой центромерой свойство в анафазах I и II преимущественно попадать в ту мегаспору, которая превратится в яйцеклетку. Очевидно, что накопление в центромере особых последовательностей ДНК придало центромере *D* эгоистические свойства — способность устранять от передачи потомству альтернативные варианты центромеры.

МЕЙОТИЧЕСКИЙ ДРАЙВ У ГРИБОВ-АСКОМИЦЕТОВ

Среди грибов явление мейотического драйва было обнаружено и изучено у аскомицетов. Мейоз у этой группы организмов приводит к образованию четырех гаплоидных ядер, каждое из которых с прилегающей цитоплазмой окружается оболочкой, так образуются гаплоидные споры. Тетрада (четверка) спор остается внутри материнской клетки-сумки (аска). В дальнейшем эти аскоспоры освобождаются, прорастают и дают начало гаплоидным клонам. Гаплоидные вегетативные клетки у большинства видов принадлежат к одному из двух типов спаривания (+ и –) и в соответствующих условиях + и – клетки сливаются, образуя диплоидную зиготу, которая либо сразу подвергается мейозу, либо начинает вегетативно размножаться. У многих аскомицетов четыре ядра — продукты мейоза, дополнительно проходят митотическое деление, и в аске формируются не 4, а 8 аскоспор, либо 4 аскоспоры оказываются двуждерными. К аскомицетам принадлежат одноклеточные дрожжи (почкующиеся *Saccharomyces* и делящиеся *Schizosaccharomyces*) и мицелиальные грибы, такие как наиболее популярный генетический объект *Neurospora*. К аскомицетам относится и ряд фитопатогенов. У нескольких видов грибов-аскомицетов обнаружено явление МД. Обзор этих случаев см. в [33].

Впервые среди грибов МД был обнаружен в популяциях двух видов рода *Neurospora* — *N. sitophila* и *N. intermedia* [34]. В некоторых внутривидовых скрещиваниях все образующиеся аски показывали расщепление 4 : 4 — четыре споры пигментированные, способные к прорастанию, и четыре споры полупрозрачные, нежизнеспособные. Генетический анализ выявил три гена, получивших название *Spore killer* — “убийцы спор”: *Sk-1* (у *N. sitophila*), *Sk-2* и *Sk-3* (у *N. intermedia*). Аллели этих генов *Sk-1^K*, *Sk-2^K*, *Sk-3^K* обуславливают гибель сестринских спор с альтернативными аллелями (*Sk-1^S*, *Sk-2^S*, *Sk-3^S*). Гены *Sk-2* и *Sk-3* были картированы вблизи центромеры III группы сцепления, а при переносе их в хромосому *N. crassa* рекомбинация в прицентромерном районе была полностью подавлена. Блок рекомбинации распространяется по обе стороны от центромеры, а район, где рекомбинация невозможна, имеет протяженность по меньшей мере 30 сМ [35]. При изучении более 700 штаммов *N. sitophila*, выделенных из природы на разных континентах, примерно 15% были киллерами; только 1 штамм оказался устойчивым, но не был киллером [33].

Применение современных молекулярно-генетических методов позволило выделить из генома штамма *Sk-1* и охарактеризовать ген *Spk-1*, ответственный как за свойство убивать чувствительные клетки, так и за устойчивость устойчивых генотипов. Продуктом этого гена является белок

размером не более чем 134 аминокислоты [36]. Было вскрыто и происхождение гена *Spk-1* — он оказался заимствованным из генома другого вида нейроспоры [36].

В основе МД у грибов, как, впрочем, и у других организмов, могут лежать два механизма [33], обозначаемых как “киллер — таргет (мишень)” и “яд — противоядие (dot — antydot)”. Первый из этих механизмов предполагает, что локус-драйвер производит некое вещество “киллер”, которое убивает развивающиеся споры, если в их хромосомах нет локуса-драйвера и есть локус-таргет. Локусы драйвер и таргет тесно сцеплены, придающая чувствительность клеткам аллель таргет находится по отношению к драйверу в транс-положении. Такая система уже рассматривалась выше по отношению к МД у *Drosophila*. Второй возможный механизм предполагает, что в локусе-драйвере имеются два элемента; один производит яд, другой — противоядие. Действию яда подвергаются все развивающиеся в аске споры, но выживают только те, локус-драйвер которых производит не только яд, но и противоядие (антидот). У штамма *Sk-1 N. sitophila* МД реализуется по первому механизму, у штаммов *Sk-2* и *Sk-3 N. intermedia* действует второй механизм [36].

Помимо *Neurospora*, МД был обнаружен и изучен у другого мицелиального гриба — у *Podospora anserina*, жизненный цикл которого сходен с таковым у нейроспоры. Половой процесс происходит следующим образом. Женские органы — протоперитеции, при созревании превращающиеся в плодовые тела со множеством асков, имеют поднимающиеся над их поверхностью гифы-трихогины. В качестве мужских гамет выступают образующиеся на мицелии микроконидии. При попадании микроконидий на трихогины их ядра мигрируют в аскогониумы (клетки внутри плодового тела), где сливаются с «женскими» ядрами. Диплоидное ядро сразу переходит к мейозу с последующим одним митотическим делением. В результате формируются двуядерные аскоспоры с гаплоидными ядрами и цитоплазмой, происходящей от женского родителя (вклад цитоплазмы микроконидии в зиготу слишком мал). У мицелиальных грибов, в том числе у *Podospora*, возможно слияние и вегетативных гиф. Клетки с ядрами разного происхождения носят название гетерокарионов, такое состояние сохраняется при последующем росте мицелия неопределенно долго.

У *Podospora anserine* были обнаружены две системы МД, изучение обеих дало очень важные результаты. В первом случае гены-драйверы оказались включенными в мобильный генетический элемент — транспозон. Были идентифицированы гены, вызывающие МД: *spok2*, *spok3*, *spok4*. Два последних входят в один блок размером около 150 kb и имеющий у разных изолятов одного и того же вида

разную хромосомную локализацию. У выделенного из природы штамма другого вида, *P. comata*, в геноме был обнаружен элемент, названный Enterprise. Его последовательность оказалась гомологичной ДНК Spk-блока *P. anserina*. В состав последнего, однако, кроме части, гомологичной Enterprise, входят еще один или два *spok*-гена. Ряд молекулярных характеристик Enterprise позволяют отнести его к транспозонам. Spk-блок также является огромным (до 150 kb и более) транспозоном, что и объясняет его локализацию в разных хромосомах у разных штаммов *P. anserina*. Включение генов МД *spok* в транспозон, т. е. объединение двух эгоистических (или паразитических) ДНК, привело к появлению геномного гиперпаразита [37].

Другая система МД (у *P. anserina*) не менее интересна. У этого вида был обнаружен полиморфный локус *het* с двумя аллелями *het-s* и *het-S*, первоначально идентифицированными как аллели, определяющие совместимость вегетативных мицелиев при образовании гетерокарионов. В дальнейшем оказалось, что продукт этого гена, белок размером 30 kD, является амилоидом, способным к агрегации и самовоспроизведению, т. е. прионом. Гифы могут быть прион-инфицированными [*Het-s*] и неинфицированными [*Het-S*]. При их слиянии образующиеся гетерокарионы отмирают. Половой процесс между инфицированными и неинфицированными мицелиями возможен. В комбинации ♀[*Het-s*] (“женский” родитель) × ♂[*Het-S*] (микроконидиальный родитель) споры генотипа *het-S* убиваются. Таким образом, аллель *het-s* действует как мейотический драйвер, благоприятствующий поддержанию в популяции прион-производящего генотипа [38]. Помимо мицелиальных грибов-сапрофитов *Neurospora* и *Podospora*, явление МД было обнаружено у фитопатогена *Fusarium moniliforme* [39] и у делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces* [40]. Общий обзор мейотического драйва у грибов дан в [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный, далеко не полный, обзор показывает, что явления мейотического драйва встречаются во всех царствах эукариот. Самые разные организмы вырываются из жестких менделевских законов, точнее, отдельные элементы их геномов (гены, хромосомы) начинают проявлять эгоистические свойства и перестают подчиняться правилу равного расхождения гомологов в мейотических делениях.

А.О. Рувинский [21] следующим образом сформулировал общие черты систем мейотического драйва.

1. Все изученные системы включают два взаимодействующих компонента — респондер и один или несколько локусов-дистортеров.

2. Хромосома, которая получает преобладание в результате элиминации нормального гомолога, проявляет суперэгоизм.

3. Участие одной или нескольких инверсий (или других хромосомных перестроек) и гетерохроматиновых элементов обеспечивает подавление рекомбинации в данном регионе и неравновесие по сцеплению.

4. Гомозиготы по благоприятствуемой хромосоме оказывают негативное влияние на жизнеспособность и/или фертильность (выделено автором).

5. Локусы-респондеры действуют в цис-положении; локусы-дистортеры — и в транс-, и в цис-положении.

6. Все обнаруженные системы широко распространены в природных популяциях и поддерживаются в состоянии стабильного генетического полиморфизма.

7. Сходство в общих чертах совсем различных систем мейотического драйва имеет конвергентное происхождение.

Важно подчеркнуть **положение 4**: внутригеномный отбор в форме мейотического драйва благоприятствует не наиболее приспособленным, как дарвиновский естественный отбор, а нередко фенотипам, проявляющим сниженную жизнеспособность и/или фертильность, т. е. малоприспособленным [41]. Во многих соответствующим образом изученных случаях драйверы появляются как результат или инсерции некоей ДНК, или дупликации предсуществующего гена. Оба эти явления должны вести к негативным последствиям: 1) инсерция препятствует работе гена, куда встроилась посторонняя ДНК, или нарушает регуляцию генной активности; 2) дупликация гена искажает генный баланс и либо сразу отбраковывается естественным отбором, либо сохраняется в геноме в результате дифференциации двух прежде идентичных копий одного гена; 3) или же приобретает функции дистортера, обеспечивающие ее сохранение при неблагоприятных эффектах на фенотип организма.

Мейотический драйв, подразумевающий внутригеномный отбор, может таким образом обеспечить поддержание полиморфизма или даже фиксацию в генофонде неприспособительных (подчас вредных) признаков, вызываемых как самим дистортером, так и тесно сцепленными с ним аллелями других генов. Роль мейотического драйва не только в микроэволюции (изменении генных частот в популяции), но и в макроэволюции (видообразовании, появлении таксонов более высокого ранга) должна быть еще изучена и оценена.

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.

Автор благодарит И.Ю. Баклушинскую и П.М. Бородину за предоставление материалов, использованных при написании настоящего обзора, и ценные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mayr E. The objects of selection // Proc. Natl. Ac. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 2091–2094.
2. Lindholm A.K., Dyer K.A., Firman R.C. et al. The ecology and evolutionary dynamics of meiotic drive // Trends Ecol. Evol. 2016. V. 31. P. 315–326. doi: 10.1016/j.tree.2016.02.001
3. Courret C., Chang C.-H., Wei K.H.-C. et al. Meiotic drive mechanisms: Lesions from *Drosophila* // Proc. R. Soc. B. 2019. V. 286. doi.org/1098/rspb.2019.1430
4. Gershenson S. A new sex-ratio abnormality in *Drosophila obscura* // Genetics. 1928. V. 13. P. 488–507.
5. Sturtevant A.H., Dobzhansky Th. Geographical distribution and cytology of “sex ratio” in *Drosophila pseudobscura* and related species // Genetics. 1936. V. 21. P. 473–490.
6. Sandler L., Hiraizumi Y., Sandler I. Meiotic drive in natural populations of *Drosophila melanogaster*. I. The cytogenetic basis of segregation-distortion // Genetics. 1959. V. 44. P. 233–250. doi.org / 10.1093/genetics/44.2.233
7. Stalker H.D. The genetic systems modifying meiotic drive in *Drosophila paramelanica* // Genetics. 1961. V. 46. P. 177–202. doi.org/10.1093/genetics/46.2.177
8. James A.C., Jaenike J. “Sex ratio” meiotic drive in *Drosophila testacea* // Genetics. 1990. V. 126. P. 651–656. doi.org/10.1093/genetics/126.3.651
9. Sandler L., Novitski E. Meiotic drive as an evolutionary force // Am. Nat. 1957. V. 91. P. 105–110. doi:10.1086/281969
10. Zimmering S., Sandler L., Nicoletti B. Mechanisms of meiotic drive // Ann. Rev. Genet. 1970. V. 4. P. 409–436.
11. Czemajor M., Joly D., Montchamp-Moreau C. Sex ratio meiotic drive in *Drosophila simulans* is related to equational nondisjunction of the Y chromosome // Genetics. 2000. V. 154. P. 229–236.
12. Tao Y., Araripe L., Kingan S.B. et al. A sex-ratio meiotic drive system in *Drosophila simulans*. II. An X-linked distorter // PLoS Biol. 2007. V. 5. doi:10.1371/journal.pbio.0050293
13. Unckless R.L., Larracuente A.M., Clark A.G. Sex ratio, meiotic drive and Y-linked resistance in *Drosophila affinis* // Genetics. 2015. V. 199. P. 831–840. doi: 10.1534/genetics.114.173948

14. Lin C.J., Hu F., Dubruille R. et al. The hpRNA/RNAi pathway is essential to resolve intragenomic conflict in the *Drosophila* male germline // *Dev. Cell.* 2018. V. 46. P. 316–326.
doi:10.1016/j.devcel.2018.07.004
15. Kusano A., Staber C., Ganetzky B. Nuclear mislocalization of enzymatically active RanGAP causes segregation distortion in *Drosophila* // *Dev. Cell.* 2001. V. 1. P. 351–361.
doi: 10.1016/S1534-5807(01)00042-9
16. Chesley P., Dunn L.C. The inheritance of taillessness (anury) in the house mouse // *Genetics.* 1936. V. 21. P. 525–536.
17. Сафронова Л.Д., Чубыкин В.Л. Мейотический драйв у мышей, содержащих в геноме *t*-комплекс // *Генетика.* 2013. Т. 49. С. 1021–1035.
doi:10.7868/S001667581306009X
18. Сафронова Л.Д. Эмбриональные эффекты *t*-гаплотипов у мышей // *Онтогенез.* 2009. Т. 40. С. 30–39.
19. Totgunakov N.Y., Kizilova E.A., Karamysheva T.V. et al. Homogeneously staining region (HSR) in chromosome 1 of the house mouse: Synapsis and recombination in meiosis // *Cytogenet. Genome Res.* 2021. V. 161. P. 14–22.
doi: 10.1159/000513266
20. Agulnik S.I., Agulnik A.I., Ruvinsky A.O. Meiotic drive in female mice heterozygous for the HSR inserts on chromosome 1 // *Genet Res.* 1990. V. 55. P. 97–100.
21. Ruvinsky A.O. Meiotic drive in female mice: an essay // *Mammal. Genet.* 1995. V. 6. P. 315–320.
22. Sabantsev I., Spitsin O., Agulnik S. et al. Population dynamics of aberrant chromosome 1 in mice // *Heredity.* 1993. V. 70. P. 481–489.
23. Friocourt G., Perrin A., Saunders P.A. et al. Bypassing Mendel's first law: Transmission ratio distortion in mammals // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24.
doi.org/10.3390/ijms24021600
24. Pardo-Manuel de Villena F., Sapienza C. Female meiosis drives karyotypic evolution in mammals // *Genetics.* 2001. V. 159. P. 1179–1189.
25. Blackmon H., Justison J., Mayrose I. et al. Meiotic drive shapes rates of karyotype evolution in mammals // *Evolution.* 2019. V. 73. P. 511–523.
26. Баклушинская И.Ю. Хромосомные перестройки, реорганизация генома и видообразование // *Зоол. журн.* 2016. Т. 95. С. 376–393.
doi: 10.7868/S0044513416040036
27. Rhoades M.M. Preferential segregation in maize // *Genetics.* 1942. V. 27. P. 395–407.
doi.org/10.1093/genetics/27.4.395
28. Rhoades M.M., Dempsey E. The effect of abnormal chromosome 10 on preferential segregation and crossing over in maize // *Genetics.* 1966. V. 53. P. 989–1020.
doi.org/10.1093/genetics/53.5.989
29. Birchler J.A., Dawe R.K., Doebley J.F. Marcus Rhoades, preferential segregation and meiotic drive // *Genetics.* 2003. V. 164. P. 835–841.
doi.org/10.1093/genetics/164.3.835
30. Kanizay B., Albert P.S., Birchler J.A. et al. Intragenomic conflict between the two major knob repeats of maize // *Genetics.* 2013. V. 194. P. 81–89.
doi.org/10.1534/genetics.112.148882
31. Finseth F. Female meiotic drive in plants: Mechanisms and dynamic // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2023. V. 82.
doi.org/10.1016/j.gde.2023.102101
32. Fishman L., Willis G.H. A novel meiotic drive locus almost completely distorts segregation in *Mimulus* (monkeyflower) hybrids // *Genetics.* 2005. V. 169. P. 347–353.
doi.org/ 10.1534/genetics.104.032789
33. Zanders S., Johannesson H. Molecular mechanisms and evolutionary consequences of spore killer in *Ascomycetes* // *Microb. Mol. Biol. Rev.* 2021. V. 85.
doi.org/10.1128/MMBR.00016-21
34. Turner B.C., Perkins D.D. Spore killer, a chromosomal factor in *Neurospora* that kills meiotic products not containing it // *Genetics.* 1979. V. 93. P. 587–606.
doi.org/10.1093/genetics/93.3.587
35. Campbell J.L., Turner B.C. Recombination blok in the Spore killer region of *Neurospora* // *Genome* . 1987. V. 29. P. 129–135.
doi: 10.1139/g87-022
36. Svedberg J., Vogan A.A., Rhoades N.A. et al. An introgressed gene causes meiotic drive in *Neurospora sitophila* // *Proc. Natl Ac. Sci. USA.* 2021. V. 118.
doi.org/10.1073/pnas.2026605118
37. Vogan A.A., Ament-Velasques S.L., Bastiaans E. et al. The Enterprise, a massive transposon carrying Spok meiotic drive genes // *Genom. Res.* 2021. V. 31. P. 789–798.
doi: 101101/gr.267609.120
38. Dalstra H.J.P., Swart K., Debets A.J.M. et al. Sexual transmission of the [Het-s] prion leads to meiotic drive in *Podospora anserine* // *Proc. Natl Ac. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 6616–6621.
doi.org/10.1073/pnas.1030058100
39. Kathariou S., Spieth P.T. Spore killer polymorphism in *Fusarium moniliforme* // *Genetics.* 1982. V. 102. P. 19–24.
40. Zanders S.E., Eickbush M.T., Yu J. et al. Genome rearrangements and pervasive meiotic drive cause hybride infertility in fission yeast // *eLife.* 2014. V. 3.
doi: 10.7554/eLife.02630
41. Zanders S.E., Unckless R.L. Fertility costs of meiotic drivers // *Curr. Biol.* 2019. V. 29. P. R512–R520.
doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.046

The Meiotic Drive: Intragenomic Competition and Selection

I. A. Zakharov^{1, *}

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

**e-mail: iaz34@mail.ru*

The article considers the distribution and mechanisms of the meiotic drive as a phenomenon manifested in unequal transmission of gene alleles and/or homologous chromosomes into gametes during meiosis. The meiotic drive has been studied in the most detail in *Drosophila*, mice, corn and in ascomycete fungi of the genera *Neurospora* and *Podospora*. The consequence of the meiotic drive is a shift in the frequencies of alleles in the gene pool and the maintenance of non-adaptive traits in the population.

Keywords: meiotic drive, gene, centromere, chromosome, *Drosophila*, mouse, corn, *Mimulus*, ascomycetes, *Neurospora*, *Podospora*, intragenomic selection.

ПОЛНОГЕНОМНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ТРАНСПОРТЕРЫ САХАРОВ У БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ

© 2024 М. А. Корженевский¹, Ю. Л. Мощенская¹, *, Т. В. Тарелкина¹, Н. А. Галибина¹¹Институт леса — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: tselishcheva.yulia@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024 г.

После доработки 11.04.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

Транспортеры сахаров играют важную роль в регуляции дальнего транспорта сахарозы в растениях. Основным поглотителем сахарозы у древесных растений является формирующаяся древесина. Таким образом, транспорт сахарозы, регулируемый семействами генов *SUT*, *SWEET* и *MST*, будет определять формирование древесной биомассы. На основании данных генома березы повислой (*Betula pendula* var. *pendula* Roth) мы идентифицировали и проанализировали кодирующие транспортеры сахаров у *Betula pendula*. Мы провели BLAST-поиск, филогенетический, структурный анализы и анализ цис-действующих элементов генов-переносчиков сахаров и определили их хромосомную локализацию. Нам удалось идентифицировать и охарактеризовать три гена семейства *SUT*, 10 генов *SWEET* и 36 генов *MST*, которые имеют типичное для семейства количество функциональных и трансмембранных доменов. Показано, что береза повислая содержит меньшее количество генов-переносчиков сахаров по сравнению с *A. thaliana*, что, вероятно, связано с апопластным типом загрузки терминальной флоэмы у *Arabidopsis*, тогда как у березы повислой загрузка флоэмы осуществляется преимущественно симпластически. Полученные результаты могут быть полезны для дальнейшего изучения участия транспортеров сахарозы в различных биосинтетических процессах древесных растений и служить основой для различных биотехнологических манипуляций.

Ключевые слова: *Betula pendula* Roth, транспорт сахаров, *SUT*, *SWEET*, *MST*, структура гена.

DOI: 10.31857/S0016675824100034 **EDN:** WGDMZI

Береза повислая (*Betula pendula* Roth) — пионерный бореальный вид древесных растений [1]. Небольшой размер генома (440 млн п.н.) [1] и быстрое ювенильное развитие делают березу привлекательным объектом для лесной биотехнологии [1, 2]. Для физиологии растений особый интерес представляет форма березы повислой — береза карельская (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercklin) Hämet-Ahti) как объект исследования для изучения механизмов формирования тканей ствола. Карельскую березу характеризуют узорчатая древесина и достаточно большое разнообразие форм роста [3–6]. Ранее было показано, что повышенное содержание сахарозы в камбиальной зоне узорчатых деревьев карельской березы приводит к изменению профилей экспрессии генов и активности ферментов, метаболизирующих сахарозу [7–10]. У березы повислой и узорчатых деревьев карельской березы сахароза в зоне роста и дифференцировки ксилемы расщепляется преимущественно сахарозосинтазой [8–10], а формирование узорчатой

древесины связано с деградацией сахарозы апопластной инвертазой и поступлением в клетку большого количества гексоз [7, 9–11].

Разгрузка флоэмы является первым этапом снабжения метаболитами акцепторных тканей, и ее нарушение может привести к изменению программы дифференцировки производных камбия [12]. Разгрузка флоэмы может происходить как апопластически, так и симпластически в зависимости от типа акцепторной ткани, стадии развития и вида растения. У древесных растений радиальный транспорт сахарозы из флоэмы в дифференцирующуюся ксилему включает выгрузку из ситовидной трубки в лучевые клетки, транспорт через лучевые клетки и экспорт из лучевых клеток в развивающиеся волокна и сосудистые элементы [13]. Полученные изображения плазмодесм [14, 15] и данные по содержанию сахарозы [7, 16, 17], полученные на различных древесных растениях, показывают, что транспорт сахарозы из ситовидных трубок в клетки

лучей и дальнейший радиальный перенос через лучевые клетки у древесных видов осуществляется преимущественно симпластически [12], при этом в литературе имеются данные о симпластической изоляции клеток радиальной паренхимы в зоне формирования древесины, что указывает на наличие апопластической стадии транспорта сахарозы от лучевых клеток к элементам волокон и сосудов [18].

Апопластный транспорт сахарозы возможен только при участии транспортеров сахаров (ST). ST растений представлены тремя семействами трансмембранных белков: SUT (переносчики сахарозы), SWEET (переносчики сахарозы и гексоз) и MST (переносчики моносахаров) (рис. 1). Семейство SUT представлено симпортерами H^+ /сахарозы (см. рис. 1). Они транспортируют субстрат в цитозоль из апопласта или вакуолей. У двудольных растений SUT подразделяют на I, II и III типы. I тип характерен только для двудольных растений. Как правило, белки этого типа расположены на плазматической мембране, и их экспрессия характерна для таких комплексов, как ситовидные элементы/клетки-спутники (SE/CC) [19–22]. Тип II отличается наличием цитоплазматической петли, для которой предполагается сигнальная функция; экспрессия белков этого типа характерна для акцепторных органов растений [23–27]. Белки III типа характерны для мембраны тонопласта, поэтому предполагается, что они участвуют в поддержании внутриклеточного гомеостаза [22, 27].

Семейство SWEET представлено унипортерами, которые транспортируют сахара из цитозоля как в апопласт, так и во внутриклеточные компартменты (см. рис. 1). Семейство SWEET делится на четыре типа, различающихся по функции и субстрату. Типы I и II транспортируют гексозы, причем тип I характерен для корней, тип II — для флоэмы и генеративных органов [28]. Предположительно белки SWEET II типа принимают участие в разгрузке комплекса SE/CC [29–31]. Тип III отличается способностью транспортировать дисахарида, поэтому представляет наибольший интерес для изучения транспорта сахарозы в развивающуюся ксилему древесных растений. Белки IV типа локализируются на тонопласте, предположительно их функция заключается в поддержании внутриклеточного метаболизма [31, 32].

Семейство MST — самое обширное среди растительных ST. Оно включает семь подсемейств: STP, или HT (белки-транспортеры сахарозы/транспортеры гексозов), ERD6 (early response to dehydration)-подобные белки, pGlucT/SBG1 (пластический транспортер глюкозы/супрессор G-белка beta1), INT (переносчики инозитола или циклических полиолов), PMT (переносчики полиолов, ранее PLT), TMT (тонопластические переносчики моносахаров) и VGT (вакуолярные переносчики

глюкозы). Белки MST транспортируют гексозы и некоторые сахарные спирты (например, инозитол и сорбит) из цитозоля в апопласт или клеточные компартменты. Для MST были предложены различные механизмы транспорта: симпортеры H^+ , антипортеры или простые каналы.

Цель нашей работы — идентификация и детальная характеристика генов, кодирующих ST в геноме березы повислой. Полученные данные могут служить основой для изучения участия белков ST в различных биосинтетических процессах и могут быть использованы для разработки биотехнологических подходов для получения древесины с заданными свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификация генов ST

Гены ST *B. pendula* были идентифицированы с помощью BLAST-поиска по геному *B. pendula* на веб-сайте Genomevolution <https://genomevolution.org/coge/GenomeInfo.pl?gid=35080>. В качестве BLAST-запроса для поиска генов SUT мы использовали известные гены *A. thaliana*, *V. vinifera*, *P. trichocarpa*, для генов SWEET — *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, для генов MST — *A. thaliana*, *V. vinifera* (пороговое значение E 1,00E-05). Последовательности *A. thaliana* и *P. trichocarpa* были получены из Phytozome 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) [27, 31], последовательности *V. vinifera* — из NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [33]. Сходство последовательностей определяли путем парного выравнивания с использованием EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Кроме того, область размером 2 т.п.н. выше стартового кодона каждого гена считали промоторной последовательностью.

Филогенетический анализ

MEGA 11.0 (<http://www.megasoftware.net/>) использовали для построения филогенетических деревьев семейств генов BpSUT, BpSWEET, BpMST. На основании гомологии с генами-переносчиками сахаров *A. thaliana*, *V. vinifera*, *P. trichocarpa* гены *B. pendula* были разделены на различные подгруппы. Все последовательности предварительно выравнивались с помощью программы MUSCLE [34]. Филогенетические деревья были построены с использованием MEGA 11.0 методом максимального подобия с моделью LG + G (1000 bootstrap replicates) для SUT, с моделью JTT + F + G (1000 bootstrap replicates) для SWEET, с моделью LG + F + G и (500 bootstrap replicates) для MST. Филогенетические деревья были визуализированы с помощью онлайн-инструмента iTOL.

Структурный анализ

Информация о структуре экзонов/интронов генов была собрана из аннотаций генома *B. pendula* на сайте: <https://genomeevolution.org/coge/GenomeInfo.pl?gid=35080>.

Экзон-интронную организацию генов-переносчиков сахаров визуализировали с помощью сервера отображения структуры генов (GSDS 2.0, <http://gsds.gao-lab.org/>) [35]. Для поиска консервативных доменов использовался веб-инструмент поиска NCBI Batch web CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>). Программа DeepTMHMM 1.0.24 (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) использовалась для прогнозирования трансмембранной топологии потенциальных переносчиков сахаров. MEME (v5.5.5; <http://meme-suite.org/tools/meme>) использовали для анализа мотивов белков BpSUT, BpSWEET, BpMST со следующими параметрами: минимальная ширина мотивов — 6; максимальная ширина мотивов — 50 и количество мотивов — 12 для SUT, 7 для SWEET и 12 для MST. Для визуализации мотивов, консервативных доменов и трансмембранной структуры транспортеров сахаров использовали программу TBtools [36].

Анализ цис-действующих элементов в промоторе генов ST у *B. pendula*

Мы извлекли промоторную последовательность (2 т.п.н.) генов-транспортеров сахаров из генома *B. pendula* и преобразовали ее в формат файла FASTA. Поиск цис-регуляторных элементов в промоторных последовательностях осуществляли с помощью программы PlantPAN 3.0 TF/TFBS Search (<http://plantpan.itsps.ncku.edu.tw/plantpan3/TFsearch.php>). Результаты группировали по функциям цис-регуляторных элементов в последовательностях промотора. Группы были названы следующим образом: “Абиотические” (мотивы, связанные с ответами на различные абиотические стрессы), “Ткани” (мотивы, связанные с тканеспецифической экспрессией), “Гормональные” (мотивы, связанные с ответами на различные фитогормоны), “Биотические” (мотивы, связанные с биотическими взаимодействиями), “Ответ на сахара” (мотивы, связанные с усилением или подавлением экспрессии генов сахарами) и “Другие” (мотивы с другими функциями). Результаты были визуализированы с помощью TBtools.

Хромосомная локализация и эволюционный анализ ST-генов у *B. pendula*

Хромосомное расположение генов ST определяли по аннотации генома *B. pendula* (<https://genomeevolution.org/coge/GenomeInfo.pl?gid=35080>). Результаты были визуализированы с помощью TBtools.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация ST-генов у *B. pendula*

В геноме березы повислой мы обнаружили все известные группы генов ST, SUT, SWEET и обширную группу MST. Мы идентифицировали в общей сложности 103 предполагаемых гена-переносчика сахаров. Анализ CDD и TMHMM позволил идентифицировать среди них 49 генов, содержащих специфичные для семейства функциональные и трансмембранные домены (доп. табл. 1).

BpSUT. Поиск в геноме *Betula pendula* выявил четыре гена, кодирующих белок, гомологичный SUT *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa* и *Vitis vinifera* [27, 33]. Анализ структуры белка показал, что три последовательности содержат домен, специфичный для семейства SUT (GPH sucrose) [22]. Предсказанное количество трансмембранных доменов для продуктов идентифицированных генов, равное 12, соответствует полученным ранее данным. Названия обнаруженным генам были даны в соответствии с идентичностью кодируемых белков ближайшим белкам *A. thaliana*, которая составляла от 60,6 до 71,8% (см. табл. 1). Длина белковых последовательностей SUT составляла 477 (SUT2), 602 (SUT3) и 498 (SUT4) аминокислот. Все белки по результатам прогнозирования локализованы на плазматической мембране (см. доп. табл. 1) (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>).

BpSWEET. Поиск в геноме *B. pendula* выявил 17 генов, кодирующих белковые последовательности, гомологичные SWEET *A. thaliana* и *P. trichocarpa* [31]. Анализ структуры белков показал, что 10 из 17 обнаруженных белков можно отнести к семейству SWEET по наличию двух функциональных (MtN3) и семи трансмембранных доменов. Идентичность обнаруженных белков ближайшим белкам *A. thaliana* колебалась от 27,3% (BpSWEET17с) до 68,2% (BpSWEET2). Длина последовательностей белка SWEET варьировала от 235 (BpSWEET2) до 509 (BpSWEET11) аминокислот (см. табл. 1). BpSWEET11 значительно длиннее остальных и содержит удвоенное количество доменов. Предполагаемое разделение этого белка на две последовательности (между 7-м и 8-м трансмембранными доменами) позволяет получить два продукта, каждый из которых имеет два домена MtN3 и семь трансмембранных доменов. Однако это разделение остается лишь предположением и нуждается в экспериментальном подтверждении. Прогноз субклеточной локализации показывает, что белки BpSWEET локализуются на клеточной мембране или мембране вакуолей и лизосом (см. табл. 1).

BpMST. Семейство генов MST включает семь подсемейств: два больших подсемейства — ERD6 (early response to dehydration) и STP/HT (sugar transport proteins/hexosetransporter), пять небольших

Таблица 1. Гены, кодирующие переносчики сахаров (ST) *B. pendula*.

Ген	ID гена	Число АК остатков в белке	Ближайший гомолог <i>A. thaliana</i> / процент идентичности	Локализация функционального домена	Внутриклеточная локализация / Score
<i>BpSUT2</i>	Vrev01.c0594.g0012.m0001	477	AT1G22710.1/60.6	14–467	Плазмалемма/0.66 Лизосома, вакуоль/0.60
<i>BpSUT3</i>	Vrev01.c0101.g0045.m0001	602	AT2G02860.1/71.7	58–587	Плазмалемма/0.75 Лизосома, вакуоль/0.70
<i>BpSUT4</i>	Vrev01.c0568.g0003.m0001	498	AT1G09960.1/71.8	21–488	Плазмалемма/0.74 Лизосома, вакуоль/0.58
<i>BpSWEET1</i>	Vrev01.c1719.g0001.m0001	269	AT1G21460.1/55.4	50–118 155–233	Плазмалемма/0.61
<i>BpSWEET2</i>	Vrev01.c1289.g0002.m0001	235	AT3G14770.1/68.2	18–102 138–233	Лизосома, вакуоль/0.80
<i>BpSWEET3</i>	Vrev01.c0505.g0022.m0001	249	AT5G53190.1/58,7	9–96 132–216	Плазмалемма/0.72 Лизосома, вакуоль/0.68
<i>BpSWEET4</i>	Vrev01.c0094.g0006.m0001	246	AT3G28007.1/54.3	10–96 136 – 217	Плазмалемма/0.79 Лизосома, вакуоль/0.62
<i>BpSWEET7</i>	Vrev01.c0188.g0031.m0001	250	AT4G10850.1/53.5	10–94 134–218	Плазмалемма/0.70 Лизосома, вакуоль/0.63
<i>BpSWEET9</i>	Vrev01.c0171.g0029.m0001	250	AT2G39060.1/46.9	28–94 133–213	Лизосома, вакуоль/0.47
<i>BpSWEET11</i>	Vrev01.c0557.g0049.m0001	509	AT3G48740.1/30.4	11–98 133–218 256–324 358–444	Плазмалемма/0.72

Таблица 1. Продолжение

Ген	ID гена	Число АК остатков в белке	Ближайший гомолог <i>A. thaliana</i> / процент идентичности	Локализация функционального домена	Внутриклеточная локализация / Score
<i>BpSWEET17a</i>	Brev01.c0142.g0090.m0001	260	AT4G15920.1/46.8	6–91 128–212	Плазмалемма/0.72
<i>BpSWEET17b</i>	Brev01.c0142.g0093.m0001	298	AT4G15920.1/40.9	22–88 124–208	Плазмалемма/0.35
<i>BpSWEET17c</i>	Brev01.c0142.g0092.m0001	394	AT4G15920.1/27.3	174–227 279–361	Лизосома, вакуоль/0.54
<i>BpSTP1a</i>	Brev01.c0241.g0013.m0001	521	AT1G11260.1/79.2	31–478	Плазмалемма/0.82 Лизосома, вакуоль/0.59
<i>BpSTP1b</i>	Brev01.c0278.g0017.m0001	508	AT1G11260.1/68.3	28–468	Плазмалемма/0.80 Лизосома, вакуоль/0.61
<i>BpSTP2</i>	Brev01.c0384.g0010.m0001	517	AT1G07340.1/58.0	29–471	Плазмалемма/0.79
<i>BpSTP3a</i>	Brev01.c0892.g0004.m0001	505	AT5G61520.1/64.1	28–473	Плазмалемма/0.78
<i>BpSTP3b</i>	Brev01.c0659.g0014.m0001	509	AT5G61520.1/59.0	28–474	Плазмалемма/0.80
<i>BpSTP5a</i>	Brev01.c0151.g0006.m0001	503	AT1G34580.1/69.4	29–474	Плазмалемма/0.74
<i>BpSTP5b</i>	Brev01.c0373.g0003.m0001	515	AT1G34580.1/55.9	39–485	Плазмалемма/0.77
<i>BpSTP7</i>	Brev01.c0518.g0064.m0001	1154	AT4G02050.1/35.5	174–616	Пластиды/0.98
<i>BpSTP10</i>	Brev01.c0970.g0004.m0001	511	AT3G19940.1/70.1	30–476	Плазмалемма/0.83

Таблица 1. Продолжение

Ген	ID гена	Число АК остатков в белке	Ближайший гомолог <i>A. thaliana</i> / процент идентичности	Локализация функционального домена	Внутриклеточная локализация / Score
<i>BpSTP13a</i>	Bprev01.c0329.g0008.m0001	535	AT5G26340.1/80.1	30–476	Плазмалемма/0.72 Лизосома, вакуоль/0.59
<i>BpSTP13b</i>	Bprev01.c0329.g0007.m0001	547	AT5G26340.1/71.3	61–506	Плазмалемма/0.64 Лизосома, вакуоль/0.61
<i>BpSTP14</i>	Bprev01.c0996.g0010.m0001	517	AT1G77210.1/76.2	32–476	Плазмалемма/0.78
<i>BpSTP15</i>	Bprev01.c5190.g0001.m0001	472	AT1G07340.1/29.7	6–457	Плазмалемма/0.59
<i>BpSTP16</i>	Bprev01.c5248.g0001.m0001	605	AT1G11260.1/24.7	1–417 459–605	Плазмалемма/0.48
<i>BpPMT3</i>	Bprev01.c0874.g0025.m0001	496	AT2G18480.1/69.3	30–473	Плазмалемма/0.75
<i>BpPMT4a</i>	Bprev01.c0407.g0011.m0001	527	AT2G20780.1/71.1	64–501	Плазмалемма/0.68 Лизосома, вакуоль/0.65
<i>BpPMT4b</i>	Bprev01.c0288.g0031.m0001	533	AT2G20780.1/68.2	62–499	Плазмалемма/0.67 Лизосома, вакуоль/0.69
<i>BpPMT5a</i>	Bprev01.c0807.g0001.m0001	532	AT3G18830.1/66.1	40–491	Плазмалемма/0.78
<i>BpPMT5b</i>	Bprev01.c0806.g0001.m0001	524	AT3G18830.1/65.0	38–489	Плазмалемма/0.73
<i>BpPMT6</i>	Bprev01.c0874.g0024.m0001	497	AT4G36670.1/63.0	24–474	Плазмалемма/0.71
<i>BpPMT7a</i>	Bprev01.c0389.g0024.m0001	564	AT2G16120.1/45.4	90–543	Плазмалемма/0.56
<i>BpPMT7b</i>	Bprev01.c0389.g0025.m0001	536	AT3G18830.1/46.9	71–518	Лизосома, вакуоль/0.74 Плазмалемма/0.59

Таблица 1. Окончание

Ген	ID гена	Число АК остатков в белке	Ближайший гомолог <i>A. thaliana</i> / процент идентичности	Локализация функционального домена	Внутриклеточная локализация / Score
<i>BpINT1</i>	Bprev01.c0066.g0021.m0001	497	AT2G43330.1/77.8	35–463	Лизосома, вакуоль/0.74 Плазмалемма/0.61
<i>BpINT2</i>	Bprev01.c0709.g0003.m0001	508	AT1G30220.1/66.6	1–472	Плазмалемма/0.73
<i>BpINT4</i>	Bprev01.c0091.g0018.m0001	575	AT4G16480.1/64.4	34–543	Плазмалемма/0.78 Лизосома, вакуоль/0.63
<i>BpTMT2</i>	Bprev01.c0455.g0033.m0001	739	AT4G35300.7/77.7	13–210 516–713	Плазмалемма/0.62
<i>BpVGT2</i>	Bprev01.c0671.g0015.m0001	499	AT5G17010.4/77.3	49–494	Лизосома, вакуоль/0.55
<i>BpVGT3</i>	Bprev01.c0999.g0007.m0001	560	AT5G59250.1/75.2	106–554	Пластиды/0.97
<i>BppGlcT1</i>	Bprev01.c0624.g0025.m0001	543	AT5G16150.3/77.9	108–526	Пластиды/0.98
<i>BppGlcT2</i>	Bprev01.c0532.g0007.m0001	535	AT1G05030.1/72.2	94–513	Пластиды/0.98
<i>BpSGB2</i>	Bprev01.c0389.g0055.m0001	486	AT1G67300.2/73.9	52–469	Лизосома, вакуоль/0.71
<i>BpERD-6like1</i>	Bprev01.c0506.g0037.m0001	479	AT5G18840.1/72.6	40–467	Лизосома, вакуоль/0.68 Плазмалемма/0.64
<i>BpERD-6like3</i>	Bprev01.c0702.g0007.m0001	487	AT1G54730.2/67.8	52–480	Лизосома, вакуоль/0.71 Плазмалемма/0.60
<i>BpERD-6like4</i>	Bprev01.c0863.g0023.m0001	480	AT2G48020.2/69.2	46–473	Лизосома, вакуоль/0.76 Плазмалемма/0.59
<i>BpERD-6like5</i>	Bprev01.c1229.g0007.m0001	486	AT1G75220.1/80.3	50–480	Плазмалемма/0.68
<i>BpERD-6like6</i>	Bprev01.c1874.g0009.m0001	484	AT1G75220.1/81.9	46–478	Плазмалемма/0.65

Примечание. Локализацию функциональных доменов определяли с помощью NCBI CDD-Search. Предсказание внутриклеточной локализации выполняли в DeepLoc 2.0

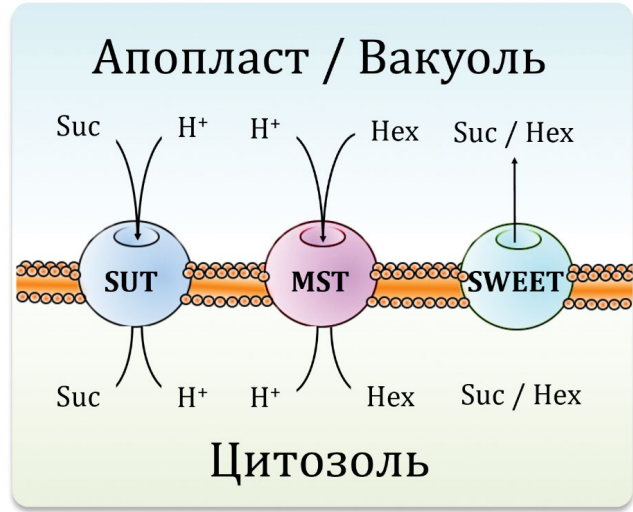


Рис. 1. Схема, отображающая механизм транспорта сахаров белками-переносчиками (ST).

подсемейств – PMT (linear polyol transporters, ранее называемые PLT), INT (inositol/cyclic polyol transporters), TMT (tonoplastic monosaccharide transporters), VGT (vacuolar glucose transporters) и pGlucT/SBG1 (plastidic glucose transporter/Suppressor of G protein beta 1) [32]. Обнаружено 81 MST, гомологичных MST *A. thaliana* и *V. vinifera*, из них 36 соответствовали MST по наличию функциональных и трансмембранных доменов. Из них 14 гомологичны белкам STP/HT, 5 ERD-6like, 8 PMT, 3 INT, 1 TMT, 2 VGT и 3 pGlucT/SBG1. Идентичность обнаруженных белков ближайшим белкам *A. Thaliana* варьировала от 24,7% (BpSTP16) до 81,9% (BpERD-6like 5). Длина последовательностей белков MST составляла от 472 (BpSTP15) до 1154 (BpSTP7) аминокислот. Большинство представителей BpMST локализуются на плазматической мембране, мембране вакуолей или мембране лизосом. Гены BpSTP7, BpVGT3, BppGlcT1, BppGlcT2 локализованы в пластидах (см. табл. 1).

Таблица 2. Общие последовательности TF-мотивов в промоторе ST-генов *B. pendula*

№	TF-мотив	Группа	Максимальное число копий в промоторе	Среднее
1	TF_motif_seq_0237	Абиотический	80	57.4
2	TF_motif_seq_0239	Тканеспецифичный	69	44.4
3	TF_motif_seq_0241	Тканеспецифичный	71	42.6
4	TF_motif_seq_0238	Другой	47	30.8
5	TF_motif_seq_0247	Тканеспецифичный	41	26.4
6	TF_motif_seq_0242	Тканеспецифичный	33	22.1
7	TF_motif_seq_0321	Абиотический	33	20.7
8	TF_motif_seq_0268	Гормональный	34	19.6
9	TF_motif_seq_0243	Абиотический	29	15.8
10	TF_motif_seq_0302	Абиотический	28	16.0
11	TF_motif_seq_0253	Тканеспецифичный	32	14.0
12	TF_motif_seq_0250	Тканеспецифичный	28	12.8
13	TF_motif_seq_0245	Тканеспецифичный	23	13.3
14	TF_motif_seq_0246	Гормональный	22	10.4
15	TF_motif_seq_0252	Гормональный	18	9.7
16	TF_motif_seq_0337	Другой	17	8.3
17	TF_motif_seq_0282	Другой	18	7.5
18	TF_motif_seq_0315	Биотический	13	6.4
19	TF_motif_seq_0375	Тканеспецифичный	14	5.8
20	TF_motif_seq_0269	Тканеспецифичный	13	5.8
21	TF_motif_seq_0283	Другой	13	5.9
22	TF_motif_seq_0254	Другой	11	4.6
23	TF_motif_seq_0260	Тканеспецифичный	14	5.9
24	TF_motif_seq_0270	Другой	14	5.2
25	TF_motif_seq_0273	Гормональный	14	5.2

Выявленное количество генов ST значительно меньше, чем у модельного травянистого растения *A. thaliana* (9 генов SUT, 16 генов SWEET и 53 гена MST). Вероятно, это связано с пассивной загрузкой флоэмы у древесных растений, не требующей участия ST. В то время как у травянистых растений с преимущественной апопластной загрузкой терминальной флоэмы ST играют наиболее важную роль, поэтому их разнообразие шире. Разница в количестве обнаруженных генов обусловлена главным образом значительным уменьшением группы ERD-6-like подсемейства у *B. pendula* (5 генов) против 19 и 21 гена у *A. thaliana* и *V. Vinifera* соответственно. Напротив, группа BpPMT шире (8 генов), чем AtPMT и VvPMT (4 и 5 генов соответственно).

Филогенетический анализ ST-генов

Чтобы изучить семейства генов-переносчиков сахаров у *A. thaliana*, *V. vinifera*, *P. trichocarpa* и *B. pendula* с эволюционной точки зрения, а также проанализировать характеристики ST березы повислой, мы использовали MUSCLE для сравнения аминокислотных последовательностей белков SUT, SWEET и MST. Филогенетический анализ обнаруженных BpSUT показал разделение семейства на три клады. Согласно гомологии с *A. thaliana*, белок BpSUT2 относится к специфической кладе двудольных (тип I). BpSUT3 и BpSUT4 относятся к кладам, характерным как для двудольных, так и для однодольных (тип II, тип III) [37] (рис. 2, а). По данным филогенетического анализа, белки BpSWEET разделены на четыре клады, соответствующие четырем типам белков. По гомологии с *A. thaliana* I тип представлен белками BpSWEET1,2,3, II тип – BpSWEET4,7, III тип – BpSWEET9,11, IV тип – SWEET17a,b,c (см. рис. 2, б). Семейство белков MST по гомологии с *A. thaliana* было разделено на семь подсемейств, каждое из которых образует субклады. Подсемейство ERD6-Like включает пять белков – BpERD6-Like1-5, подсемейство VGT – два белка, pGlcT/SGB – три белка, PMT – восемь белков и наиболее обширное подсемейство STP – 14 белков (см. рис. 2, в).

Структура генов

Для изучения структуры ST генов у *B. pendula* мы проанализировали их последовательности ДНК и определили состав интронов и экзонов. Пакет программного обеспечения GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) использовали для картирования интрон-экзонной структуры семейства ST-генов березы повислой (рис. 3). Результаты показали, что три из 50 ST-генов *B. pendula* (6%) не содержат интронов (BpSTP13a, BpSTP15, BpPMT7a). Анализ экзон-интронной организации обнаруженных BpSUT показал соответствие генам модельных растений *A. thaliana* и *P. trichocarpa*. Единственным

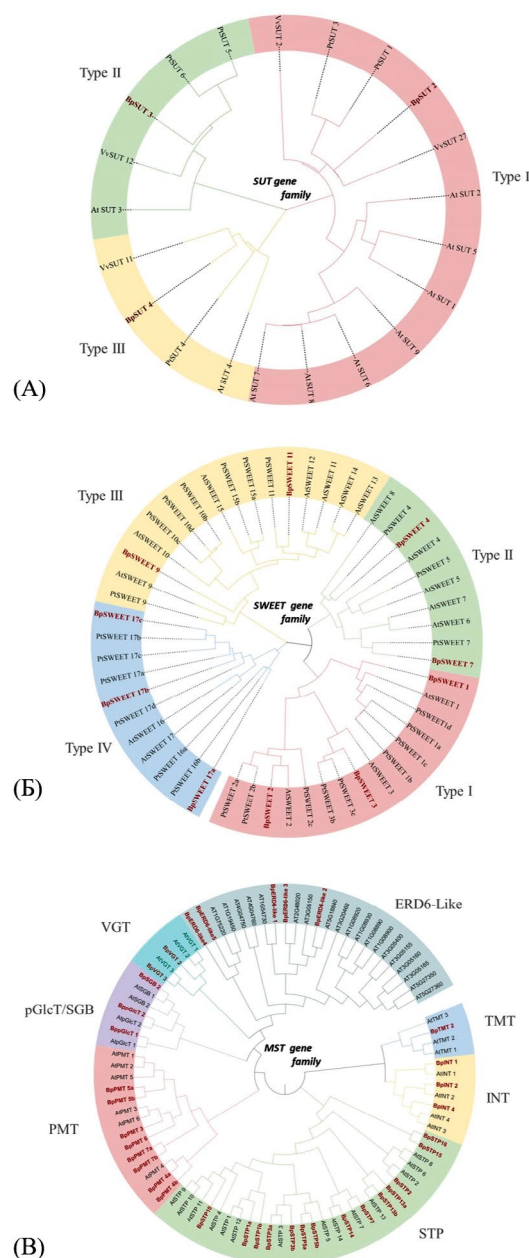
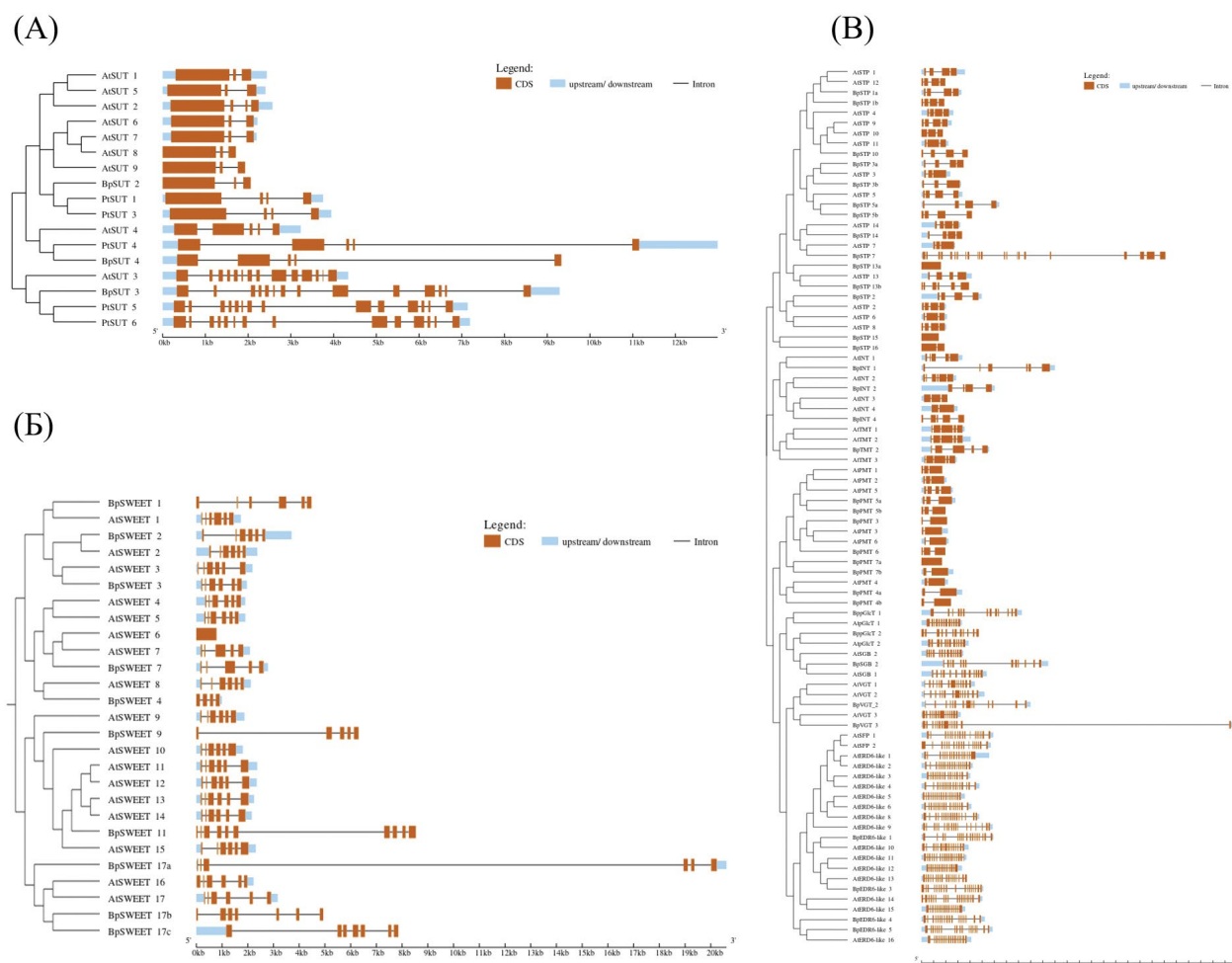


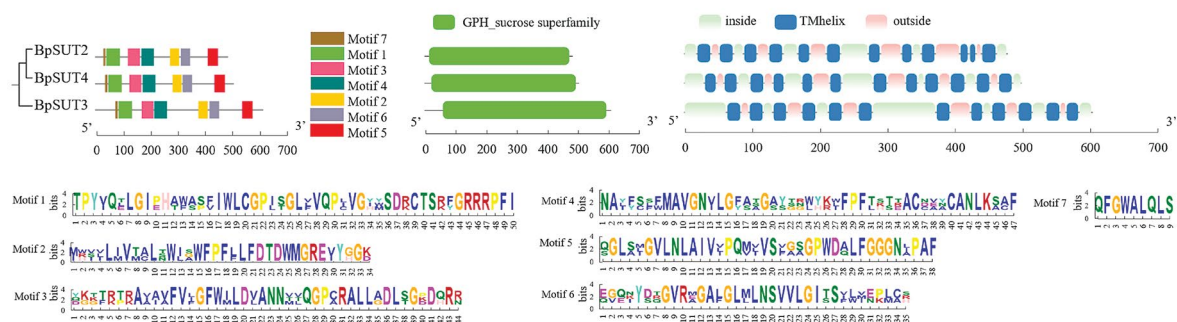
Рис. 2. Филогенетические деревья: (а) – белков семейства SUT *A. thaliana*, *V. vinifera*, *P. Trichocarpa* и *B. pendula*; (б) – белков семейства SWEET *A. thaliana*, *P. trichocarpa* и *B. pendula*; (в) – белков семейства MST *A. thaliana* и *B. pendula*. Филогенетические деревья строили с помощью MEGA 11.0 методом максимального подобия с LG + G-моделью и 1000 итераций бутстрэп-анализа для SUT, с JTT + F + G-моделью и 1000 итераций бутстрэп-анализа для SWEET, с LG + F + G-моделью и 500 итераций бутстрэп-анализа для MST. Филогенетические деревья визуализировали с использованием онлайн-инструмента iTOL.

исключением стал BpSUT2, который наиболее идентичен гену AtSUT2 (60,6%), имеет три экзона и два интрона, тогда как AtSUT2 имеет четыре экзона и два интрона. Таким образом, его экзон-интронная структура более соответствует остальным шести генам AtSUT типа I (см. рис. 3, а). Анализ экзон-интронной организации обнаруженных BpSWEET показал соответствие генам *A. thaliana*: гены BpSWEET1,2,3,7,12,17b имеют шесть экзонов и пять интронов. Гены BpSWEET4,9 имеют на один экзон меньше из-за потери одного из первых коротких экзонов. BpSWEET17с имеет один дополнительный экзон (см. рис. 3, б). Экзон-интронная организация BpMST в целом соответствует AtMST, за исключением генов BpSTP13а, BpSTP15, BpPMT7а. В целом гены MST *B. pendula* имеют более длинные интроны, чем *A. thaliana* (см. рис. 3, в).

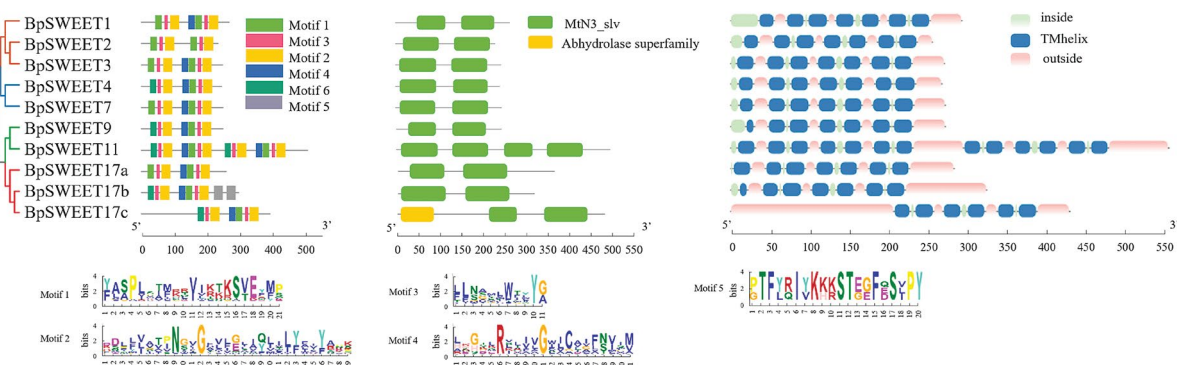
Для дальнейшего изучения разнообразия структуры ST-белков *B. pendula* использовали онлайн-программу для выявления мотивов (MEME; <http://meme.sdsc.edu/meme/meme.html>). Каждый член семейства BpSUT содержал один и тот же тип мотива (рис. 4, а). BpSWEET имеют по семь консервативных мотивов каждый (за исключением белка SWEET11, который имел удвоенное число мотивов) (см. рис. 4, б). Мотивы 1, 2, 3 повторяются дважды в каждом белке, что отражает эволюцию бактериального semiSWEET. В BpSWEET2 отсутствует мотив 4, расположенный между повторами. Также обращает на себя внимание замена мотива 1 на мотив 6 в белках BpSWEET4,9,11,17b,17с. Эта замена не отражает филогенетического родства белков. На 3'-конце BpSWEET17b также имеются два мотива 5, которых нет ни в одном другом BpSWEET. При анализе BpMST мы остановились



(A)



(B)



(B)

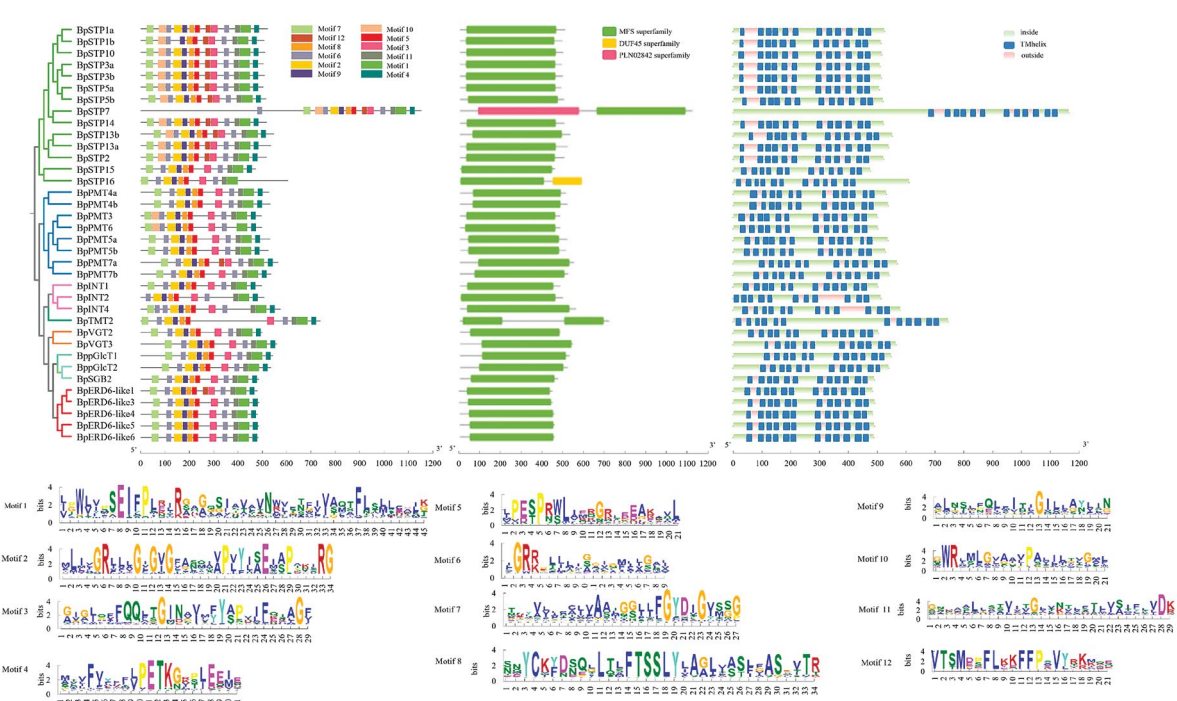


Рис. 4. Консервативные мотивы, функциональные и трансмембранные домены ST *B. pendula* семейства SUT (a), семейства SWEET (б) и семейства MST (в). Белковые последовательности генов березы были получены из генома на онлайн-ресурсе Genomevolution. Консервативные мотивы были определены с помощью инструмента MEME, функциональные домены определяли инструментом NCBI CDD-Search, трансмембранные домены — при помощи TMHMM 3.0.

Таблица 3. Число и суммы средней представленности общих последовательностей TF-мотивов в промоторах генов *ST B. pendula* по группам

Группа	Число общих мотивов на группу	Сумма средней представленности общих мотивов группы в промоторах	Сумма средней представленности всех мотивов группы в промоторах
Тканеспецифичные	10	193.2	237
Другие	6	62.2	117
Абиотические	4	109.9	200
Гормональные	4	45.0	69
Биотические	1	6.4	17
Ответ на сахара	0	0.0	13

на 12 консервативных мотивах. Мотивы 1, 3, 5, 6, 8, 9 встречаются во всех BpMST, мотив 6 представлен двумя копиями, а в белках BpSTP7 и BpINT4 — тремя копиями (см. рис. 4, *в*). Мотивы 2, 4, 7 и 11 встречаются во всех BpMST, за исключением одного представителя (BpSTP1b, BpSTP16, BpINT2, BpPMT6 соответственно). Напротив, мотивы 10 и 12 характерны для подсемейства BpSTP (за исключением BpSTP15 и BpSTP16). Мотив 10 также присутствует в BpPMT4a и BpPMT4b. Помимо подсемейства STP, мотив 12 присутствует в PMT7a и ERD-6like 2.

Пакет CDD NCBI использовали для анализа консервативных доменов. В результате домен GPH sucrose был обнаружен во всех BpSUT (см. рис. 4, *а*). BpSWEET имеют два домена MtN3, за исключением BpSWEET11, который имеет четыре домена MtN3 (см. рис. 4, *б*). Важно отметить, что белок BpSWEET17с имеет на 5'-конце α/β -гидролазный домен (6–69 аминокислот). Все обнаруженные BpMST имеют домен MFS, однако белок BpSTP7 имеет домен PLN02842 на 5'-конце (677–1119 аминокислот), а белок BpSTP16 имеет домен DUF45 (459–605) на 3'-конце, что может быть причиной более низкой идентичности этих последовательностей гомологам *A. thaliana* (см. рис. 4, *в*). Полученные данные о локализации функциональных доменов следует учитывать при выборе праймеров для ОТ-ПЦР таким образом, чтобы последовательности праймеров не были комплементарны участкам, содержащим неспецифичные домены, например, у BpSWEET17с, BpSTP7 и BpSTP16.

Цис-элементы в промоторах ST генов *B. pendula*

Для дальнейшего изучения потенциальных механизмов регуляции экспрессии ST *B. pendula* последовательность, расположенная на 2 тпн выше сайта инициации трансляции гена, была использована для поиска цис-элементов в PlantPAN 3.0 TF/TFBS. BpSWEET17с и BpSTP7 были исключены из

запроса, поскольку они имеют атипичный функциональный домен на 5'-концах. Всего в транспортерах обнаружено 279 различных последовательностей мотивов TF, из них 25 являются общими (табл. 2). Среди общих последовательностей мотивов 10 были связаны с тканеспецифической экспрессией, четыре — с абиотическими стрессами, четыре — с гормональным ответом, шесть — с другими функциями (табл. 3). Один мотив связан с биологической реакцией, и ни одного мотива, связанного с реакцией на сахара, обнаружено не было. Несмотря на то что среди общих последовательностей мотивов элементы с другими функциями представлены больше, чем группа, связанная с абиотическими стрессами, сумма средней представленности существенно выше в группе мотивов, связанных с абиотическими стрессами, — 109,9 против 62,2. Мы также обнаружили 33 уникальные последовательности мотивов TF (табл. 5). Среди них наибольшее количество связано с реакциями на абиотические стрессы (10), восемь — тканеспецифические, шесть — гормонозависимые, один — связанный с биотическими взаимодействиями, один с ответом на сахара и семь — с другими функциями (табл. 4). Каждый из генов *BpSTP13b*, *BpINT1*, *BpTMT2* и *BpERD6-like5* имеет по две уникальные последовательности мотивов.

Хромосомная локализация ST-генов

Для оценки распределения ST-генов-переносчиков сахаров *B. pendula* на хромосомах были получены данные об их расположении на псевдохромосомах (рис. 5). Результаты показали, что ST-гены присутствуют на всех хромосомах, кроме VIII. На хромосомах I и IV *B. pendula* было локализовано наибольшее количество генов ST (12 и 14% соответственно). Хромосомы 1, 5, 7 и 10 имеют кластеры разных ST, которые могут выполнять общую биологическую функцию. Многие близкородственные гены расположены

Таблица 4. Уникальные последовательности TF-мотивов в промоторе генов *ST B. pendula*

№	TF-мотив	Группа	Число копий	Ген
1	TF_motif_seq_0494	Абиотический	2	<i>BpTMT2</i>
2	TF_motif_seq_0008	Абиотический	1	<i>BpSUT2</i>
3	TF_motif_seq_0011	Тканеспецифичный	1	<i>BpSUT3</i>
4	TF_motif_seq_0017	Абиотический	1	<i>BpVGT2*</i>
5	TF_motif_seq_0025	Абиотический	1	<i>BpSTP1a</i>
6	TF_motif_seq_0028	Другой	1	<i>BpPMT6</i>
7	TF_motif_seq_0046	Тканеспецифичный	1	<i>BpSTP10</i>
8	TF_motif_seq_0049	Абиотический	1	<i>BpSTP13a</i>
9	TF_motif_seq_0061	Абиотический	1	<i>BpTMT2*</i>
10	TF_motif_seq_0069	Другой	1	<i>BpINT1*</i>
11	TF_motif_seq_0083	Гормональный	1	<i>BpSGB2</i>
12	TF_motif_seq_0111	Биотический	1	<i>BpINT1*</i>
13	TF_motif_seq_0191	Гормональный	1	<i>BpPMT5b</i>
14	TF_motif_seq_0356	Гормональный	1	<i>BpSUT4</i>
15	TF_motif_seq_0410	Абиотический	1	<i>BpSWEET1</i>
16	TF_motif_seq_0412	Тканеспецифичный	1	<i>BpPMT7a</i>
17	TF_motif_seq_0421	Ответ на сахара	1	<i>BpSWEET3</i>
18	TF_motif_seq_0425	Другой	1	<i>BpERD6-like2</i>
19	TF_motif_seq_0428	Другой	1	<i>BpERD6-like1</i>
20	TF_motif_seq_0431	Тканеспецифичный	1	<i>BpSWEET11</i>
21	TF_motif_seq_0432	Гормональный	1	<i>BpERD6-like5*</i>
22	TF_motif_seq_0438	Другой	1	<i>BpPMT3</i>
23	TF_motif_seq_0449	Гормональный	1	<i>BpVGT2*</i>
24	TF_motif_seq_0462	Тканеспецифичный	1	<i>BpSTP13b*</i>
25	TF_motif_seq_0463	Другой	1	<i>BpSWEET7</i>
26	TF_motif_seq_0468	Абиотический	1	<i>BpSTP13b*</i>
27	TF_motif_seq_0479	Тканеспецифичный	1	<i>BpSTP14</i>
28	TF_motif_seq_0482	Абиотический	1	<i>BpERD6-like5*</i>
29	TF_motif_seq_0493	Другой	1	<i>BpTMT2*</i>
30	TF_motif_seq_0501	Гормональный	1	<i>BpINT4</i>
31	TF_motif_seq_0503	Тканеспецифичный	1	<i>BpERD6-like4</i>
32	TF_motif_seq_0507	Тканеспецифичный	1	<i>BpSTP2</i>
33	TF_motif_seq_0509	Абиотический	1	<i>BpPMT4a</i>

Примечание. Звездочкой указаны гены, имеющие два уникальных TF-мотива в промоторе.

- P. 753–760.
doi:10.1134/S1021443715060060
9. Moshchenskaya Y.L., Galibina N.A., Topchieva L.V., Novitskaya L.L. Expression of genes encoding sucrose synthase isoforms during anomalous xylogenesis in Karelian birch // Russ. J. Plant Physiol. 2017. V. 64. P. 616–624.
doi:10.1134/S1021443717030104
 10. Novitskaya L.L., Nikolaeva N.N., Galibina N.A. et al. The greatest density of parenchyma inclusions in Karelian birch wood occurs at confluences of phloem flows // Silva Fenn. 2016. V. 50. P. 1461–1478.
doi:10.14214/sf.1461
 11. Galibina N.A., Novitskaya L.L., Nikerova K.M. Source-sink relations in the organs and tissues of silver birch during different scenarios of xylogenesis // Russ. J. Plant Physiol. 2019. V. 66. P. 308–315. doi:10.1134/S1021443719020067
 12. Mahboubi A., Niittyla T. Sucrose transport and carbon fluxes during wood formation // Physiologia plantarum. 2018. V. 164. P. 67–81.
doi:10.1111/ppl.12729
 13. Van Bel A.J.E. Xylem-phloem exchange via the rays: The undervalued route of transport // J. Exp. Bot. 1990. V. 41. P. 631–644.
doi:10.1093/jxb/41.6.631
 14. Sauter J.J. The strasburger cells – equivalents of companion cells // Berichte der Deutschen Botan. Gesellschaft. 1980. Bd. 93. S. 29–42.
 15. Sauter J.J., Kloth S. Plasmodesmatal frequency and radial translocation rates in ray cells of poplar (*Populus x Canadensis* Moench ‘robusta’) // Planta. 1986. V. 168. P. 377–380.
doi: 10.1007/BF00392363
 16. Roach M., Arrivault S., Mahboubi A. et al. Spatially resolved metabolic analysis reveals a central role for transcriptional control in carbon allocation to wood // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 3529–3539.
doi:10.1093/jxb/erx200
 17. Uggla C., Magel E., Moritz T., Sundberg B. Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in scots pine // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 2029–2039.
doi:10.1104/pp.125.4.2029
 18. Sokołowska K., Zagórska-Marek B. Symplasmic, long-distance transport in xylem and cambial regions in branches of *Acer pseudoplatanus* (Aceraceae) and *Populus tremula* × *P. tremuloides* (Salicaceae) // Am. J. Bot. 2012. V. 99. P. 1745–1755.
doi: 10.3732/ajb.1200349
 19. Weise A., Barker L., Kühn C. et al. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants // The Plant Cell. 2000. V. 12. P. 1345–1355.
doi:10.1105/tpc.12.8.1345
 20. Stadler R., Brandner J., Schulz A. et al. Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells // The Plant Cell. 1995. V. 7. P. 1545–1554.
doi:10.1105/tpc.7.10.1545
 21. Baker R.F., Leach K.A., Boyer N.R. et al. Sucrose transporter ZmSut1 expression and localization uncover new insights into sucrose phloem loading // Plant Physiol. 2016. V. 172. P. 1876–1898.
doi:10.1104/pp.16.00884
 22. Wang Y., Chen Y., Wei Q. et al. Phylogenetic relationships of sucrose transporters (SUTs) in plants and genome-wide characterization of *SUT* genes in *Orchidaceae* reveal roles in floral organ development // Peer J. 2021. V. 9.
doi:10.7717/peerj.11961
 23. Aoki N., Hirose T., Scofield G.N. et al. The sucrose transporter gene family in rice // Plant Cell Physiol. 2003. V. 44. P. 223–232.
doi: 10.1093/pcp/pcg030
 24. Barth I., Meyer S., Sauer N. PmSUC3: Characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major* // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 1375–1385.
doi: 10.1105/tpc.010967
 25. Meyer S., Lauterbach C., Niedermeier M. et al. Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 684–693.
doi: 10.1104/pp.103.033399
 26. Hackel A., Schauer N., Carrari F. et al. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways // Plant J. 2004. V. 45. P. 180–192.
doi: 10.1111/j.1365- 313X.2005.02572.x
 27. Peng D., Gu X., Xue L.-J. et al. Bayesian phylogeny of sucrose transporters: Ancient origins, differential expansion and convergent evolution in monocots and dicots // Frontiers in Plant Science. 2014. V. 5(615). P. 1–12.
doi:10.3389/fpls.2014.00615
 28. Chen H.Y., Huh J.H., Yu Y.C. et al. The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection // Plant J. 2015. V. 83. P. 1046–1058.
doi: 10.1111/tpj.12948
 29. Bock K.W., Honys D., Ward J.M. et al. Integrating membrane transport with male gametophyte development and function through transcriptomics // Plant Physiol. 2006. V. 140. P. 1151–1168.
doi: 10.1104/pp.105.074708
 30. Guan Y.F., Huang X.Y., Zhu J. et al. RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 852–863.
doi:10.1104/pp.108.118026

31. Zhang L., Wang L., Zhang J. et al. Expression and localization of SWEETs in *Populus* and the effect of SWEET7 overexpression in secondary growth // *Tree Physiology*. 2020. V. 41. P. 882–899. doi:10.1093/treephys/tpaa145.
32. Slewinski T.L. Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: A physiological perspective // *Mol. Plant*. 2011. V. 4. P. 641–662. doi:10.1093/mp/ssr051Li
33. Afoufa-Bastien D., Medici A., Jeauffre J. et al. The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: Phylogenetic overview and macroarray expression profiling // *Plant Biology*. 2010. V. 10(245). P. 1–22. doi:10.1186/1471-2229-10-245
34. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 5. P. 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
35. Hu B., Jin J., Guo A.Y. et al. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server // *Bioinformatics*. 2015. V. 31. № 8. P. 1296–1297. doi: 10.1093/bioinformatics/btu817
36. Chen Ch., Chen H., Zhang Y. et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data // *Mol. Plant*. 2020. V. 13. P. 1194–1202. doi:10.1016/j.molp.2020.06.009
37. Doidy J., Vidal U., Lemoine R. Sugar transporters in Fabaceae, featuring SUT MST and SWEET families of the model plant *Medicago truncatula* and the agricultural crop *Pisumsativum* // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 9. P. 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223173>

Genome-Wide Identification and Characterization of Sugar Transporter Genes in Silver Birch

M. A. Korzhenevsky¹, Yu. L. Moshchenskaya¹ *, T. V. Tarelkina¹, N. A. Galibina¹

Forest Research Institute of the Karelian Research Centre Russian Academy of Sciences, Petrozavods, 185910 Russia

*e-mail: tselishcheva.yulia@mail.ru

Sugar transporters play an important role in regulating the long-distance sucrose transport from source to sink organs. The main sucrose absorber in woody plants is developing wood. Thus, sucrose transport, regulated by *SUT*, *SWEET*, and *MST* gene families, will determine the formation of woody biomass. Based on silver birch (*Betula pendula* var. *pendula* Roth) genomic data, we identified and analyze encoding sugar transporters in *Betula pendula*. We conducted BLAST-search, phylogenetic, structural analysis and analysis of cis-acting elements of sugar transporter genes and determined their chromosomal localization. We were able to identify and characterize 3 genes of the *SUT* family, 10 *SWEET* genes and 36 *MST* genes, which have a typical number of functional and transmembrane domains for the family. It was shown that silver birch contains a smaller number of sugar transporters genes compared to *A. thaliana*, which is probably because of the apoplastic type of terminal phloem loading in *Arabidopsis*, while in silver birch phloem loading is carried out predominantly symplastically. The results obtained may be useful for further study of the participation of sucrose transporters in various biosynthetic processes in woody plants and provide a basis for various biotechnological manipulations.

Keywords: *Betulapendula* Roth, sugar transport, *SUT*, *SWEET*, *MST*, gene structure.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ГИНОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ

© 2024 Е. М. Моисеева¹, В. В. Фадеев¹, Ю. В. Фадеева¹, С. И. Мазиллов¹, М. И. Чумаков^{1,*}

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр
«Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, 410049 Россия

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

Поступила в редакцию 25.03.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 29.05.2024 г.

В статье приведен анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих гиногенез (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*) у гаплоиндуцирующих (ЗМС-8, ЗМС-П) и контрольных (КМ, ГПЛ-1) линий кукурузы саратовской селекции. С помощью секвенирования и последующего множественного выравнивания транскриптов целевых генов исследуемых в работе линий и референсной линии кукурузы В73 определено наличие однонуклеотидных замен (ОНЗ), делеций и вставок, построены филогенетические деревья по изучаемым генам. Установлено наличие 4-нуклеотидной вставки в гене *Zm_Pla1*, которая обуславливает гаплоиндуцирующую способность у предковой линии Stock 6 и гаплоиндуцирующих линий ЗМС-8 и ЗМС-П, а также 15 идентичных ОНЗ. Но элементы партеногенеза, демонстрируемые линиями АТ-1, АТ-3 и АТ-4, у которых отсутствуют вставки из четырех нуклеотидов в гене *Zm_Pla1*, имеют иную генетическую основу. Филогенетический анализ гена *Zm_Pla1* подтвердил родство гаплоиндуцирующих линий Stock6, ЗМС-П и ЗМС-8. В гене *Zm_Dmp7* зафиксировано наличие пяти ОНЗ у линии ЗМС-8 и трех ОНЗ у линий ЗМС-П и КМ. Одна из ОНЗ (в положении 131 от стартового кодона) в гене *Zm_Dmp7* является причиной повышенной гаплоиндуцирующей способности линии САУ5, но не ЗМС-П. Помимо этого, в гене *Zm_Dmp7* обнаружены 3-нуклеотидная делеция у линии ЗМС-П и 9-нуклеотидная делеция у линии КМ.

Ключевые слова: гаплоиндукция, кукуруза, мутации, полиморфизм генов.

DOI: 10.31857/S0016675824100047 **EDN:** WGDEBU

Одной из важнейших мировых сельскохозяйственных культур является кукуруза (*Zea mays* L.). В современных сельскохозяйственных биотехнологиях для ускоренного получения гомозиготных линий применяют такую особенность систем размножения растений, как гиногенез (образование гаплоидных растений при нарушениях оплодотворения яйцеклетки). У современных сортов кукурузы независимое от оплодотворения развитие зародыша (гиногенез, или матроклинный партеногенез, как частный случай) встречается крайне редко (0,01–0,1%). Однако более 60 лет назад в результате скрещиваний и селекции была получена линия кукурузы Stock 6, при использовании которой в качестве опылителя в потомстве индуцируется образование до 2–3% матроклинных гаплоидов [1].

В 2017 г. впервые установлено, что в результате скрещиваний у линии кукурузы Stock 6, полученной более 60 лет назад [1], возникла случайная мутация — в четвертом экзоне гена *Zm_Pla1*,

кодирующего белок фосфолипазу А, произошла вставка четырех нуклеотидов, что привело к сдвигу рамки считывания, замене 20 аминокислот, появлению стоп-кодона и укорочению белка [2]. В ходе последующей селекции у линий саратовской селекции на базе линии Stock 6 эффективность гаплоиндукции (ГИ) была повышена с 2 до 8–10% [3–6]. Однако пока неясно, какие мутации обуславливают повышенную ГИ-способность у линий саратовской селекции.

В 2018 г. впервые было установлено, что ген *Dmp9* регулирует слияние мембран женской и мужской гамет растений и экспрессируется специфически как в генеративных клетках, так и в спермиях [7]. Годом позже было показано, что нокаут гена *Dmp9* арабидопсиса приводит к нарушению оплодотворения в большей степени яйцеклетки, чем центральной клетки [8]. В 2019 г. было показано, что ген *Dmp7*, расположенный в локусе *qhir8* (789 тпн) у кукурузы, является ортологом гена *Dmp9*

арабидопсиса и контролирует гаплоиндукцию [9]. Ген *Dmp7* экспрессируется на поздней стадии развития пыльца кукурузы, а кодируемый им белок локализуется в плазматической мембране спермия и участвует в прикреплении спермия к поверхности яйцеклетки или центральной клетки. Роль гена *Dmp7* в гаплоиндукции кукурузы была доказана в экспериментах по нокауту гена с помощью геномного редактирования (CRISPR/Cas9) [9]. Одна однонуклеотидная замена (ОНЗ) (в положении 131 от стартового кодона) последовательности гена *Dmp7* у линии кукурузы CAU5 приводит к аминокислотной замене (метионин на треонин), что повышает гаплоиндукцию в 2–3 раза в присутствии мутантного гена *Pla1* [9].

В 2003 г. Чалык (Chalyk) с соавт. впервые была выдвинута гипотеза, что возможной причиной появления гаплоидов в потомстве линий-гаплоиндукторов кукурузы является анеуплоидия (элиминация хромосом) у части популяции мужских половых клеток, которая вызывает стимуляцию деления яйцеклетки без оплодотворения [10]. Элиминация хромосом подтвердилась у линий-гаплоиндукторов кукурузы, созданных на основе линии Stock 6 [11, 12]. Согласно [13], для CENH3-мутантов кукурузы содержание гаплоидов в потомстве может достигать 3.6%.

Элиминация хромосом и появление гаплоидов в потомстве арабидопсиса наблюдались при мутации в гене, кодирующем центромер-специфичный гистоновый белок CENH3, необходимый для прикрепления веретена в процессе митоза и мейоза. Изменения в нуклеотидной последовательности гена приводят к несовместимости и потере хромосом в первых зиготических делениях [14].

Исследования механизма анеуплоидии у кукурузы показали, что гаплоиндукция возникает при модификации N-концевого фрагмента или C-концевого складчатого гистонного домена белка CENH3 [13]. В работе [15] показано, что при ко-экспрессии гена *CenH3* дикого и мутантного типов способность к гаплоиндукции пропадает.

Цель статьи – сравнительный анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих гиногенез (наследуемый и индуцируемый) у гаплоиндуцирующих и контрольных линий кукурузы саратовской селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения

Линия кукурузы ЗМС-8 (частота ГИ – 8%) [4], производная от линии ЗМС, получена на кафедре генетики ФГБУ ВО Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского (СГУ). Линия ЗМС-П (частота ГИ – 10%) была получена из потомства

самоопыленных гибридов линии ЗМС-8 (материнский родитель) и формы кукурузы с пурпурной окраской стеблей, листьев и метелок [6]. В скрещиваниях при получении линий ЗМС-8 и ЗМС-П использована линия Stock 6 [16].

Партеногенетическая линия кукурузы АТ-1 была выделена в самоопыленном потомстве гибрида линии-гаплоиндуктора Stock 6 (США, [1]) и линии Коричневый тестер (США) [см. 17]. При экспериментальной задержке опыления в зародышевых мешках у линии кукурузы АТ-1 был обнаружен высокий процент начала развития зародышей и эндосперма [17]. Однако линия АТ-1 плохо вызревала в условиях Саратовской области и поэтому была скрещена со скороспелой линией саратовской селекции ГПЛ-1 (дигаплоидизированный гаплоид, Саратов), в результате чего получена линия АТ-3 [18]. Партеногенетическая линия кукурузы АТ-4 была получена путем скрещивания линии АТ-1 с тетраплоидной линией Кр-1 (Краснодар) и последующим отбором диплоидной формы гибрида [19, 20]. Для линий АТ характерны такие элементы апомиксиса, как независимое от опыления развитие зародыша до стадии глобулы, начало эндоспермогенеза, полиэмбриония, а также псевдогамия [17, 21–23].

Линия КМ саратовской селекции без ГИ-способности имеет пурпурную окраску корней и побегов, что позволяет выявлять гаплоиды на стадии проростков [3].

Определение нуклеотидной последовательности транскриптов генов

Для выявления мутаций были секвенированы транскрипты целевых генов у исследуемых линий кукурузы. РНК выделяли из замороженных тканей (пыльца, завязи) [24, 25], получали кДНК согласно инструкции производителя ревертазы (“Евроген”, Россия). Участки кДНК исследуемых генов амплифицировали с использованием специфических праймеров (подобраны с помощью ресурса Primer-Blast для перекрывающихся фрагментов последовательностей) и набора реактивов Tersus Plus PCR kit (Кат. № РК121, “Евроген”). Затем ПЦР-продукты очищали при помощи набора Cleanup Mini (Кат. № BC023S, Евроген) и секвенировали в компаниях “Евроген” и “Синтол”.

Методы биоинформатики

Нуклеотидные последовательности генов гаплоиндуцирующих и партеногенетических линий кукурузы сравнивали между собой, с линиями, не обладающими данными признаками, и референсной линией В73 методом множественного выравнивания с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Zm_Pla1

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей транскриптов гена *Zm_Pla1* исследованных нами линий ЗМС-П и ЗМС-8, а также предковой линии Stock 6 показало присутствие вставки из четырех нуклеотидов и 15 ОНЗ (рис. 1), что свидетельствует о наследовании саратовскими линиями нуклеотидной последовательности гена *Zm_Pla1* от линии Stock 6. Филогенетический анализ и множественное выравнивание гена *Zm_Pla1* у исследуемых линий и линий из базы данных (<https://www.gramene.org>, <https://www.maizegdb.org>) показали наличие тех же 15 ОНЗ в генах *Zm_Pla1* у линий, ни одна из которых не является гаплоиндуктором. Поэтому можно предположить, что наличие 15 ОНЗ не связано с повышенной ГИ-способностью линий ЗМС-П и ЗМС-8.

Последовательности гена *Zm_Pla1* линий КМ и ГПЛ-1, которые использовались при получении линий ЗМС-8 и ЗМС-П, также не содержали 4-нуклеотидной вставки. У линии КМ обнаружен вариант нуклеотидной последовательности гена *Zm_Pla1*, содержащий семь ОНЗ. Последовательность гена *Zm_Pla1* линии ГПЛ-1 полностью совпадает с последовательностью гена *Zm_Pla1* референсной линии В73.

Мы секвенировали транскрипт гена *Zm_Pla1* партеногенетической линии АТ-1, которая была выделена среди самоопыленного потомства Stock 6 и Коричневый тестер [17] и ее производных – АТ-3, АТ-4. Вопреки нашему ожиданию последовательности *Zm_Pla1* этих линий полностью совпадают с последовательностью *Zm_Pla1* референсной линии и не имеют вставки четырех нуклеотидов и 15 ОНЗ (данные не показаны). Эти линии характеризуются наличием элементов наследуемого партеногенеза, но не обладают гаплоиндуцирующей способностью. Таким образом, ген *Zm_Pla1*, мутировавший у линии Stock 6, не был унаследован линией АТ-1 и ее производными, а наследуемый партеногенез линий АТ связан с другими генетическими детерминантами.

Вставка четырех нуклеотидов в гене *Zm_Pla1* нарушает функцию кодируемого им фермента фосфолипазы А, который осуществляет гидролиз фосфолипидов до жирных кислот. Связь этого процесса с гаплоиндукцией не вполне ясна, но предположительно дефектная фосфолипаза влияет на состав фосфолипидов мембраны и, как следствие, способность мембран спермиев и яйцеклетки к слиянию [26]. В результате спермий не может слиться с яйцеклеткой и произвести диплоидный зародыш. Вставка четырех нуклеотидов в ген *Zm_Pla1* приводит к фенотипу, как у линии Stock 6, и служит причиной образования до 2% гаплоидов в

потомстве у линии-негаплоиндуктора [27]. Какие дополнительные мутации и в каких генах дают увеличение ГИ-способности линий ЗМС-П и ЗМС-8 до 8–10%, еще предстоит выяснить.

Zm_CenH3

Нуклеотидная последовательность гена *Zm_CenH3* у линий КМ и ЗМС-8 полностью совпадает с последовательностью гена референсной линии В73, а у линии ЗМС-П несет одну ОНЗ.

Zm_Dmp7

Линии ЗМС-8 и ЗМС-П обладают высокой гаплоиндуцирующей способностью – 8–10 % [3–6]. Количество ОНЗ на 1000 нуклеотидов у гена *Zm_Dmp7* исследованных линий составляет от 6,4 до 10,4. Анализ белок-кодирующей последовательности гена *Zm_Dmp7* показал наличие пяти ОНЗ у линии ЗМС-8, а также трех ОНЗ и одной делеции из трех нуклеотидов у линии ЗМС-П по сравнению с контрольной линией В73 (рис. 2). Линия КМ несет три ОНЗ и делецию из девяти нуклеотидов в белок-кодирующей части гена *Zm_Dmp7*, последовательность гена *Zm_Dmp7* линии ГПЛ-1 совпадает с референсной последовательностью гена *Zm_Dmp7* линии В73 (данные не показаны). У линий ЗМС-8 и ЗМС-П одинаковые ОНЗ С>G в положении 431, линии КМ, ЗМС-8 и ЗМС-П несут идентичные ОНЗ в положении 457 (см. рис. 2).

Интересно отметить, что ген *Zm_Dmp7* у линии ЗМС-8 несет ту же ОНЗ (в положении 131 от стартового кодона, рис. 2), что и гаплоиндуцирующая линия кукурузы CAU5 [9], которая, как считают авторы, увеличивает гаплоиндукцию у линии кукурузы CAU5 в 2–3 раза в присутствии мутантного гена *Zm_Pla1* [9]. Однако линия ЗМС-П (ГИ – 10%), полученная при скрещивании ЗМС-8 (ГИ – 8%) с негаплоиндуцирующими линиями, не несет ОНЗ в положении 131. Таким образом, ОНЗ в положении 131 от стартового кодона в гене *Zm_Dmp7* не является причиной повышенной гаплоиндуцирующей способности линии ЗМС-П.

Для выявления филогенетического родства изучаемых линий кукурузы были построены филограммы с использованием последовательностей транскриптов генов *Zm_Pla1* (рис. 3), *Zm_Dmp7* (рис. 4).

Эволюционный анализ генов был проведен в программе MEGA 11 [28]. Эволюционные расстояния были вычислены с использованием метода максимального составного правдоподобия [29].

Из филограммы, построенной по гену *Zm_Pla1*, видно, что линии саратовской селекции распределились по родственным группам линий из баз данных. Линии по данному гену разделились на два больших кластера или на 12 отдельных групп,

B73	181	GAGCTGGACGGACCGGAGGCGAGGCTGGCGGACTACTTCGACTACATCGCCGGAACCAGC	240
ГПЛ-1	181	240
KM	181	..A.....	240
Stock 6	181	240
ЗМС-П	181	240
ЗМС-8	181	240
B73	301	GCTGCCAAGGACATCAACCACCTTTACATGCAGAACTGCCCGGCATCTTTCCTCAGAAG	360
ГПЛ-1	301	360
KM	301T.....G.....C.....	360
Stock 6	301T.....G.....C.....	360
ЗМС-П	301T.....G.....C.....	360
ЗМС-8	301T.....G.....C.....	360
B73	541	AAGAGCACGCCTCTGAAGAACGCTCTGCTCTCGGACGTGTGCATTGGCACGTCCGCCGCG	600
ГПЛ-1	541	600
KM	541G.....	600
Stock 6	541G.....	600
ЗМС-П	541G.....	600
ЗМС-8	541G.....	600
B73	841	CTCTACACGGCGCGGAGTGCTCCCGTGGGGTATCTGCCGGTGGTCCGCAACAACGGC	900
ГПЛ-1	841	900
KM	841C.....	900
Stock 6	841C.....	900
ЗМС-П	841C.....	900
ЗМС-8	841C.....	900
B73	961	GCCGCGATGTTCCAGTCGCTCCACAGCGACGGCGACTACCTGCGCATCCAGGACAACCTCG	1020
ГПЛ-1	961	1020
KM	961	1020
Stock 6	961A.....	1020
ЗМС-П	961A.....	1020
ЗМС-8	961A.....	1020
B73	1021	CTCCGTGGCGCCGCGGCCACCGTGGACGCGGGCGACGCCGGAACATGCGGAACGCTCGTC	1080
ГПЛ-1	1021	1080
KM	1021	1080
Stock 6	1021A.....	1080
ЗМС-П	1021A.....	1080
ЗМС-8	1021A.....	1080
B73	1081	GGGATCGGGGAGCGGATGCTGGCACAGAGGGTGTCCAGGGTCAACGTGGAGACAGG----	1136
ГПЛ-1	1081	1136
KM	1081	1136
Stock 6	1081C.....GAGC	1140
ЗМС-П	1081C.....GAGC	1140
ЗМС-8	1081C.....GAGC	1140
B73	1137	GAGGTACGAACCGGTGACTGGCGAAGGAAGCAATGCCGATGCCCTCGGTGGGCTCGCTAG	1196
ГПЛ-1	1137	1196
KM	1137	1196
Stock 6	1141C.A.....	1200
ЗМС-П	1141C.A.....	1200
ЗМС-8	1141C.A.....	1200
B73	1197	GCAGCTCTCCGAGGAGAGGAGAACAAGGCTCGCGCGCCGCTCTCTGCCATCAACCCAAG	1256
ГПЛ-1	1197	1256
KM	1197	1256
Stock 6	1201C..	1260
ЗМС-П	1201C..	1260
ЗМС-8	1201C..	1260
B73	1257	AGGCTCTAGATGTGCGTCGTACGATATCTAAGACAAGTGGCTTTACTGTGTCAGTCACATGC	1316
ГПЛ-1	12571287	
KM	12571287	
Stock 6	1261	.A.....C.C.....1320	
ЗМС-П	1261	.A.....C.C.....1291	
ЗМС-8	1261	.A.....C.C.....1291	

Рис. 1. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *Zm_Pla1* у линий кукурузы саратовской селекции KM, ЗМС-8, ЗМС-П, ГПЛ-1, а также линий Stock 6 и B73, выполненное с использованием программы BLAST. Точками показано нуклеотидное сходство у линий кукурузы, буквами обозначены одонуклеотидные замены, дефисом — отсутствие нуклеотида.

B73	1	ATGGATCGCAGCAACGCCGGTGC	60
КМ	1	51
ЗМС-8	1	60
ЗМС-П	1A.....	57
B73	61	CCGCCGGGCGCGGGAAGGAAGCGCCGCGGTGGCGAGGGGCGTGCAGAAGACGCTCTCC	120
КМ	52	111
ЗМС-8	61A.....	120
ЗМС-П	58	117
B73	121	AAGACGTCCATGCTGGCCAACTTCTCCCCACGGGCACGCTGCTAACCTTCGAGATGCTA	180
КМ	112	171
ЗМС-8	121C.....	180
ЗМС-П	118	177
B73	241	CTGCTCGCGCTCTGCGCCGCTCCTGCTTCTTCCACTTCACCGACAGCTTCCGCGCC	300
КМ	232	291
ЗМС-8	241A.....	300
ЗМС-П	238	297
B73	361	GGGCTCGGCGTCGAGGTGCCAGGGAGGAAAGGTACCGGCTCGCCTTCGTCGACGTCGTG	420
КМ	352A.....	411
ЗМС-8	361	420
ЗМС-П	358	417
B73	421	CACGCTGTTCATGTCCGTGCTGGTCTTTGCGGCCGTCACGCTCGCCGACTACCGGGTCTCC	480
КМ	412C.....G.....	471
ЗМС-8	421G.....G.....	480
ЗМС-П	418G.....G.....	477

Рис. 2. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *Zm_Dmp7* у линий кукурузы саратовской селекции КМ, ЗМС-8, ЗМС-П и референсной линии В73, выполненное с использованием программы BLAST. Точками показано нуклеотидное сходство последовательностей гена *Zm_Dmp7* исследуемых линий с последовательностью гена *Zm_Dmp7* референсной линии В73; ОНЗ у линий КМ, ЗМС-8 и ЗМС-П обозначены буквами; дефис означает отсутствие нуклеотида. ОНЗ линии ЗМС-8, совпадающая с ОНЗ линии САУ5, подчеркнута.

у всех линий в дендрограмме p -расстояния ветвей не превышают 0,007 (см. рис. 3). Линии АТ-1, АТ-3 и АТ-4 входят в одну группу с референсной линией В73. Несмотря на то что линия Stock 6 аннотирована как одна из предковых для линии АТ-1 [17], ген *Zm_Pla1* не был унаследован этой линией.

Филогенетический анализ гена *Zm_Pla1* демонстрирует родство гаплоиндуцирующих линий Stock 6, ЗМС-П и ЗМС-8 и приобретение линиями ЗМС-П и ЗМС-8 способности к гаплоиндукции за счет мутации в гене *Zm_Pla1* у Stock 6 укладывается в эту концепцию. Однако линии-гаплоиндукторы ЗМС-П и ЗМС-8 объединены в группу не только с линией Stock 6, но и с негаплоиндуцирующими линиями EP1, CML277, CML69, TX303, CML103, NC358, M162W, KY21, CML247 (см. рис. 3).

На основании выявленного нами полиморфизма гена *Zm_Dmp7* построена филограмма с использованием последовательностей гена *Zm_Dmp7* линий-негаплоиндукторов, найденных в базах данных и исследуемых нами, линий ГПЛ-1 и КМ, а также линий-гаплоиндукторов – ЗМС-П и ЗМС-8 (см. рис. 4). По характеру нуклеотидных последовательностей линии кукурузы распределились в два кластера с низким значением p -расстояния (эволюционное расстояние) между линиями внутри кластера. Как видно из дендрограммы, один из кластеров включает линии-гаплоиндукторы

ЗМС-П, ЗМС-8 и контрольную линию ГПЛ-1 саратовской селекции.

Линия Stock 6, несущая мутацию в гене *Zm_Pla1*, являлась предковой для линий с наследуемым (АТ-1, АТ-3, АТ-4) и индуцированным (ЗМС-П, ЗМС-8) партеногенезом. Нами показано, что высокая гаплоиндуцирующая способность саратовских линий ЗМС-П и ЗМС-8 частично обусловлена наличием дефектного гена *Zm_Pla1*, унаследованного от Stock 6. Партеногенетические линии АТ несут ген *Zm_Pla1*, полностью идентичный гену *Zm_Pla1* референсной непартеногенетической линии В73, что указывает на то, что элементы апомиксиса, демонстрируемые этими линиями, обусловлены иными генетическими детерминантами.

В процессе многолетней селекционной работы нескольких групп по всему миру частоту гаплоиндукции у современных линий-гаплоиндукторов кукурузы удалось повысить с 2 до 8–15 % по сравнению с предковой линией Stock 6 [6, 16]. Ген *Zm_Pla1* определен как первый детерминирующий гаплоиндукцию с частотой 2% [27], и ведутся поиски генов повышенной гаплоиндуцирующей способности. Например, в работе [30] идентифицировали девять ОНЗ, которые были достоверно связаны с гаплоиндукцией. В работе [9] одна из ОНЗ (в положении 131) в гене *Zm_Dmp7* была определена как причина повышенной частоты гаплоиндукции

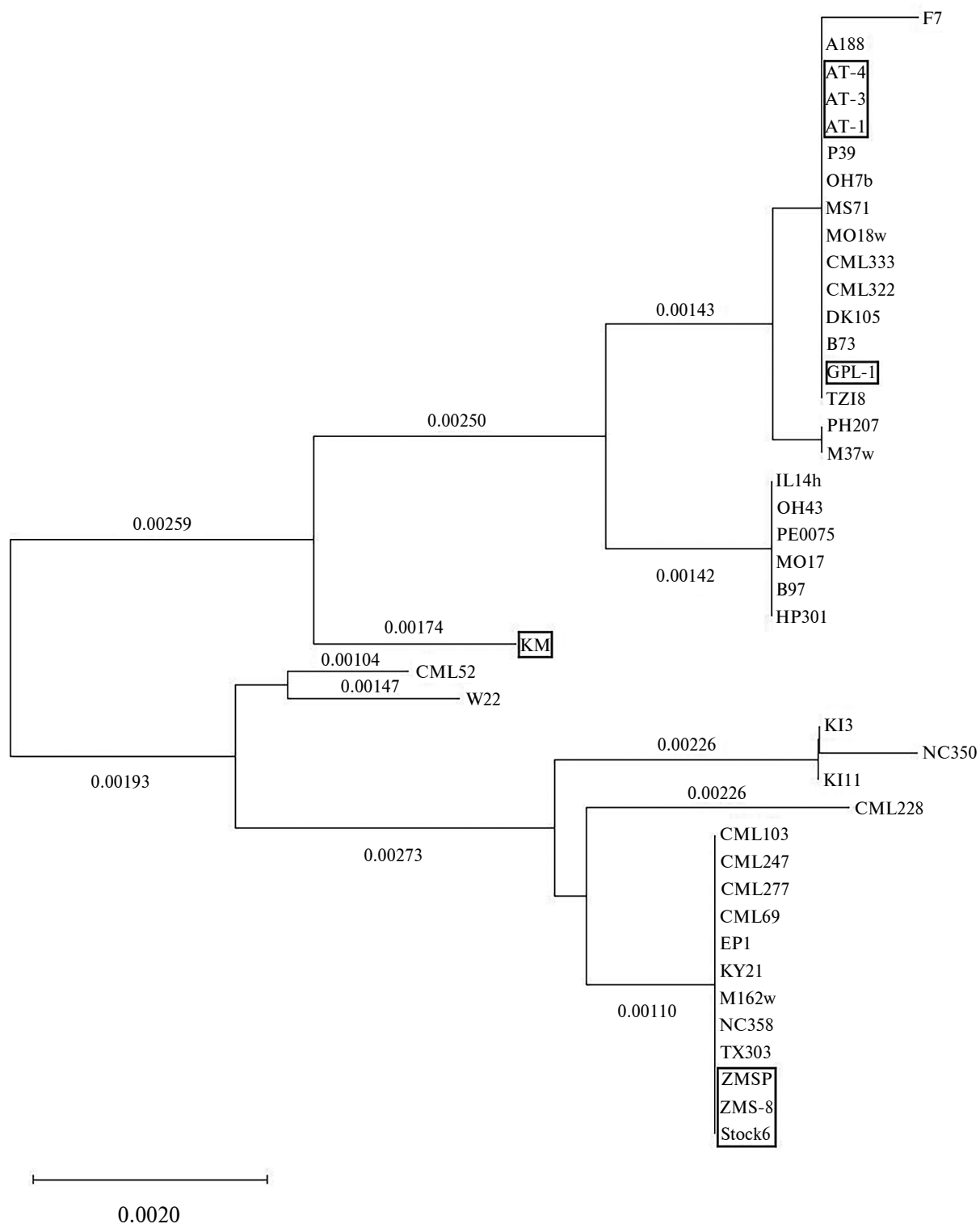


Рис. 3. Филограмма линий кукурузы по гену *Zm_Pla1*, построенная в программе MEGA 11 [по 16] (обозначения линий даны согласно авторскому оригиналу). Вариант представления с данными эволюционного расстояния для каждой из ветвей; рамками выделены изучаемые линии саратовской селекции.

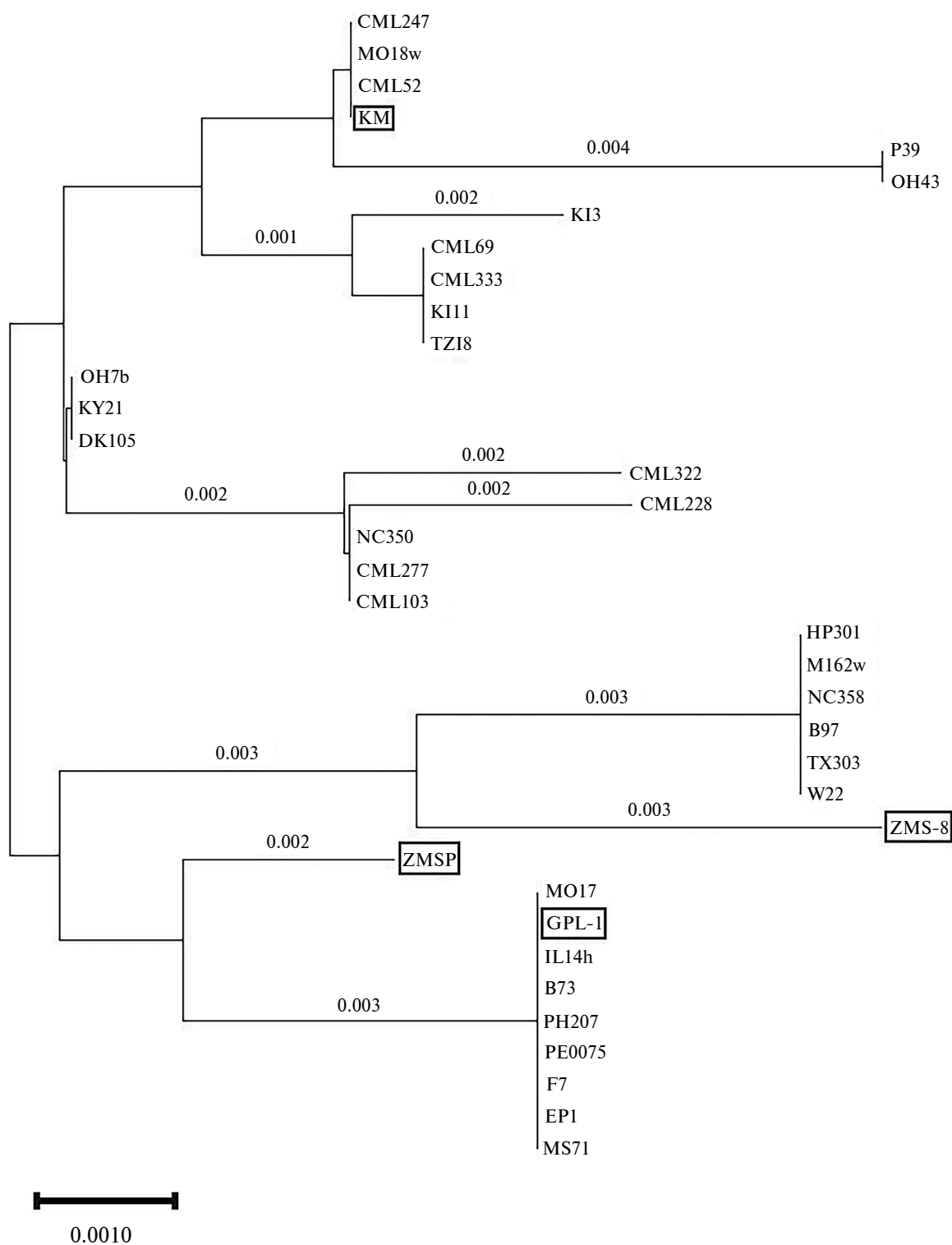


Рис. 4. Филограмма линий кукурузы по гену *Zm_DMP7*, построенная в программе MEGA 11 [по 16] (обозначения линий даны согласно авторскому оригиналу). Вариант представления с данными эволюционного расстояния для каждой из ветвей; рамками выделены изучаемые линии саратовской селекции.

в присутствии мутантного гена *Zm_Pla1*. В наших исследованиях связь этой мутации гена *Zm_Dmp7* с повышенной способностью линий саратовской селекции к гаплоиндукции не установлена.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-26-00101). Авторы признательны Ю.В. Смолькиной, О.В. Гуторовой, А.Ю. Колесовой за предоставленные образцы кукурузы.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coe E.H. A line of maize with high haploid frequency // *Am. Naturalist*. 1959. V. 59. P. 381–382. doi: 10.1086/282098
2. Gilles L.M., Khaled A., Laffaire J.B. et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize // *EMBO J*. 2017. doi: 10.15252/embj.201796603
3. Тырнов В.С., Завалишина А.Н. Индукция высокой частоты возникновения матроклинных гаплоидов кукурузы // *Докл. АН СССР*. 1984. Т. 276. С. 735–738.
4. Zavalishina A.N., Tyrnov V.S. Induction of matroclinal haploidy in maize *in vivo* // *Reproductive biology and plant breeding: XIII EUCARPIA Congr. L*. 1992. P. 221–222.
5. Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Селиванова Л.П., Завалишина А.Н. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы // *ДАН*. 1997. Т. 353. С. 405–407.
6. Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // *Изв. Самар. науч. центра Росс. академии наук*. 2016. Т. 18. № 2. С. 341–344.
7. Takahashi T., Mori T., Ueda K. et al. The male gamete membrane protein DMP9/DAU2 is required for double fertilization in flowering plants // *Development*. 2018. V. 45. Iss. 23. doi: 10.1242/dev.170076
8. Cyprys P., Lindemeier M., Sprunck S. Gamete fusion is facilitated by two sperm cell-expressed DUF679 membrane proteins // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 253–257. doi: 10.1038/s41477-019-0382-3
9. Zhong Y., Liu C., Qi X. et al. Mutation of *ZmDMP* enhances haploid induction in maize // *Nat. Plants*. 2019. V. 5. P. 575–580. doi: 10.1038/s41477-019-0443-7
10. Chalyk S., Baumann A., Daniel G. et al. Aneuploidy as a possible cause of haploid-induction in maize // *Maize Genet. Coop. Newsletter*. 2003. V. 77. P. 29–30.
11. Zhang Z.L., Qiu F.Z., Liu Y.Z. et al. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.) // *Plant Cell Rep*. 2008. V. 27. P. 1851–1860. doi: 10.1007/s00299-008-0601-2
12. Qiu F., Liang Y., Li Y. et al. Morphological, cellular and molecular evidences of chromosome random elimination *in vivo* upon haploid induction in maize // *Curr. Plant Biol*. 2014. V. 1. P. 83–90. doi: 10.1016/j.cpb.2014.04.001
13. Kelliher T., Starr D., Wang W. et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize // *Front. Plant Sci*. 2016. V. 7. P. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2016.00414
14. Ravi M., Chan S.W.L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination // *Nature*. 2010. V. 464. P. 615–619. doi: 10.1038/nature08842
15. Wang S., Jin W., Wang K. Centromere histone H3- and phospholipase-mediated haploid induction in plants // *Plant Methods*. 2019. V. 15. Article 42. doi: 10.1186/s13007-019-0429-5
16. Hu H., Schrag T.A., Peis R. et al. The genetic basis of haploid induction in maize identified with a novel genome-wide association method // *Genetics*. 2016. V. 202. P. 1267–1276. doi: 10.1534/genetics.115.184234
17. Тырнов В.С., Еналеева Н.Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // *Докл. АН СССР*. 1983. Т. 272. № 3. С. 722–725.
18. Апанасова Н.В., Павлов Н.А. Новые партеногенетические линии кукурузы // *Сб. ст. Межд. науч.-практ. конф., посвящ. 135-й годовщине со дня рождения акад. Н.И. Вавилова. ВАВИЛОВСКИЕ ЧТЕНИЯ*. Саратов, 2022. С. 49–52. <https://www.vavilovsar.ru/files/ckeditor/uploads/22-12-26/1672047844/VCh2022%20SBORNIK.pdf>
19. Kolesova A.Y., Tyrnov V.S. Embryological peculiarities of tetraploid parthenogenetic maize forms // *Maize Genet. Coop. Newsletter*. 2012. V. 85. P. 65–66.
20. Volokhina I., Gusev Y., Moiseeva Ye. et al. Gene expression in parthenogenetic maize proembryos // *Plants*. 2021. V. 10 (5). doi: 10.3390/plants10050964
21. Апанасова Н.В., Тумовец В.В. Цитозембриологическое изучение проявления апомиксиса у кукурузы линии АТ-3 после опыления // *Бюлл. Бот. сада Саратовского гос. ун-та*. 2003. № 2. С. 194–197.
22. Tyrnov V.S. Producing of parthenogenetic forms of maize // *Maize Genet. Coop. Newsletter*. 1997. V. 71. P. 73–74.

23. Tyrnov V.S., Smolkina Y.V., Titovets V.V. Estimation of parthenogenesis frequency on the grounds of genetical and embryological data // *Maize Genet. Coop. Newsletter*. 2001. V. 75. P. 56–57.
24. Моисеева Е.М., Гусев Ю.С., Гуморова О.В., Чумаков М.И. Сравнительный анализ экспрессии генов *HAP2/GCS1*, *GEX2* у линий кукурузы саратовской селекции // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 3. С. 327–335. doi: 10.31857/S0016675823030098.
25. Моисеева Е.М., Фадеев В.В., Красова Ю.В., Чумаков М.И. Анализ мутаций генов автономного эмбрио- и эндоспермогенеза кукурузы // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 9. С. 1090–1093. doi: 10.31857/S0016675823090084.
26. Чумаков М.И. Матроклинная гаплоидия и взаимодействие гамет у кукурузы (обзор) // *Генетика*. 2018. Т. 54. № 10. С. 1120–1124. doi: 10.1134/S1022795418100058
27. Liu C., Li X., Meng D. et al. A 4-bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase a generates haploid induction in maize // *Mol. Plant*. 2017. V. 10. P. 520–522. doi: 10.1016/j.molp.2017.01.011
28. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101 (30). P. 11030–11035.
29. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 // *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38. P. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
30. Trentin H.U., Frei U.K., Lübberstedt T. Breeding maize maternal haploid inducers // *Plants*. 2020. V. 9 (5). P. 614. doi: 10.3390/plants90506

Comparative Analysis of Mutations of the Gynogenesis Maize Genes

Ye. M. Moiseeva¹, V. V. Fadeev¹, Yu. V. Fadeeva¹, S. I. Mazilov¹, M. I. Chumakov^{1, *}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Federal Research Center “Saratov Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Saratov, 410049 Russia*

*e-mail: chumakov_m@ibppm.ru

The SNP polymorphism in gynogenesis (*Zm_Pla1*, *Zm_CenH3*, *Zm_Dmp7*) genes from haploid-inducing and control maize lines was evaluated. Using sequencing and multiple alignment methods the SNP, deletions, insertions in the target genes was established in comparing with the reference B73 maize line, and the phylogenetic trees were prepared. The presence of a 4-nucleotide insertions (4NI) and 15 identical SNP in the *Zm_Pla1* gene of the ancestral Stock 6 and haploid-inducing ZMS-8 and ZMS-P maize lines and the absence of 4NI in the *Zm_Pla1* gene in parthenogenetic as well as control maize lines were established. Phylogenetic analysis of the *Zm_Pla1* gene confirmed the relationships between Stock 6 and haploid-inducing ZMS-P and ZMS-8 maize lines from Saratov. The presence of 5 SNPs in the *Zm_Dmp7* gene of the ZMS-8 line, 3 SNPs and one 3-nucleotide deletion in the *Zm_Dmp7* gene of the ZMS-P line, 3 SNPs and a 9-nucleotide deletion in the *Zm_Dmp7* gene of the KM line were observed. The SNP (at position 131 from the start codon) in the *Zm_Dmp7* gene is the reason for the increased haploid-inducing ability in CAU5, but not for ZMS-P maize line. Additionally, the 3-nucleotide deletion in the *Zm_Dmp7* gene in the ZMS-P maize line and a 9-nucleotide deletion in the KM maize line were observed.

Keywords: haploid-induction, maize, mutations, gene polymorphism.

ГЕНЫ ЦИСТЕИН-БОГАТЫХ ПЕПТИДОВ ПЫРЕЯ *Thinopyrum elongatum*¹© 2024 М. П. Слезина¹, Е. А. Истомина¹, А. Н. Шиян¹, Т. И. Одинцова^{1, *}¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: odintsova2005@rambler.ru

Поступила в редакцию 26.04.2024 г.

После доработки 03.06.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

Цистеин-богатые пептиды играют важную роль в защитной системе растений. Цель настоящей работы состояла в поиске *in silico* генов антимикробных и сигнальных пептидов в геноме пырея удлиненного *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey ($2n = 14$, EE) – дикорастущего злака, обладающего высокой устойчивостью к патогенам и абиотическому стрессу. В результате биоинформатического анализа в геноме пырея было выявлено 154 новых гена предшественников антимикробных и сигнальных пептидов, относящихся к девяти семействам. В ряде генов цистеин-богатых пептидов обнаружены интроны. Были определены структура предшественников пептидов и локализация генов пептидов в хромосомах пырея. Показано наибольшее сходство последовательностей пептидов пырея с гомологичными пептидами растений родов *Triticum* и *Aegilops*, что подтверждает цитогенетические данные о родстве генома Е с геномом Д и близкими ему геномами. Полученные результаты вносят вклад в характеристику молекулярных компонентов иммунной системы *Th. elongatum* и послужат базой для дальнейшего исследования механизмов устойчивости, а также для научно обоснованного практического использования этого вида в качестве донора устойчивости в селекции пшеницы.

Ключевые слова: иммунитет растений, *Thinopyrum elongatum*, цистеин-богатые пептиды, биоразнообразие генов.

DOI: 10.31857/S0016675824100055 EDN: WFJMCC

В ходе эволюции растения выработали сложную систему защиты от патогенов, которая осуществляется на двух уровнях [1]. Первый базовый уровень защиты, получивший название РТИ (PAMP-triggered immunity), активируется при узнавании расположенными в мембране рецепторами растительной клетки эволюционно консервативных структур патогена, так называемых PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) или MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns), либо компонентов растительной клетки, названных DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), которые высвободились при ее разрушении патогенными микроорганизмами. РТИ эффективно защищает от неспециализированных патогенов. Следующий уровень защиты активируется после узнавания внутриклеточными рецепторами клетки, кодируемыми генами устойчивости, факторов вирулентности (эффекторов) патогена. Узнавание эффекторов индуцирует защитный ответ, получивший название ЕТИ (effector-triggered

immunity). В отличие от РТИ, ЕТИ направлен на борьбу со специализированными патогенами. Узнавание патогена при РТИ и ЕТИ приводит к сходным процессам, таким как быстрое поступление ионов кальция в клетку, синтез активных форм кислорода, активация митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), перепрограммирование экспрессии генов, отложение каллозы в клеточной стенке в местах инфицирования, а также синтез антимикробных соединений. Среди антимикробных соединений, образующихся в ответ на заражение, существенная роль принадлежит защитным пептидам.

Важнейшую группу защитных пептидов составляют антимикробные пептиды (АМП), которые непосредственно взаимодействуют с патогенами и подавляют их рост. Они обеспечивают защиту против широкого круга патогенов [2–4]. Эффективность защиты обеспечивается чрезвычайным разнообразием компонентов состава АМП в пределах одного вида растений, а также многообразием их механизмов действия. Кроме того, АМП взаимодействуют с другими компонентами врожденной иммунной системы растений [5, 6].

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по doi статьи.

Помимо АМП, к группе защитных пептидов относятся регуляторные пептиды: являясь участниками сигнальных путей, они координируют взаимодействия растений с патогенными и непатогенными микроорганизмами, а также стрессовыми абиотическими факторами среды [7–10]. На основе особенностей строения пептиды растений условно подразделяют на три основные группы: цистеин-богатые пептиды; пептиды, не содержащие остатков цистеина, и пептиды с посттрансляционными модификациями [11]. Цистеин-богатые пептиды (ЦБП) образуют наиболее многочисленную группу, на их долю приходится около 2% от всех экспрессирующихся генов [12, 13]. Гены ЦБП обычно образуют кластеры на хромосомах, которые возникли в результате многократных дупликаций отдельных генов. При большом внутри- и межвидовом разнообразии последовательностей ЦБП их объединяет наличие у предшественника сигнального пептида и обогащенного остатками цистеина (4–16) зрелого пептида. Несмотря на многочисленные исследования отдельных пептидов у отдельно взятых видов растений, оценка истинного числа, а также структурного и функционального разнообразия пептидов представляет значительные сложности. Однако быстрое развитие в последние годы методов полногеномного секвенирования и биоинформатики открывает новые возможности для проведения *in silico* поиска генов ЦБП в геномных и транскриптомных данных для последующих функциональных исследований.

Пырей удлинённый *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey — растение семейства мятликовые, которое растёт повсеместно и является хорошим кормовым растением. Оно устойчиво к грибным заболеваниям, низким температурам, засолённости почвы, засухе; кроме того, этот вид обладает высокой урожайностью [14]. Устойчивость пырея к биотическим и абиотическим факторам среды делает его уникальным объектом для изучения механизмов формирования устойчивости к патогенам и абиотическим стрессовым факторам. Этот вид является также уникальным донором устойчивости при селекции пшеницы. В геноме пырея локализован целый ряд генов устойчивости к грибным болезням, обеспечивающих устойчивость к определенным расам патогенов [14]. В то же время гены АМП, обуславливающие устойчивость к широкому кругу патогенов, у пырея удлинённого не изучены. В литературе отсутствуют также данные о генах регуляторных пептидов, влияющих на устойчивость пырея к патогенам и абиотическому стрессу.

Цель настоящей работы — поиск *in silico* генов АМП и сигнальных пептидов в геноме пырея удлинённого *Th. elongatum*. В результате проведенного биоинформатического анализа в геноме пырея нами было выявлено 154 гена АМП-подобных и сигнальных пептидов. Дальнейшие исследования

экспрессии обнаруженных генов пептидов в ответ на стрессовые факторы среды, а также биологической активности пептидов *in vitro* позволят понять их роль в иммунной системе пырея для научно обоснованного использования этого вида в селекции пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа использовали последнюю версию сборки генома *Th. elongatum* isolate D-3458 (GenBank GCA_011799875.1). Поиск АМП и регуляторных пептидов проводили с использованием разработанного нами алгоритма, основанного на регулярных выражениях [15]. Для идентификации сигнальных пептидов использовали программу SignalP v6.0 [16]. Последовательности АМП, в которых не был найден сигнальный пептид, отбрасывали. Для всех найденных последовательностей предсказывали антимикробные свойства при помощи программы CAMPR4 [17]. Значение изоэлектрической точки (pI) определяли при помощи программы ProtParam [18]. Наличие С-концевого GPI (glycosylphosphatidylinositol) якоря предсказывали с помощью программы big-PI Plant Predictor [19]. Для аннотации пептидов использовали программу BLAST и базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Все выравнивания последовательностей проводили с помощью программы Vector NTI Advance 9.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С использованием разработанного нами ранее алгоритма у пырея было выявлено 154 гена АМП-подобных и сигнальных пептидов, связанных с защитными функциями. Обнаруженные гены кодируют пептиды следующих семейств: дефензины, снакины, липид-переносящие белки, тионины, гевеиноподобные пептиды, пептиды семейств Ole e 1, MEG и RALF. Кроме того, найдены гены, кодирующие пептиды с новым цистеиновым мотивом.

Дефензины/DEFLs

Дефензины представляют собой уникальное семейство АМП, поскольку они обнаружены у всех многоклеточных организмов [20]. В молекулах “классических” дефензинов восемь остатков цистеина, которые образуют следующий мотив: CX{4,25}CX{2,12}CX{3,4}CX{3,17}CX{4,32}CXCX{1,6}C. К дефензиноподобным пептидам относят также пептиды со сходным 8-Цис-мотивом, который, однако, включает три расположенные подряд остатка цистеина в С-концевой области молекулы: CX{3,21}CX{2,12}CX{3,4}CX{3,15}CX{4,23}CCC. К дефензиноподобным пептидам относят также пептиды с шестью и четырьмя остатками

цистеина [13]. У 4-Цис DEFLs мотив следующий: CX{3,5}CX{8,17}CX{4,6}C.

Считается, что дефензины растений участвуют в защите от грибных и бактериальных патогенов и вредителей, используя для этого различные механизмы, такие как нарушение проницаемости мембран, ингибирование ионных каналов, а также подавление активности ферментов патогенов [20–23]. Помимо защиты от патогенов, дефензины обуславливают устойчивость к абиотическому стрессу [24, 25]. Кроме того, они участвуют в процессах развития [26].

В геноме пырея нами было обнаружено 39 генов предшественников дефензиноподобных пептидов (рис. 1, Приложение). Среди них 30 генов пептидов с классическим 8-Цис-мотивом (дефензины группы 1, DEFL1), два гена пептидов с 8-Цис-мотивом и расположенными подряд тремя остатками цистеина (дефензины группы 2, DEFL2), семь генов пептидов с 4-Цис-мотивом (дефензины группы 4, DEFL4). Во всех (кроме двух) генах классических дефензинов обнаружен интрон в области сигнального пептида. Предшественники DEFL1 имеют сходную структуру, характерную для дефензинов класса 1, которые секретируются в апопласт, и состоят из сигнального и зрелого пептидов. Лишь

KAF7074040.1	1	-----MEGRALCFVLVLLALASP-ALAE-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	124
TeDEFL1-69		-----MEGRALCFVVLVLLALASP-ALAE-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	
TeDEFL1-70		-----MEGRALCFVVLVLLALASP-ALAE-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	
TeDEFL1-65		-----MGARNATCFVLVLLALFANLGTAE-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	
TeDEFL1-67		-----MGARNATCFVLVLLALFANLGTAE-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	
TeDEFL1-66		-----MSARNATCFVLVLLALFANLGTAE-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	
TeDEFL1-68		-----MDARHATCFVLVLLALFANLGTAE-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	
TeDEFL1-63		-----MEPARTIVGAFVLLVLLALASP-ALAE-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	
TeDEFL1-64		-----MEAWRKTMTCCLLFCFMTATCEVSTEN-----	-----KCYKERFY-SMTCMK-----WHAMEGVNQ--SPDLVLKSAHCTTKHV-----	-----IMRYNCEM-----TKE-----	
TeDEFL1-30		-----MKTTQVLLVLSLALMLSSG-----EGGCVDCDVPVPAADCSCTVIRGEAE-----	-----PRNCEABECRRQHG-----GLGACAAALG-----	-----SCAL-----SVKYP-----PSSIAQGN	
TkDEFL1-30		-----MKTTQVLLVLSLALMLSSG-----EGGCVDCDVPVPAADCSCTVIRGEAE-----	-----PRNCEABECRRQHG-----GLGACAAALG-----	-----SCAL-----SVKYP-----PSSIAQGN	
TeDEFL1-12		-----MKTKKQVATQVVLVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TkDEFL1-12		-----MKTKKQVATQVVLVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-32		-----MNSKPKVTVCAVMLVLLVLLVSSYDGGGVGVAE-----	-----ARCTGKSQHRHFFPIS-----DKSCTKTCLEHGAKE-----	-----TAGY-----KIRRCCTRO-----	
TkDEFL1-32		-----MNSKPKVTVCAVMLVLLVLLVSSYDGGGVGVAE-----	-----ARCTGKSQHRHFFPIS-----DKSCTKTCLEHGAKE-----	-----TAGY-----KIRRCCTRO-----	
TeDEFL1-56		-----MGLSVKIFAVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
XP_037410120.1		-----MGLSAKVFVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-59		-----MGMTKVLVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-57		-----MDLSMKVFVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-58		-----MDLSMKVFVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-60		-----MDLSMKVFVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-61		-----MDLSMKVFVLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-54		-----MASSHKFFFAA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-55		-----MESHKLPFAIAILLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-62		-----MNSKPKVTVCAVMLVLLVLLVSSYDGGGVGVAE-----	-----ARCTGKSQHRHFFPIS-----DKSCTKTCLEHGAKE-----	-----TAGY-----KIRRCCTRO-----	
TeDEFL1-15		-----MEASRRLSAAILLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-16		-----MEASRRLSAAILLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TkDEFL1-15		-----MEASRRLSAAILLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TkDEFL1-16		-----MEASRRLSAAILLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-53		-----MGKLLSAAILLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-22		MASTRSRMVAS-VLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TkDEFL1-22		MASTRSRMVAS-VLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-36		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TkDEFL1-36		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-51		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-51		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-23		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-24		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TkDEFL1-24		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-20		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TkDEFL1-20		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-23		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL1-40		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TkDEFL1-40		MALSRMAASA-LLLVLLVLAEEAAPPV-----AE-----	-----AKICRRRSAGCFKGPV-----NKNCAQVCOEGR-----	-----GGGNDGPF-----LRRCKCTRO-----	
TeDEFL4-10	1	-----MGRKVCISLAILALVLAGPGAKAAPFAGGPASMDAAVAVRQMSMKLEDDGVAPELT-----VDLEVHRR-----	-----ILID-VGQSALNNGRPS-----CIRNCPAR-GDSYTGRRGLKYYCGNGGS	-----	120
TkDEFL4-10		-----MGRKVCISLAILALVLAGPGAKAAPFAGGPASMDAAVAVRQMSMKLEDDGVAPELT-----VDLEVHRR-----	-----ILID-VGQSALNNGRPS-----CIRNCPAR-GDSYTGRRGLKYYCGNGGS	-----	
TeDEFL4-12		-----MDRNVCSILVLAALVLAGPDGTGA-----AAAVYNVDQAVMP-----TPSSLMRLLEDGVPPELAVTTLDVHNR-----	-----VYGAGDITKAGALDAVKFRVVRNCPAPSGAPYTGRRGKYYDCRV-----	-----	
TkDEFL4-12		-----MDRNVCSILVLAALVLAGPDGTGA-----AAAVYNVDQAVMP-----TPSSLMRLLEDGVPPELAVTTLDVHNR-----	-----VYGAGDITKAGALDAVKFRVVRNCPAPSGAPYTGRRGKYYDCRV-----	-----	
TeDEFL4-27		-----MDRNVCSILVLAALVLAGPDGTGA-----AAAVYNVDQAVMP-----TPSSLMRLLEDGVPPELAVTTLDVHNR-----	-----VYGAGDITKAGALDAVKFRVVRNCPAPSGAPYTGRRGKYYDCRV-----	-----	
TkDEFL4-27		-----MDRNVCSILVLAALVLAGPDGTGA-----AAAVYNVDQAVMP-----TPSSLMRLLEDGVPPELAVTTLDVHNR-----	-----VYGAGDITKAGALDAVKFRVVRNCPAPSGAPYTGRRGKYYDCRV-----	-----	
TeDEFL4-37		-----MDTKACISILVLAALVLAGPDGTGA-----AAAVYNVDQAVMP-----TPSSLMRLLEDGVPPELAVTTLDVHNR-----	-----VYGAGDITKAGALDAVKFRVVRNCPAPSGAPYTGRRGKYYDCRV-----	-----	
TkDEFL4-37		-----MDTKACISILVLAALVLAGPDGTGA-----AAAVYNVDQAVMP-----TPSSLMRLLEDGVPPELAVTTLDVHNR-----	-----VYGAGDITKAGALDAVKFRVVRNCPAPSGAPYTGRRGKYYDCRV-----	-----	
TeDEFL4-20		MGRCLSFLLLLGIALAFAGPANGDISAGFAASGAAYSIDAAVRQMSMKLEDDGVPPELS-----VDLEVHRR-----	-----VLGASPGALSNNRPA-PGACAP-GGSYTNRRGKYYCGRG-----	-----	
TkDEFL4-20		MGRCLSFLLLLGIALAFAGPANGDISAGFAASGAAYSIDAAVRQMSMKLEDDGVPPELS-----VDLEVHRR-----	-----VLGASPGALSNNRPA-PGACAP-GGSYTNRRGKYYCGRG-----	-----	
TeDEFL4-43		-----MDRQARVSLVLLVLTGTGTVIAVLAANPTAGETRAGPGLAGSGMTAYRVDAAATAPQKLT-----FVVHRR-----	-----VLASLSNPGALSNNRPA-PGACAP-GGSYTNRRGKYYCGRG-----	-----	
TeDEFL4-8		-----MKPQTQLLLAYIAALVMSGG-----VLGA-----STHAAMP-VTVEDDEVGFAEREAYPQRRVLAIDPGSISYGLLEANKAAYGSGRGR-----GOPYTGRRGKYYCGRG-----	-----	-----	
TkDEFL4-8		-----MKPQTQLLLAYIAALVMSGG-----VLGA-----STHAAMP-VTVEDDEVGFAEREAYPQRRVLAIDPGSISYGLLEANKAAYGSGRGR-----GOPYTGRRGKYYCGRG-----	-----	-----	
TeDEFL2-1	1	-----MALVNPNKMRRTTAAVLAIVLVMVSACTLPSCAAHKYNLAASPPGGTRYCSFLIGGQACSYSANNDMCSRMRARGQOHTFCTREPGO-----CCOFT	-----	-----	100
TeDEFL2-2		-----MALVNPNKMRRTTAAVLAIVLVMVSACTLPSCAAHKYNLAASPPGGTRYCSFLIGGQACSYSANNDMCSRMRARGQOHTFCTREPGO-----CCOFT	-----	-----	
KAF6992008.1		-----MGLLKDRALLVLAIVLVMVSACTLPSCAAHKYNLAASPPGGTRYCSFLIGGQACSYSANNDMCSRMRARGQOHTFCTREPGO-----CCOFT	-----	-----	

Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей предшественников DEFLs *Th. elongatum* (Te) и *T. kiharae* (Tk) [27], а также некоторых дефензинов растений. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Группы сходных пептидов разделены пустой строкой.

один предшественник TeDEFL1-30 содержит дополнительно короткий С-концевой домен (см. рис. 1). Значения pI большинства зрелых дефензинов варьируют от 7.73 до 10.06, но у восьми pI находится в диапазоне 5.02–6.86 (см. Приложение).

Гены классических дефензинов локализованы в шести из семи хромосом пырея. Число обнаруженных генов на разных хромосомах варьирует: на хромосоме 1E – 10; 2E – 3; 3E – 6; 4E – 5; 5E – 4; 7E – 2. На хромосоме 6E генов предшественников дефензинов выявлено не было.

Все обнаруженные последовательности предшественников дефензинов пырея обладают наибольшим сходством с изученными нами ранее пептидами *Triticum kiharae* Dorof. et Migush., а также других растений родов *Triticum* и *Aegilops* (степень сходства $\geq 89\%$). Только у одного пептида TeDEFL1-59 гомология была ниже (81%). Единственным исключением стал пептид TeDEFL1-30, который обладал максимальным сходством с пептидом *Hordeum vulgare* L. (82%).

Сравнение последовательностей γ -коров дефензинов пырея – участков полипептидной цепи с мотивом GXCN, которые связаны с антимикробными свойствами, с γ -корами дефензинов *T. kiharae* показало, что для ряда дефензинов они совпадают. Это относится к дефензинам пырея TeDEFL1-12, -16, -20, -32, -36 и -40. Проведенное нами ранее исследование показало, что эти γ -коры проявляют высокую антимикробную активность против дрожжеподобных грибов *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*, различных видов фузариевых грибов и фитопатогенных бактерий – *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas savastanoi* и *Pectobacterium carotovorum* [28]. Причем оказалось, что наиболее высокой активностью и наиболее широким спектром антимикробного действия обладает γ -кор DEFL1-16, имеющий последовательность GKCRGFRRRC. У пырея, помимо TeDEFL1-16, есть еще два дефензина с очень сходными γ -корами: TeDEFL1-15 и TeDEFL1-53 (см. рис. 1). По сравнению с TeDEFL1-16 у TeDEFL1-15 в γ -коре K1 заменен на R1 и R8 заменен на H8; а у TeDEFL1-53 F6 заменен на A6. Поскольку все перечисленные выше замены являются консервативными, можно ожидать, что пептиды пырея TeDEFL1-15 и TeDEFL1-53 сохраняют антимикробную активность, как у γ -кора TeDEFL1-16.

Два предшественника дефензинов с тремя подряд расположенными остатками цистеина TeDEFL2-1 и TeDEFL2-2 обладают наибольшим сходством последовательностей с гипотетическими белками *T. aestivum* KAF7092360.1 и KAF6992008.1: идентичность последовательностей составляла 85 и 91% для TeDEFL2-1 и TeDEFL2-2 соответственно (см. рис. 1, Приложение). Гены этих двух дефензинов расположены на хромосомах 6E и 1E.

Гены семи предшественников дефензиноподобных пептидов DEFL4, синтезирующихся в виде препробелков, расположены на хромосомах 2E, 3E и 6E. Эти предшественники имеют высокое сходство с 4-Цис DEFL *T. kiharae* и гипотетическими белками растений родов *Triticum* и *Aegilops* (см. рис. 1, Приложение). Степень идентичности последовательностей варьирует от 82 до 97%.

Снакины

Снакины относятся к специфичным для растений цистеин-богатым АМП, содержащим 12 остатков цистеина, которые образуют следующий мотив: CX₃CX₃CX_{7,11}CX₃CX₂CCX₂CX_{1,3}CX₁₁CX_{1,2}CX_{11,14}-КСР. Накапливаются данные о том, что, как и другие АМП, снакины полифункциональны. Наряду с тем, что они эффективно подавляют рост патогенных бактерий и грибов [29], они участвуют в таких процессах, как деление, рост и элонгация клеток, цветение и др. [30, 31]. Как и гены дефензинов, гены снакинов образуют мультигенные семейства [32]. Их экспрессия регулируется биотическими и абиотическими стрессовыми факторами среды, а также гиббереллинами [33].

В геноме пырея нами найдено десять генов предшественников снакинов TeSN1–10 (рис. 2, а, Приложение). Известно, что гены снакинов обычно имеют один или два интрона [34]. Во всех генах снакинов пырея нами обнаружен интрон в области сигнального пептида. Второй интрон в области зрелого пептида был обнаружен в генах только двух снакинов (TeSN7 и TeSN9). Большинство генов снакинов пырея кодируют предшественники, которые состоят из сигнального пептида и зрелого цистеин-богатого пептида. Три предшественника состоят из трех доменов: сигнального пептида, вариативного по аминокислотному составу участка, и зрелого пептида, содержащего 12 консервативно расположенных остатков цистеина (см. рис. 2, а). Такая трехдоменная структура предшественника описана и для других представителей этого семейства АМП [35]. У снакина TeSN5 обнаружена делеция в зрелом пептиде, приводящая к потере 5-го остатка цистеина.

Гены снакинов расположены во всех хромосомах пырея, кроме 3E. Как и в случае дефензинов, число генов снакинов на разных хромосомах различно: в хромосомах 2E и 5E – по три гена, в остальных – по одному.

Зрелые пептиды снакинов являются основными молекулами. Как и дефензины, снакины пырея наиболее сходны со снакинами растений родов *Triticum* и *Aegilops* (см. рис. 2, а, Приложение). Процент идентичности аминокислотных последовательностей варьирует от 88 до 97%. Сравнение со снакином TkSN1 пшеницы *T. kiharae* показало, что

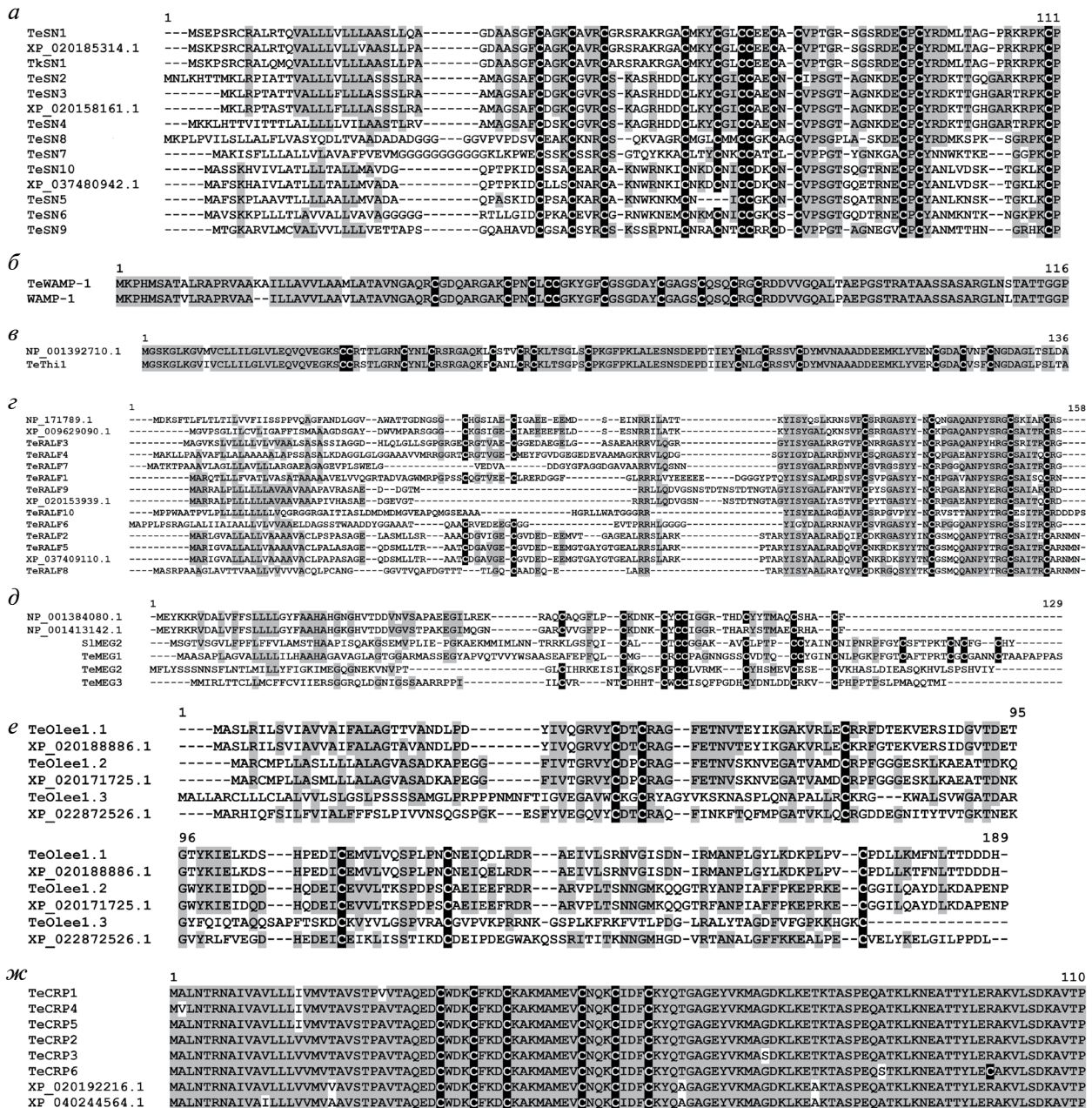


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей предшественников: *a* – снакинов *Th. elongatum*, TksN1 пшеницы [28] и некоторых снакинов растений рода *Triticum*; *б* – гевеиноподобного пептида *Th. elongatum* и пептида WAMP-1 пшеницы (P85966.2); *в* – тиониноподобного пептида *Th. elongatum* и гомологичной последовательности *T. aestivum*; *г* – пептидов семейства RALF *Th. elongatum* и других растений; *д* – пептидов семейства MEG *Th. elongatum*, пептида MEG2 *Solanum lycopersicum* [15] и пептидов MEG1 (NP_001384080.1), MEG2-like (NP_001413142.1) *Zea mays*; *е* – пептидов семейства Ole e 1 *Th. elongatum*, Ole e 1-like пептида *Olea europaea* var. *syvestris* (XP_022872526.1) и гомологичных последовательностей; *ж* – цистеин-богатых пептидов *Th. elongatum* с новым мотивом и их ближайших гомологов. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Группы сходных пептидов разделены пустой строкой.

зрелый снакин TeSN1 отличается от снакина пшеницы лишь одной консервативной заменой аланина на глицин. Проведенное нами ранее изучение антимикробных свойств γ-куркумина пшеницы

выявило его высокую активность: IC₅₀ для различных грибных и бактериальных патогенов варьировало от 6 до 160 μM [28]. Таким образом, можно предположить, что снакин пырея обладает такими

же антимикробными свойствами, как и пептид пшеницы. Сравнение последовательностей γ -коров других снакинов пырея с таковым TkSN1 выявило значительные различия, однако программа CAMPR4 указывает на наличие антимикробной активности у всех снакинов пырея.

Гевеиноподобные пептиды

Гевеиноподобные пептиды растений различаются по числу остатков цистеина в молекуле: описаны пептиды с шестью, восьмью и десятью остатками цистеина [36]. Для них характерно наличие хитин-связывающего сайта, состоящего из нескольких консервативно расположенных остатков гидрофобных аминокислот, который участвует во взаимодействии с хитином и другими полисахаридами клеточных стенок патогенов. Гевеиноподобные пептиды обладают антифунгальными и антибактериальными свойствами, которые обусловлены ингибированием роста гиф грибов или клеточной стенки бактерий за счет непосредственного взаимодействия пептида с полимерами клеточных стенок патогена. Альтернативный механизм состоит в ингибировании эффекторов патогена, таких как металлопротеиназы грибов, которые гидролизуют защитные хитиназы растений [37]. Гевеиноподобные пептиды синтезируются в виде препробелков. Некоторые представители семейства образуются в результате протеолитического процессинга хитиназ класса 1 или гололектинов [38, 39].

В геноме пырея нами найден один ген предшественника 10-Цис гевеиноподобного пептида TeWAMP1 (см. Приложение). Ген расположен в хромосоме 2Е. Предшественник TeWAMP1 имеет типичную трехдоменную структуру и состоит из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. По сравнению с предшественником гевеиноподобного пептида пшеницы WAMP1 у TeWAMP1 есть отдельные замены и одна делеция в сигнальном пептиде и С-концевом продоме (см. рис. 2, б). Идентичность последовательности предшественника TeWAMP1 последовательности предшественника WAMP1 составляет 95%. Зрелый гевеиноподобный пептид пырея TeWAMP1 полностью совпадает по аминокислотной последовательности с WAMP1 — гевеиноподобным пептидом *T. kiharae*, обладающим антифунгальными и антибактериальными свойствами (см. рис. 2, б) [40]. Так, IC₅₀ ингибирования *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium solani* и *F. oxysporum* этим пептидом составляет 5 μ г/мл.

Тиониноподобные пептиды

Тионины представляют собой высокоосновные пептиды длиной 45–47 аминокислотных остатков с шестью или восьмью остатками цистеина, которые

образуют следующие мотивы: CCX{10,11}CX{8,10}CX{5}CX{7,10}C или CCX{7}CX{3}CX{8-10}CX{3}CX{7}C [4, 13]. Тионины обнаружены только у растений. В соответствии с числом остатков цистеина в молекуле выделяют два основных структурных класса тионинов: тионины класса 1 с восьмью остатками цистеина и тионины класса 2 — с шестью остатками цистеина [41]. По сравнению с другими АМП тионины обладают очень высокой ингибирующей активностью в отношении как бактериальных, так и грибных патогенов, в ряде случаев сравнимой с активностью антибиотиков [42]. Тионины синтезируются в виде предшественников, которые состоят из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого кислого домена, который также обогащен остатками цистеина, расположение которых консервативно и описывается следующей формулой: CX{3}CX{3,4}CX{4,32}CX{2,3}CX{3,4}C.

В генах предшественников тионинов выявлено два маленьких интрона в области С-концевого кислого домена [41].

Поиск последовательностей тионинов в данных секвенирования 1000 транскриптомов растений показал, что тионины значительно более распространены в растительном царстве, чем предполагалось ранее. Биоинформатический поиск позволил выявить 133 последовательности тиониноподобных пептидов у голосеменных и покрытосеменных растений, а также папоротников [41]. Тионины не были обнаружены у водорослей и мхов.

В геноме пырея обнаружен один ген предшественника тионина TeThi1, содержащий два интрона в области С-концевого домена (см. Приложение). Он расположен на хромосоме 1Е. Как и предшественники тионинов других видов растений, TeThi1 имеет трехдоменную структуру и состоит из сигнального пептида, зрелого пептида и С-концевого продомена. Зрелый тионин содержит восемь консервативно расположенных остатков цистеина, а С-концевой домен, необходимый для транспорта пептида в вакуоль, — шесть (см. рис. 2, в). Сходство последовательностей предшественника TeThi1 с предшественником альфа-2-пуротионина пшеницы *T. aestivum* составляет 91%. В области зрелого пептида шесть замен, из которых три являются консервативными. Антимикробная активность альфа-2-пуротионина пшеницы *T. aestivum* высокая [43, 44], поэтому можно предположить, что и у тионина пырея она высокая, хотя это предположение нуждается в экспериментальной проверке.

Неспецифические липид-переносящие белки

Неспецифические липид-переносящие белки (lipid-transfer proteins, LTPs) обнаружены у всех наземных растений [45]. Как и тионины, эти АМП выявлены исключительно у растений. Для LTPs характерен 8-Цис-мотив: CX{6,15}CX{9,31}CCX{8,21}

1	140
TelTP1.1	MAPITRRANILVVGILASAAVAADAVEAEAFQVSCDAVSAIIPGSGFLVAVAGAPSESCHGAQGLRRILAGTGGARRALCRGLEQSGSPS--FGVLDPDRARQLFALCKLGISIP--VSPHTCDKIP
TelTP1.53	MTPTTRYLAALAAASLFLMGLHVRVEAGPADNDCAVQATFGGCGAGVAVG-EDKLSRPGCGGLADIKDMPTFDRRALACGCHKEMVAAG-KVLARATLPAQCGVRSIFLPT-THDFCDSRIPRAD
TelTP1.60	MTPTTRSPAVVAALLLVIA--AEAGGDESQVAGTAFSGCTGVVAGL-DEEVPFCGGLGVDKILADGADQRRDLCGLLEMLAAG-KVDSGRAGLPSACGLSGVFLPT-TSPFTCSQIP
TelTP1.61	MAPACHLITATLAAARVAVALLLAGGGAEGADTSDQVAGTAFSGCTGVVAGL-DEEVPFCGGLGVDKILADGADQRRDLCGLLEMLAAG-KVDSGRAGLPSACGLSGVFLPT-TSPFTCSQIP
TelTP1.45	MSWSSSKAKASLAVLLMLAFALQGLEADMSQSGMLSDLSGLGLFQGE-EDYPSADCGGASIVAAATADROEACGLKSAAGEG--SAEATAARDLADCGGLSLEFF--TSPVDCQSG
TelTP1.48	MAPAGNCRAGSVLLVALLVLA-PRGSAALSCSTVYNTIMCGLVFGS-GAVPRAACGGLTITDILATREORRELCQVRSVMAAGNLRYGAGLGRADFIPLSPYNNHRS--ISLNIQDNR
TelTP1.46	MAPRG-AAVLAMVLAAMVAP-PATVHAATSCSTVYSTIMCGLVYVQ--GSGPARGCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.43	MARQVLMGVALVLMIAAVP-R-AAVADCGHVDLVRCPGLSVG--GPGSPGCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.32	MARVALVIVFTVLAALAV-AKESAGAVTCDVSTAIAPCMSTATGQ-ASAPSGCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.35	MARLSKAVVAARVLAALVMAA-GEASAGAVTCDVSTAIAPCMSTATGQ-ASAPSGCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.2	MAARRAHAAATLALLVALLVLAAP-APAGAVANCGQVSYLAPCISYAMGR-VSPFGGCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.22	MARAAANTIVVALLVALLVLAH-T-ADAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.19	MARTATKLVLLVALLVALLVLA--DAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.10	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.11	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.12	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.9	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.14	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.15	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.16	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.17	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.18	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.20	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
TelTP1.21	MARSVAQVVVLAALVLAALAA--EAATSCQVNSALGPGCLTYARG--GAGPSAVCGGGLTQNLKASANNSPDRRTICGLKNVANGS-GPYITRAALPSKCNVALPYK--TSPVDCQSG
1	116
TelTP2.1	MAAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.10	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.4	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.20	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.26	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.29	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.30	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.31	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.32	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.33	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.34	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.35	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.36	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.37	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.41	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.42	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP2.40	MAASKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
1	181
TelTP4.1.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.1.2	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.1.7	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.8.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.9.6	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.9.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.8.7	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.8.8	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.12.2	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.7.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.6.8	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.6.6	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.6.7	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.6.4	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.6.4	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.6.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP4.6.5	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
1	229
TelTP6.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.12	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.1.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.11.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.11.8	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.11.5	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.1.8	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.9	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.10	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.9	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.9	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.9	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.14	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.14	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.14	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
1	162
TelTP6.5.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC
TelTP6.6.1	MAKATLVCFMIVAVAAALLAAP-----GAVEAATCPTPTLTFCAPAIIGNAAPSAAACCGKLAHPASCCCKYKDPNLQRYVNSPENGKVFPAACKVRLPFC

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей липид-переносящих белков *Th. elongatum*. Консервативные аминокислотные остатки выделены серым цветом. Остатки цистеина в зрелом пептиде выделены белым цветом на черном фоне. Типы сходных пептидов разделены пустой строкой.

СХСХ{13,35}СХ{5,18}С [46]. В молекулах LTP есть гидрофобная полость, за счет которой происходят связывание и перенос липидов. Существуют несколько типов классификаций LTPs: первая, подразделяющая LTPs на два семейства в зависимости от молекулярной массы (9 или 7 кДа), сменялась классификациями, учитывавшими расстояние между остатками цистеина, а также число и расположение интронов [45]. LTPs кодируются мультигенными семействами, насчитывающими десятки членов у одного вида, и синтезируются в виде предшественников, которые состоят из

сигнального и зрелого пептидов [47]. У некоторых LTPs в С-концевой области молекулы есть так называемый GPI-якорь. Недавние исследования выявили роль LTPs с GPI-якорем в защите от нехозяиных грибных патогенов и синтезе суберина, воска и спорополленина [48,49]. LTPs являются полифункциональными белками. Они участвуют в защите от биотического и абиотического стрессов, синтезе полимеров клеточной стенки, в развитии семян, прорастании, элонгации клеток и образовании клубеньков [45, 50–52].

В геноме пырея найдено 78 генов предшественников неспецифических липид-переносящих белков (рис. 3, Приложение). Как и у других видов покрытосеменных растений, у пырея это наиболее многочисленная группа цистеин-богатых пептидов. По разработанной нами ранее классификации LTPs пырея относятся к различным структурным типам: 1, 2, D, G и X [53]. Среди них есть полипептиды, содержащие GPI-якорь (тип G) и не содержащие его (типы 1, 2, D, X). Гены LTP расположены во всех хромосомах пырея. Однако распределены они по хромосомам неравномерно. Гены пептидов типа G расположены преимущественно на хромосоме 5E, большая часть генов LTP типа 1 — на 3E, типа 2 — на 1E и 4E, а типа D — на 2E. Гены LTP X расположены на хромосоме 4E. В девяти генах LTP, пять из которых относятся к генам LTP 1, обнаружен один интрон, в десяти генах — два интрона, причем все эти гены кодируют LTP G. Также в гене еще одного представителя этого типа *TeLTPg11.5* было найдено три интрона. Только гены LTP 2 не имели интронов. Большая часть LTPs пырея положительно заряжена (см. Приложение). Эти LTPs предположительно обладают антимикробными свойствами. Напротив, отрицательно заряженные LTPs, вероятнее всего, выступают в качестве сигнальных молекул, регулирующих иммунный ответ растения. Анализ с помощью программы CAMPR4 показал, что все LTPs, кроме трех пептидов, являются антимикробными (см. Приложение).

Пептиды семейства RALF

Пептиды семейства RALF (rapid alkalization factor) относятся к регуляторным цистеин-богатым пептидам. Они получили свое название благодаря их способности вызывать быстрое защелачивание среды в культуре клеток табака [54]. Пептиды RALF образуются из С-концевой области препробелка в результате протеолитического процессинга. Они участвуют в регуляции роста и развития, а также в передаче сигнала, регулирующего взаимодействия растение — патоген при патоген-индуцируемом иммунном ответе (PTI) [55, 56].

В геноме пырея выявлено 10 генов предшественников пептидов RALF (см. рис. 2, з, Приложение). У всех обнаружен сайт протеолитического расщепления RR, необходимый для образования зрелого пептида из С-концевой области предшественника. Гены предшественников RALF пырея находятся на хромосомах 1E, 2E, 3E, 4E и 5E. Все предшественники RALF пырея обладают высокой степенью сходства последовательностей (83–99%) с пептидами семейства RALF родственных видов родов *Triticum*, *Aegilops* и *Hordeum* (см. Приложение). Для всех пептидов RALF, кроме TeRALF1, предсказано наличие антимикробных свойств.

Пептиды семейства MEG

Гены семейства MEG (maternally expressed gene) обнаружены у многих видов злаков. Первый изученный у кукурузы ген *MEG1* экспрессируется в базальном слое транспортных клеток эндосперма и кодирует предшественник MEG1, который состоит из сигнального пептида и зрелого пептида. Зрелый пептид содержит восемь остатков цистеина, образующих следующий мотив: CX{4,9}CX{4,12}CXCCX{4,10}CX{6,12}CX{3}C [57]. Роль пептидов семейства MEG изучена слабо. Предполагают, что они могут выступать как структурные, защитные или транспортные белки.

В геноме пырея найдено три гена предшественников пептидов MEG, которые по цистеиновому мотиву сходны с пептидами семейства MEG кукурузы MEG1 и MEG2-like (см. рис. 2, д, Приложение). Гены предшественников MEG пырея находятся на хромосомах 2E, 5E и 6E. Все они обладают наибольшим сходством последовательностей с неохарактеризованными белками родственных видов родов *Triticum* и *Aegilops*. Степень идентичности последовательностей составляет 62–96%. У двух пептидов TeMEG1 и TeMEG2 предсказано наличие антимикробных свойств (см. Приложение).

Пептиды семейства Ole e 1

Пептиды семейства Ole e 1 являются основными аллергенами пыльцы оливы *O. europaea* [58]. На долю Ole e 1 может приходиться до 20% от общего белка пыльцы [59]. Этот низкомолекулярный белок содержит шесть консервативно расположенных остатков цистеина и обладает сходством последовательности с белками пыльцы других видов растений, таких как кукуруза, рис, береза и арабидопсис. Роль этих полипептидов неизвестна. Полагают, что они участвуют в процессах роста пылевой трубки [60].

В геноме пырея найдено три гена предшественников полипептидов Ole e 1, по одному в хромосомах 1E, 2E и 3E (см. рис. 2, е, Приложение). Во всех генах Ole e 1 пырея обнаружен интрон в области зрелого пептида. Полипептиды пырея обладают максимальным сходством с белками семейства Ole e 1 *Aegilops tauschii* subsp. *stragulata* (98–99%). Два пептида из трех являются кислыми, а один высокоосновным, при этом антимикробная активность предсказана для всех пептидов Ole e 1 (см. Приложение).

Цистеин-богатые пептиды с новым мотивом

В геноме пырея найдено девять генов предшественников пептидов TeCRP1–6 с новым цистеиновым мотивом: CX{3}CX{3}CX{8}CX{3}CX{3}C (см. рис. 2, ж, Приложение). Они высоко гомологичны, отличаясь единичными аминокислотными

заменами. Кроме того, было обнаружено, что четыре гена кодируют идентичный по аминокислотной последовательности продукт — TeCRP2. Гены *TeCRP1–6* локализованы в хромосоме 5E. Кодируемые ими слабощелочные пептиды имеют максимальное сходство с неохарактеризованными белками *Ae. tauschii* (см. Приложение). Антимикробные свойства у этих пептидов, по всей видимости, отсутствуют. Функции этих пептидов остаются неизвестными.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пырей *Th. elongatum* — дикорастущий злак, который обладает высокой устойчивостью к патогенам и абиотическому стрессу. Механизмы устойчивости пырея к разным видам стресса слабо изучены. В литературе имеются данные о генах устойчивости пырея, “узнающих” факторы вирулентности патогенов и обеспечивающих расоспецифическую устойчивость по типу ETI. Так, было установлено, что длинное плечо хромосомы 7 (7EL) *Th. elongatum* несет участок с локусом высокоэффективной устойчивости к фузариозу колоса (*fusarium head blight*, FHB) [61, 62], в нем также находятся локусы устойчивости к листовую (Lr19 и Lr29) и стеблевой (Sr25 и Sr43) ржавчине [63, 64]. Всего в геноме *Th. elongatum* было аннотировано 1897 аналогов генов устойчивости [14]. Помимо устойчивости к патогенам, *Th. elongatum* является также источником устойчивости к абиотическим стрессовым факторам среды, таким как низкие температуры, переувлажнение и засоление почв. В частности, было показано, что в хромосоме 2E расположены локусы устойчивости к переувлажнению, а в хромосоме 3E — локусы солеустойчивости.

В отличие от ETI факторы устойчивости, связанные с PTI, такие как защитные белки и пептиды, у пырея не изучены. Цель настоящей работы состояла в поиске *in silico* всего комплекса генов защитных пептидов в геноме диплоидного вида пырея *Th. elongatum*, который несет базовый для этого рода геном E ($2n = 2x = 14$, EE) [65]. Выявление всего пула генов защитных пептидов у пырея представляло интерес, с одной стороны, для характеристики молекулярных компонентов иммунной системы у этого вида, что послужит базой для дальнейшего исследования механизмов устойчивости. С другой стороны, эти исследования необходимы для научно обоснованного практического использования *Th. elongatum* в качестве донора устойчивости в селекции пшеницы, что приобретает в последнее время особую актуальность. На фоне быстрого роста населения земного шара необходимо увеличение производства пшеницы. Это увеличение может быть достигнуто в основном за счет повышения урожайности с помощью интегрированных методов борьбы с болезнями и вредителями и повышения устойчивости к абиотическим

стрессам. Ежегодно около 20% урожая пшеницы теряется из-за болезней [66]. Абиотический стресс, вызванный засухой, засоленностью почвы и загрязнением тяжелыми металлами, также существенно снижает продуктивность этой важнейшей сельскохозяйственной культуры.

Для поиска генов антимикробных и сигнальных пептидов в геноме пырея мы использовали разработанный ранее алгоритм поиска по цистеиновым мотивам, характерным для различных семейств цистеин-богатых пептидов [15].

В результате в геноме пырея нами выявлено 154 гена антимикробных и сигнальных пептидов (см. Приложение). Следует отметить, что число генов пептидов различных семейств видоспецифично и различается у разных видов растений [13]. Обнаруженные нами в геноме пырея гены кодируют пептиды следующих семейств: дефензины, LTPs, снакины, гевеиноподобные пептиды, тионины, пептиды семейств MEG, Ole e 1 и RALF. Обнаружено также новое семейство генов пептидов CRP с ранее неизвестным 6-Цис-мотивом, функции которых еще предстоит изучить. Поиск сходных последовательностей с помощью программ BLAST показал, что пептиды пырея обладают максимальным сходством с пептидами растений семейства мятликовые, прежде всего относящихся к родам *Triticum* и *Aegilops* (см. Приложение). Этот результат согласуется с цитогенетическими данными о наибольшем из всех злаков сходстве генома E пырея с геномом D *Ae. tauschii* [67, 68].

Самое многочисленное семейство генов пептидов у пырея представлено генами LTP (78). Следующим по численности семейством оказались дефензины (39). Эти данные согласуются с литературными данными о численном преобладании генов LTP и дефензинов в геномах растений [13, 53, 69, 70].

Гены антимикробных и сигнальных пептидов обнаружены во всех семи хромосомах пырея (рис. 4). Однако обогащенность генами пептидов для разных хромосом пырея различается. Больше всего генов пептидов выявлено в хромосоме 5E (34), а меньше всего — в хромосоме 6E (7) (рис. 5). Гены пептидов распределены по хромосомам неравномерно, встречаются обогащенные и бедные генами пептидов участки (см. рис. 4 и 5). Для многих хромосом пырея генами пептидов обогащены области, примыкающие к теломерным районам. Гены пептидов отдельных семейств также распределены по хромосомам неравномерно (см. рис. 5). Гены DEFL и LTP находятся на всех хромосомах. Напротив, гены цистеин-богатых пептидов CRP с новым мотивом локализованы только на хромосоме 5E. Гены снакинов не обнаружены в хромосоме 3E. Гены RALFs не найдены в хромосомах 6E и 7E.

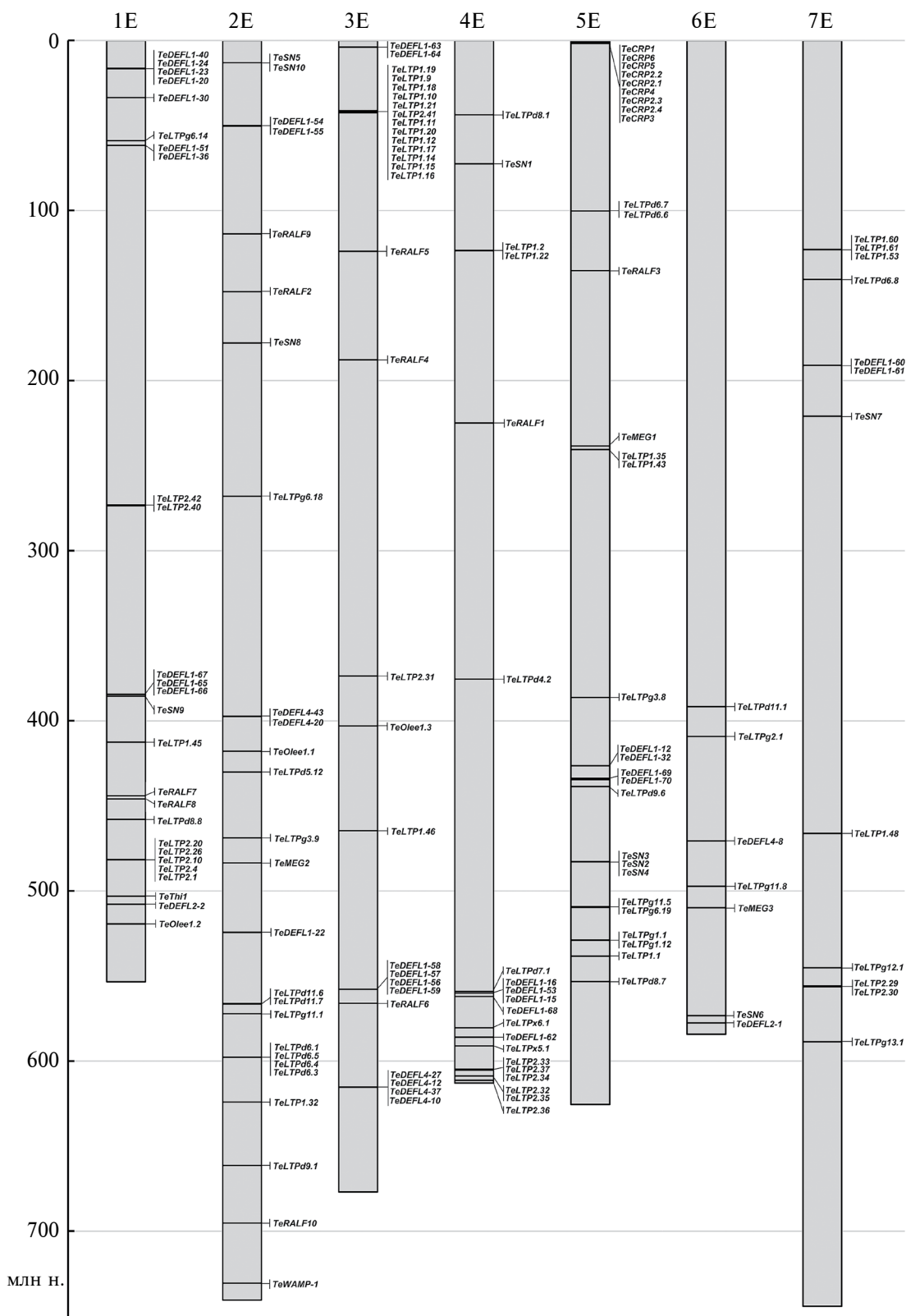


Рис. 4. Карта расположения генов АМП и сигнальных пептидов на хромосомах *Th. elongatum*.

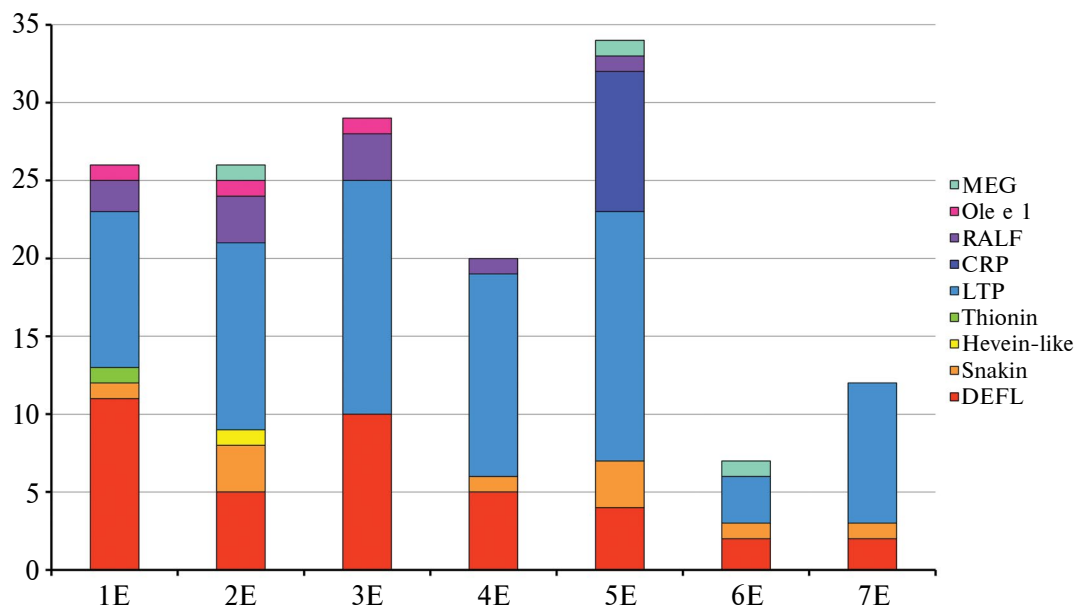


Рис. 5. Распределение генов АМП и сигнальных пептидов по хромосомам пырея. Snakin — снакин, Hevein-like — гевеиноподобный пептид, Thionin — тионин.

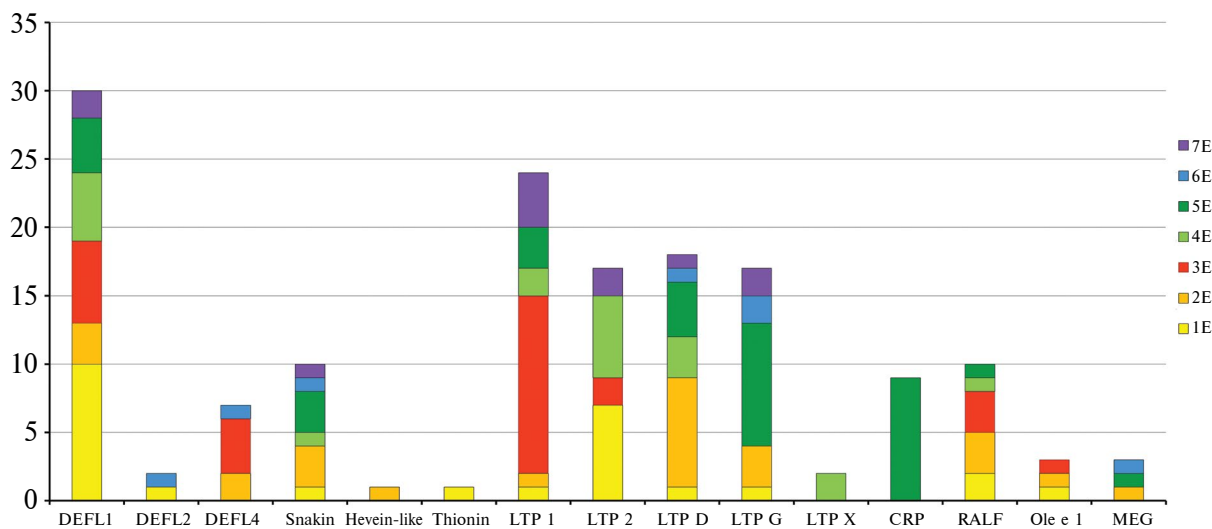


Рис. 6. Представленность генов пептидов разных подгрупп в хромосомах пырея. Snakin — снакин, Hevein-like — гевеиноподобный пептид, Thionin — тионин.

Интересно распределение по хромосомам пырея генов различных подсемейств пептидов (рис. 6). Так, гены “классических” дефензинов расположены на всех хромосомах, кроме 6Е. Гены дефензинов с 4-Цис-мотивом находятся только на трех хромосомах 2Е, 3Е и 6Е. Подавляющее число генов LTP 1 находится на хромосоме 3Е; гены LTP 2, за единичными исключениями, — на хромосомах 1Е и 4Е; гены LTP D — на хромосомах 2Е, 4Е, 5Е;

гены типа LTP G — преимущественно на хромосоме 5Е. В ряде случаев гены пептидов одного семейства образуют кластеры, кодирующие сходные по последовательности пептиды, что свидетельствует о том, что они возникли в результате тандемных дупликаций (см. рис. 4). К таким кластерам относятся, например, кластер генов дефензинов, кодирующих TeDEFL1-20, -23, 24, -40, на хромосоме 1Е (см. рис. 1 и 4); кластер генов LTP 1 на хромосоме

3Е, кластер генов LTP D подтип 6 на хромосоме 2Е (см. рис. 3 и 4). Гены снакинов, кодирующие близкородственные пептиды TeSN2, 3 и 4, а также гены цистеин-богатых пептидов CRP с новым мотивом образуют отдельные кластеры на хромосоме 5Е (см. рис. 2 и 4).

Таким образом, в геноме диплоидного вида *Th. elongatum* нами выявлено 154 новых гена цистеин-богатых пептидов, относящихся к девяти семействам. Изучена локализация генов пептидов в хромосомах пырея. Дальнейшие исследования биологической активности обнаруженных пептидов с использованием трансгенных технологий и тестирования *in vitro* позволят понять их роль в защите от стресса, а также в других физиологических процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-16-00010 (М.П. Слезина, Е.А. Истомина, Т.И. Одинцова) и государственного задания № 122022600163-7 (А.Н. Шиян).

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dodds P., Rathjen J. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 539–548. doi: 10.1038/nrg2812.
2. Zou F., Tan C., Shinali T.S. et al. Plant antimicrobial peptides: A comprehensive review of their classification, production, mode of action, functions, applications, and challenges // *Food Funct.* 2023. V. 14. № 12. P. 5492–5515. doi: 10.1039/d3fo01119d
3. Li J., Hu S., Jian W. et al. Plant antimicrobial peptides: structures, functions, and applications // *Bot. Stud.* 2021. V. 62. № 1. 5. doi: 10.1186/s40529-021-00312-x
4. Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L. Antimicrobial peptides from plants // *Pharmaceuticals*. 2015. V. 8. № 4. P. 711–757. doi: 10.3390/ph8040711
5. Bolouri Moghaddam M.R., Vilcinskis A., Rahnamaeian M. Cooperative interaction of antimicrobial peptides with the interrelated immune pathways in plants // *Mol. Plant Pathol.* 2016. V. 17. № 3. P. 464–471. doi: 10.1111/mpp.12299
6. Campos M.L., de Souza C.M., de Oliveira K.B.S. et al. The role of antimicrobial peptides in plant immunity // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. № 21. P. 4997–5011. doi: 10.1093/jxb/ery294
7. Hu Z., Zhang H., Shi K. Plant peptides in plant defense responses // *Plant Signal. Behav.* 2018. V. 13. № 8. doi: 10.1080/15592324.2018.1475175
8. Xie H., Zhao W., Li W. et al. Small signaling peptides mediate plant adaptations to abiotic environmental stress // *Planta*. 2022. V. 255. № 4. 72. doi: 10.1007/s00425-022-03859-6
9. Marmiroli N., Maestri E. Plant peptides in defense and signaling // *Peptides*. 2014. V. 56. P. 30–44. doi: 10.1016/j.peptides.2014.03.013
10. Yamaguchi K., Kawasaki T. Pathogen- and plant-derived peptides trigger plant immunity // *Peptides*. 2021. V. 144. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170611
11. Tavormina P., De Coninck B., Nikonorova N. et al. The plant peptidome: An expanding repertoire of structural features and biological functions // *Plant Cell*. 2015. V. 27. № 8. P. 2095–2118. doi: 10.1105/tpc.15.00440
12. Silverstein K.A., Graham M.A., Paape T.D. et al. Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. № 2. P. 600–610. doi: 10.1104/pp.105.060079
13. Silverstein K.A., Moskal W.A. Jr., et al. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants // *Plant J.* 2007. V. 51. № 2. P. 262–280. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x
14. Коростылева Т.В., Шиян А.Н., Одинцова Т.И. Генетический ресурс пырея *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey в селекционном улучшении пшеницы // *Генетика*. 2023. Т. 59. № 10. С. 1112–1119. doi: 10.31857/S0016675823100077
15. Slezina M.P., Istomina E.A., Korostyleva T.V. et al. Molecular insights into the role of cysteine-rich peptides in induced resistance to *Fusarium oxysporum* infection in tomato based on transcriptome profiling // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 11. doi: 10.3390/ijms22115741.
16. Teufel F., Almagro Armenteros J.J., Johansen A.R. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models // *Nat. Biotechnol.* 2022. V. 40. P. 1023–1025. doi: 10.1038/s41587-021-01156-3
17. Gawde U., Chakraborty S., Waghu F.H. et al. CAMPR4: A database of natural and synthetic antimicrobial peptides // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. P. D377–D383. doi: 10.1093/nar/gkac933.
18. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server // *The Proteomics Protocols Handbook* / Ed. John M. Walker. USA: Humana Press, 2005. P. 571–607.
19. Eisenhaber B., Wildpaner M., Schultz C.J. et al. Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins. Sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for *Arabidopsis* and rice // *Plant Physiol.* 2003. V. 133. P. 1691–1701. doi: 10.1104/pp.103.023580.
20. Parisi K., Shafee T.M.A., Quimbar P. et al. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019. V. 88. P. 107–118. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.004

21. Lay F.T., Anderson M.A. Defensins – components of the innate immune system in plants // *Curr. Protein and Pept. Sci.* 2005. V. 6. № 1. P. 85–101. doi: 10.2174/1389203053027575.
22. Cools T.L., Struyfs C., Cammue B.P., Thevissen K. Antifungal plant defensins: Increased insight in their mode of action as a basis for their use to combat fungal infections // *Future Microbiol.* 2017. V. 12. P. 441–454. doi: 10.2217/fmb-2016-0181
23. Sathoff A.E., Samac D.A. Antibacterial activity of plant defensins // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2019. V. 32. № 5. P. 507–514. doi: 10.1094/MPMI-08-18-0229-CR
24. Mirouze M., Sels J., Richard O. et al. A putative novel role for plant defensins: A defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance // *Plant J.* 2006. V. 47. № 3. P. 329–342. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02788.x
25. Sasaki K., Kuwabara C., Umeki N. et al. The cold-induced defensin TAD1 confers resistance against snow mold and *Fusarium* head blight in transgenic wheat // *J. Biotechnol.* 2016. V. 228. P. 3–7. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.015
26. Stotz H.U., Spence B., Wang Y. A defensin from tomato with dual function in defense and development // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 71. № 1–2. P. 131–143. doi: 10.1007/s11103-009-9512-z
27. Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. et al. Defensin-like peptides in wheat analyzed by whole-transcriptome sequencing: A focus on structural diversity and role in induced resistance // *PeerJ.* 2019. V. 7. doi: 10.7717/peerj.6125
28. Slezina M.P., Istomina E.A., Kulakovskaya E.V. et al. The γ -core motif peptides of AMPs from grasses display inhibitory activity against human and plant pathogens // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 15. doi: 10.3390/ijms23158383
29. Segura A., Moreno M., Madueño F. et al. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1999. V. 12. № 1. P. 16–23. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.1.16
30. Nahirñak V., Almasia N.I., Fernandez P.V. et al. Potato snakin-1 gene silencing affects cell division, primary metabolism, and cell wall composition // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. № 1. P. 252–263. doi: 10.1104/pp.111.186544
31. Zhang S., Yang C., Peng J. et al. *GAS45*, a regulator of flowering time and stem growth in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69. P. 745–759. doi: 10.1007/s11103-009-9452-7
32. Oliveira-Lima M., Benko-Iseppon A.M., Neto J.R.C.F. et al. Snakin: Structure, roles and applications of a plant antimicrobial peptide // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2017. V. 18. № 4. P. 368–374. doi: 10.2174/1389203717666160619183140
33. Berrocal-Lobo M., Segura A., Moreno M. et al. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. № 3. P. 951–961. doi: 10.1104/pp.010685
34. Meiyalaghan S., Thomson S.J., Fiers M.W. et al. Structure and expression of *GSL1* and *GSL2* genes encoding gibberellin stimulated-like proteins in diploid and highly heterozygous tetraploid potato reveals their highly conserved and essential status // *BMC Genomics.* 2014. V. 15. 2. doi: 10.1186/1471-2164-15-2
35. Iqbal A., Khan R.S. Snakins: Antimicrobial potential and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants // *Mol. Biol. Rep.* 2023. V. 50. № 10. P. 8683–8690. doi: 10.1007/s11033-023-08734-5
36. Slavokhotova A.A., Shelenkov A.A., Andreev Y.A., Odintsova T.I. Hevein-like antimicrobial peptides of plants // *Biochemistry (Mosc).* 2017. V. 82. № 13. P. 1659–1674. doi: 10.1134/S0006297917130065
37. Slavokhotova A.A., Naumann T.A., Price N.P. et al. Novel mode of action of plant defense peptides – hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metalloproteases // *FEBS J.* 2014. V. 281. № 20. P. 4754–4764. doi: 10.1111/febs.13015
38. Van den Bergh K.P., Rougé P., Proost P. et al. Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) // *Planta.* 2004. V. 219. № 2. P. 221–232. doi: 10.1007/s00425-004-1238-1
39. Loo S., Tay S.V., Kam A. et al. Anti-fungal hevein-like peptides biosynthesized from quinoa cleavable hololactins // *Molecules.* 2021. V. 26. № 19. doi: 10.3390/molecules26195909
40. Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A. et al. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // *FEBS J.* 2009. V. 276. № 15. P. 4266–4275. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07135.x
41. Höng K., Austerlitz T., Bohlmann T., Bohlmann H. The thionin family of antimicrobial peptides // *PLoS One.* 2021. V. 16. № 7. doi: 10.1371/journal.pone.0254549
42. Oard S., Rush M.C., Oard J.H. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani* // *J. Appl. Microbiol.* 2004. V. 97. № 1. P. 169–180. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02291.x
43. Molina A., Ahl Goy P., Fraile A. et al. Inhibition of bacterial and fungal plant pathogens by thionins of types I and II // *Plant Science.* 1993. V. 92. № 2. P. 169–177. doi: 10.1016/0168-9452(93)90203-C
44. Terras F., Schoofs H., Thevissen K. et al. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors // *Plant Physiol.* 1993. V. 103. № 4. P. 1311–1319. doi: 10.1104/pp.103.4.1311

45. Salminen T.A., Blomqvist K., Edqvist J. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function // *Planta*. 2016. V. 244. № 5. P. 971–997. doi: 10.1007/s00425-016-2585-4
46. Kader J.C. Lipid-transfer proteins in plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1996. V. 47. P. 627–654. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.627
47. Santos-Silva C.A.D., Ferreira-Neto J.R.C., Amador V.C. et al. From gene to transcript and peptide: A deep overview on non-specific lipid transfer proteins (nsLTPs) // *Antibiotics (Basel)*. 2023. V. 12. № 5. 939. doi: 10.3390/antibiotics12050939
48. Fahlberg P., Buhot N., Johansson O.N., Andersson M.X. Involvement of lipid transfer proteins in resistance against a non-host powdery mildew in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Plant Pathol.* 2019. V. 20. № 1. P. 69–77. doi: 10.1111/mpp.12740
49. Edstam M.M., Blomqvist K., Eklöf A. et al. Coexpression patterns indicate that GPI-anchored non-specific lipid transfer proteins are involved in accumulation of cuticular wax, suberin and sporopollenin // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 83. № 6. P. 625–649. doi: 10.1007/s11103-013-0113-5
50. Yang Y., Li P., Liu C. et al. Systematic analysis of the non-specific lipid transfer protein gene family in *Nicotiana tabacum* reveal its potential roles in stress responses // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 172. P. 33–47. doi: 10.1016/j.plaphy.2022.01.002
51. Liu F., Zhang X., Lu C. et al. Non-specific lipid transfer proteins in plants: Presenting new advances and an integrated functional analysis // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. № 19. P. 5663–5681. doi: 10.1093/jxb/erv313
52. Missaoui K., Gonzalez-Klein Z., Pazos-Castro D. et al. Plant non-specific lipid transfer proteins: An overview // *Plant Physiol. Biochem.* 2022. V. 171. P. 115–127. doi: 10.1016/j.plaphy.2021.12.026
53. Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. et al. Non-specific lipid transfer proteins in *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: Identification, characterization and expression profiling in response to pathogens and resistance inducers // *Pathogens*. 2019. V. 8. № 4. 221. doi: 10.3390/pathogens8040221
54. Pearce G., Moura D.S., Stratmann J., Ryan C.A. Jr. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 22. P. 12843–12847. doi: 10.1073/pnas.201416998
55. Blackburn M.R., Haruta M., Moura D.S. Twenty years of progress in physiological and biochemical investigation of RALF peptides // *Plant Physiol.* 2020. V. 182. № 4. P. 1657–1666. doi: 10.1104/pp.19.01310
56. Stegmann M., Monaghan J., Smakowska-Luzan E. et al. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling // *Science*. 2017. V. 355. № 6322. P. 287–289. doi: 10.1126/science.aal2541
57. Gutiérrez-Marcos J.F., Costa L.M., Biderre-Petit C. et al. Maternally expressed gene1 Is a novel maize endosperm transfer cell-specific gene with a maternal parent-of-origin pattern of expression // *Plant Cell*. 2004. V. 16. № 5. P. 1288–1301. doi: 10.1105/tpc.019778
58. Villalba M., Batanero E., López-Otín C. et al. The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 216. № 3. P. 863–869. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18208.x
59. Castro A.J., de Dios Alché J., Cuevas J. et al. Pollen from different olive tree cultivars contains varying amounts of the major allergen Ole e 1 // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003. V. 131. № 3. P. 164–173. doi: 10.1159/000071482
60. De Dios Alché J., M'rani-Alaoui M., Castro A.J., Rodríguez-García M.I. Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during *in vitro* germination // *Plant Cell. Physiol.* 2004. V. 45. № 9. P. 1149–1157. doi: 10.1093/pcp/pch127
61. Han F.P., Fedak G. Molecular characterization of partial amphiploids from *Triticum durum* × tetraploid *Thinopyrum elongatum* as novel source of resistance to wheat *Fusarium* head blight // *Proc. 10th Int. Wheat Genet. Symp. Paestum*. 2003. P. 1148–1150.
62. Miller S.S., Watson E.M., Lazebnik J. et al. Characterization of an alien source of resistance to *Fusarium* head blight transferred to Chinese spring wheat // *Botany*. 2011. V. 89. P. 301–311. doi: 10.1139/b11-017
63. Ceoloni C., Forte P., Kuzmanović L. et al. Cytogenetic mapping of a major locus for resistance to *Fusarium* head blight and crown rot of wheat on *Thinopyrum elongatum* 7EL and its pyramiding with valuable genes from a *Th. ponticum* homoeologous arm onto bread wheat 7DL // *Theor. Appl. Genet.* 2017. V. 130. P. 2005–2024. doi: 10.1007/s00122-017-2939-8
64. Konkin D., Hsueh Y.C., Kirzinger M. et al. Genomic sequencing of *Thinopyrum elongatum* chromosome arm 7EL, carrying fusarium head blight resistance, and characterization of its impact on the transcriptome of the introgressed line CS-7EL // *BMC Genomics*. 2022. V. 23. № 1. 228. doi: 10.1186/s12864-022-08433-8
65. Wang R.R., Larson S.R., Jensen K.B. et al. Genome evolution of intermediate wheatgrass as revealed by EST-SSR markers developed from its three progenitor diploid species // *Genome*. 2015. V. 58. № 2. P. 63–70. doi: 10.1139/gen-2014-0186
66. Singh J., Chhabra B., Raza A. et al. Important wheat diseases in the US and their management in the 21st century // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 13. doi: 10.3389/fpls.2022.1010191
67. Liu Z., Li D., Zhang X. Genetic relationships among five basic genomes St, E, A, B and D in Triticeae

- revealed by genomic southern and *in situ* hybridization // J. Integr. Plant Biol. 2007. V. 49. № 7. P. 1080–1086. doi: 10.1111/j.1672-9072.2007.00462.x
68. Gaál E., Valárik M., Molnár I. *et al.* Identification of COS markers for *Thinopyrum elongatum* chromosomes preliminary revealed high level of macrosyntenic relationship between the wheat and *Th. elongatum* genomes // PLoS One. 2018. V. 13. № 12. doi: 10.1371/journal.pone.0208840.
69. Ke T., Cao H., Huang J. *et al.* EST-based *in silico* identification and *in vitro* test of antimicrobial peptides in *Brassica napus* // BMC Genomics. 2015. V. 16. № 1. 653. doi: 10.1186/s12864-015-1849-x
70. Tian D., Xie Q., Deng Z. *et al.* Small secreted peptides encoded on the wheat (*Triticum aestivum* L.) genome and their potential roles in stress responses // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. doi: 10.3389/fpls.2022.1000297

Cysteine-Rich Peptide Genes of Wheatgrass *Thinopyrum elongatum*

M. P. Slezina^a, E. A. Istomina^a, A. N. Shiyan^a, T. I. Odintsova^{a,*}

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: odintsova2005@rambler.ru

Cysteine-rich peptides play an important role in the plant defense system. The aim of the present work was to search *in silico* for genes encoding antimicrobial and signaling peptides in the genome of *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R. Dewey ($2n = 14$, EE) – a wild grass species with high resistance to pathogens and abiotic stress. Bioinformatic analysis revealed 154 new genes of antimicrobial and signaling peptide precursors belonging to 9 families in *Th. elongatum* genome. Introns were detected in a number of cysteine-rich peptide genes. The structure of peptide precursors and localization of peptide genes in wheat chromosomes were determined. The greatest similarity of the sequences of *Th. elongatum* peptides with homologous peptides of plants of the genera *Triticum* and *Aegilops* was shown, which confirms the cytogenetic data on the relatedness of genome E with genome D and similar genomes. The results obtained contribute to the characterization of molecular components of the immune system of *Th. elongatum* and will serve as a basis for further studies of resistance mechanisms, as well as for scientifically justified practical use of this species as a resistance donor in wheat breeding.

Keywords: plant immunity, *Thinopyrum elongatum*, cysteine-rich peptides, gene biodiversity.

УДК 574.9 + 575.174.015.3

**ОСОБЕННОСТИ ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ
И ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА
D. cristata Sars И *D. longiremis* Sars
(Anomopoda: Daphniidae) В СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ¹**

© 2024 г. Е. И. Зуйкова^{1, 2*}, Л. П. Слепцова¹, Л. В. Андреева^{3, 1},
Я. А. Кучко⁴, Н. А. Бочкарев^{1, 2}, Е. С. Захаров⁵

¹Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630091 Россия

²Санкт-Петербургский филиал Всероссийского научно-исследовательского
института рыбного хозяйства и океанографии им. Л.С. Берга, Санкт-Петербург, 199053 Россия

³Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук,
Якутск, 677007 Россия

⁴Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, 185035 Россия

⁵Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677000 Россия

*e-mail: zuykova1064@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.04.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Впервые представлены данные о популяционно-генетической структуре видов *Daphnia cristata* Sars, 1862 и *D. longiremis* Sars, 1862 (Anomopoda: Daphniidae) из водоемов Северной Евразии. На основе фрагмента митохондриального гена 12S рРНК реконструированы филогенетические отношения, связи между гаплотипами и их распространение. Полученные данные свидетельствуют о недавней быстрой пространственной экспансии *D. cristata*. Согласно результатам исследования, зоны распространения видов *D. cristata* и *D. longiremis* разделяются в широтном направлении с зарегистрированной зоной их контакта в Центральной Якутии. Результаты исследования позволяют сделать заключение о сильном влиянии климатических условий ледниковых периодов и межледниковий в позднем плейстоцене — раннем и среднем голоцене — на формирование современного генетического разнообразия и филогеографической структуры *D. cristata* и *D. longiremis*.

Ключевые слова: *Daphnia*, филогения, филогеография, Российская Федерация.

DOI: 10.31857/S0016675824100062 **EDN:** WFBDGX

Северная Евразия — обширная территория, имеющая большое значение для биогеографических и филогеографических исследований, в том числе и основывающихся на изучении разных таксонов ветвистоусых ракообразных (Cladocera). В результате комплексных морфологических и молекулярно-генетических исследований было показано, что данный регион представляет собой переходную зону между восточным и западным фаунистическими комплексами кладоцер [1–3]. К настоящему времени филогеографические исследования на разных группах кладоцер привели к созданию довольно целостной схемы формирования

их биоразнообразия в Северной Евразии [4]. Несмотря на ее надежность, подкрепленную фаунистическими и морфологическими исследованиями, для признания несомненной универсальности этой модели необходимо продолжение филогеографических работ в этом обширном регионе на как можно большем числе таксонов. Как показывает практика, расширение исследований (в географическом и таксономическом масштабах) приводит к выявлению новых митохондриальных линий и филогрупп и даже потенциально новых видов [5–8]. Кроме этого, изучение механизмов и путей формирования видового разнообразия отдельных таксонов кладоцер способствует выявлению общих закономерностей и особенностей их исторического развития. В плейстоцене фазы похолоданий

¹Дополнительные материалы размещены в электронном виде по doi статьи.

(оледенений) и потеплений климата периодически сменяли друг друга и длились довольно продолжительные периоды. Это не могло не повлиять на биоразнообразие, географическое распространение большинства таксонов кладоцер, на уровень генетического полиморфизма отдельных популяций и видов, а также на формирование современной филогеографической структуры [9–11]. Современные дистантные филогенетические линии, как правило, представляют остатки сохранившейся в ледниковых рефугиумах пресноводной фауны. Такие линии и филогруппы выявлены в пределах североазиатских таксонов группы *D. longispina* s.l., что в соответствии с палеоклиматическими данными свидетельствует о сильном влиянии как процессов дисперсии, так и викариантных событий, случавшихся в разные фазы плейстоцена [6, 7, 12]. Также было показано, что Северная Евразия, особенно юг Сибири, представляет собой источник видового и гаплотипического разнообразия кладоцер.

Сравнительный анализ уже имеющихся данных, комплексное изучение как можно большего числа видов и видовых комплексов рода *Daphnia* O.F. Müller, 1776 необходимы для выявления общих закономерностей формирования современных филогеографических паттернов и воссоздания путей их исторического развития на территории Северной Евразии. Например, до настоящего времени нет исчерпывающей информации о филогеографии, генетической структуре популяций ряда видов рода

Daphnia, которые широко распространены в Северной Евразии, особенно в арктических и субарктических водоемах: *Daphnia middendorffiana* Fischer, 1851, *D. pulex* Leydig, 1860 s.l., *D. cristata* Sars, 1862 и *D. longiremis* Sars, 1862. Между тем предварительные исследования свидетельствуют о разной эволюционной истории этих видов [7].

Цель настоящей работы заключалась в проведении более масштабного исследования особенностей популяционно-генетической структуры двух относительно холодолюбивых видов, *D. cristata* и *D. longiremis*, в Северной Евразии. На основании вновь полученных данных предполагалось описать географическое распространение гаплотипов, выявить генеалогические связи между популяциями и сделать предварительное заключение об исторических процессах, которые привели к формированию современной филогеографической структуры *D. cristata* и *D. longiremis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для данного исследования послужили пробы зоопланктона, содержащие особей *D. cristata* и *D. longiremis* из различных водоемов Северной Евразии, расположенных от Чукотки до Карелии (рис. 1, Приложение, табл. S1). Пробы фиксировали 96%-ным этанолом. Перед выделением ДНК каждую особь идентифицировали до вида и при хорошей их сохранности фотографировали



Рис. 1. Карта распределения видов *D. cristata* (синие квадраты) и *D. longiremis* (красные квадраты) на территории Северной Евразии. Сиреневым цветом выделены места совместного или близкого обитания видов. Номера соответствуют местам отбора проб в приложении табл. 1. GB1–GB4 – точки отбора проб для образцов из базы данных GenBank (NCBI).

Таблица 1. Эволюционная дивергенция (нескорректированные *p*-дистанции, %) между парами нуклеотидных последовательностей в пределах популяций и между популяциями и видами *D. cristata* и *D. longiremis* на основе фрагмента гена *12S* мтДНК. Анализ включал 109 нуклеотидных последовательностей

№	В пределах популяций	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.2 ± 0.2													
2	n/c	0.1												
3	0.2 ± 0.1	0.3	0.2											
4	0.5 ± 0.2	0.4	0.3	0.5										
5	0	0.1	0	0.2	0.3									
6	0	0.3	0.2	0.4	0.5	0.2								
7	0.3 ± 0.1	0.3	0.2	0.4	0.5	0.2	0.4							
8	0.8 ± 0.2	0.6	0.5	0.7	0.8	0.5	0.6	0.6						
9	n/c	11.1	11	11	11.3	11	10.8	11.2	11.5					
10	n/c	11.1	11	11	11.3	11	10.8	11.2	11.5	0				
11	0.4 ± 0.2	11.3	11.2	11.1	11.4	11.2	11	11.3	11.6	0.3	0.3			
12	0.6 ± 0.2	11.5	11.4	11.4	11.6	11.4	11.2	11.6	11.8	0.8	0.8	0.7		
13	0	11.1	11	11	11.3	11	10.8	11.2	11.5	0	0	0.3	0.8	
14	0.3 ± 0.2	19.4	19.3	19.4	19.5	19.3	19.1	19.4	19.5	18.9	18.9	19.1	19.6	18.9

Примечание. *D. cristata*: 1 – Швеция, Финляндия, 2 – Белоруссия, 3 – Дальний Восток, 4 – Забайкалье, 5 – оз. Глубокое, 6 – Республика Тыва, 7 – Карелия, 8 – Якутия; *D. longiremis*: 9 – Канада, 10 – Норвегия, 11 – Чукотка, 12 – Якутия, 13 – Ямало-Ненецкий АО; 14 – *D. middendorffiana* (внешняя группа). n/c – оценка эволюционных дистанций невозможна.

с помощью окулярной видеокамеры Альтами 1.3 Мпикс (Альтами, Санкт-Петербург, Россия), установленной на бинокулярный микроскоп, при увеличениях 4× и 10×.

Общую геномную ДНК выделяли из отдельно взятых особей с помощью 5%-ного раствора Chelex 100 resin (BioRad, США). Амплификацию фрагментов некодирующего *12S* рРНК гена митохондриальной ДНК (мтДНК) проводили с использованием продукта БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (2×) (компания “Биолабмикс”, Новосибирск, Россия, www.biolabmix.ru) в программируемых термостатах M111 (ООО “БИС-Н”, Новосибирск, Россия). Параметры термопрофилей и последовательности праймеров аналогичны указанным в предыдущих работах [5, 6]. ПЦР-продукты секвенировали по прямому и обратному праймерам в компании СИНТОЛ (Москва, Россия, www.syntol.ru). Полученные оригинальные нуклеотидные последовательности редактировали вручную в программе BioEdit v 7 [13] и депонировали в международную базу данных GenBank (NCBI) согласно выявленным гаплотипам под номерами: PP697986–PP698018 (см. Приложение, табл. S1). Для последующих анализов последовательности выравнивали с помощью алгоритма MAFFT v 7 в интернет-приложении <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> [14].

Реконструкция филогенетического дерева выполнена на основе фрагмента гена *12S* мтДНК (582–587 пн). В качестве внешней группы в анализе использованы нуклеотидные последовательности

D. middendorffiana, номера доступа в базе данных GenBank (NCBI) – OL333495 и OL333496. Кроме того, в анализе использовали ранее полученные последовательности *D. cristata* и *D. longiremis* из базы данных GenBank (см. Приложение, табл. S1). Выбор моделей, наилучшим образом описывающих эволюцию изучаемых последовательностей, осуществляли в программе jModelTest v 2.1.7 на основе показателей правдоподобия для 88 разных моделей и информационных критериев Акайке (AIC) и Байеса (BIC) [15, 16]. Согласно проведенному анализу, для фрагмента гена *12S* рРНК лучшими моделями были 3-параметрическая модель Тамуры с гамма-распределением (TN92+G, параметр $\alpha = 0.619$) [17] и General Time Reversible модель с гамма-распределением (GTR+G, параметр $\alpha = 0.538$) [18]. Первую модель использовали для реконструкции *12S* филогении с помощью метода максимального правдоподобия (ML) в программе MEGA v 7.0; поддержку ветвей оценивали по бутстрэп-тесту при числе репликаций 1000 [19, 20]. Вторую модель использовали при реализации байесовского анализа в программе MrBayes v 3.2 [21]. Две синхронные серии, каждая с четырьмя марковскими цепями, запускали для 1×10^6 поколений при частоте записи параметров, равной 500. Стационарность серии подтверждали с помощью мер апостериорной вероятности и логарифмического правдоподобия. Параметры эффективного размера выборки (ESS > 500) для проверки конвергенции марковских цепей и трассировочных графиков MCMC оценивали в

программе Tracer v 1.6 [22]. Визуализацию BI-филогении для фрагмента гена *12S* мтДНК выполняли в программе FigTree v 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Эволюционную дивергенцию между популяциями и видами *D. cristata* и *D. longiremis* на основе последовательностей фрагмента гена *12S* мтДНК оценивали по нескорректированным *p*-расстояниям, рассчитанным в программе MEGA v 7.0. Полиморфизм фрагмента гена *12S* мтДНК для видов *D. cristata* и *D. longiremis* и в их географических популяциях оценивали по стандартным параметрам: число полиморфных (сегрегирующих) сайтов (*S*), число гаплотипов (*h*), гаплотипическое (H_d) и нуклеотидное (π) разнообразие. Географические популяции сформированы образцами из одного и того же региона; при этом один образец *D. cristata* из Эвенкии был объединен с группой образцов из Якутии. Расчеты выполняли в программе DnaSP v 5.10 [23]. Генеалогические связи между *12S* гаплотипами видов *D. cristata* и *D. longiremis* оценивали с

помощью метода медианного связывания (MJ, Median-joining алгоритм), реализованного в программе PopART v 1.7 [24, 25]. Эволюционную историю исследуемых видов оценивали по соотношению показателей генетического полиморфизма [26, 27] (Grant, Bowen, 1998; Avise, 2000), значениям тестов на нейтральность эволюции Φ и F_s и Таджимы *D* [28, 29] и структуре сетей гаплотипов.

Приложения табл. S1 и рис. S1 доступны на портале Open Science Framework (<https://osf.io/dn2cp/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Митохондриальная филогения и эволюционная дивергенция

Топологии филогенетических деревьев, полученных с помощью разных методов — байесовского (BI) и максимальной экономии (ML), существенно не различались (рис. 2; Приложение, рис. S1). Нуклеотидные последовательности фрагмента

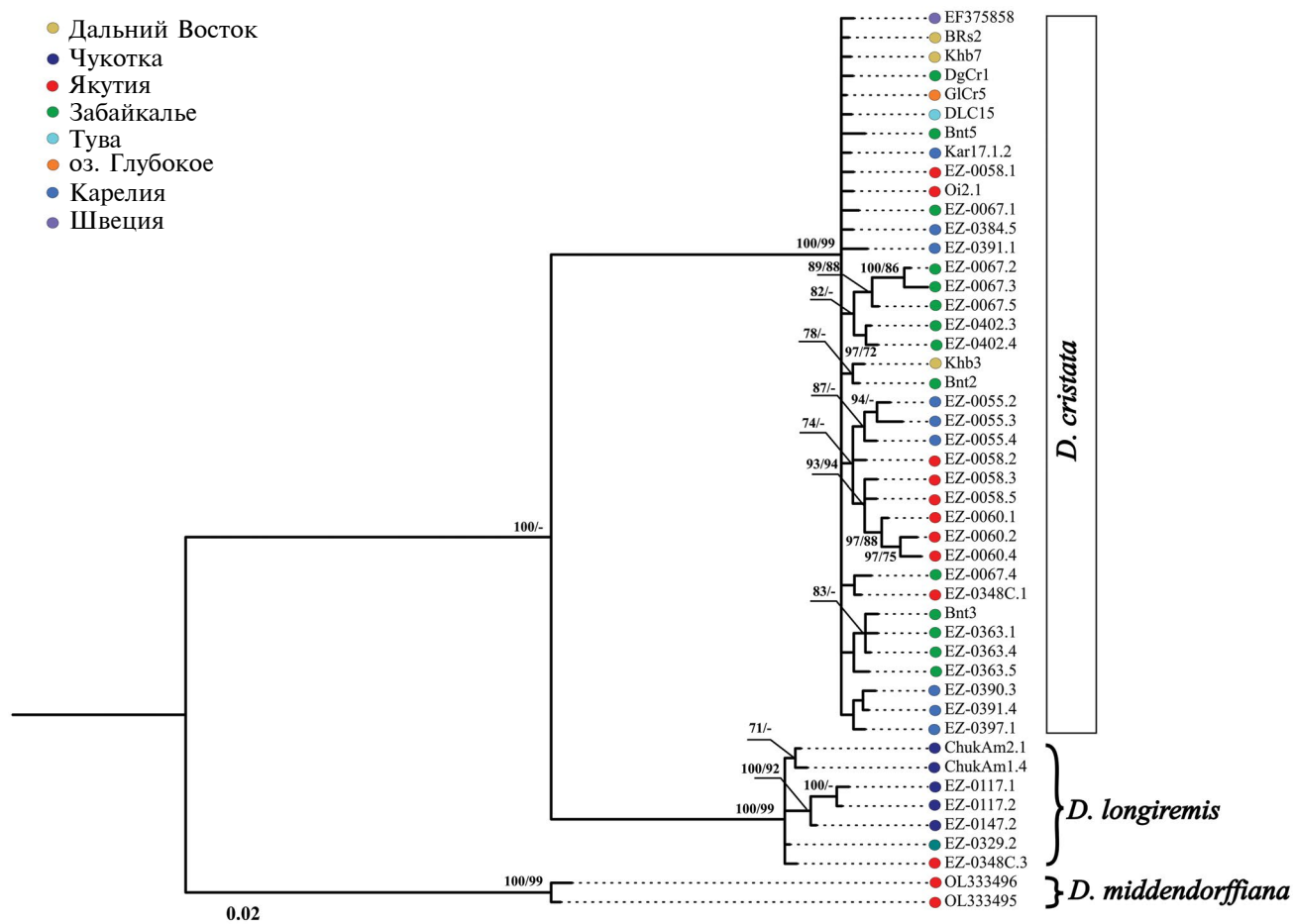


Рис. 2. Байесовское филогенетическое дерево для видов *D. cristata* и *D. longiremis* на основе фрагмента гена *12S* мтДНК (согласно выявленным гаплотипам). Показана апостериорная вероятность и бутстрэп-значения поддержки ветвей ветвления выше 70% (BI/ML). Масштаб — число ожидаемых замен на сайт.

гена *12S* мтДНК сформировали две явно выраженные клады, соответствующие видам *D. cristata* и *D. longiremis*, однако на ML-дереве хорошей поддержки ветвей для этих клад не зарегистрировано. В пределах видовых клад выделились внутренние субклады с высокой поддержкой ветвей. Высокий уровень дивергенции отмечен для популяций *D. cristata* из Баунтовской системы озер (Забайкалье) и Республики Саха (Якутия) — 0.5–0.8% (см. табл. 1). Здесь особенно следует отметить популяцию из оз. Большие Капылюши (Забайкалье), для которой выявлена высокая митохондриальная дивергенция со множеством внутренних субклад (до 100%). В Карелии дивергентные линии выявлены в оз. Тулос (образцы EZ-0055), которые формируют общую группу с образцами из Якутии (EZ-0058 и EZ-0060) с поддержкой ветви 74% (рис. 2).

Одна внутренняя субклада *D. longiremis* на филогенетическом дереве сформирована образцами из Чукотки (ChukAm), другая — образцами из Чукотки (EZ-0117) и Якутии (EZ-0147). Образцы из Ямало-Ненецкого АО (EZ-0329) и Якутии (EZ-0348с.3) общую субкладу формируют только на ML-дереве (70%; см. Приложение рис. S1), тогда как на байесовском дереве они не связаны друг с другом (см. рис. 2). Высокая внутривидовая дивергенция (до 0.6%) для *D. longiremis* также зарегистрирована для популяций из Якутии (см. табл. 1). Высокие значения *p*-дистанций выявлены между географической популяцией *D. cristata* из Якутии и всеми остальными (0.5–0.8%); это же справедливо для *D. longiremis* (0.7–0.8%). Эволюционная дивергенция между *D. cristata* и *D. longiremis* была очень высокой — 10.8–11.8% (табл. 1).

Полиморфизм мтДНК и тесты на нейтральность эволюции

Генетический полиморфизм на основе фрагмента гена *12S* мтДНК для видов *D. cristata* и *D. longiremis* оказался сходным (см. табл. 2). Число гаплотипов (*h*) и сегрегирующих (полиморфных) сайтов (*S*) выше у *D. cristata*, что в некоторой мере может быть обусловлено разницей в размере выборок. Показатели гаплотипического (H_d) и нуклеотидного (π) разнообразия существенно не различаются и характеризуются высокими значениями для обоих

видов. Значения тестов на нейтральность эволюции F_u F_s и Таджимы *D* принимают достоверные отрицательные значения для вида *D. cristata*, для вида *D. longiremis* эти показатели имеют положительные, но недостоверные величины, что также может быть обусловлено малым объемом выборки (табл. 2).

На популяционном уровне общие закономерности соотношения показателей генетического полиморфизма и тестов на нейтральность эволюции отличаются от тех, которые были обнаружены на видовом уровне (табл. 3). Наиболее заметные отличия выявлены для показателя *h*, высокие значения которого зарегистрированы для *D. cristata* из Якутии, Карелии (по 10) и Забайкалья (15), популяции из этих регионов также характеризуются высоким числом полиморфных сайтов (*S*) (см. табл. 3). Для *D. cristata* высокие значения показателей H_d и π выявлены в Якутии и Забайкалье; на Дальнем Востоке и в Карелии отмечены низкие значения π при высоком значении H_d . Для *D. longiremis* аналогично высокие значения этих показателей зарегистрированы для популяций из Якутии, высокие значения H_d при низких значениях π — для популяций Чукотки (см. табл. 3). Самые низкие значения показателей генетического полиморфизма обнаружены в популяциях *D. cristata* из оз. Глубокое и Тувы (оз. Дорог-Холь); для *D. longiremis* — из водоемов Ямало-Ненецкого АО. Популяции *D. cristata* из водоемов Якутии, Забайкалья и Карелии характеризуются отрицательными значениями тестов на нейтральность эволюции, популяции *D. longiremis* из водоемов Чукотки и Якутии — положительными значениями. Тест F_u F_s для *D. cristata* из Карелии принимает достоверное отрицательное значение (–3.702, табл. 3).

Медианные сети и распространение *12S* гаплотипов

Гаплотипы локуса *12S* *D. cristata* сформировали звездообразную структуру с центральным гаплотипом H_{2-} , распространенным в популяциях большинства всех исследованных регионов Северной Евразии, за исключением Дальнего Востока, Якутии и Тувы (рис. 3). Остальные гаплотипы *D. cristata* слабо связаны друг с другом, не группируются ни в одну четкую структуру, как правило, уникальны

Таблица 2. Значения индексов генетического полиморфизма и тестов на нейтральность эволюции для видов *D. cristata* и *D. longiremis* Северной Евразии на основе фрагмента гена *12S* мтДНК

Вид	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>S</i>	$H_d \pm \text{st.d.}$	$\pi \pm \text{st.d.}$	Tajima's <i>D</i>	Fu's F_s
<i>D. cristata</i>	89	37	40	0.832 ± 0.040	0.00471 ± 0.0006	–2.061*	–26.630**
<i>D. longiremis</i>	17	7	9	0.853 ± 0.053	0.00531 ± 0.0008	0.577	0.784

Примечание. *n* — число анализируемых нуклеотидных последовательностей; *S* — число полиморфных (сегрегирующих) сайтов; *h* — число гаплотипов; H_d — гаплотипическое разнообразие; π — нуклеотидное разнообразие; st.d. — стандартное отклонение; Tajima's *D* и Fu's F_s — тесты на нейтральность эволюции. **P* < 0.01, ***P* < 0.001.

Таблица 3. Значения индексов генетического полиморфизма и тестов на нейтральность эволюции для географических популяций видов *D. cristata* и *D. longiremis* Северной Евразии на основе фрагмента гена *12S* мтДНК

Виды/ популяции	<i>n</i> *	<i>h</i> *	<i>S</i> *	<i>H_d</i> ± st.d.*	π ± st.d.*	Tajima's <i>D</i> *	Fu's <i>F_S</i> *
<i>D. cristata</i>							
FE	7	3	5	0.639 ± 0.126	0.0021 ± 0.0005	0.410	0.736
YAK	11	10	14	0.982 ± 0.046	0.0075 ± 0.0011	−1.151	−4.8810
TUV	3	1	0	0	0	0	0
TRANS	31	15	20	0.796 ± 0.074	0.0055 ± 0.0010	−1.151	−4.881
GLUB	9	1	0	0	0	0	0
KAR	25	10	13	0.763 ± 0.085	0.0034 ± 0.0007	−1.427	−3.702**
<i>D. longiremis</i>							
CHUK	7	3	5	0.667 ± 0.160	0.0038 ± 0.0012	0.363	2.789
YAK	6	4	8	0.800 ± 0.172	0.0063 ± 0.0019	0.274	1.127
YANAO	2	1	0	0	0	0	0

Примечание. CHUK – Чукотка, FE – Дальний Восток, GLUB – Глубокое озеро, KAR – Карелия, TRANS – Забайкалье, YAK – Якутия, YANAO – Ямало-Ненецкий АО, TUV – Республика Тыва. * – значения см. в табл. 2; ***P* < 0.01.

и связаны с центральным гаплотипом максимум через девять мутаций и несколько гипотетических гаплотипов. Множество уникальных гаплотипов выявлено в популяциях из Якутии, Забайкалья и Карелии. Один общий гаплотип (Н_3) зарегистрирован в популяциях *D. cristata* из водоемов Дальнего Востока и Эвенкии.

В отличие от медианной сети *D. cristata*, сеть гаплотипов фрагмента *12S* для *D. longiremis* характеризуется совершенно иным типом связей (рис. 3). Наиболее заметной отличительной особенностью сети является отсутствие широко распространенного центрального гаплотипа. Один общий *12S* гаплотип *D. longiremis* выявлен в популяциях из Якутии и Чукотки (Н_2); другой – в популяциях из Канады, Норвегии и Ямало-Ненецкого АО (Н_1). Гаплотипы Н_4 и Н_5 из Якутии, гаплотип Н_6 из Чукотки формируют удаленную ветвь, связанную с остальной группой гаплотипов через 3–7 мутационных шагов (см. рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Филогения и филогеография

Проведенные исследования в первую очередь выявили различия в распространении видов *D. cristata* и *D. longiremis* на территории Северной Евразии. Несмотря на близкородственные отношения между видами, вид *D. cristata* распространен более широко, тогда как *D. longiremis* приурочен к водоемам арктической и субарктической зон. По данным литературы, *D. longiremis* предпочитает холодные водоемы, и ареал распространения вида ограничен на юг примерно 60° с. ш. [30–33]. Очевидно, что *D. cristata* также тяготеет к водоемам, расположенным в холодных регионах и высоких широтах. Однако

популяции этого вида зарегистрированы гораздо южнее, чем популяции *D. longiremis*, например, в российской части Дальнего Востока, Забайкалье, юге Сибири. Массовый гаплотип *D. cristata* обнаружен в водоемах от Забайкалья до Карелии, а также в Белоруссии и Финляндии. Уникальные гаплотипы отмечены в популяциях этого вида из водоемов российского Дальнего Востока, Якутии, юга Сибири. Картина географического распространения гаплотипов *D. cristata* напоминает таковую для *D. galeata* [34] и, по всей видимости, свидетельствует о недавней быстрой пространственной экспансии на всей обширной исследованной территории. Гаплотипы *D. cristata*, формирующие дивергентные внутривидовые субклады, обнаружены в географически удаленных популяциях (российский Дальний Восток, Забайкалье – Баунтовская система озер, Республика Тыва – Тоджинская котловина). Что касается уникальных гаплотипов, расположенных удаленно от центрального, скорее всего, они представляют собой остатки более древней фауны, изолированной в течение продолжительного времени в рефугиумах, свободных от покровного плейстоценового оледенения.

Похожая ситуация наблюдается при анализе распространения *D. longiremis*, когда наиболее удаленные гаплотипы найдены в популяциях из Чукотки и Якутии. В то же время один гаплотип (Н_2), очевидно, распространен по всей Голарктике – Канада, Норвегия и Ямало-Ненецкий АО. Поэтому мы не можем исключать тот факт, что исследование большего числа популяций *D. longiremis* Северной Евразии приведет к выявлению дополнительных точек географического распространения этого гаплотипа, а также изменит структуру медианной сети для этого вида. На данный момент нашими исследованиями зарегистрировано

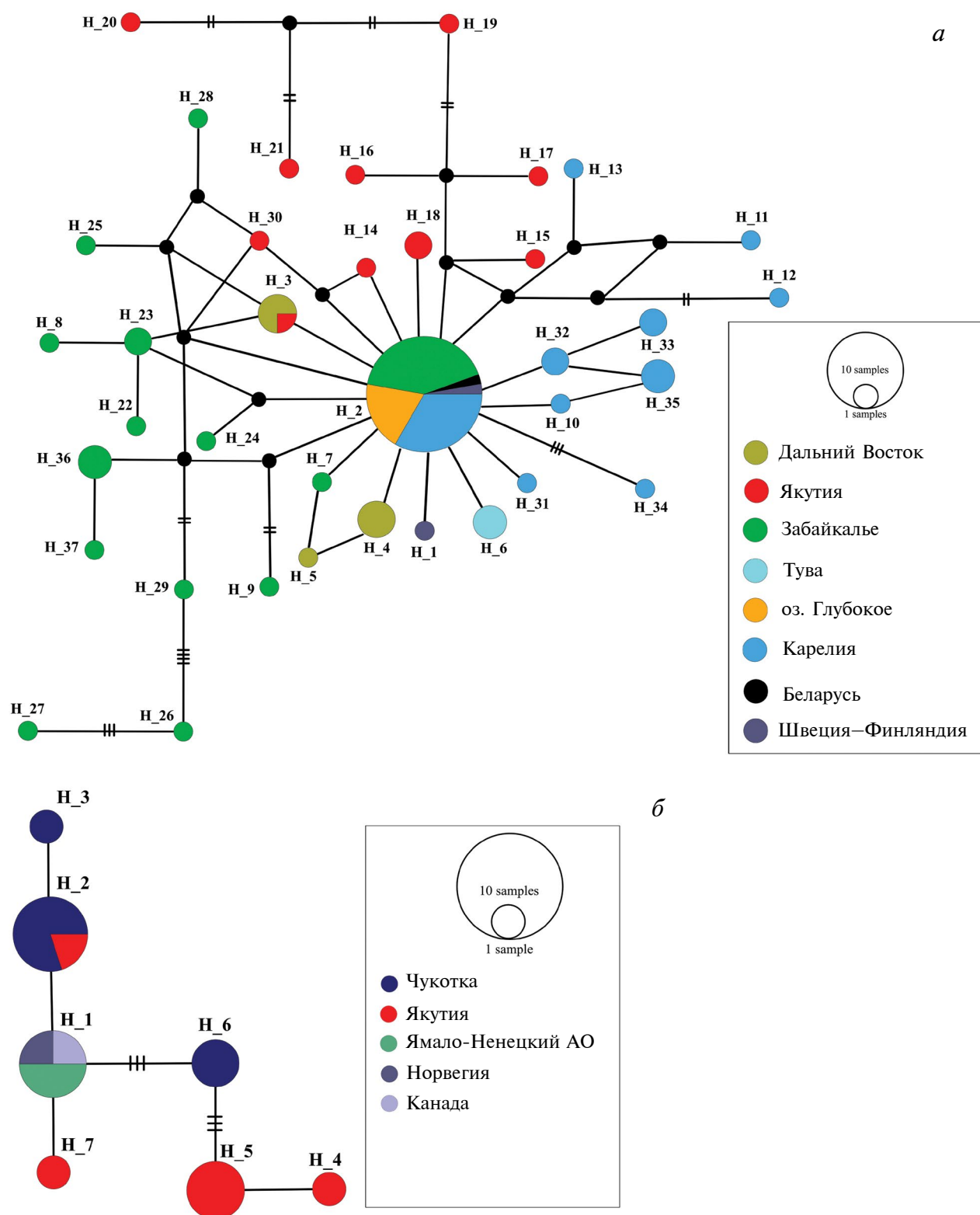


Рис. 3. Медианные сети (MJ) 12S гаплотипов *D. cristata* (*a*) и *D. longiremis* (*б*). Размер кружков соответствует относительной частоте гаплотипов (масштаб указан в нижнем правом углу); черные маленькие кружки — медианные векторы; вертикальные черточки — число мутаций, если оно не равно 1.

совместное обитание *D. cristata* и *D. longiremis* только в одном водоеме, расположенном в среднем течении р. Лены, и, предположительно, в Скандинавии.

Анализ генетического полиморфизма и структуры *D. cristata* и *D. longiremis* показал, что в географически удаленных популяциях этих видов формируется специфический набор гаплотипов. Возможно, в этом прослеживается их географическая и временная изоляция во множественных рефугиумах позднего плейстоцена. Такие механизмы формирования популяционно-генетической структуры обнаружены и для других североазиатских видов рода *Daphnia*. Например, подобная структурированность отмечена для *D. dentifera* [7, 12]. Наши данные свидетельствуют в пользу гипотезы о возможном аллопатрическом видообразовании в удаленных популяциях рода *Daphnia* на территории Северной Евразии в периоды плейстоценовых оледенений, чему способствовала длительная географическая изоляция [12]. Эта точка зрения подкрепляется результатами исследований дафний Северной Америки [35–37]. Нельзя исключать и факт влияния берингийской и/или североамериканской фауны на формирование популяционно-генетической структуры видов, населяющих территорию Северной Евразии, поскольку внутривидовая генетическая дивергенция может быть следствием вторичного контакта гетерогенных популяций и дистантных митохондриальных линий, гибридного происхождения и непрерывного видообразования [38–40].

При некоторых общих закономерностях формирования филогеографических паттернов разных видов рода *Daphnia* на территории Северной Евразии обращает на себя внимание разница в особенностях географической направленности распространения крупных митохондриальных клад и видов. Так, *D. longispina* s. str. населяет водоемы западнее бассейна р. Лены, а *D. dentifera* – восточнее, т. е. для этих викариантных видов характерно долготное распространение [7, 12, 41]. Сходная дифференциация справедлива для гаплотипов “европейской” и “сибирской” клад вида *D. longispina* s. str., а также других таксонов кладоцер [4]. В то же время, согласно полученным данным, зоны распространения близкородственных видов *D. cristata* и *D. longiremis* разделяются в широтном направлении с зарегистрированной зоной их контакта в Центральной Якутии. Их географическое распределение очень похоже на таковое двух близкородственных североамериканских видов *D. parvula* и *D. retrocurva* [37].

Эволюционная история видов

Гаплотипическое H_d и нуклеотидное π разнообразие для *D. cristata* и *D. longiremis* имеют высокие

значения. Подобное соотношение этих показателей, во-первых, характерно для стабильной популяции с высоким эффективным размером, во-вторых, наблюдается в выборке, которая состоит из исторически дифференцированных популяций [26, 27]. На наш взгляд, для исследованных видов более приемлем второй сценарий развития событий, принимая во внимание высокий уровень эволюционной дивергенции между популяциями, согласно выявленным внутренним митохондриальным субкладам с высокой степенью поддержки и значениям p -дистанций. Похожее соотношение H_d и π было выявлено для “сибирской” клады *D. longispina* s. str. [12]. Однако если анализировать эти показатели на уровне отдельных географических популяций *D. cristata* и *D. longiremis*, то, как и в случае с *D. longispina* s. str., следует предположить, что популяции из разных регионов претерпели разные эволюционные сценарии. Высокие значения H_d и π наблюдаются в популяциях *D. cristata* из Якутии и Забайкалья, *D. longiremis* – из Якутии. Высокие значения H_d при низких значениях π зарегистрированы в популяциях *D. cristata* из водоемов российской части Дальнего Востока и Карелии, а в популяциях *D. longiremis* – из водоемов Чукотки. Такое соотношение показателей свидетельствует о быстром росте популяции из древней популяции с низким эффективным размером [26, 27].

Отрицательные и значимые значения тестов на нейтральность эволюции Таджимы D и $\Phi_u F_s$ для *D. cristata* со всей очевидностью указывают на недавнюю пространственную экспансию этого вида [28, 29, 42, 43]. Положительные, но недостоверные значения этих тестов для *D. longiremis* свидетельствуют о недавнем прохождении через “бутылочное горлышко”. Значения тестов Таджимы D и $\Phi_u F_s$ на популяционном уровне в целом согласуются с таковыми, полученными на видовом уровне. Исключение составила дальневосточная популяция *D. cristata* с положительными и недостоверными значениями тестов, что также может являться результатом недавнего “бутылочного горлышка”. Для остальных популяций значения тестов были отрицательными, но недостоверными, кроме географической популяции из Карелии, для которой тест $\Phi_u F_s$ принимал отрицательное статистически значимое значение, свидетельствующее о недавней пространственной экспансии.

Популяции *D. cristata* из оз. Дорог-Холь (Тува), оз. Глубокое и *D. longiremis* из Ямало-Ненецкого АО представлены единственными гаплотипами и, соответственно, отсутствием какого бы то ни было генетического полиморфизма. По всей видимости, эти популяции подверглись недавнему и катастрофическому воздействию по типу “бутылочного горлышка”. Кроме того, географическая изолированность популяции *D. cristata* из оз. Дорог-Холь также могла привести к резкому сокращению ее

генетического разнообразия, и, возможно, она представляет собой остатки древней популяции (или популяций), ранее распространенной в Алтае-Саянском регионе повсеместно. В данном случае нельзя исключать и экспансию из других регионов, учитывая способность эфиппидных стадий дафний к пассивному распространению и высокую скорость колонизации [44–46]. Однако, на наш взгляд, этот сценарий маловероятен, поскольку популяция *D. cristata* из оз. Дорог-Холь представлена уникальным гаплотипом Н_5, отличным от массового гаплотипа Н_2, но связанным с ним напрямую через одну мутацию. Скорее всего, продолжительная временная изоляция этой популяции и послужила причиной генетической дифференциации.

Очевидно, наличие множества уникальных дистантных гаплотипов *D. cristata* в водоемах Якутии, Забайкалья и Карелии объясняется воздействием на популяции вида повторяющихся ледниковых циклов в период плейстоцена. В Сибири в периоды холодных фаз среднего и позднего плейстоцена озера Тоджинской котловины, ледниково-подпрудное озеро палеоВитим в Забайкалье и окружающие его более мелкие подпрудные озера [47–49] служили рефугиумами для пресноводной фауны. В этот период ледниковые перемены между водоемами являлись барьерами для перемещения водных организмов, и населяющие их популяции могли быть изолированы друг от друга в течение продолжительного времени, что неизбежно приводило к внутривидовой диверсификации [35, 36, 50, 51]. К настоящему времени имеются неоспоримые доказательства того, что территории, в период плейстоцена свободные ото льда, представляют собой источник повышенного биоразнообразия [52].

В европейской части России, по сравнению с Сибирью, нижнечетвертичные покровные оледенения были гораздо обширнее и мощнее. В частности, в Сарганское (Нижнеислинское) оледенение ледниковый щит покрывал всю Фенноскандию, в том числе и территорию современной Карелии [53–55]. В этот период потенциальные пресноводные рефугиумы располагались только по периферии ледникового щита, а вселение пресноводной фауны в водоемы Карелии происходило уже после начала таяния наиболее мощного ледника стадии LGM (около 20 тыс. лет назад), т. е. в самом конце плейстоцена при переходе к голоцену. В голоцене на Кольском полуострове также происходили значительные изменения климата, и период похолодания (≈ 8500 – 8000 лет назад) сопровождался резким повышением уровня воды в бессточных озерах [56]. Очевидно, в этот период и произошло увеличение гаплотипического разнообразия в западноевропейских популяциях *D. cristata* за счет смешения разных филогенетических линий, обитающих в водоемах, располагавшихся по кромкам

отступающего ледника. Возможно, что на этом этапе имела место и пространственная экспансия массового гаплотипа этого вида по всей территории Северной Евразии.

Первые филогеографические и популяционно-генетические исследования *D. cristata* Северной Евразии выявили повышенное гаплотипическое разнообразие вида в тех регионах, где в период плейстоцена сохранялись пресноводные рефугиумы – российская часть Дальнего Востока, Якутия, Карелия. При этом показатели генетического полиморфизма и тесты на нейтральность эволюции на основе фрагмента гена *12S* мтДНК для удаленных и изолированных географических популяций *D. cristata* (Тува, Глубокое озеро) и в целом для вида *D. longiremis* указывают на относительно недавнее «бутылочное горлышко», т. е. резкое сокращение численности. Для других популяций *D. cristata* более очевидна быстрая пространственная экспансия. В целом генетические показатели для обоих исследованных видов указывают на сходные микроэволюционные процессы, но при этом на территории Северной Евразии прослеживается четкая дифференциация этих видов в широтном направлении. Выявленные дивергентные митохондриальные линии в пределах видов *D. cristata* и *D. longiremis* подтверждают гипотезу о формировании уникальной видовой и гаплотипической структуры разных таксонов рода *Daphnia* на территории Северной Евразии в период позднего плейстоцена – раннего голоцена под влиянием смены периодов ледниковый и межледниковый.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда – проект № 24-24-00528.

Авторы выражают благодарность А.А. Котову за моральную поддержку при планировании данных исследований; Д.С. Сендеку за консультацию по палеоклиматической истории Северо-Западной Европы; А.В. Катохину, Е.Г. Егоровой, А.В. Кирилловой, А.В. Холодову, Т.И. Букиной, Н.В. Ильмасту за помощь в сборе проб зоопланктона из водоемов российского Дальнего Востока, Республики Саха (Якутия), Ямало-Ненецкого АО и Карелии.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котов А.А. Фаунистические комплексы Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) Восточной Сибири и Дальнего Востока России // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 7. С. 748–768.

2. Bekker E.I., Karabanov D.P., Galimov Ya.R., Kotov A.A. Barcoding reveals high cryptic diversity in the North Eurasian *Moina* species (Crustacea: Cladocera) // PLoS One. 2016. V. 11. doi:10.1371/journal.pone.0161737
3. Kotov A.A., Taylor D.J. Contrasting endemism in pond-dwelling cyclic parthenogens: The *Daphnia curvirostris* species group (Crustacea: Cladocera) // Scientific Reports. 2019. V. 9 (6812). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43281-9>.
4. Коровчинский Н.М., Котов А.А., Бойкова О.С., Смирнов Н.Н. Ветвистоусые ракообразные (Crustacea: Cladocera) Северной Евразии. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2021. 481 с.
5. Zuykova E.I., Bochkarev N.A., Katokhin A.V. Identification of the *Daphnia* species (Crustacea: Cladocera) in the lakes of the Ob and Yenisei River basins: Morphological and molecular phylogenetic approaches // Hydrobiologia. 2013. V. 715. P. 135–150. doi:10.1007/s10750-012-1423-3
6. Zuykova E.I., Simonov E.P., Bochkarev N.A. et al. Contrasting phylogeographic patterns in closely related species of *Daphnia longispina* group (Crustacea: Cladocera) with focus on north-eastern Eurasia // PLoS One. 2018. V. 13(11). e0207347
7. Zuykova E.I., Sleptzova L.P., Bochkarev N.A. et al. Mitochondrial lineage diversity and phylogeography of *Daphnia* (*Daphnia*) (Crustacea: Cladocera) in North-East Russia // Water. 2022. V. 14. <https://doi.org/10.3390/w14121946>
8. Kotov A.A., Garibian P.G., Bekker E.I. et al. A new species group from the *Daphnia curvirostris* species complex (Cladocera: Anomopoda) from the eastern Palearctic: taxonomy, phylogeny and phylogeography // Zool. J. Linn. Soc. 2021. V. 191. P. 772–822. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa046>
9. Гордеева Н.В., Дриц А.В., Флинт М.В. Генетическое разнообразие копеподы *Limnocalanus macrurus* арктических морей России // Океанология. 2019. Т. 59. № 6. С. 998–1007. doi:10.31857/S0030-1574596998-1007
10. Hebert P.D.N., Hann B.J. Patterns in the composition of arctic tundra pond microcrustacean communities // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1986. V. 43. № 7. P. 1416–1425. doi:10.1139/f86-175
11. Samchyshyna L., Hansson L.A., Christoffersen K.S. Patterns in the distribution of Arctic freshwater zooplankton related to glaciation history // Polar Biol. 2008. V. 31. P. 1427–1435. doi:10.1007/s00300-008-0482-4
12. Зуйкова Е.И., Слепцова Л.П., Бочкарев Н.А. и др. Сравнительная филогеография викариантных видов группы *Daphnia longispina* s.l. (Crustacea: Cladocera) в Северной Евразии // Биология внутренних вод. 2024.
13. Hall T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. Ser. 1999. V. 41. P. 95–98. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29
14. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization // Brief. Bioinform. 2019. V. 20. № 4. P. 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
15. Guindon S., Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood // Syst. Biol. 2003. V. 52. P. 696–704. doi: 10.1080/10635150390235520
16. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. et al. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing // Nature Meth. 2012. V. 9. № 772.
17. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases // Mol. Biol. Evol. 1992. V. 9. P. 678–687. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752
18. Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Some mathematical questions in biology // DNA Sequence Analysis. Providence. Amer. Math. Soc. 1986. V. 17. P. 57–86.
19. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 6–25. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
20. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054
21. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
22. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D. et al. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7 // Syst. Biol. 2018. V. 67. P. 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
23. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
24. Bandelt H., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 37–48.
25. Leigh J.W., Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction // Methods Ecol. Evol. 2015. V. 6. P. 1110–1116. doi:10.1111/2041-210X.12410
26. Grant W.A.S., Bowen B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation // J. Heredity. 1998. V. 89. P. 415–426. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>

27. *Avise J.C.* Phylogeography. The History and Formation of Species. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts, 2000. 447 p.
28. *Fu Y.X.* Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // *Genetics*. 1997. V. 147. P. 915–925. doi: 10.1093/genetics/147.2.915
29. *Tajima F.* Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. 1989. V. 123. P. 585–595. doi: 10.1093/genetics/123.3.585
30. *Стрелецкая Э.А.* Список коловраток, ветвистоусых и веслоногих ракообразных водоемов бассейна рек Колыма и Анадырь // *Гидробиологические исслед. внутр. водоемов Северо-Востока СССР*. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1975. С. 32–59.
31. *Кузьмина Л.И.* Видовой состав зоопланктона рек арктической части Якутии // *Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность*. Севастополь, 2018. С. 680–683.
32. *Фролова Л.А., Нигаматзянова Г.Р.* Структурно-функциональная характеристика зоопланктонных сообществ термокарстовых озер о. Самойловский (дельта реки Лены, Республика Саха (Якутия)) // *Уч. зап. Казанского ун-та. Сер.: Естественные науки*. 2019. Т. 161. № 1. С. 158–171.
33. *Шевелева Н.Г., Мирабдуллаев И.М., Копырина Л.И. и др.* Первые сведения о ракообразных (Crustacea: Cladocera, Sorepoda) озер “Полюса холода” (Якутия): биология и экология // *Акт. пробл. изучения ракообразных*. Борок, 2022. 70 с.
34. *Зуйкова Е.И., Бочкарев Н.А., Котов А.А.* Видовая и генетическая структура группы *Daphnia longispina* s.l. (Cladocera, Daphniidae) в водоемах Южной Сибири // *Зоол. журн.* 2020. Т. 99. № 10. С. 1110–1123. doi:10.31857/S0044513420100153
35. *Ishida S., Taylor D.J.* Mature habitats associated with genetic divergence despite strong dispersal ability in an arthropod // *BMC Evol. Biol.* 2007. V. 7. doi:10.1186/1471-2148-7-52
36. *Ishida S., Taylor D.J.* Quaternary diversification in a sexual Holarctic zooplankton, *Daphnia galeata* // *Mol. Ecol.* 2007. V. 16. P. 569–582. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03160.x
37. *Costanzo K.S., Taylor D.J.* Research article rapid ecological isolation and intermediate genetic divergence in lacustrine cyclic parthenogens // *BMC Evol. Biol.* 2010. V. 10. P. 166. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/166>
38. *De Gelas K., De Meester L.* Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 753–764. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02434.x
39. *Thielsch A., Brede N., Petrusek A. et al.* Contribution of cyclic parthenogenesis and colonization history to population structure in *Daphnia* // *Mol. Ecol.* 2009. V. 18. P. 1616–1628. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04130.x
40. *Hamrová E., Mergeay J., Petrusek A.* Strong differences in the clonal variation of two *Daphnia* species from mountain lakes affected by overwintering strategy // *BMC Evol. Biol.* 2011. V. 11. № 231. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-231>
41. *Zuykova E.I., Bochkarev N.A., Talor D.J., Kotov A.A.* Unexpected endemism in the *Daphnia longispina* complex (Crustacea: Cladocera) in Southern Siberia // *PLoS One*. 2019. V. 14. e0221527.
42. *Garrigan D., Lewontin R., Wakeley J.* Measuring the sensitivity of single-locus “neutrality tests” using a direct perturbation approach // *Mol. Biol. Evol.* 2010. V. 27. P. 73–89. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp209>
43. *Holsinger K.E.* Lecture notes in population genetics. Department of Ecology and Evolutionary Biology. U-3043. Univ. Connecticut Storrs, 2015. doi:10.6084/M9.FIGSHARE.100687
44. *Figuerola J., Green A.J., Michot T.C.* Invertebrate eggs can fly: Evidence of Waterfowl-mediated gene flow in aquatic invertebrates // *Am. Nat.* 2005. V. 165. P. 274–280. <https://doi.org/10.1086/427092>
45. *Louette G., de Meester L.* High dispersal capacity of cladoceran zooplankton in newly founded communities // *Ecology*. 2005. V. 86. P. 353–359.
46. *Van de Meutter F., Stoks R., de Meester L.* Size-selective dispersal of *Daphnia* resting eggs by backswimmers (*Notonecta maculata*) // *Biology Letters*. 2008. V. 4. P. 494–496. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0323>
47. *Гросвальд М.Г., Котляков В.М.* Великая приледниковая система стока Северной Азии и ее значение для межрегиональных корреляций // *Четвертичный период. Палеография и литология*. Кишинев: Штииница, 1989. С. 5–13.
48. Биоразнообразие водных экосистем Забайкалья. Видовая структура гидробиоценозов озер и рек горных территорий / З.П. Оглы, О.К. Клишко, Н.А. Добрынина и др. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1998. 190 с.
49. *Еникеев Ф.И.* Палеогеография Сарпанского оледенения горного обрамления Муйской впадины (Северное Забайкалье) // *Геосферные исследования*. 2018. № 3. С. 58–70.
50. *April J., Hanner R.H., Dion-Coté A.-M., Bernatchez L.* Glacial cycles as an allopatric speciation pump in north-eastern American freshwater fishes // *Mol. Ecol.* 2013. V. 22. P. 409–422. doi:10.1111/mec.12116
51. *Hewitt G.M.* Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary // *Phil. Trans. R. Soc.*

- Lond. 2004. B. V. 359. P. 183–195.
doi:10.1098/rstb.2003.1388
52. Chin T.A., Cristescu M.E. Speciation in *Daphnia* // Mol. Ecol. 2021. V. 30. № 6. P. 1398–1418.
doi:10.1111/mec.15824
53. Hughes A.L.C., Gyllencreutz R., Lohne Ø.S. et al. The last Eurasian ice sheets – a chronological database and time-slice reconstruction, DATED-1 // Boreas. 2016. V. 45. P. 1–45. doi:10.1111/bor.12142
54. Mangerud J., Jakobsson M., Alexanderson H. et al. Ice-dammed lakes and rerouting of the drainage of northern Eurasia during the Last Glaciation // Quaternary Sci. Reviews. 2004. V. 23. P. 1313–1332.
doi:10.1016/j.quascirev.2003.12.009
55. Svendsen J.I., Alexanderson H., Astakhov V.I. et al. Late Quaternary ice sheet history of northern Eurasia // Quaternary Sci. Reviews. 2004. V. 23. P. 1229–1271.
doi:10.1016/j.quascirev.2003.12.008
56. Ильяшук Б.П., Ильяшук Е.А., Хаммарлунд Д. Изменения климата в предгорьях Хибин, Кольский полуостров, на протяжении голоцена // Бюл. Комиссии по изучению четвертичного периода. № 67. М.: ГЕОС, 2007. С. 85–96.

Phylogeography Patterns and Population Genetics Polymorphism of *Daphnia cristata* Sars and *D. longiremis* Sars (Anomopoda: Daphniidae) in North Eurasia

E. I. Zuykova^{1, 2, *}, L. P. Sleptzova¹, L. V. Andreeva^{3, 1}, Ya. A. Kuchko⁴,
N. A. Bochkarev^{1, 2}, E. S. Zakharov⁵

¹*Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630091 Russia*

²*Saint Petersburg Branch of the Russian Federal Research Institute of Fisheries and oceanography, Saint Petersburg, 199053 Russia*

³*Institute for Biological Problems of Cryolithozone of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677007 Russia*

⁴*Institute of Biology of Karelian Research Centre of Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia*

⁵*Amnosov North-East. Federal University, Yakutsk 677000 Russia*

*e-mail: zuykova1064@yandex.ru

The first data on the population genetic structure of the *D. cristata* Sars, 1862 and *D. longiremis* Sars, 1862 species (Anomopoda: Daphniidae) from the water bodies of North Eurasia are present. The variability of the *12S* gene fragment of the mtDNA for these taxa belonging to subgenus *Daphnia* (*Daphnia*) O.F. Müller, 1776 (Crustacea: Cladocera) in this region is studied, and the phylogenetic analysis performed. The genealogical relationships between haplotypes of the *D. cristata* and *D. longiremis* species and their geographical distribution are shown. Our new data allow us to suggest a recent rapid spatial expansion for *D. cristata* during the Late Pleistocene and Early-Middle Holocene periods. According to the results of the study, the distribution zones of *D. cristata* and *D. longiremis* species are separated in the latitudinal direction with the zone of their contact in Central Yakutia. Our results provide convincing evidence for the influence of ice ages and interglacial on the formation of modern genetic diversity and the phylogeographic structure of *D. cristata* and *D. longiremis*.

Keywords: *Daphnia*, phylogeny, phylogeography, Russia.

НЕРАВНОМЕРНОСТЬ ПРИТОКА СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ ЕВРОПЕЙЦЕВ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *SLC45A2*, *SLC24A5*, *TYRP1*, *DRD2*, *EDAR* И *OCA2* В ГЕНОФОНД КОРЯКОВ

© 2024 Б. А. Малярчук¹, *, А. Н. Литвинов¹

¹Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, 685000 Россия

*e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Поступила в редакцию 04.03.2024 г.

После доработки 03.04.2024 г.

Принята к публикации 04.04.2024 г.

Исследовано распределение аллелей, в высокой степени специфичных для европейцев, в генофонде коряков, который сформировался в результате интенсивных на территории Северного Приохотья межэтнических контактов, характеризующихся преобладанием генетического вклада со стороны мужчин восточноевропейского происхождения. Для анализа отобраны локусы rs16891982 (ген *SLC45A2*), rs1426654 (ген *SLC24A5*), rs1408799 (ген *TYRP1*), rs1076563 (ген *DRD2*), rs3827760 (ген *EDAR*), rs1448485 (ген *OCA2*), которые в основном связаны с функционированием системы пигментации. Обнаружена высокая гетерогенность в распределении частот специфичных для европейцев аллелей: от 1.4% для варианта rs1076563-С гена *DRD2* до 14.7% для варианта rs1426654-А гена *SLC24A5*. Обсуждаются причины неравномерности притока аллелей, специфичных для европейцев, в генофонд коряков. Не исключено, что формирование генетической структуры современных коряков в условиях активной межэтнической метисации сопровождалось действием естественного отбора на некоторые участки генома.

Ключевые слова: гены *SLC45A2*, *SLC24A5*, *TYRP1*, *DRD2*, *EDAR*, *OCA2*, популяционно-специфичные аллели, коренное население Сибири, межрасовое смешение.

DOI: 10.31857/S0016675824100074 **EDN:** WFALJP

Коряки — коренные жители Северного Приохотья и Камчатки, которые в основном специализировались на морском зверобойном промысле (до 80% населения), проживают на побережье Охотского и Берингова морей [1]. Колыбелью коряков, по всей видимости, была Тауйская губа Охотского моря [2]. Согласно археологическим данным, на Охотском побережье обнаружены многочисленные древние поселения морских охотников — представителей токаревской и древнекорякской культур (возрастом примерно от трех тысяч лет до нескольких веков назад), которых принято считать предками коряков [2, 3]. До середины XVIII в. коряки активно сопротивлялись продвижению русских первопроходцев, а после примирения подверглись мощной ассимиляции со стороны пришлого русского населения [2]. Оседлые коряки в основном обрусели и растворились в новом этническом сообществе — охотских камчадалах. Лишь коряки-оленьеводы глубинных территорий, вероятнее всего, сохранили свою культуру и генетическое своеобразие. В советское время, как и раньше, в

брачной структуре коряков сохранялась гендерная диспропорция, обусловленная тем, что в смешанные браки вступали главным образом европейские мужчины [2]. Однако несмотря на активную ассимиляцию со стороны некоренного населения (доля смешанных в этническом отношении браков достигает 80%), численность коренных жителей области не уменьшается, а возрастает, что объясняется традицией записи детей от смешанных браков как коренных жителей [4]. Такая тенденция характерна и для других народов Крайнего Северо-Востока Евразии [5, 6].

Результаты молекулярно-генетических исследований коренного населения Северного Приохотья — коряков и эвенов Магаданской обл. — показали, что частота европейских вариантов митохондриальной ДНК (мтДНК), наследуемой по материнской линии, у них очень мала — лишь у эвенов достигает 4% [7]. Однако частота гаплогрупп Y-хромосомы, унаследованных коряками в результате метисации с мужчинами восточноевропейского (преимущественно русского) происхождения,

довольно высока — 16.7% у коряков и 37.8% у эвенов [8]. Это свидетельствует о достаточно интенсивных межэтнических контактах на территории Северного Приохотья, особенно с участием мужчин восточноевропейского происхождения.

Наличие гендерного сдвига в распределении европейских маркеров ДНК материнского и отцовского происхождения (мтДНК и Y-хромосомы соответственно) в генофонде коряков ставит вопрос о том, какова частота аутосомных вариантов полиморфизма, полученных коряками в результате метисации с восточными европейцами. Наиболее подходящими для исследования этого вопроса представляются маркеры, характеризующиеся высокой популяционной (в данном случае этнорасовой) специфичностью — например, характеризующиеся почти 100%-ным присутствием у европейцев, но почти полным отсутствием у восточноазиатских народов. Для исследования нами отобраны шесть маркеров подобного рода, изученных ранее на этнорасовом уровне [9], и проведен анализ распределения аллелей у коряков и других народов Европы и Восточной Азии.

Пять маркерных локусов расположены в генах, ответственных за контроль пигментации (гены *SLC45A2*, *SLC24A5*, *TYRP1*, *DRD2* и *OCA2*), и один — в гене *EDAR*, который участвует в эктодермальном развитии. В восточноазиатских популяциях, характеризующихся высокой распространенностью варианта rs3827760-С гена *EDAR*, намного чаще отмечаются более прямые и густые волосы и лопатообразные резцы, а также наблюдается увеличение плотности долей в молочных железах, что предположительно способствует повышению количества витамина D и полиненасыщенных жирных кислот в грудном молоке [10]. Белковые продукты указанных выше генов пигментации участвуют в биохимическом пути меланогенеза как мембранные транспортеры меланоцитов (*SLC24A5*, *SLC45A2*, *OCA2*) и ферменты меланогенеза (*TYRP1*) [11]. Ген *DRD2* играет важную роль в развитии нервной системы и синаптической передаче

и экспрессируется в основном в нервных тканях и в коже [12], а у *DRD2*-нокаутированных мышей шерсть темнее, чем у мышей дикого типа [13]. Популяционно-генетические исследования показали, что все шесть отмеченных выше генов находятся под действием положительного отбора в различных региональных группах человека [11, 14, 15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для отбора информативных локусов, позволяющих дифференцировать восточноазиатские и европейские популяции, использованы опубликованные ранее данные в работе [9]. Размер выборки коряков — жителей Северо-Эвенского р-на Магаданской обл. (побережье Охотского моря, координаты 61°55' с. ш. и 159°14' в. д.), составил 32 человека. Информативность маркеров (*I*) рассчитывали по формуле:

$$I = |p_1 - p_2| / (p_1 + p_2), \quad (1)$$

где p_1 и p_2 — частоты аллеля в популяциях 1 и 2 соответственно. Для дальнейшего анализа были отобраны локусы rs16891982 (ген *SLC45A2*), rs1426654 (ген *SLC24A5*), rs1408799 (ген *TYRP1*), rs1076563 (ген *DRD2*), rs3827760 (ген *EDAR*), rs1448485 (ген *OCA2*) (табл. 1).

Частоты аллелей исследуемых локусов в различных популяциях мира определяли с помощью базы генетических данных dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Сведения о полиморфизме этих локусов у древних индивидов взяты из базы данных Allen Ancient DNA Resource (AADR) (<https://reich.hms.harvard.edu/>). Величину генных потоков рассчитывали по формуле:

$$M = (p_{\text{ANC}} - p_{\text{KRK}}) / (p_{\text{ANC}} - p_{\text{RUS}}), \quad (2)$$

где M — доля привнесенных аллелей, p_{ANC} — частота анализируемого аллеля в древней восточносибирской популяции, p_{KRK} — частота аллеля у современных коряков, p_{RUS} — частота аллеля у русских. Данная формула по смыслу аналогична формулам, приведенным в работах [16, 17]. Принадлежность к древней восточносибирской популяции

Таблица 1. Характеристика исследованных полиморфных локусов

Полиморфизм	Хромосома	Ген	Нуклеотидная позиция	Характер замены
rs1426654	15	<i>SLC24A5</i>	48426484	A>G
rs16891982	5	<i>SLC45A2</i>	33951693	C>G
rs1408799	9	<i>TYRP1</i>	12672097	T>C
rs1076563	11	<i>DRD2</i>	113295909	A>C
rs3827760	2	<i>EDAR</i>	109513601	T>C
rs1448485	15	<i>OCA2</i>	28282741	C>A

Примечание. Характеристика локусов основывается на данных dbSNP относительно геномной сборки GRCh37.p13.

устанавливалась для тех древних индивидов, которые были обнаружены на территории в интервале координат 42.0–70.7° с. ш. и 131.0° в. д. – 170.0° з. д., т. е. примерно от Приморья до Чукотки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отобранные для анализа генетические маркеры характеризуются высокими значениями информативности I , так как частоты аллелей существенно различаются в региональных группах населения мира – у современных восточных азиатов и европейцев (данные для I^1 в табл. 2). Однако, поскольку генофонд современных коряков формировался с участием аллелей, специфичных для восточноевропейского (в основном русского) населения (причем на первых этапах, по всей видимости, происходившего из северных районов Восточной Европы [18]), то для расчетов нами были использованы данные о частоте аллелей у русского населения северо-запада европейской части России (Псковской и Новгородской областей, $N = 95$) [9]. Кроме этого, чтобы охарактеризовать генофонд коряков до периода европейского влияния, нами были использованы данные о распределении исследуемых генетических маркеров у древних жителей самой восточной части Сибири на протяжении последних 10 тыс. лет. Известно, что наиболее древнее позднелептостенолитическое население Сибири сменилось примерно 14 тыс. лет назад и позже выходцами из Восточной Азии (вероятнее всего, Приамурья), в результате чего сформировались сибирские

популяции, давшие начало предкам как палеосибирских народов, так и америндов [19, 20].

Использование палеогеномных данных привело к тому, что информативность анализируемых генетических маркеров увеличилась во всех случаях, за исключением варианта rs1448485-С гена *OCA2* (показатель I^2 в табл. 2). Необходимо отметить, что в случае генов *SLC24A5*, *SLC45A2* и *TYRP1* исследуемые аллели, специфичные для европейцев, отсутствовали в выборках древнего населения Восточной Сибири как в интервале от примерно 1 тыс. лет назад до 9 тыс. лет назад, так и у трех самых древних образцов с Янской стоянки (возрастом примерно 32 тыс. лет) и стоянки Дуванный Яр (возрастом примерно 9 тыс. лет) (табл. 3). Единичный случай появления аллеля rs1076563-С гена *DRD2* зарегистрирован у индивида возрастом примерно 6.2 тыс. лет с территории современной Якутии. Для маркера в гене *EDAR* наблюдается более сложная картина распространения. У самых древних индивидов выявлен вариант rs3827760-Т, характерный для жителей западной части Евразии, однако у более позднего населения Восточной Сибири произошло замещение этого аллеля на альтернативный вариант rs3827760-С. Предполагается, что смена населения началась примерно 14–19 тыс. лет назад, а основным генетическим источником в процессах заселения северо-востока Азии и формирования населения Берингии было древнее население Приамурья, которое привнесло адаптивный вариант rs3827760-С гена *EDAR* на Крайний Север [20].

Таблица 2. Частоты аллелей, их информативность и величина потока генов (M) для коряков относительно данных для современных и древних популяций Евразии

Популяция, показатель	<i>SLC24A5</i>	<i>SLC45A2</i>	<i>TYRP1</i>	<i>DRD2</i>	<i>EDAR</i>	<i>OCA2</i>
	rs1426654-A	rs16891982-G	rs1408799-C	rs1076563-C	rs3827760-T	rs1448485-C
Восточная Азия	0.013	0.002	0.017	0.059	0.084	0.118
Европа	0.995	0.969	0.694	0.585	0.987	0.868
Русские	0.99	0.974	0.653	0.521	0.984	0.858
Коряки	0.146	0.037	0.047	0.031	0.049	0.109
Восточная Сибирь, древняя	0	0	0	0.024	0	0.158
I^1	0.975	0.996	0.952	0.817	0.843	0.761
I^2	1.0	1.0	1.0	0.912	1.0	0.689
M	0.147	0.038	0.072	0.014	0.05	0

Примечание. Величины информативности маркеров приводятся по данным о частотах аллелей у населения Восточной Азии и Европы (I^1) и у древних жителей Восточной Сибири и у русских (I^2). Частоты аллелей приводятся для населения Восточной Азии и Европы по базе данных dbSNP, для русских и коряков – по работе [9], для древних восточных сибиряков – по базе данных Allen Ancient DNA Resource.

Таблица 3. Частота исследуемых аллелей у древнего населения Восточной Сибири

Возраст	<i>SLC24A5</i> rs1426654-A	<i>SLC45A2</i> rs16891982-G	<i>TYRP1</i> rs1408799-C	<i>DRD2</i> rs1076563-C	<i>EDAR</i> rs3827760-T	<i>OCA2</i> rs1448485-C
1–9 тыс. лет назад	0 (0/25)	0 (0/43)	0 (0/28)	0.024 (1/41)	0 (0/42)	0.158 (3/19)
> 9 тыс. лет назад	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	1.0 (3/3)	0.33 (1/3)

Примечание. В скобках показано соотношение количества анализируемых аллелей к общему числу аллелей в выборках.

История появления аллеля rs1448485-C гена *OCA2* на востоке Сибири, вероятнее всего, имеет более сложный характер и не связана напрямую с миграциями европейцев. Согласно данным базы AADR, у самых древних образцов с Янской стоянки (примерно 32 тыс. лет назад) наблюдаются оба аллеля локуса rs1448485, а в более позднее время аллель rs1448485-C был зарегистрирован у населения Приморья (примерно 7.7 тыс. лет назад), Якутии (4.2 тыс. лет назад) и Чукотки (около 1 тыс. лет назад). Поэтому, несмотря на существенные различия по распространенности этого генетического варианта у современного населения Восточной Азии и Европы, он не может надежно маркировать наличие контактов между древними коряками и восточными европейцами. Как видно из табл. 2, информативность этого генетического варианта также находится на самом низком уровне. Соответственно, поскольку частота варианта rs1448485-C у современных коряков ниже, чем у древних жителей Восточной Сибири, то величина притока этого аллеля (*M*) оценивается как нулевая (см. табл. 2). Однако из-за отмеченных выше сложностей в истории появления варианта rs1448485-C гена *OCA2* на востоке Сибири вопрос о величине его потока со стороны восточных европейцев в относительно недавнее время остается открытым.

Таким образом, результаты анализа показали, что приток аллелей, специфичных для европейцев, в генофонд коряков можно охарактеризовать как крайне неравномерный. Минимальная величина (1.4%) отмечается для варианта rs1076563-C гена *DRD2*, а максимальная (14.7%) — для варианта rs1426654-A гена *SLC24A5*, остальные маркеры показали промежуточные значения генного потока *M*. Как отмечалось выше, по материнской линии (по мтДНК) у коряков практически отсутствуют европейские варианты гаплотипов [7], однако по отцовской линии (по Y-хромосоме) метисация с мужчинами восточноевропейского происхождения довольно высока — 16.7% [8].

Неравномерность проявления популяционно-специфичных вариантов полиморфизма при межрасовой метисации ранее отмечалась в ряде исследований. Еще в ранних работах, основанных на анализе распределения биохимических маркеров

крови, была обнаружена гетерогенность распределения специфичных для европейцев вариантов полиморфизма в смешанных по происхождению афроамериканских популяциях [16]. Это объяснялось действием естественного отбора в отношении некоторых аллелей, однако ре-анализ данных показал, что, вероятнее всего, другие факторы (малое число исследованных генетических маркеров, относительно небольшие размеры изученных выборок, неопределенности, связанные с определением частот анализируемых аллелей в популяциях-источниках) также могли привести к гетерогенности частот аллелей в смешанных популяциях [21].

Новое развитие это направление популяционной генетики получило уже относительно недавно в рамках полногеномных исследований. Анализ плотных панелей генетических маркеров показал, что естественный отбор действительно влияет на распределение аллелей, связанных с тем или иным этнорасовым компонентом генофонда. Так, исследование пуэрториканцев, происхождение которых связано со смешением представителей трех рас (европейцев, африканцев и америндов), позволило выявить несколько хромосомных участков, в которых наблюдается дефицит аллелей, специфичных для европейцев [22]. По мнению авторов этой работы, подобного рода дефицит вызван действием отбора против накопления вариантов полиморфизма, которые не могут быть адаптивно значимыми в условиях проживания в Новом Свете. Результаты более поздних исследований смешанных популяций Америки оказались довольно противоречивыми: в одних работах отмечалось влияние отбора на представленность африканских и европейских вариантов полиморфизма [23], а в других подобного рода влияние опровергалось [24]. Однако во многих работах отмечались отклонения аллельного распределения в геномных областях, ответственных за иммунный ответ (*HLA*-локусы) или связанных с раковыми и аутоиммунными заболеваниями [22, 25–28]. Все это свидетельствует в пользу гипотез о том, что межрасовое смешение сопровождается адаптивным отбором, затрагивающим функциональные геномные варианты [29].

Полученные в настоящем исследовании результаты также свидетельствуют о гетерогенности частот аллелей, специфичных для европейцев, в генофонде коряков. Причем некоторые из них (например, rs1076563-С гена *DRD2* и rs16891982-G гена *SLC45A2*), по всей видимости, недопредставлены в “европейском” генетическом компоненте генофонда коряков и поэтому вполне вероятно, что формирование генетической структуры современных коряков в условиях активной метисации сопровождалось действием отбора на некоторые участки генома. Мы предполагаем, что метисация могла отразиться и на состоянии здоровья коренных народов Крайнего Севера. Для прояснения этих вопросов необходимы более масштабные генетические исследования современного и древнего коренного населения Крайнего Севера. В последние годы значительно интенсифицировались исследования полиморфизма генов, контролирующих пигментацию глаз, волос и кожи, в популяциях России и соседних стран, население которых формировалось в результате межэтнического смешения на протяжении длительного времени [30–34]. Поэтому вопрос о наследовании популяционно-специфичных вариантов полиморфизма в смешанных по происхождению группах населения требует более пристального внимания.

В данной работе использовались только литературные данные.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гурвич И.С. Этническая история Северо-Востока Сибири. М.: Наука, 1966. 269 с.
2. Хаховская Л.Н. Культура этнолокального сообщества (коряки села Верхний Парень). М., СПб.: Нестор-История, 2018. 278 с.
3. Гребенюк П.С., Федорченко А.Ю., Лебединцев А.И., Малярчук Б.А. Древние культуры Крайнего Северо-Востока Азии и этногенетические реконструкции // Томский журн. лингв. и антропол. исследований. 2019. № 2. С. 110–136. doi: 10.23951/2307-6119-2019-2-110-136
4. Хаховская Л.Н. Коренное население края во второй половине XX века. Электронный ресурс. URL: <http://kayur-travel.ru/index.php?newsid=43> (дата обращения – 25.01.2024).
5. Балановская Е.В., Богунов Ю.В., Богунова А.А. и др. Демографическая ситуация в чукотских селениях севера Камчатки // Вестн. Моск. ун-та. Сер.: XXIII. Антропология. 2020. № 1. С. 87–97. doi: 10.32521/2074-8132.2020.1.087-097
6. Балановская Е.В., Богунов Ю.В., Богунова А.А. и др. Демографический портрет коряков севера Камчатки // Вестн. Моск. ун-та. Серия XXIII. Антропология // 2020. № 4. С. 111–122. doi: 10.32521/2074-8132.2020.4.111-122
7. Derenko M., Denisova G., Litvinov A. et al. Mitogenomics of the Koryaks and Evens of the northern coast of the Sea of Okhotsk // J. Hum. Genet. 2023. V. 68. P. 705–712. doi: 10.1038/s10038-023-01173-x
8. Малярчук Б.А., Деренко М.В. Генетическая история коряков и эвенов Магаданской области по данным о полиморфизме Y-хромосомы // Вавил. журн. генет. и селекции. 2024. Т. 28. № 1. С. 90–97. doi: 10.18699/vjgb-24-11
9. Rogalla U., Rychlicka E., Derenko M.V. et al. Simple and cost-effective 14-loci SNP assay designed for differentiation of European, East Asian and African samples // Forensic Sci. Int. Genet. 2015. V. 14. P. 42–49. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.09.009
10. Hlusko L.J., Carlson J.P., Chaplin G. et al. Environmental selection during the last ice age on the mother-to-infant transmission of vitamin D and fatty acids through breast milk // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. P. E4426–E4432. doi: 10.1073/pnas.1711788115
11. Sturm R.A., Duffy D.L. Human pigmentation genes under environmental selection // Genome Biol. 2012. V. 13. doi: 10.1186/gb-2012-13-9-248
12. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A. et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. The gene ontology consortium // Nat. Genet. 2000. V. 25. P. 25–29. doi: 10.1038/75556
13. Yamaguchi H., Aiba A., Nakamura K. et al. Dopamine D2 receptor plays a critical role in cell proliferation and proopiomelanocortin expression in the pituitary // Genes Cells. V. 1. P. 253–268. doi: 10.1046/j.1365-2443.1996.d01-238.x
14. Lao O., de Gruijter J.M., van Duijn K. et al. Signatures of positive selection in genes associated with human skin pigmentation as revealed from analyses of single nucleotide polymorphisms // Ann. Hum. Genet. 2007. V. 71. P. 354–369. doi: 10.1111/j.1469-1809.2006.00341.x
15. Sabeti P.C., Varilly P., Fry B. et al. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations // Nature. 2007. V. 449. P. 913–918. doi: 10.1038/nature06250
16. Workman P.L., Blumberg B.S., Cooper A.J. Selection, gene migration and polymorphic stability in a US White and Negro population // Am. J. Hum. Genet. 1963. V. 15. P. 429–437.

17. Животовский Л.А. Генетика природных популяций. Йошкар-Ола: Типография "Вертикаль", 2021. 600 с.
18. Соловьев А.В., Борисова Т.В., Романов Г.П. и др. Генетическая история русских старожилов Арктического побережья Якутии из с. Русское Усолье по данным Y-хромосомы и широкогеномного анализа // Генетика. 2023. Т. 59. № 9. С. 1070–1077. doi: 10.31857/S0016675823090114
19. Sikora M., Pitulko V., Sousa V. et al. The population history of northeastern Siberia since the Pleistocene // Nature. 2019. V. 570. P. 182–188. doi: 10.1038/s41586-019-1279-z
20. Mao X., Zhang H., Qiao S. et al. The deep population history of northern East Asia from the Late Pleistocene to the Holocene // Cell. 2021. V. 184. P. 3256–3266. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.040
21. Long J. The genetic structure of admixed populations // Genetics. 1991. V. 127. P. 417–428. doi: 10.1093/genetics/127.2.417
22. Tang H., Choudhry S., Mei R. et al. Recent genetic selection in the ancestral admixture of Puerto Ricans // Am. J. Hum. Genet. 2007. V. 81. P. 626–633. doi: 10.1086/520769
23. Jin W., Xu S., Wang H. et al. Genome-wide detection of natural selection in African Americans pre- and post-admixture // Genome Res. 2012. V. 22. P. 519–527. doi: 10.1101/gr.124784.111
24. Bhatia G., Tandon A., Patterson N. et al. Genome-wide scan of 29,141 African Americans finds no evidence of directional selection since admixture // Am. J. Hum. Genet. 2014. V. 95. P. 437–444. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.08.011
25. Deng L., Ruiz-Linares A., Xu S., Wang S. Ancestry variation and footprints of natural selection along the genome in Latin American populations // Sci. Rep. 2016. V. 6. doi: 10.1038/srep21766
26. Zhou Q., Zhao L., Guan Y. Strong selection at MHC in Mexicans since admixture // PLoS Genet. 2016. V. 12. doi: 10.1371/journal.pgen.1005847
27. Norris E.T., Rishishwar L., Chande A.T. et al. Admixture-enabled selection for rapid adaptive evolution in the Americas // Genome Biol. 2020. V. 21. P. 29. doi: 10.1186/s13059-020-1946-2
28. Mendoza-Revilla J., Chacón-Duque J.C., Fuentes-Guajardo M. et al. Disentangling signatures of selection before and after European colonization in Latin Americans // Mol. Biol. Evol. 2022. V. 39. doi: 10.1093/molbev/msac076
29. Ongaro L., Mondal M., Flores R. et al. Continental-scale genomic analysis suggests shared post-admixture adaptation in the Americas // Hum. Mol. Genet. 2021. V. 30. P. 2123–2134. doi: 10.1093/hmg/ddab177
30. Balanovska E., Lukianova E., Kagazezheva J. et al. Optimizing the genetic prediction of the eye and hair color for North Eurasian populations // BMC Genomics. 2020. V. 21 (Suppl. 7). P. 527. doi: 10.1186/s12864-020-06923-1
31. Балановская Е.В., Горин И.О., Кошель С.М., Балановский О.П. Генеогеографический атлас ДНК-маркеров, контролирующих цвет глаз и волос человека // Генетика. 2021. Т. 57. № 12. С. 1356–1375. doi: 10.31857/S0016675821120031
32. Фесенко Д.О., Ивановский Д.И., Иванов П.Л. и др. Биочип для генотипирования полиморфизмов, ассоциированных с цветом глаз, волос, кожи, группой крови, половой принадлежностью, основной гаплогруппой Y-хромосомы, и его использование для исследования славянской популяции // Мол. биология. 2022. Т. 56. № 5. С. 860–880. doi: 10.31857/S0026898422050056
33. Фесенко Д.О., Арамова О.Ю., Вдовченко Е.В. и др. ДНК-фенотипирование останков из элитных погребений юга России хазарского времени // Мол. биология. 2023. Т. 57. № 4. С. 597–608. doi: 10.31857/S0026898423040055
34. Bukayev A., Aidarov B., Fesenko D. et al. Genotype data for 60 SNP genetic markers associated with eye, hair, skin color, ABO blood group, sex, core Y-chromosome haplogroups in Kazakh population // BMC Res. Notes. 2024. V. 17. P. 51. doi: 10.1186/s13104-024-06712-z

Uneven Influx of European-Specific Alleles of *SLC45A2*, *SLC24A5*, *TYRP1*, *DRD2*, *EDAR* and *OCA2* Genes into the Gene Pool of the Koryaks

B. A. Malyarchuk^{1, *}, A. N. Litvinov¹

¹*Institute of Biological Problems of the North, Far East. Branch of the Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia*

**e-mail: malyarchuk@ibpn.ru*

The distribution of alleles highly specific to Europeans in the Koryak gene pool, which formed as a result of intensive interethnic admixture in the Northern Priokhotie, characterized by the prevailing genetic contribution from males of Eastern European origin, was analyzed. The loci rs16891982 (*SLC45A2* gene), rs1426654 (*SLC24A5* gene), rs1408799 (*TYRP1* gene), rs1076563 (*DRD2* gene), rs3827760 (*EDAR* gene), and rs1448485 (*OCA2* gene), which are mainly associated with the pigmentation system, were selected for analysis. High heterogeneity was found in the frequency of European-specific alleles, ranging from 1.4% for the variant rs1076563-C of the *DRD2* gene to 14.7% for the variant rs1426654-A of the *SLC24A5* gene. The reasons for the uneven influx of European-specific alleles into the Koryak gene pool are discussed. It is possible that the formation of genetic structure of modern Koryaks under intensive interethnic admixture was accompanied by the influence of natural selection on some parts of the genome.

Keywords: genes *SLC45A2*, *SLC24A5*, *TYRP1*, *DRD2*, *EDAR*, *OCA2*, population-specific alleles, Siberian indigenous populations, interracial admixture.

ДИНАМИКА ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ НАСЕЛЕНИЯ ЮГА ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ ЗА 130-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД. ВОЗРАСТ ВСТУПЛЕНИЯ В БРАК

© 2024 К. Н. Сергеева¹, Ю. И. Гончарова¹, А. С. Невинных¹, И. В. Батлуцкая¹,
С. Н. Сокорев¹, И. Н. Сорокина^{1, *}

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

*e-mail: Sorokina_5@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принята к публикации 03.05.2024 г.

В статье представлены результаты оценки динамики возраста вступления в брак репродуктивной части населения юга Центральной России, являющегося одним из факторов динамики генетической структуры последующих поколений. За 130 лет (с 1890–1910 гг. по 2016–2018 гг.) произошло увеличение возраста вступления в брак как мужчин (+ 5.11 лет, с 24.05 до 29.16 лет), так и женщин (+ 5.78 лет, с 20.39 до 26.17 лет), а средняя разница в возрасте супругов уменьшилась на 0.66 (с 3.66 до 3.00 лет). В конце XIX в. брачный возраст городского населения репродуктивной части популяции был выше, чем сельского (особенно среди мужчин). К середине XX в. средний возраст вступления в брак у сельского населения увеличился, превысив показатели города, и данная тенденция сохранилась в последующие поколения до 2016–2018 гг. Произошло снижение средней разницы в возрасте супругов, особенно в городской части популяции. В конце XIX в. средняя разница в возрасте супругов у городских жителей была выше в 1.4 раза, чем у сельских, а к началу XXI в., наоборот – в 1.4 раза ниже. Положительная брачная ассортативность по возрасту супругов возросла за 130-летний период (в 1.2 раза) как в городе, так и в селе, но была более значима для жителей сельской местности (за исключением периода 1991–1993 гг.). Изменения среднего брачного возраста супругов, происходящие последние десятилетия, имеют особую значимость с медико-генетической точки зрения (особенно возраст вступления в брак женщин), так как этот показатель потенциально значим для детерминации распространенности ряда наследственных заболеваний среди населения. Изучение возраста вступления в брак позволяет выявлять неблагоприятные тенденции и риски потенциального негативного изменения структуры генофондов (и, соответственно, уровня здоровья) последующих поколений.

Ключевые слова: средний брачный возраст, средняя разница в возрасте супругов, брачная ассортативность.

DOI: 10.31857/S0016675824100085 **EDN:** WEXZHE

В современном мире генетические исследования становятся все более востребованными и важными, в том числе для прогнозирования динамики структуры генофондов и уровня здоровья народонаселения различных регионов [1–4]. Одним из ключевых факторов, который важно учитывать при проведении популяционно-генетических исследований, является возраст вступления в брак [1–3]. Многочисленные исследования, посвященные анализу брачного возраста населения, указывают на географическую и временную вариативность данного показателя. Территориальные особенности брачно-возрастных параметров установлены в Архангельской, Томской, Кемеровской,

Тюменской областях, в Краснодарском крае, Республике Марий Эл, Туркмении, Казахстане, ряде городов России и др. [1–16]. В исследованиях российских [1, 3, 12] и зарубежных [17, 18] ученых отмечается наличие брачной ассортативности по возрасту среди населения, которая является значимым фактором популяционно-генетической структуры, при этом степень выраженности и динамика брачной ассортативности по возрасту имеет особенности в различных этно-территориальных группах населения.

Изменения среднего брачного возраста приводят к изменению продолжительности поколений. Оказывая влияние на возрастные границы и

продолжительность периода воспроизводства населения, данный показатель выступает одним из факторов динамики генетической структуры последующих поколений [1, 2]. Кроме того, повышение среднего брачного возраста супругов приводит к нарушению возрастных границ репродуктивного оптимума, что может способствовать возникновению неблагоприятных генетических вариантов и их передаче потомкам. Так, исландские генетики показали, что увеличение возраста отца на один год прибавляет в среднем потомству 1.5 мутации, а аналогичное увеличение возраста матери добавляет 0.37 дополнительных мутаций [19]. С увеличением среднего брачного возраста и возраста деторождения возрастает риск возникновения хромосомных патологий, накапливается генетический груз популяции [1]. Таким образом, анализ возраста вступления в брак представляет интерес также для прогноза генетического здоровья последующих поколений.

Данное сообщение продолжает серию работ [20–22], посвященных изучению динамики ряда популяционно-демографических показателей среди населения юга Центральной России, и представляет результаты изучения возраста вступления в брак населения Белгородской области в динамике за 130-летний период (с 1890-х гг. по 2018 г.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом настоящего исследования выступали районные популяции Белгородской области: Белгородский, Грайворонский, Корочанский, Новооскольский, Старооскольский уезды (районы), которые входили в состав Курской губернии, затем Курской области, а после 1954 г. отошли к Белгородской области. Другие уезды (районы) – Бирючанский (позже Красногвардейский и частично Алексеевский) и Валуйский до 1954 г. входили в состав Воронежской губернии, затем Воронежской области, после 1954 г. являются районами Белгородской области. Детальные характеристики изучаемых районов и критерии их включения изложены в ранее представленных работах [19, 20]. Исследование проводилось за пять временных периодов: 1890–1910 гг., 1951–1953 гг., 1978–1980 гг., 1991–1993 гг. и 2016–2018 гг.

Материалом для исследования послужили данные записей церковно-приходских книг Архива ЗАГС Белгородской области конца XIX в. (1890–1910 гг. – 4925 записей), а также актов гражданского состояния областного архива ЗАГС за 1951–1953 гг. (5128 записей), 1978–1980 гг. (14819 записей), 1991–1993 гг. (6128 записей) и 2016–2018 гг. (8130 записей). Из актовых записей тотально выкопировалась информация о возрасте женихов и невест. Всего было проанализировано 39130 записей. Из анализа были исключены расторгнутые браки

и браки, где один из супругов был пострепродуктивного возраста, так как данные пары не участвуют в формировании генофонда последующего поколения.

В работе приведен анализ возраста вступления в брак в репродуктивной части популяции (для мужчин возраст до 55 лет, для женщин – до 45 лет), средней разницы в возрасте между супругами. Метрой оценки степени брачной ассортативности по возрасту супругов выступал парный коэффициент Пирсона r [23, 24]. Средний возраст вступления в брак женихов и невест определялся как среднее арифметическое путем деления общего числа человеко-лет (сумма значений возраста женихов/невест) на количество женихов/невест [25]. Обработка информации проводилась с использованием программ Excel (10), Statistica (v10).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Возраст вступления в брак населения юга Центральной России

1890–1910 гг. Изучение брачного возраста репродуктивной части населения в уездах Курской и Воронежской губерний в 1890–1910 гг. показало, что средний брачный возраст мужчин (24.05 года) превышал на 3.66 года соответствующий показатель у женщин (20.39 года) (табл. 1). Возрастные показатели вступающих в брак мужчин и женщин в Курской и Воронежской губерниях не отличались как в пределах губерний, так и между ними. В городской части популяции выше по сравнению с сельским населением возраст вступления в брак (на 2.33 года у мужчин и на 0.91 года у женщин) и его вариабельность (Δ – разница между наименьшим и наибольшим возрастом вступления в брак), особенно среди мужчин (в городе $\Delta 4.35$ года у мужчин и $\Delta 2.03$ года у женщин; в селе $\Delta 3.16$ года у мужчин и $\Delta 0.83$ года у женщин). В конце XIX в. наблюдалась выраженная брачная ассортативность по возрасту вступления в брак (в среднем по региону – $r = 0.638$, $p < 0.001$) (см. табл. 1).

1951–1953 гг. К середине XX в. в районах Курской и Воронежской областей значительно увеличился возраст вступления в брак (+ 4.00 года у мужчин и + 5.18 лет у женщин) и уменьшилась средняя разница в возрасте между супругами (– 1.18 года) по сравнению с концом XIX в. (табл. 2). Возрастные показатели вступающих в брак в Воронежской области несколько превышали аналогичные показатели в Курской области (на 0.84 года у мужчин и на 0.79 года у женщин). В среднем по региону изменчивость брачного возраста была выше в городах ($\Delta 7.14$ года у мужчин и $\Delta 5.14$ года у женщин) по сравнению с сельской местностью ($\Delta 5.22$ года у мужчин и $\Delta 3.09$ года у женщин) и практически отсутствовала разница в

Таблица 1. Половозрастные характеристики ($x \pm \sigma$, r) вступивших в брак в Курской и Воронежской губерниях в 1890–1910 гг.

Популяции		Количество		Средний возраст вступивших в брак			r ($p < 0.001$)
		мужчин	женщин	мужчины	женщины	разница	
Уезды Курской губернии	Белгородский	841	841	24.53 ± 0.22	20.70 ± 0.14	3.83 ± 0.08	0.575
	город	252	252	25.66 ± 0.40	20.90 ± 0.26	4.76 ± 0.14	0.573
	село	589	589	24.04 ± 0.26	20.61 ± 0.16	3.43 ± 0.10	0.577
	Старооскольский	791	791	24.79 ± 0.24	20.88 ± 0.15	3.91 ± 0.09	0.570
	город	165	167	27.15 ± 0.45	22.02 ± 0.34	5.13 ± 0.11	0.407
	село	626	624	24.17 ± 0.27	20.58 ± 0.17	3.59 ± 0.10	0.634
	Новооскольский	727	726	23.75 ± 0.22	20.13 ± 0.13	3.62 ± 0.09	0.495
	город	302	301	24.96 ± 0.35	20.17 ± 0.23	4.79 ± 0.12	0.438
	село	425	425	22.89 ± 0.28	20.10 ± 0.16	2.79 ± 0.12	0.538
	Корочанский	364	364	24.69 ± 0.32	20.51 ± 0.18	4.18 ± 0.14	0.541
	город	162	162	26.94 ± 0.49	21.25 ± 0.32	5.69 ± 0.17	0.574
	село	202	202	22.89 ± 0.37	19.93 ± 0.19	2.96 ± 0.18	0.441
	Грайворонский	789	788	23.00 ± 0.20	19.95 ± 0.12	3.05 ± 0.08	0.631
	город	320	320	22.80 ± 0.29	20.08 ± 0.17	2.72 ± 0.12	0.596
	село	469	468	23.14 ± 0.28	19.85 ± 0.16	3.29 ± 0.12	0.652
	В среднем по губернии	702	702	24.15 ± 0.24	20.43 ± 0.14	3.72 ± 0.10	0.562
	город	240	240	25.50 ± 0.40	20.88 ± 0.26	4.62 ± 0.14	0.518
	село	462	462	23.43 ± 0.29	20.21 ± 0.17	3.22 ± 0.12	0.568
Уезды Воронежской губернии	Валуйский	818	812	23.54 ± 0.25	20.32 ± 0.17	3.22 ± 0.08	0.761
	город	189	187	25.96 ± 0.52	22.11 ± 0.32	3.85 ± 0.20	0.658
	село	629	625	22.82 ± 0.29	19.78 ± 0.19	3.04 ± 0.10	0.772
	Бирючанский	584	581	24.07 ± 0.29	20.23 ± 0.19	3.84 ± 0.10	0.665
	город	257	256	25.23 ± 0.39	20.62 ± 0.26	4.61 ± 0.13	0.544
	село	327	325	23.16 ± 0.40	19.92 ± 0.27	3.24 ± 0.13	0.763
	В среднем по губернии	701	697	23.81 ± 0.27	20.28 ± 0.18	3.53 ± 0.09	0.713
	город	223	222	25.60 ± 0.46	21.37 ± 0.29	4.23 ± 0.17	0.601
	село	478	475	22.99 ± 0.35	19.85 ± 0.23	3.14 ± 0.12	0.768
	<i>В среднем по региону</i>	702	700	24.05 ± 0.25	20.39 ± 0.15	3.66 ± 0.10	0.638
	<i>город</i>	235	235	25.53 ± 0.41	21.02 ± 0.27	4.51 ± 0.14	0.559
	<i>село</i>	467	465	23.30 ± 0.31	20.11 ± 0.19	3.19 ± 0.12	0.668

Примечание. $x \pm \sigma$ – средний возраст вступления в брак ± ошибка среднего; r – парный коэффициент Пирсона, оценивающий степень брачной ассортативности по возрасту супругов.

Таблица 2. Половозрастные характеристики ($x \pm \sigma$, r)* вступивших в брак в Курской и Воронежской областях в 1951–1953 гг.

Популяции		Количество		Средний возраст вступления в брак			r ($p < 0.001$)
		мужчин	женщин	мужчины	женщины	разница	
Районы Курской области	Белгородский	1155	1135	28.21 ± 0.23	25.87 ± 0.18	2.34 ± 0.05	0.799
	город	397	387	28.60 ± 0.38	26.14 ± 0.30	2.46 ± 0.08	0.754
	село	758	748	28.00 ± 0.28	25.74 ± 0.23	2.26 ± 0.05	0.820
	Старооскольский	667	666	27.89 ± 0.25	25.99 ± 0.22	1.90 ± 0.03	0.768
	город	189	188	28.42 ± 0.52	25.84 ± 0.43	2.58 ± 0.09	0.781
	село	478	478	27.68 ± 0.28	26.06 ± 0.26	1.62 ± 0.02	0.766
	Новооскольский	630	628	27.35 ± 0.26	25.38 ± 0.22	1.97 ± 0.04	0.710
	город	98	96	28.62 ± 0.76	25.22 ± 0.59	3.40 ± 0.17	0.697
	село	532	532	27.12 ± 0.27	25.41 ± 0.24	1.71 ± 0.03	0.716
	Корочанский	555	500	29.86 ± 0.44	25.43 ± 0.31	4.43 ± 0.13	0.878
	город	156	156	28.36 ± 0.99	27.17 ± 0.93	1.19 ± 0.06	0.739
	село	399	344	31.51 ± 0.53	26.48 ± 0.39	5.03 ± 0.14	0.883
	Грайворонский	635	622	25.73 ± 0.27	24.04 ± 0.21	1.69 ± 0.06	0.780
	город	112	112	23.29 ± 0.30	21.73 ± 0.30	1.56 ± 0.00	0.636
	село	523	510	26.29 ± 0.32	24.56 ± 0.25	1.73 ± 0.07	0.782
	<i>В среднем по области</i>	728	710	27.81 ± 0.29	25.34 ± 0.23	2.47 ± 0.06	0.787
	<i>город</i>	190	188	27.46 ± 0.59	25.22 ± 0.51	2.24 ± 0.08	0.721
	<i>село</i>	538	522	28.12 ± 0.34	25.65 ± 0.27	2.47 ± 0.07	0.793
Районы Воронежской области	Валуйский	663	617	31.12 ± 0.38	27.47 ± 0.30	3.65 ± 0.08	0.864
	город	181	176	30.43 ± 0.67	27.02 ± 0.55	3.41 ± 0.12	0.886
	село	482	441	31.38 ± 0.46	27.65 ± 0.35	3.73 ± 0.11	0.862
	Алексеевский	503	502	26.17 ± 0.29	24.79 ± 0.27	1.38 ± 0.02	0.830
	город	161	160	25.73 ± 0.47	24.49 ± 0.45	1.24 ± 0.02	0.846
	село	342	342	26.37 ± 0.37	24.93 ± 0.33	1.44 ± 0.04	0.824
	<i>В среднем по области</i>	583	560	28.65 ± 0.34	26.13 ± 0.29	2.52 ± 0.05	0.847
	<i>город</i>	171	168	28.08 ± 0.57	25.76 ± 0.50	2.32 ± 0.07	0.866
	<i>село</i>	412	392	28.88 ± 0.42	26.29 ± 0.34	2.59 ± 0.08	0.843
	<i>В среднем по региону</i>	687	667	28.05 ± 0.30	25.57 ± 0.24	2.48 ± 0.06	0.817
	город	185	182	27.64 ± 0.58	25.37 ± 0.51	2.27 ± 0.07	0.794
	село	502	485	28.34 ± 0.36	25.83 ± 0.29	2.51 ± 0.07	0.818

Примечание. * – значения $x \pm \sigma$, r см. в табл. 1.

возрасте супругов среди городского и сельского населения. Брачная ассортативность по возрасту супругов к середине XX в. была более выражена по сравнению с концом XIX в. ($r = 0.817, p < 0.001$) без значимых различий между городом и селом (см. табл. 2).

1978–1980 гг. К 1978–1980 гг. в районах Белгородской области уменьшился средний возраст вступления в брак как у мужчин (–3.41 года), так и у женщин (–3.77 года), при этом увеличилась и разница в возрасте супругов, составив 2.84 года. Вариабельность среднего брачного возраста была небольшая как у мужчин ($\Delta 2.27$ года), так и у женщин ($\Delta 1.15$ года) (табл. 3). К 1978–1980 гг. различий по брачному возрасту между городской и сельской частями популяции не наблюдали, при этом средняя разница в возрасте супругов в городах была ниже, чем в селе. Положительная брачная ассортативность по возрасту супругов несколько

уменьшилась по сравнению с предыдущим периодом ($r = 0.785, p < 0.001$).

1991–1993 гг. В 1991–1993 гг. возрастные параметры вступающих в брак практически не изменились по сравнению с серединой XX в.: средний брачный возраст мужчин увеличился на 0.9 года, составив 25.54 года, а у женщин – на 0.54 года, составив 22.34 года, при незначительном увеличении разницы в возрасте супругов – до 3.20 года (табл. 4). Вариабельность возрастных показателей не отличалась среди мужчин ($\Delta 2.1$ года) и женщин ($\Delta 2.08$ года). В среднем по области в городах и селах возраст вступления в брак не отличался среди мужчин, а среди женщин был выше в городах. Средняя разница в возрасте супругов в городах была ниже, чем в селе. К концу XX в. сохранилась и даже несколько увеличилась положительная брачная избирательность по возрасту супругов ($r = 0.810, p < 0.001$), максимально

Таблица 3. Половозрастные характеристики ($x \pm \sigma, r$)* вступивших в брак в Белгородской области в 1978–1980 гг.

Популяции	Количество		Средний возраст вступления в брак			r ($p < 0.001$)
	мужчин	женщин	мужчины	женщины	разница	
Белгородский	4673	4633	23.82 ± 0.07	21.75 ± 0.06	2.07 ± 0.01	0.714
город	3373	3369	23.25 ± 0.06	21.46 ± 0.06	1.79 ± 0.01	0.619
село	1300	1264	25.31 ± 0.20	22.52 ± 0.16	2.79 ± 0.04	0.793
Старооскольский	3233	3170	26.09 ± 0.11	22.51 ± 0.09	3.58 ± 0.02	0.783
город	2132	2095	25.31 ± 0.14	22.87 ± 0.11	2.44 ± 0.03	0.784
село	1101	1075	24.67 ± 0.19	21.81 ± 0.15	2.86 ± 0.04	0.774
Новооскольский	1004	972	24.75 ± 0.22	21.72 ± 0.16	3.03 ± 0.06	0.796
Корочанский	938	936	23.84 ± 0.16	21.77 ± 0.16	2.07 ± 0.00	0.775
Грайворонский	587	570	24.21 ± 0.27	21.41 ± 0.20	2.80 ± 0.07	0.762
Валуйский	1513	1449	25.20 ± 0.19	21.91 ± 0.15	3.29 ± 0.04	0.821
Красногвардейский	1106	1070	24.42 ± 0.20	21.36 ± 0.15	3.06 ± 0.05	0.804
Алексеевский	954	928	24.77 ± 0.22	22.00 ± 0.17	2.77 ± 0.05	0.826
<i>В среднем по области</i>	1751	1716	24.64 ± 0.18	21.80 ± 0.14	2.84 ± 0.04	0.785
<i>город</i>	2753	2732	24.28 ± 0.10	22.17 ± 0.09	2.12 ± 0.02	0.702
<i>село</i>	1201	1170	24.99 ± 0.20	22.17 ± 0.16	2.83 ± 0.04	0.784

Примечание. * – значения $x \pm \sigma, r$ см. в табл. 1.

Таблица 4. Половозрастные характеристики ($x \pm \sigma$, r)* вступающих в брак в Белгородской области в 1991–1993 гг.

Популяции	Количество		Средний возраст вступления в брак			r ($p < 0.001$)
	мужчин	женщин	мужчины	женщины	разница	
Белгородский	1566	1519	26.47 ± 0.21	23.71 ± 0.17	2.76 ± 0.04	0.838
город	1279	1240	26.55 ± 0.23	23.87 ± 0.19	2.68 ± 0.04	0.918
село	287	279	26.13 ± 0.47	23.01 ± 0.41	3.12 ± 0.06	0.792
Старооскольский	996	966	26.72 ± 0.26	23.53 ± 0.22	3.19 ± 0.04	0.853
город	637	626	26.59 ± 0.31	23.98 ± 0.28	2.61 ± 0.03	0.944
село	359	340	26.95 ± 0.45	22.70 ± 0.35	4.25 ± 0.01	0.834
Новооскольский	381	367	25.70 ± 0.39	21.83 ± 0.33	3.87 ± 0.06	0.865
Корочанский	451	445	25.13 ± 0.32	22.16 ± 0.28	2.97 ± 0.04	0.771
Грайворонский	299	290	25.33 ± 0.42	22.03 ± 0.32	3.30 ± 0.10	0.760
Валуйский	842	817	24.84 ± 0.35	21.63 ± 0.30	3.21 ± 0.05	0.841
Красногвардейский	581	571	24.62 ± 0.27	21.64 ± 0.23	2.98 ± 0.04	0.762
Алексеевский	675	661	25.52 ± 0.27	22.17 ± 0.22	3.35 ± 0.05	0.789
<i>В среднем по области</i>	724	705	25.54 ± 0.31	22.34 ± 0.26	3.20 ± 0.05	0.810
<i>город</i>	958	933	26.57 ± 0.27	23.93 ± 0.24	2.65 ± 0.04	0.931
<i>село</i>	323	310	26.54 ± 0.46	22.86 ± 0.38	3.69 ± 0.04	0.813

Примечание. * – значения $x \pm \sigma$, r см. в табл. 1.**Таблица 5.** Половозрастные характеристики ($x \pm \sigma$, r)* вступающих в брак в Белгородской области в 2016–2018 гг.

Популяции	Количество		Средний возраст вступления в брак			r ($p < 0.001$)
	мужчин	женщин	мужчины	женщины	разница	
Белгородский	1946	1929	29.32 ± 0.15	27.00 ± 0.13	2.32 ± 0.02	0.725
город	1009	1010	28.56 ± 0.17	26.67 ± 0.16	1.89 ± 0.001	0.694
село	937	919	29.92 ± 0.22	27.35 ± 0.19	2.57 ± 0.03	0.742
Старооскольский	1876	1827	30.49 ± 0.18	27.68 ± 0.15	2.81 ± 0.03	0.784
Новооскольский	472	455	30.23 ± 0.37	26.88 ± 0.31	3.35 ± 0.05	0.714
Корочанский	418	404	25.37 ± 0.63	22.68 ± 0.57	2.699 ± 0.06	0.760
Грайворонский	397	384	28.45 ± 0.41	24.57 ± 0.36	3.88 ± 0.05	0.784
Валуйский	800	787	29.54 ± 0.26	26.86 ± 0.24	2.68 ± 0.02	0.762
Красногвардейский	621	604	29.83 ± 0.31	26.62 ± 0.27	3.21 ± 0.04	0.764
Алексеевский	889	854	30.12 ± 0.26	27.08 ± 0.22	3.04 ± 0.04	0.755
<i>В среднем по области</i>	927	906	29.16 ± 0.32	26.17 ± 0.28	3.00 ± 0.04	0.756

Примечание. * – значения $x \pm \sigma$, r см. в табл. 1.

проявляясь среди городского населения ($r = 0.931$, при $p < 0.001$) (см. табл. 4).

2016–2018 гг. К 2016–2018 гг. в районах Белгородской области возраст вступления в брак увеличился на 3.26 года у мужчин и на 3.83 года у женщин. Вариабельность брачного возраста увеличилась в 2.5 раза по сравнению с предыдущим периодом без выраженных отличий у мужчин ($\Delta 5.12$ года) и женщин ($\Delta 5.00$ лет), при этом уменьшилась средняя разница в возрасте супругов (табл. 5). В городе средний брачный возраст супругов и средняя разница в возрасте были ниже, чем в селе. Положительная брачная ассортативность по возрасту супругов к 2016–2018 гг. стала менее выражена ($r = 0.756$, $p < 0.001$) без значимых различий между районами.

*Тенденции динамики брачного возраста
репродуктивной части населения
юга Центральной России*

На следующем этапе работы была дана оценка динамики возрастных показателей супругов за 130 лет (с 1890–1910 гг. по 2016–2018 гг.) в разрезе пяти временных периодов (данные представлены

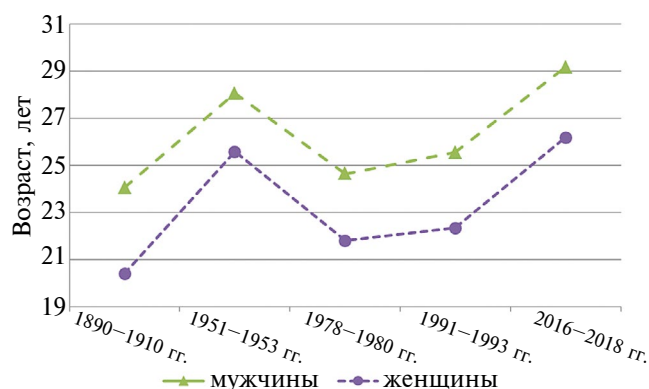


Рис. 1. Динамика среднего брачного возраста супругов Белгородской области.

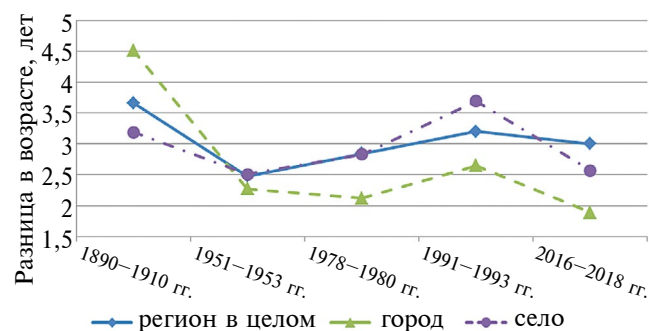


Рис. 2. Динамика средней разницы возраста супругов Белгородской области.

на рис. 1–4). Были выявлены следующие тенденции. Во-первых, средний брачный возраст мужчин на протяжении всего анализируемого временного интервала с 1890 г. по 2018 г. превышал средний брачный возраст женщин (на 2.48–3.66 года) (рис. 1). Во-вторых, за 130 лет увеличился возраст вступления в брак мужчин (+ 5.11 года, с 24.05 года до 29.16 года) и женщин (+ 5.78 года, с 20.39 года до 26.17 года) (см. рис. 1), средняя разница в возрасте супругов уменьшилась на 0.66 года (с 3.66 года до 3.00 лет) (рис. 2). В-третьих, в конце XIX в. брачный возраст городского населения был выше, чем сельского (особенно среди мужчин) (рис. 3). К середине XIX в. средний возраст вступления в брак сельского населения увеличился, превысив показатели города, и данная тенденция сохранилась в последующие поколения до 2016–2018 гг. (см. рис. 3). За 130-летний период произошло снижение средней разницы в возрасте супругов (см. рис. 2), особенно в городской части популяции. Так, если в конце XIX в. средняя разница в возрасте супругов городской части популяции была выше в 1.4 раза,

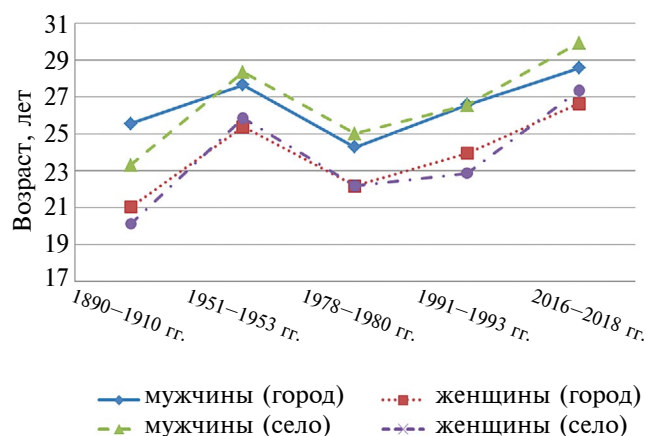


Рис. 3. Динамика среднего брачного возраста супругов среди городского и сельского населения Белгородской области.

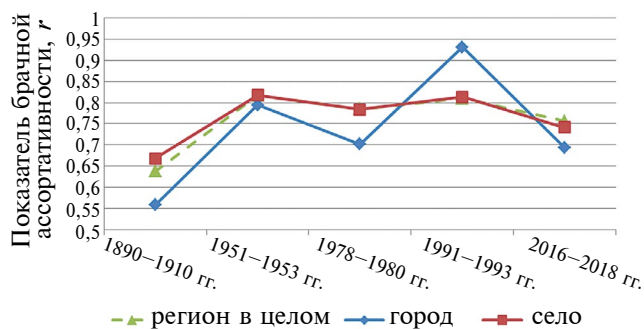


Рис. 4. Динамика брачной ассортативности по возрасту супругов Белгородской области.

чем сельской части, то к началу XXI в., наоборот, — в 1.4 раза ниже (см. рис. 2). В-пятых, брачная ассортативность по возрасту супругов за 130-летний период возросла (в 1.2 раза) как в городе, так и в селе и была более значима для жителей сельской местности (за исключением периода 1991–1993 г.) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В Белгородской области на протяжении ряда поколений (с 1890 г. по 2018 г.) наблюдалось изменение возраста вступления в брак среди лиц репродуктивного возраста. Средний брачный возраст мужчин во все анализируемые временные интервалы с 1890 г. по 2018 г. превышал средний брачный возраст женщин. За 130 лет произошло увеличение возраста вступления в брак как мужчин (в 1.2 раза, с 24.05 года до 29.16 года), так и женщин (в 1.3 раза, с 20.39 года до 26.17 года), а средняя разница в возрасте супругов уменьшилась в 1.2 раза (с 3.66 года до 3.00 лет). Проведенное ранее Л.А. Атраментовой и О.В. Филипцовой [26] исследование белгородской популяции за три временных периода (1960, 1985, 1995 гг.) также показало увеличение брачного возраста мужчин (с 25.80 года до 28.23 года) и женщин (с 23.81 года до 26.13 года), однако, в отличие от наших данных, средняя попарная разница в возрасте за анализируемые 35 лет увеличилась с 1.99 года до 2.10 года [26].

В конце XIX в. брачный возраст городского населения был выше, чем сельского (особенно среди мужчин). К середине XX в. средний возраст вступления в брак сельского населения увеличился, превывсив показатели города, и данная тенденция сохранилась в последующем до 2016–2018 гг. Средняя разница в возрасте супругов в городах была ниже, чем в селах, на протяжении всего прошлого века. За 130-летний период произошло снижение средней разницы в возрасте супругов, особенно в городской части популяции.

За 130-летний период в репродуктивной части населения белгородской популяции увеличилось более чем на 18.5% значение показателя брачной ассортативности по возрасту супругов (с 0.638 до 0.756). Для корректного сопоставления с литературными данными нами был рассчитан показатель брачной избирательности по возрасту супругов во всей популяции Белгородского региона, который с 1890–1910 гг. по 2016–2018 гг. увеличился более чем на 30% (с 0.668 до 0.881). Полученные оценки брачной ассортативности по возрасту в 2016–2018 гг. в Белгородской области оказались сопоставимы с показателями, зарегистрированными в г. Москве (0.88) [3]. Аналогичные тенденции в изменении брачной ассортативности по возрасту отмечались и среди жителей соседнего города Харькова с 1960 г. по 1985 г. [9].

Изменения брачного возраста супругов были установлены ранее для соседней с Белгородской — Курской области, произошедшие с 1960–1963 гг. по 1987–1990 гг. [27]. Во всех районных популяциях Курского региона, так же как и изучаемого нами Белгородского региона, средний брачный возраст мужчин превышал средний брачный возраст женщин. В репродуктивной части популяции Курского региона возрастные параметры женихов и невест (средний брачный возраст мужчин и женщин, средняя разница в возрасте супругов, коэффициент корреляции по брачному возрасту) городской части популяции были выше по сравнению с сельскими жителями. Также было установлено, что за период с 1960–1963 гг. по 1987–1990 гг. в большинстве популяций Курской области наблюдалось снижение возрастных показателей супругов [28], что отличается от полученных нами результатов, а также аналогичных исследований в московской [2], харьковской [9], евпаторийской [10] популяциях, где за 25 лет наблюдался рост возрастных показателей. Увеличение возрастных характеристик вступающих в брак также отмечалось и в Санкт-Петербурге [14], Тамбове [15], Кемеровской области [1, 28]. Позднее вступление в брак было установлено Л.А. Тарской и соавт. среди якутов: средний брачный возраст мужчин составил 27.18 года, женщин 25.31 года [29].

Следует отметить, что изменения среднего брачного возраста супругов, происходящие последние десятилетия, имеют особую значимость с медико-генетической точки зрения (особенно возраст вступления в брак женщин). С одной стороны, данный показатель отражается на возрасте матерей при рождении первого ребенка и в целом на показателе рождаемости. Как свидетельствуют результаты анализа, проведенного в Институте демографических исследований ФНИСЦ РАН, в России возраст вступления в брак к началу XXI в. повысился с 19 до 25 лет у женщин и с 23 до 27 лет у мужчин по сравнению с серединой 1990-х гг., а средний возраст матерей при рождении первого ребенка, снижавшийся с 1960-х гг. до 1994 г. (с 24.4 года до 22.5 лет), возрос и к 2019 г. увеличился до 25–27 лет [30]. Увеличение возраста рождения первого ребенка наблюдается в большинстве стран. Т. Frejka и J.-P. Sardon провели сравнительный анализ показателей возраста матери по ряду экономически развитых стран [31]. Так, например, в Швейцарии, Италии средний возраст женщин при перворождении достигает 30 лет, а в Греции — 31 года [30]. Показатель рождаемости зависит не только от половозрастного состава населения, но и от возрастной структуры лиц, состоящих в браке. Чем выше доля состоящих в браке женщин репродуктивного возраста (особенно 20–29 лет), тем при прочих равных условиях будут выше и показатели рождаемости [30]. Среди множества причин [32]

увеличения среднего возраста вступления в брак мужчин и женщин (и, как следствие, увеличения возраста рождения детей) наиболее значимым фактором является изменение структуры брачной миграции [2].

В представленных нами ранее работах [20–22] было показано изменение структуры браков (в отношении мест рождения супругов) в Белгородском регионе за 130-летний период: значительное снижение (в 1.6–2.2 раза) удельного веса изолакальных браков и существенное увеличение доли гетеролокальных браков (практически в 11 раз). При этом среди городского населения была более выражена динамика изолакальных браков, а среди сельских жителей — динамика гетеролокальных браков [20]. За 130-летний период в среднем по Белгородскому региону увеличились среднеквадратические расстояния между местами рождения супругов с учетом дальних миграций (6.9 раза) и без них (13.3 раза), эффективное давление миграций (1.5 раза) и снизился коэффициент линейного систематического давления миграций (11 раз), эффективный размер популяции (1.3 раза). Уровень локального инбридинга значительно снизился среди городского населения и сохранился среди сельского [21, 22]. Проведенный корреляционный анализ между параметрами изоляции расстоянием Малек и другими изучаемыми популяционно-демографическими показателями в Белгородской области в разрезе пяти временных периодов показал, что с конца XIX в. с ростом среднеквадратических расстояний между местами рождения супругов увеличивались доля выходцев из разных областей ($r = 0,86, p = 0,014$), средний брачный возраст женщин ($r = 0,79, p = 0,036$) и снижались доли супругов из одной области ($r = -0,86, p = 0,014$) и из одного района ($r = -0,86, p = 0,007$). Также увеличение расстояний между местами рождения супругов как с учетом дальних миграций, так и без них приводило к росту доли браков, заключаемых между выходцами из разных областей и снижению удельного веса изолакальных браков. Данные корреляционные взаимосвязи популяционно-демографических показателей сохранялись до 1978–1980 гг., отсутствовали в 90-е гг. XX в. и вновь появились спустя поколение [20–22]. Иными словами, наблюдаемые зависимости между различными генетически значимыми демографическими событиями (особенности браков супругов по местам рождения, дальность миграции, возраст вступления в брак) не случайны, а находятся в определенной связи. Увеличение возраста вступления в брак сопровождается расширением географии мест рождения вступающих в брак, что, в свою очередь, может способствовать увеличению генетического разнообразия последующих поколений и снижению потенциально неблагоприятных эффектов на динамику генофондов изолакальных браков. Однако, наряду

с таким благоприятным эффектом на структуру генофонда, увеличение возраста супругов может способствовать распространению патогенетически значимых генетических вариантов у потомков.

Так, увеличение возраста вступления в брак и возраста материнства и отцовства остро ставит вопрос увеличения и накопления генетического груза в последующих поколениях. Было установлено, что 80,4% новых мутаций происходят в геноме сперматозоида, т. е. имеют отцовское происхождение, и порядка 20% — материнское происхождение [19]. Увеличение возраста отца на один год приводит к увеличению у детей в среднем на 1.47 новых мутаций, а один год возраста матери — на 0.37 [19]. С медицинской точки зрения оптимальный возраст родителей при рождении детей снижает риск развития детей с патологией [1]. Очевидно, что в связи с вышеизложенными изменениями популяционно-демографических показателей населения Белгородского региона необходимо проведение детального анализа динамики врожденных и наследственных заболеваний.

Одним из факторов формирования генетической структуры популяций выступает брачная ассортативность по различным признакам [1, 3]. Увеличение брачной ассортативности по возрасту супругов за 130-летний период (в 1.2 раза) свидетельствует о тенденции к усилению роли избирательности браков по возрасту супругов в формировании популяционно-генетической структуры Белгородского региона. Степень брачной ассортативности по возрасту на всех иерархических уровнях (сельская часть популяции, город, областной центр) среди жителей соседнего Курского региона была несколько выше (0.902–0.914) [27], чем в изучаемой нами Белгородской области. Наши данные и данные по Курской области несколько отличаются от уровня брачной избирательности по возрасту среди сельских популяций Архангельской области (0.397) [33], жителей Краснодарского края (0.589) [6], Кемеровской области (0.66) [1, 28].

Несколько иные тенденции возрастных изменений были установлены среди сельского населения Казахстана, где с 1965–1970 гг. до 1995 г. произошло снижение среднего брачного возраста от 27.85 года до 25.40 года у мужчин и от 24.95 года до 22.59 года у женщин [12]. По данным Г.М. Березиной, к 1995–2000 гг. у женщин данная тенденция снижения возраста вступления в брак сохранилась, и он уменьшился еще до 21.33 года [12]. Эти данные сопоставимы с материалами, полученными по брачному возрасту чувашей (женщины 20.8 года), татар (20.7 года), удмуртов (21.34 года), луговых и горных марийцев (мужчины 25.13 года и 24.37 года соответственно, женщины 21.92 года и 22.23 года соответственно), а также русских популяций Ростовской области (20.55 года) [34–36].

Следует отметить, что возраст вступления в брак является важной характеристикой, играющей существенную роль в формировании брачно-миграционной структуры населения, и может иметь важное медико-генетическое значение, так как этот показатель потенциально значим для детерминации распространенности ряда наследственных заболеваний среди населения [1–4, 23, 34, 35]. Изучение возраста вступления в брак позволяет выявлять неблагоприятные тенденции и риски потенциального негативного изменения структуры генофондов (и, соответственно, уровня здоровья) последующих поколений. Такие знания позволяют своевременно принимать решения по планированию семьи и защите здоровья будущих поколений. В связи с этим особенности возрастной структуры вступающих в брак необходимо учитывать при проведении популяционно-генетических и медико-генетических исследований [37–47].

Работа выполнена без финансирования на личные средства.

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. Ульянова М.В., Кучер А.Н., Лавряшина М.Б. Генетико-демографическое изучение шорцев Таштагольского района Кемеровской области: динамика брачно-миграционной структуры // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 133–139. № 1. Р. 116–121. DOI: 10.1134/S1022795411010170)
2. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Имашева А.Г. Роль миграционных процессов в формировании брачной структуры московской популяции. Сообщ. I. Возраст, место рождения и национальность вступающих в брак // Генетика. 1984. Т. 20. № 3. С. 501–511.
3. Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю. Роль миграционных процессов в формировании брачной структуры Московской популяции. Сообщ. II. Брачная ассортативность в отношении возраста, места рождения и национальности супругов // Генетика. 1988. Т. 24. № 9. С. 1679–1688.
4. Ельчинова Г.И., Кривенцова Н.В., Амелина С.С., Зинченко Р.А. Медико-генетическое обследование населения Ростовской области: временная динамика репродуктивных параметров // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1576–1579.
5. Ревазов А.А., Казаченко Б.Н., Тарлычёва Л.В., Филиппов И.К. К популяционной генетике населения Европейского Севера РСФСР. Сообщ. III. Демографические и генетические характеристики двух сельских советов Пинежского района Архангельской области // Генетика. 1979. Т. 15. № 5. С. 917–926.
6. Сладкова С.В., Ревазов А.А., Голубцов В.И., Кадошникова М.Ю. Анализ структуры городских и сельских популяций центральной части Краснодарского края // Генетика. 1990. Т. 26. № 11. С. 2070–2075.
7. Тураева Ш.М., Некрасова Е.П., Ревазов А.В., Кадышева Е.К. Популяционно-генетическая структура населения г. Ашхабада Туркменской ССР // Генетика. 1991. Т. 27. № 8. С. 1451–1459.
8. Пузырев В.П. Медико-генетическое исследование населения Приполярных регионов. Томск, 1991. 200 с.
9. Атраментова Л.А. Брачная структура населения г. Харькова в отношении генетически значимых социально-демографических признаков // Генетика. 1991. Т. 27. № 5. С. 920–927.
10. Атраментова Л.А., Мещерякова И.П. Генетико-демографические параметры брачной структуры евпаторийской популяции // Генетика. 2007. Т. 43. № 3. С. 400–408.
11. Старцева Е.А., Ельчинова Г.И., Рассанов В.П. и др. Генетико-демографическая характеристика горных марийцев // Генетика. 1996. Т. 32. № 1. С. 110–113. (Startseva E.A., El'chinova G.I., Rassanov V.P., et al. Genetic and demographic characteristics of highland mari // Rus. J. Genetics. 1996. V. 32. № 1. P. 96–98.)
12. Березина Г.М. Генетическая структура сельских популяций Казахстана // Мед. генетика. 2005. Т. 4. № 2. С. 50–55.
13. Кривенцова Н.В., Ельчинова Г.И., Амелина С.С., Зинченко Р.А. Брачно-миграционная характеристика населения Ростовской области // Генетика. 2005. Т. 41. № 7. С. 981–985.
14. Маркова М.А. Брачное поведение сельского населения Санкт-Петербургской губернии в XVIII – первой половине XIX в. (по материалам ревизского и церковно-приходского учета) // Историческая и церковно-приходского учета) // Информационные технологии и математические методы в исторических исследованиях и образовании. 2013. № 2. С. 80–85.
15. Стрекалова Н.В., Стрекалов Д.В. Возраст вступления в брак в провинциальном губернском городе в конце XVIII – первой половине XIX в. (на материалах Тамбова) // Русь, Россия. Средневековье и Новое время. 2019. № 6. С. 276–280.
16. Васильева Л.И. Динамика генетико-демографической структуры населения Курской области. Миграционные процессы // Генетика. 2002. Т. 38. № 4. С. 546–553.

17. *Elwert A.* Opposites attract: Assortative mating and immigrant–native intermarriage in contemporary Sweden // *Eur. J. Population.* 2020. V. 36. P. 675–709. doi.org/10.1007/s10680-019-09546-9
18. *Kolk M.* Age differences in unions: Continuity and divergence among Swedish couples between 1932 and 2007 // *Eur. J. Population.* 2015. V. 31(4). P. 365–382.
19. *Jónsson H., Sulem P., Kehr B. et al.* Parental influence on human germline de novo mutations in 1,548 trios from Iceland // *Nature.* Publ. online 20 September 2017. doi: 10.1038/nature24018.
20. *Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Батлуцкая И.В., Со-рокина И.Н.* Динамика популяционной структуры населения юга Центральной России за 130-летний период. Миграционные процессы // *Генетика.* 2024. Т. 60. № 8. С. 100–117.
21. *Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Гончарова Ю.И. и др.* Изменение популяционной структуры населения Курской и Воронежской губерний в первой половине XX века. Изоляция расстоянием Малеко // *Генетика.* 2024. Т. 60. № 9. С. 90–97.
22. *Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Гончарова Ю.И. и др.* Динамика популяционной структуры населения Белгородской области. Изоляция расстоянием Малеко // *Генетика.* 2024. Т. 60. № 9. С. 98–109.
23. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова М.: Наука, 2004. 619 с.
24. *Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю.* Городские популяции: возможности генетической демографии (миграция, подразделенность, аутбридинг) // *Информ. вестник ВОГиС.* 2006. Т. 10. № 1. С. 155–188.
25. *Новоселова С.В., Денисенко М.Б.* Основы демографии: пособие. Минск: Альтиора – Живые краски, 2012. 133 с.
26. *Атраментова Л.А., Филиппова О.В.* Генетико-демографическая структура белгородской популяции: возраст, национальность, образование, профессия // *Генетика.* 2005. Т. 41. № 6. С. 823–829.
27. *Чурносков М.И.* Генетико-демографическая структура и распространенность мультифакториальных признаков в популяции Курской области: Автореф. дис.... д-ра мед. наук. М., 1997. 40 с.
28. *Лавряшина М.Б., Ульянова М.В., Балановская Е.В.* Коренные народы Южной Сибири: воспроизводство и динамика популяционных генофондов // Новосибирск: Наука, 2016. 311 с.
29. *Тарская Л.А., Ельчинова Г.И., Винокуров В.Н.* Анализ брачных миграций в двух районах Республики Саха (Якутия) // *Генетика.* 2003. Т. 39. № 12. С. 1698–1701.
30. *Архангельский В.Н., Калачикова О.Н.* Возраст матери при рождении первого ребенка: динамика, региональные различия, детерминация // *Эконом. и социальные перемены: факты, тенденции, прогноз.* 2020. Т. 13. № 5. С. 200–217. doi: 10.15838/esc.2020.5.71.12
31. *Frejka T., Sardon J.-P.* First birth trends in developed countries: A cohort analysis // *Demographic Research.* 2006. V. 15. P. 147–180. https://www.demographic-research.org/volumes/vol15/6/15-6.pdf
32. *Ипатов А.А., Тындык А.О.* Репродуктивный возраст: 30-летний рубеж в предпочтениях и биографиях // *Мир России.* 2015. № 4. С. 123–148.
33. *Пасеков В.П., Ревазов А.А.* К популяционной генетике населения европейского севера РСФСР. Сообщ. 1. Данные по структуре шести деревень Архангельской области // *Генетика.* 1975. Т. 11. № 1. С. 141–155.
34. Наследственные болезни в популяциях человека / под ред. Гинтера Е.К. М.: Медицина, 2002. 304 с.
35. *Ельчинова Г.И., Кривенцова Н.В., Амелина С.С., Зинченко Р.А.* Медико-генетическое обследование населения Ростовской области: временная динамика репродуктивных параметров // *Генетика.* 2004. Т. 40. № 11. С. 1576–1579.
36. *Березина Г.М.* Генетико-демографические процессы в сельских популяциях Казахстана и их генетическая дифференциация по митохондриальной ДНК: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2005. 52 с.
37. *Сорокина И.Н., Рудых Н.А., Безменова И.Н. и др.* Популяционно-генетические характеристики и генетико-эпидемиологическое исследование ассоциаций генов-кандидатов с мультифакториальными заболеваниями // *Науч. результаты биомед. исследований.* 2018. Т. 4. № 4. С. 20–30. doi: 10.18413/2313-8955-2018-4-4-0-3
38. *Сергеева К.Н., Соколов С.Н., Ефремова О.А. и др.* Анализ уровня эндогамии популяции как основа популяционно-генетических и медико-генетических исследований // *Науч. рез-ты биомед. ис-след.* 2021. Т. 7. № 4. С. 375–387. doi: 10.18413/2658-6533-2021-7-4-0-4
39. *Moskalenko M.I., Milanova S.N., Ponomarenko I.V. et al.* Study of associations of polymorphism of matrix metalloproteinases genes with the development of arterial hypertension in men // *Kardiologiya.* 2019. V. 59. № 7S. P. 31–39. doi:10.18087/cardio.2598
40. *Eliseeva N., Ponomarenko I., Reshetnikov E. et al.* *LOXLI* gene polymorphism candidates for exfoliation glaucoma are also associated with a risk for primary open-angle glaucoma in a Caucasian population from central Russia // *Mol. Vis.* 2021. V. 27. P. 262–269.
41. *Рашина О.В.* Ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов с развитием *H. Pylori* – негативной язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у жителей Центрального Черноземья России // *Науч. рез-ты биомед. ис-след.* 2023. Т. 9. № 3. С.333–346. doi: 10.18413/2658-6533-2023-9-3-0-4.

42. *Bushueva O., Solodilova M., Churnosov M. et al.* The flavin-containing monooxygenase 3 gene and essential hypertension: The joint effect of polymorphism E158K and cigarette smoking on disease susceptibility // *Int. J. Hypertens.* 2014. V. 2014. doi: 10.1155/2014/712169
43. *Polonikov A., Ryumova L., Klyosova E. et al.* Matrix metalloproteinases as target genes for gene regulatory networks driving molecular and cellular pathways related to a multistep pathogenesis of cerebrovascular disease // *J. Cell Biochem.* 2019. V. 10 P. 16467–16482. doi: 10.1002/jcb.28815
44. *Решетникова Ю.Н., Пономаренко И.В., Чурносоев В.И. и др.* Генетический вариант rs11568818 матричной металлопротеиназы 7 ассоциирован с весом новорожденного у беременных с задержкой роста плода // *Науч. рез-ты биомед. исследований.* 2024. Т. 10. № 2. С. 222–233. doi: 10.18413/2658-6533-2024-10-2-0-4
45. *Tikunova E., Ovtcharova V., Reshetnikov E. et al.* Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia // *Int. J. Ophthalmol.* 2017. V. 10. № 10. P. 1490–1494. doi:10.18240/ijo.2017.10.02
46. *Reshetnikov E., Churnosova M., Stepenov V. et al.* Maternal age at menarche genes polymorphisms are associated with offspring birth weight // *Life.* 2023. V. 13. <https://doi.org/10.3390/life13071525>
47. *Reshetnikov E., Churnosova M., Reshetnikova Y. et al.* Maternal age at menarche genes determines fetal growth restriction risk // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 24. № 25(5). doi: 10.3390/ijms25052647

Dynamics of the Population Structure of the Population of the South of Central Russia Over a 130-Year Period. Age of Marriage

**K. N. Sergeeva¹, Y. I. Goncharova¹, A. S. Nevinnykh¹, I. V. Batlutskaya¹,
S. N. Sokorev¹, I. N. Sorokina^{1, *}**

¹ *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod National Research University»
Belgorod, 308015 Russia*

**e-mail: Sorokina_5@mail.ru*

The article presents the results of assessing the dynamics of the age at marriage of the reproductive part of the population of the south of Central Russia, which acts as one of the factors in the dynamics of the genetic structure of subsequent generations. Over 130 years (from 1890–1910 to 2016–2018), there was an increase in the age of marriage for men (+ 5.11 years, from 24.05 years to 29.16 years) and women (+ 5.78 years, from 20.39 years to 26.17 years) and the average difference in the age of spouses decreased by 0.66 (3.66 to 3.00 years). At the end of the 19th century the marriage age of the urban population of the reproductive part of the population was higher than that of the rural population (especially among men). By the middle of the 19th century the average age of marriage among the rural population increased, exceeding the city indicators and this trend continued in subsequent generations until 2016–2018. There was a decrease in the average age difference between spouses, especially in the urban part of the population. At the end of the 19th century, the average difference in the age of spouses among urban residents was 1.4 times higher than for rural residents, and by the beginning of the 21st century, on the contrary, it was 1.4 times lower. Positive marital assortativeness by age of spouses increased over the 130-year period (1.2 times), both in the city and in the village, but was more significant for residents of rural areas (except for the period 1991–1993). Changes in the average marriage age of spouses that have been occurring in recent decades are of particular significance from a medical-genetic point of view (especially the age at which women marry), since this indicator is potentially significant for determining the prevalence of a number of hereditary diseases among the population. Studying the age at marriage allows us to identify unfavorable trends and risks of potential negative changes in the structure of gene pools (and accordingly, the level of health) of subsequent generations.

Keywords: average age at marriage, average age difference between spouses, assortativity of marriages.

УДК575:599.9

ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1* И *SSTR5-AS1* КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ И ПРОГРЕССИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 Е. А. Филиппова^{1,*}, С. С. Лукина¹, В. И. Логинов^{1,2}, А. М. Бурдённый¹,
И. В. Пронина¹, Н. А. Аржанухина³, Т. П. Казубская³, Э. А. Брага^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

²Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

*e-mail: p.lenyuxa@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.04.2024 г.

После доработки 05.06.2024 г.

Принята к публикации 11.06.2024 г.

Метастазирование в лимфатические узлы относится к наиболее важным факторам плохого прогноза больных РМЖ, пятилетняя выживаемость при метастатическом РМЖ составляет менее 30%. Метилирование ДНК происходит на ранних стадиях онкологических заболеваний, а также играет важную роль в развитии лимфогенных метастазов и может служить диагностическим и прогностическим маркером РМЖ. Биоинформатически отобраны гены днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, предположительно гиперметилованные при РМЖ и связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом и метастазированием. Методом количественной метил-специфичной ПЦР показано статистически значимое повышение уровня метилирования этих генов днРНК в опухолях молочной железы по сравнению с парной нормой. Гиперметилование генов *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* при РМЖ выявлено впервые. Методом статистического анализа установлены положительные корреляции между уровнями метилирования для пар *GAS5* – *HOTAIR* и *SSTR5-AS1* – *HOTAIRM1*. Результат о ко-метиловании *GAS5* и *HOTAIR* при РМЖ согласуется с биоинформатически предсказанным (с привлечением анализа обогащения по функциональной принадлежности и базы данных psPath) участием этих днРНК в регуляции общих сигнальных путей и биологических процессов. Уровень метилирования генов днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* ассоциирован с показателями прогрессии РМЖ (стадий опухолевого процесса, размером опухоли, наличием метастазов в лимфатические узлы). Предложена модель оценки риска развития лимфогенных метастазов в зависимости от уровня метилирования гена *HOTAIRM1*. Таким образом, получены данные о днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* и гиперметиловании их генов как факторе развития и прогрессии метастатического РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, метилирование ДНК, длинные некодирующие РНК, лимфо-генные метастазы.

DOI: 10.31857/S0016675824100096 **EDN:** WEVYTV

Рак молочной железы (РМЖ) по-прежнему занимает первое место по заболеваемости раком во всем мире среди женщин [1]. Причем заболеваемость РМЖ растет с каждым годом, что значительно влияет на здоровье и качество жизни женщин [2]. В последние годы хотя и отмечается значительный прогресс в лечении РМЖ, частота рецидивов и метастазов все еще остается на высоком уровне. Метастазы в лимфатические узлы являются одним из наиболее важных факторов снижения выживаемости больных РМЖ – 5-летняя выживаемость метастатическим РМЖ остается менее 30% [3, 4].

Исследование молекулярных механизмов лимфо-генного метастазирования и поиск новых биомаркеров являются крайне актуальной задачей.

Развитие и прогрессирование РМЖ включает и генетические, и эпигенетические изменения [5, 6]. В последние годы эпигенетические события рассматриваются как решающие факторы возникновения и прогрессирования опухолей. В ряде исследований охарактеризован метиломный ландшафт РМЖ на ранних стадиях, однако есть данные, что он изменяется в ходе эволюции рака от ранних до поздних стадий и таким образом, будучи

определенным на ранних стадиях, не является репрезентативным на поздних стадиях. Данные о статусе динамического и обратимого метилирования ДНК могут служить источником потенциальных маркеров и терапевтических мишеней для лечения РМЖ [7].

Длинные некодирующие РНК (днРНК) представляют собой класс транскриптов длиной более 200 оснований и хорошо известны своим ограниченным потенциалом кодирования белков [8]. Предыдущие исследования выявили ряд днРНК, участвующих в многоуровневой регуляции экспрессии генов, включая регуляцию транскрипции за счет метилирования ДНК или нарушения активности факторов транскрипции. Хотя сообщалось, что многие днРНК aberrантно экспрессируются при РМЖ [9] и участвуют в таких процессах, как апоптоз [10], пролиферация [11] и метастазирование [12], функции и механизмы большинства днРНК в лимфогенном метастазировании РМЖ не выяснены и требуют дальнейших исследований.

Цель данной работы – изучение вклада метилирования группы генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, включая их ко-метилирование, в развитие и прогрессию РМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Парные (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань молочной железы) образцы РМЖ были собраны и морфологически охарактеризованы в Отделе патоморфологии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина на основании классификации ВОЗ [13]. Диагноз поставлен на основании гистологического заключения. Клинико-морфологические характеристики 108 образцов РМЖ представлены в табл. 1.

В исследование брали образцы РМЖ у больных, которые до операции не получали лучевой, химио- или гормонотерапии. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [14]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином и эозином. Образцы тканей хранили при –70 °С. Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора TissueRuptor® II (QIAGEN, Хильден, Германия).

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при –20 °С. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм, степень очистки ДНК определяли по спектру при длинах волн от 230 до 320 нм на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo

Fisher Scientific, Уилмингтон, Делавэр, США); качество ДНК определяли электрофорезом в 0.8%-ном агарозном геле с использованием системы горизонтального электрофореза (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) с последующей визуализацией геля с помощью системы документации геля (Bio-Rad, Калифорния, США). Уровень метилирования генов днРНК анализировали с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени, как описано в работе [15]. Амплификацию проводили на приборе Система ПЦР-детектирования в реальном времени Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, Калифорния) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Москва, Россия) по протоколу производителя. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР для генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1* и контрольного гена *ACTB1* приведены в табл. 2. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК (#G1471; Промега, Калифорния, США). В качестве положительного контроля 100%-ного метилирования использовали коммерческий препарат ДНК (#SD1131; Thermo Fisher Scientific, Уилмингтон, Делавэр).

Таблица 1. Клинико-патоморфологические параметры больных

Клинико-гистологический параметр		Количество образцов
Стадия опухолевого процесса	Ранние стадии (I + II)	80
	III стадия	28
Размер первичной опухоли	T1	21
	T2	68
	T3	9
	T4	10
Лимфогенное метастазирование	Есть	52
	Нет	56
Экспрессия рецептора эстрогена	Есть	87
	Нет	21
Экспрессия рецептора прогестерона	Есть	83
	Нет	25
Экспрессия рецептора HER2	Есть	65
	Нет	43

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и параметры количественной МС-ПЦР

Ген	Праймеры для МС-ПЦР	T _{отж} , °C	Продукт ПЦР, п.н.
<i>GAS5</i>	MF: CGTTATCGTCGGTATTGGAGGGG	185	60
	MR: CGCCCGACGCCTTATCCC		
	UF: TGTTATTGTTGGTATTGGAGGGGTGAG	179	60
	UR: CAACACCTTATCCCCATCTTCTCCA		
<i>HOTAIR</i>	MF: CGGGTTTTTATTTTTTCGTTATTGCG	258	54
	MR: CGACTACTCTCGCCAAATTTCACTACTTC		
	UF: TGGGTTTTTATTTTTTTGTTATTGTGTTATTTTG	258	52
	UR: CAACTACTCTCACCAAATTTCACTACTTCACAC		
<i>HOTAIRM1</i>	MF: TTTAGGCGGCGGTAGTTGTTGC	60	212
	MR: ACCCTCTTCCCTTCTCACCTCTCG		
	UF: GATTTGGAGTGTTGGAGTGAAGAAGA	60	229
	UR: TTACAACCACCCAACAACTCTAACC		
<i>SSTR5-AS1</i>	MF: CGGCGTTAGCGGGTCGAGT	59.4	153
	MR: CGCTCCTTCTAACCCTTCGAC		
	UF: TGTGGGTGGTGTAGTGGGTGAGT	60	168
	UR: ACAAACACCACATCCTTCTAACCCTTC		
<i>ACTB1</i>	F: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	60	132
	R: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA		

Примечание. MF/UF — прямой праймер к метилированному/неметилированному аллелю; MR/UR — обратный праймер к метилированному/неметилированному аллелю. Все олигонуклеотиды подобраны по программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Статистика 22 (IBM, Армонк, Нью-Йорк, США) и в программной среде R. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический U-тест Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Данные выражали в виде медианы (Me), нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. Корреляционный анализ выполняли с использованием метода ранговой корреляции Спирмена и рассчитывали уровень его значимости. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Дискриминантный анализ был проведен для установления зависимости между вероятностью развития метастазов в лимфатических узлах и индексом метилирования генов днРНК. Константа дискриминации, разделяющая исследованные образцы РМЖ на группы, определялась как значение

функции, равноудаленное от центроидов. Значимость различий при сравнении средних значений дискриминантной функции устанавливали с помощью коэффициента λ Уилкса ($p < 0.001$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гиперметилирование генов днРНК GAS5, HOTAIR, HOTAIRM1, SSTR5-AS1 при РМЖ и их вовлеченность в общие биологические процессы

Для отбора генов днРНК, aberrантно метилированных при РМЖ, нами проанализирована база данных MethMarkerDB (<https://methmarkerdb.hzau.edu.cn/>), которая содержит в себе информацию о 724 метилированных генах биомаркеров из опубликованных статей в PubMed, а также данных полногеномного секвенирования метилирования ДНК (WGBS). Дополнительно для уточнения набора днРНК для дальнейшего собственного

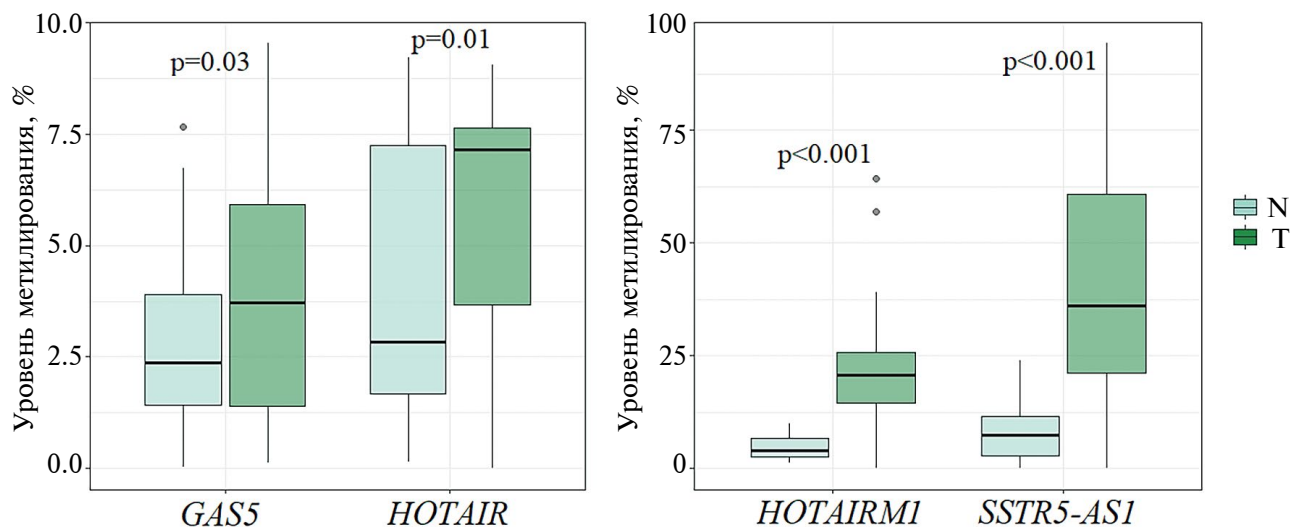


Рис. 1. Уровень метилирования генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1* в опухолевых образцах молочной железы и в парной норме. Т – tumor/опухоль; N – norm / прилегающая гистологически нормальная ткань молочной железы.

экспериментального исследования провели анализ базы данных GeneCards по ключевому слову “EMT” (epithelial-mesenchymal transition), поскольку известно, что эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) является ключевым процессом прогрессии и метастазирования рака – основной причины смерти больных РМЖ. В результате нами были отобраны четыре гена днРНК – *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1* для анализа уровня метилирования в образцах опухолей молочной железы. Нами показано значимое увеличение уровня метилирования ($p < 0.05$; критерий Манна–Уитни) в образцах опухоли по сравнению с нормальной прилегающей тканью молочной железы для всех четырех генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1* (рис. 1). Метилирование генов *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* при РМЖ показано нами впервые.

Подверженность гиперметилированию ряда генов днРНК при РМЖ и ко-метилирование могут указывать на их общее участие в биологических процессах при РМЖ. Нами проведен анализ обогащения по функциональной принадлежности с привлечением базы данных ncPath (<http://nc-path.pianlab.cn/#/Home>) для четырех исследуемых днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, по результатам которого установили, что днРНК *GAS5*, *HOTAIR* и *HOTAIRM1* вовлечены в регуляцию mTOR – (hsa04150), MAPK – (hsa04010), FoxO – (hsa04068) и Hippo – (hsa04390) сигнальных путей и имеют множество общих мишеней в каждом из путей. Например, общей мишенью для днРНК *GAS5* и *HOTAIR* в mTOR сигнальном пути могут выступать такие гены, как *PTEN*, *PI3K*, *SOS*, *PKC*, *RSK* и др.

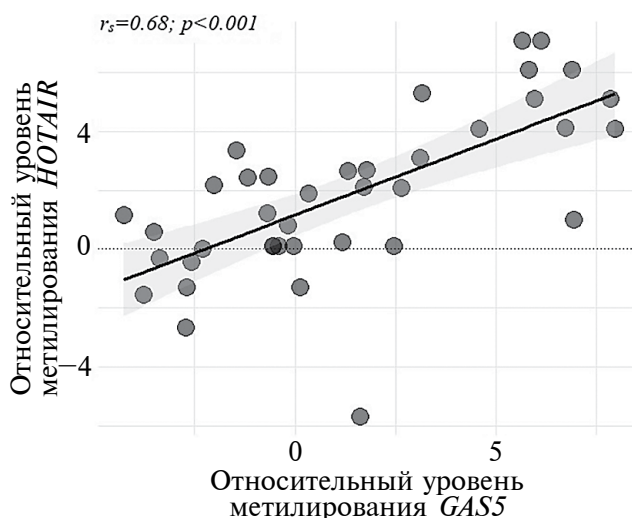


Рис. 2. Корреляция относительного уровня метилирования генов днРНК *HOTAIR* и *GAS5*.

Методом статистического анализа с применением коэффициента корреляции Спирмена с поправкой на множественные сравнения Беньямини–Хохберга установили высокую статистически значимую положительную корреляцию для пары *GAS5* – *HOTAIR* ($r_s = 0.68$; $p < 0.001$) (рис. 2), а также умеренную положительную корреляцию для пары *SSTR5-AS1* – *HOTAIRM1* ($r_s = 0.42$; $p = 0.04$). Таким образом, полученные данные по ко-метилированию генов днРНК, как и биоинформатические предсказания, свидетельствуют об их взаимном участии в общих сигнальных путях и биологических процессах.

*Связь гиперметилирования генов днРНК
HOTAIRM1 и SSTR5-AS1 с прогрессией РМЖ.
Метилирование HOTAIRM1 как фактор
прогноза лимфогенных метастазов*

При сравнении уровня метилирования четырех генов днРНК на более поздней стадии (III) по сравнению с таковым на ранних стадиях (I–II) нами показано значимое ($p < 0.05$) увеличение уровня метилирования на поздней стадии для генов *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* (рис. 3, а). Также уровень метилирования генов *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* был значимо ($p < 0.05$) выше в образцах опухолей молочной железы пациенток с размером опухоли T3–T4 по сравнению с T1–T2 (см. рис. 3, б). При оценке уровня метилирования генов днРНК в образцах опухолей молочной железы в зависимости от наличия метастазов нами установлено высокозначимое ($p < 0.005$) повышение уровня метилирования для генов днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* в образцах с наличием метастазов в лимфатических узлах (N1–N3) (см. рис. 3, в).

Таким образом, нами определены два гена днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1*, уровень метилирования которых статистически значимо коррелирует с такими показателями прогрессии РМЖ, как стадия, размер опухоли, наличие метастазов в лимфатических узлах. При сопоставлении уровня метилирования с иммуногистохимическими показателями образцов от больных РМЖ, такими как экспрессия рецепторов PR, ER и HER2, нами установлено значимое снижение уровня метилирования для гена днРНК *GAS5* в опухолевых образцах от пациенток с РМЖ, экспрессирующих рецептор PR, по сравнению с опухолевыми образцами от пациенток с РМЖ, не экспрессирующими рецептор PR ($p = 0.04$).

Для установления зависимости между развитием лимфогенных метастазов и уровнем метилирования генов днРНК нами проведен дискриминантный анализ, в результате которого была получена следующая модель:

$$Y_{lm} = -1.817 + 0.087 * X_{mi} (\text{HOTAIRM1}),$$

где Y_{lm} – дискриминантная функция, характеризующая вероятность наличия лимфогенного метастазирования, X_{mi} (*HOTAIRM1*) – индекс метилирования днРНК *HOTAIRM1* (%).

Константа дискриминации, разделяющая исследуемых на две группы, определялась как значение функции, равноудаленное от центроидов, которые составили в группе с отсутствием лимфогенного метастазирования -0.33 , а при наличии лимфогенного метастазирования 0.456 . Соответственно, константа дискриминации равна 0.063 . При сравнении средних значений дискриминантной функции в обеих группах с помощью коэффициента λ Уилкса были установлены статистически значимые различия ($p = 0.008$). Индекс метилирования (mi) днРНК *HOTAIRM1* характеризовался прямой связью с вероятностью лимфогенного метастазирования: при увеличении mi днРНК *HOTAIRM1* вероятность лимфогенного метастазирования возрастала. Принадлежность пациентов к группе высокого или низкого риска лимфогенного метастазирования определялась исходя из рассчитанных значений прогностической дискриминантной функции: при значении функции более 0.063 – к группе высокого риска лимфогенного метастазирования, при значении функции менее 0.063 – относился к группе низкого риска. Чувствительность модели составила 71.4% , специфичность – 72.4% . К сожалению, представленная модель не была валидирована на

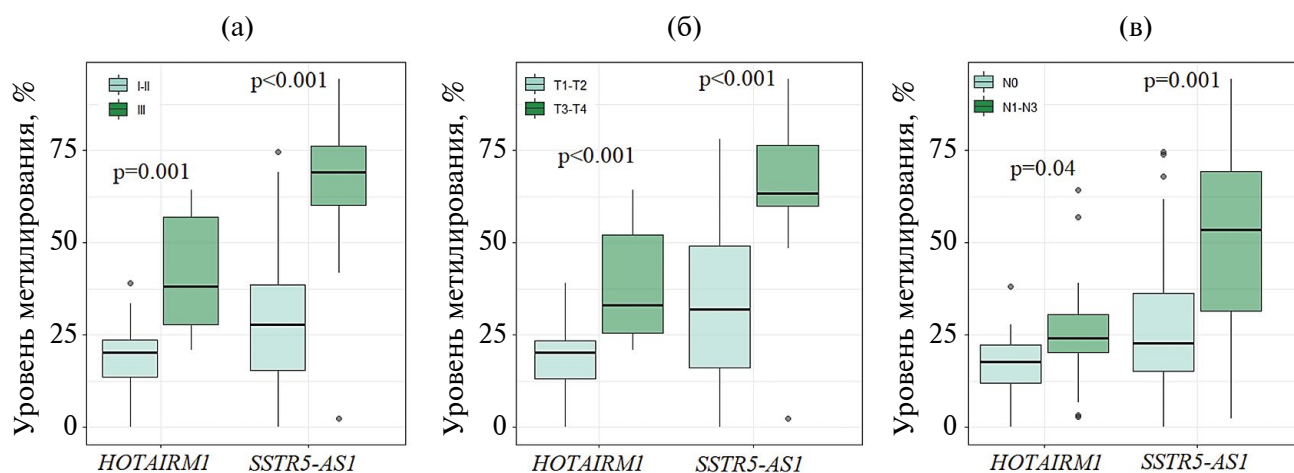


Рис. 3. Связь уровня метилирования генов днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* со стадией онкологического процесса (а), с размером опухоли (б) и лимфогенным метастазированием (в). См. текст. NO – образцы без метастазов в лимфатических узлах.

дополнительной выборке образцов на момент подготовки публикации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее показано, что метилирование ДНК является маркером злокачественных опухолей [16] и происходит на ранних стадиях развития РМЖ [17], а также играет важную роль в регуляции развития метастазов в лимфатических узлах. Имелось также сообщение, что метилирование межгенных областей может иметь биологическое значение в регуляции экспрессии *HOTAIR* [18]. В настоящей работе исследовано метилирование четырех генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *SSTR5-AS1*, *HOTAIRM1*; гиперметилирование генов днРНК *HOTAIRM1* и *SSTR5-AS1* обнаружено при РМЖ впервые. Ранее нами сообщалось о гиперметилировании гена *GAS5* [19] на небольшой выборке образцов РМЖ, однако в текущем исследовании нам удалось подтвердить полученные ранее данные на более представительной выборке образцов РМЖ.

Полученные данные по ко-метилированию в парах генов *GAS5* – *HOTAIR* и *SSTR5-AS1* – *HOTAIRM1* согласуются с данными биоинформатического анализа о совместном участии исследуемых днРНК в общих сигнальных путях и биологических процессах. Кроме того, данными литературы также подтверждается участие исследуемых нами днРНК в перечисленных выше сигнальных путях. Например, днРНК *GAS5* может действовать как супрессор при раке гортани, поскольку она подавляет пролиферацию клеток и метастазирование, регулируя сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR [20]. В работе [21] отмечается, что днРНК *HOTAIR* играет роль в прогрессировании РМЖ, возможно, за счет активации сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. днРНК *HOTAIRM1* способствует пролиферации клеток остеосаркомы и подавляет апоптоз за счет усиления эффекта Варбурга через ось miR-664b-3p/Rheb/mTOR [22]. Таким образом, наше предположение о совместном участии исследуемых днРНК в общих биологических процессах и сигнальных путях подтверждается как данными биоинформатического анализа, так и данными литературы.

Таким образом, нами определены гены днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, aberrантно метилированные при РМЖ, а также установлена положительная корреляция между уровнями метилирования для пар генов днРНК *GAS5* – *HOTAIR* и *SSTR5-AS1* – *HOTAIRM1*. Для днРНК *GAS5* – *HOTAIR*, чьи гены проявляют синергизм в изменениях уровней метилирования, биоинформатически предсказано участие в регуляции общих сигнальных путей и биологических процессов, что находит подтверждение в данных литературы. Для генов днРНК *HOTAIRM1*

и *SSTR5-AS1* установлена связь уровня метилирования с показателями прогрессии РМЖ (стадией опухолевого процесса, размером опухоли, наличием метастазов в лимфатические узлы); предложена математическая модель для оценки риска развития лимфогенных метастазов в зависимости от уровня метилирования гена *HOTAIRM1*.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 22-75-00132).

Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии (18.04.2023, № 8-23-2).

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.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F., Laversanne M., Sung H. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J. Clin. 2024. doi: 10.3322/caac.21834
2. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E. et al. Cancer statistics, 2022 // CA Cancer J. Clin. 2022. V. 72. № 1. P. 7–33. doi: 10.3322/caac.21708
3. To B., Isaac D., Andrechek E.R. Studying lymphatic metastasis in breast cancer: Current models, strategies, and clinical perspectives // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 2020. V. 25. № 3. P.191–203. doi: 10.1007/s10911-020-09460-5
4. Kim M.Y. Breast cancer metastasis // Adv. Exp. Med. Biol. 2021. V. 1187. P. 183–204. doi: 10.1007/978-981-32-9620-6_9
5. Shukla S., Penta D., Mondal P. et al. Epigenetics of breast cancer: Clinical status of epi-drugs and phytochemicals // Adv. Exp. Med. Biol. 2019. V. 1152. P. 293–310. doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_16
6. Rahman M.M., Brane A.C., Tollefsbol T.O. MicroRNAs and epigenetics strategies to reverse breast cancer // Cells. 2019. V. 8. № 10. doi: 10.3390/cells8101214
7. Cervena K., Siskova A., Buchler T. et al. Methylation-based therapies for colorectal cancer // Cells. 2020. V. 9. № 6. doi: 10.3390/cells9061540

8. *Yan H., Bu P.* Non-coding RNA in cancer // *Essays Biochem.* 2021. V. 65. № 4. P. 625–639. doi: 10.1042/EBC20200032
9. *Ahmadpour S.T., Orre C., Bertevello P.S. et al.* Breast cancer chemoresistance: Insights into the regulatory role of lncRNA // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 21. ID. 15897. doi: 10.3390/ijms242115897
10. *Yang F., Lv S.* LncRNA EPB41L4A-AS1 regulates cell proliferation, apoptosis and metastasis in breast cancer // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2022. V. 52. № 1. P. 3–11. Erratum in: *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2022. V. 52. № 3. ID. 510.
11. *Hashemi M., Moosavi M.S., Abed H.M. et al.* Long non-coding RNA (lncRNA) H19 in human cancer: From proliferation and metastasis to therapy // *Pharmacol. Res.* 2022. V. 184. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106418
12. *Kim J., Piao H.L., Kim B.J. et al.* Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 12. P. 1705–1715. doi: 10.1038/s41588-018-0252-3
13. *Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Chichester C.W.* TNM Classification of Malignant Tumours. 8th. ed. / Eds 2017. 272 p.
14. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects // *JAMA.* 2013. V. 310. № 20. P. 2191–2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053
15. *Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A. et al.* Aberrant methylation of 20 miRNA genes specifically involved in various steps of ovarian carcinoma spread: From primary tumors to peritoneal macroscopic metastases // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 3. doi: 10.3390/ijms23031300
16. *Wu J., Xiao Y., Xia C. et al.* Identification of biomarkers for predicting lymph node metastasis of stomach cancer using clinical DNA methylation data // *Dis. Markers.* 2017. V. 2017. doi: 10.1155/2017/5745724
17. *Teschendorff A.E., Gao Y., Jones A. et al.* DNA methylation outliers in normal breast tissue identify field defects that are enriched in cancer // *Nat. Commun.* 2016. V. 29. № 7. doi: 10.1038/ncomms10478
18. *Lu L., Zhu G., Zhang C. et al.* Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. V. 136. № 3. P. 875–83. doi: 10.1007/s10549-012-2314-z
19. *Selezneva A.D., Filippova E.A., Selezneva A.D. et al.* Hypermethylation of long non-coding RNA genes group in the breast cancer development and progression // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022. V. 173. № 6. P. 765–769. doi: 10.1007/s10517-022-05627-8
20. *Liu W., Zhan J., Zhong R. et al.* Upregulation of long noncoding RNA GAS5 suppresses cell proliferation and metastasis in laryngeal cancer via regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2021. V. 20. doi: 10.1177/1533033821990074
21. *Sadeghalvad M., Mansouri K., Mohammadi-Motlagh H.R. et al.* Long non-coding RNA HOTAIR induces the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer cells // *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2022. V. 68. № 4. P. 456–462. doi: 10.1590/1806-9282.20210966
22. *Yu X., Duan W., Wu F. et al.* LncRNA-HOTAIRM1 promotes aerobic glycolysis and proliferation in osteosarcoma via the miR-664b-3p/Rheb/mTOR pathway // *Cancer Sci.* 2023. V. 114. № 9. P. 3537–3552. doi: 10.1111/cas.15881

Hypermethylation of Long Non-Coding RNA Genes *GAS5*, *Hota**ir*, *Hota**irm1* and *SSTR5-AS1* As Factors in the Development and Progression of Metastatic Breast Cancer

E. A. Filippova^{1, *}, S. S. Lukina¹, V. I. Loginov^{1, 2}, A. M. Burdenny¹,
I. V. Pronina¹, N. A. Arzhanukhina³, T. P. Kazubskaya³, E. A. Braga^{1, 2}

¹*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

²*Medical Genetic Research Center, Moscow, 115522 Russia*

³*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, the Ministry of Health of Russia, Moscow, 115478 Russia*

**e-mail: p.lenyxa@yandex.ru*

Metastasis to the lymph nodes is one of the most important factors in the poor prognosis of patients with breast cancer; the five-year survival rate for metastatic breast cancer is less than 30%. DNA methylation occurs in the early stages of the development of cancer, and also plays an important role in the development of lymphatic metastases and can serve as a diagnostic and prognostic marker of malignant tumors, including breast cancer. The lncRNA genes *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1*, *SSTR5-AS1*, presumably hypermethylated in breast cancer and associated with epithelial-mesenchymal transition and metastasis, were bioinformatically selected. Quantitative methyl-specific PCR showed a statistically significant increase in the methylation level of these lncRNA genes in breast tumors compared to the paired norm. Hypermethylation of the *HOTAIRM1* and *SSTR5-AS1* genes in breast cancer was identified for the first time. Using statistical analysis, positive correlations were established between methylation levels for the *GAS5-HOTAIR* and *SSTR5-AS1-HOTAIRM1* pairs. The result of co-methylation of *GAS5* and *HOTAIR* in breast cancer is consistent with the bioinformatically predicted (using enrichment analysis and the ncPath database) participation of these lncRNAs in the regulation of common signaling pathways and biological processes. The level of methylation of the lncRNA genes *HOTAIRM1* and *SSTR5-AS1* is associated with indicators of breast cancer progression (stage of the tumor process, tumor size, presence of metastases in the lymph nodes). A model has been proposed for assessing the risk of developing lymphogenous metastases depending on the level of methylation of the *HOTAIRM1* gene. Thus, data were obtained on lncRNAs *GAS5*, *HOTAIR*, *HOTAIRM1* and *SSTR5-AS1* and hypermethylation of their genes as factors in the development and progression of metastatic breast cancer.

Keywords: breast cancer, DNA methylation, long non-coding RNA, lymphogenous metastases.

УДК 579.873.21;577.21

ТЕТРАЦИКЛИНОВАЯ ИНДУКЦИЯ ПРИРОДНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К БЕДАКВИЛИНУ У *Mycobacterium smegmatis* MC2 155

© 2024 А. А. Ватлин^{1,2,*}, Д. А. Цыбизов¹, В. С. Летвинова², В. Н. Даниленко²

¹Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, 117198 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vatlin_alexey123@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2024 г.

После доработки 04.04.2024 г.

Принята к публикации 00.04.21024 г.

Возникновение антибиотикорезистентности у микроорганизмов, включая микобактерии, представляет собой серьезную проблему в современной медицине, снижая эффективность лечения. В современном мире довольно широко обсуждается влияние на возникновение антибактериальной устойчивости минимальных селективных концентраций антибиотиков (МСК), которые значительно ниже классических минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Предполагается, что такие микроконцентрации могут являться дополнительным механизмом отбора лекарственно устойчивых штаммов, что особенно актуально в связи с накоплением концентраций антибиотиков в окружающей среде в результате антропогенной деятельности. В контексте микобактерий понимание процессов индукции устойчивости к антибиотикам на уровне МСК является особенно важным для разработки эффективных стратегий лечения и контроля распространения лекарственной устойчивости. Цель данной работы — изучение индукции системы природной лекарственной устойчивости у микобактерий при воздействии на клетку концентрациями, значительно ниже стандартных МИК, не влияющими на рост клетки. Был проведен анализ устойчивости *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 к одному из основных антибиотиков второго ряда, применяемых в медицинской практике, — бедаквину, при индукции тетрациклином, офлоксацином и канамицином. Установлено, что одним из механизмов, влияющим на изменение чувствительности штамма *M. Smegmatis* mc2 155 при индукции микроконцентрациями тетрациклина, является система выброса антибиотика из клетки — MmpS5-MmpL5.

Ключевые слова: антибиотики, природная лекарственная устойчивость, резистом, микобактерии, *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, MmpS5-MmpL5.

DOI: 10.31857/S0016675824100105 **EDN:** WEPZUF

Антибиотикорезистентность представляет собой глобальную проблему ВОЗ, связанную с передачей бактерий и генов антибиотикорезистентности между людьми, животными и окружающей средой, а также с накоплением антибиотиков в окружающей среде [1]. В последнее время появляется все больше данных о возможности индукции природной лекарственной устойчивости концентрациями антибиотиков значительно ниже известных МИК — минимальные селективные концентрации (МСК) [2–4]. Показано, что концентрации в несколько сот раз ниже значений МИК соответствующих антимикробных препаратов для бактерий могут вызывать изменения в фенотипе резистентности и индуцировать лекарственную устойчивость [5–7]. При этом появляются данные о накоплении в окружающей среде концентраций значительно выше МСК [8].

В предыдущей работе нами было показано, что низкие концентрации тетрациклина, канамицина и офлоксацина, не влияющие на рост микобактериальных клеток, могут активировать систему природного резиста, приводя к повышению устойчивости *M. Smegmatis* mc2 155 и увеличению экспрессии гена *whiB* — основного транскрипционного регулятора, вовлеченного в процесс формирования устойчивости *M. Smegmatis* mc2 155 и увеличению экспрессии гена *whiB* — основного транскрипционного регулятора, вовлеченного в процесс формирования устойчивости [9–11]. Также ранее нами была разработана тест-система для оценки выброса из клетки разрабатываемых новых антибиотиков клеточной помпой MmpS5-MmpL5 [12, 13]. Согласно литературным данным, данная система ответственна за выброс целого ряда антибиотиков из клетки, в частности, широко применяемого

противотуберкулезного препарата второго ряда — бедаквилина, а ее активация приводит к повышению устойчивости у микобактерий к целому ряду антибиотиков [14].

Настоящая работа посвящена анализу индукции системы природной лекарственной устойчивости тетрациклином, офлоксацином и канамицином в концентрациях, не влияющих на рост клетки, на повышение уровня устойчивости к бедаквилину за счет активации клеточной помпы MmpS5-MmpL5.

В работе использовался штамм бактерий *M. smegmatis* mc2 155. Культивирование бактерий проводили на агаризованной среде M290 (M290, Himedia, India) и в жидкой среде Middlebrook 7H9. Определение антибактериальной устойчивости *M. smegmatis* проводили с использованием бумажных дисков, как описано в [15], с модификациями: культуры *M. smegmatis* выращивались на протяжении ночи в среде Middlebrook 7H9 до начала экспоненциальной фазы ($OD_{600} = 1.2$), после чего разбавлялись в пропорции 1 : 9 : 10 (культура : вода : M290) и в количестве 5 мл наслаивались как верхний слой на чашки Петри со средой M290. При индукции устойчивости антибиотики тетрациклин (0,015 мкг/мл), офлоксацин (0,08 мкг/мл) и канамицин (0,03 мкг/мл), не влияющие на рост [9], добавлялись в жидкую среду и выращивались до той же фазы роста, что и контроль без индукции. После этого на агар наносили диски из фильтровальной бумаги с антимикубактериальными препаратами. Эксперимент проводился в трех независимых биологических повторностях.

Выделение РНК и измерение уровня экспрессии гена *MSMEG_1380* и *MSMEG_1382* с использованием РТ-ПЦР проводили по описанной ранее методологии без модификаций [9]. Метод оценки экспрессии ($\Delta\Delta Ct$), p -value ≤ 0.001 . Используемая последовательность праймеров:

q1380-f 5'-CTGCTCGACGAACCATGCGAAAC-3'
и q1380-r

5'-AAGGGTCTTGAGCCGAATCTCAACG-3'
(*MSMEG_1380*),

q1382-f
5'-ACCACGCAGATCATGAACAACGACT-3'
и q1382-r

5'-GAAATCGTCGAAGTCCGCCAGATGA-3'
(*MSMEG_1382*),

qsigAs-sm-f
5'-CGAGCTTGTTGATCACCTCGACCAT-3'
и qsigAs-sm-r

5'-CTCGACCTCATCCAGGAAGGCAAC-3'
(*sigA*),

qftsZs-sm-f
5'-AGCAGCTCCTCGATGTCGTCCTT-3'
и qftsZs-sm-r

5'-GCCTGAAGGGCGTCGAGTTTCAT-3' (*ftsZ*).

Для оценки скорости роста культуру *M. Smegmatis* разводили в среде Middlebrook 7H9 до $OD_{600} = 0.1$ (исследовался планктонный рост). Измерение оптической плотности клеточной суспензии проводили на приборе SmartSpec Plus (Bio-Rad) в течение 25,5 ч каждые 1.5 часа. При индукции в среду добавлялся тетрациклин в концентрации 0,015 мкг/мл. Бедаквилин добавлялся в концентрации 0,5 нМ (1/20 от МИК) и 1 нМ (1/10 от МИК). Эксперимент проведен в трех независимых повторностях.

Ранее нами было показано, что индукция малыми концентрациями антибиотиков (тетрациклином, офлоксацином, стрептомицином и канамицином) может приводить к активации генов природного резиста и повышать уровень устойчивости к различным антибиотикам через активацию глобальных транскрипционных регуляторов [9]. Одними из наиболее распространенных в микобактериальной клетке являются TetR-зависимые транскрипционные регуляторы, которые могут регулировать широкий ряд генов, ответственных за формирование лекарственной устойчивости [16]. Одним из таких генов является клеточная мульти-субстратная помпа *mmpS5-mmpL5* [17], которая, как нами было показано ранее, напрямую регулируется транскрипционным регулятором *MSMEG_1380* [12]. Сама же клеточная помпа MmpS5-MmpL5 (по литературным данным) вовлечена в процесс выброса широко применяемых в медицинской практике антибиотиков — клофазимина и бедаквилина [18, 19]. При этом стоит отметить, что в соответствии с нормами Агентства министерства

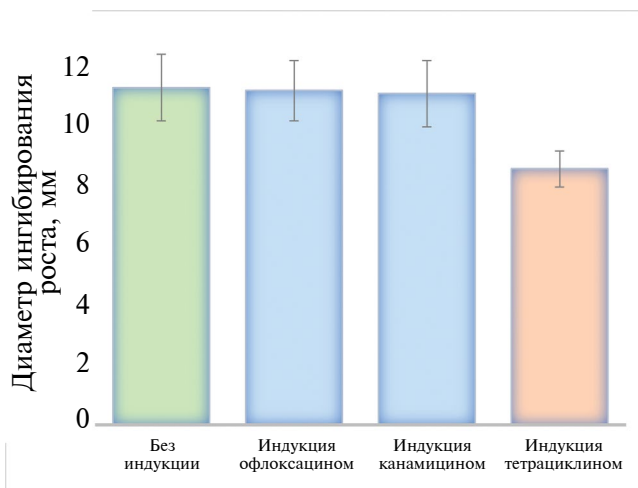


Рис. 1. Диаметры зон ингибирования роста культуры *M. smegmatis* mc2 155 бедаквилином (0,01 нмоль/диск) при индукции офлоксацином, канамицином и тетрациклином. Зеленый столбец — контрольный образец без индукции. Столбцы представляют средние значения в мм. Стандартное отклонение рассчитано из трех независимых биологических повторностей.

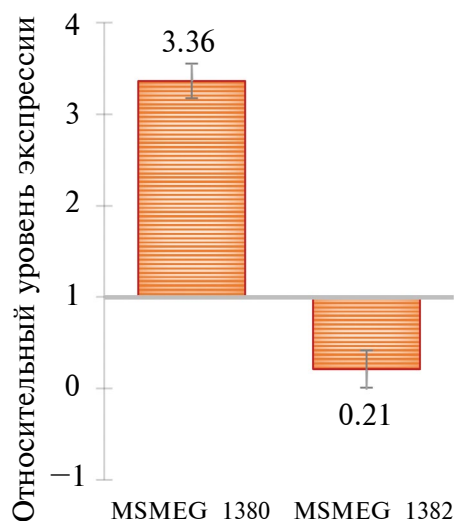


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов *MSMEG_1380* и *MSMEG_1382* в клетках *M. smegmatis* mc2 155, культивируемых в присутствии тетрациклина в концентрации, не влияющей на рост клеток. Экспрессия изучаемых генов при отсутствии антибиотиков принята за единицу; стандартное отклонение рассчитано из трех независимых биологических повторов.

здравоохранения США (FDA, USA) суточная доза для широко применяемого в сельском хозяйстве при производстве продуктов питания тетрациклина составляет 25 г/кг массы тела в сутки (FDA: Sec.556.720) [20]. На основании данного предположения нами была выдвинута гипотеза, что минимальные концентрации тетрациклина, которые не влияют на рост клетки, могут приводить к активации TetR-зависимых транскрипционных регуляторов и увеличению активности клеточной помпы MmpS5-MmpL5.

Для проверки данного предположения мы провели индукцию устойчивости штамма *M. smegmatis* mc2 155 тетрациклином, офлоксацином и канамицином в концентрациях, не влияющих на рост клеток. Было показано, что индукция офлоксацином и канамицином не приводит к изменению уровня устойчивости клеток к бедаквилину, тогда как индукция тетрациклином делает клетки более устойчивыми к бедаквилину (рис. 1). На основании полученных данных об индукции тетрациклином устойчивости к бедаквилину нами был проведен анализ изменения уровня экспрессии TetR-зависимого транскрипционного репрессора *MSMEG_1380* и регулируемой им помпы MmpS5-MmpL5 (ген *MSMEG_1382*) при индукции

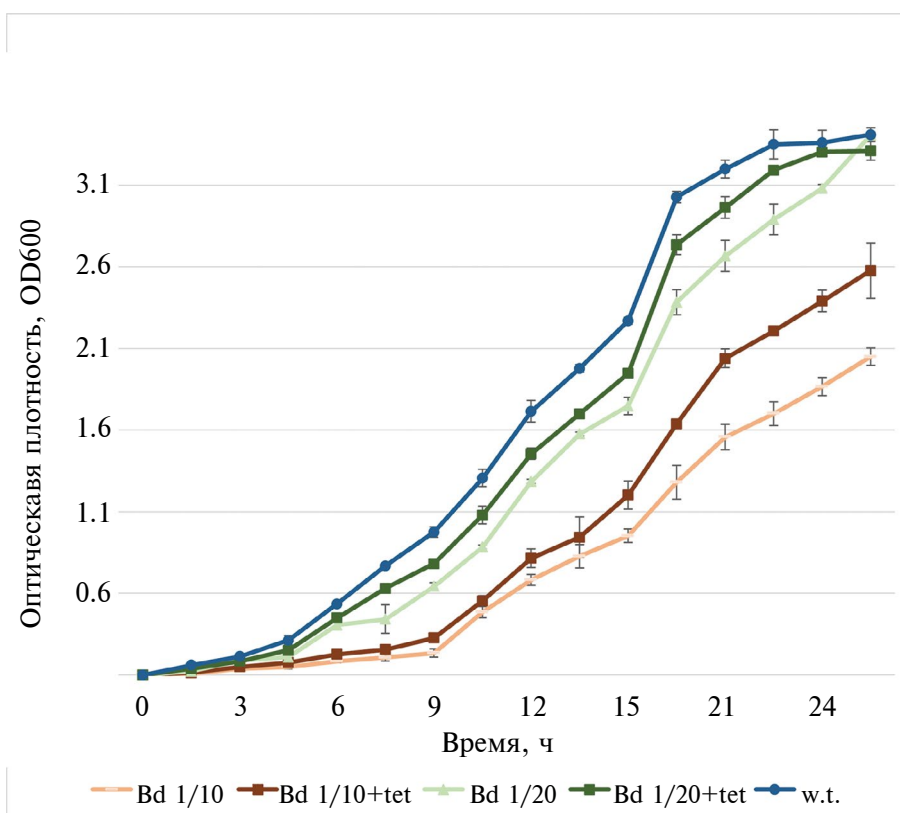


Рис. 3. Кривая роста штамма *M. smegmatis* mc2 155 (w.t., желтый) в присутствии бедаквилина (Bd, зеленый), а также в присутствии бедаквилина и индуктора тетрациклина (Bd+tet, синий). Предел погрешности – стандартное отклонение. Опыт проводился в трех независимых повторах.

клеток тетрациклином. Было показано, что концентрации, не влияющие на рост клеток, вызывают 4.78-кратное снижение экспрессии *MSMEG_1380*, что в свою очередь вызывает повышение уровня экспрессии гена *MSMEG_1382* в 3.36 раза (рис. 2).

На основании полученных данных далее провели анализ скорости роста *M. smegmatis* в среде с бедаквилином при индукции тетрациклином. Нами было проведено сравнение скорости роста штамма *M. smegmatis* mc2 155 в трех различных условиях: контроль (w.t.), штамм в присутствии индуктора (тетрациклина) и бедаквилина и штамм в присутствии бедаквилина без индукции. Концентрации бедаквилина составляли 1/20 МИК, 0.5 нМ и 1/10 от МИК, 1 нМ соответственно. Использование большей концентрации приводило к существенному замедлению роста штамма и невозможности оценки результатов (рис. 3).

В результате проведенного исследования мы выявили, что штамм без обработки антибиотиками имеет более высокую скорость роста в отличие от штамма в присутствии бедаквилина в концентрациях 1/20 и 1/10 от МИК. При этом скорость роста штамма при добавлении в среду микроконцентрации тетрациклина увеличивалась. Данные результаты подтверждают предположение о влиянии минимальных селективных концентраций антибиотиков на скорость роста штаммов, что может приводить к отбору штаммов с индуцированными генами резистента [5].

В настоящей работе показано увеличение устойчивости культуры микобактерий *M. smegmatis* mc2 155 к бедаквилину при индукции тетрациклином. Оценка возможного механизма индукции выявила снижение экспрессии TetR-зависимого транскрипционного репрессора *MSMEG_1380* и увеличение экспрессии регулируемой им помпы MmpS5-MmpL5 (ген *MSMEG_1382*), что может приводить к выбросу бедаквилина из клетки. Полученные далее результаты подтверждают разницу в скорости роста у *M. smegmatis* mc2 155 при индукции устойчивости природного резистента низкими концентрациями тетрациклина в присутствии бедаквилина, что подтверждает предположение о возможности отбора штаммов с индуцированной устойчивостью из-за разницы в скорости роста.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00066, <https://rscf.ru/project/22-74-00066/>.

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. Larsson D.G.J., Flach C.F. Antibiotic resistance in the environment: 5 // Nat. Rev. Microbiol. 2022. V. 20. № 5. P. 257–269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x
2. Hjort K., Fermér E., Tang P.C., Andersson D.I. Antibiotic minimal selective concentrations and fitness costs during biofilm and planktonic growth // mBio. Am. Soc. for Microbiology, 2022. V. 13. № 3. doi: 10.1128/mbio.01447-22
3. Stanton I.C., Murray A.K., Zhang L. et al. Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration: 1 // Commun. Biol. 2020. V. 3. № 1. P. 1–11. doi: 10.1038/s42003-020-01176-w
4. Swinkels A.F., Fischer E.A.J., Korving L. et al. Defining minimal selective concentrations of amoxicillin, doxycycline and enrofloxacin in broiler-derived cecal fermentations by phenotype, microbiome and resistome // bioRxiv, 2023. doi: 10.1101/2023.11.21.568155
5. Gullberg E., Cao S., Berg O.G. et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations // PLoS Pathog. 2011. V. 7. № 7. doi: 10.1371/journal.ppat.1002158
6. Gullberg E., Albrecht L.M., Karlsson C. et al. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals // mBio. 2014. V. 5. № 5. doi: 10.1128/mBio.01918-14
7. Liu A., Fong A., Becket E. et al. Selective advantage of resistant strains at trace levels of antibiotics: A simple and ultrasensitive color test for detection of antibiotics and genotoxic agents // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. V. 55. № 3. P. 1204–1210. doi: 10.1128/AAC.01182-10
8. Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations // Ups. J. Med. Sci. 2014. V. 119. № 2. P. 103–107. doi: 10.3109/03009734.2014.904457
9. Vatlin A.A., Bekker O.B., Shur K.V. et al. Kanamycin and ofloxacin activate the intrinsic resistance to multiple antibiotics in *Mycobacterium smegmatis* // Biology (Basel). 2023. V. 12. № 4. doi: 10.3390/biology12040506
10. Прозоров А., Даниленко В. Системы “токсин-анти-токсин” у бактерий: инструмент апоптоза или модуляторы метаболизма? // Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 147–159.
11. Прозоров А.А., Федорова И.В., Беккер О.Б., Даниленко В.Н. Факторы вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*: генетический контроль, новые концепции // Генетика. 2014. Т. 50. № 8. С. 885.
12. Maslov D.A., Shur K.V., Vatlin A.A., Danilenko V.N. MmpS5-MmpL5 transporters provide mycobacterium smegmatis resistance to imidazo[1,2-b][1,2,4,5]

- tetrazines // Pathogens. 2020. V. 9. № 3.
doi: 10.3390/pathogens9030166
13. Шур К.В., Фролова С.Г., Акимова Н.И., Маслов Д.А. Тест-система для *in vitro* скрининга кандидатов в антимикобактериальные препараты на устойчивость, опосредованную mmpS5-mmpL5-транспортерами // Генетика. 2021. Т. 57. № 1. С. 108–111.
doi: 10.1134/S1022795421010154
14. Yamamoto K., Nakata N., Mukai T. et al. Coexpression of MmpS5 and MmpL5 contributes to both efflux transporter MmpL5 trimerization and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // mSphere. 2021. V. 6. № 1.
doi: 10.1128/mSphere.00518-20
15. Shahbaaz M., Maslov D.A., Vatlin A.A. et al. Repurposing based identification of novel inhibitors against MmpS5-MmpL5 efflux pump of *Mycobacterium smegmatis*: A combined in silico and in vitro study // Biomedicines. 2022. V. 10. № 2.
doi: 10.3390/biomedicines10020333
16. Deng W., Li C., Xie J. The underling mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors // Cell Signal. 2013. V. 25. № 7. P. 1608–1613.
doi: 10.1016/j.cellsig.2013.04.003
17. Richard M., Gutiérrez A.V., Viljoen A.J. et al. Mechanistic and structural insights into the unique tetr-dependent regulation of a drug efflux pump in *Mycobacterium abscessus* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00649
18. Andries K., Villellas C., Coeck N. et al. Acquired resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline // PloS One. 2014. V. 9. № 7.
doi: 10.1371/journal.pone.0102135
19. Hartkoorn R.C., Uplekar S., Cole S.T. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis* // Antimicrob. Agents Chemother. 2014. V. 58. № 5. P. 2979–2981.
doi: 10.1128/AAC.00037-14
20. 2CFR – Code of Federal Regulations Title 21. URL: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556&showFR=1&ubpartNode=21:6.0.1.1.18.2> (accessed: 06.03.2023).

Tetracycline Induction of Natural Drug Resistance to Bedaquiline in *Mycobacterium smegmatis* mc2 155

A. A. Vatlin^{1, 2, *}, D. A. Tsybizov¹, V. S. Letvinova², V. N. Danilenko²

¹*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia*

²*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: vatlin_alexey123@mail.ru*

The emergence of antibiotic resistance in microorganisms, including mycobacteria, poses a serious problem in modern medicine, reducing treatment effectiveness. In the modern world, there is considerable discussion about the influence of minimal selective concentrations of antibiotics (MSC), which are significantly lower than classical minimal inhibitory concentrations (MIC), on the emergence of antibacterial resistance. It is assumed that such microconcentrations may act as an additional mechanism for selecting drug-resistant strains, which is particularly relevant due to the accumulation of antibiotic concentrations in the environment as a result of human activity. In the context of mycobacteria, understanding the processes of induction of resistance to antibiotics at the MSC level is especially important for the development of effective treatment strategies and control of the spread of drug resistance. The aim of this study was to investigate the induction of the natural drug resistance system in mycobacteria under the influence of concentrations significantly lower than standard MIC and not affecting cell growth. The resistance of *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 to one of the main antibiotics used in medical practice, bedaquiline, was analyzed during induction by tetracycline, ofloxacin, and kanamycin. It was established that one of the mechanisms influencing the change in sensitivity of the *M. smegmatis* mc2 155 strain during induction by microconcentrations of tetracycline is the antibiotic efflux system – MmpS5-MmpL5.

Keywords: antibiotics, natural drug resistance, resistome, mycobacteria, *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, MmpS5-MmpL5.

ТЕСТИРОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ КРЫЖОВНИКА НА ЧЕРНОЙ И КРАСНОЙ СМОРОДИНЕ

© 2024 А. В. Пикунова^{1, *}, А. А. Павленко¹, М. А. Должикова¹, О. Д. Голяева¹, С. Д. Князев¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур,

Орловская область, п/о Жулина, 302530 Россия

*e-mail: pikuanna84@mail.ru

Поступила в редакцию 15.03.2024 г.

После доработки 02.05.2024 г.

Принята к публикации 06.05.2024 г.

Одиннадцать микросателлитных маркеров, ранее разработанных на основании сиквенсов крыжовника, были протестированы на красной и черной смородине. В результате все микросателлитные локусы амплифицировали на представителях смородины черной, а на представителях смородины красной в трех локусах не было амплификации (RucANS, RucDFR2-1, RucDFR1-3). Выявлены полиморфные локусы как для черной, так и для красной смородины. В локусе MTT-7 у исследуемых генотипов черной смородины наблюдается амплификация трех фрагментов, возможно, данный локус дублирован. При этом на красной смородине в локусе MTT-7 наблюдается амплификация, типичная для монолокусного микросателлита. Локусы RucHLH-1 и RucUFGT были протестированы на гибридной семье смородины красной (Белая Потапенко × 1426-21-80). Путем генетического картирования установлена локализация локуса RucHLH-1 на группе сцепления 4 в геноме красной смородины и локализация RucUFGT (предположительно) на группе сцепления 1. Набор микросателлитных локусов для рода Смородина на данный момент ограничен. В данной работе показано, что часть SSR-маркеров, разработанных на крыжовнике, амплифицируются и выявляют полиморфизм и на смородине тоже, а также могут быть использованы для исследований как черной, так и красной смородины.

Ключевые слова: смородина, крыжовник, микросателлитные локусы, ДНК-маркеры, SSR, *Ribes* L., генетический полиморфизм, генетическое картирование.

DOI: 10.31857/S0016675824100114 **EDN:** WEKCGY

Микросателлитные маркеры (SSR, simple sequence repeat) ограничивают повторы простых последовательностей ДНК, размер повторяющейся единицы которых не превышает 1–10 п. н. SSR – мультиаллельные, кодоминантные маркеры, обладающие хорошей воспроизводимостью. Они широко используются как инструмент характеристики геномов различных живых организмов, в том числе сельскохозяйственно-значимых культур [1].

Первые микросателлитные маркеры для представителей рода Смородина были созданы шотландскими учеными в начале 2000-х гг. [2]. На данный момент набор протестированных микросателлитных локусов для смородин крайне ограничен и насчитывает не более 100 локусов, из них около 50 картированы в геноме черной или красной смородины [3, 4]. Для сравнения – база данных Hidras насчитывает 664 локуса для яблони (<https://sites.unimi.it/camelot/hidras/HiDRAS-SSRdb/pages/CompleteSSRtable.php>), большинство из которых картированы.

SSR применяют в фундаментальных исследованиях по оценке генетического полиморфизма, изучению филогенетических отношений, построению генетических карт для групп сцепления и в прикладных целях – для изучения родословных, формирования идентификационных систем, поиска маркеров, связанных с важными хозяйственно-биологическими свойствами, при маркер-вспомогательном отборе интересных с генетико-селекционной точки зрения генотипов в начале онтогенеза растений [5].

Род Смородина (*Ribes* L.) включает более 150 видов, хозяйственное значение имеют смородина черная (*Ribes nigrum* L.), смородина красная (*Ribes rubrum* L.) и крыжовник (*Ribes uva-crispa* L.) [6]. По современным взглядам, смородина и крыжовник принадлежат к одному роду *Ribes* [3, 7], хотя ранее относились к двум различным родам в пределах одного семейства в связи со значительными морфологическими отличиями [8]. Зачастую SSR-маркеры, разработанные для одного вида, могут

Таблица 1. Микросателлитные локусы, задействованные в работе

№	Название локуса	Т отжига, °C	Последовательность праймеров 5–3'		Источник
			F	R	
1	MTT-5	56	GCGATTCCATTACGACACTTTGCA	ggttATAGGGAAGCATCACCTCACC	[10]
2	MTT-7	50	CACCCAAACATACTGTAATGGATCGAAG	ggttACACGATCTCGTTCTATC	
3	MTT-9	50	ATGACTCTGATACCACACCAG	ggtTGCGTATGTGATTCTGCTCTG	
5	RucANS	60	TCTTAACCCCTAAAATTGCAGCC	ggttCCATTCCACCACCACTTCTTTCTC	
6	RucHLH-1	60	TTTCACTAGAGCCATTCTTGCC	ggttGAAAAATACGTTACGATGGAGC	
7	RucHLH-2	60	TTTTCTCTTCCTCGTGTGCTC	ggttCCCCCTCTCTGTAGTGCCAAATTC	
8	RucHLH-3	60	GAATTGGCACTACAGAGAGGG	ggtTGAAAGTTGAGTGTTCTCGGAGAGA	[11]
9	RucDFR1-2	50	ACCCTACTTGGCAGAAATGAAGT	ggttCGTGGTCTTCGACACAAAAATAC	
10	RucDFR1-3	60	CTAGTGGTGTGTCCTTTCAATCA	ggttCTAGGCTGGTCCCTAAATCGTA	
11	RucDFR2-1	60	CTATATCGTTCGAGCAACCGTA	ggtTGGCAAAGTCTAAACAAATGCTTC	
12	RucUFGT	55	GTGCTCATGTTTATACCGACTTCA	ggttCAAAGCAAAGGGGAAGAGGTTG	

Таблица 2. Результаты амплификации микросателлитных локусов на красной и черной смородине

№	Локус	Размеры фрагментов, п. н.			H_o	H_e
		крыжовник*	черная смородина	красная смородина		
1	MTT-5	145–261	140–152	162	0.50	0.68
2	MTT-7	151–193	150, 160, 198	140–153	1.00	0.74
3	MTT-9	—	225, 320	335	0.40	0.34
4	RucANS	237, 241	210, 212	—	0.75	0.47
5	RucHLH-1	198, 208	235–240	220–222	0.33	0.67
6	RucHLH-2	243–248	245	245	—	—
7	RucHLH-3	314–319	310	305	0.00	0.32
8	RucDFR1-2	364–397	375–480	340	0.20	0.46
9	RucDFR1-3	318–326	160	—	—	—
10	RucDFR2-1	257–261	230	—	—	—
11	RucUFGT	343–355	510, 515	685–700	0.50	0.74

Примечание. Прочерк – амплификации на протестированных образцах не было. * – по ранее опубликованным данным разработчиков локусов [11, 12]; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_e – ожидаемая гетерозиготность.

использоваться и при исследовании близкородственных видов за счет консервативности генома [5].

Цель настоящей работы – проверить переносимость микросателлитных локусов, разработанных для крыжовника на черной и красной смородине.

ДНК выделяли из молодых листьев смородины СТАВ-методом с небольшими модификациями [9]. В настоящей работе протестировали 11 микросателлитных локусов (табл. 1) на красной (сорт Белая Потапенко и гибридная форма 1426-21-80) и черной смородине (сорта Кипиана, Арапка, Воевода, гибридная форма 3516-14-46). Локусы RucHLH-1 и RucUFGT также были протестированы на гибридах картирующей популяции красной смородины, полученной от скрещивания Белая Потапенко и формы 1426-21-80, всего 139 гибридов (шесть из них были исключены в процессе картирования в связи с большим количеством выпадов). Разделение фрагментов проводили в 8%-ном ПААГ с окрашиванием нитратом серебра. Значение коэффициентов гетерозиготности вычисляли в программе GenAIEх 6.5 [12]. Генетическую карту составляли с применением программы Join Map3/0, регрессионное картирование с использованием функции Kosambi.

Микросателлитные локусы, задействованные в работе, ранее были получены на основании сиквенов крыжовника в работах К. Antonius с соавт. [10] и Е. Vidyagina с соавт. [11]. В результате все микросателлитные локусы амплифицировали на

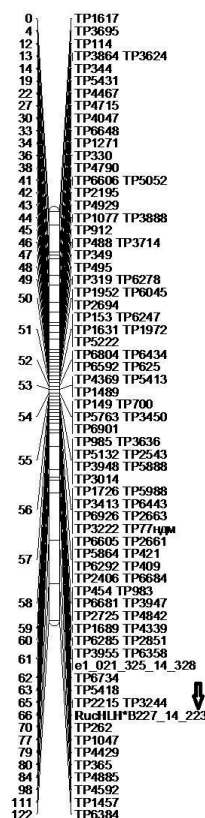


Рис. 1. Генетическая карта группы сцепления 4 смородины красной и локализация на ней локуса RucHLH-1 (указан стрелкой).

представителях смородины черной, а на представителях смородины красной не было амплификации в трех локусах: *RucANS*, *RucDFR2-1*, *RucDFR1-3* (табл. 2). Данный факт может опосредованно отражать большую генетическую близость крыжовника к смородине черной, нежели чем к смородине красной, отмеченную ранее на основании исследований с применением различных типов молекулярно-генетических данных [13, 14].

Диапазон амплифицируемых на образцах смородины фрагментов в целом аналогичен диапазону аллелей на крыжовнике, кроме локусов *RucUFGT* и *RucDFR1-3*, в которых размеры фрагментов для крыжовника и смородин значительно различаются. Лocus *RucHLH-2* оказался мономорфным у всех проанализированных образцов красной и черной смородины, в нем был амплифицирован один фрагмент размером около 245 п. н. У образцов черной смородины в локусах *RucDFR1-3*, *RucDFR2-1*, *RucHLH-3* также амплифицировался один мономорфный фрагмент (160, 230, 310 п. н. соответственно). У образцов красной смородины мономорфный фрагмент амплифицировался также в локусе *MTT-5*. При этом в локусах *MTT-9*, *RucHLH-3* и *RucDFR1-2* у образцов красной смородины наблюдалась амплификация лишь у одного из тестируемых образцов, данные локусы мы рассматриваем как полиморфные.

По полученным данным были подсчитаны коэффициенты гетерозиготности (см. табл. 2). Наблюдаемая гетерозиготность варьировала от 0.2 (в локусе *RucDFR1-2*) до 1 (в локусе *MTT-7*), ожидаемая гетерозиготность варьировала от 0.32 (в локусе *RucHLH-3*) до 0.74 (в локусах *MTT-7* и *RucUFGT*). *MTT-7* на ДНК каждого образца черной смородины амплифицировал по три фрагмента и, возможно, является двулокусным. При этом на красной смородине наблюдается амплификация, типичная для монолокусного микросателлита. Возможно, в геноме черной смородины locus *MTT-7* дублирован. Однако для подтверждения данной гипотезы необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, в результате были выявлены полиморфные локусы для черной (*MTT-5*, *MTT-7*, *MTT-9*, *RucANS*, *RucHLH-1*, *RucDFR1-2*, *RucUFGT*) и красной (*MTT-9*, *RucHLH-3*, *RucDFR1*, *MTT-7*, *RucHLH-1*, *RucUFGT*) смородины.

Локусы *RucHLH-1* и *RucUFGT* протестировали на гибридной семье (Белая Потапенко × 1426-21-80). Полученные данные были использованы для построения генетической карты вместе с ранее полученной информацией о полиморфизме микросателлитных и SNP-маркеров [4]. Лocus *RucHLH-1* был локализован нами на группе сцепления 4 вместе с микросателлитным локусом *e1-O21*

и 94 SNP-маркерами (карта раунда 3, LOD 5, рис. 1).

Лocus *RucUFGT* сгруппировался вместе с микросателлитным локусом *g1-K04* и SNP-маркером *TP1673* (карта раунда 1, LOD 5) на расстоянии 5 сМ от *g1-K04*. На предыдущей генетической карте красной смородины locus *g1-K04* не был сгруппирован с другими маркерами [4], однако на ранее опубликованной генетической карте черной смородины он располагается на группе сцепления 1 [3]. Таким образом, в данной работе установлена локализация локуса *RucHLH-1* на группе сцепления 4 в геноме смородины красной и локализация *RucUFGT*, предположительно, на группе сцепления 1.

В настоящей работе показано, что большая часть SSR-маркеров, разработанных на крыжовнике, амплифицируется и выявляет полиморфизм и на смородине, они могут быть использованы для исследований как черной, так и красной смородины.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ “Изучение генома смородины (*Ribes* L.) с помощью ДНК маркеров” 23-26-00160.

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. *Vieira M.L., Santini L., Diniz A.L., Munhoz C.D.* Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful // *Genet. Mol. Biol.* 2016. V. 4. № 39. P. 312–328.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
2. *Brennan R., Jorgensen L., Woodhead M., Russell J.* Development and characterization of SSR markers in *Ribes species* // *Mol. Ecol.* 2002. V. 2. № 3. P. 327–330.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00233.x>
3. *Brennan R., Jorgensen L., Hackett C. et al.* The development of a genetic linkage map of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) and the identification of regions associated with key fruit quality and agronomic traits // *Euphytica*. 2008. V. 161. P. 19–34.
<https://doi.org/10.1007/s10681-007-9412-8>
4. *Пикунцова А.В., Горюнова С.В., Горюнов Д.В.* Генетическая карта смородины красной (*Ribes rubrum* L.), построенная с применением SSR и SNP ДНК-маркеров // *Генетика*. 2020. V. 56. № 11. С. 1340–1344.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820100100>
5. *Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S. et al.* Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants

- // Euphytica. 2011. V. 177. № 3. P. 309–334.
<https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>
6. Князев С.Д., Огольцова Т.П. Селекция смородины черной на современном этапе. Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2004. 238 с.
 7. Janczewski E. Monograph of the currants *Ribes* L. // Mem. Soc. Phys. Hist. Nat. Geneve. 1907. V. 35. P. 199–517.
 8. Berger A. A taxonomic review of currants and gooseberries // N.Y. Agric. Exptl Sta. Techn. Bull. 1924. V. 109. P. 1–118.
 9. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. 1987. V. 19. P. 11–15.
 10. Antonius K., Karhu S., Kaldm H. et al. Development of the Northern European *Ribes* core collection based on a microsatellite (SSR) marker diversity analysis // Plant Genet. Res.: Characterization and Utilization. 2012. V. 10. P. 70–73.
<https://doi.org/10.1017/S1479262111000980>
 11. Vidyagina E.O., Lebedev V.G., Subbotina N.M. The development of the genic SSR markers for analysis of genetic diversity in gooseberry cultivars // Agronomy. 2021. V. 11. № 6.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11061050>
 12. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537–2539.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
 13. Пикунцова А.В., Мартыросян Е.В., Князев С.Д., Рыжова Н.Н. Применение RAPD-анализа для изучения генетического полиморфизма и филогенетических связей у представителей рода *Ribes* L. // Экол. генетика. 2011. Т. 9. № 2. С. 34–44.
 14. Pikunova A., Goryunova S., Goryunov D. Genetic diversity and pedigree analysis of red currant germplasm // Plants. 2022. V. 11. № 13.
<https://doi.org/10.3390/plants11131623>

Transferability of SSR Markers Developed on Goseberry to Red and Black Currants

A. V. Pikunova^{1,*}, A. A. Pavlenko¹, M. A. Dolzhikova¹, O. D. Golyaeva¹, S. D. Knyazev¹

¹All-Russian Research Institute of Fruit Crop Breeding, VNIISP, Zhilina, Orel district, 302530 Russia

Eleven microsatellite markers previously developed based on gooseberry sequences were tested on red and black currants. As a result, all microsatellite loci were amplified on representatives of black currant, but on representatives of red currant there was no amplification in three loci (RucANS, RucDFR2-1, RucDFR1-3). Polymorphic loci have been identified for both black and red currants. In the MTT-7 locus in the studied black currant genotypes, amplification of 3 fragments has been observed. Probably this locus is duplicated in black currant genome. At the same time, in red currant, amplification typical for monolocus microsatellite has been observed in the MTT-7 locus. The RucHLH-1 and RucUFGT loci were tested on a hybrid red currant family (Belaya Potapenko × 1426-21-80). By genetic mapping, the localization of the RucHLH-1 locus was established on linkage group 4 in the red currant genome, and the localization of RucUFGT was presumably on linkage group 1. The set of microsatellite loci for the currant genus is currently limited. This work shows that some of the SSR markers developed on gooseberries are amplified and reveal polymorphism in currants and can be used to study both black and red currants.

Keywords: currants, gooseberry, microsatellite loci, DNA-markers, SSR, *Ribes* L., genetic polymorphism, linkage mapping.

УДК 575.162 + 577.24

ГЕН *SHAGGY*, КОДИРУЮЩИЙ ПРОТЕИНКИНАЗУ GSK3, КОНТРОЛИРУЕТ ЗАВИСИМОЕ ОТ ПОЛА ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КЛАСТЕРОВ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ *D. melanogaster* НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ

© 2024 Н. В. Рощина^{1, 2#}, Е. Р. Веселкина^{1#}, *, М. В. Тростников³, Е. Г. Пасюкова^{1, **}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: veselkinaer123@gmail.com

**e-mail: egpas@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.03.2024 г.

После доработки 19.04.2024 г.

Принята к публикации 08.05.2024 г.

Дофаминергические нейроны контролируют поведение, память и подвижность, а причинно-следственная связь нарушения их работы с нейродегенеративными заболеваниями и старением привлекает внимание к исследованию участия дофаминергических нейронов в регуляции продолжительности жизни. Важную роль в работе дофаминергических нейронов играет высококонсервативная серин-треониновая протеинкиназа GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) — один из важнейших мультифункциональных ферментов клеток высших организмов, которую у *Drosophila melanogaster* кодирует ген *shaggy*. В этой статье впервые приведены доказательства того, что изменение уровня экспрессии *shaggy* всего лишь в нескольких кластерах дофаминергических нейронов может повлиять на продолжительность жизни. Это влияние может быть как отрицательным, так и положительным и зависит от пола. Полученные данные могут послужить основой для дальнейшего поиска сфокусированных на конкретных клетках-мишенях факторов, регулирующих темпы старения, а также для разработки высокоспецифичных подходов к терапии нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: продолжительность жизни, нервная система, дофаминергические нейроны, протеинкиназа GSK3, *Drosophila melanogaster*.

Авторы внесли равный вклад в работу.

DOI: 10.31857/S0016675824100127 EDN: WEIMKM

Дофаминергические (ДА) нейроны играют важную роль в формировании памяти, поведения, мотивации к обучению, подвижности, сна и других свойств организма, причем их функции весьма сходны у представителей разных таксонов [1]. Депрессия, шизофрения и нейродегенеративные заболевания, связанные с нарушением продолжительности жизни, связаны с нарушением работы ДА нейронов [1, 2]. Таким образом, ДА нейроны являются важным компонентом нервной системы, который поддерживает здоровое долголетие.

Действительно, в опытах с модельным объектом *Drosophila melanogaster* была продемонстрирована связь между свойствами дофаминергической

системы и продолжительностью жизни. Оказалось, что с возрастом в короткоживущих инбредных линиях природного происхождения наблюдается потеря ДА нейронов, тогда как в долгоживущих линиях их число сохраняется [3]. Опубликованы также результаты немногочисленных исследований, в которых показано, что изменение работы отдельных генов в ДА нейронах может привести к изменению продолжительности жизни дрозофилы [4, 5]. Более того, оказалось, что вклад отдельных групп ДА нейронов в продолжительность жизни может быть неравноценным [5].

Ранее мы продемонстрировали, что изменение экспрессии гена *shaggy*, кодирующего

протеинкиназу GSK3 (Glycogen Syntase Kinase 3), в различных типах нейронов, в том числе в ДА нейронах, приводит к разнонаправленным изменениям продолжительности жизни самцов и самок *D. melanogaster* [4]. GSK3 является высококонсервативной мультифункциональной серин-треониновой протеинкиназой, которая играет важную роль в поддержании функциональной целостности нервной системы [6, 7]. В частности, повышение активности GSK3 способствует патогенезу болезни Паркинсона и гибели ДА нейронов [8]. Напротив, снижение активности GSK3 рассматривается как потенциальный эффективный вариант терапии паркинсонизма [9]. GSK3 фосфорилирует транскрипционные факторы CREB и NURR1 [10, 11] и таким образом способна повлиять на экспрессию гена *pale*, кодирующего тирозингидроксилазу, ключевой фермент биосинтеза дофамина. Этим может объясняться значение GSK3 для правильной работы ДА нейронов. Мы решили проверить, повлияет ли изменение экспрессии *shaggy* в отдельных кластерах ДА нейронов на продолжительность жизни. Особый интерес представлял вопрос о том, можно ли, изменив экспрессию гена, добиться увеличения продолжительности жизни.

Для работы мы выбрали трансгенную конструкцию, в которой кДНК-копия основного транскрипта гена *shaggy* имеет аминокислотную замену A81T (транскрипт *sggRB-A81T*), а эффект активации конструкции охарактеризован как доминантно-негативный по отношению к эндогенному пулу GSK3 [12]. Активация *sggRB-A81T*, т. е. уменьшение суммарной активности GSK3, во всех кластерах ДА нейронов приводила к снижению продолжительности жизни самцов и увеличению продолжительности жизни самок [4].

Дофаминергическая система *D. melanogaster* устроена достаточно просто и содержит 125 ДА нейронов в каждом полушарии мозга. Клеточные тела ДА нейронов сгруппированы в кластеры (*ram*, *pal*, *rpl1*, *rpl2ab*, *rpl2c*, *rpm1*, *rpm2*, *rpm3*, *T1* и *Sb*) и легко визуализируются [13] (рис. 1, а).

Для оценки влияния сверхэкспрессии транскрипта *sggRB-A81T* в отдельных кластерах ДА нейронов на продолжительность жизни в работе была использована модификация классической бинарной экспрессионной системы GAL4-UAS [14]. Выбранная модификация, которая основана на применении драйверов Split_GAL4, позволяет получать более ограниченные и специфические наборы клеток для активации трансгенных конструкций [15]. В настоящей работе были использованы Split_GAL4 драйверы, любезно предоставленные Марком Ву (Mark Wu, Johns Hopkins University School of Medicine, США) и обеспечивающие активацию трансгенных конструкций в разных кластерах ДА нейронов [13,

16]. Используя стандартные скрещивания с хромосомами-балансерами, мы получили линии, в геноме которых присутствовали комбинации Split_GAL4 драйверов, обеспечивающие экспрессию трансгенных конструкций в выбранных нами наборах кластеров ДА нейронов (см. рис. 1, б).

Линия *w[1118]; P{TH-C-GAL4.AD}attP40; P{TH-F-GAL4.DBD}attP2* (Д1) активирует трансгенные конструкции в одиночных нейронах кластеров *rpl1* и *rpl2ab*, во всех нейронах кластеров *rpm1* и *rpm2* и трех нейронах кластера *Sb* [13].

Линия *w[1118]; P{TH-D-GAL4.AD}attP40; P{TH-F-GAL4.DBD}attP2* (Д2) активирует трансгенные конструкции во всех нейронах кластеров *rpl1*, *rpl2c*, в нескольких нейронах кластера *rpm2* и во всех нейронах кластера *rpm3* [13].

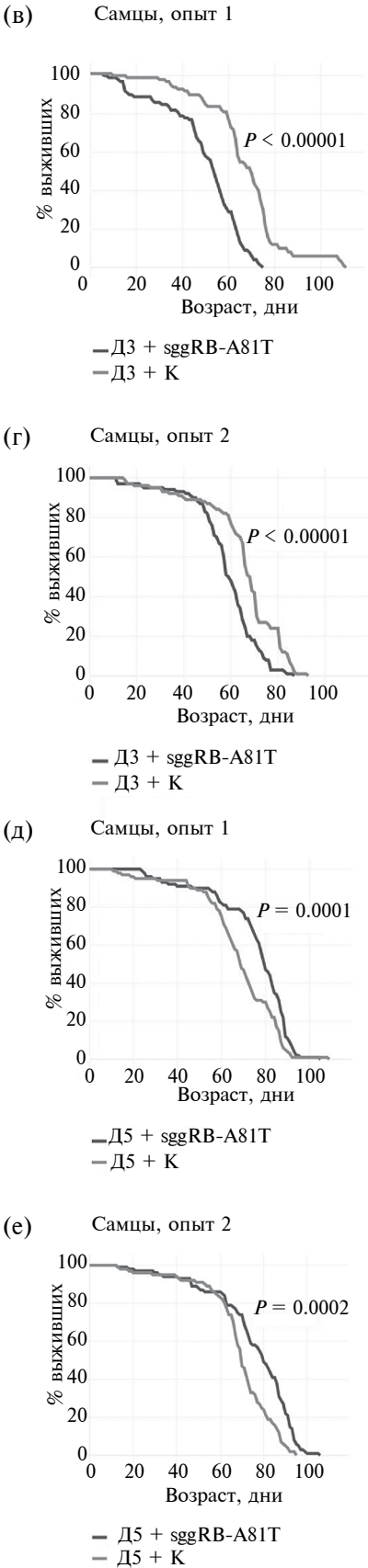
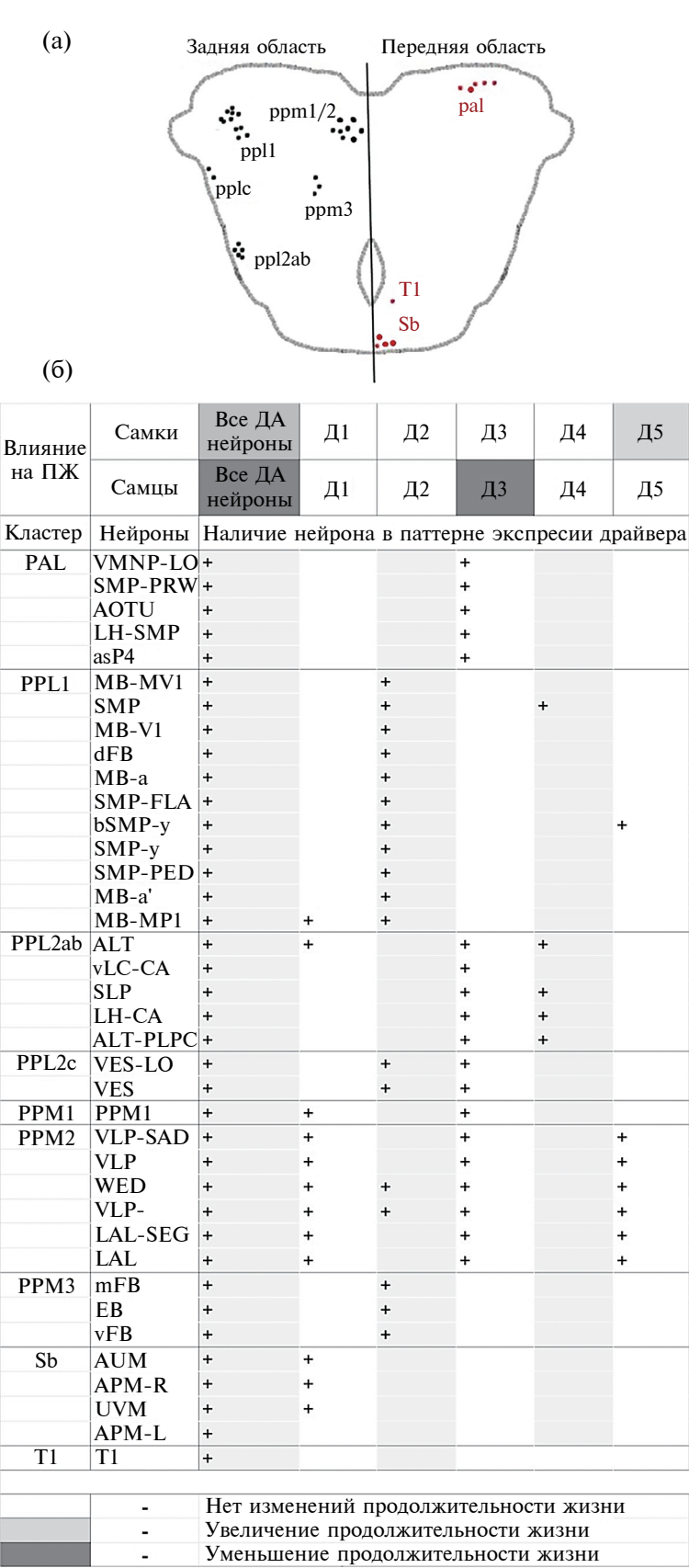
Линия *w[1118]; P{TH-C'-GAL4}* (Д3) активирует трансгенные конструкции во всех нейронах *rpl2*-кластера, в большей части нейронов кластеров *rpm1* и *rpm2* и нескольких нейронах (3–5 штук) *pal*-кластера [16].

Линия *w[1118]; P{VmatR76F02-GAL4.AD}attP40; P{TH-C-GAL4.DBD}attP2* (Д4) активирует трансгенные конструкции в одном ДА нейроне кластера *rpl1* и в четырех из пяти ДА нейронов кластера *rpl2ab* [13].

Линия *w[1118]; P{TH-D-GAL4.AD}attP40; P{VmatR76F05-GAL4.DBD}attP2* (Д5) активирует трансгенные конструкции в единичном нейроне *rpl1* и во всех нейронах *rpm2* [13].

Для изменения экспрессии *shaggy* и активности GSK3 была использована линия *w[1118]; P{w[+mC] = UAS-sgg.A81T}MB2* (*sggRB-A81T*). Она содержит трансгенную конструкцию, включающую кДНК-копию транскрипта *sggRB-A81T*, кодирующего изоформу РВ протеинкиназы GSK3 с аминокислотной заменой A81T в киназном домене. Данная замена блокирует ферментативную активность белка и обеспечивает доминантно-негативный эффект активации *sggRB-A81T*. Линия *w[1118]* (К) без вставки трансгенной конструкции была использована в качестве контрольной [12].

Для индукции экспрессии трансгенной конструкции самцов линии *sggRB-A81T*, а также самцов линии К скрещивали с самками каждой из драйверных линий (Д1–Д5). Для измерения продолжительности жизни самцов и самок всех гибридных генотипов собирали в течение дня и помещали в пробирки с питательной средой (манная крупа, изюм, сахар, дрожжи, агар-агар, нипагин, пропионовая кислота), по пять мух каждого пола отдельно. Число мертвых особей в пробирках регистрировали ежедневно; все культуры вели при 25 °С. Выборка составила 100 особей на генотип/пол; некоторые опыты были повторены дважды.



Для оценки полученных данных использовали стандартный статистический анализ продолжительности жизни [17]. Для оценки статистической значимости различий между кривыми выживания использовали критерий Манна–Уитни.

В первом эксперименте была проведена оценка продолжительности жизни гибридных самцов и самок, полученных в результате скрещивания *sggRB-A81T* и *K* с драйверными линиями Д1, Д2 и Д3. Этот набор драйверов активирует экспрессию трансгенной конструкции в различных и частично перекрывающихся кластерах нейронов (см. рис. 1, б), включая все группы, кроме *ram*, Т1 и единственного нейрона *Sb*. Основной целью использования такого набора драйверных линий было выявление групп кластеров, изменение экспрессии *shaggy* в которых могло бы имитировать эффект изменения его экспрессии во всех нейронах.

Продолжительность жизни гибридных самок, паттерн экспрессии *sggRB-A81T* у которых определялся драйверами Д1 и Д2, не изменилась ($P = 0,1359$, $P = 0,2498$), а в эксперименте с драйвером Д3 снизилась только в одном из двух повторных экспериментов ($P = 0,0001$, $P = 0,3966$). Таким образом, изменение активности GSK3 в протестированных наборах кластеров ДА нейронов не привело к достоверному и воспроизводимому изменению продолжительности жизни самок. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что влияние измененной активности GSK3 на продолжительность жизни самок обеспечивается специфической комбинацией нейронов разных кластеров, которая не представлена ни в одном из трех экспериментов, но существующей в случае активации трансгенной конструкции во всех нейронах.

Продолжительность жизни гибридных самцов, паттерн экспрессии *sggRB-A81T* у которых определялся драйверами Д1 и Д2, не изменилась ($P = 0,3697$, $P = 0,4792$), но была достоверно снижена в случае паттерна, обеспечиваемого драйвером Д3 ($P < 0,00001$, $P < 0,00001$; см. рис. 1, в, г). Таким образом, изменение активности GSK3 в кластерах ДА нейронов *pal*, *ppl2ab* и *ppl2c*, *ppm1* и *ppm2*

привело к достоверному и воспроизводимому изменению продолжительности жизни самцов. Такой паттерн активации трансгенной конструкции полностью воспроизвел эффект активации во всех ДА нейронах. *sggRB-A81T* был активирован в нейронах кластеров *ppl2c*, *ppm1* и *ppm2* также с помощью драйверов Д1 и Д2, однако это не привело к изменению продолжительности жизни гибридных самцов. Возможно, изменение активности GSK3 в этих нейронах не влияет на продолжительность жизни, и важное значение имеет лишь модификация активности GSK3 в нейронах кластеров *pal* и *ppl2ab*. Однако нельзя исключить и того, что принципиальную роль в контроле продолжительности жизни самцов играет взаимодействие нейронов кластеров *ppl2c*, *ppm1* и *ppm2* с нейронами кластера *pal* и *ppl2ab*.

Чтобы уточнить набор кластеров ДА нейронов, изменение активности GSK3 в которых приводит к изменению продолжительности жизни, во втором эксперименте мы использовали драйверы Д4 и Д5, которые затрагивают небольшое количество кластеров и отдельные нейроны. Ранее мы показали, что изменение продолжительности жизни при активации *sggRB-A81T* во всех ДА нейронах связано с потерей единичных нейронов в кластере *ppl2ab* [4]. В связи с этим было принято решение оценить эффект измененной активности GSK3 в нейронах этого кластера на продолжительность жизни, используя драйвер Д4 (см. рис. 1, б). Кроме того, используя драйвер Д5 (см. рис. 1, б), мы оценили продолжительность жизни особей, у которых активность GSK3 изменялась только в единственном нейроне *ppl1* и кластере *ppm2*.

Продолжительность жизни гибридных самок, паттерн экспрессии *sggRB-A81T* у которых определялся драйвером Д4, слабо увеличилась в одном из экспериментов и не изменилась в повторном ($P = 0,0397$, $P = 0,9046$), что свидетельствует об отсутствии достоверного и воспроизводимого эффекта. Таким образом, изменение активности GSK3 в кластере *ppl2ab* не влияет на продолжительность жизни самок, что подтверждает результаты опыта с драйвером Д3. Продолжительность жизни гибридных самок, паттерн экспрессии *sggRB-A81T* у которых определялся драйвером Д5, увеличилась в обоих экспериментах ($P = 0,0001$, $P = 0,0002$; рис. 1, д, е), что свидетельствует о достоверном и воспроизводимом влиянии активации трансгенной конструкции в кластере *ppm2* и одном из нейронов кластера *ppl1* на исследуемый признак. Таким образом, изменение активности GSK3 только в нейронах кластера *ppm2* и одном нейроне *ppl1* полностью воспроизвело положительное влияние на продолжительность жизни самок, продемонстрированное ранее при изменении активности GSK3 во всех ДА нейронах. Следует отметить, однако,

Рис. 1. Роль дофаминергических нейронов в контроле продолжительности жизни. а — схема расположения дофаминергических нейронов в головном мозге взрослой особи *D. melanogaster*; б — паттерн экспрессии драйверов Д1–Д5 в дофаминергических нейронах (по [13, 16]). Кластер *ram*, включающий около 200 дофаминергических нейронов, расположенных в нижней части мозга, не представлен; в, г — кривые выживания самцов (первый и второй опыты); д, е — кривые выживания самок (первый и второй опыты) с измененной экспрессией гена *shaggy* в отдельных кластерах дофаминергических нейронов. ПЖ — продолжительность жизни. P — вероятность различий кривых выживания, критерий Манна–Уитни.

что изменение экспрессии *shaggy* в кластере *rrm2* одновременно с изменением в нейронах некоторых других кластеров (драйверы Д1, Д3, рис. 1, б) не привело к увеличению продолжительности жизни самок.

Продолжительность жизни гибридных самцов, паттерн экспрессии *sggRB-A81T* у которых определялся драйверами Д4 и Д5, снизилась в одном из проведенных экспериментов и не изменилась в другом ($P = 0.0001$, $P = 0.5574$; $P = 0.0001$, $P = 0.1566$), что свидетельствует об отсутствии достоверного и воспроизводимого эффекта. Таким образом, снижение активности GSK3 в единичных нейронах кластера *rpl1* и нейронах кластеров *rpl2ab* и *rrm2* не влияет на продолжительность жизни самцов. Формально, учитывая результаты опыта с драйвером Д3, можно предположить, что снижение продолжительности жизни самцов связано с изменением активности GSK3 в нейронах кластера *ral*.

Отметим, что продолжительность жизни — сложный признак, зависящий от работы многих генов в различных клетках, и надежно выявить влияние на него изменений в экспрессии определенного транскрипта одного гена в очень ограниченном количестве клеток достаточно трудно. В связи с этим мы опирались только на те результаты, которые воспроизвелись в независимых экспериментах. Обобщая, формальный анализ полученных результатов позволяет сказать, что изменение активности протеинкиназы GSK3 в нейронах кластера *rrm2* увеличивает продолжительность жизни самок, а изменение активности GSK3 в нейронах кластера *ral* уменьшает продолжительность жизни самцов так же, как изменение ее активности во всех ДА нейронах. Отметим также, что в целом наши эксперименты указывают на возможность взаимодействия различных кластеров нейронов в контроле продолжительности жизни.

Наличие у высших организмов сложной многокомпонентной сети нейронов различного типа предполагает высокий уровень функциональной специфичности различных их групп и даже отдельных нейронов. Например, проекция каждого ДА нейрона у дрозофилы индивидуальна, и даже находящиеся в одном кластере нейроны могут быть функционально гетерогенными [18]. Все больше данных указывают на то, что один нейрон или определенная группа нейронов могут влиять на сексуальное поведение [19], поиск пищи [20], агрессивность [21]. Так, активация определенных ДА нейронов в кластерах *rpl1* и *ram* приводила к запоминанию неприятного воздействия, тогда как активация других нейронов из этих кластеров не приводила к такому эффекту [22]. Известно, что нейроны *ral* и *rrm2* участвуют в формировании циркадных ритмов [23]. Неудивительно,

что влияние отдельных ДА нейронов и небольших их групп на продолжительность жизни также может различаться. Так, изменение экспрессии гена *Mask*, кодирующего предполагаемый скаффолд белок, в некоторых группах ДА нейронов приводило к увеличению продолжительности жизни, в то время как в других — нет [5]. Наши результаты свидетельствуют о том, что на продолжительность жизни влияет изменение экспрессии гена *shaggy* в нескольких кластерах ДА нейронов. Какие именно кластеры повлияют на продолжительность жизни, определяется тем, активность каких генов изменяется. Так, в наших экспериментах изменение экспрессии *shaggy*, индуцированное драйвером Д3, снизило продолжительность жизни самцов, в то время как в экспериментах, представленных в [5], изменение экспрессии *Mask*, индуцированное тем же драйвером, увеличило продолжительность жизни самцов.

Интересно, что продолжительность жизни самцов и самок зависит от разных нейронов с измененной экспрессией *shaggy*. Так, индукция трансгенной конструкции в кластере *rrm2* не влияет на продолжительность жизни самцов, но увеличивает продолжительность жизни самок, что полностью воспроизводит эффект активации трансгенной конструкции во всех ДА нейронах и, следовательно, указывает на ключевую роль кластера *rrm2* в контроле этого признака у самок. При этом эффект кластера *rrm2* проявляется только при отсутствии изменений экспрессии *shaggy* в других кластерах, что может свидетельствовать о разнонаправленном вкладе разных групп нейронов в контроль продолжительности жизни и их взаимодействии. В то же время активация трансгенной конструкции в кластере *rrm2* и кластерах *ral*, *rpl2* и *rrm1* приводит к снижению продолжительности жизни самцов. Учитывая, что изменение экспрессии *shaggy* в кластерах *rrm2*, *rpl2* и *rrm1* в разных комбинациях не повлияло на продолжительность жизни самцов, можно говорить о специфическом вкладе кластера *ral* в сокращение продолжительности жизни самцов. Высокая половая специфичность влияния кластеров ДА нейронов на продолжительность жизни может быть обусловлена особенностями функций отдельных нейронов у самцов и самок. Возможно, экспрессия двух транскрипционных факторов, участвующих в определении пола в ходе развития и кодируемых генами *fruitless* и *doublesex*, в нервной системе *D. melanogaster* может детерминировать половой диморфизм нервных клеток [24], который затем определяет особенности влияния различных белков, в том числе GSK3, на свойства нейронов и продолжительность жизни. Известно, например, что ДА нейроны кластера *rpl2ab* участвуют в восстановлении нормального полового поведения в старости [19].

Результаты, представленные в настоящей работе, доказывают, что активация экспрессии *sgg-RB-A81T* в отдельных кластерах дофаминергической системы *D. melanogaster* может приводить к эффектам, подобным эффектам активации экспрессии *sgg-RB-A81T* во всех ДА нейронах. Проведенные эксперименты позволили заключить, что роль разных кластеров ДА нейронов в контроле продолжительности жизни различна, и выделить те кластеры, изменение экспрессии гена *shaggy* в которых приводит к изменению этого признака.

Это открывает принципиальную возможность для дальнейшего поиска геропротекторных воздействий, направленных на конкретные клеточные мишени, что позволит повысить их эффективность и безопасность.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объектов позвоночных животных и людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chinta S.J., Andersen J.K. Dopaminergic neurons // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005. V. 37. № 5. P. 942–946. doi:10.1016/j.biocel.2004.09.009
2. Zhou Z.D., Yi L.X., Wang D.Q. et al. Role of dopamine in the pathophysiology of Parkinson's disease // Transl. Neurodegener. 2023. V. 12. № 1. P. 44. doi:10.1186/s40035023-00378-6
3. Coleman C.R., Pallos J., Arreola-Bustos A. et al. Natural variation in age-related dopamine neuron degeneration is glutathione-dependent and linked to life span // bioRxiv. 2024. doi:10.1101/2024.02.12.580013
4. Trostnikov M.V., Veselkina E.R., Kremontsova A.V. et al. Modulated expression of the protein kinase GSK3 in motor and dopaminergic neurons increases female lifespan in *Drosophila melanogaster* // Front. Genet. 2020. V. 11. doi:10.3389/fgene.2020.00668
5. Tian X. Enhancing *mask* activity in dopaminergic neurons extends lifespan in flies // Aging Cell. 2021. V. 20. № 11. doi:10.1111/accel.13493
6. Beurel E., Grieco S.F., Jope R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases // Pharmacol. Ther. 2015. V. 148. P. 114–131. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016
7. Patel P., Woodgett J.R. Glycogen synthase kinase 3: A kinase for all pathways? // Curr. Top. Dev. Biol. 2017. V. 123. P. 277–302. doi:10.1016/bs.ctdb.2016.11.011
8. Golpich M., Amini E., Hemmati F. et al. Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) signaling: Implications for Parkinson's disease // Pharmacol. Res. 2015. V. 97. P. 16–26. doi:10.1016/j.phrs.2015.03.010
9. Duda P., Wiśniewski J., Wójtowicz T. et al. Targeting GSK3 signaling as a potential therapy of neurodegenerative diseases and aging // Expert. Opin. Ther. Targets. 2018. V. 22. № 10. P. 833–848. doi:10.1080/14728222.2018.1526925
10. Ilouz R., Kowalsman N., Eisenstein M. et al. Identification of novel glycogen synthase kinase-3 β substrate-interacting residues suggests a common mechanism for substrate recognition // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 41. P. 30621–30630. doi:10.1074/jbc.M604633200
11. García-Yagüe Á.J., Lastres-Becker I., Stefanis L. et al. α -Synuclein induces the GSK-3-mediated phosphorylation and degradation of NURR1 and loss of dopaminergic hallmarks // Mol. Neurobiol. 2021. V. 58. № 12. P. 6697–6711. doi:10.1007/s12035-021-02558-9
12. Bourouis M. Targeted increase in shaggy activity levels blocks wingless signaling // Genesis. 2002. V. 34. № 1–2. P. 99–102. doi:10.1002/gene.10114
13. Xie T., Ho M.C.W., Liu Q. et al. A genetic toolkit for dissecting dopamine circuit function in *Drosophila* // Cell. Rep. 2018. V. 23. № 2. P. 652–665. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.068
14. Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. V. 118. № 2. P. 401–415. doi:10.1242/dev.118.2.401
15. Luan H., Diao F., Scott R.L. et al. The *Drosophila* split Gal4 system for neural circuit mapping // Front. Neural. Circuits. 2020. V. 14. doi:10.3389/fncir.2020.603397
16. Liu Q., Liu S., Kodama L. et al. Two dopaminergic neurons signal to the dorsal fan-shaped body to promote wakefulness in *Drosophila* // Curr. Biol. 2012. V. 22. № 22. P. 2114–2123. doi:10.1016/j.cub.2012.09.008
17. Carey J.R. Longevity: The biology and demography of life span. Princeton, NT: Princeton Univ. Press, 2003. 304 p.
18. Busto G.U., Cervantes-Sandoval I., Davis R.L. Olfactory learning in *Drosophila* // Physiology (Bethesda). 2010. V. 25. № 66. P. 338–346. doi:10.1152/physiol.00026.2010
19. Kuo S.-Y., Wu C.-L., Hsieh M.-Y. et al. PPL2ab neurons restore sexual responses in aged *Drosophila* males through dopamine // Nat. Commun. 2015. V. 6. № 1. P. 7490. doi:10.1038/ncomms8490.

20. Landayan D., Feldman D.S., Wolf F.W. Satiation state-dependent dopaminergic control of foraging in *Drosophila* // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 5777. doi:10.1038/s41598-018-24217-1.
21. Alekseyenko O.V., Chan Y.-B., Li R., Kravitz E.A. Single dopaminergic neurons that modulate aggression in *Drosophila* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 15. P. 6151–6156. doi:10.1073/pnas.1303446110
22. Aso Y., Herb A., Ogueta M. et al. Three dopamine pathways induce aversive odor memories with different stability // PLoS Genet. 2012. V. 8. № 7. doi: 10.1371/journal.pgen.1002768
23. Liang X., Holy T.E., Taghert P.H. Polyphasic circadian neural circuits drive differential activities in multiple downstream rhythmic centers // Curr. Biol. 2023. V. 33. № 2. P. 351–363.e3. doi: 10.1016/j.cub.2022.12.025
24. Rezával C., Nojima T., Neville M.C. et al. Sexually dimorphic octopaminergic neurons modulate female postmating behaviors in *Drosophila* // Curr. Biol. 2014. V. 24. № 7. P. 725–730. doi: 10.1016/j.cub.2013.12.051.

The *shaggy* Gene Encoding the GSK3 Protein Kinase Controls the Sex-Dependent Effects of Specific Clusters of *D. melanogaster* Dopaminergic Neurons on Lifespan

N. V. Roshina^{1, 2}, E. R. Veselkina¹, M. V. Trostnikov³, E. G. Pasyukova^{1, *}

¹National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

³Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: egpas@rambler.ru

Dopaminergic neurons control behavior, memory, and locomotion, and the causal relationship of their dysfunction to neurodegenerative diseases and aging has drawn attention to investigating the involvement of dopaminergic neurons in the regulation of lifespan. The highly conserved serine-threonine protein kinase GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), one of the most important multifunctional cellular enzymes in higher organisms, which in *Drosophila melanogaster* is encoded by the *shaggy* gene, plays an important role in the function of dopaminergic neurons. This paper provides the first evidence that altering *shaggy* expression levels in just a few clusters of dopaminergic neurons can affect lifespan. This effect can be either negative or positive and depends on sex. The data obtained may serve as a basis for further search for targeted cell-specific factors regulating the rate of aging, as well as for the development of highly specific approaches to the therapy of neurodegenerative diseases.

Keywords: lifespan, the nervous system, dopaminergic neurons, protein kinase GSK3, *Drosophila melanogaster*.

ГЕНОМ *Staphylococcus epidermidis* ИЗ КАЗЕОЗНОГО НЕКРОЗА ТУБЕРКУЛЕМЫ

© 2024 В. В. Синьков¹, Е. А. Орлова¹, О. Б. Огарков^{1, *}, А. Е. Суздальницкий^{2, 3},
И. Г. Кондратов¹, Н. Л. Белькова¹, Л. В. Рычкова¹, Л. И. Колесникова¹

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, 664003 Россия

²Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, Иркутск, 664039 Россия

³Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, 664003 Россия

*e-mail: obogarkov@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 23.04.2024 г.

Принята к публикации 06.05.2024 г.

Ряд факультативно-анаэробных липофильных микроорганизмов, включая представителей *Corynebacterium* и *Staphylococcaceae*, обитают в некротическом содержимом туберкулем. Проведено выделение из казеума штамма *Staphylococcus epidermidis*, его полногеномное секвенирование и картирование генов. Выявили, что коагулазонегативный стафилококк относится к генотипу MLST 73 и устойчив к двум противотуберкулезным препаратам. Фенотипически штамм обладает уреазной, желатиназной и бета-гемолитической активностью и имеет соответствующие гены. Как и у *S. epidermidis* O47, его геном состоит из одной хромосомы, содержащей около 2.4 млн пар нуклеотидов, а *oriC* имеет такую же ориентацию. Всего было идентифицировано 2333 гена, из которых 2206 были кодирующими. В контигах изученного генома обнаружены последовательности генов репликации плазмид: *rep7a*, *rep13*, *rep5b* и *pSK1*. Филогенетический анализ указывает на близость анализируемого генома с большой группой европейских штаммов. Учитывая биохимические и микробиологические свойства выделенного штамма, мы предполагаем, что стафилококки и другие факультативно-анаэробные микроорганизмы-сателлиты туберкулезных очагов могут играть важную роль в разжижении казеозного некроза за счет собственной протеолитической активности и привлечения нейтрофилов к очагу воспаления.

Ключевые слова: туберкулема, *Staphylococcus epidermidis*, картирование генов вирулентности.

DOI: 10.31857/S0016675824100139 **EDN:** WEFYLG

Микробиота глубоких отделов легких сильно отличается от микробиоты верхних дыхательных путей гораздо более низкой биомассой и динамическим разнообразием [1]. Внутри туберкулезного очага происходит резкое снижение биоразнообразия сателлитной микробиоты [2]. Полученные нами метагеномные данные позволили разделить исследуемые сообщества микроорганизмов туберкулезных очагов на два типа: (i) — микобактериальная казеома (туберкулема), в которой 70% и более геномов соответствует микобактериям туберкулеза, и (ii) — полимикробное сообщество, в котором концентрация микобактерий туберкулеза варьирует от 0 до 10% [3]. При этом в одном из казеумов (некротический центр туберкулезного очага) было выявлено преобладание представителей семейства *Staphylococcaceae* [3]. Туберкулема является наиболее часто встречающейся патологической формой при туберкулезе легких и квалифицируется как объемное казеозно-некротическое образование,

отграниченное от прилежащей ткани капсулой. Культивирование пяти казеозных образцов из туберкулем (отличных от использованных в настоящем исследовании) при пониженном парциальном давлении кислорода позволило нам выделить и идентифицировать по результатам полногеномного секвенирования липофильную *Corynebacterium kefirresidentii* [4]. Выделение из туберкулезных некротических очагов липофильных факультативно-анаэробных бактерий вместе с результатами метагеномных исследований [2–4] свидетельствует о вероятной роли нетуберкулезной сателлитной микрофлоры в процессах разжижения казеозного некроза. Это может иметь важное патофизиологическое значение и, вероятно, должно рассматриваться как неблагоприятный исход при туберкулезе легких. Мы предполагаем, что микробное сообщество туберкулезного очага формируется в результате изоляции иммунной системой пациента вместе с возбудителем туберкулеза [5] других бактерий

из нижних дыхательных путей. При этом условия внутри туберкулезного очага создают возможности для развития преимущественно факультативно-анаэробной липофильной микробиоты.

Цель настоящего исследования — выделение и полногеномное секвенирование представителя *Staphylococcaceae* как одного из наиболее распространенных сателлитных обитателей казеозного некроза в очагах при туберкулезе легких.

Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Все образцы операционного материала были получены во время операций по иссечению туберкулем.

Образцы помещались в 50-миллилитровую стерильную пластиковую пробирку в условиях операционной и затем хранились при температуре -80°C до момента исследования. После медленного оттаивания при 4°C максимально доступное количество некротического материала из туберкулезного очага помещали в стерильные пробирки с 5-ю мл LB (Luria-BertaniMedium, BD Difco) под

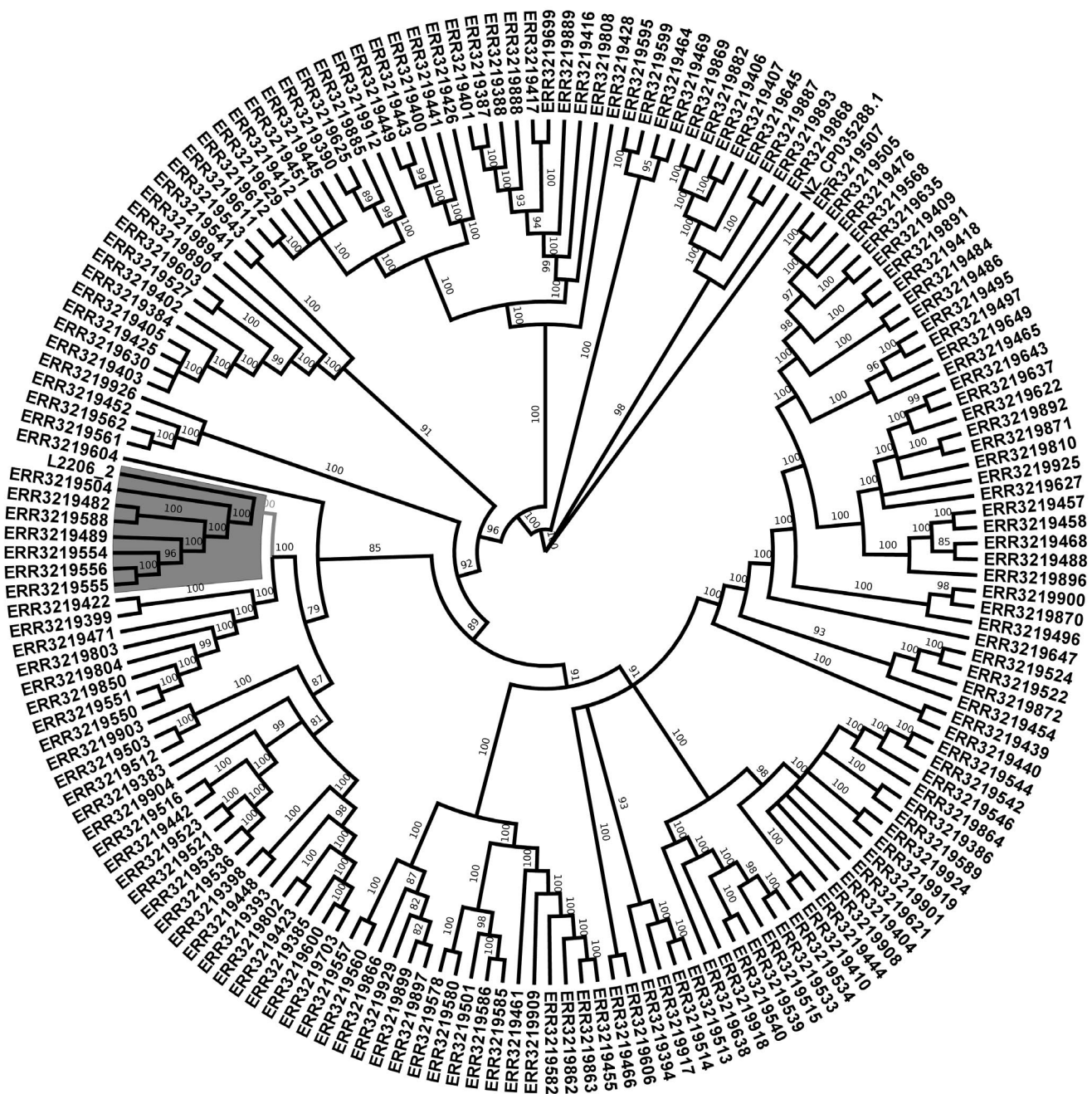
вазелиновым маслом. Через две недели 100 мкл осадка засевали газоном на чашку Петри с LB-агаром (BD Difco). Инкубацию проводили при 37°C в течение трех дней в инкубационном контейнере BD GasPak EZ с AnaeroGasPac (Россия) до образования видимых колоний бактерий. Один штамм из образца 2206 дал стабильный и воспроизводимый рост на чашках Петри.

Штамм 2206-2 был первично идентифицирован с помощью секвенирования по Сэнгеру генов *16S rPHK* и *rpoB*. Для амплификации и секвенирования по Сэнгеру гена *rpoB* рода *Staphylococcus* были использованы праймеры 1418st F: 5'-ATCTCAATTYATGGACCAAGC, 3241st R: 5'-GCTACGTGTTCCATACCTGT [6], а также универсальные бактериальные праймеры для гена *16S rPHK* EUB27 L: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG и EUB518 R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG [7]. Идентичность по генам *rpoB* и *16S rPHK* с видами *S. epidermidis* образца 2206-2 и составила 100% (GenBank accession numbers: 2206-2 *16S* rRNA OP893659, *rpoB* OP893660).

Таблица 1. Сводная таблица биохимических и микробиологических свойств выделенного штамма

Параметры	2206-2	Параметр	2206-2
STAPHYtest 16 (ErbaLachema)		Sensititre RAPMYCO	
VPT Acetoin	yes	Trimethoprim	Res
H Urease URE	yes	Ciprofloxacin	Sus
G Arginine ARG	no	Moxifloxacin	Sus
F Ornithine ORN	no	Cefoxitin	Sus
E β -GalactosidasebGA	no	Amikacin	Sus
D β -Glucuronidase GLR	no	Doxycycline	Sus
C Esculin ESL	no	Tigecycline	Sus
B Nitrate NIT	no	Clarithromycin	Res
A Phosphatase PHS	no	Linezolid	Sus
H Galactose GAL	yes	Imipenem	Sus
G Sacharose SUC	yes	Cefepime	Sus
F Trehalose TRE	no	Amoxicillin	Sus
E Mannitol MAN	no	Ceftriaxone	Sus
D Xylose XYL	no	Minocycline	Sus
C Maltose MLT	yes	Tobramycin	Sus
B Mannose MNS	yes	Sensititre SLOWMYCO	
A Lactose LAC	yes	Rifabutin	Sus
Микробиологические тесты		Ethambutol	Res
Gelatinase	yes	Isoniazid	Res
Coagulase	no	Rifampin	Sus
Hemolysis	yes (β -type)	Streptomycin	Sus
Lipase	no	Ethionamide	Sus

Примечание. Sus — susceptibility (чувствительность), Res — resistance (устойчивость).



Полногеномное секвенирование осуществлено на NGS-секвенаторе DNBSeg-G400 компанией “Геномед”. Первичные последовательности генома размещены в NCBI, проект PRJNA1074084. Сборку геномных прочтений в скаффолды проводили с помощью программы Spades v. 3.11.1. Аннотация контигов осуществлялась при помощи пакета программ PGAP. Идентификация генов, кодирующих 16S рРНК и 23S рРНК исследуемых штаммов

в сборке, проводилась с помощью программного пакета SqueezeMeta. Гены факторов вирулентности определяли программой Vfanalyzer. Предсказание oriC в исследуемом геноме осуществлялось с использованием программы Ori-Finder 2. Для определения нуклеотидных последовательностей плазмидных генов репликации использовали программу PlasmidFinder.

Таблица 2. Обнаруженные гены факторов вирулентности

Группа факторов вирулентности	Фактор вирулентности	Соответствующий ген [9]	2206-2 рамка считывания
Adherence	Autolysin	<i>atl</i>	orf01481
	Cell wall associated fibronectin binding protein	<i>ebh</i>	orf00155
	Elastinbindingprotein	<i>ebp</i>	orf00118
	Ser-Asp rich fibrinogenbinding proteins	<i>sdrF</i>	orf01195
		<i>sdrG</i>	orf00844
		<i>sdrH</i>	orf01386
Enzyme	Cysteineprotease	<i>sspB</i>	orf01711
	Lipase	<i>geh</i>	orf01204
		<i>lip</i>	orf02238
	Serine V8 protease	<i>sspA</i>	orf02100
	Thermonuclease	<i>nuc</i>	orf00275
Toxin	Betahemolysin	<i>hly</i>	orf01227

Биоинформационный поиск потенциальной множественной устойчивости к антибиотикам осуществляли программами ResFinder 4.1 и CARD 3.2.9 (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>). Филогенетическое древо построено программой IQ-TREE с 1000 итераций. Биохимические свойства штамма изучали с использованием биохимических тест-систем «STAPHY test 16» (Erba Lachema s. r. o., Чехия). Липазную активность определяли посевом на сердечно-мозговой агар (HIMEDIA, Индия) с добавлением 1%-ного Tween-80 и 10 мМ CaCl₂, как описано ранее [4]. Фенотипическая устойчивость к антибиотикам против микобактерий определялась с помощью тест-систем TREK Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific (США) RAPMYCO для быстрорастущих и SLOWMYCO для медленно растущих микобактерий по протоколам производителя.

Штамм относится к коагулазонегативным стафилококкам (табл. 1). Обращает на себя внимание фенотипическая устойчивость к двум противотуберкулезным препаратам, а также уреазная, желатиназная и гемолитическая активности. По результатам секвенирования по Сэнгеру и полногеномного секвенирования, штамм относится к MLST 73 [8] — достаточно широко распространенный в мире генотип у людей, но не встречавшийся ранее в России. Так же как и у *S. epidermidis* O47 [9], его геном состоит из одной хромосомы, содержащей около 2.4 млн п. н., а *oriC* имеет ту же направленность. В общей сложности были идентифицированы 2333 гена, из которых 2206 являлись кодирующими. В контигах исследуемого генома обнаружены последовательности плазмидных репликационных генов: *rep7a*, *rep13*, *rep5b* и *pSK1*. Визуально при

электрофорезе тотальной ДНК наблюдались три дискретные (отличные от геномной) полосы, которые могут быть плазмидами (данные не приводятся). Биоинформационный анализ, выполненный программами ResFinder 4.1 и CARD 3.2.9, предполагает множественную лекарственную устойчивость исследуемого штамма к широкому кругу антибиотиков, включая макролиды, за счет наличия генов *fosB*, *msr(A)*, *mph(C)* и *tet(K)*, с большой вероятностью кодируемых плазмидами.

На рис. 1 приведено МР филогенетическое древо 180 геномов *S. epidermidis* из NCBI и генома выделенного штамма. Затемнением выделен кластер геномов *S. epidermidis* из Европы (BioProject PRJEB31403). Таким образом, выделенный штамм *S. epidermidis* обладал весьма умеренной токсичностью и вирулентностью (табл. 2), продуцировал биофильм при культивировании на жидкой среде, был крайне устойчив к различным химическим воздействиям (данные не приводятся) и обладал множественной лекарственной устойчивостью, включая устойчивость к этамбутолу и изониазиду.

Мы предполагаем, что микробное сообщество легких в силу своего непостоянства и транзиторного характера попадает внутрь туберкулезного очага в известной мере случайно. Однако попадание липофильных факультативно-анаэробных бактерий может драматическим образом изменять организацию некротического содержимого туберкулезного очага. По всей видимости, благоприятное течение связано со “стерильной” кальцификацией некроза, в рамках которой никакая посторонняя микробиота внутри казеоза не размножается. Микобактерии туберкулеза в анаэробных условиях казеума

остаются жизнеспособными, но теряют способность к размножению, при этом они демонстрируют чрезвычайную толерантность к противотуберкулезным препаратам [10].

Можно также предполагать, что в некротическом содержимом способна развиваться “патологическая сукцессия”, когда к бактериям с высокой активностью липаз [4] присоединяются другие бактерии, имеющие в том числе коллагеназную (желатиназа) активность, например стафилококки. Разрушение коллагеновой стромы легкого является необратимым процессом, ведущим в конечном итоге к образованию каверн. Мы ожидаем, что выделенные нами из казеума туберкулем липофильные факультативно-анаэробные микроорганизмы в дальнейшем могут послужить источником биологически активных веществ с адьювантными и/или иммуномодулирующими свойствами, пригодными для создания специфических иммунологических препаратов, в том числе для усиления эффекта субъединичных вакцин, разрабатываемых для профилактики туберкулеза. В пользу этой возможности говорит многолетняя и успешная история исследования грамположительной анаэробной палочки *Corynebacterium parvum*, которая принадлежит к нормальной микробиоте кожи [11].

Настоящая работа выполнена при участии группы геномных исследований и биоинформационного анализа ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ с использованием оборудования ЦКП “Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья” ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ 23-15-00280.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Natalini J.G., Singh S., Segal L.N. The dynamic lung microbiome in health and disease. // Nat. Rev. Microbiol. 2023. V. 21. P. 222–235. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00821-x>
2. Орлова Е.А., Огарков О.Б., Кондратов И.Г. и др. Анализ разнообразия и функционального потенциала бактериальных сообществ туберкулезных очагов // Клеточ. техн. в биол. и медицине. 2024. № 1. С. 29–36. <https://doi.org/10.47056/1814-3490-2024-1-29-36>. Cell Technologies in Biology and Medicine 2024. № 1. С. 29–36.)
3. Орлова Е.А., Огарков О.Б., Суздальницкий А.Е. и др. Анализ микробного разнообразия казеозного некроза туберкулезных очагов // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2021. Т. 39. № 3. С. 18–24. <https://doi.org/10.17116/molgen20213903118> <https://doi.org/10.3103/S0891416821030058>
4. Огарков О.Б., Суздальницкий А.Е., Кондратов И.Г. и др. Выделение и полногеномное секвенирование липофильной анаэробной бактерии, представителя видового комплекса *Corynebacterium tuberculostearicum*, из туберкулезного очага // Acta Biomedica Scientifica. 2023. Т. 8. № 4. С. 12–19. <http://dx.doi.org/10.29413/ABS.2023-8.4.2>
5. Russell D.G., Cardona P.J., Kim M.J., Allain S., Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma // Nat. Immunol. 2009. V. 10. № 9. P. 943–948. <https://doi.org/10.1038%2Fni.1781>
6. Mellmann A., Becker K., von Eiff C. et al. Sequencing and staphylococci identification // Emerg. Infect. Dis. 2006. V. 12 № 2 P. 333–336. <https://doi.org/10.3201%2Fid1202.050962>
7. Sun D.L., Jiang X., Wu Q.L., Zhou N.Y. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. № 19. P. 5962–5969. <https://doi.org/10.1128/aem.01282-13>
8. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications // Wellcome Open Res. 2018. V. 24. № 3. P. 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
9. Raue S., Fan S.H., Rosenstein R. et al. The Genome of *Staphylococcus epidermidis* O47 // Front. Microbiol. 2020. V. 25. № 11. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2020.02061>
10. Sarathy J.P., Dartois V. Caseum: A niche for *Mycobacterium tuberculosis* drug-tolerant persists // Clin. Microbiol. Rev. 2020. V. 33 № 3. <https://doi.org/10.1128/cmr.00159-19>
11. Palmieri B., Vadalà M., Roncati L. et al. The long-standing history of *Corynebacterium parvum*, immunity, and viruses // J. Med. Virol. 2020 V. 92. № 11. P. 2429–2439. <https://doi.org/10.1002%2Fjmv.26100>

The genome of *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Caseous Tuberculoma

V. V. Sinkov¹, E. A. Orlova¹, O. B. Ogarkov^{1,*}, A. E. Suzdalnitsky^{2, 3}, I. G. Kondratov,
N. L. Belkova¹, L. V. Rychkova¹, L. I. Kolesnikova¹

¹Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia

²Irkutsk Tuberculosis-prevention hospital, Irkutsk, 664039 Russia

³Irkutsk State Medical University, Irkutsk, 664003 Russia

*e-mail: obogarkov@mail.ru

A number of facultative-anaerobic lipophilic microorganisms, including representatives of *Corynebacterium* and Staphylococcaceae, inhabit the necrotic contents of tuberculomas. A strain of *Staphylococcus epidermidis* was isolated from caseum, fully genome sequenced, and gene-mapped. The coagulase-negative *Staphylococcus* belonged to the MLST 73 genotype and was resistant to two antituberculosis drugs. The strain phenotypically had urease, gelatinase and beta-hemolytic activities and possessed the corresponding genes. Similar to *S. epidermidis* O47, its genome consists of a single chromosome containing approximately 2.4 million base pairs, and oriC has the same orientation. A total of 2333 genes were identified, of which 2206 were coding genes. In contigs of the genome, sequences of plasmid replication genes were found: *rep7a*, *rep13*, *rep5b* and *pSK1*. Phylogenetic analysis indicates the closeness of the analyzed genome with a large group of European strains. Considering the biochemical and microbiological properties of the isolated strain, we hypothesize that staphylococci and other facultative-anaerobic satellite microorganisms of tuberculosis foci may play an important role in caseum liquefaction due to their own proteolytic activity and attraction of neutrophils to the focus of inflammation.

Keywords: tuberculoma, *Staphylococcus epidermidis*, virulence gene mapping.