

ISSN 0016-6758

Том 59, Номер 8

Август 2023



ГЕНЕТИКА



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 8, 2023

Обзорные и теоретические статьи

Методы нормализации данных ChIP-seq и их применение в исследованиях регуляторных участков генома клеток мозга

Ф. Е. Гусев, Т. В. Андреева, Е. И. Рогов

859

Генетические полиморфизмы, ассоциированные с эффективностью коррекции массы тела: систематический обзор

Э. С. Егорова, И. И. Ахметов

870

Генетика микроорганизмов

Транскриптомный анализ штамма *Levilactobacillus brevis* 47f в условиях окислительного стресса

Е. У. Полуэктова, О. В. Аверина, А. С. Ковтун, В. Н. Даниленко

888

Реакция штамма *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 на окислительный стресс

О. В. Аверина, А. С. Ковтун, Д. А. Мавлетова,
Р. Х. Зиганшин, В. Н. Даниленко

898

Генетика растений

Экспрессия генов биогенеза каротиноидов в процессе длительного холодового хранения клубней картофеля

А. В. Кулакова, А. В. Шенникова, Е. З. Кочиева

914

Хромосомная локализация гена *b-Amy-A1* и распространение его аллелей в культуре озимой мягкой пшеницы

В. П. Нецветаев, Я. О. Козелец, А. П. Ащеулова,
А. В. Петренко, О. В. Акиншина

929

Особенности транскрипционной активности длинных некодирующих РНК (*COOLAIR*, *COLDAIR* и *COLDWRAP*) при яровизации растений *Arabidopsis thaliana* северных природных популяций

М. В. Зарецкая, О. Н. Лебедева, О. М. Федоренко

938

Генетика животных

История колонизации острова Итуруп красно-серой полевкой *Craseomys rufocanus* по данным анализа фрагмента гена цитохрома *b* (*cytb*)

Н. И. Абрамсон, Л. С. Турсунова, Т. В. Петрова,
И. Ю. Попов, В. В. Платонов, А. В. Абрамов

946

Генетика человека

Полногеномное ассоциативное исследование риска развития шизофрении в Республике Башкортостан

А. Э. Гареева

954

Краткие сообщения

Популяционно-генетическая характеристика ингушей, проживающих
в Северной Осетии-Алании

*Г. И. Ельчинова, Н. В. Балинова, В. В. Кадышев,
И. С. Тебиева, Ю. А. Ревазова, Р. А. Зинченко*

964

Использование генетических ресурсов тетраплоидной пшеницы *Triticum aethiopicum*
для создания линий фиолетовозерной мягкой пшеницы
с повышенным содержанием антоцианов

А. В. Фисенко, А. Ю. Драгович

971

Contents

Vol. 59, No. 8, 2023

Reviews and Theoretical Articles

Methods for ChIP-seq Normalization and Their Application for Analysis of Regulatory Elements in Brain Cells

F. E. Gusev, T. V. Andreeva, and E. I. Rogaev

859

Genetic Polymorphisms Associated with the Efficiency of Weight Loss: A Systematic Review

E. S. Egorova and I. I. Ahmetov

870

Genetics of Microorganisms

Transcriptomic Analysis of the *Levilactobacillus brevis* 47f Strain under Oxidative Stress

E. U. Pouektova, O. V. Averina, A. S. Kovtun, and V. N. Danilenko

888

Reaction of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Strain ATCC 15697 to Oxidative Stress

O. V. Averina, A. S. Kovtun, D. A. Mavletova, R. H. Ziganshin, and V. N. Danilenko

898

Plant Genetics

The Content of Carotoids and the Expression Profile of Carotenoid Biogenesis Genes during Long-Term Cold Storage of Potato Tubers

A. M. Kulakova, A. V. Shchennikova, and E. Z. Kochieva

914

Chromosomal Location of the *b-Amy-A1* Gene and Distribution of Its Alleles in Winter Common Wheat Culture

V. P. Netsvetaev, Ya. O. Kozelets, A. P. Ascheulova, A. V. Petrenko, and O. V. Akinshina

929

Peculiarities of Transcriptional Activity of Long Non-Coding RNAs (*COOLAIR*, *COLDAIR*, and *COLDWRAP*) during the Vernalization of the Plant *Arabidopsis thaliana* of Northern Natural Populations

M. V. Zaretskaya, O. N. Lebedeva, and O. M. Fedorenko

938

Animal Genetics

The Colonization History of Iturup Island by the Red-Backed Vole *Craseomys rufocanus* according to the Analysis of the Cytochrome *b* (*cytb*) Fragment

N. I. Abramson, L. S. Tursunova, T. V. Petrova, I. Yu. Popov, V. V. Platonov, and A. V. Abramov

946

Human Genetics

Genome-Wide Association Study of the Risk of Schizophrenia in the Republic of Bashkortostan

A. E. Gareeva

954

Short Communications

Population-Genetic Characteristics Ingush in the North Ossetia-Alania

*G. I. Elchinova, N. V. Balinova, V. V. Kadyshv,
I. S. Tebieva, Yu. A. Revazov, and R. A. Zinchenko*

964

The Use of the Genetic Resources of Tetraploid Wheat *Triticum aethiopicum*
on the Developing of Purple-Grain Common Wheat
with a High Content of Anthocyanins

A. V. Fisenko and A. Yu. Dragovich

971

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 57.088.1

МЕТОДЫ НОРМАЛИЗАЦИИ ДАННЫХ ChIP-seq И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ
В ИССЛЕДОВАНИЯХ РЕГУЛЯТОРНЫХ УЧАСТКОВ
ГЕНОМА КЛЕТОК МОЗГА

© 2023 г. Ф. Е. Гусев^{1, 2, *}, Т. В. Андреева^{1, 2, **}, Е. И. Рогаев^{1, 2, ***}

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

²Научный центр генетики и науки о жизни, Университет “Сириус”, Краснодарский край, пгт. Сириус, 354340 Россия

*e-mail: gusev@vigg.ru

**e-mail: an_tati@vigg.ru

***e-mail: evivrog@gmail.com

Поступила в редакцию 14.12.2022 г.

После доработки 13.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

За последние годы метод иммунопреципитации хроматина с последующим глубоким секвенированием (ChIP-seq) стал одним из основных инструментов для исследования регуляции экспрессии генов. Как и другие способы молекулярного профилирования, ChIP-seq имеет ряд методических особенностей, которые могут оказывать нежелательный эффект на получаемые результаты, особенно в случаях, когда используются образцы клеток и тканей, качество которых сложно контролировать, например замороженные постмортальные образцы тканей мозга человека. Однако методы биоинформатического анализа совершенствуются с каждым годом и позволяют уменьшить эти эффекты на этапе анализа полученных данных секвенирования и позволяют сделать поправки (нормализовать данные) на неравномерность как технических особенностей ChIP-seq, так и в более общем смысле различных факторов исследований, например постмортальный интервал или гетерогенность клеточного состава исследуемых образцов. В этом обзоре мы рассмотрели широкий спектр предложенных методов нормализации данных ChIP-seq, особенности их применения и выбора в конкретном исследовании, в том числе в экспериментах с образцами клеток мозга человека. Представлены преимущества и недостатки существующих подходов к нормализации, а также примеры, свидетельствующие о перспективности использования методов ChIP-seq при исследовании мозга.

Ключевые слова: геномика, эпигеномика, хроматин, нормализация, иммунопреципитация, мозг.

DOI: 10.31857/S0016675823080088, **EDN:** XTNLER

Геном любого живого организма помимо самой генетической последовательности имеет также ряд факторов, которые характеризуют его работу в клетках. В клетках ДНК упакована в структуру, называемую хроматином, и при этом намотана на белковые комплексы, называемые нукleosомами, которые в свою очередь состоят из гистонов. Различные химические модификации гистонов, такие как метилирование или ацетилирование отдельных оснований, коррелируют с функцией соответствующих участков генома [1]. Суммарно такие изменения гистонов и другие химические изменения ДНК называются эпигеномом [2]. За последние годы подход, основанный на иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием (ChIP-seq), стал одним из основных методов исследования эпигенетического состояния генома. Он состоит из двух последовательных этапов: 1) выделение белков, связанных с ДНК, с

помощью специфических антител и 2) определение последовательностей выделенной ДНК. Картировав затем полученные последовательности на референсную последовательность генома исследуемого организма, можно определить связана ли ДНК каждого участка генома с исследуемым белком или нет, что можно использовать как для изучения транскрипционных факторов, так и для модификаций гистонов [3].

Как и многие другие методы количественных исследований в геномике, ChIP-seq используется в том числе и для сравнительного анализа нескольких образцов и сталкивается с теми же проблемами, что и, например, анализ экспрессии генов с помощью гибридизации на микрочип или секвенирования транскриптома (RNA-seq): наличие так называемой технической вариативности при получении данных [4, 5]. Наблюдаемое в геномных профилях разнообразие условно делит-

ся на две части: биологическое и техническое. Биологическое разнообразие отражает действительные различия между особями (образцами) в живой природе, а техническое разнообразие отражает дополнительные эффекты, которые добавляются во время измерения. Самым очевидным таким эффектом является глубина секвенирования (т.е. суммарное количество прочтений, полученных для конкретного образца) [6]. Кроме этого, при подготовке библиотек секвенирования количество циклов амплификации может быть различным в зависимости от количества доступной ДНК, что в конечном итоге повлияет на измеренные уровни связанности белков с ДНК при выполнении ChIP-seq [7]. Существуют факторы, которые более сложно контролировать, например при подготовке партии образцов работы были разбиты на несколько дней, но в каждый из дней средняя температура воздуха в лаборатории была различной, что повлияло на скорость химических реакций и в конце концов внесло вклад в полученные данные [8]. При проведении ChIP-seq одним из основных таких факторов является неравномерная эффективность работы антител [9]. В той или иной степени эффективность всегда неполная, и это проявляется в появлении так называемого геномного шума, который выглядит как короткие прочтения, картированные не в локусы целевого обогащения (рис. 1,а). Например, для антител, специфичных к H3K4me3, который является маркером активных промоторов генов [10], почти всегда наблюдается картирование данных ChIP-seq в другие участки генома. Почти всегда неспецифические последовательности равномерно распределены по референсной последовательности [11] и эта равномерность является одним из главных условий возможности нормализации данных. Помимо технических аспектов применения различных методик получения и сравнения молекулярных профилей, исследования клеток мозга (особенно человека) имеют дополнительные аспекты, которые влияют на проведение достоверного анализа, в частности влияние на эпигенетический профиль различных аспектов жизнедеятельности человека (например, возраста или курения, этнической принадлежности и пр.), особенно наличие большого количества различных типов клеток в одном образце, которые опосредованно влияют на статистический анализ исследуемых фенотипов, уменьшая возможности получения достоверных результатов [5, 12].

НОРМАЛИЗАЦИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ СИГНАЛА ChIP-seq

Почти все методы для нормализации данных ChIP-seq, описанные ниже, опираются на первоначальное построение матрицы, описывающей полногеномное эпигенетическое состояние ис-

следуемых образцов. Для этого весь геном обычно разбивается последовательно на окна определенной длины (пересекающиеся друг с другом или нет). При этом длина окна зависит от изучаемого целевого белка [13]: для транскрипционных факторов, для посадки которых на ДНК обычно требуется 10–20 нуклеотидов; для анализа модификаций гистонов используют окна, длина которых соответствует размеру ДНК, намотанной на нуклеосому (т.е. около 150 нуклеотидов). Для некоторых модификаций гистонов характерна более широкая локализация – в этих случаях используются окна длиной до 1000 нуклеотидов. Затем для каждого образца в каждом окне вычисляется количество последовательностей, картированных в конкретное окно, и из этих величин формируется матрица, которая и является основой для последующей нормализации и дифференциального анализа (рис. 1,б, в). Следует отметить, что многие методы были разработаны для исследования эпигенома клеточных культур на небольшом количестве образцов и программные пакеты не всегда адаптированы для исследований больших выборок, как этого требует сравнительный анализ, например, при исследовании болезней человека.

Нормализация на глубину секвенирования

Один из очевидных факторов, влияющих на возможность корректного сравнения между образцами, является количество прочтений, полученных после глубокого секвенирования, поскольку эта величина слабо зависит от исходного материала, но определяется, во-первых, стоимостью секвенирования и, во-вторых, сложностью эквивалентного смешивания библиотек и тем, как работают приборы для секвенирования. Поэтому один из самых простых методов нормализации данных ChIP-seq (и многих других данных глубокого секвенирования) является нормализация измерения количества прочтений, картированных в конкретный локус (например, ген или пик обогащения), к общему количеству прочтений, полученных для образца [13–15]. В этом случае элементы исходной матрицы делятся на сумму величин в каждой строке матрицы (т.е. на суммарное количество прочтений конкретного образца, рис. 1,б).

TMM-нормализация

Другим подходом, который получил первоначальное развитие в анализе экспрессии генов, является нормализация образцов, опирающаяся на идею того, что большая часть локусов не должна иметь значительных изменений в одних образцах по сравнению с другими. Исходя из этого, при анализе нескольких образцов сначала выбирается случайно один из образцов, называемый референс-

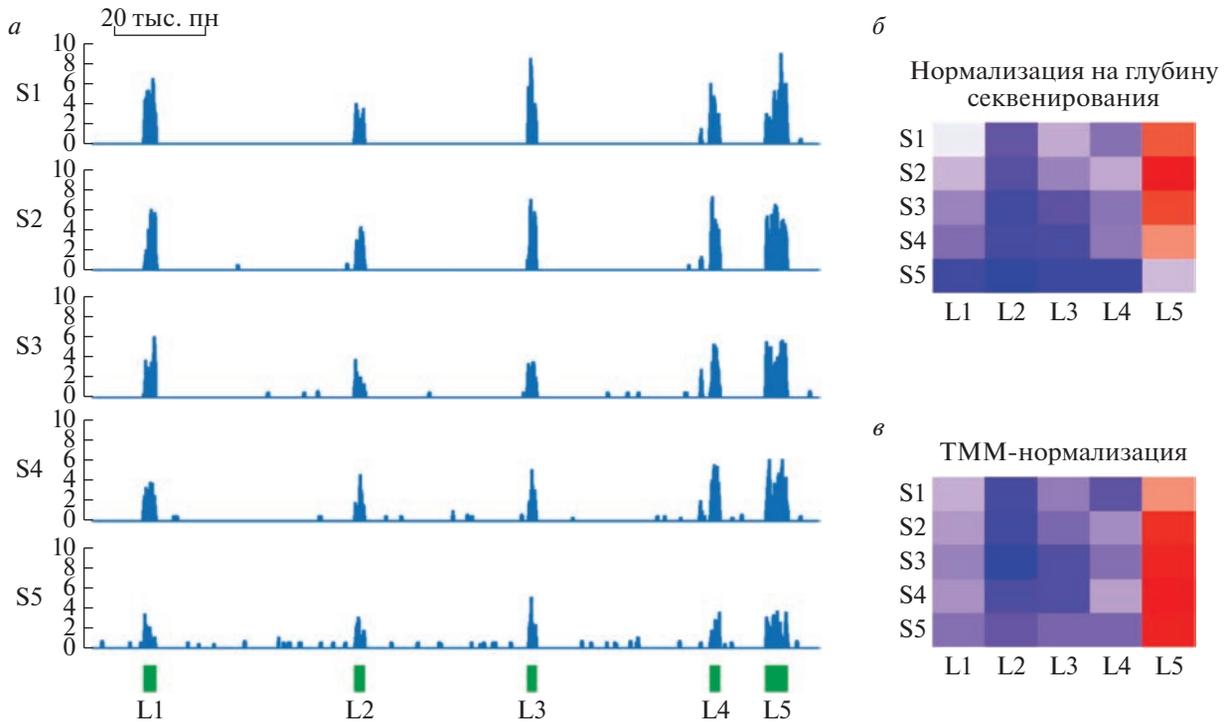


Рис. 1. Демонстрация двух методов нормализации. На панели *a* приведены пять симулированных профилей ChIP-seq. При этом в симуляции использован один и тот же сигнал, но с разным соотношением сигнала и шума (отражая различную степень эффективности антител в реальном эксперименте), поэтому ожидается, что все пять профилей должны быть похожи друг на друга после нормализации. Зелеными прямоугольниками выделены симулированные локусы обогащения. На панелях *б* и *в* изображены результаты двух методов нормализации этих профилей: строки соответствуют образцам панели *a*, а столбцы – локусам обогащения, цвет характеризует оценку сигнала. На панели *б* изображены результаты нормализации на суммарную глубину секвенирования, а на панели *в* – результаты TMM-нормализации. Этот пример демонстрирует преимущество TMM-нормализации над нормализацией на глубину секвенирования в данной ситуации, поскольку на панели *б* наблюдается зависимость нормализованных значений от соотношения сигнал/шум в профиле. Следует отметить, что обе нормализации не предполагают нормализации значений между локусами обогащения, а предполагают только нормализацию между различными профилями.

ным, и остальные нормализуются относительно него. Для каждого вычисляется обрезанное среднее M-величин (trimmed mean of M-values, TMM), которое равно взвешенному среднему M-величин (логарифм разности плотности прочтений между двумя образцами), исключая локусы, в которых M-величина и A-величина (половина логарифма суммы плотности прочтений в двух образцах) принимают экстремальные значения (определенные по умолчанию как 30- и 10%-ные квантили соответственно). Этот подход успешно применяется как для транскриптомных данных, для которых был изначально разработан, так и для других геномных данных, включая ChIP-seq [13, 16]. Однако, как отмечают авторы программного пакета *svaw* [13] для сравнительного анализа ChIP-seq данных, в некоторых случаях исходная посылка метода TMM не выполняется (например, когда сравнивают образцы, в которых происходит значительная перестройка эпигенетического статуса генома) и предлагают в таких случаях использовать только локусы, в которых наблюдается высо-

кое связывание целевого белка с ДНК. Однако и метод нормализации на глубину секвенирования, и TMM-нормализация не моделируют напрямую основного фактора, специфического для ChIP-seq: вероятности неравной эффективности антитела в исследуемых образцах, что приводит к отличающимся соотношениям сигнал-шум и может существенно влиять на анализ.

CisGenome, SPP, CCAT и NCIS

Как отмечают авторы программного пакета *svaw* [13], метод нормализации TMM, очень успешно применяемый для анализа данных RNA-seq, не всегда подходит для анализа ChIP-seq. Существует целое семейство методов, разработанных для нормализации данных ChIP-seq, основанных на исключении части локусов из анализа, что позволяет более эффективно использовать метод нормализации на глубину секвенирования или TMM-нормализацию. Каждый из этих методов исключает из общего числа некоторые локусы, основываясь на

определенном критерии. После этого коэффициент нормализации вычисляется одним из вышеописанных способов, используя только картированные в оставшиеся участки генома последовательности.

В методе, предложенном авторами программного пакета CisGenome [17], предлагают использовать только участки генома, в которых суммарно обнаружено малое количество прочтений, тем самым нормализуя уровень шума между образцами. Авторы метода SPP используют распределение Пуассона, чтобы оценить количество прочтений, картированных в локус, и используют для нормализации только те, в которых у всех исследуемых образцов P -значение меньше 0.05 [18].

В программном пакете SSAT [19] для определения локусов для оценки коэффициента нормализации используется итерационный процесс, в котором на первом этапе используется нормализация с помощью глубины секвенирования. Затем на каждом шаге для анализа используются только регионы генома, в которых различается количество последовательностей в образцах, картированных только на прямую цепь референсного генома, а оценка коэффициента нормализации обновляется с помощью последовательностей, картированных только на комплементарную цепь референсной последовательности. Этот процесс повторяется пока коэффициент нормализации не перестает изменяться.

Во всех этих подходах используются заранее заданные критерии размера локусов, количества последовательностей, ограничение P -значения или другие. Авторы метода NCIS [20] развивают эти подходы, но предлагают алгоритм, адаптивный к исходным данным, для выбора размера локусов и ограничения на суммарное количество прочтений в образцах. Они отмечают, что выбор ограничения на количество прочтений позволяет маневрировать между смещением оценки коэффициента нормализации и его дисперсией. Анализируя данные ChIP-seq, они строят график данных разницы логарифмов количества прочтений в двух образцах относительно суммарного количества последовательностей в локусе (своеобразный аналог МА-графика) и находят на нем точку, разделяющую локусы с обогащением от локусов, содержащих только шум. Аналогичным образом получают оценку необходимого размера регионов генома. На основании этих двух величин вычисляется коэффициент нормализации с помощью метода, аналогичного методу CisGenome.

MANorm & MANorm2

Метод MANorm [21] применяется для нормализации пары образцов относительно друг друга исходя из того, что если в двух различных образцах много общих локусов связывания с целевым

белком то в этих регионах связывание должно определяться общими механизмами. Исходя из этого, авторы развивают идею нормализации, которую успешно применяют для нормализации данных экспрессии генов с помощью графика Бланта—Альтмана, который еще называют МА-графиком. В методе MANorm в этом графике на оси абсцисс нанесена логарифмированная средняя плотность прочтений в двух образцах (A), а на оси ординат — логарифмированная разница в плотности прочтений между двумя образцами (M), но для построения используются только те участки генома, в которых у каждого из образцов наблюдается обогащение. На основании такого графика определяется устойчивая линейная модель, связывающая среднюю плотность последовательностей с разницей в этой плотности. Исходя из данной линейной модели, производится трансформация пространства значений (M, A) таким образом, чтобы ось абсцисс совпала с полученной линейной моделью. Рассматривая теперь значения M и A после трансформации во всех пиках, а не только общих, можно получить нормализованные значения M и A, т.е. нормализованные значения разницы между двумя образцами. Таким образом, метод MANorm позволяет провести сравнение двух образцов с учетом нормализации, но не позволяет получить нормализованные профили ChIP-seq.

Метод MANorm2 [22] является развитием метода MANorm, позволяя применить похожий подход не для сравнения двух образцов, а для сравнения двух групп образцов. В частности, авторы предлагают учесть наличие потенциальной структуры (гетерогенности образцов) и для этого на одном из первых этапов отдельно нормализуют группы. Внутри группы образцов авторы проводят нормализацию путем линейной трансформации M- и A-величин таким образом, чтобы среднее M-величин было нулевым и ковариация M- и A-величин тоже была нулевой.

ChIPnorm

Авторы подхода ChIPnorm [23] предлагают похожий на MANorm метод, но используют два последовательных шага. На первом этапе определяются участки генома, в которых наблюдается значимое обогащение последовательностей в двух анализируемых образцах по сравнению с контрольной библиотекой и со случайным распределением. На втором этапе проводится нормализация двух образцов на основании регионов, которые имели значимое обогащение в обоих образцах на первом этапе (т.е. исходя из того же принципа, что в методе MANorm, но сами регионы выбираются по другому принципу). В предлагаемом авторами программном пакете также реализованы некоторые другие методы нормализации: нормализация к единице и квантильная нормализация, которые

похожи на нормализацию на глубину секвенирования или ТММ-нормализацию и были ранее разработаны для анализа данных экспрессии генов с помощью микроматриц.

CHIPIN

Авторы программного пакета для языка программирования R под названием CHIPIN (ChIP-seq Inter-sample Normalization) [24] предлагают подход для нормализации данных ChIP-seq, который можно использовать в тех случаях, когда не используются калибровочный контроль, но зато доступны данные по экспрессии генов. Авторы предлагают нормализовать сигнал ChIP-seq между различными образцами исходя из предположения, что для генов, экспрессия которых постоянна, регуляторные участки также должны иметь одинаковую активность.

Исходя из этого, авторы предлагают проводить нормализацию в два этапа: на первом определяются локусы генов, имеющих неизменную экспрессию, а на втором — линейная или квантильная нормализация определяется так, чтобы разница в локусах, пересекающихся с локусами “неизменных” генов, была минимальной.

Оценивая качество нормализации на основании анализа средних значений нормализованных профилей покрытия в локусах начала транскрипции, авторы, помимо нормализации предлагают использовать этот метод для оценки качества работы (специфичности) антител, используемых для ChIP-seq. На примере использования двух различных антител (против H3K27ac и против H3K27me3) в клеточных линиях авторы демонстрируют, что при использовании первого антитела средний профиль плотности прочтений в окрестности сайтов начала транскрипции не зависит от степени экспрессии гена, а для второго антитела профили генов с высокой и средней степенью экспрессии похожи друг на друга и на профили, полученные для первого, но сильно отличаются от профилей для генов с низкой экспрессией. Это подтверждает ранее опубликованные результаты о том, что второе антитело связывается не только с метилированными лизинами, но и с ацетилированными, т.е. не является специфичным.

Идейно близкий подход также реализован в программном пакете THOR [25], однако в нем в качестве “постоянных” генов используются так называемые гены домашнего хозяйства (т.е. гены необходимы в клетках для поддержания базовой жизнеспособности).

Калибровочный контроль

Природа данных глубокого секвенирования предполагает исследование относительных вели-

чин: абсолютные значения крайне трудно измерить. Однако в ряде случаев происходят глобальные изменения в структуре хроматина (например, в случае мутации в гистоне), для исследования которого сравнительного анализа недостаточно. Для того чтобы решить эту проблему, авторы метода ChIP-Rx [9] разработали подход, позволяющий учитывать количество клеток, использованных в исследовании. Вдохновляясь аналогичными подходами в исследованиях транскриптомики [26, 27], они предлагают добавлять в каждый исследуемый образец внешний калибровочный контроль в отношении, постоянном между образцами. При этом в качестве дополнения используется материал от другого биологического вида. Например, реализуя эту стратегию на иммортализованной человеческой клеточной линии Jukart, авторы добавляют в образцы клетки плодовой мушки в пропорции две клетки мухи к одной клетке человека. Гистоны являются одними из наиболее эволюционно консервативных белков и поэтому антитела, вероятно, будут одинаково эффективно работать и для млекопитающих, и для плодовой мушки.

Выполнив иммунопреципитацию и последующее секвенирование, можно затем в каждом образце картировать последовательности и на геном человека, и на геном плодовой мушки. Затем определить отношение количества прочтений на два генома и использовать эту величину для нормализации.

В другой похожем подходе [28] предлагается использовать комбинацию экзогенного хроматина плодовой мушки и специфического для него антитела, тем самым ослабляя требование универсальности используемого антитела. Более того, авторы предполагают, что такой подход легче в использовании, потому что позволяет заранее подготовить большое количество экзогенного материала до проведения иммунопреципитации в целевых образцах.

ChIPseqSpikeInFree

Несмотря на то что использование калибровочного контроля показало свою эффективность как в анализе данных экспрессии генов, так и для ChIP-seq, лишь малая доля исследований использует этот подход. Это связано с экспериментальными трудностями (например, требуется оптимизация количества добавляемого хроматина в зависимости от целевой модификации гистонов или транскрипционных факторов). Тем не менее, как утверждают авторы метода ChIPseqSpikeInFree [29], в таких случаях все же возможно провести адекватную нормализацию и провести сравнение образцов, исходя только из данных секвенирования ChIP-seq.

Для этого авторы разбивают весь референсный геном на участки длиной 1 тпн и определяют распределение плотности прочтений в этих участках. Они обнаружили, что во многих ChIP-seq экспериментах с помощью анализа плотности все участки генома можно разбить на три класса: 1) те, в которых низкое обогащение, и 2) те, в которых очень высокое обогащение. Далее авторы заметили, что многие локусы с высоким обогащением инвариантны относительно глобальных изменений структуры хроматина и их обогащение обратно пропорционально глобальным уровням целевого белка. На основании этого они предлагают нормализовать образцы исходя из того, что соотношение между небогащенными локусами и высокообогащенными локусами генома не зависит от исследуемого образца.

Используя этот подход на примере нескольких экспериментов, в которых происходит глобальное изменение уровней химических модификаций гистонов, авторы показали, что результаты соответствуют ожиданиям. Например, они подтвердили глобальное уменьшение уровней H3K79me2 и сохранение уровней H3K4me3 в клетках MV4-11, обработанных фенилбутаном, по сравнению с необработанными, а также увеличение уровней H3K27me3 в клеточных линиях с нокаутом гистона H3.3^{K27M} и в нескольких других экспериментах [9, 30].

Нелинейная нормализация

В дополнение к предыдущим методам, которые в большей степени производят нормализацию линейным преобразованием данных, были также предложены методы, предоставляющие большую гибкость. Например, в методе S3norm [31] производится не линейная, а логарифмическая нормализация таким образом, чтобы не только локусы обогащения имели в среднем одинаковый сигнал, но локусы, в которых нет обогащения (отрицательный контроль), так же имели в среднем одинаковые значения сигнала (отличающиеся от значения для локусов обогащения). Таким образом, напрямую производится нормализация соотношения сигнала и шума. В пакете csaw [13] предложен метод нелинейной нормализации, который производит трансформацию данных (методом локальной полиномиальной регрессии) таким образом, чтобы соотношение сигнала между образцами не зависело от уровня среднего значения сигнала.

Выбор конкретного метода нормализации

Такое большое количество методов для одного из первых этапов анализа данных ChIP-seq порождает очевидный вопрос: какой из них необхо-

димо использовать? Авторы каждого из методов аргументируют в пользу того, который разработали они сами, поэтому в первую очередь необходимы независимые исследования применимости этих методов, какие были уже опубликованы для RNA-seq.

Авторы одного из таких исследований для ChIP-seq [32] предлагают выбирать подходящий метод из нескольких, основываясь на анализе адекватности сделанной ими оценки коэффициента нормализации с помощью так называемого диагностического графика. Для построения такого графика последовательность референсного генома разбивается на множество непересекающихся участков (окон), которые затем кластеризуются таким образом, чтобы в них последовательно сохранилось примерно одинаковое количество картированных последовательностей. Авторы показали, что отношение количества картированных последовательностей в каждом кластере имеет форму нормального распределения, в котором среднее равно логарифму коэффициента нормализации. Отобразив на графике эти распределения и сравнивая их с оценками, полученными одним из вышеописанных методов, можно получить представление о достоверности нормализации. В качестве примера авторы сравнивают методы нормализации CisGenome, CCGAT и NCIS и в приведенных примерах метод CCGAT дает заниженную оценку коэффициента нормализации.

Следует учесть, что предложенный метод диагностических графиков можно использовать только для методов нормализации, которые выполняют линейную трансформацию данных, и он не учитывает возможность глобального изменения структуры хроматина. Поэтому при выборе способа нормализации необходимо учитывать специфический характер исследования и маловероятно, что существует единый способ нормализации, подходящий под все возможные эксперименты.

НОРМАЛИЗАЦИЯ ДРУГИХ ФАКТОРОВ

Вместе с техническими эффектами, свойственными именно ChIP-seq, исследованиям хроматина свойственны те же проблемы, что и другим молекулярным методам, в частности неравномерность выборок и/или сильное влияние факторов, которые не представляют интереса для исследования. Например, при исследовании клеток мозга человека методом ATAC-seq [33] было установлено, что более 466 локусов генома меняют степень открытости хроматина в зависимости от продолжительности временного интервала, прошедшего от момента смерти до получения образцов тканей мозга (postmortem interval, PMI). В исследованиях нейropsychических заболеваний некоторыми такими факторами являются курение человека, которое значительно влияет на эпигенетический профиль [34],

в том числе клеток мозга, и использование медикаментов, которые тоже по-разному могут влиять на состояние хроматина. Более общей трудностью при исследованиях клеток мозга является гетерогенность клеточного состава клеток мозга, который содержит, по разным оценкам, более 10 различных типов клеток (например, нейроны различных типов, олигодендроциты, астроциты, микроглия и пр.), в результате чего полученный молекулярный профиль представляет собой некое усреднение сигнала по разным типам клеток (за исключением применения методов секвенирования отдельных единичных клеток или ядер). Эти и другие факторы требуют более тщательного подхода к анализу, нежели классический метод сравнения двух групп индивидов, который в этом случае будет иметь меньшую статистическую силу.

Для многих молекулярных методов успешно используется подход, в котором наблюдаемый сигнал раскладывается на несколько компонент с помощью линейной модели. Этот подход позволяет учитывать в модели не только исследуемый фенотип, но и другие характеристики исследуемых образцов. Например, в эту модель включают возраст, пол, статус курения и пр., что позволяет при проведении статистического теста на ассоциацию с фенотипом исключить их влияние. Этот подход используется в программных пакетах *limma* [35], *edgeR* [16], *DEseq* [36] и других. Другим вариантом является линейная регрессия, с помощью которой можно получить сигнал, из которого исключено влияние факторов, не представляющих интереса для исследования [37, 38]. Считается, что второй подход по сравнению с первым уменьшает статистическую силу анализа, но зато позволяет использовать другие виды анализа (например, PCA). Таким образом возможно учесть различные биологические (и технические тоже) факторы при анализе конкретного фенотипа.

В частности, в качестве таких факторов можно использовать клеточный состав исследуемых образцов (т.е. процент содержания различных типов клеток), который можно оценить по уже полученному профилю ChIP-seq. Одним из наиболее надежных способов является декомпозиция на основании ранее полученных профилей отдельных типов клеток (в похожих экспериментальных условиях, например для того же транскрипционного фактора или модификации гистонов), которые можно получить из ранее опубликованных данных. Например, некоторые исследования клеток используют метод сортировки ядер нейронов, чтобы отделить нейроны мозга от других типов клеток мозга: получены нейронально-специфичные профили для некоторых модификаций хро-

матина (в частности H3K4me3), а также соответствующие профили ненейрональных клеток [39, 40]. В одном из исследований получены профили модификаций хроматина для четырех различных типов клеток [41]. Наконец, в рамках проекта ENCODE [42] получены различные данные ChIP-seq для клеточных линий, производных от астроцитов, олигодендроцитов, нейронов и прочих. В этом случае возможно использование одного из многих методов декомпозиции [43, 44]. Тем не менее следует учитывать, что эти методы в большей степени разработаны для анализа экспрессии генов и ДНК метилирования, но аналогичные подходы можно применять и для анализа ChIP-seq [45], хотя этой теме посвящено малое количество исследований.

Наконец, в некоторых случаях оправдано определение неизвестных заранее факторов, не связанных с исследуемыми фенотипами. В частности, довольно успешно и часто применяются методы анализа суррогатных переменных (SVA) [46] или RUVseq [47]. Однако следует учитывать, что они основаны на линейных моделях и могут при применении оказывать нежелательное влияние на анализ исследуемых фенотипов. В частности, эти методы могут определять пропорции различных типов клеток как один из таких нежелательных факторов.

НОРМАЛИЗАЦИЯ ChIP-seq В ИССЛЕДОВАНИЯХ ТКАНЕЙ МОЗГА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Одним из центральных проектов последнего десятилетия в исследованиях эпигенетики является проект ENCODE [42], в основном направленный на исследование эпигенетического статуса. В какой-то мере его продолжением является проект *psychENCODE* [48], направленный на изучение регуляции экспрессии генов при психиатрических заболеваниях и, в частности, его участники применяют ChIP-seq для исследования молекулярных факторов патологий. Например, в исследовании органоидов мозга человека (т.е. полученных путем репрограммирования фибробластов) [49] для сравнительного анализа ChIP-seq профилей с маркером H3K27ac была применена TMM-нормализация. В исследовании профилей ацетилирования гистонов сортированных нейронов лобной доли [50] также был применен метод TMM-нормализации и поправка на многие другие факторы (возраст, пол, клеточный состав образца и пр.), как и в продолжении этой работы для сравнения пациентов с шизофренией и контрольной выборки [51] (но уже не только для метки H3K27ac, но и для H3K4me3). Однако в анало-

гичном исследовании ацетилирования гистонов пациентов с аутизмом была применена нормализация на глубину секвенирования (но также вместе с поправкой на возраст, пол, пропорцию нейрональных клеток и пр.).

В исследованиях нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, также применяется метод ChIP-seq для исследования эпигенетического состояния хроматина. Например, для исследования профилей H3K4me3 и H3K27me3 клеток энторинальной коры головного мозга больных и здоровых индивидов [52] была применена нормализация на общее количество прочтений (т.е. на глубину секвенирования). В более широком исследовании 699 индивидов с различной степенью деменции [53] был также применен метод нормализации на глубину секвенирования. В исследованиях факторов развития глиобластомы с помощью ChIP-seq против метки активных генов H3K27ac [54] была использована нормализация методом, близким к ТММ-нормализации из пакета DESeq2 [55]. В другом исследовании глиом [56] была использована нормализация на глубину секвенирования.

Таким образом, в исследованиях модификаций гистонов методом ChIP-seq в клетках мозга человека наиболее часто используются сортировка нейронов отдельно от других типов клеток, а также нормализация на глубину секвенирования или ТММ-нормализация. Несмотря на то что оба эти метода нормализации не были изначально разработаны специально для данных ChIP-seq, их применение оправдано в тех случаях, когда уровень шума примерно одинаков в используемых данных (что необходимо контролировать [11]), либо когда другие факторы (пол, возраст и пр.) вносят большой вклад и нормализация предназначена в первую очередь для учета этих различий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкий спектр методов нормализации данных ChIP-seq позволяет выбрать наиболее подходящий под условия конкретного эксперимента. Несмотря на то что многое можно сделать во время анализа уже полученных данных, изначальное планирование эксперимента может иметь решающее значение для статистической силы и достоверности последующего анализа. Например, уже упомянутое ранее добавление калибровочного контроля для анализа позволяет провести нормализацию данных, но имеет также и недостатки. Одним из подходов к частичному решению проблемы гетерогенности клеток мозга может быть использование сортировки клеток/ядер до прове-

дения ChIP-seq для получения профиля, что часто применяется для исследования нейропсихиатрических и нейродегенеративных заболеваний. Наконец, использование одноклеточных технологий (single cell/nuclei) для исследования состояния хроматина на уровне отдельных клеток (scATAC-seq и scChIP-seq) является одним из наиболее перспективных методов в этой области.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номер гранта 19-75-30039).

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. *Fyodorov D.V., Zhou B.-R., Skoultchi A.I., Bai Y.* Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2018. V. 19. № 3. P. 192–206. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.94>
2. *Park P.J.* ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology // *Nat. Rev. Genet.* 2009. V. 10. № 10. P. 669–680. <https://doi.org/10.1038/nrg2641>
3. *Furey T.S.* ChIP-seq and beyond: New and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. № 12. P. 840–852. <https://doi.org/10.1038/nrg3306>
4. *Altman N.* Batches and blocks, sample pools and subsamples in the design and analysis of gene expression studies // *Batch Effects and Noise in Microarray Experiments*. UK, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. P. 33–50. <https://doi.org/10.1002/9780470685983.ch4>
5. *Goh W.W.B., Wang W., Wong L.* Why batch effects matter in omics data, and how to avoid them // *Trends Biotechnol.* 2017. V. 35. № 6. P. 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.02.012>
6. *Jung Y.L., Luquette L.J., Ho J.W.K. et al.* Impact of sequencing depth in ChIP-seq experiments // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 9. <https://doi.org/10.1093/nar/gku178>
7. *Sundaram A.Y.M., Hughes T., Biondi S. et al.* A comparative study of ChIP-seq sequencing library preparation methods // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. № 1. P. 816. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3135-y>
8. *Teng M., Du D., Chen D., Irizarry R.A.* Characterizing batch effects and binding site-specific variability in ChIP-seq data // *NAR Genomics and Bioinformatics.*

2021. V. 3. № 4.
<https://doi.org/10.1093/nargab/lqab098>
9. *Orlando D.A., Chen M.W., Brown V.E. et al.* Quantitative ChIP-seq normalization reveals global modulation of the epigenome // *Cell Reports*. 2014. V. 9. № 3. P. 1163–1170.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.018>
 10. *Gu B., Lee M.G.* Histone H3 lysine 4 methyltransferases and demethylases in self-renewal and differentiation of stem cells // *Cell & Bioscience*. 2013. V. 3. № 1.
<https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-39>
 11. *Nakato R., Sakata T.* Methods for ChIP-seq analysis: A practical workflow and advanced applications // *Methods*. 2021. V. 187. P. 44–53.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.03.005>
 12. *Price E.M., Robinson W.P.* Adjusting for batch effects in DNA methylation microarray data, a lesson learned // *Front. Genet.* 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00083>
 13. *Lun A.T.L., Smyth G.K.* csaw: A Bioconductor package for differential binding analysis of ChIP-seq data using sliding windows // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 5.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1191>
 14. *Diaz A., Park K., Lim D.A., Song J.S.* Normalization, bias correction, and peak calling for ChIP-seq // *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 2012. V. 11. № 3.
<https://doi.org/10.1515/1544-6115.1750>
 15. *Stark R., Brown G.* DiffBind: Differential Binding Analysis of ChIP-seq Peak Data. Bioconductor version: Release (3.16), 2022.
<https://doi.org/10.18129/B9.bioc.DiffBind>
 16. *Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K.* edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 1. P. 139–140.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
 17. *Ji H., Jiang H., Ma W., Wong W.H.* Using CisGenome to analyze ChIP-chip and ChIP-seq data // *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2011.
<https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0213s33>
 18. *Kharchenko P.V., Tolstorukov M.Y., Park P.J.* Design and analysis of ChIP-seq experiments for DNA-binding proteins // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 12. P. 1351–1359.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1508>
 19. *Xu H., Handoko L., Wei X. et al.* A signal-noise model for significance analysis of ChIP-seq with negative control // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. № 9. P. 1199–1204.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq128>
 20. *Liang K., Keleş S.* Normalization of ChIP-seq data with control // *BMC Bioinformatics*. 2012. V. 13. № 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-199>
 21. *Shao Z., Zhang Y., Yuan G.-C. et al.* MAnorm: A robust model for quantitative comparison of ChIP-Seq data sets // *Genome Biol.* 2012. V. 13. № 3.
<https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-r16>
 22. *Tu S., Li M., Chen H. et al.* MAnorm2 for quantitatively comparing groups of ChIP-seq samples // *Genome Res.* 2021. V. 31. № 1. P. 131–145.
<https://doi.org/10.1101/gr.262675.120>
 23. *Nair N.U., Sahu A.D., Bucher P., Moret B.M.E.* ChIP-norm: A statistical method for normalizing and identifying differential regions in histone modification ChIP-seq libraries // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039573>
 24. *Polit L., Kerdivel G., Gregoricchio S. et al.* CHIPIN: ChIP-seq inter-sample normalization based on signal invariance across transcriptionally constant genes // *BMC Bioinformatics*. 2021. V. 22. № 1. P. 407.
<https://doi.org/10.1186/s12859-021-04320-3>
 25. *Allhoff M., Seré K., Pires J. et al.* Differential peak calling of ChIP-seq signals with replicates with THOR // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 20.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw680>
 26. *Lovén J., Orlando D.A., Sigova A.A. et al.* Revisiting global gene expression analysis // *Cell*. 2012. V. 151. № 3. P. 476–482.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.012>
 27. *Kanno J., Aisaki K., Igarashi K. et al.* “Per cell” normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays // *BMC Genomics*. 2006. V. 7. № 1.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-64>
 28. *Egan B., Yuan C.-C., Craske M.L. et al.* An alternative approach to ChIP-Seq normalization enables detection of genome-wide changes in histone H3 lysine 27 trimethylation upon EZH2 inhibition // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166438>
 29. *Jin H., Kasper L.H., Larson J.D. et al.* ChIPseqSpikeIn-Free: a ChIP-seq normalization approach to reveal global changes in histone modifications without spike-in // *Bioinformatics*. 2020. V. 36. № 4. P. 1270–1272.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz720>
 30. *Pathania M., De Jay N., Maestro N. et al.* H3.3K27M cooperates with Trp53 loss and PDGFRA gain in mouse embryonic neural progenitor cells to induce invasive high-grade gliomas // *Cancer Cell*. 2017. V. 32. № 5. P. 684–700. e9.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.014>
 31. *Xiang G., Keller C.A., Giardine B. et al.* S3norm: Simultaneous normalization of sequencing depth and signal-to-noise ratio in epigenomic data // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № 8. P. e43.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa105>
 32. *Angelini C., Heller R., Volkinshtein R., Yekutieli D.* Is this the right normalization? A diagnostic tool for ChIP-seq normalization // *BMC Bioinformatics*. 2015. V. 16. № 1. P. 150.
<https://doi.org/10.1186/s12859-015-0579-z>
 33. *Bryois J., Garrett M.E., Song L. et al.* Evaluation of chromatin accessibility in prefrontal cortex of individuals with schizophrenia // *Nat. Commun.* 2018. V. 9.

- № 1. P. 3121.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05379-y>
34. *Tsai P.-C., Glastonbury C.A., Eliot M.N. et al.* Smoking induces coordinated DNA methylation and gene expression changes in adipose tissue with consequences for metabolic health // *Clin. Epigenetics*. 2018. V. 10. P. 126.
<https://doi.org/10.1186/s13148-018-0558-0>
 35. *Ritchie M.E., Phipson B., Wu D. et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 7. P. e47.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
 36. *Love M.I., Huber W., Anders S.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol.* 2014. V. 15. № 12. P. 550.
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
 37. *Zhang Y., Parmigiani G., Johnson W.E.* ComBat-seq: Batch effect adjustment for RNA-seq count data // *NAR Genomics and Bioinformatics*. 2020. V. 2. № 3.
<https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa078>
 38. *Johnson W.E., Li C., Rabinovic A.* Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods // *Biostatistics*. 2007. V. 8. № 1. P. 118–127.
<https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxj037>
 39. *Shulha H.P., Cheung I., Guo Y. et al.* Coordinated cell type-specific epigenetic remodeling in prefrontal cortex begins before birth and continues into early adulthood // *PLoS Genetics*. 2013. V. 9. № 4.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003433>
 40. *Gusev F.E., Reshetov D.A., Mitchell A.C. et al.* Epigenetic-genetic chromatin footprinting identifies novel and subject-specific genes active in prefrontal cortex neurons // *The FASEB J*. 2019. V. 33. № 7. P. 8161–8173.
<https://doi.org/10.1096/fj.201802646R>
 41. *Nott A., Holtman I.R., Coufal N.G. et al.* Brain cell type-specific enhancer-promoter interactome maps and disease-risk association // *Science*. 2019. V. 366. № 6469. P. 1134–1139.
<https://doi.org/10.1126/science.aay0793>
 42. *Dunham I., Kundaje A., Aldred S.F. et al.* An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome // *Nature*. 2012. V. 489. № 7414. P. 57–74.
<https://doi.org/10.1038/nature11247>
 43. *Ouyang Z., Bourgeois-Tchir N., Lyashenko E. et al.* Characterizing the composition of iPSC derived cells from bulk transcriptomics data with CellMap // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 17394.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-22115-1>
 44. *Jew B., Alvarez M., Rahmani E. et al.* Accurate estimation of cell composition in bulk expression through robust integration of single-cell information // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1971.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15816-6>
 45. *Li H., Sharma A., Luo K. et al.* DeconPeaker, A deconvolution model to identify cell types based on chromatin accessibility in ATAC-seq data of mixture samples // *Frontiers in Genet.* 2020. V. 11.
 46. *Leek J.T.* svaseq: removing batch effects and other unwanted noise from sequencing data // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 21. P. e161.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku864>
 47. *Risso D., Ngai J., Speed T.P., Dudoit S.* Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. № 9. P. 896–902.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2931>
 48. *Akbarian S., Liu C., Knowles J.A. et al.* The psychENCODE project // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 12. P. 1707–1712.
<https://doi.org/10.1038/nn.4156>
 49. *Amiri A., Coppola G., Scuderi S. et al.* Transcriptome and epigenome landscape of human cortical development modeled in organoids // *Science*. 2018. V. 362. № 6420.
<https://doi.org/10.1126/science.aat6720>
 50. *Girdhar K., Hoffman G.E., Jiang Y. et al.* Cell-specific histone modification maps in the human frontal lobe link schizophrenia risk to the neuronal epigenome // *Nat. Neurosci.* 2018. V. 21. № 8. P. 1126–1136.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0187-0>
 51. *Girdhar K., Hoffman G.E., Bendl J. et al.* Chromatin domain alterations linked to 3D genome organization in a large cohort of schizophrenia and bipolar disorder brains // *Nat. Neurosci.* 2022. V. 25. № 4. P. 474–483.
<https://doi.org/10.1038/s41593-022-01032-6>
 52. *Persico G., Casciaro F., Amatori S. et al.* Histone H3 Lysine 4 and 27 Trimethylation Landscape of Human Alzheimer's Disease // *Cells. Multidisciplinary Digital Publ. Institute*. 2022. V. 11. № 4.
<https://doi.org/10.3390/cells11040734>
 53. *Klein H.-U., McCabe C., Gjonneska E. et al.* Epigenome-wide study uncovers large-scale changes in histone acetylation driven by tau pathology in the aging and Alzheimer human brain // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. № 1. P. 37–46.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0291-1>
 54. *Mack S.C., Singh I., Wang X. et al.* Chromatin landscapes reveal developmentally encoded transcriptional states that define human glioblastoma // *J. Exp. Med.* 2019. V. 216. № 5. P. 1071–1090.
<https://doi.org/10.1084/jem.20190196>
 55. *Anders S., Huber W.* Differential expression analysis for sequence count data // *Genome Biol.* 2010. V. 11. № 10.
<https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
 56. *Stepniak K., Machnicka M.A., Mieczkowski J. et al.* Mapping chromatin accessibility and active regulatory elements reveals pathological mechanisms in human gliomas // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 3621.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23922-2>

Methods for ChIP-seq Normalization and Their Application for Analysis of Regulatory Elements in Brain Cells

F. E. Gusev^{a, b, *}, T. V. Andreeva^{a, b, **}, and E. I. Rogaev^{a, b, ***}

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

^b*Center for Genetics and Life Science, "Sirius" University of Science and Technology, Krasnodar krai, p. Sirius, 354340 Russia*

**e-mail: gusev@vigg.ru*

***e-mail: an_tati@vigg.ru*

****e-mail: evivrog@gmail.com*

Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) has become one of the major tools to elucidate gene expression programs. Similar to other molecular profiling methods, ChIP-seq is sensitive to several technical biases which affect downstream results, especially in cases when material quality is difficult to control, for example, frozen post-mortem human tissue. However methods for bioinformatics analysis improve every year and allow to mitigate these effects after sequencing by adjusting for both technical ChIP-seq biases and more general biological biases like post-mortem interval or cell heterogeneity of the sample. Here we review a wide selection of ChIP-seq normalization methods with a focus on application in specific experimental settings, in particular when brain tissue is investigated.

Keywords: genomics, epigenomics, chromatin, normalization, immunoprecipitation, brain.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ КОРРЕКЦИИ МАССЫ ТЕЛА: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР¹

© 2023 г. Э. С. Егорова^{1, *}, И. И. Ахметов^{1, 2}

¹Казанский государственный медицинский университет, Казань, 420012 Россия

²Научно-исследовательский институт спорта и физических упражнений,
Ливерпульский университет им. Джона Мурса, Ливерпуль, L3 5AF Великобритания

*e-mail: jastspring@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 20.03.2023 г.

Индивидуальные особенности человека не только обуславливают различия в массе тела, но и детерминируют реакцию организма на диету и двигательную активность. Цель данного систематического обзора — описание генетических маркеров, ассоциированных со снижением массы тела в ответ на немедикаментозные методы лечения ожирения, диетотерапию и физические нагрузки. Приемлемые для включения в систематический обзор интервенционные исследования содержали все необходимые параметры генетического полиморфизма, диеты, физической нагрузки и изменений антропометрических или композиционных показателей тела. 91 статья соответствовала критериям и была включена в данный систематический обзор. Подавляющее число исследований ($n = 88$) было проведено с использованием ген-кандидатного подхода и только три работы выполнены с применением полногеномного поиска ассоциаций (GWAS). Всего было обнаружено 98 генетических вариантов, из которых 72 маркера ассоциированы с эффективностью диетотерапии и 26 — с индивидуальным ответом на физические нагрузки. Следует отметить, что значимость маркеров была подтверждена независимыми исследованиями только для 10 из 98 генетических вариантов. В ближайшие годы следует ожидать прогресса в этом направлении, результатом которого станет разработка метода индивидуального подбора каждому пациенту типа диеты и физической нагрузки для профилактики и лечения ожирения.

Ключевые слова: генетика ожирения, гены, полиморфизмы, физическая нагрузка, диета, коррекция массы тела, систематический обзор.

DOI: 10.31857/S0016675823080052, **EDN:** XSUABK

Ожирение — одна из актуальных проблем в системе здравоохранения в настоящий момент. Темпы распространенности ожирения во всем мире таковы, что за последние 50 лет оно достигло масштабов пандемии. По данным ВОЗ, количество взрослых в возрасте 18 лет и старше с избыточной массой тела во всем мире составляет около двух миллиардов, из них 650 миллионов страдают ожирением [1, 2]. При этом в России распространенность избыточной массы тела достигает 55%, а ожирения — 26% [3].

Динамика ожирения во многом объясняется современным образом жизни, который характеризуется несбалансированным питанием с высоким содержанием калорий и низким уровнем фи-

зической активности, недостаточным для компенсации избыточного потребления. Кроме того, к значимым факторам развития ожирения можно отнести социально-экономический статус, различные поведенческие аспекты [4], микробиом [5], а также измененные в результате технологических достижений циркадные ритмы [6]. Однако, несмотря на общую тенденцию современного образа жизни, люди, живущие в одной и той же среде, демонстрируют значительную вариабельность массы тела, в основе которой помимо средовых лежат и генетические факторы. Так, близнецовые исследования показали, что в предрасположенности человека к ожирению важную роль играют гены, вклад которых оценивается в пределах 40–80% [7, 8]. С учетом последних данных, С. Bouchard пришел к выводу, что генетический компонент индекса массы тела (ИМТ) составляет от 40 до 50%; при этом наследуемость ИМТ и других фенотипов

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823080052 для авторизованных пользователей.

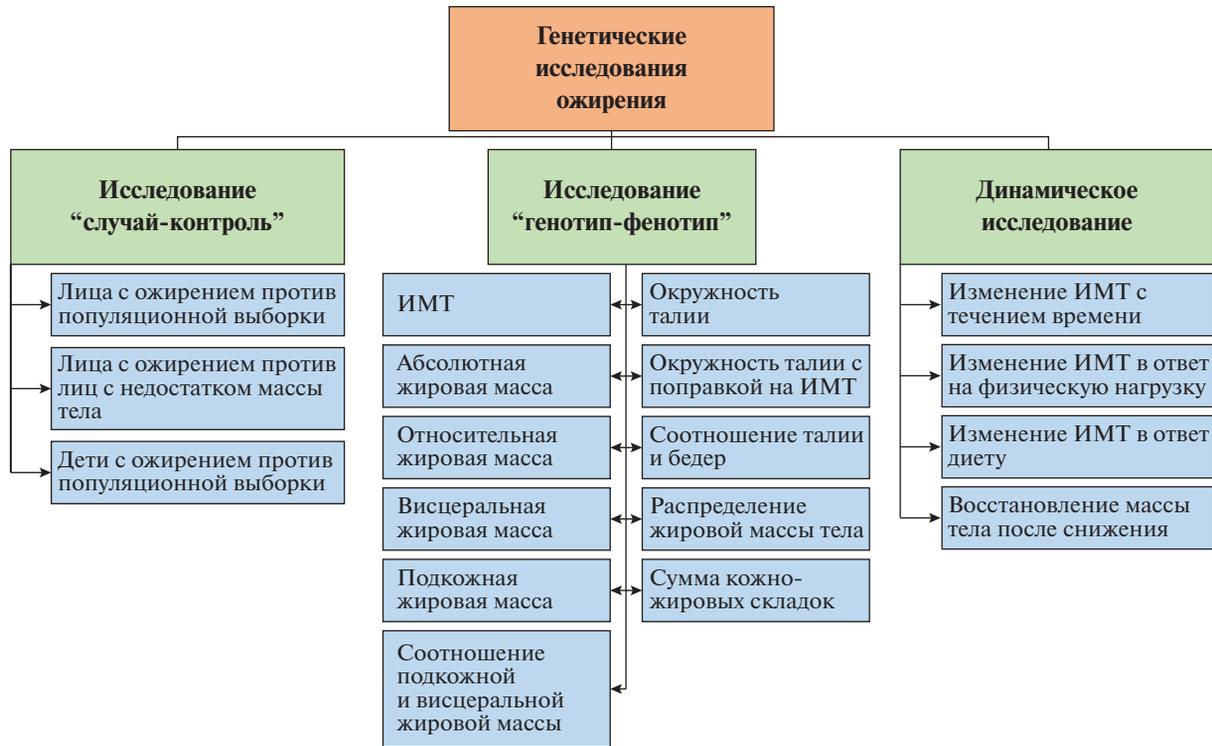


Рис. 1. Методы и подходы при проведении генетических исследований фенотипов ожирения.

ожирения ниже среди лиц с нормальным весом (30–35%) и выше среди лиц с ожирением (60–80%) [9].

В последнее десятилетие огромный прогресс в идентификации генетических локусов, связанных с ожирением, был достигнут благодаря исследованиям по полногеномному поиску ассоциаций (GWAS – genome wide association study) [10–12]. Недавний крупномасштабный метаанализ GWAS-исследований в европейской популяции выявил 906 локусов, на которые приходится 6% вариабельности ИМТ [13]. При этом размер эффекта каждого аллеля может оцениваться в несколько граммов жировой массы или меньше [14]. Следует отметить, что вклад разных генетических маркеров в риск развития ожирения неодинаков [9]. Предполагается, что за счет увеличения выборок до нескольких миллионов человек в ближайшее время будет обнаружено дополнительно несколько тысяч распространенных генетических вариантов (с частотой >5%), которые будут объяснять до 30% дисперсии ИМТ [14–16]. При этом на оставшуюся долю наследуемости ИМТ, по-видимому, будут приходиться низкочастотные (частота 1–5%) и редкие генетические варианты (≤1%) [17].

Для обнаружения геномных предикторов ожирения помимо ИМТ исследуются разные фенотипы ожирения, такие как абсолютная и относительная жировая масса, висцеральная и подкож-

ная жировая масса, соотношение висцеральной и подкожной жировой массы, окружность талии, соотношение окружностей талии и бедер и т.п. (рис. 1). Для определения генетической архитектуры ожирения в GWAS-исследованиях используются разные методологические подходы, такие как “случай–контроль”, “генотип–фенотип”, лонгитюдное исследование, где выявляют изменение ИМТ с течением времени. Кроме того, появляется все больше работ, направленных на выявление генетических маркеров эффективности снижения веса в ответ на физические нагрузки, диетотерапию и прием фармакологических препаратов (так называемые интервенционные исследования).

Таким образом, целью данного систематического обзора является описание и анализ доступной на сегодняшний момент информации о генетических маркерах, ассоциированных с эффективностью применения физических нагрузок и диетотерапии для коррекции массы тела.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стратегия поиска

Поиск литературы и анализ данных проводился в соответствии с рекомендациями PRISMA в электронной базе PubMed среди англоязычной литературы без ограничения по дате публикации по ключевым словам: “полиморфизм”, “SNP”,

“генотип”, “диета”, “питание”, “физическая активность”, “физические упражнения”, “тренировка”, “снижение веса”, “снижение жировой массы тела”. Поиск в базе данных PubMed проводили с охватом статей, проиндексированных не позднее 8 декабря 2022 г. Во время поиска фильтры не применялись.

Выбор исследований

Включение статей в данный обзор проводилось в соответствии со следующими критериями: интервенционное исследование, описанная диета или физическая нагрузка, указанная продолжительность диеты или физической нагрузки, наличие данных генетического полиморфизма, наличие результата в виде изменения антропометрических показателей или состава тела. Критериями для исключения являлись неинтервенционные лонгитюдные исследования, исследования, проводившиеся не на людях, а также работы с участием испытуемых, страдающих тяжелым заболеванием (например, раком). Кроме того, были исключены исследования с участием детей, спортсменов, беременных и кормящих женщин, а также пациентов, перенесших хирургические операции.

Извлечение данных

Выявленные исследования из баз данных были извлечены в Microsoft Excel 2016 и автоматически проверены на наличие дубликатов. Оставшиеся после удаления дубликатов статьи были проверены на основе заголовка, аннотации и полного текста в два последовательных этапа. Затем полные статьи оценивались на предмет соответствия требованиям для включения с использованием критериев включения и исключения, изложенных ниже.

Следующие данные были извлечены из полнотекстовых вариантов публикаций: характеристика выборки (количество испытуемых, пол, этническая принадлежность), генетический полиморфизм (название гена и rs-номер), аллель/генотип, ассоциированный с высокой эффективностью вмешательства, характеристика интервенционного вмешательства (тип диетотерапии или физической нагрузки и продолжительность вмешательства), результаты вмешательства (измеряемый параметр, количественное измерение изменяемого параметра у генотипов, уровень значимости P) и ссылка на статью.

Оценка качества исследований (оценка риска предвзятости)

Оценку риска систематической ошибки для рандомизированных контролируемых исследований проводили при помощи адаптированной валидированной версии вопросника Кокрановского сотруд-

ничества [18, 19]. Критерии оценки исследований были следующими: метод рандомизации участников исследования в группы и сокрытие рандомизационной последовательности, “ослепление” исследуемых, медицинского персонала и исследователей, оценивающих эффект вмешательства, пропуски в данных об исходах, неполное представление результатов, а также другие источники систематических ошибок (например, конфликт интересов). Риск систематической ошибки для каждого критерия оценивался как низкий, высокий или неясный.

Риск систематической ошибки для публикаций когортных исследований оценивали в соответствии со шкалой оценки качества Ньюкасла—Оттавы [20, 21]. Критерии оценки исследований касались формирования когорт, сопоставимости когорт и оценки исходов, включая восемь подпунктов, которые дают максимальную оценку 9 баллов. В зависимости от итоговых баллов публикации классифицировались: как исследования, у которых высокий риск систематических ошибок (0–5 баллов); исследования, у которых средний риск систематических ошибок (6–7 баллов); исследования, у которых низкий риск систематических ошибок (8–9 баллов).

Кроме того, была проведена оценка методологического качества публикаций в соответствии с критериями, важными для исследований, изучающих генетическую ассоциацию [22, 23]. Оценка качества таких исследований основывалась на восьми критериях: взаимодействие как основная цель исследования, статистический тест на взаимодействие, поправка на множественное тестирование, поправка на этническую принадлежность или стратификацию населения, тестирование равновесия Харди—Вайнберга, тест на групповое сходство на исходном уровне, размер выборки или анализ мощности и достаточное количество указанных деталей процедуры исследования (Приложение). На основании положительных (+1 балл), нейтральных (0 баллов) или отрицательных (–1 балл) оценок по каждому пункту общее количество баллов за каждую публикацию может варьироваться от –8 до 8 баллов. Таким образом, статьи, набравшие от 6 до 8 баллов, оценивались как исследования с высоким методологическим качеством; статьи, набравшие от 2 до 5 баллов, оценивались как исследования со средним качеством, а статьи с –8 до 1 балла — как исследования с низким качеством.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отбор и характеристика исследований

Первоначальный поиск, по ключевым словам, в базе данных PubMed выявил 4012 публикаций (рис. 2). Кроме того, были дополнительно вклю-

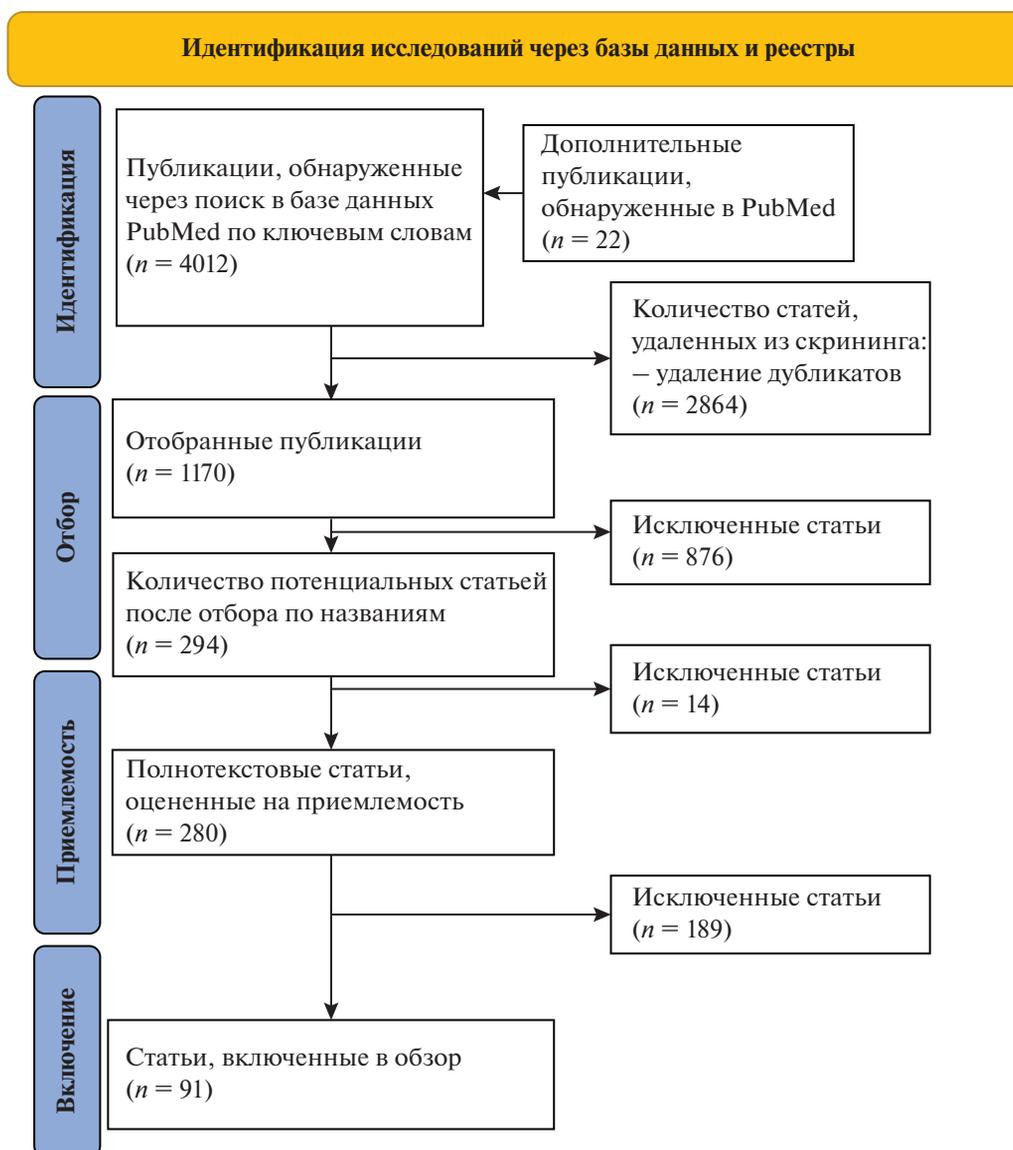


Рис. 2. Блок-схема PRISMA.

чены в анализ 22 публикации, обнаруженные по поиску похожих статей и не найденные в результате поиска по ключевым словам. После удаления дубликатов ($n = 2864$) 1170 уникальных статей были отобраны для анализа в соответствии с темой систематического обзора по названию и аннотации публикации, из которых 876 статей были исключены. Затем для подробной оценки было прочитано 280 полнотекстовых вариантов исследований, из которых 189 статей были исключены по причине: исходов, не соответствующих коррекции массы тела ($n = 106$); статистически незначимых различий в изменении антропометрических данных или данных состава тела между генотипами ($n = 34$); неинтервенционных исследований ($n = 17$); исследований, изучавших влияние негенетических поли-

морфизмов на коррекцию массы тела ($n = 13$); неуказанных параметров вмешательства ($n = 5$); медикаментозных или хирургических вмешательств ($n = 4$); исследований, в которых не было единых параметров вмешательств для всех испытуемых ($n = 3$), испытуемых спортсменов ($n = 3$), детей и подростков ($n = 2$); неуказанного уровня значимости P ($n = 1$); отсутствия полнотекстового варианта публикации ($n = 1$).

В общей сложности 91 интервенционное исследование соответствовало нашим критериям и было включено в данный систематический обзор. Период публикации включенных статей колебался с 1997 по 2022 г. Общее количество генетических полиморфизмов из выбранных статей составило 98 (из них уникальных 88). Во всех вмешатель-

ствах и генетических скринингах участвовало 23 135 человек, при этом размер выборки варьировал от 17 до 1995 участников. Продолжительность вмешательств варьировала от двух недель до трех лет. Исследования различались по характеристикам участников, а также по типу диетического вмешательства, типу физической нагрузки (ФН) и по продолжительности вмешательства (Приложение).

Качество исследования и риск систематической ошибки

Кокрановская шкала оценки риска систематической ошибки показала низкий риск для 14 рандомизированных контролируемых исследований, средний риск для шести исследований и высокий риск для десяти исследований (Приложение). Причиной низкой оценки рандомизированных контролируемых исследований является характер вмешательства в образ жизни, усложняющего “ослепление” пациента и персонала.

Оценка систематических ошибок нерандомизированных контролируемых исследований по шкале оценки качества Ньюкасла–Оттавы выявила 48 исследований с низким риском и 13 исследований со средним риском (Приложение). Основными причинами снижения баллов было отсутствие информации о дополнительных критериях сопоставимости когорт, а именно статистически значимых различий по приверженности диете и уровню физических нагрузок между исследуемыми.

Оценка методологического качества публикаций в соответствии со специально разработанной шкалой для исследований, изучающих ассоциацию генов с диетой/физической нагрузкой, продемонстрировала 56 публикаций с высоким методологическим качеством и 35 публикаций со средним методологическим качеством (Приложение). Основными причинами снижения качества публикаций стало отсутствие поправки на множественное сравнение, отсутствие поправки на стратификацию населения и недостаточный размер исследуемой выборки.

Подавляющее число исследований ($n = 88$) было проведено с использованием ген-кандидатного подхода и только три работы выполнены с применением полногеномного поиска ассоциаций (GWAS). Всего было обнаружено 98 генетических вариантов, из которых 72 маркера ассоциированы с эффективностью диетотерапии и 26 – с индивидуальным ответом на физические нагрузки. Следует отметить, что значимость маркеров была подтверждена независимыми исследованиями только для 10 из 98 генетических вариантов.

Генетические маркеры эффективности диетотерапии в лечении ожирения

В 67 исследованиях было обнаружено 72 уникальных генетических маркера: 27 генетических вариантов ассоциировались с эффективностью коррекции массы тела (МТ) в ответ на умеренно гипокалорийную диетотерапию, 10 генетических маркеров – в ответ на выраженно гипокалорийную диету, 18 – в ответ на гипокалорийную низкожировую диету, 18 – в ответ на гипокалорийную высокобелковую диету, 6 – в ответ на гипокалорийную низкоуглеводную диету, 8 – в ответ на средиземноморскую диету, 4 – в ответ на гипокалорийную диету, обогащенную мононенасыщенными и/или полиненасыщенными жирами, и 1 генетический маркер – в ответ на гипокалорийную диету, обогащенную клетчаткой.

Наиболее значимые данные были получены в результате проведенных GWAS-исследований с участием большого числа индивидов с избыточной массой тела и ожирением. Необходимо отметить исследование M. Nikraу с соавт., в котором носители аллеля дикого типа *C* полиморфизма rs679482 гена *SGCG* (Sarcoglycan gamma – саркогликан гамма) были более успешными в снижении МТ в ответ на гипокалорийную высокобелковую диету в течение 12 нед. [24] (Приложение). Еще одно крупное GWAS-исследование выявило четыре генетических маркера (полиморфизм rs6981587 гена *ANK1/MIR486-2* (Ankyrin-1/MicroRNA 486-2 – анкирин 1/микроРНК 486-2), полиморфизмы rs873822, rs870879, rs1027493 гена *RBSG4* (Long intergenic non-protein coding RNA 1363 – длинная межгенная небелкокодирующая РНК 1363)), которые ассоциировались с эффективностью снижения МТ в ответ на гипокалорийную высокобелковую диету в течение 16 нед. [25].

В интервенционных многоцентровых исследованиях с участием свыше 1000 испытуемых было выявлено, что средиземноморская диета эффективна для коррекции МТ для носителей рискового аллеля *G* полиморфизма rs1801282 гена *PPARG* (Peroxisome proliferator – activated receptor gamma – гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом) [26], носителей минорного аллеля *C* полиморфизма rs2289487 гена *PLIN1* (Perilipin 1 – перилипин 1) [27], носителей генотипа *TT* полиморфизма rs1052700 гена *PLIN1* [27] и носителей генотипа *AA* полиморфизма rs1801260 гена *CLOCK* (Circadian locomotor output cycles protein kaput – регулятор циркадных ритмов) [28]. В исследовании J. Aberle с соавт. [29] была продемонстрирована эффективность низкожировой диеты в течение 12 нед. для носителей минорного аллеля *A* полиморфизма rs1049353 гена *CBI* (Cannabinoid receptor 1 – каннабиноидный рецептор типа 1) и носителей протективного аллеля *G* полиморфизма rs1862513 гена *RETN* (Resistin – резистин) [29].

При этом значимое влияние на коррекцию МТ как минимум в двух исследованиях показали 13 полиморфизмов генов: rs2419621 гена *ACSL5* (Acyl-coA synthetase long chain family member 5 – член семейства длинноцепочечных ацил-КоА-синтетаз 5), rs10182181 гена *ADCY3* (Adenylate cyclase 3 – аденилатциклаза типа 3), rs4994 гена *ADRB3* (Adrenoreceptor beta 3 – бета-3-адренергический рецептор), rs1801260 гена *CLOCK*, rs1799883 гена *FABP2* (Fatty acid binding protein 2 – белок, связывающий жирные кислоты 2), rs9939609 гена *FTO* (Fat mass and obesity-associated protein – альфа-кетоглутарат-зависимая диоксигеназа), rs2943641 гена *IRS1* (Insulin receptor substrate 1 – субстрат инсулинового рецептора 1), rs2605100 гена *LYPLAL1* (Lysophospholipase like 1 – лизофосфолипазоподобный белок 1), rs10830963 гена *MTNR1B* (Melatonin receptor 1B – Мелатониновый рецептор типа 1B), rs894160 гена *PLIN1*, rs1801282 гена *PPARG*, rs7903146 гена *TCF7L2* (Transcription factor 7 Like 2 – Транскрипционный фактор 7-подобный 2) и rs1800849 гена *UCP3* (Uncoupling protein 3 – митохондриальный разобщающий белок 3). Важно отметить, что восемь из 13 полиморфизмов генов продемонстрировали значимое влияние на коррекцию МТ в ответ на один и тот же тип диетотерапии: rs10182181 гена *ADCY3*, rs4994 гена *ADRB3*, rs1801260 гена *CLOCK*, rs2943641 гена *IRS1*, rs2605100 гена *LYPLAL1*, rs10830963 гена *MTNR1B*, rs894160 гена *PLIN1*, rs1801282 гена *PPARG*.

Так, в двух исследованиях было показано, что носители рискованного аллеля *G* полиморфизма rs10182181 гена *ADCY3* значимо больше снижали жировую массу тела (ЖМТ) [30] и ИМТ [31] в ответ на гипокалорийную низкожировую диету. M. Garaulet с соавт. [28] в интервенционном исследовании с большим числом испытуемых ($n = 1495$) подтвердили, что средиземноморская диета является наиболее эффективной для носителей рискованного аллеля *A* полиморфизма rs1801260 гена *CLOCK* [32]. Также репликационными исследованиями было подтверждено, что для носителей протективного аллеля *A* полиморфизма rs4994 гена *ADRB3* [33, 34] и носителей аллеля *G* полиморфизма rs894160 гена *PLIN1* [35, 36] эффективной при коррекции массы тела является гипокалорийная диета. Для носителей протективного аллеля *C* полиморфизма rs2943641 гена *IRS1* эффективной является низкожировая диета [31, 37], для носителей протективного аллеля *G* полиморфизма rs2605100 гена *LYPLAL1* [31, 38] и носителей аллеля *C* полиморфизма rs10830963 гена *MTNR1B* [39, 40] – высокобелковая диета, для носителей рискованного аллеля *G* полиморфизма rs1801282 гена *PPARG* – средиземноморская диета [26, 41].

По данным ряда исследований было выявлено, что носители одних и тех же аллелей могут одинаково эффективно снижать МТ (или другие

антропометрические показатели, или показатели состава тела) при разных типах диетотерапий. Как гипокалорийная диета в течение 24 нед. [42], так и менее продолжительная гипокалорийная высокобелковая диета в течение 12 нед. [43] эффективно влияют на снижение МТ и состав тела для носителей альтернативного аллеля *T* полиморфизма rs2419621 гена *ACSL5*. Такое же явление характерно и для полиморфизмов гена *CB2R* (Cannabinoid receptor 2 – каннабиноидный рецептор 2) [44], гена *FABP2* [45, 46], гена *FTO* [47–50], гена *MC4R* (Melanocortin 4 receptor – рецептор меланокортина 4) [51, 52], гена *MTNR1B* [39, 53–55], гена *PPARG* [26, 41], гена *TCF7L2* [38, 56], гена *UCP2* (Uncoupling protein 2 – митохондриальный разобщающий белок 2) [31, 57].

В результате исследований было обнаружено, что полиморфизм rs987237 гена *TFAP2B* (Transcription factor AP-2 beta – транскрипционный фактор AP-2 бета) модифицировал влияние диеты на коррекцию веса в зависимости от состава макронутриентов: для носителей рискованного аллеля *A* предпочтительной для эффективного снижения МТ является гипокалорийная низкоуглеводная диета, но не низкожировая [58]. Аналогичная картина наблюдалась для полиморфизма rs7957197 гена *HNF1A* (Hepatocyte nuclear factor 1-alpha – ядерный фактор гепатоцитов 1-альфа), где носители альтернативного аллеля *A* значимо больше снижали МТ при гипокалорийной низкожировой диете, а носители аллеля *T* – напротив, при низкоуглеводной [59]. Носители генотипа *CC* полиморфизма rs1801133 гена *MTFHR* (Methylenetetrahydrofolate reductase – метилентетрагидрофолатредуктаза) эффективно снижали МТ в ответ на средиземноморскую диету [60], а носители генотипа *AA* – в ответ на высокобелковую [31].

Генетические маркеры эффективности физических нагрузок при лечении ожирения

В 24 исследованиях обнаружены 26 генетических маркеров, ассоциированных со снижением МТ в ответ на различные типы ФН. Из них 22 ассоциировались с эффективностью снижения МТ в ответ на аэробную тренировку, 2 – в ответ на силовую, 1 – в ответ на интервальную и 2 маркера – в ответ на ФН без уточнения типа.

Наиболее значимые результаты были продемонстрированы в GWAS-исследовании с участием 126 польских женщин, вовлеченных в аэробную 12-недельную тренировку [61], согласно которому носители редкого *T* аллеля (частота в европейской популяции около 1.5%) полиморфизма rs116143768 гена *ACSL1* (Acyl-CoA synthetase long chain family member 1 – длинноцепочечная ацил-КоА-синтетаза 1) значимо больше снижали относительную ЖМТ ($P = 1.18 \times 10^{-9}$) (Приложение). Одни из наиболее значимых результатов по эффективно-

сти снижения ЖМТ в ответ на аэробные нагрузки высокой интенсивности были получены I. Mazur с соавт. [62] для носителей аллеля *T* полиморфизма rs1765040 гена *PPARGC1A* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha – гамма-коактиватор рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-альфа) ($P = 0.00013$).

Из описанных в данном систематическом обзоре 26 генетических маркеров значимое влияние на коррекцию МТ в ответ на ФН как минимум в двух независимых исследованиях продемонстрировали только два генетических полиморфизма: rs8050136 гена *FTO* и rs1801282 гена *PPARG*. Так репликационными исследованиями было показано, что носители рискованного аллеля *A* полиморфизма rs8050136 гена *FTO* значимо больше снижали МТ в ответ на аэробные нагрузки в течение шести месяцев у женщин ($n = 234$) [63], а также в течение 12 нед. только у мужчин ($n = 101$) [64]. В исследовании T. Østergård с соавт. [65] носители аллеля *G* полиморфизма rs1801282 гена *PPARG* продемонстрировали эффективное снижение МТ в ответ на аэробные нагрузки в течение десяти недель. В дальнейшем эти результаты были подтверждены исследованием P. Franks с соавт. [66] с участием 1004 испытуемых с избыточной массой тела или ожирением, в котором носители аллеля *G* значимо больше снижали МТ и ЖМТ в ответ на преимущественно аэробную ФН умеренной интенсивности в течение одного года.

Силовые тренировки с отягощением в течение 12 нед. продемонстрировали свою эффективность при коррекции МТ для носителей генотипа *GG* полиморфизма rs7566605 гена *INSIG2* (Insulin induced gene 2 – инсулин-индуцированный белок 2) в исследовании с участием 752 испытуемых [67]. J. Cameron с соавт. [68] в работе с участием 127 женщин с избыточной массой тела или ожирением показали, что носители протективного аллеля *C* полиморфизма rs1800497 гена *DRD2* (Dopamine receptor D2 – дофаминовый D2-рецептор) более успешны в снижении массы тела, жировой массы тела и ИМТ при более продолжительных силовых нагрузках в течение шести месяцев. В статье O. Andrade-Mayorga с соавт. [69] было выявлено, что высокоинтенсивные интервальные тренировки в течение 12 нед. эффективны в снижении ЖМТ для носителей рискованного аллеля *T* полиморфизма rs1052700 гена *PLIN1*.

Наряду с этим были обнаружены противоречивые результаты. Так, в исследовании D. Phares с соавт. [70] с участием 70 человек носители аллеля *G* полиморфизма rs4994 гена *ADRB3* эффективно снижали ЖМТ, а D. de Luis с соавт. [71], напротив, продемонстрировали наибольшую эффективность для носителей генотипа *AA*.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном систематическом обзоре было рассмотрено 91 исследование, выявляющее ассоциацию генетических вариантов с эффективностью коррекции массы тела: в 67 работах изучалось влияние диеты на коррекцию массы тела и в 24 статьях – влияние физической нагрузки. Несмотря на то что нутриенты обладают существенным модулирующим эффектом на ожирение, физическая нагрузка также может привести к значительной коррекции массы тела. При этом при физической активности не только снижается жировая масса тела, а также может увеличиться мышечная масса, рост которой также способствует улучшению обмена веществ и повышению липолиза [72]. Необходимо увеличение числа экспериментальных работ по изучению влияния разных типов физической активности на коррекцию массы тела в зависимости от генотипа человека. Данный систематический обзор представляет результаты 67 исследований, изучавших ассоциацию 72 генетических маркеров с коррекцией массы тела в ответ на диетотерапию. В большинстве публикаций ($n = 27$) исследовалась эффективность сбалансированной гипокалорийной диеты, что скорее всего связано с тем, что это наиболее простой и эффективный способ коррекции массы тела. Однако было показано, что макронутриентный состав пищевого рациона влияет на гормональный фон, метаболические пути, экспрессию генов, а также на состав микробиома кишечника [73]. Поэтому необходимо отметить актуальность проведения исследований, изучающих эффективность различных по составу макронутриентов диет на коррекцию массы тела в зависимости от генетического статуса индивида.

Анализ результатов выявил, что только восемь генетических маркеров подтвердили свою ассоциацию с эффективностью одной и той же диетотерапии в репликационных исследованиях: rs10182181 гена *ADCY3*, rs4994 гена *ADRB3*, rs1801260 гена *CLOCK*, rs2943641 гена *IRS1*, rs2605100 гена *LYPLAL1*, rs10830963 гена *MTNR1B*, rs894160 гена *PLIN1* и rs1801282 гена *PPARG*.

В двух исследованиях было продемонстрировано, что носители рискованного аллеля *G* полиморфизма rs10182181 гена *ADCY3* эффективнее снижали ЖМТ или ИМТ в ответ на низкожировую диету, но не на высокобелковую диету [30, 31]. Известно, что ген *ADCY3* кодирует фермент аденилатциклазу типа 3, который превращает АТФ в цАМФ. Данный фермент (*ADCY3*) участвует в большом количестве физиологических метаболических процессов, включая регуляцию углеводного и липидного обменов, а также развитие и функцию жировой ткани, а также регулирует экспрессию генов, участвующих в адипогенезе, термогенезе и липолизе [74]. На основании данных, получен-

ных в экспериментах на мышах, известно, что гипопластичность гетерозиготных мышей по гену *Adcy3* +/- приводит к снижению экспрессии генов, участвующих в термогенезе, окислении жирных кислот и передаче сигналов инсулина у мышей, и, наоборот, к усилению экспрессии генов, связанных с адипогенезом, в периферических тканях [75]. С другой стороны, диета с высоким содержанием жиров приводит к снижению экспрессии гена аденилатциклазы типа 3 [76]. Кроме того, по данным GTEx Portal [77] аллель *G* ассоциируется с более высоким уровнем экспрессии *ADCY3* в крови и жировой ткани. На основании этих данных можно предположить, что низкожировая диета вероятно будет способствовать повышению экспрессии гена *ADCY3*, снижению адипогенеза и улучшению регулирования уровня инсулина в организме. Однако механизмы, лежащие в основе модулирования потребления макронутриентов генетическим вариантом *ADCY3*, до конца не изучены, и необходимы дальнейшие экспериментальные исследования.

Носители протективного аллеля *C* полиморфизма rs2943641 гена *IRS1* наиболее успешно снижают МТ при низкожировой диете, но не при низкоуглеводной или высокобелковой [31, 37]. Потенциальные механизмы, лежащие в основе этих результатов, неизвестны, но могут быть связаны с резистентностью к инсулину, индуцированной липидами [78].

Носители протективного аллеля *G* полиморфизма rs2605100 гена *LYPLAL1* и носители аллеля *C* полиморфизма rs10830963 гена *MTNR1B* эффективно снижали МТ в ответ на высокобелковую диету. Интересно, что в исследованиях О. Ramos-Lopez с соавт. [31, 38] носители протективного аллеля *G* полиморфизма rs2605100 гена *LYPLAL1* эффективно снижали жировую массу тела и ИМТ в ответ на гипокалорийную высокобелковую, но не в ответ на гипокалорийную низкожировую. При этом известно, что ген *LYPLAL1* кодирует лизофосфолипазоподобный белок 1, действующий как триглицеридлипаза, а аллель *G* полиморфизма гена *LYPLAL1*, по всей видимости, связан с повышенной экспрессией гены липазы и повышенными концентрациями триглицеридов в сыроворотке натощак, что приводит к развитию ожирения [79]. К настоящему моменту биохимическая роль *LYPLAL1* до конца не установлена [80], поэтому необходимы дополнительные исследования, которые бы выявили механизм действия лизофосфолипазоподобного белка.

В нескольких исследованиях было выявлено, что носители протективного аллеля *C* полиморфизма rs10830963 гена *MTNR1B* могут эффективно снижать МТ в ответ на разные по составу макронутриентов гипокалорийные диеты [39, 40, 53, 54], а носители рискованного аллеля *G* – в ответ на

гипокалорийную низкожировую [55]. Установлено, что ген *MTNR1B* кодирует рецептор мелатонина, экспрессируемый в супрахиазматическом ядре, центре контроля циркадных ритмов, а также в β -клетках поджелудочной железы [81, 82]. Было обнаружено, что диета с высоким содержанием жиров модифицирует циркадные ритмы человека [83, 84], что ведет к значительному изменению циркадной ритмичности различных гормонов, связанных с ожирением. При этом полиморфизм rs10830963 гена *MTNR1B* может участвовать в регуляции экспрессии гена *MTNR1B* или экспрессии других генов, которые могут влиять на роль мелатонина в энергетическом балансе.

В двух исследованиях была продемонстрирована эффективность средиземноморской диеты для носителей рискованного аллеля *A* полиморфизма гена *CLOCK* [28, 32] и рискованного аллеля *G* полиморфизма rs1801282 гена *PPARG* [26, 41]. Кодируемый геном *CLOCK* циркадный осциллятор играет важную роль в развитии ожирения и метаболического синдрома [85]. Выявлено, что носители аллеля *G* могут проявлять большую степень ожирения и испытывать большие трудности с уменьшением веса в ответ на низкокалорийную диету. Это может быть связано с особенностями циркадных ритмов и пищевым поведением человека, что вероятно затрудняет коррекцию массы тела. Тем не менее было показано, что более длительное соблюдение средиземноморской диеты связано с улучшением качества сна [86] и большей эффективностью коррекции МТ [87, 88].

В исследовании А. Chmurzynska с соавт. [41] носители рискованного аллеля *G* полиморфизма rs1801282 гена *PPARG* одинаково успешно снижали МТ в ответ на гипокалорийную сбалансированную и гипокалорийную средиземноморскую диеты. Однако коррекция массы тела в ответ на гипокалорийную диету у носителей аллеля *G* сопровождалась значительным снижением безжировой массы тела. Напротив, в ответ на гипокалорийную средиземноморскую диету наблюдалось значимое снижение абдоминальной жировой массы тела у индивидов с таким же генотипом. Данное наблюдение подтвердило результаты М. Garaulet с соавт. [26]. Известно, что ненасыщенные жирные кислоты, которыми богата средиземноморская диета, являются лигандами для гамма-рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом [89]. Активация *PPARG* жирными кислотами опосредует экспрессию нескольких генов-мишеней, участвующих в накоплении жировой ткани, таких как липопротеинлипаза, а также играет роль в насыщении жировой триглицеридлипазы [89]. Кроме того, сообщалось о защите от ожирения, вызванного пищевым жиром, и резистентности к инсулину у мышей с дефицитом *Pparg* (*Pparg* +/-) [90].

Также было выявлено, что полиморфизм rs894160 гена *PLIN1* ассоциировался с изменением массы тела в ответ на краткосрочную (в течение 12 нед.) и длительную (в течение одного года) гипокалорийную диету [35, 36]. Перилипипин участвует в катехоламинстимулированном липолизе посредством взаимодействия с липазой [91]. Было продемонстрировано, что носители аллеля дикого типа *G* более успешны в снижении массы тела в ответ на ограничение калорийности в связи с неизменными уровнями перилипина и скорости окисления липидов. Соответственно генетические маркеры обуславливают разную степень окисления жиров в ответ на одинаковую степень отрицательного энергетического баланса и изменения массы тела у индивидов с разными генотипами.

Нами было выявлено 24 генетических полиморфизма, которые показали значимую ассоциацию с коррекцией веса в ответ на физические нагрузки. При этом репликационные исследования, подтвердившую данную ассоциацию, были проведены только для двух полиморфизмов генов: *FTO* [63, 64] и *PPARG* [65, 66].

J. Mitchell с соавт. [63] продемонстрировали, что полиморфизм rs8050136 гена *FTO* ассоциируется со снижением ИМТ в ответ на аэробную нагрузку умеренной интенсивности в течение шести месяцев. При этом значимо больше снижали массу тела носители рискованного аллеля *A* данного варианта. Эти данные были подтверждены в исследовании W. Wang с соавт. [64] на китайской популяции, где также носительство аллеля *A* среди мужчин благоприятно влияло на снижение массы тела. Однако в исследовании HERITAGE с участием 481 человека была показана обратная картина: носители протективного аллеля *C* значимо больше по сравнению с носителями рискованного аллеля *A* снижали жировую массу тела в ответ на аэробную нагрузку низкой/умеренной интенсивности [92].

Известно, что физическая нагрузка высокой интенсивности вызывает снижение экспрессии гена *FTO* в скелетных мышцах по сравнению с физической нагрузкой низкой интенсивности [93]. При этом было выявлено, что у носителей генотипа *AA* (*A* — аллель риска) полиморфизма rs9939609 гена *FTO* уровень глюкозы в мышцах выше в ответ на тренировку. Это может свидетельствовать о метаболическом сдвиге в сторону большего окисления липидов и отхода от окисления глюкозы потенциально за счет активации АМФ-активируемой протеинкиназы и *FTO*-зависимого деметилирования *N6*-метиладенозина [94]. Можно предположить, что благодаря этому механизму носители аллеля риска могут получить преимущество в снижении веса в ответ на физическую

нагрузку высокой или умеренной, но не низкой интенсивности.

Кроме того, в обсервационных продолжительных исследованиях было продемонстрировано, что рискованный аллель *A* полиморфизма rs9939609 гена *FTO* в меньшей степени повышал риск развития ожирения (на 30%) в группе физически активных людей, чем в группе малоподвижных людей [95–97], а по данным некоторых исследований — на 80% [98, 99].

Исследование T. Østergård с соавт. [65] об ассоциации рискованного аллеля *G* полиморфизма rs1801282 гена *PPARG* со значимо большим снижением массы тела в ответ на физическую нагрузку подтвердилось многоцентровым исследованием с участием свыше 1000 человек [66]. Однако в публикации A. Zarebska с соавт. [100] сообщили о том, что носители протективного аллеля *C* полиморфизма гена *PPARG* значимо больше снижают жировую массу тела по сравнению с носителями аллеля *G*. Как упоминалось выше, *PPARG* регулирует адипогенез, липолиз и чувствительность к инсулину. При этом в недавнем метаанализе с участием 70317 человек сообщается, что аллель *G* полиморфизма rs1801282 гена *PPARG* обуславливает повышенный риск ожирения [101]. Однако в некоторых исследованиях было выявлено, что аллель *G* ассоциируется с высоким ИМТ только у лиц с выраженным ожирением, а у индивидов с нормальной массой тела эта взаимосвязь ослабевает [102].

Возможно этим объясняются противоречивые результаты, поскольку известно, что в исследовании A. Zarebska с соавт. [100] средний ИМТ испытуемых составлял 21.5 ± 2.5 кг/м², а в исследованиях T. Østergård с соавт. [65] и P. Franks с соавт. [66] средний ИМТ был выше, 25.7 ± 2.7 и 34.1 кг/м² соответственно. Кроме того, возможно более молодые участники исследования A. Zarebska с соавт. [100] имели исходно более высокий уровень физической активности, чем испытуемые в исследованиях T. Østergård с соавт. [65] и P. Franks с соавт. [66], который мог модифицировать ассоциацию аллеля *G* с эффективностью коррекции веса.

Недостаточное количество воспроизведенных данных в репликационных исследованиях вероятно связано с отсутствием поправки на множественное сравнение в некоторых публикациях, которое могло привести к ложноположительным результатам. Однако необходимо сказать, что поправка на множественное сравнение в выборке размер которой часто бывает ограничен в силу характера проводимых вмешательств, также может привести к возникновению ошибки второго рода, т.е. к не выявлению истинной взаимосвязи. Кроме того, обнаруженные противоречивые результаты могут быть связаны не только с разными размерами выборок, но и с различием в продолжительности

исследований, типах диетического вмешательства или физических нагрузок, с дизайном исследования, а также с этнической принадлежностью участников исследования.

Тем не менее во множестве других исследованиях было продемонстрировано, что питание и двигательная активность оказывают значительное влияние на коррекцию массы тела в зависимости от генотипа индивида. Так, было показано, что влияние потребления свободных сахаров и сахаросодержащих напитков, а также жареной пищи на ИМТ в значительной степени зависит от полигенного профиля, состоящего из 32 полиморфизмов генов, ассоциированных с риском развития ожирения [103, 104]. Ассоциация генетических маркеров с ИМТ была значимее среди участников с более высоким потреблением сахаросодержащих напитков, чем среди участников с более низким потреблением: увеличение ИМТ на каждые десять аллелей риска составило 1.00 кг/м² при приеме менее одной порции в месяц, 1.20 кг/м² при приеме от одной до четырех порций в месяц, 1.37 кг/м² при приеме от двух до шести порций в неделю [103]. В другой работе было показано, что генетическая связь с ожирением усиливалась при более высоком потреблении жареной пищи: риск развития ожирения на каждые 10 аллелей риска увеличивался в 1.61 раза при потреблении жареной пищи менее одного раза в неделю, в 2.12 раза при потреблении от одного до трех раз и в 2.72 раза при потреблении более трех раз в неделю. При этом вариант гена *FTO* показал самое сильное взаимодействие с потреблением жареной пищи [104]. Эти данные свидетельствуют о том, что лица с высоким генетическим риском ожирения оказались более восприимчивыми к негативному влиянию сахаросодержащих напитков и жареной пищи, что привело у них к более выраженному повышению ИМТ.

Модифицирующее влияние на генетическую предрасположенность к ожирению оказывает не только диетический состав макронутриентов, но и частота приемов пищи. Регулярная частота приема пищи ослабляет генетическую предрасположенность к увеличению ИМТ, как с точки зрения одного из исследуемых генетических локусов (rs1421085 гена *FTO*, rs17782313 гена *MC4R*, rs6265 гена *BDNF*, rs10938397 гена *GNPDA2*, rs1424233 гена *MAF*, rs6548238 гена *TMEM18*, rs11084753 гена *KCTD15*, rs2815752 гена *NEGR1*), так и на основании полигенного анализа [105]. Кроме того, время приема пищи может играть решающую роль в ожирении, поскольку циркадные ритмы имеют важное значение в энергетическом обмене. Диетический подход, в основе которого лежит ограничение времени приема пищи, представляет собой многообещающий и эффективный ме-

тод лечения ожирения без снижения общей калорийности рациона [106, 107].

Большинство рискованных аллелей (ранее показавших связь с риском ожирения), описанных в настоящем обзоре, ассоциируются со сниженной эффективностью коррекции веса. Таким образом, рискованные аллели не только приводят к увеличению жировой массы в ответ на пониженную физическую активность и переизбыток, но и затрудняют процесс снижения веса в ответ на диету и физические нагрузки.

Подводя итог, следует выделить, что преимуществом данной работы является всесторонний обзор исследований, изучающих генетическую ассоциацию не только с эффективностью диетотерапий, но и эффективностью физических нагрузок по отношению к изменениям массы тела. Кроме того, мы провели оценку систематических ошибок и методологического качества исследований, включенных в данную статью.

В настоящей работе мы рассмотрели 91 исследование, в которых была показана ассоциация 98 генетических маркеров с эффективностью снижения массы тела под действием определенного типа тренировочного режима или диеты. Стоит отметить, что большая часть генетических вариантов, выявленных в результате интервенционных исследований, обнаружена при помощи генкандидатного подхода, ограниченного существующими знаниями исследователей о биологии ожирения. Это свидетельствует о том, что на сегодняшний момент наши знания относительно генетических маркеров, влияющих на массу тела и функциональный ответ на физические нагрузки и прием макронутриентов, ограничены. Требуется проведение дальнейших крупномасштабных GWAS-исследований, репликативных исследований и метаанализов, которые позволят выявить новые генетические маркеры, ассоциированные с адаптационными реакциями организма на тренировку и прием макронутриентов.

Выявление новых генетических маркеров позволит объяснить большую фенотипическую дисперсию изменения веса и, в свою очередь, повысить их прогностическую эффективность. Таким образом, настоящий обзор позволил выявить 98 генетических маркеров эффективности снижения массы тела в ответ на разные типы диет и физических нагрузок. В ближайшие годы следует ожидать прогресса в этом направлении, результатом которого станет разработка метода индивидуального подбора каждому пациенту типа диеты и физической нагрузки для профилактики и лечения ожирения.

Публикация подготовлена в рамках научно-исследовательского проекта, поддержанного грантом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России на проведение научных исследований в

рамках Программы развития Университета (“Разработка диагностического комплекса, направленного на профилактику и лечение ожирения с учетом полиморфизмов генов, ассоциированных с циркадными ритмами человека” № НИР 94-017-2022).

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. *Yanovski J.A.* Obesity: Trends in underweight and obesity – scale of the problem // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018. V. 14. № 1. P. 5–6. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.157>
2. GBD 2017 Diet Collaborators. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 // *Lancet.* 2019. V. 393. e10184. P. 1958–1972. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30041-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30041-8)
3. *Мартинчик А.Н., Лайкам К.Э., Козырева Н.А. и др.* Распространение ожирения в различных социально-демографических группах населения России // *Вопр. питания.* 2021. Т. 90. № 3(535). С. 67–76.
4. *Narciso J., Silva A.J., Rodrigues V. et al.* Behavioral, contextual and biological factors associated with obesity during adolescence: A systematic review // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214941>
5. *Gao R., Zhu C., Li H. et al.* Dysbiosis signatures of gut microbiota along the sequence from healthy, young patients to those with overweight and obesity // *Obesity (Silver Spring).* 2018. V. 26. № 2. P. 351–361. <https://doi.org/10.1002/oby.22088>
6. *Romo-Nava F., Guerdjikova A.I., Mori N.N. et al.* A matter of time: A systematic scoping review on a potential role of the circadian system in binge eating behavior // *Front. Nutr.* 2022. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.978412>
7. *Silventoinen K., Jelenkovic A., Sund R. et al.* Genetic and environmental effects on body mass index from infancy to the onset of adulthood: An individual-based pooled analysis of 45 twin cohorts participating in the Collaborative project of Development of Anthropometrical measures in Twins (CODATwins) study // *Am. J. Clin. Nutr.* 2016. V. 104. № 2. P. 371–379. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.130252>
8. *Silventoinen K., Jelenkovic A., Sund R. et al.* Genetic and environmental variation in educational attainment: An individual-based analysis of 28 twin cohorts // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 12681. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69526-6>
9. *Bouchard C.* Genetics of obesity: What we have learned over decades of research // *Obesity (Silver Spring).* 2021. V. 29. № 5. P. 802–820. <https://doi.org/10.1002/oby.23116>
10. *Fox C.S., Liu Y., White C.C. et al.* Genome-wide association for abdominal subcutaneous and visceral adipose reveals a novel locus for visceral fat in women // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 5. e1002695. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002695>
11. *Yengo L., Sidorenko J., Kemper K.E. et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry // *Hum. Mol. Genet.* 2018. V. 27. № 20. P. 3641–3649. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy271>
12. *Warner E.T., Jiang L., Adjei D.N. et al.* A genome-wide association study of childhood body fatness // *Obesity (Silver Spring).* 2021. V. 29. № 2. P. 446–453. <https://doi.org/10.1002/oby.23070>
13. *Huang J., Huffman J.E., Huang Y. et al.* Genomics and phenomics of body mass index reveals a complex disease network // *Nat. Commun.* 2022. V. 29. V. 13. № 1. P. 7973. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35553-2>
14. *Locke A.E., Kahali B., Berndt S.I. et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology // *Nature.* 2015. V. 518. № 7538. P. 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature14177>
15. *Ge T., Chen C.Y., Neale B.M. et al.* Phenome-wide heritability analysis of the UK Biobank // *PLoS Genet.* 2018. V. 14. № 2. e1007228. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006711>
16. *Khera A.V., Chaffin M., Wade K.H. et al.* Polygenic prediction of weight and obesity trajectories from birth to adulthood // *Cell.* 2019. V. 177. № 3. P. 587–596. e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.028>
17. *Wainschtein P., Jain D., Zheng Z. et al.* Assessing the contribution of rare variants to complex trait heritability from whole-genome sequence data // *Nat. Genet.* 2022. V. 54. № 3. P. 263–273. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00997-7>
18. *Higgins J.P., Altman D.G., Gøtzsche P.C. et al.* The Cochrane Collaboration’s tool for assessing risk of bias in randomised trials // *BMJ.* 2011. V. 343. d5928. <https://doi.org/10.1136/bmj.d5928>
19. *Реброва О.Ю., Федяева В.К., Хачатрян Г.Р.* Адаптация и валидизация вопросника для оценки риска систематических ошибок в рандомизированных контролируемых испытаниях // *Мед. технологии. Оценка и выбор.* 2015. Т. 1. № 19. С. 9–17.
20. *Wells G., Shea B., O’Connell D. et al.* The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of non-randomised studies in meta-analyses // *Ottawa Hospital Res. Institute.* 2000. https://www.ohri.ca//programs/clinical_epidemiology/oxford.20asp
21. *Реброва О.Ю., Федяева В.К.* Вопросник для оценки риска систематических ошибок в нерандомизированных сравнительных исследованиях: русскоязычная версия шкалы Ньюкасл–Оттава //

- Мед. технологии. Оценка и выбор. 2016. Т. 3. № 25. С. 14–19.
22. *Campbell H., Rudan I.* Interpretation of genetic association studies in complex disease // *Pharm. J.* 2002. V. 2. P. 349–360. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500132>
23. *Dietrich S., Jacobs S., Zheng J.S. et al.* Gene-lifestyle interaction on risk of type 2 diabetes: A systematic review // *Obes. Rev.* 2019. V. 20. № 11. P. 1557–1571. <https://doi.org/10.1111/obr.12921>
24. *Nikpay M., Lau P., Soubeyrand S. et al.* SGGG rs679482 associates with weight loss success in response to an intensively supervised outpatient program // *Diabetes.* 2020. V. 69. № 9. P. 2017–2026. <https://doi.org/10.2337/db20-0219>
25. *Valsesia A., Wang Q.P., Gheldof N. et al.* Genome-wide gene-based analyses of weight loss interventions identify a potential role for NKX6.3 in metabolism // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 540. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08492-8>
26. *Garaulet M., Smith C.E., Hernández-González T. et al.* PPAR γ Pro12Ala interacts with fat intake for obesity and weight loss in a behavioural treatment based on the Mediterranean diet // *Mol. Nutr. Food Res.* 2011. V. 55. № 12. P. 1771–1779. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100437>
27. *Garaulet M., Vera B., Bonnet-Rubio G. et al.* Lunch eating predicts weight-loss effectiveness in carriers of the common allele at PERILIPIN1: the ONTIME (Obesity, Nutrigenetics, Timing, Mediterranean) study // *Am. J. Clin. Nutr.* 2016. V. 104. № 4. P. 1160–1166. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.134528>
28. *Garaulet M., Sánchez-Moreno C., Smith C.E. et al.* Ghrelin, sleep reduction and evening preference: relationships to CLOCK 3111 T/C SNP and weight loss // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 2. e17435. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017435>
29. *Aberle J., Flitsch J., Beck N.A. et al.* Genetic variation may influence obesity only under conditions of diet: Analysis of three candidate genes // *Mol. Genet. Metab.* 2008. V. 95. № 3. P. 188–191. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2008.07.008>
30. *Goni L., Riezu-Boj J.I., Milagro F.I. et al.* Interaction between an ADCY3 genetic variant and two weight-lowering diets affecting body fatness and body composition outcomes depending on macronutrient distribution: a randomized trial // *Nutrients.* 2018. V. 10. № 6. P. 789. <https://doi.org/10.3390/nu10060789>
31. *Ramos-Lopez O., Cuervo M., Goni L. et al.* Modeling of an integrative prototype based on genetic, phenotypic, and environmental information for personalized prescription of energy-restricted diets in overweight/obese subjects // *Am. J. Clin. Nutr.* 2020. V. 111. № 2. P. 459–470. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz286>
32. *Garaulet M., Corbalán M.D., Madrid J.A. et al.* CLOCK gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the Mediterranean diet // *Int. J. Obes. (Lond).* 2010. V. 34. № 3. P. 516–523. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.255>
33. *Sakane N., Yoshida T., Umekawa T. et al.* Effects of Trp64Arg mutation in the beta 3-adrenergic receptor gene on weight loss, body fat distribution, glycemic control, and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients // *Diabetes Care.* 1997. V. 20. № 12. P. 1887–1890. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.12.1887>
34. *Tchernof A., Starling R.D., Turner A. et al.* Impaired capacity to lose visceral adipose tissue during weight reduction in obese postmenopausal women with the Trp64Arg beta3-adrenoceptor gene variant // *Diabetes.* 2000. V. 49. № 10. P. 1709–1713. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.10.1709>
35. *Corella D., Qi L., Sorlí J.V. et al.* Obese subjects carrying the 11482G>A polymorphism at the perilipin locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 90. № 9. P. 5121–5126. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0576>
36. *Ruiz J.R., Larrarte E., Margareto J. et al.* Preliminary findings on the role of PLIN1 polymorphisms on body composition and energy metabolism response to energy restriction in obese women // *Br. J. Nutr.* 2011. V. 106. № 4. P. 486–490. <https://doi.org/10.1017/S0007114511000432>
37. *Qi Q., Bray G.A., Smith S.R. et al.* Insulin receptor substrate 1 gene variation modifies insulin resistance response to weight-loss diets in a 2-year randomized trial: the Preventing Overweight Using Novel Dietary Strategies (POUNDS LOST) trial // *Circulation.* 2011. V. 124. № 5. P. 563–571. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025767>
38. *Ramos-Lopez O., Riezu-Boj J.I., Milagro F.I. et al.* Models integrating genetic and lifestyle interactions on two adiposity phenotypes for personalized prescription of energy-restricted diets with different macronutrient distribution // *Front. Genet.* 2019. V. 10. № 686. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00686>
39. *Goni L., Cuervo M., Milagro F.I., Martínez J.A.* Gene-Gene interplay and gene-diet interactions involving the MTNR1B rs10830963 variant with body weight loss // *J. Nutrigenet. Nutrigenomics.* 2014. V. 7. № 4–6. P. 232–242. <https://doi.org/10.1159/000380951>
40. *de Luis D.A., Izaola O., Primo D., Aller R.* Dietary-fat effect of the rs10830963 polymorphism in MTNR1B on insulin resistance in response to 3 months weight-loss diets // *Endocrinol. Diabetes Nutr. (Engl. Ed).* 2020. V. 67. № 1. P. 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2019.02.007>
41. *Chmurzynska A., Muzsik A., Krzyżanowska-Jankowska P. et al.* PPAR γ and FTO polymorphism can modulate

- the outcomes of a central European diet and a Mediterranean diet in centrally obese postmenopausal women // *Nutr. Res.* 2019. V. 69. P. 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.08.005>
42. *Rajkumar A., Lamothe G., Bolongo P. et al.* Acyl-CoA synthetase long-chain 5 genotype is associated with body composition changes in response to lifestyle interventions in postmenopausal women with overweight and obesity: A genetic association study on cohorts Montréal–Ottawa New Emerging Team, and Complications Associated with Obesity // *BMC Med. Genet.* 2016. V. 17. № 1. P. 56. <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0320-4>
 43. *Izaola Jáuregui O., López Gómez J.J., Primo Martín D. et al.* ACYL-CoA synthetase long-chain 5 polymorphism is associated with weight loss and metabolic changes in response to a partial meal-replacement hypocaloric diet // *Nutr. Hosp.* 2020. V. 37. № 4. P. 757–762. <https://doi.org/10.20960/nh.03019>
 44. *de Luis D.A., Mulero I., Primo D. et al.* Effects of polymorphism rs3123554 in the cannabinoid receptor gene type 2 (CB2R) on metabolic and adiposity parameters after weight loss with two hypocaloric diets // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2018. V. 139. P. 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.030>
 45. *de Luis D., Aller R., Izaola O. et al.* Effect of fatty acid-binding protein 2 Ala54Thr genotype on weight loss and cardiovascular risk factors after a high-polyunsaturated fat diet in obese patients // *J. Investig. Med.* 2012. V. 60. № 8. P. 1194–1198. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e318271fb25>
 46. *Martinez-Lopez E., Garcia-Garcia M.R., Gonzalez-Avalos J.M. et al.* Effect of Ala54Thr polymorphism of FABP2 on anthropometric and biochemical variables in response to a moderate-fat diet // *Nutrition.* 2013. V. 29. № 1. P. 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.03.002>
 47. *de Luis D.A., Aller R., Conde R. et al.* The rs9939609 gene variant in FTO modified the metabolic response of weight loss after a 3-month intervention with a hypocaloric diet // *J. Investig. Med.* 2013. V. 61. № 1. P. 22–26. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e318276161d>
 48. *Huang T., Qi Q., Li Y. et al.* FTO genotype, dietary protein, and change in appetite: the Preventing Overweight Using Novel Dietary Strategies trial // *Am. J. Clin. Nutr.* 2014. V. 99. № 5. P. 1126–1130. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.082164>
 49. *de Luis D.A., Aller R., Izaola O., Pacheco D.* Role of rs9939609 FTO gene variant in weight loss, insulin resistance and metabolic parameters after a high monounsaturated vs a high polyunsaturated fat hypocaloric diets // *Nutr. Hosp.* 2015. V. 32. № 1. P. 175–181. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.9169>
 50. *de Luis D.A., Aller R., Izaola O. et al.* Effects of a high-protein/low-carbohydrate diet versus a standard hypocaloric diet on weight and cardiovascular risk factors: role of a genetic variation in the rs9939609 FTO gene variant // *J. Nutrigenet. Nutrigenomics.* 2015. V. 8. № 3. P. 128–136. <https://doi.org/10.1159/000441142>
 51. *Verhoef S.P., Camps S.G., Bouwman F.G. et al.* Genetic predisposition, dietary restraint and disinhibition in relation to short and long-term weight loss // *Physiol. Behav.* 2014. V. 128. P. 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.004>
 52. *Holzapfel C., Sag S., Graf-Schindler J. et al.* Association between single nucleotide polymorphisms and weight reduction in behavioural interventions-A pooled analysis // *Nutrients.* 2021. V. 13. № 3. <https://doi.org/10.3390/nu13030819>
 53. *de Luis D.A., Izaola O., Primo D., Aller R.* Association of the rs10830963 polymorphism in melatonin receptor type 1B (MTNR1B) with metabolic response after weight loss secondary to a hypocaloric diet based in Mediterranean style // *Clin. Nutr.* 2018. V. 37. № 5. P. 1563–1568. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.08.015>
 54. *de Luis D.A., Izaola O., Primo D., Aller R.* A circadian rhythm-related MTNR1B genetic variant (rs10830963) modulate body weight change and insulin resistance after 9 months of a high protein/low carbohydrate vs a standard hypocaloric diet // *J. Diabetes Complications.* 2020. V. 34. № 4. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107534>
 55. *Goni L., Sun D., Heianza Y., Wang T. et al.* A circadian rhythm-related MTNR1B genetic variant modulates the effect of weight-loss diets on changes in adiposity and body composition: the POUNDS Lost trial // *Eur. J. Nutr.* 2019. V. 58. № 4. P. 1381–1389. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1660-y>
 56. *Grau K., Cauchi S., Holst C. et al.* TCF7L2 rs7903146-macronutrient interaction in obese individuals' responses to a 10-wk randomized hypoenergetic diet // *Am J. Clin. Nutr.* 2010. V. 91. № 2. P. 472–479. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27947>
 57. *Yoon Y., Park B.L., Cha M.H. et al.* Effects of genetic polymorphisms of UCP2 and UCP3 on very low calorie diet-induced body fat reduction in Korean female subjects // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 359. № 3. P. 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.110>
 58. *Stocks T., Angquist L., Banasik K. et al.* TFAP2B influences the effect of dietary fat on weight loss under energy restriction // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 8. e43212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043212>
 59. *Huang T., Wang T., Heianza Y. et al.* HNF1A variant, energy-reduced diets and insulin resistance improvement during weight loss: The POUNDS Lost trial and DIRECT // *Diabetes Obes. Metab.* 2018. V. 20. № 6. P. 1445–1452. <https://doi.org/10.1111/dom.13250>
 60. *Di Renzo L., Rizzo M., Iacopino L. et al.* Body composition phenotype: Italian Mediterranean Diet and C677T MTHFR gene polymorphism interaction //

- Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2013. V. 17. № 19. P. 2555–2565.
61. *Bojarczuk A., Boulygina E.A., Dzitkowska-Zabielska M. et al.* Genome-wide association study of exercise-induced fat loss efficiency // *Genes (Basel)*. 2022. V. 13. № 11. P. 1975.
<https://doi.org/10.3390/genes13111975>
62. *Mazur I.I., Drozdowska S., Andrieieva O. et al.* PPARC1A gene polymorphism is associated with exercise-induced fat loss // *Mol. Biol. Rep.* 2020. V. 47. № 10. P. 7451–7457.
<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05801-z>
63. *Mitchell J.A., Church T.S., Rankinen T. et al.* FTO genotype and the weight loss benefits of moderate intensity exercise // *Obesity (Silver Spring)*. 2010. V. 18. № 3. P. 641–643.
<https://doi.org/10.1038/oby.2009.311>
64. *Wang W., Yang K., Wang S. et al.* The sex-specific influence of FTO genotype on exercise intervention for weight loss in adult with obesity // *Eur. J. Sport Sci.* 2022. V. 22. № 12. P. 1926–1931.
<https://doi.org/10.1080/17461391.2021.1976843>
65. *Østergård T., Ek J., Hamid Y. et al.* Influence of the PPAR-gamma2 Pro12Ala and ACE I/D polymorphisms on insulin sensitivity and training effects in healthy offspring of type 2 diabetic subjects // *Horm. Metab. Res.* 2005. V. 37. № 2. P. 99–105.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-861174>
66. *Franks P.W., Jablonski K.A., Delahanty L. et al.* The Pro12Ala variant at the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene and change in obesity-related traits in the Diabetes Prevention Program // *Diabetologia*. 2007. V. 50. № 12. P. 2451–2460.
<https://doi.org/10.1007/s00125-007-0826-6>
67. *Orkunoglu-Suer F.E., Gordish-Dressman H., Clarkson P.M. et al.* INSIG2 gene polymorphism is associated with increased subcutaneous fat in women and poor response to resistance training in men // *BMC Med. Genet.* 2008. V. 23. № 9. P. 117.
<https://doi.org/10.1186/1471-2350-9-117>
68. *Cameron J.D., Riou M.È., Tesson F. et al.* The TaqIA RFLP is associated with attenuated intervention-induced body weight loss and increased carbohydrate intake in post-menopausal obese women // *Appetite*. 2013. V. 60. № 1. P. 111–116.
<https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.09.010>
69. *Andrade-Mayorga O., Díaz E., Salazar L.A.* Effects of four lipid metabolism-related polymorphisms on body composition improvements after 12 weeks of high-intensity interval training and dietary energy restriction in overweight/obese adult women: A pilot study // *Front. Physiol.* 2021. V. 1. № 12.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.712787>
70. *Phares D.A., Halverstadt A.A., Shuldiner A.R. et al.* Association between body fat response to exercise training and multilocus ADR genotypes // *Obes. Res.* 2004. V. 12. № 5. P. 807–815.
<https://doi.org/10.1038/oby.2004.97>
71. *de Luis D.A., Gonzalez Sagrado M., Aller R. et al.* Influence of the Trp64Arg polymorphism in the beta 3 adrenoceptor gene on insulin resistance, adipocytokine response, and weight loss secondary to lifestyle modification in obese patients // *Eur. J. Intern. Med.* 2007. V. 18. № 8. P. 587–592.
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2007.04.019>
72. *Huh J.Y.* The role of exercise-induced myokines in regulating metabolism // *Arch. Pharm. Res.* 2018. V. 41. № 1. P. 14–29.
<https://doi.org/10.1007/s12272-017-0994-y>
73. *Ludwig D.S., Willett W.C., Volek J.S., Neuhaus M.L.* Dietary fat: from foe to friend? // *Science*. 2018. V. 362. P. 764–770.
74. *Wu L., Shen C., Seed Ahmed M. et al.* Adenylate cyclase 3: A new target for anti-obesity drug development // *Obes. Rev.* 2016. V. 17. № 9. P. 907–914.
<https://doi.org/10.1111/obr.12430>
75. *Pitman J.L., Wheeler M.C., Lloyd D.J. et al.* A gain-of-function mutation in adenylate cyclase 3 protects mice from diet-induced obesity // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110226>
76. *Tong T., Shen Y., Lee H.W. et al.* Adenylate cyclase 3 haploinsufficiency confers susceptibility to diet-induced obesity and insulin resistance in mice // *Sci. Rep.* 2016. V. 6.
<https://doi.org/10.1038/srep34179>
77. URL: <https://gtexportal.org>.
78. *Markgraf D.F., Al-Hasani H., Lehr S.* Lipidomics-resolving the analysis and perception of type 2 diabetes // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 11.
<https://doi.org/10.3390/ijms17111841>
79. *Bille D.S., Banasik K., Justesen J.M. et al.* Implications of central obesity-related variants in LYPLAL1, NRXN3, MSRA, and TFAP2B on quantitative metabolic traits in adult Danes // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020640>
80. *Kok B.P., Ghimire S., Kim W. et al.* Discovery of small-molecule enzyme activators by activity-based protein profiling // *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 16. № 9. P. 997–1005.
<https://doi.org/10.1038/s41589-020-0555-4>
81. *Lyssenko V., Nagorny C.L., Erdos M.R. et al.* Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 1. P. 82–88.
82. *Weaver D.R., Reppert S.M.* The Mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei // *Neuroreport*. 1996. V. 20. № 8. P. 109–112.
<https://doi.org/10.1097/00001756-199612200-00022>
83. *Laermans J., Depoortere I.* Chronobesity: Role of the circadian system in the obesity epidemic // *Obes. Rev.* 2016. V. 17. P. 108–125.
<https://doi.org/10.1111/obr.12351>
84. *Oosterman J.E., Kalsbeek A., la Fleur S.E., Belsham D.D.* Impact of nutrients on circadian rhythmicity // *Am. J. Physiol. – Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2015. V. 308.

- № 5. P. R337–R350.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00322.2014>
85. *Garaulet M., Madrid J.A.* Chronobiology, genetics and metabolic syndrome // *Curr. Opin. Lipidol.* 2009. V. 20. № 2. P. 127–134.
<https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283292399>
 86. *Naja F., Hasan H., Khadem S.H. et al.* Adherence to the Mediterranean diet and its association with sleep quality and chronotype among youth: A cross-sectional study // *Front. Nutr.* 2022. V. 8.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2021.805955>
 87. *Corbalán M.D., Morales E.M., Canteras M. et al.* Effectiveness of cognitive-behavioral therapy based on the Mediterranean diet for the treatment of obesity // *Nutrition.* 2009. V. 25. № 7–8. P. 861–869.
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.02.013>
 88. *Fu J., Tan L.J., Lee J.E., Shin S.* Association between the mediterranean diet and cognitive health among healthy adults: A systematic review and meta-analysis // *Front. Nutr.* 2022. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.946361>
 89. *Maciejewska-Skrendo A., Massidda M., Tocco F., Leżnicka K.* The influence of the differentiation of genes encoding peroxisome proliferator-activated receptors and their coactivators on nutrient and energy metabolism // *Nutrients.* 2022. V. 14. № 24.
<https://doi.org/10.3390/nu14245378>
 90. *Kubota N., Terauchi Y., Miki H. et al.* PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance // *Mol. Cell.* 1999. V. 4. № 4. P. 597–609.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80210-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80210-5)
 91. *Marcinkiewicz A., Gauthier D., Garcia A. et al.* The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 11901–11909.
 92. *Rankinen T., Rice T., Teran-Garcia M. et al.* FTO genotype is associated with exercise training-induced changes in body composition // *Obesity (Silver Spring).* 2010. V. 18. № 2. P. 322–326.
<https://doi.org/10.1038/oby.2009.205>
 93. *Danaher J., Stathis C.G., Wilson R.A. et al.* High intensity exercise downregulates FTO mRNA expression during the early stages of recovery in young males and females // *Nutr. Metab. (Lond).* 2020. V. 17. № 68.
<https://doi.org/10.1186/s12986-020-00489-1>
 94. *Wu W., Feng J., Jiang D. et al.* AMPK regulates lipid accumulation in skeletal muscle cells through FTO-dependent demethylation of N⁶-methyladenosine // *Sci. Rep.* 2017. V. 7.
<https://doi.org/10.1038/srep41606>
 95. *Li S., Zhao J.H., Luan J. et al.* Physical activity attenuates the genetic predisposition to obesity in 20,000 men and women from EPIC-Norfolk prospective population study // *PLoS Med.* 2010. V. 7. № 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000332>
 96. *Loos R.J., Yeo G.S.* The bigger picture of FTO: The first GWAS-identified obesity gene // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014. V. 10. № 1. P. 51–61.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.227>
 97. *Kilpeläinen T.O., Qi L., Brage S. et al.* Physical activity attenuates the influence of FTO variants on obesity risk: A meta-analysis of 218 166 adults and 19268 children // *PLoS Med.* 2011. V. 8. № 11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001116>
 98. *Vimalaswaran K.S., Li S., Zhao J.H. et al.* Physical activity attenuates the body mass index-increasing influence of genetic variation in the FTO gene // *Am. J. Clin. Nutr.* 2009. V. 90. № 2. P. 425–428.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27652>
 99. *Reddon H., Gerstein H.C., Engert J.C. et al.* Physical activity and genetic predisposition to obesity in a multiethnic longitudinal study // *Sci. Rep.* 2016. V. 6.
<https://doi.org/10.1038/srep18672>
 100. *Zarebska A., Jastrzebski Z., Cieszczyk P. et al.* The Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene modifies the association of physical activity and body mass changes in Polish Women // *PPAR Res.* 2014. V. 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/373782>
 101. *Li S., He C., Nie H. et al.* G allele of the rs1801282 polymorphism in PPAR γ gene confers an increased risk of obesity and hypercholesterolemia, While T allele of the rs3856806 polymorphism displays a protective role against dyslipidemia: A systematic review and meta-analysis // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.919087>
 102. *Masud S., Ye S., SAS Group.* Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis // *J. Med. Genet.* 2003. V. 40. № 10.
<https://doi.org/10.1136/jmg.40.10.773>
 103. *Qi Q., Chu A.Y., Kang J.H. et al.* Sugar-sweetened beverages and genetic risk of obesity // *N. Engl. J. Med.* 2012. V. 367. P. 1387–1396.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203039>
 104. *Qi Q., Chu A.Y., Kang J.H. et al.* Fried food consumption, genetic risk, and body mass index: Gene-diet interaction analysis in three us cohort studies // *BMJ.* 2014. V. 348.
<https://doi.org/10.1136/bmj.g1610>
 105. *Jääskeläinen A., Schwab U., Kolehmainen M. et al.* Meal frequencies modify the effect of common genetic variants on body mass index in adolescents of the northern Finland birth cohort 1986 // *PLoS One.* 2013. V. 10. № 9. e73802.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073802>
 106. *Cienfuegos S., Gabel K., Kalam F. et al.* Effects of 4- and 6-h time-restricted feeding on weight and cardiometabolic health: A randomized controlled trial in adults with obesity // *Cell Metab.* 2020. V. 32. № 3. P. 366–378.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.018>
 107. *Pellegrini M., Cioffi I., Evangelista A. et al.* Effects of time-restricted feeding on body weight and metabo-

- lism. A systematic review and meta-analysis // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2020. V. 21. № 1. P. 17–33. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09524-w>
108. *Heianza Y., Sun D., Wang T. et al.* Starch digestion-related amylase genetic variant affects 2-year changes in adiposity in response to weight-loss diets: The POUNDS Lost Trial // *Diabetes.* 2017. V. 66. № 9. P. 2416–2423. <https://doi.org/10.2337/db16-1482>
 109. *Zhang X., Qi Q., Zhang C. et al.* FTO genotype and 2-year change in body composition and fat distribution in response to weight-loss diets: the POUNDS LOST Trial // *Diabetes.* 2013. V. 62. № 2. P. 662. <https://doi.org/10.2337/db11-1799>
 110. *Frey U.H., Hauner H., Jöckel K.H. et al.* A novel promoter polymorphism in the human gene GNAS affects binding of transcription factor upstream stimulatory factor 1, Galphas protein expression and body weight regulation // *Pharmacogenet. Genomics.* 2008. V. 18. № 2. P. 141–151. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3282f49964>
 111. *Razquin C., Martinez J.A., Martinez-Gonzalez M.A. et al.* A Mediterranean diet rich in virgin olive oil may reverse the effects of the -174G/C IL6 gene variant on 3-year body weight change // *Mol. Nutr. Food Res.* 2010. V. 54. Suppl. 1. P. S75–S82. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900257>
 112. *Heianza Y., Sun D., Ma W. et al.* Gut-microbiome-related LCT genotype and 2-year changes in body composition and fat distribution: the POUNDS Lost Trial // *Int. J. Obes. (Lond).* 2018. V. 42. № 9. P. 1565–1573. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0046-9>
 113. *Sun D., Heianza Y., Li X. et al.* Genetic, epigenetic and transcriptional variations at NFATC2IP locus with weight loss in response to diet interventions: The POUNDS Lost Trial // *Diabetes Obes. Metab.* 2018. V. 20. № 9. P. 2298–2303. <https://doi.org/10.1111/dom.13333>
 114. *Lin X., Qi Q., Zheng Y. et al.* Neuropeptide Y genotype, central obesity, and abdominal fat distribution: the POUNDS Lost Trial // *Am. J. Clin. Nutr.* 2015. V. 102. № 2. P. 514–519. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.107276>
 115. *Valeeva F.V., Medvedeva M.S., Khasanova K.B. et al.* Association of gene polymorphisms with body weight changes in prediabetic patients // *Mol. Biol. Rep.* 2022. V. 49. № 6. P. 4217–4224. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07254-y>
 116. *Heianza Y., Ma W., Huang T. et al.* macronutrient intake-associated FGF21 genotype modifies effects of weight-loss diets on 2-year changes of central adiposity and body composition: The POUNDS Lost Trial // *Diabetes Care.* 2016. V. 39. № 11. P. 1909–1914. <https://doi.org/10.2337/dc16-1111>
 117. *Xu M., Qi Q., Liang J. et al.* Genetic determinant for amino acid metabolites and changes in body weight and insulin resistance in response to weight-loss diets: the Preventing Overweight Using Novel Dietary Strategies (POUNDS LOST) trial // *Circulation.* 2013. V. 127. № 12. P. 1283–1289. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000586>
 118. *Mansego M.L., Milagro F.I., Zulet M.A., Martinez J.A.* SH2B1 CpG-SNP is associated with body weight reduction in obese subjects following a dietary restriction program // *Ann. Nutr. Metab.* 2015. V. 66. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1159/000368425>
 119. *Mattei J., Qi Q., Hu F.B. et al.* TCF7L2 genetic variants modulate the effect of dietary fat intake on changes in body composition during a weight-loss intervention // *Am. J. Clin. Nutr.* 2012. V. 96. № 5. P. 1129–1136. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.038125>
 120. *Aberle J., Evans D., Beil F.U., Seedorf U.* A polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with weight loss after short-term diet // *Clin. Genet.* 2005. V. 68. № 2. P. 152–154. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00463.x>
 121. *Hamada T., Kotani K., Nagai N. et al.* Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and obesity-related metabolic changes in response to low-energy diets in obese women // *Nutrition.* 2011. V. 27. № 1. P. 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.10.012>
 122. *Tsuzaki K., Kotani K., Nagai N. et al.* Adiponectin gene single-nucleotide polymorphisms and treatment response to obesity // *J. Endocrinol. Invest.* 2009. V. 32. № 5. P. 395–400. <https://doi.org/10.1007/BF03346474>
 123. *Ruiz J.R., Larrarte E., Margareto J. et al.* Role of β_2 -adrenergic receptor polymorphisms on body weight and body composition response to energy restriction in obese women: preliminary results // *Obesity (Silver Spring).* 2011. V. 19. № 1. P. 212–215. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.130>
 124. *de Luis D.A., Fernández Ovalle H., Izaola O. et al.* Rs 10767664 gene variant in Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) affect metabolic changes and insulin resistance after a standard hypocaloric diet // *J. Diabetes Complications.* 2018. V. 32. № 2. P. 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.10.005>
 125. *de Luis D.A., Gonzalez Sagrado M., Aller R. et al.* Effects of C358A missense polymorphism of the endocannabinoid degrading enzyme fatty acid amide hydrolase on weight loss after a hypocaloric diet // *Metabolism.* 2011. V. 60. № 5. P. 730–734. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.07.007>
 126. *Mammès O., Aubert R., Betoulle D. et al.* LEPR gene polymorphisms: associations with overweight, fat mass and response to diet in women // *Eur. J. Clin. Invest.* 2001. V. 31. № 5. P. 398–404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2001.00843.x>
 127. *Abete I., Goyenechea E., Crujeiras A.B., Martínez J.A.* Inflammatory state and stress condition in weight-lowering Lys109Arg LEPR gene polymorphism carriers // *Arch. Med. Res.* 2009. V. 40. № 4. P. 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2009.03.005>

128. Thamer C., Machann J., Stefan N. et al. Variations in PPARD determine the change in body composition during lifestyle intervention: A whole-body magnetic resonance study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 93. № 4. P. 1497–1500.
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-1209>
129. Matsuo T., Nakata Y., Katayama Y. et al. PPARG genotype accounts for part of individual variation in body weight reduction in response to calorie restriction // *Obesity (Silver Spring)*. 2009. V. 17. № 10. P. 1924–1931.
<https://doi.org/10.1038/oby.2009.199>
130. Yamakage H., Konishi Y., Muranaka K. et al. Association of protein tyrosine phosphatase 1B gene polymorphism with the effects of weight reduction therapy on bodyweight and glycolipid profiles in obese patients // *J. Diabetes Investig.* 2021. V. 12. № 8. P. 1462–1470.
<https://doi.org/10.1111/jdi.13492>
131. Heni M., Herzberg-Schäfer S., Machicao F. et al. Dietary fiber intake modulates the association between variants in TCF7L2 and weight loss during a lifestyle intervention // *Diabetes Care*. 2012. V. 35. № 3. e24.
<https://doi.org/10.2337/dc11-2012>
132. Nagai N., Sakane N., Kotani K. et al. Uncoupling protein 1 gene –3826 A/G polymorphism is associated with weight loss on a short-term, controlled-energy diet in young women // *Nutr. Res.* 2011. V. 31. № 4. P. 255–261.
<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2011.03.010>
133. Cha M.H., Kim K.S., Suh D., Yoon Y. Effects of genetic polymorphism of uncoupling protein 2 on body fat and calorie restriction-induced changes // *Hereditas*. 2007. V. 144. № 5. P. 222–227.
<https://doi.org/10.1111/j.2007.0018-0661.02005.x>
134. Papazoglou D., Papathanasiou P., Papanas N. et al. Uncoupling protein-2 45-base pair insertion/deletion polymorphism: is there an association with severe obesity and weight loss in morbidly obese subjects? // *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 2012. V. 10. № 4. P. 307–311.
<https://doi.org/10.1089/met.2012.0003>
135. de Luis D.A., Aller R., Izaola O. et al. Relation of –55CT polymorphism of UCP3 gene with weight loss and metabolic changes after a high monounsaturated fat diet in obese non diabetic patients // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013. V. 17. № 20. P. 2810–2815.
136. Cha M.H., Shin H.D., Kim K.S. et al. The effects of uncoupling protein 3 haplotypes on obesity phenotypes and very low-energy diet-induced changes among overweight Korean female subjects // *Metabolism*. 2006. V. 55. № 5. P. 578–586.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.11.012>
137. Corbi G., Polito R., Monaco M.L. et al. Adiponectin expression and genotypes in Italian people with severe obesity undergone a hypocaloric diet and physical exercise program // *Nutrients*. 2019. V. 11. № 9.
<https://doi.org/10.3390/nu11092195>
138. Leońska-Duniec A., Jastrzębski Z., Jazdzewska A. et al. Individual responsiveness to exercise-induced fat loss and improvement of metabolic profile in young women is associated with polymorphisms of adrenergic receptor genes // *J. Sports Sci. Med.* 2018. V. 17. № 1. P. 134–144.
139. Suchanek P., Kralova-Lesna I., Poledne R. et al. An AHSG gene variant modulates basal metabolic rate and body composition development after a short-time lifestyle intervention // *Neuro Endocrinol. Lett.* 2011. V. 32. Suppl. 2. P. 32–36.
140. Tworoger S.S., Chubak J., Aiello E.J. et al. The effect of CYP19 and COMT polymorphisms on exercise-induced fat loss in postmenopausal women // *Obes. Res.* 2004. V. 12. № 6. P. 972–981.
<https://doi.org/10.1038/oby.2004.119>
141. de Luis D.A., Aller R., Izaola O. et al. Influence of ALA54THR polymorphism of fatty acid binding protein 2 on lifestyle modification response in obese subjects // *Ann. Nutr. Metab.* 2006. V. 50. № 4. P. 354–360.
<https://doi.org/10.1159/000094299>
142. Franzago M., Di Nicola M., Fraticelli F. et al. Nutrigenetic variants and response to diet/lifestyle intervention in obese subjects: A pilot study // *Acta Diabetol.* 2022. V. 59. № 1. P. 69–81.
<https://doi.org/10.1007/s00592-021-01787-7>
143. Ficek K., Cięszczyk P., Leźnicka K. et al. Novel associations between interleukin-15 polymorphisms and post-training changes of body composition parameters in young nonobese women // *Front. Physiol.* 2019. V. 5. № 10.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00876>
144. Suchánek P., Lánská V., Hubáček J.A. Body composition changes in adult females after lifestyle intervention are influenced by the NYD-SP18 variant // *Cent. Eur. J. Publ. Health.* 2015. V. 23. Suppl. P. 19–S22.
<https://doi.org/10.21101/cejph.a4105>
145. Leońska-Duniec A., Cięszczyk P., Jastrzębski Z. et al. The polymorphisms of the PPARD gene modify post-training body mass and biochemical parameter changes in women // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202557>
146. Haupt A., Thamer C., Heni M. et al. Gene variants of TCF7L2 influence weight loss and body composition during lifestyle intervention in a population at risk for type 2 diabetes // *Diabetes*. 2010. V. 59. № 3. P. 747–750.
<https://doi.org/10.2337/db09-1050>
147. Lim K.I., Shin Y.A. Impact of UCP2 polymorphism on long-term exercise-mediated changes in adipocytokines and markers of metabolic syndrome // *Aging Clin. Exp. Res.* 2014. V. 26. № 5. P. 491–496.
<https://doi.org/10.1007/s40520-014-0213-3>
148. de Luis D.A., Aller R., Izaola O. et al. Modulation of adipocytokines response and weight loss secondary to a hypocaloric diet in obese patients by –55CT polymorphism of UCP3 gene // *Horm. Metab. Res.* 2008. V. 40. № 3. P. 214–218.
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1046796>

Genetic Polymorphisms Associated with the Efficiency of Weight Loss: A Systematic Review

E. S. Egorova^{a, *} and I. I. Ahmetov^{a, b}

^aLaboratory of Genetics of Aging and Longevity, Kazan State Medical University, Kazan, 420012 Russia

^bResearch Institute for Sport and Exercise Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, L3 5AF United Kingdom

*e-mail: jastspring@yandex.ru

Interindividual differences are associated not only with body weight but also determine the body's response to diet and physical activity. This systematic review aimed to identify the genetic markers associated with diet-induced and exercise-induced weight loss. The eligible intervention studies for this systematic review contained all the necessary parameters for genetic polymorphism, diet, exercise, and changes in anthropometric or body composition parameters. In total, 91 articles met the criteria and were included in this systematic review. The vast majority of studies ($n = 88$) are used of candidate gene approach, and only three studies were performed using hypothesis-free approach (GWAS). A total of 98 genetic variants were found, of which 72 markers are associated with the efficiency of diet therapy, and 26 – with individual response to physical activity. It should be noted that the significance of markers was replicated for only 10 of 98 genetic variants. In the near future, we should expect progress in this area, which will result in the development of a method for individual selection for each patient of the type of diet and exercise for the prevention and treatment of obesity.

Keywords: genetics of obesity, genes, polymorphisms, physical activity, diet, weight loss, systematic review.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММА *Levilactobacillus brevis* 47f
В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА¹© 2023 г. Е. У. Полуэктова¹*, О. В. Аверина¹, А. С. Ковтун¹, В. Н. Даниленко¹¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: epolu@vigg.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

Levilactobacillus brevis 47f – гетероферментативная аэротолерантная молочнокислая бактерия, выделенная из микробиоты желудочно-кишечного тракта здорового человека. В комплексе доклинических исследований штамм проявил противовоспалительные свойства в отношении мукозита слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника, индуцированного 5-фторурацилом. Вместе с тем молекулярные механизмы, определяющие свойства штамма и, в частности, его реакцию на воздействие активных форм кислорода, остаются неизученными. Задачей данной работы было исследовать реакцию штамма на действие окислителей – перекиси водорода и кислорода – методом транскрипционного RNAseq-анализа. Оба окислителя оказали сильное действие на штамм, увеличивая или снижая экспрессию нескольких сот генов – как общих, так и специфических для каждого оксиданта. Приведена характеристика белков с наиболее увеличенной экспрессией ($D\geq 5$). Гены, активизирующиеся при действии обоих оксидантов, кодируют белки стресса, антиоксидантной защиты, репарации белков и нуклеотидов, клеточной стенки, транспорта и метаболизма углеводов, катаболических путей запасающей энергии. При действии перекиси активизируется транскрипция в основном белков защиты: стрессового ответа и молекулярных шаперонов, антиоксидантной активности, репарации ДНК, а также белков, участвующих в формировании клеточной стенки. В аэробных условиях в значительной степени активизируются гены, определяющие белки преобразования энергии (использование в качестве источника энергии, помимо глюкозы, фруктозы, жирных кислот, нуклеозидов; белки фосфокетолазного пути) и импорта пептидов, аминокислот, сахаров. Полученные в настоящей работе результаты будут использованы нами при интегрированном анализе совокупности транскриптомных, протеомных и метаболомных данных по данному штамму. Это внесет значительный вклад в создание на основе *L. brevis* 47f фармабиотика для лечения различных воспалительных заболеваний.

Ключевые слова: транскриптомный анализ, *Levilactobacillus brevis*, перекись водорода, аэробный рост.

DOI: 10.31857/S0016675823080106, **EDN:** XTXIFD

Levilactobacillus brevis – грамположительная облигатно гетероферментативная молочнокислая бактерия, присутствующая в микробиоте человека (ротовой и вагинальной полостях и кишечнике) [1]. Среди представителей данного вида обнаружены и охарактеризованы штаммы, обладающие противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными (АО) свойствами [2–4].

Одним из важных свойств лактобацилл, отбираемых для последующего применения в медицинской практике (фармабиотиков) и в качестве ингредиентов в функциональных продуктах питания, является устойчивость к действию оксидантов

и активных форм кислорода (АФК) и способность к повышению АО статуса организма хозяина [5, 6]. АФК образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода до супероксидного радикала ($\cdot O_2^-$), перекиси водорода (H_2O_2) или гидроксильного радикала ($\cdot OH$). С АФК бактерии взаимодействуют как внутри клетки, так и вне ее и поддерживают окислительно-восстановительный гомеостаз [7]. *L. brevis*, как и многие лактобациллы, обычно обитает в анаэробных условиях и получает энергию за счет реакций брожения, однако является аэротолерантной бактерией и способна расти в присутствии кислорода [8, 9]. Аэробный рост меняет метаболизм клетки, прежде всего метаболизм углеводов [10].

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823080106 для авторизованных пользователей.

Штамм *L. brevis* 47f синтезирует гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) — основной тормозной медиатор центральной нервной системы млекопитающих [11]. Бесклеточный супернатант штамма снижает АО активность параквата и перекиси водорода в люминесцентной тест-системе на основе рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* [12]. В комплексе доклинических исследований штамм проявил противовоспалительные свойства в отношении мукозита слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника, индуцированного 5-фторурацилом [13]. Штамм *L. brevis* 47f можно рассматривать как потенциальный пробиотик поддерживающей терапии для пациентов, проходящих противоопухолевую химиотерапию. Оральное введение штамма крысам, находящимся в условиях постоянного освещения или постоянной темноты, нормализовало физиологические параметры животных и состав кишечной микробиоты [14]. Эти данные свидетельствуют о том, что штамм обладает рядом важных и разноплановых пробиотических свойств. Однако молекулярные механизмы, определяющие свойства штамма и, в частности, его реакцию на воздействие активных форм кислорода, которые образуются в ходе промышленных процессов, во время прохождения клеток по желудочно-кишечному тракту в нормальных условиях и при воспалительных процессах, остаются неизученными. Целью настоящей работы было исследовать реакцию штамма на действие окислителей — перекиси водорода и кислорода — методом транскрипционного RNAseq-анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальный штамм и условия роста

Штамм *Levilactobacillus brevis* 47f выделен из организма человека в РФ в 2010 г., депонирован в ВКПМ (№ В-12237), геном штамма секвенирован (GenBank LBHR01). Штамм выращивали на среде MRS (HiMedia, Индия) [15] при 37°C в частично анаэробных условиях (в эксикаторе, где кислород был выжжен горением свечи). Для транскриптомного анализа в условиях окислительного стресса бактериальную культуру выращивали до экспоненциальной фазы роста (OD₆₀₀ = 0.3, контроль); далее добавляли H₂O₂ до 5 мМ и инкубировали 2 ч в тех же условиях (проба H₂O₂) и 4 ч в условиях аэрации (250 об./мин, 37°C) (проба O₂).

Выделение мРНК и секвенирование

Лизис и разрушение клеток проводили с помощью лизоцима, тритона X-100 и механически на приборе SpeedMill plus (Analytik Jena AG, Германия). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Образцы РНК обрабатывали ДНКазой I для разрушения остатков ДНК.

Чистота образцов РНК тестировалась на спектрофотометре NanoDrop TM1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Для удаления рРНК образцы обрабатывали набором Ribo-off rRNA Depletion Kit (Bacteria) (Nanjing Vazyme Biotech Co, Китай). Библиотеки для секвенирования были получены с помощью набора MGIEasy RNA Directional Library Prep Set (MGI, Китай). Библиотеки оценивали проверкой распределения размера фрагментов с помощью Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent, США) и количественной характеристикой с помощью qPCR с зондом TaqMan (Eurogen, Россия). Парноконцевое секвенирование фрагментов проводили на платформе DNBseq (BGI, Китай). Секвенированный транскриптом анализировали на наличие ошибок с использованием FastQCv0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Адаптеры обрезали с помощью программы Trimmomatic 0.39 [16].

Обработка и анализ транскриптомных данных

Проверенные на качество транскриптомные чтения секвенированных образцов были картированы на исследуемый геном (RefSeq GCF_001010995.1 *Levilactobacillus brevis* 47f) с использованием hisat2 v2.2.1 [17]. Картирования были отфильтрованы с помощью программного пакета SAMtools v1.10 [18]. Количество чтений на транскрипт оценивалось с помощью HTSeq-count v2.0.2 [19]. Дифференциальную экспрессию определяли как отношение количества картированных на ген чтений для опытной и контрольной проб. Анализ функциональной активности белков проводили по базам данных Clusters of Orthologous Groups (COG) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>) и InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Чувствительность клеток штамма L. brevis 47f к действию оксидантов

При использованных концентрации и времени обработки жизнеспособность штамма менялась крайне незначительно (H₂O₂) или вообще не менялась (O₂) (рис. 1).

Оба оксиданта оказали сильное действие на экспрессию генов. Максимальные значения дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) — 44 для H₂O₂ и 30 для O₂, минимальные — 0.02 для H₂O₂ и 0.03 для O₂. Число ДЭГ приведено на рис. 2, а, б. Наиболее сильное изменение ДЭГ вызывает H₂O₂. ДЭГ H₂O₂ и O₂ частично перекрываются, хотя в целом значительно различаются друг от друга.

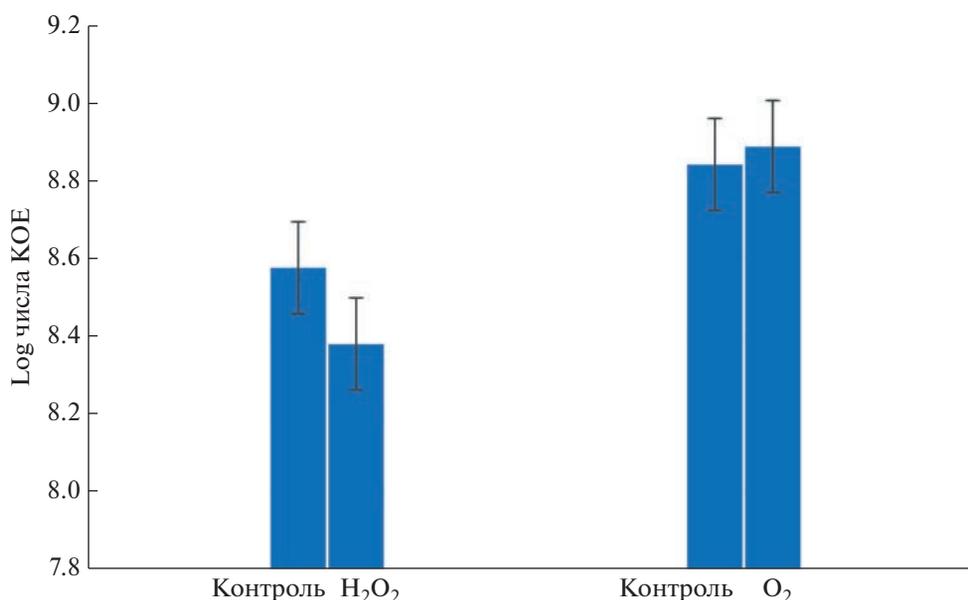


Рис. 1. Чувствительность клеток штамма *L. brevis* 47f к действию оксидантов.

Гены белков-антиоксидантов штамма *L. brevis* 47f

Ранее мы составили каталог генов/белков с АО функцией у лактобацилл и бифидобактерий [20]. В табл. 1 на основе этого каталога приведены гены белков-антиоксидантов штамма *L. brevis* 47f и соответствующие им значения ДЭ. В геноме штамма отсутствуют гены глутаредоксина, синтеза и метаболизма глутатиона (глутатионредуктазы, глутатионсинтазы, глутатион-S-трансферазы), супероксиддисмутазы, поэтому они не приведены в табл. 1. ДЭГ меняется у 25 из 40 генов при действии H₂O₂ и только у 10 из 40 генов при действии O₂, причем восемь из этих десяти генов проявляют ДЭ и при действии H₂O₂. К генам, увеличивающим экспрессию под действием перекиси, относятся гены АТФаз-переносчиков ионов меди, белков Dps, NrdH, глутатионпероксидазы, олеатгидратазы, FAD- и NAD(P)H/FAD-зависимых оксидоредуктаз, пируватоксидазы, пероксидазы, тиоредоксина, тиоредоксинредуктазы, пероксидероксина. Снижение ДЭГ при действии перекиси отмечается всего у двух генов. При действии кислорода увеличивается экспрессия ДНК-связывающего белка Dps, олеатгидратазы, одного из двух генов тиоредоксина, пероксидероксина и ряда оксидоредуктаз. Снижение ДЭГ отмечается у двух генов.

Распределение белков, соответствующих ДЭГ ≥ 5, по функциональным категориям

Далее мы охарактеризовали белки, соответствующие генам с наиболее сильным увеличением экспрессии (ДЭ ≥ 5). Белки были разделены на

три группы: общие для обоих типов стресса, специфические для O₂, специфические для H₂O₂. На рис. 2, в представлено общее число таких генов, характеристики отдельных генов и белков приведены в табл. S1–S3. Из генов с измененной экспрессией около 60% увеличивают экспрессию при действии обоих оксидантов, около 40% являются специфическими для перекиси и кислорода. На рис. 3 представлено распределение специфических для перекиси водорода и кислорода белков с ДЭ ≥ 5 по функциональным категориям COG (Clusters of Orthologous Genes). Всего распределено 176 белков, из них 47 не имеют COG-категории, у семи функция неизвестна (в том числе и для белка, кодируемого геном AAX72_RS14285 и дающего максимальную ДЭ 44.28 для H₂O₂/12.96 для O₂), для 14 предсказана только общая функция. Таким образом, точная функция более чем трети белков (68 белков, 38.6%) неизвестна. Гены с ДЭ в случае действия перекиси и кислорода различались. При действии перекиси преобладали категории: посттрансляционная модификация/белковый обмен/шапероны; клеточная стенка/мембрана/биоэнергетика/клеточная оболочка; защитные механизмы; мобилком: профаги/транспозоны; репликация/рекомбинация/репарация; транспорт и метаболизм неорганических ионов; транскрипция. При действии кислорода преобладали категории: транспорт и метаболизм липидов, углеводов, аминокислот; выработка и преобразование энергии.

Характеристика отдельных генов/белков с ДЭ ≥ 5

Далее дана более подробная характеристика белков, соответствующих трем группам: общей

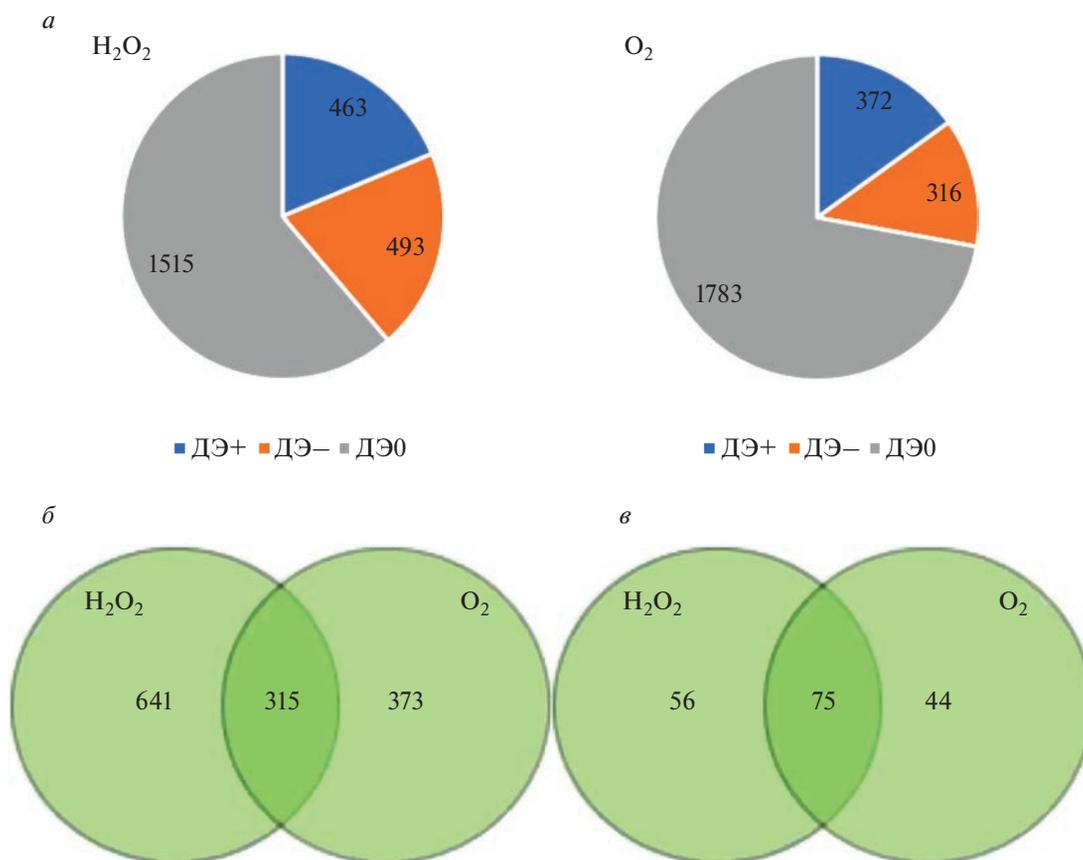


Рис. 2. Характеристика числа генов с ДЭ ≥ 2 (ДЭ+) и ДЭ ≤ 0.5 (ДЭ-) штамма *L. brevis* 47f при действии кислорода и перекиси водорода. *а* – соотношение общего числа генов; *б* – общие и специфические гены с наиболее сильным увеличением экспрессии (ДЭ ≥ 5).

для H₂O₂ и O₂ и двум специфическим. Деление достаточно условное; так, различные гены тиоредоксина, Dps белка, Fe-S кластера, альдо-кеторедуктаз могут входить не в одну, а в две группы. Условно и деление белков на функциональные группы. Один и тот же белок может участвовать в окислительно-восстановительных процессах, метаболизме углеводов (пируватоксидаза) и адгезии (выполнять дополнительную функцию, т.н. совместительство белков (protein moonlighting), например трансальдолаза).

O₂ и H₂O₂ общие гены/белки

Эта группа содержит 75 генов с ДЭ ≥ 5, из них 70 кодируют белки, в том числе:

- стрессовые белки. Это оперон, объединяющий гены малых стрессовых белков, связанных с мембранами (AAX72_RS08655–AAX72_RS08675), гены универсальных стрессовых белков, белков семейств CsbD и GlsB/YeaQ/YmgE;

- белки АО защиты (олеатгидратаза, белок Dps, пероксицероксин, один из двух генов тиоредоксина, два из четырех имеющихся генов белков

железосерного кластера), а также восемь оксидоредуктаз. Это белки COG-категорий, которые определяют транспорт и метаболизм липидов FabG (AAX72_RS09445, AAX72_RS00795, AAX72_RS00795); FadH2 (AAX72_RS13105, AAX72_RS11615), а также продукцию и преобразование энергии Lpd (AAX72_RS04865, AAX72_RS12425);

- белки, осуществляющие репарацию белков и нуклеотидов (пептид-метионин S-оксидоредуктазы, MrsA и MrsB, NUDIX белок);

- белки компонентов клеточной стенки (синтеза липотейхоевой кислоты – диацилглицеролкиназа) и выведения из клетки токсических веществ (белок механочувствительного канала MscL, пермеаза AAX72_RS02830);

- шесть из десяти имеющихся у штамма альдокеторедуктаз;

- транспортные белки, в том числе белки фосфотрансферазных систем, и метаболизма углеводов, белки транспорта и метаболизма мальтозы (AAX72_RS05675–AAX72_RS05680, AAX72_RS11235–AAX72_RS11240);

Таблица 1. Дифференциальная экспрессия генов белков-антиоксидантов штамма *L. brevis* 47f

Фермент/белок	Идентификатор гена	ДЭГ в транскрипционном анализе	
		H ₂ O ₂	O ₂
Гем-зависимая каталаза	AAX72_RS13120	1.81	1.06
АТФаза-переносчик меди	AAX72_RS09325	5.35	1.80
	AAX72_RS09305	2.08	1.28
ДНК-связывающий белок Dps	AAX72_RS12335	6.98	2.64
Диацилглицеролкиназа	AAX72_RS03005	1.38	0.70
	AAX72_RS06875	1.16	0.84
Глутаредоксин NrdH типа	AAX72_RS04510	2.36	0.47
Глутатитонпероксидаза	AAX72_RS08620	7.88	1.68
Гамма-глутамилцистеинсинтетаза (глутаматцистеинлигаза)	AAX72_RS03165	2.7	1.94
Олеатгидратаза (изомераза линолевой кислоты)	AAX72_RS09270	7.66	3.35
NAD(P)/FAD-зависимая оксидоредуктаза	AAX72_RS03320	2.14	0.85
	AAX72_RS11635	4.85	0.76
	AAX72_RS11615	2.74	2.74
	AAX72_RS13105	5.81	2.05
	AAX72_RS04865	20.62	7.80
	AAX72_RS12425	7.00	2.88
	AAX72_RS00845	2.10	1.09
	AAX72_RS07805	4.37	1.53
	AAX72_RS02225	0.37	0.84
	AAX72_RS05210	4.10	1.49
	AAX72_RS07330	1.69	0.51
	AAX72_RS09770	1.47	0.98
	AAX72_RS00765	2.01	1.33
	AAX72_RS03120	0.49	1.06
	AAX72_RS04125	0.65	0.52
	AAX72_RS09445	5.63	3.26
	AAX72_RS09755	1.25	1.73
	AAX72_RS07435	1.85	0.28
AAX72_RS09930	1.54	2.17	
AAX72_RS05210	4.10	1.49	
Тиолпероксидаза	AAX72_RS06165	3.54	1.64
Пероксидаза DuP-типа	AAX72_RS07920	0.98	0.53
Пируватоксидаза	AAX72_RS07840	5.4	1.26
Тиоредоксин	AAX72_RS06600	5.8	1.74
	AAX72_RS05795	11.35	2.15
Тиоредоксинредуктаза	AAX72_RS04745	3.25	1.91
Белок семейства DsbA	AAX72_RS12460	1.66	0.64
АВС-транспортер цистеина CysC	AAX72_RS02950	0.79	1.07
АВС-транспортер цистеина CysD	AAX72_RS02945	0.72	1.09
Пероксидероксин OsmC семейства	AAX72_RS10345	6.00	2.95

Примечание. Цветом выделены значения ДЭГ ≥ 2 и ДЭГ ≤ 0.5 .

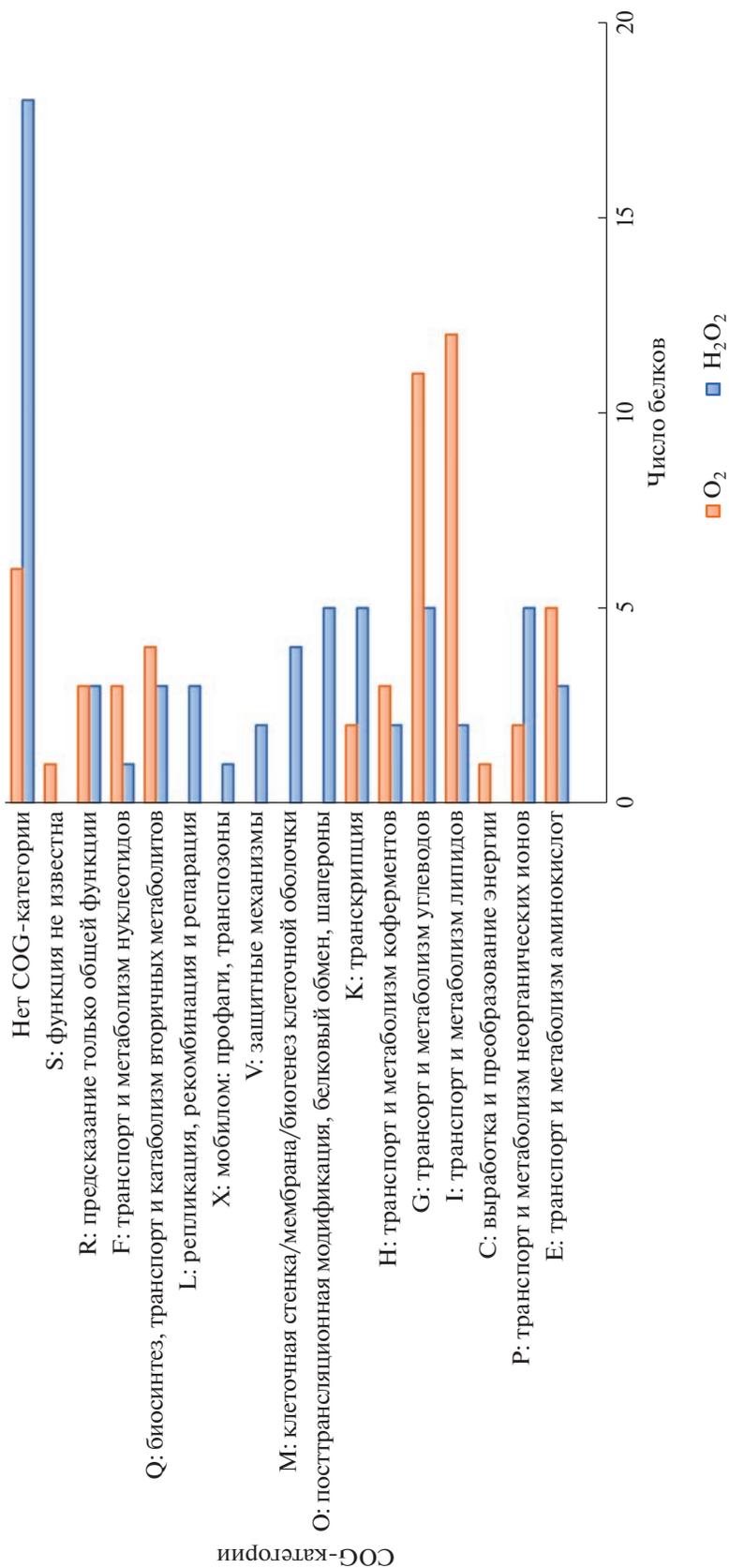


Рис. 3. Распределение белков, соответствующих генам с ДЭ ≥ 5, по категориям SOG. Представлены белки, специфические для стресса, вызванного перекисью водорода и кислородом.

– транскетолазу, глицеролдегидрогеназу, белки пируватдегидрогеназного и альфа-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов (AAX72_RS03560–AAX72_RS03575).

H₂O₂ специфические гены/белки

В эту группу входят 56 генов с ДЭ ≥ 5 , из них 53 кодируют белки, в том числе:

– молекулярные шапероны (Hsp20, GrpE, Dnak) и HrcA репрессор стрессовых белков класса I. Репрессор III класса стрессовых белков CtsR (AAX72_RS00305) также имеет увеличенную экспрессию (3.33);

– белки-антиоксиданты, кроме перечисленных в разделе “Гены белков-антиоксидантов штамма *L. brevis* 47f” к ним можно отнести нитроредуктазу, белки VIT семейства, белки железосерного кластера (два из них специфичны для H₂O₂ стресса, два являются общими для обоих окислителей);

– альдокеторедуктазы. Из 16 генов четыре дают увеличение ДЭ только при действии перекиси водорода, еще шесть – в случаях обоих окислителей;

– белки транспорта и метаболизма углеводов, а именно пектина (AAX72_RS07760–AAX72_RS07770);

– трансальдолазу, фермент пентозофосфатного пути;

– белки репарации ДНК: ДНК-полимераза γ -семейства, ДНК-полимераза IV DinB, экзонуклеаза UvrB;

– белки биогенеза клеточной стенки: глутаматрацемаза, глутамин-фруктозо-6-фосфаттрансаминаза GlmS, белок, содержащий LysM-домен;

– белки синтеза аминокислот с разветвленными боковыми цепями (ацетолактатдегидрогеназа и ацетолактатсинтаза).

O₂ специфические гены/белки

В эту группу входят 44 гена с ДЭ ≥ 5 , из них 42 кодируют белки.

Эта группа генов включает два протяженных предполагаемых оперона. Один из них, включающий пять генов (AAX72_RS03140–AAX72_RS03160), объединяет гены пуринового и пиримидинового метаболизма. Другой, содержащий 15 генов (AAX72_RS01100–AAX72_RS01170), определяет биосинтез длинноцепочечных жирных кислот. В эту группу входит также ряд белков метаболизма углеводов ($N = 10$), в том числе белки фосфокеталазного пути (лактатдегидрогеназа, глюкокиназа, фруктозопермеаза), маннитолдегидрогеназа, белки, осуществляющие импорт пептидов, аминокислот и сахаров.

ОБСУЖДЕНИЕ

Судя по числу и значениям ДЭГ, оба окислителя оказывают сильное действие на штамм, увеличивая или снижая экспрессию генов. 315 генов (33% для H₂O₂ и 46% для O₂) изменяют экспрессию при действии обоих окислителей. Такой общий ответ на действие различных стрессовых факторов неоднократно отмечался для других лактобацилл [21, 22] и объясняет перекрестную адаптацию лактобацилл к различным стрессовым факторам [23, 24].

Нужно отметить, что среди генов с ДЭ есть большое число генов с неизвестными функциями. 34% белков, соответствующих генам с ДЭ ≥ 5 для H₂O₂ и 19% для O₂, не могут быть отнесены к конкретной COG-категории (рис. 3).

Гены белков, отнесенных к АО, в подавляющем большинстве увеличивают экспрессию; при действии перекиси активируется значительно большее число таких генов, чем при действии кислорода.

Гены/белки, активизирующиеся при действии обоих окислителей, это стрессовые белки, белки АО защиты, белки репарации белков и нуклеотидов, белки клеточной стенки. Также активизируются гены транспорта и метаболизма углеводов, белки, входящие в катаболические пути запасания энергии.

Разделение генов/белков с ДЭ по COG-категориям различно для двух стрессовых факторов. Под действием перекиси усиливается экспрессия генов репарации, шаперонов, защитных механизмов, биогенеза клеточной стенки. При действии кислорода усиливается экспрессия большого числа генов транспорта и метаболизма липидов и углеводов.

При действии перекиси активизируется транскрипция в основном белков защиты: белков стрессового ответа и молекулярных шаперонов, антиоксидантных белков, белков репарации ДНК, белков, участвующие в формировании клеточной стенки, которые также выполняют защитную функцию. Необычным следует отметить факт увеличения экспрессии пяти генов, чья активность связана с поглощением и метаболизмом пектина. В стрессовых условиях активизируются нестандартные пути метаболизма углеводов – в данном случае можно предположить использование катаболизма пектина как источника энергии.

Кислород активизирует оперон генов пуринового и пиримидинового метаболизма. Возможно, соответствующие ферменты вовлекаются в нуклеотидный (salvage, реутилизационный) путь, когда биологические продукты образуются из промежуточных продуктов деградации [25]. Кроме того, в необычных условиях бактерии могут использовать нуклеозиды как источники углерода и

энергии [26]. Другой активируемый оперон кодирует гены синтеза жирных кислот. Первичная роль бактериальных жирных кислот состоит в том, что они являются гидрофобными компонентами мембранных липидов. Кроме того, жирные кислоты являются энергетическим депо, при их расщеплении выделяется больше энергии на грамм вещества, чем при разложении глюкозы [27]. Индукция синтеза жирных кислот отмечалась при действии на клетки штамма *L. brevis* ATCC367 н-бутанола [28]. В целом в аэробных условиях в значительной степени активизируются гены, определяющие белки преобразования энергии (использование в качестве источника энергии, помимо глюкозы, фруктозы, жирных кислот, нуклеозидов; белки фосфокетолазного пути) и импорта пептидов, аминокислот, сахаров.

Сравнение с другими работами осложнено тем, что экспрессия генов зависит от многих факторов: стадии роста культуры, способа применения оксиданта, выбранного вида и даже штамма бактерий [29]. Поэтому можно говорить только об общих закономерностях реакции лактобацилл на действие оксидантов. В ответе *Limosilactobacillus reuteri* на действие перекиси водорода отмечалась активизация генов белков-АО, белков защиты от повреждений, вызываемых перекисью (метионинсульфоксидредуктаза), белков репарации ДНК и транспорта металлов [21]. При действии перекиси на штамм *Lactiplantibacillus plantarum* CAUN2 также увеличивалась экспрессия генов белков-АО, систем репарации ДНК и белков шаперонов [30]. У штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21 под действием перекиси увеличивалась экспрессия генов стрессового ответа, метионинсульфоксидредуктаз, полифосфаткиназы, синтеза ряда аминокислот, фосфотрансферазных систем транспорта сахаров [31]. В большинстве работ отмечается увеличение экспрессии генов стрессового ответа, белков-АО, белков репарации ДНК и белков. В аэробных условиях у штамма *L. plantarum* WCFS1 отмечается увеличение экспрессии генов пируватдегидрогеназного и малатдегидрогеназного путей [32]. У штамма *Lentilactobacillus buchneri* CD034 в аэробных условиях увеличена экспрессия генов глутатионредуктазы, пероксидазы, шаперонов, пируватоксидаз, лактатоксидазы, генов семейства короткоцепочечных алкогольдегидрогеназ [33]. Наряду с изменением экспрессии генов стрессового ответа и белков-АО отмечается изменение экспрессии генов энергетических процессов. Однако в случае каждого конкретного штамма активизируются специфические гены, т.е. ответ бактериальной клетки на стресс достаточно индивидуален.

Суммируя, можно заключить, что действие перекиси водорода и кислорода на штамм *L. brevis*

47f активизирует экспрессию как общих генов, так и специфических для каждого оксиданта. При действии перекиси в основном активизируются гены защитных механизмов, при действии кислорода – в основном гены, связанные с выработкой и преобразованием энергии.

Полученные в настоящей работе результаты будут использованы нами при интегрированном анализе совокупности транскриптомных, протеомных и метаболомных данных по данному штамму. Это внесет значительный вклад в создание на основе *L. brevis* 47f фармабиотика для лечения различных воспалительных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-54-18006. Участие В.Н. Даниленко и Е.У. Полуэктовой финансировалось также в рамках госзадания № 0092-2022-0003.

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. Feyereisen M., Mahony J., Kelleher P. et al. Comparative genome analysis of the *Lactobacillus brevis* species // BMC Genomics. 2019. V. 20. № 1. Article 416. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5783-1>
2. Kim K.T., Yang S.J., Paik H.D. Probiotic properties of novel probiotic *Levilactobacillus brevis* KU15147 isolated from radish kimchi and its antioxidant and immune-enhancing activities // Food Sci. Biotechnol. 2021. V. 30. P. 257–265. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00853-0>
3. Stankovic M., Veljovic K., Popovic N. et al. *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 and *Lb. plantarum* BGPKM22 exhibit anti-inflammatory effect by attenuation of NF- κ B and MAPK signaling in human bronchial epithelial cells // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 10. <https://doi.org/10.3390/ijms23105547>
4. Kumar S., Praneet N.S., Suchiang K. *Lactobacillus brevis* MTCC 1750 enhances oxidative stress resistance and lifespan extension with improved physiological and functional capacity in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16 pathway // Free Radic. Res. 2022. V. 56. № 7–8. P. 555–571. <https://doi.org/10.1080/10715762.2022.2155518>
5. Danilenko V., Devyatkin A., Marsova M. et al. Common inflammatory mechanisms in COVID-19 and Parkinson's diseases: The role of microbiome, probiotics and postbiotics in their prevention // J. Inflamm. Res. 2021. V. 14. P. 6349–6381. <https://doi.org/10.2147/JIR.S333887>

6. Yunes R.A., Poluektova E.U., Belkina T.V., Danilenko V.N. Lactobacilli: Legal regulation and prospects for new generation drugs // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. P. 652–664.
<https://doi.org/10.1134/S0003683822050179>
7. Sporer A.J., Kahl L.J., Price-Whelan A., Dietrich L.E.P. Redox-based regulation of bacterial development and behavior // *Ann. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 777–797.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044453>
8. Zotta T., Parente E., Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: Impact on stress response and potential applications in the food industry // *J. Appl. Microbiol.* 2017. V. 122. № 4. P. 857–869.
<https://doi.org/10.1111/jam.13399>
9. Zotta T., Ricciardi A., Ianniello R.G. et al. Aerobic and respirative growth of heterofermentative lactic acid bacteria: A screening study // *Food Microbiol.* 2018. V. 76. P. 117–127.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.017>
10. Bryukhanov A.L., Klimko A.I., Netrusov A.I. Antioxidant properties of lactic acid bacteria // *Microbiology.* 2022. V. 91. P. 463–478.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722601439>
11. Yunes R.A., Poluektova E.U., Dyachkova M.S. et al. GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota // *Anaerobe.* 2016. V. 42. P. 197–204.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.011>
12. Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. № 2. Article 27.
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2410-2>
13. Marsova M., Odorskaya M., Novichkova M. et al. The *Lactobacillus brevis* 47f strain protects the murine intestine from enteropathy induced by 5-fluorouracil // *Microorganisms.* 2020. V. 8. № 6.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060876>
14. Olekhovich E.I., Batotsyrenova E.G., Yunes R.A. et al. The effects of *Levilactobacillus brevis* on the physiological parameters and gut microbiota composition of rats subjected to desynchronization // *Microbial. Cell Factories.* 2021. V. 20. Article 226.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01716-x>
15. DeMan J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // *J. Appl. Microbiol.* 1960. V. 23. № 1. P. 130–135.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
16. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 15. P. 2114–2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
17. Kim D., Paggi J.M., Park C. et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. № 8. P. 907–915.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
18. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools // *Gigascience.* 2021. V. 10. № 2.
<https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
19. Putri G.H., Anders S., Pyl P.T. et al. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0 // *Bioinformatics.* 2022.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac166>
20. Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic Lactobacilli and bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 10.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9101340>
21. Basu Thakur P., Long A.R., Nelson B.J. et al. Complex responses to hydrogen peroxide and hypochlorous acid by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // *mSystems.* 2019. V. 4. № 5.
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00453-19>
22. Zhang C., Gui Y., Chen X. et al. Transcriptional homogenization of *Lactobacillus rhamnosus* hsrlyfm 1301 under heat stress and oxidative stress // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. № 6. P. 2611–2621.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10407-3>
23. Huang R., Pan M., Wan C. et al. Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress // *J. Dairy Sci.* 2016. V. 99. № 2. P. 1002–1010.
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9993>
24. Zhang C., Lu J., Yang D. et al. Stress influenced the aerotolerance of *Lactobacillus rhamnosus* hsrlyfm 1301 // *Biotechnol. Lett.* 2018. V. 40. P. 729–735.
<https://doi.org/10.1007/s10529-018-2523-6>
25. Kilstrup M., Hammer K., Jensen P.R., Martinussen J. Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. V. 29. № 3. P. 555–590.
<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.006>
26. Tozzi M.G., Camici M., Mascia L. et al. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism // *FEBES J.* 2006. V. 273. № 6. P. 1089–1101.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05155.x>
27. De Carvalho C.C.C.R., Caramujo M.J. The various roles of fatty acids // *Molecules.* 2018. V. 23. № 10.
<https://doi.org/10.3390/molecules231025832018>
28. Winkler J., Kao K.C. Transcriptional analysis of *Lactobacillus brevis* to N-butanol and ferulic acid stress responses // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021438>
29. Maresca D., Zotta T., Mauriello G. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00157>
30. Zhai Z., Yang Y., Wang H. et al. Global transcriptomic analysis of *Lactobacillus plantarum* CAUH2 in response to hydrogen peroxide stress // *Food Microbiol.* 2020. V. 87.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103389>
31. Полуэктова Е.У., Мавлетова Д.А., Одорская М.В. и др. Сравнительный геномный, транскриптомный и

- протеомный анализ штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21, перспективного для создания фармацевтики // Генетика. 2022. Т. 58. № 9. С. 1029–1041.
<https://doi.org/10.31857/S0016675822090120>
32. Stevens M.J.A., Wiersma A., de Vos W.M. et al. Improvement of *Lactobacillus plantarum* aerobic growth as directed by comprehensive transcriptome analysis // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 15. P. 4776–4778.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00136-08>
33. Eikmeyer F.G., Heint S., Marx H. et al. Identification of oxygen-responsive transcripts in the silage inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 by RNA sequencing // PLoS One. 2015. V. 10. № 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134149>

Transcriptomic Analysis of the *Levilactobacillus brevis* 47f Strain under Oxidative Stress

E. U. Pouektova^a, *, O. V. Averina^a, A. S. Kovtun^a, and V. N. Danilenko^a

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

*e-mail: epolu@vigg.ru

Levilactobacillus brevis 47f is a heterofermentative aerotolerant lactic acid bacterium isolated from the microbiota of the gastrointestinal tract of a healthy person. Previously, the strain showed anti-inflammatory properties and protects the murine intestine from enteropathy induced by 5-fluorouracil as part of preclinical studies. At the same time, the molecular mechanisms that account for the properties of the strain and its response to the action of reactive oxygen species, remain unexplored. The aim of this work was to study the response of the strain to the action of oxidizing agents – hydrogen peroxide and oxygen – using the method of transcriptional RNAseq analysis. Both oxidants exhibited a strong effect on the strain, increasing or decreasing the expression of several hundred genes – both general and specific for each oxidant. The characteristics of proteins whose expression was increased the most ($DE \geq 5$) are provided. The genes activated under the action of both oxidants encode proteins related to stress, antioxidant activity, protein and nucleotide repair, cell wall, carbohydrate transport and metabolism, and catabolic energy storage pathways. Peroxide mainly activated the transcription of defense proteins, namely, stress response and molecular chaperones, antioxidant activity, DNA repair, and proteins involved in the formation of the cell wall. Under aerobic conditions, the genes that encode proteins involved in energy conversion (the use of fatty acids, nucleosides, fructose in addition to glucose as an energy source; proteins of the phosphoketolase pathway) and the import of peptides, amino acids, and sugars, were activated to a large extent. The data obtained in this work will be used by us to conduct an integrated analysis of transcriptomic, proteomic, and metabolomic data derived from this strain. This will make a significant contribution to the creation of a probiotic based on *L. brevis* 47f for the treatment of various inflammatory diseases.

Keywords: transcriptomic analysis, *Levilactobacillus brevis*, hydrogen peroxide, aerobic growth.

**РЕАКЦИЯ ШТАММА *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697
НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС**

© 2023 г. О. В. Аверина^{1, *}, А. С. Ковтун¹, Д. А. Мавлетова¹, Р. Х. Зиганшин², В. Н. Даниленко¹

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

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: olgavr06@mail.ru

Поступила в редакцию 20.02.2023 г.

После доработки 14.03.2023 г.

Принята к публикации 15.03.2023 г.

Бифидобактерии являются преобладающей популяцией в микробиоте кишечника человека. Несмотря на растущее число данных о полезных свойствах бифидобактерий для здоровья человека, знаний об их антиоксидантном потенциале по-прежнему недостаточно. Роль антиоксидантного потенциала бифидобактерий в поддержании гомеостаза микробиоты кишечника организма хозяина в целом – важнейшая задача, требующая решений. Впервые представлены результаты геномного, транскриптомного и протеомного анализов штамма *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 после действия окислительного стресса. Растущую культуру штамма подвергали воздействию перекиси водорода в течение двух часов и кислорода в течение двух и четырех часов. Предварительный анализ генома штамма показал наличие 17 генов, кодирующих белки с известной антиоксидантной функцией, как и в других геномах *B. longum* subsp. *infantis*, доступных в международной базе данных NCBI. Полнотранскриптомный анализ выявил увеличение уровней транскриптов более чем в 2 раза для шести генов с известной антиоксидантной функцией. Данные количественного протеомного анализа показали повышение уровней белков более чем в 2 раза для пяти ферментов с известной антиоксидантной функцией. Более 28 других белков с повышенными уровнями более чем в 2 раза были идентифицированы в клетках растущей культуры штамма в ответ на продолжительное действие кислорода. Эти белки могут быть вовлечены в процессы ответа клетки на стресс, метаболизм аминокислот, нуклеотидов и в транспортные процессы. В клетках после действия стресса выявлен высокий уровень у шести белков с неизвестными функциями, которые могут играть значимую роль в антиоксидантной защите анаэробных бифидобактерий. Полученные данные предполагается применить при отборе штаммов *B. longum* subsp. *infantis* и создании на их основе пробиотиков, способных корректировать состав микробиоты.

Ключевые слова: бифидобактерии, геномный анализ, транскриптомный анализ, протеомный анализ, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0016675823080039, **EDN:** XSJCWK

Род *Bifidobacterium* является одной из преобладающих бактериальных популяций в микробиоте кишечника человека. Их положительная функциональная роль для здоровья человека хорошо охарактеризована [1]. Количество бифидобактерий у младенцев, родившихся вагинальным путем и находящихся на грудном вскармливании, составляет 90% от общей микробиоты кишечника. Далее количество бифидобактерий в толстой кишке взрослых снижается до 5% и еще больше снижается у пожилых людей [2]. Одним из важных свойств бифидобактерий является устойчивость к действию оксидантов и активных форм кислорода (АФК) и способность к повышению антиоксидантного (АО) и противовоспалительного статуса организма хозяина [3–5].

Бифидобактерии – грамположительные микроорганизмы из класса Actinobacteria с высоким содержанием G+C. Как и большинство бактерий толстой кишки, бифидобактерии – строгие анаэробы, поэтому кислород может быть важным фактором стресса, с которым им надо справляться. Известно, что воздействие кислорода вызывает накопление АФК, главным образом H₂O₂, которые могут вызывать вредные эффекты, включая неправильное свертывание и агрегацию белков, повреждение ДНК и перекисное окисление липидов, что приводит к гибели клеток. Многочисленные *in vivo* и *in vitro* исследования продемонстрировали, что бифидобактерии и их клеточные компоненты обладают АО способностью, которая обеспечивает определенную степень защиты

от окислительного повреждения как их собственных клеток, так и клеток их хозяев [5]. Бифидобактерии могут проявлять АО активность посредством различных механизмов: хелатирования токсичных ионов (Fe_2^+ и Cu_2^+); синтеза АО-ферментов, пептидов и тиолов; соединений со свойствами АО [5]. Однако АО активность специфична для штамма и не является общей даже для вида [6, 7]. Ранее проведенные исследования выявили у штаммов *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* чувствительность к кислороду (растут в присутствии 5% O_2 в жидкой культуре), у *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* и *Bifidobacterium adolescentis* гиперчувствительность к кислороду (рост ингибируется в условиях 5% O_2) [8]. Однако было показано, что штаммы *B. longum*, *B. infantis* способны к росту при периодическом встряхивании на качалке [9]. Анализ последовательности геномов *B. longum* показал отсутствие генов для NADH-пероксидазы или супероксиддисмутазы, хотя имеется гомолог для NADH-оксидазы [10]; присутствуют гены, кодирующие ферменты, уменьшающие окислительное повреждение, а именно алкилгидропероксидредуктазу (*ahpC*) [11], тиоредоксинредуктазу [12] и другие [5].

В последние годы наблюдается растущий интерес к бифидобактериям в качестве препаратов для лечения и профилактики различных заболеваний, сопровождаемых развитием окислительного стресса. Это определяет увеличение спроса к использованию бифидобактерий в качестве фармабиотиков, биологически активных добавок и в составе функциональных продуктов питания.

Успешное применение бифидобактерий зависит не только от научных исследований их свойств, которые демонстрируют эффективность в обеспечении пользы для здоровья человека, но и от разработки технологий, обеспечивающих выживание в больших количествах во время производственного культивирования и поддержание во время длительного хранения [13]. Повреждение клеток АФК является одной из основных причин потери жизнеспособности анаэробных пробиотиков, таких как бифидобактерии, и поэтому оказывает большое влияние на их коммерческое применение.

Несмотря на растущее число исследований полезной функциональности бифидобактерий для здоровья человека [14], знаний об их АО потенциале все еще недостаточно. В связи с этим в ближайшем будущем следует уделять все больше внимания изучению ответа бифидобактерий на окислительный стресс (ОС). В настоящей работе впервые представлены результаты геномного, транскриптомного и протеомного анализов штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. Штамм выделен из кишечника ребенка, его геном секвенирован и хорошо описан [15]. Бактерии *B. longum* subsp. *in-*

fantis являются подвидом вида *Bifidobacterium longum* — наиболее распространенного и стабильного на протяжении жизни человека. Для понимания механизма АО защиты клеток *B. longum* subsp. *infantis* на ОС мы изучали растущую культуру штамма при действии перекиси водорода в течение двух часов и кислорода в течение двух и четырех часов. Бактерии *B. longum* subsp. *infantis* являются доминирующими в бифидофлоре кишечника детей раннего возраста, находящихся на грудном вскармливании [16], поэтому углубление знаний об АО защите как самих клеток бифидобактерий, так и их хозяина имеет большое значение для будущей разработки стратегий для выживания в составе микробиоты младенца. Полученные данные предполагается применить при отборе штаммов *B. longum* subsp. *infantis* и создании на их основе фармабиотиков, способных корректировать состав микробиоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, среды, условия культивирования

Культуру штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 из коллекции лабораторных культур выращивали при 37°C в бульоне Mann Rogosa Sharp (MRS) с добавлением 0.05% L-цистеина HCl в анаэробных условиях в анаэроостате HiAnaerobic System-MarkIII, HiMedia (Индия).

Воздействие на культуру B. infantis окислительного стресса

Культуру выращивали в жидкой среде MRS с цистеином до середины экспоненциальной фазы роста (OD_{600} 0.5–0.6) в анаэробных условиях при 37°C. Контрольную часть культуры отбирали до окислительного стресса и через 2 ч инкубации в анаэробных условиях. Для эксперимента культуру после центрифугирования (при 28°C и 7500 об./мин) и замены среды с цистеином на среду без него разделяли на три части: две части культивировали на качалке при 250 об./мин и 37°C в течение двух и четырех часов, в одну часть добавляли H_2O_2 до 1 мм и инкубировали при 37°C в аэробных условиях в течение двух часов.

Выделение мРНК и дальнейшее секвенирование

Клетки из культуральной жидкости (10^8 кое/мл) собирали центрифугированием (1 мин 12000 об./мин) и осадок ресуспендировали в 100 мкл GE-буфера (30 mM Tris HCl, 1 mM этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), pH 8.0) с добавлением лизосима (20 мг/мл) и инкубировали в течение 10 мин при 37°C. К суспензии добавляли 350 мкл буфера для лизиса (4.5 mM гуанидин/HCl, 50 mM Tris HCl, 30% Тритон X-100, pH 6.6). Клетки разруша-

ли механическим путем с шариками кремнезема (диаметром 150–212 мкм) на приборе Speed Mill plus (Analytik jena, Германия). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы с РНК обрабатывали DNaseI для разрушения остатков ДНК. Чистота образцов РНК тестировалась на приборе Nano Drop™. С помощью биоанализатора Agilent 2100 (AgilentRNA 6000 NanoKit) в образцах было определено общее количество РНК, RIN, 23S/16S. Образцы РНК были обработаны набором Ribo-off rRNA Depletion Kit (Bacteria) для удаления рРНК (16S и 23S), сохраняя мРНК. Далее библиотеки для секвенирования были подготовлены набором MGIEasy RNA Directional Library Prep Set по протоколу производителя. Полученная одноцепочечная кольцевая ДНК (ssCirDNA) была синтезирована как окончательная библиотека. Библиотека была амплифицирована с помощью полимеразы phi29 для получения ДНК-шариков. Они были загружены в наночип для парноконцевого секвенирования длиной 100 пн на платформе DNBseq(BGI). Секвенированные образцы транскриптома были проанализированы на наличие ошибок прочтения с использованием FastQC v 0.11.5 [17]. Качество секвенирования улучшалось с помощью Trimmomatic v0.39 [18].

Каталог ортологов генов, кодирующих продукты с антиоксидантной активностью

Составляли список антиоксидантов, продуцируемых бактериями рода *Bifidobacterium*. Затем выполняли поиск референсных аминокислотных последовательностей к генам, ответственных за метаболизм выбранных антиоксидантов. Выбирались только последовательности, экспериментально подтвержденные в исследовательских работах. Затем эти референсные последовательности были использованы для поиска ортологов у бактерий вида *B. longum* с использованием BLAST [19] и базы данных NCBI Protein2022.

Анализ геномов *B. longum* subsp. *infantis*

Для анализа распространения генов из каталога ортологов среди бактерий *B. longum* subsp. *infantis* из базы данных NCBI Assembly были загружены опубликованные геномные сборки. Использовались только геномы со статусом сборки “полный”. Для идентификации гомологов генов из референсного каталога использовали программу blastx. Пороги для фильтрации выравниваний: минимальная идентичность 60%, минимальная относительная длина выравнивания 80%.

Анализ экспрессии генов антиоксидантов

Анализ уровней экспрессии генов, ответственных за антиоксидантные свойства, в секвенированных образцах штамма проводили с использованием собранного каталога ортологов. Чтения транскриптома были картированы на аминокислотные последовательности с помощью DIAMOND v2.0.13 [20]. Выравнивания были отфильтрованы с помощью пользовательских скриптов, написанных на языке программирования Perl, по следующему пороговому значению: идентичность $\geq 60\%$ и относительная длина выравнивания $\geq 90\%$. Множественные выравнивания были отфильтрованы. После этого количество чтений, выровненных с каждым геном, было подсчитано и нормализовано.

Анализ полного транскриптома

Эталонные геномы и их аннотации из базы данных RefSeq были загружены по соответствующим идентификаторам для *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 GCF_001010995.1. Далее использовали hisat2 v2.2.1 [21] для картирования проверенных на качество транскриптомных чтений секвенированных образцов. Картирования были отфильтрованы с помощью программного пакета SAMtools v1.10 [22]. Количество чтений на транскрипт оценивалось с помощью HTSeq-count v2.0.2 [23].

Пробоподготовка образцов для хромато-масс-спектрометрического анализа

Клетки штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 выращивали в среде MRS до экспоненциальной фазы роста (OD_{600} 0.5–0.6). Клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 7000 об./мин в течение 30 мин, при 4°C. Осадок клеток трижды промывали раствором PBS, pH 7.4. Далее клетки ресуспендировали в растворе PBS, pH 7.4, предварительно преинкубируя при 95°C в течение 20 мин в соотношении 1 : 10. Затем клетки инкубировали при 95°C в течение 10 мин. Клетки лизировали с использованием ультразвукового дезинтегратора VibraCell™ Ultrasonic Processor (Sonics, США) при частоте 20 кГц трижды по 15 с с интервалом между обработками 10 с при 4°C. Обломки клеточных стенок отделяли центрифугированием при 17000 об./мин в течение 20 мин при 4°C. Концентрацию белков определяли на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США) согласно рекомендации производителя.

Гидролиз белков трипсином

Аликвоты растворов лизатов клеток, содержащие 20 мкг белка, высушивали досуха на центрифужном вакуумном концентраторе SpeedVac (Savant, Франция) и растворяли в 20 мкл буферного раствора, содержащего 100 мМ Трис pH 8.5, 1%

дезаксихолата натрия, 10 мМ ТСЕР (Tris (2-carboxyethyl) phosphine) и 20 мМ 2-САО (2-хлороацетамид), прогревали в течение 20 мин при 85°C, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 0.4 мкг трипсина в 10 мкл 100 мМ Трис рН 8.5 и оставляли инкубироваться при 37°C на ночь. По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли равный объем 2% ТФУ и пептиды обессоливали на микроколонке SDB-RPS Stage Tip, изготовленной из наконечника для автоматической пипетки на 200 мкл и трех кусочков мембраны SDB-RPS (3М, США), вырезанных иглой калибром 16 [24]. Раствор пептидов наносили на микроколонку центрифугированием при 300 g, промывали смесью растворителей 50 мкл 1% ТФУ: 50 мкл этилацетата (3 раза), 50 мкл 0.2% ТФУ и элюировали 50 мкл раствора, содержащего 5% гидроксида аммония и 80% ацетонитрила в воде. Элюат высушивали досуха и хранили при –80°C. Перед анализом пептиды растворяли в 40 мкл раствора, содержащего 0.1% ТФУ и 2% ацетонитрила в воде.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Образцы загружали на изготовленную предколонку 50 × 0.1 мм, упакованную сорбентом Inertsil ODS3 3 μm (GLSciences), в растворе, содержащем 2% ацетонитрила, 98% H₂O, 0.1% ТФУ, при скорости потока 10 мкл/мин и разделяли при комнатной температуре на колонке из плавленного кварца 300 × 0.1 мм с эмиттером, изготовленной на приборе P2000 Laser Puller (Sutter, USA) и упакованной сорбентом Reprosil PURC18AQ 1.9 (Dr. Maisch). Обращенно-фазную хроматографию проводили на хроматографе Ultimate 3000 Nano LC System, соединенном с масс-спектрометром QExactive Plus Orbitrap mass spectrometer посредством наноэлектроспрейного источника. Для хроматографического разделения пептидов использовали систему растворителей А (99.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты) и Б (19.9% воды, 0.1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила). Пептиды элюировали с колонки линейным градиентом: 3% Б 3 мин, 3–6% Б 2 мин, 6–30% Б 50 мин, 30–55% Б 10 мин, 55% Б 2 мин, 55–99% Б 0.1 мин, 99% Б 2 мин, 3–99% Б 0.1 мин при скорости потока 500 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме DDA (TopN=10) со следующими настройками прибора: MS1 сканирование: разрешение 70000, диапазон сканирования 200–1600 *m/z*, максимальное время инъекции ионов – 35 мс, уровень АГС – 3 × 10⁶; MS2 сканирование: разрешение 17500, HCD фрагментация с энергией 30%, максимальное время инъекции ионов – 80 мс, уровень АГС – 1 × 10⁵.

Анализ масс-спектрометрических данных

Масс-спектрометрические данные анализировали при помощи компьютерной программы Peaks studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc.) [22, 25]. Идентификацию белков проводили посредством корреляции тандемных масс-спектров с базой данных белковых последовательностей *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 Uniprot (19.09.2022) со следующими параметрами: постоянная модификация Cys – карбамидометилирование, переменные модификации – деамидирование Asn/Gln и окисление Met, допустимый уровень ложноположительных идентификаций пептидов – 0.01 (определялся по реверсной базе данных аминокислотных последовательностей), специфичность протеазы – С-конец Arg и Lys (при поиске в базе данных допускалось до двух пропущенных сайтов гидролиза). При идентификации пептидов допускалось отклонение экспериментально полученной массы пептида от его теоретической массы до 10 млн долей, а отклонение массы фрагментов – до 0.05 Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Геномный анализ антиоксидантного потенциала бактерий *B. longum* subsp. *infantis*

Ферменты и другие клеточные соединения и метаболиты, отвечающие на действие окислительного стресса у представителей вида *B. longum*, были отобраны после анализа доступных опубликованных данных и представлены в обзорной статье [5]. К генам, подобранным к белкам с выявленной антиоксидантной функциональностью, были подобраны ортологи. Ортологи выявляли как описано в разделе “Материалы и методы” в геномах видов бифидобактерий – комменсалов кишечника человека. Аминокислотные последовательности отобранных ортологов собраны в каталог, который включал 203 последовательности для 27 белков (табл. S1). Аминокислотные последовательности ортологов в FASTA формате доступны в базе данных на сайте <https://github.com/Alexey-Kovtun/Catalog>. Затем было проанализировано наличие генов из каталога в полных геномах различных штаммов подвида *B. infantis*. Данные о наличии в геномах различных штаммов подвида *B. longum* subsp. *infantis* 17 генов, кодирующих субъединицу С алкилгидропероксидредуктазы (*ahpC*), субъединицу F алкилгидропероксидредуктазы (*ahpF*), пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктазу класса I, оксидоредуктазу DSBA, дигидрооротатдегидрогеназу, глутаредоксин (*grxC2*), глутатион АТФ-связывающий белок (*gsiA*), изомеразу линолевой кислоты, NADH-оксидазу, АТФазу Р-типа, пермеазу, пероксиредоксин, белок с доменом тиоредоксина, тиоредоксинпероксидазу, тиоредоксинредуктазу, сериновую протеазу, представлены в табл. S2. Эта таблица включает данные по геному

штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, у которого также выявлено присутствие этих генов, кроме гена, кодирующего сериновую протеазу.

Для определения функциональности выявленных генов и других генов с антиоксидантными свойствами был проведен общий транскриптомный анализ растущей культуры штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, подвергнутой воздействию H_2O_2 и кислорода.

Транскриптомный анализ антиоксидантного ответа штамма B. longum subsp. infantis ATCC 15697

Для полного транскриптомного анализа использовали культуру штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 в фазе экспоненциального роста, которую подвергали воздействию перекиси водорода в течение двух часов и кислорода в течение двух и четырех часов. Эти условия были использованы для приближения к среде обитания бифидобактерий в кишечном тракте с возможным окислительным стрессом во время воспалительных процессов или во время промышленных процессов производства бактериального препарата.

Общую РНК выделяли из культуральных клеток, отобранных до (контроль) и после воздействия окислительного стресса, и секвенировали на устройстве DNBSEQ System после подготовки образца. Образцы транскриптома штамма *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 были секвенированы как парные концевые считывания длиной 100 пн. Полные параметры образцов представлены в табл. S3. Процедура проверки качества показала, что образцы подходят для анализа и их размеры не сильно уменьшились после обрезки. Общий объем данных почти равномерно распределен по выборкам. Транскриптомные считывания были выровнены по справочному каталогу с помощью DIAMOND и отфильтрованы, как описано в разделе “Материалы и методы”. Количество оставшихся прочтений, использованных для оценки уровней экспрессии, составило 466051, 439089, 316276, 523810 и 375600. Транскриптомные чтения были нанесены на карту генома *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 с использованием HTSeq-2. Общее количество чтений, использованных для дальнейшей оценки уровней экспрессии, составило 28334402 (контроль 1), 28733996 (контроль 2), 27525358 (H_2O_2 – 2 ч), 28459072 (O_2 – 2 ч) и 26529750 (O_2 – 4 ч).

Общее количество генов с идентифицированными транскриптами составило 2647. Из них увеличение уровней более чем в 2 раза было обнаружено для транскриптов 243 генов в ответ на H_2O_2 , 67 генов в ответ на действие O_2 в течение двух часов и 99 генов в ответ на действие O_2 в течение четырех часов. Используя каталог ортологов для по-

иска генов, кодирующих продукты с антиоксидантным действием, среди транскриптов было выявлено шесть различных генов, которые представлены в табл. 1. В основном окислительный стресс повлиял на увеличение уровней транскриптов более чем в 2 раза для генов, кодирующих белок с доменом тиоредоксина, тиоредоксинредуктазу, АТФазу Р-типа, изомеразу линолевой кислоты и пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктазу класса I. Транскрипты генов, кодирующих тиоредоксинредуктазу, были увеличены в 9.27 раз после воздействия H_2O_2 и в 2.13 раза после действия O_2 в течение четырех часов инкубации. Транскрипты для белка с тиоредоксиновым доменом увеличены в 2.66 раз после воздействия H_2O_2 . Все стрессовые воздействия спровоцировали увеличение транскрипта АТФазы Р-типа в 19.92 раз при действии H_2O_2 , в 2.05 раз при действии O_2 в течение двух часов и 3.68 раз при действии O_2 в течение четырех часов инкубации. Транскрипты для гена, кодирующего изомеразу линолевой кислоты, были увеличены в 5.31 раз только при воздействии H_2O_2 . Транскрипты для гена, кодирующего пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктазу класса I, были увеличены в 2.4 и 1.71 раз и для гена пермеазы увеличены в 2.57 и 2.54 раз только при действии O_2 .

Для идентификации продуктов трансляции изучаемых генов в условиях окислительного стресса был проведен количественный протеомный анализ клеточной культуры штамма *B. infantis* ATCC 15697.

Количественный протеомный анализ антиоксидантного ответа культуры штамма B. infantis ATCC 15697

Для протеомного анализа также использовали растущую культуру штамма *B. infantis* ATCC 15697 в фазе экспоненциального роста, которую подвергали воздействию перекиси водорода в течение двух часов и кислорода в течение двух и четырех часов.

Белки выделяли из культуральных клеток, отобранных до (контроль) и после воздействия окислительного стресса, и изучали с помощью количественного протеомного анализа, описанного в разделе “Материалы и методы”. Volcano plot для белков *B. infantis* ATCC 15697 на рис. 1 показывает количество белков с выявленной разницей (увеличение или снижение) после действия окислительного стресса. Под действием H_2O_2 разница обнаруживается для двух белков, под действием O_2 в течение двух часов разница обнаруживается для шести белков и под действием O_2 в течение четырех часов разница обнаруживается для 63 белков. В дальнейшем анализ были включены только данные по увеличению количества белка более чем в 2 раза.

Таблица 1. Изменения уровней транскриптов генов, кодирующих продукты антиоксидантного ответа в *B. infantis* ATCC 15697, до и после действия окислительного стресса

Продукт гена	Locus_tag гена	*H ₂ O ₂ /контроль	*O ₂ 2 ч/контроль	*O ₂ 4 ч/контроль
Белок с доменом тиоредоксина	<i>BLON_RS01630</i>	2.66	1.06	1.79
Тиоредоксинредуктаза	<i>BLON_RS12925</i>	9.27	1.41	2.13
АТФаза Р-типа	<i>BLON_RS01320</i>	19.92	2.05	3.68
Изомераза линолевой кислоты	<i>BLON_RS04150</i>	5.31	1.47	0.79
Пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктаза класса 1	<i>BLON_RS08540</i>	0.83	2.4	1.71
Fe-пермеаза	<i>BLON_RS01040</i>	0.45	2.57	2.54

* – кратное отношение к содержанию в разных образцах до и после окислительного стресса.

Пять известных белков с АО функциональностью были идентифицированы в ответ на стресс (табл. 2). Повышенный уровень наблюдался у глутаредоксина (в 3.55 раз) только под действием кислорода в течение четырех часов инкубации. Однако уровень транскриптов гена, его кодирующего, был на низком уровне. АТФаза Р-типа и ферритин увеличивались после действия всех стрессовых факторов, как и их транскрипты (табл. 1 и 2). Количество Fe-пермеазы и субъединицы PdxT пиридоксаль-5'-фосфат синтазы увеличивается только при действии кислорода в 30.5 раз (2 ч), 24.7 раз (4 ч) и 3.3 раз (4 ч) соответственно.

Остальные 34 идентифицированных белка с повышенным уровнем в клетках после действия окислительного стресса выполняют различные функции, но в основном защитные.

При действии H₂O₂ было выявлено увеличение только для helix-turn-helix регулятора транскрипции в 5.26 раз, как и транскрипта в 9.6 раз; внеклеточных белков, связывающих растворенные вещества из семейства 1, в 4.35 раз с увеличением в уровне транскрипта в 21.44 раз, и из семейства 5 в 9.09 раз без выявленного увеличения транскриптов и одного белка с неизвестными функциями с увеличением в 25 раз и увеличением транскрипта в 30.15 раз. Действие O₂ в течение двух часов спровоцировало увеличение только одного белка с неизвестными функциями в 14.58 раза и увеличение транскрипта в 2.3 раза. Остальные белки увеличивались в уровне более чем 2 раза после длительного действия кислорода. Однако для большинства из них наблюдался низкий уровень транскрипции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из немногочисленных опубликованных данных для бифидобактерий были отобраны ферменты и другие соединения с АО действием и кодирующие их гены [5]. Был проведен поиск выявленных к ним ортологов в геномах штаммов подвида *B. longum* subsp. *infantis*. Изучение распре-

деления АО генов показало присутствие 17 в большинстве геномов, что указывает на их консервативность и, возможно, общие механизмы АО защиты у *B. longum* subsp. *infantis*. Однако у бифидобактерий была выявлена штаммоспецифичность в проявлении АО способности [5]. Возможно, в защите от окислительного стресса у бифидобактерий участвуют и другие неизвестные ферменты и метаболиты. Для определения функциональности выявленных в геномах АО генов и выявления новых генов, участвующих в ответе на окислительный стресс, мы применили комплексный подход с использованием омиксных технологий. Анализ общего транскриптома показал увеличение уровней транскриптов для шести генов, кодирующих известные АО белки. После действия всех окислительных факторов у *B. infantis* ATCC 15697 определен высокий уровень транскриптов гена, кодирующего АТФазу Р-типа. Сообщалось, что ген *zntA1*, кодирующий АТФазу Р-типа, был повышен в 2.01 раза после 60 мин воздействия кислорода у штамма *B. longum* BVMN68 [26]. АТФазы Р-типа могут быть вовлечены в перенос Mn²⁺, который затем удаляет супероксидные анионы в клетках бифидобактерий [12]. Mn²⁺ не только заменяет супероксиддисмутазу в удалении супероксидных анионов, но также может удалять H₂O₂ [27]. После действия H₂O₂ и O₂ повышается уровень тиоредоксинредуктазы и белка с доменом тиоредоксина. Гены, кодирующие глутаредоксин, тиоредоксин и тиоредоксинредуктазу, были повышены более чем в 6 раз за 60 мин при воздействии кислорода на штамм *B. longum* BVMN68 [26]. Тиоредоксин-зависимая восстановительная система играет важную роль в реакции на окислительный стресс путем непосредственного восстановления H₂O₂, удаления гидроксильных радикалов, подавления синглетного кислорода и поддержания внутриклеточного тиолдисульфидного баланса [28]. Действие кислорода оказало влияние на повышение уровня Fe-пермеазы. Fe-пермеазы в составе плазматической мем-

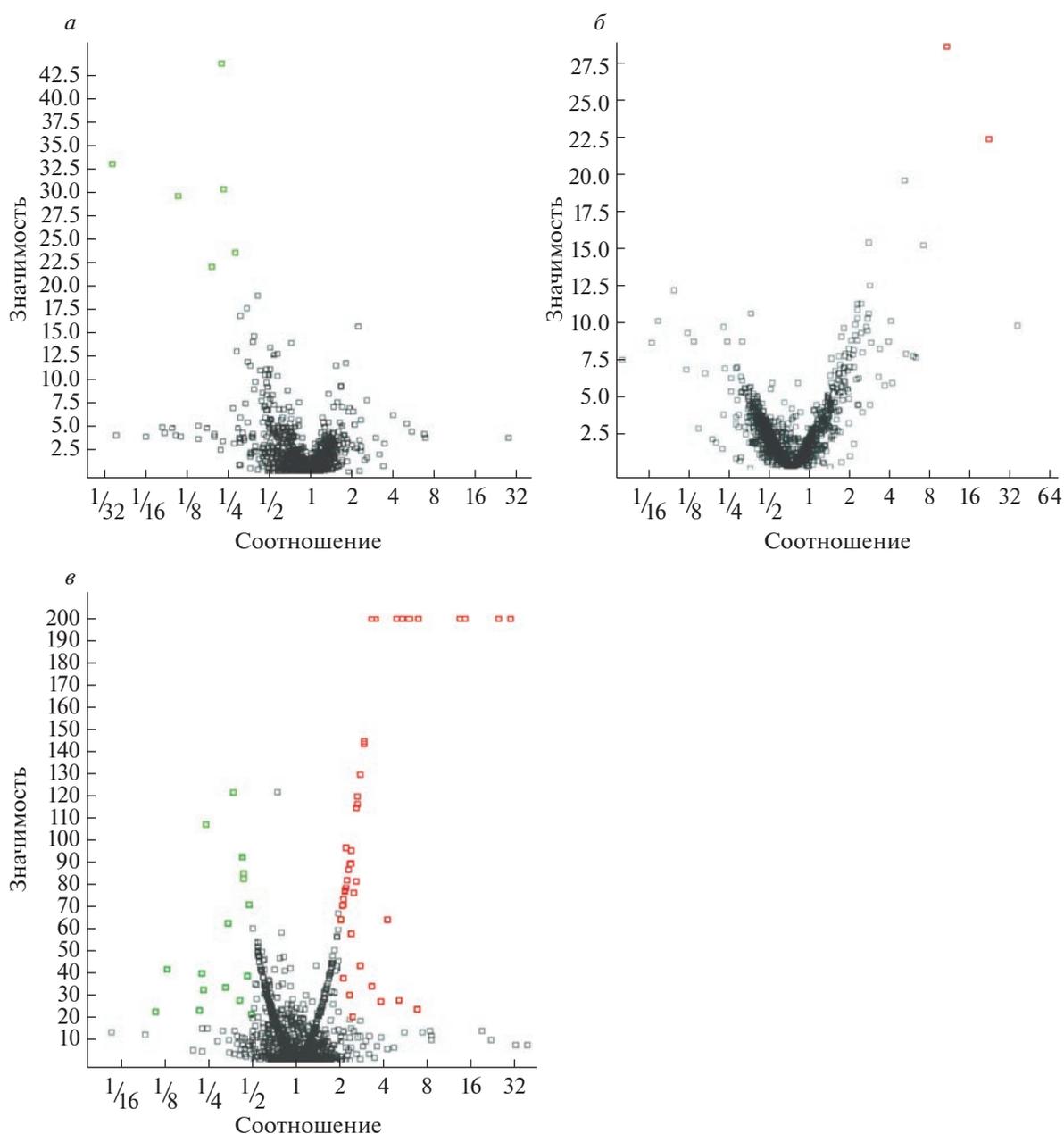


Рис. 1. Volcano plot для белков *B. infantis* ATCC 15697, индуцируемых действием: а – H₂O₂, б – O₂ в течение 2-часовой инкубации, в – O₂ в течение 4-часовой инкубации.

браны участвуют в переносе железа [29]. Значительное повышение уровня транскрипта гена, кодирующего изомеразу линолевой кислоты, было отмечено только после действия перекиси водорода. Конъюгированная линолевая кислота, образуемая некоторыми видами бифидобактерий, сама не обладает АО свойствами, однако ее метаболиты проявляют способность защищать клетки от вредного окислительного воздействия [30, 31]. После действия кислорода в клетках *B. infantis* ATCC 15697 был отмечен повышенный уровень транскрипта гена пиридиннуклеотид-дисуль-

фидоксидоредуктазы класса I. Известно, что этот фермент участвует в реакции клеток на окислительный стресс [11].

Количественный протеомный анализ позволил выявить и другие белки с АО функциями. После действия H₂O₂ возросло количество ферритина в 4.54 раз. Ферритин катализирует окисление ионов Fe²⁺ перекисью водорода, что предотвращает образование гидроксильного радикала по реакции Фентона [12]. На уровне трансляции так же, как и на уровне транскрипции, увеличивается

Таблица 2. Сравнительные данные протеомного и транскриптомного анализа клеток штамма *B. infantis* ATCC 15697 до и после воздействия окислительного стресса

Продукт гена	Locus_tag гена	H ₂ O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 4 ч/контроль
Антиоксидантный ответ				
Глутаредоксин	<i>BLON_RS12860</i>	NS	NS	3.55*
		0.49	1.55	1.05**
Ферритин	<i>BLON_RS00160</i>	4.54	NS	5.88
		21.61	1.70	3.57
Fe-пермеаза	<i>BLON_RS01040</i>	NS	30.50	24.70
		0.45	2.57	2.54
АТФаза Р-типа	<i>BLON_RS01320</i>	3.57	NS	2.10
		19.92	2.05	3.68
Пиридоксаль-5'-фосфатсинтаза субъединица <i>pdxT</i>	<i>BLON_RS10350</i>	NS	NS	3.30
		0.81	2.36	3.17
Ответ на стресс				
Внеклеточный лиганд-связывающий рецептор	<i>BLON_RS02930</i>	NS	NS	3.49
		0.35	1.0	1.58
Внеклеточный лиганд-связывающий рецептор	<i>BLON_RS03810</i>	NS	NS	2.18
		1.33	2.83	2.0
RelB-антитоксин	<i>BLON_RS01740</i>	NS	NS	2.98
		2.5	0.82	1.0
Фактор созревания рибосом <i>rimM</i>	<i>BLON_RS01970</i>	NS	NS	2.68
		0.66	1.0	1.27
Фактор элонгации транскрипции <i>greA</i>	<i>BLON_RS09225</i>	NS	NS	2.62
		1.68	1.95	2.3
Белок, содержащий домен FMN	<i>BLON_RS01070</i>	NS	NS	2.39
		1.56	1.0	0.36
Домен DnaJ белка теплового шока	<i>BLON_RS00750</i>	NS	NS	2.29
		10.3	0.8	4.2
Тирозин-тРНК-лигаза	<i>BLON_RS09710</i>	NS	NS	2.27
		0.91	0.57	0.54
Белок-шаперон ClpB	<i>BLON_RS12265</i>	NS	NS	2.18
		21.57	1.58	8.1
Эндорибонуклеаза L-PSP	<i>BLON_RS01645</i>	NS	NS	2.64
		0.59	1.75	2.5
Метаболизм аминокислот				
Альфа-субъединица триптофан-синтазы	<i>BLON_RS07130</i>	NS	NS	2.19
		0.63	2.1	2.0
Антранилатфосфорибозилтрансфераза	<i>BLON_RS04830</i>	NS	NS	2.13
		0.79	2.03	3.41

Таблица 2. Продолжение

Продукт гена	Locus_tag гена	H ₂ O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 4 ч/контроль
3-Изопропилмалат дегидрогеназа	<i>BLON_RS10735</i>	NS	NS	2.04
		0.57	1.92	2.63
Треонинальдолаза	<i>BLON_RS10060</i>	NS	NS	2.02
		0.42	0.46	0.38
Метаболизм нуклеотидов				
Нуклеозид 2-дезоксирибозил-трансфераза	<i>BLON_RS03085</i>	NS	NS	2.22
		0.47	1.1	1.65
Фосфорибозиламинглицинлигаза	<i>BLON_RS10180</i>	NS	NS	2.77
		1.5	0.85	0.33
Регуляция транскрипции				
helix-turn-helix регулятор транскрипции	<i>BLON_RS04795</i>	5.26	NS	6.95
		9.6	1.84	1.0
Транспорт				
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 1)	<i>BLON_RS12635</i>	4.35	NS	2.80
		21.44	0.44	0.44
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 1)	<i>BLON_RS10690</i>	NS	NS	3.33
		0.58	1.16	1.16
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 5)	<i>BLON_RS01440</i>	9.09	NS	NS
		0.9	1.25	0.92
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 5)	<i>BLON_RS10445</i>	NS	NS	6.91
		1.55	2	0.86
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 5)	<i>BLON_RS04415</i>	NS	NS	2.10
		0.5	1.96	2.0
Внеклеточный белок, связывающий растворенные вещества (семейство 3)	<i>BLON_RS03845</i>	NS	NS	2.96
		1.12	0.82	0.82
УДФ-N-ацетилглюкозамин-N-ацетил-мурамил(пентапептид)-пирофосфорил-ундекапренол-N-ацетилглюкозаминтрансфераза	<i>BLON_RS04355</i>	NS	NS	6.03
		0.93	1.14	0.83
SecE-субъединица транслоказы	<i>BLON_RS06530</i>	NS	NS	2.48
		0.6	0.6	0.46
ABC-2-транспортер	<i>BLON_RS12655</i>	NS	NS	2.36
		6.17	1.57	1.02
ABC-транспортер	<i>BLON_RS01065</i>	NS	NS	3.84
		1.19	1.25	0.47

Таблица 2. Окончание

Продукт гена	Locus_tag гена	H ₂ O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 2 ч/контроль	O ₂ 4 ч/контроль
Белок, содержащий домен Fsx	<i>BLON_RS01060</i>	NS 0.9	NS 1.25	2.47 0.63
Неизвестные белки				
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS01045</i>	NS 0.65	14.58 2.3	14.56 1.38
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS10130</i>	25.0 30.15	NS 1.5	NS 0.75
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS11705</i>	NS 0.65	NS 0.54	13.33 0.27
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS01055</i>	NS 0.77	NS 1.55	5.49 0.96
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS12535</i>	NS 0.8	NS 1.66	2.39 3.14
Белок с неизвестными функциями	<i>BLON_RS07940</i>	NS 2.1	NS 1.46	2.33 2.5

Примечание. * – кратное отношение к среднему содержанию белков в различных образцах до и после окислительного стресса; ** – кратное отношение к количеству транскриптов в различных образцах до и после окислительного стресса. NS – без изменений в уровнях.

АТФаза Р-типа при действии всех стрессовых факторов, что указывает на важную роль белка для защиты от окислительного стресса у *B. infantis*. Важно отметить значительное повышение АО белков Fe-пермеазы, пиридоксаль-5'-фосфатсинтазы (субъединицы PdxT) и глутаредоксина при длительном воздействии кислорода. Пиридоксаль-5'-фосфатсинтаза участвует в синтезе витамина B6. Витамин B6 играет важную роль в антиоксидантном механизме и является кофактором глутатиона [32]. Глутаредоксин действует как антиоксидант, восстанавливая дегидрокарбонат, пероксиредоксины, метионинсульфоксидредуктазу [33]. Отсутствие повышенных уровней АО белков, выявленных при транскриптомном анализе, можно объяснить их нестабильностью. Возможно, они быстро разрушаются и их сложно зафиксировать используемым методом анализа [34].

Другие идентифицированные белки с повышенным уровнем в клетках участвуют в процессах реакции на стресс, метаболизме аминокислот и нуклеотидов и транспортных процессах. У штамма *B. infantis* ATCC 15697 в основном после длительного воздействия кислорода повышается уровень стрессовых белков шаперона ClpB и белка теплового шока с DnaJ доменом. Транскрипты генов, кодирующих шапероны DnaJ и ClpB, были повышены в штамме *B. longum* VBMN68 после 60-минутного воздействия кислорода [26]. ClpB сов-

местно с DnaK, DnaJ и GrpE участвует в подавлении агрегации белка. Это универсальное явление, обнаруживаемое в реакциях различных организмов на различные абиотические стрессовые состояния [35]. Участие ClpB в антиоксидантной активности предполагается у штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21, обладающего высоким антиоксидантным потенциалом в модели паркинсонизма [36]. В клетках штамма *B. infantis* ATCC 15697 также был выявлен избыточный уровень для RelB-антитоксина, белка с FMN доменом, тирозин-тРНК-лигазы, эндорибонуклеазы L-PSP. RelB-антиоксиген нейтрализует действие токсина, образуемого при стрессовых состояниях клетки [37]. Тирозин-тРНК-лигаза образует углерод-кислородные связи. Эндорибонуклеаза L-PSP расщепляет РНК в клетке. FMN домен был обнаружен в общих стрессовых белках [38]. Он может помогать бактериям реагировать на окислительный стресс. Таким образом, эти белки могут играть важную роль в защите бифидобактерий от окислительного стресса.

Под длительным действием кислорода повышались уровни белков, участвующих в метаболизме нуклеотидов и в метаболизме и транспорте аминокислот. Гены, принадлежащие к категории COG E (транспорт и метаболизм аминокислот), были индуцированы по сравнению с контролем в штамме *B. longum* VBMN68 при воздействии кислорода [26], что указывает на то, что процессы

биосинтеза аминокислот и белков, транспорта и метаболизма усиливаются при окислительном стрессе. В штамме *B. infantis* ATCC 15697 в основном при продолжительном культивировании на качалке повышается уровень у 11 различных белков с транспортными функциями. Активность транспортной системы включается в ответ на потребности клеток как в соединениях с антиоксидантными свойствами, так и в источниках дополнительной энергии, необходимой для восстановления внутриклеточного баланса.

В клетках *B. infantis* ATCC 15697 после длительного воздействия кислорода увеличивался уровень шести белков с неизвестными функциями, что указывает на использование клетками неизвестных механизмов защиты от окислительного стресса. Эти белки представляют большой интерес для дальнейших исследований.

Таким образом, можно заключить, что механизм антиоксидантной защиты у исследуемого штамма включает как известные механизмы, характерные для бактерий вида *B. longum*, а именно синтез АО-ферментов, соединений с АО свойствами, хелатирование токсичных ионов (Fe_2^+), так и специфические механизмы, включая как внутриклеточные механизмы общей антистрессовой защиты, так и неизвестные пути, в которые возможно вовлечены белки с неизвестными функциями.

Изучение роли отобранных штаммов бифидобактерий в обеспечении формирования противовоспалительного потенциала микробиоты и организма хозяина — несомненно перспективное направление исследований [4].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-54-18006. Участие В.Н. Даниленко и О.В. Авериной также финансировалось в рамках гос. задания № 0092-2022-0003.

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. Wong C.B., Odumaki T., Xiao J.Z. Insights into the reason of Human-Residential Bifidobacteria (HRB) being the natural inhabitants of the human gut and their potential health promoting benefits // *FEMS Microbiol. Rev.* 2020. V. 44. P. 369–385. <https://doi.org/10.1093/femsre/uaaa010>
2. Arbolea S., Watkins C., Stanton C., Ross R.P. Gut bifidobacteria populations in human health and aging // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. e1204. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01204>
3. Averina O.V., Zorkina Y.A., Yunes R.A. et al. Bacterial metabolites of human gut microbiota correlating with depression // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. 9234. <https://doi.org/10.3390/ijms21239234>
4. Danilenko V., Devyatkin A., Marsova M. et al. Common inflammatory mechanisms in COVID-19 and Parkinson's diseases: The role of microbiome, pharmabiotics and postbiotics in their prevention // *J. Inflamm. Res.* 2021. V. 14. P. 6349–6381. <https://doi.org/10.2147/JIR.S333887>
5. Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic lactobacilli and bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 10. P. 1340. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101340>
6. Domej W., Oetll K., Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD—Implications and relevance for treatment // *Int. J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* 2014. V. 9. P. 1207–1224. <https://doi.org/10.2147/COPD.S51226>
7. Calabrese V., Santoro A., Monti D. et al. Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 115. P. 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.379>
8. Kawasaki S., Watanabe M., Fukiya S., Yokota A. Stress responses of bifidobacteria: oxygen and bile acid as the stressors. The bifidobacteria and related organisms // *Biol. Taxon. Appl.* 2018. V. 10. P. 131–143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805060-6.00007-7>
9. Shimamura S., Abe F., Ishibashi N. et al. Between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species // *J. Dairy Sci.* 1992. V. 75. № 12. P. 3296–3306. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78105-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78105-3)
10. Huang G., Pan H., Zhu Z., Li Q. The complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* LTBL16, a potential probiotic strain from healthy centenarians with strong antioxidant activity // *Genome.* 2020. V. 112. P. 769–773. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.05.015>
11. Xiao M., Xu P., Zhao J. et al. Oxidative stress-related responses of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68 at the proteomic level after exposure to oxygen // *Microbiology.* 2011. V. 157. P. 1573–1588. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044297-0>
12. Klijn A., Mercenier A., Arigoni F. Lessons from the genomes of bifidobacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. V. 29. P. 491–509. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.010>
13. Blazheva D., Mihaylova D., Averina O.V. et al. Antioxidant potential of probiotics and postbiotics: A biotechnological approach to improving their stability // *J. Gen.* 2022. V. 58. № 9. P. 1036–1050. <https://doi.org/10.1134/S1022795422090058>
14. Wong C., Sugahara H., Odumaki T., Xiao J. Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health //

- Benef. Microbes. 2018. V. 9. P. 111–122.
<https://doi.org/10.3920/BM2017.0031>
15. Sela D.A., Chapman J., Adeuya A. et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome // PNAS. 2008. V. 105. № 48. P. 18964–18969.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0809584105>
16. Turroni F., Ventura M., van Sinderen D. Opinion Insights into endogenous *Bifidobacterium* species in the human gut microbiota during adulthood // Trends in Microbiol. 2022. V. 30. № 10. P. 940–947.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.04.004>
17. Andrews S., Fast Q.C. A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
18. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. P. 2114–2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
19. Madden T.L., Tatusov R.L., Zhang J. Applications of network BLAST server // Methods Enzymol. 1996. V. 266. P. 131–141.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)66011-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(96)66011-x)
20. Buchfink B., Reuter K., Drost H.G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND // Nature Meth. 2021. V. 18. P. 366–368.
<https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x>
21. Kim D., Paggi J.M., Park C. et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37. № 8. P. 907–915.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
22. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools // Gigascience. 2021. V. 10. giab008.
<https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
23. Putri G.H., Anders S., Pyl P.T. et al. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0 // Bioinformatics. 2022. btac166.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac166>
24. Kulak N.A., Pichler G., Paron I. et al. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells // Nature Meth. 2014. V. 11. № 3. P. 319–324.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2834>
25. Ma B., Zhang K., Hendrie C. et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry // Rapid. Commun. Mass Spectrom. 2003. V. 17. № 20. P. 2337–2342.
<https://doi.org/10.1002/rcm.1196>
26. Zuo F., Yu R., Xiao M. et al. Transcriptomic analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68 in response to oxidative shock // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 17085.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35286-7>
27. Horsburgh M.J., Wharton S.J., Karavolos M., Foster S.J. Manganese: Elemental defence for a life with oxygen // Trends Microbiol. 2002. V. 10. P. 496–501.
[https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)02462-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02462-9)
28. Zeller T., Klug G. Thioredoxins in bacteria: Functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes // Naturwissenschaften. 2006. V. 93. P. 259–266.
<https://doi.org/10.1007/s00114-006-0106-1>
29. Koster W. Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope // Front. Biosci. 2005. V. 1. № 10. P. 462–477.
<https://doi.org/10.2741/1542>
30. MacDonald H.B. Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge // J. Am. Coll. Nutr. 2000. V. 19. № 2. P. 1115–1185.
<https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718082>
31. Raimondi S., Amaretti A., Leonardi A. et al. Conjugated linoleic acid production by bifidobacteria: screening, kinetic, and composition // Biomed. Res. Int. 2016. 8654317.
<https://doi.org/10.1155/2016/8654317>
32. Mayo B., van Sinderen D. Bifidobacteria: Genomics and Molecular Aspects / Eds Mayo B., van Sinderen D. Norfolk, UK: Caister Acad. Press, 2010. 260 p.
33. Fernandes A.P., Holmgren A. Glutaredoxins: Glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system // Antiox. Redox Sign. 2004. V. 6. № 1. P. 63–74.
<https://doi.org/10.1089/152308604771978354>
34. Belle A., Tanay A., Bitincka L. et al. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome // PNAS. 2006. V. 103. № 35. P. 13004–13009.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605420103>
35. Zolkiewski M. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation: A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 28083–28086.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28083>
36. Полуэктова Е.У., Мавлетова Д.А., Одорская М.В. и др. Сравнительный геномный, транскриптомный и протеомный анализ штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21, перспективного для создания фармабиотика // Генетика. 2022. Т. 58. № 9. С. 1029–1041.
<https://doi.org/10.31857/S0016675822090120>
37. Averina O.V., Alekseeva M., Shkoporov A., Danilenko V. Functional analysis of the type II toxin–antitoxin systems of the MazEF and RelBE families in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 // Anaerobe. 2015. V. 35. P. 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.07.007>
38. Hilario E., Li Y., Niks D., Fan L. The structure of a *Xanthomonas* general stress protein involved in citrus canker reveals its flavin-binding property // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2012. V. 68. P. 846–853.
<https://doi.org/10.1107/S0907444912014126>

Таблица S1. Референсный каталог аминокислотных последовательностей, кодируемых генами с антиоксидантными свойствами в бактериях рода *Bifidobacterium*

Название фермента	Число гомологов
Alkyl hydroperoxide reductase <i>ahpC</i>	6
Alkyl hydroperoxide reductase <i>ahpF</i>	6
Class I pyridine nucleotide disulfideoxidoreductase	3
Cobalamin-independent methionine synthase II	9
DSBA oxidoreductase	9
Dihydroorotate dehydrogenase	9
Glutaredoxin <i>grxC2 (nrdH)</i>	7
Glutathione import ATP-binding protein <i>gsiA</i>	8
Hydroxycinnamic acid esterase <i>caeA</i> – Carboxylesterase A	4
Linoleic acid isomerase	5
NADH oxidase	11
Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase	9
P-type ATPase	9
Peptidase O <i>pepO</i>	9
Permease	5
Peroxiredoxin	5
Polyphosphate kinase <i>ppk</i>	9
Pyrophosphohydrolase <i>mutI</i>	9
Ribonucleotide reductase <i>nrdA</i>	6
Subtilisin-like serine protease	2
Superoxide dismutase <i>sodB</i>	12
Superoxide dismutase <i>sodC</i>	11
Thioredoxin	4
Thioredoxin domain protein	9
Thioredoxin peroxidase	7
Thioredoxin reductase	14
Thioredoxin reductase-like protein	6

Таблица S2. Распространение генов, кодирующих продукты с антиоксидантной функциональностью, в геномах *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

Штамм	Алкилглицеропероксид-редуктаза <i>ahrC</i>	Алкилглицеропероксид-редуктаза <i>ahrF</i>	Пирдиннуклеотид-дисульфидоксидо-редуктаза класса I	Оксидоредуктаза DSBA	Диглицеротат-диглицерогеназа	Лугаредоксин <i>grxC2</i>	Лугатинон АТФ-связывающий белок <i>gsiA</i>	Изомераза линолевой кислоты	NADH-оксидлаза	АТФаза Р-типа
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> 157F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 = JCM 1222 = DSM 20088	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> isolate USA001 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain BINF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain BT1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain CECT 7210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 11347	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 11660	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 7009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 7010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain KCTC 5934	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain NCTC11817	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица S2. Продолжение

Штамм	Пермеаза	Пероксиредоксин	Серниловая протеаза	Белок с ломом тиоредоксина	Тиоредоксин-пероксидаза	Тиоредоксин-редуктаза	Тиоредоксин-подобный белок
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> 157F	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 = JCM 1222 = DSM 20088	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> isolate USA001 1	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain BINF	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain BT1	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain CECT 7210	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 11347	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 11660	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 7009	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain JCM 7010	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain KCTC 5934	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> strain NCTC 11817	+	+	-	+	+	+	+

Таблица S3. Параметры анализируемых транскриптомных образцов

Название образца	До тримминга		После тримминга	
	размер, млн чтений	размер, млрд нуклеотидов	размер, млн чтений	размер, млрд нуклеотидов
BIN1	30.4	3.1	29.0	2.6
BIN2	30.6	3.1	29.1	2.6
BIN3	30.5	3.1	29.2	2.6
BIN4	30.5	3.1	29.2	2.6
BIN5	28.2	2.8	27.1	2.4

Примечание. BIN1 – контроль 1, BIN2 – контроль 2, BIN3 – H₂O₂ – 2 ч, BIN4 – O₂ – 2 ч, BIN5 – O₂ – 4 ч.

Reaction of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Strain ATCC 15697 to Oxidative Stress

O. V. Averina^{a, *}, A. S. Kovtun^a, D. A. Mavletova^a, R. H. Ziganshin^b, and V. N. Danilenko^a

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

^bShemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: olgavr06@mail.ru

The genus *Bifidobacterium* is one of the predominant bacterial populations in human gut microbiota. Despite the increasing number of studies on the beneficial functionality of bifidobacteria for human health, knowledge about their antioxidant potential is still insufficient. The role of the antioxidant potential of bifidobacteria in maintaining the homeostasis of the intestinal microbiota of the host organism as a whole is an important task that requires solutions. For the first time, this paper presents the data of genomic, transcriptomic and proteomic analyses of probiotic strains *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 after the action of oxidative stress. The growing culture of strain was exposed to hydrogen peroxide for 2 hours and oxygen for 2 and 4 hours. Preliminary genome analysis of the strain showed the presence of 18 genes encoding a known protein with antioxidant function, as in other compiled genomes of *B. longum* subsp. *infantis* strains available in the international database. The complete transcriptome analysis revealed an increase in transcript levels by more than two times for 6 genes with a known antioxidant function. The data of quantitative proteomic analysis showed an increase in protein levels by more than two times for five enzymes with a known antioxidant function. 28 other proteins with increased levels more than twice were identified in the cells of the growing culture in response to the long action of oxygen. These proteins can be involved in the processes of the cell's response to stress, the amino acids, nucleotides metabolism and transport processes. Six proteins with unknown functions, which may play a significant role in the antioxidant response of anaerobic bifidobacteria, were found to have high levels in the cells after the action of stress. The obtained data are supposed to be used in the selection of *B. longum* subsp. *infantis* strains and the creation of probiotics able to correct the composition of the microbiota.

Keywords: bifidobacteria, genomic analysis, transcriptomic analysis, proteomic analysis, oxidative stress.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БИОГЕНЕЗА КАРОТИНОИДОВ В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХОЛОДОВОГО ХРАНЕНИЯ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ© 2023 г. А. В. Кулакова¹, *, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева¹¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: kulakova_97@mail.ru

Поступила в редакцию 24.01.2023 г.

После доработки 06.03.2023 г.

Принята к публикации 09.03.2023 г.

Каротиноиды представляют собой вторичные метаболиты, которые синтезируются и откладываются во всех типах пластид растений. Данные пигменты играют значимую роль в защите от оксидативного стресса, а также в окраске цветков и запасующих органов растений. Клубни картофеля *Solanum tuberosum* L. синтезируют каротиноиды, в том числе в процессе послеуборочного хранения. В данном исследовании был проведен анализ экспрессии генов пути биогенеза каротиноидов (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2* и *NCED6*), а также генов предполагаемой инициации дифференцировки хромoplastов (*OR1* и *OR2*) в динамике длительного холододового хранения (сентябрь, февраль, апрель) клубней картофеля сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда. Было показано, что мРНК *OR1* и *OR2* присутствует в клубнях всех сортов на всех этапах хранения. Для всех анализируемых генов ферментов пути биосинтеза каротиноидов профиль экспрессии по мере хранения клубней характеризовался существенным снижением уровней транскриптов в феврале в сравнении с сентябрем, за некоторыми исключениями. В период с февраля по апрель уровень транскриптов генов менялся несущественно. Проведенный биохимический анализ содержания каротиноидов в динамике холододового хранения показал, что в момент сбора урожая самое высокое содержание каротиноидов в клубнях сорта Утро; клубни остальных сортов характеризовались сходной суммой каротиноидов. По мере хранения с сентября по апрель суммарное содержание каротиноидов изменялось генотип-зависимым образом без какой-либо общей для сортов тенденции. В целом в работе впервые была охарактеризована активность большинства генов пути метаболизма каротиноидов в процессе длительного холододового хранения клубней, что существенно дополняет известные данные по экспрессионному ответу этих генов на абиотический стресс.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, сорта картофеля, хранение клубней, биосинтез каротиноидов, хромoplastы, экспрессия гена.

DOI: 10.31857/S001667582308009X, EDN: ХТТРАИ

Каротиноиды представляют собой бесцветные и пигментированные (желтые, оранжевые и красные) вторичные метаболиты, которые синтезируются и откладываются во всех типах пластид растений (кроме пропластид) [1, 2]. В наибольших количествах каротиноиды накапливаются в секвестрирующих структурах внутри хромoplastов [1, 2]. Специализирующиеся на синтезе и хранении крахмала амилопласты также способны запасать большие количества каротиноидов, что показано на примере зерен кукурузы и клубней картофеля с темно-желтой окраской [3, 4]. В растениях каротиноиды являются значимыми компонентами механизмов фотосинтеза и фотозащиты, играют существенную роль в привлечении опылителей цветков и распространителей семян, а также по-

ставляют важные компоненты рациона человека (провитамин А и антиоксиданты) [1, 2].

Первым ферментом пути биосинтеза каротиноидов является фитоинсинтаза PSY, катализирующая образование 15-цис-фитоина. Последующие реакции десатурации (под действием фитоиндесатуразы PDS и ζ-каротиндесатуразы ZDS) и цис-транс-изомеризации (15-цис-ζ-каротинизомераза Z-ISO и каротиноид-цис-транс-изомераза CRTISO) приводят к синтезу полностью-транс-ликопина. Ликопин-β-циклаза (LCYB) и ликопин-ε-циклаза (LCYE) иницируют циклизацию ликопина в β- и α-каротин и далее в β/β- (зеаксантин) и ε/β- (лютеин) ксантофиллы соответственно. Из зеаксантина образуются антраксантин, виолаксантин (зеаксантинэпоксидаза ZEP; реакция обратима с помощью виолаксантиндеэпоксидазы

VDE) и неоксантин (неоксантинсинтаза NSY) [5]. Каротиноиды β, β -ветви расщепляются до стриголактонов (субстрат β -каротин; каротиноид-расщепляющие диоксигеназы CCD), а также абсцизовой кислоты (АБК; субстраты 9-*цис*-виолаксантин и 9-*цис*-неоксантин; 9-*цис*-эпоксикаротиноид диоксигеназы NCED) [6–9] (рис. S1).

Данные о биогенезе каротиноидов активно используются в метаболической инженерии сельскохозяйственных растений, основанной на манипуляциях с уровнями экспрессии генов ферментов пути. Конститутивная суперэкспрессия гена фитоинсинтазы *PSY* увеличивает общее содержание каротиноидов и/или β -каротина у многих культурных видов [10–13]. Такой подход способствовал увеличению суммы каротиноидов в плодах томата *Solanum lycopersicum* L. [14] и клубнях картофеля *Solanum tuberosum* L. [15].

Уровни экспрессии *LCYB* и *LCYE* влияют на соотношение β -каротин/ α -каротин [16–20]. Примерами успеха в направлении повышения содержания β -каротина являются “золотые” рис *Oryza sativa* (с суперэкспрессией гена *PSY* и бактериального гена фитоиндесатуразы *crtI* [21, 22]) и картофель (замалчивание активности гена ликопин-ε-циклазы *LcyE* [16]), а также томаты с плодами оранжевой окраски за счет суперэкспрессии гена ликопин-β-циклазы *LcyB* [23].

Еще одним примером использования данных о биогенезе каротиноидов в биотехнологии агрокультур является картофель, модифицированный для производства в клубнях коммерчески важных кетокаротиноидов, включая астаксантин, за счет инактивированной экспрессии гена зеаксантинэпоксидазы *ZEP* в сочетании с суперэкспрессией гена β -каротинкетотазы *crtO* из цианобактерии *Synechocystis* [24].

Изменяя уровень активности гена *VDE*, кодирующего виолаксантиндеэпоксидазу, использующую аскорбат в качестве восстановителя для превращения виолаксантина в зеаксантин [25], можно регулировать уровень витамина С [26, 27].

Кроме манипуляций с уровнем транскриптов генов биосинтеза каротиноидов, используется также стимуляция образования накапливающих каротиноиды структур. Плоды томата и других плодовых культур с окрашенными плодами накапливают каротиноиды в хромопластах [28], и для изменения содержания пигментов достаточно изменения уровней экспрессии генов биосинтеза каротиноидов. В случае корнеплодов все сложнее. Так, исследование 25 сортов моркови *Daucus carota* L. выявило, что оранжевые и красные корнеплоды содержат большое количество хромопластов с секвестрирующими каротиноиды субструктурами, тогда как у моркови с желтой и белой окраской преобладают амилопласты [29]. Пластиды картофельных клубней представлены в основном крах-

мал-ассоциированными амилопластами и не содержат хромопластов [4], к формированию которых не приводит даже высокий уровень каротиноидов в темно-желтой мякоти [2].

Показано, что присутствие хромопластов в корнеплодах моркови сцеплено с аллелем *DcOR3^{Leu}* гена *ORANGE (OR)* [29]. Ген *OR*, инициирующий дифференцировку пропластид и/или неокрашенных пластид в хромопласты, впервые выделен из мутанта цветной капусты (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) с оранжевой окраской кочна-соцветия [30]. С использованием гена *OR* получены трансгенные растения картофеля. Продемонстрировано, что суперэкспрессия гена *OR* не меняет активности генов биогенеза каротиноидов, однако приводит к 6-кратному повышению содержания суммы каротиноидов в клубнях за счет их накопления и еще большему его росту в процессе длительного холодного хранения [30]. При этом в клубнях образуются структуры, похожие на хромопласты, и увеличение суммы каротиноидов есть следствие появления их накопителей [2].

Содержание каротиноидов в корнеплодах важно не только с точки зрения их диетической ценности, но и как соединений, которые (включая апокаротиноиды) играют центральную роль в обеспечении развития и стрессовой адаптации растений [31]. Таким образом, повышенное содержание тех или иных соединений каротиноидов в клубнях картофеля [15, 16, 24] может быть важно еще и для сохранения клубней в их наиболее съедобном и товарном состоянии при длительном содержании в картофелехранилищах. Потери качества при хранении связаны с дыханием, прорастанием и высушиванием клубней, а также со стрессами — распространением болезней и повреждением экстремальными температурами [32]. Объем потерь, как правило, зависит от сорта (генотипа), условий до и во время хранения, а также его продолжительности [32].

Растения картофеля недостаточно охарактеризованы по содержанию каротиноидов и по экспрессии генов каротиногенеза в динамике как развития, так и хранения клубней. Тем не менее продемонстрирована генотип-зависимость уровня экспрессии отдельных генов каротиногенеза на разных стадиях развития клубней [33]. На примере ряда сортов картофеля показана связь активности семи генов данного пути, а также содержания и соотношения соответствующих типов каротиноидов в клубнях, с генотипом и условиями выращивания [34, 35]. Прямая зависимость от температуры хранения выявлена для содержания АБК в клубнях шести генотипов картофеля; кроме того, трехнедельное хранение приводит к почти двукратному снижению количества этого гормона [36]. Однако отметим, что ранее работы по изучению экспрессии генов биогенеза каротиноидов при низких

температурах проводились на малом количестве генов и на коротких сроках хранения клубней.

Целью настоящей работы стала оценка активности 18 генов биогенеза каротиноидов и апокаротиноидов, а также изменений суммарного содержания каротиноидов в клубнях пяти сортов картофеля российской селекции в динамике длительного (в точках 0, 3.5–4 и 7 мес.) низкотемпературного (+3°C) хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Для исследования использовали образцы картофеля *S. tuberosum* пяти сортов: Барин (каталожный номер 8854151), Красавчик (9553926), Утро (9253216), Северное сияние (8558886) и Надежда (9463920) (<https://teestr.gossortrf.ru/>). Сорта являются среднеспелыми (исключение – среднеранний сорт Красавчик) и различаются окраской клубней: Барин (кожура/мякоть – светло-бежевая/светло-желтая), Красавчик (красная/светло-кремовая), Утро (светло-бежевая/светло-желтая), Северное сияние (синяя/синие-пестрая) и Надежда (светло-бежевая/кремовая) (рис. S2) (<https://teestr.gossortrf.ru/>).

В 2022 г. растения выращивали в полевых условиях ВНИИКХ им. А.Г. Лорха (Московская обл., Россия). Клубни собирали в первой половине сентября. Материал одного свежесобранного клубня каждого анализируемого сорта подготавливали для дальнейшего анализа. Как правило, количество каротиноидов измеряют в мякоти клубней, либо в совокупности с кожурой (например, [35]). Прямоугольную секцию продольного участка клубня (~1.0 г), которая охватывала все ткани от кожуры до сердцевинки мякоти, вырезали и измельчали растиранием в жидком азоте, разделяли на весовые аликвоты (по 0.1–0.2 г) и хранили при –80°C. Весовая доля кожуры в образце составляла менее 0.5% от веса вырезанного клубневого сектора. Остальной урожай, предварительно обработанный (фумигация, “мумификация”, проветривание, антисептирование), закладывали на хранение в закрываемое картофелехранилище ВНИИКХ (в условиях воздушного вентилирования и низкой положительной температуры +3°C). Выбор температуры хранения базировался на результатах оценки содержания редуцирующих сахаров в клубнях во время хранения при разных температурах, показавшей существенную динамику изменений при +3°C [37]. В начале февраля (4.5–5 мес. после сбора урожая; учитывая период подготовительной обработки клубней (около месяца), это приблизительно середина (3.5–4 мес.) срока хранения при +3°C) и конце апреля (8 мес. после сбора урожая (7 мес. хранения при +3°C); перед высадкой) отбирали по одному клубню каждого сорта; тканевый материал для анализа подготавливали аналогично сентябрь-

скому. Таким образом, был отобран материал клубней пяти сортов, соответствующий временным точкам 0 (сбор урожая, сентябрь), ~3.5–4 мес. при +3°C (февраль) и ~7 мес. при +3°C (апрель).

Определение содержания каротиноидов. Суммарное содержание каротиноидов определяли с использованием модифицированного протокола метода Фолча [38, 39] в трех технических повторах. Для этого 0.2 г растительной ткани гомогенизировали в растворе хлороформ-метанол (2 : 1 [об/об]) в присутствии следовых количеств Mg_2CO_3 , инкубировали 1 ч при 4°C и центрифугировали 10 мин при 4000 об./мин и 4°C. В хлороформной фазе измеряли содержание суммы каротиноидов, регистрируя спектры поглощения на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® basic (Eppendorf, Германия). Для статистической обработки результатов применяли программу GraphPad Prism v8 (GraphPad Software Inc., США; <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Данные выражали как среднее значение (M) со стандартным отклонением ($\pm SD$) на основе трех технических повторов для каждого варианта измерения. Для оценки различий использовали t -test ($p < 0.05$ указывает на статистическую значимость различий).

Выделение РНК, синтез кДНК. Из 50–100 мг ткани клубней выделяли суммарную РНК (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Германия). Полученные препараты дополнительно чистили от примесей геномной ДНК (RNase free DNasey set, QIAGEN) и использовали для синтеза кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). Качество РНК проверяли методом электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле. Концентрацию препаратов РНК и кДНК определяли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью соответствующих реактивов (Qubit RNA HS Assay Kit и Qubit DS DNA HS Assay Kit, Invitrogen, США).

Определение профиля экспрессии генов и оценка его корреляции с суммарным содержанием каротиноидов. Уровень транскриптов генов *OR1*, *OR2*, *PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2* и *NCED6* в клубнях картофеля определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Данные нормализовали на уровень транскриптов референсных генов *elongation factor 1-alpha (elf1)* и *SEC3A* [40, 41]. Для реакции использовали 3 нг препарата кДНК, разработанные нами праймеры (последовательности праймеров и идентификаторы генов в базе данных NCBI приведены в табл. 1) и набор “Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR GreenI и ROX” (ООО “Синтол”, Россия). Реакции проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США) в трех технических

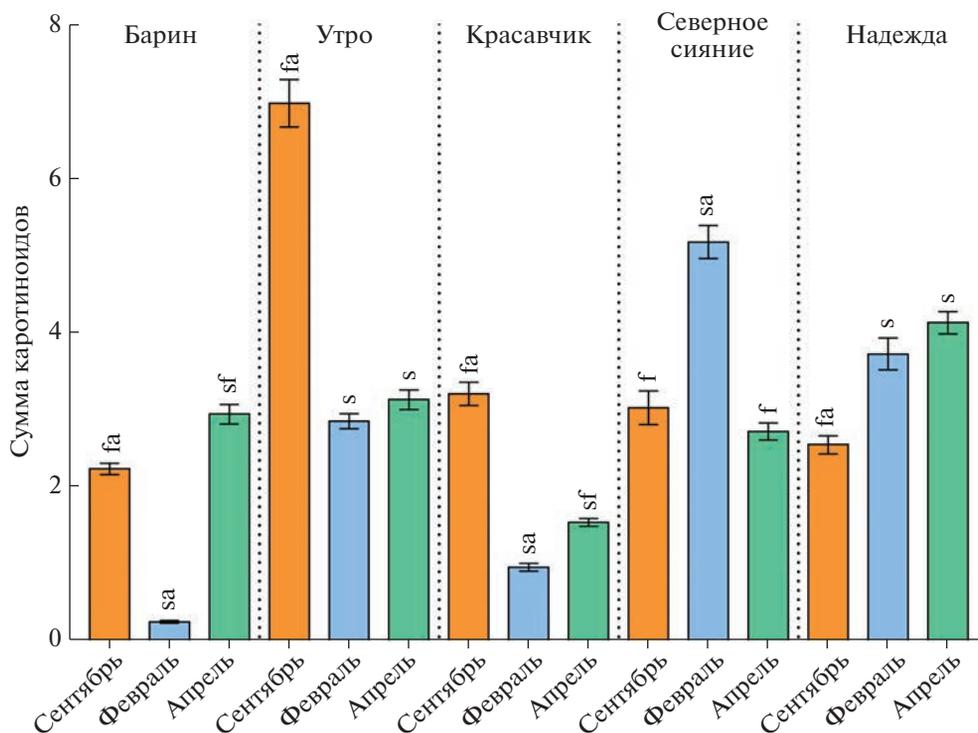


Рис. 1. Суммарное содержание каротиноидов (мкг/г сырого веса) в клубнях картофеля сортов Барин, Утро, Красавчик, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного (+3°C) хранения (сентябрь, февраль, апрель). Буквами s, f и a над столбцами обозначено достоверное отличие ($p < 0.05$) конкретного значения суммы каротиноидов от значений для двух других месяцев внутри каждого образца (s – сентябрь, f – февраль, a – апрель).

повторах в следующих условиях: предварительная денатурация (5 мин, 95°C); 40 циклов (15 с, 95°C; 50 с, 62°C). Относительную экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Визуализацию данных и регрессионный анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism v 8 (<https://www.graphpad.com>). Регрессионный анализ (поиск корреляции между уровнем экспрессии гена и содержанием каротиноидов) проводили с помощью программы GraphPad Prism v 8 (<https://www.graphpad.com>). Критерии наличия корреляции: значения коэффициента корреляции Пирсона (r) > 0.5 и p -value < 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение суммарного содержания каротиноидов в клубнях сортов картофеля

Был проведен биохимический анализ суммарного содержания каротиноидов в клубнях пяти сортов картофеля в динамике холодового хранения: свежесобранные клубни (сентябрь), спустя 3.5–4 мес. (февраль) и спустя 7 мес. (апрель) хранения при +3°C (рис. 1).

В сентябре самое высокое содержание каротиноидов оказалось в клубнях сорта Утро; клубни остальных сортов характеризовались меньшей,

сходной между сортами суммой каротиноидов (рис. 1). В феврале показатели упали у сортов Красавчик, Барин и Утро и выросли у сортов Надежда и Северное сияние. В апреле по сравнению с февралем значения суммы каротиноидов в клубнях сортов поднялись, кроме сорта Северное сияние (падение до сентябрьского уровня). В сравнении с сентябрем содержание каротиноидов выросло у сортов Надежда и Барин, снизилось у сортов Красавчик и Утро и не изменилось у сорта Северное сияние.

Таким образом, было выявлено, что при низкотемпературном хранении клубней картофеля с сентября по апрель содержание суммы каротиноидов изменяется в зависимости от генотипа, без какой-либо общей для сортов тенденции.

Определение профиля экспрессии генов биогенеза каротиноидов

В тех же тканях, которые были использованы для определения содержания каротиноидов, был проведен анализ экспрессии 16 генов пути биогенеза каротиноидов (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2* и *NCED6*) в динамике длительного низкотемпературного хранения клубней (рис. 2–5).

Таблица 1. Используемые в работе последовательности праймеров

Ген	NCBI Gene ID	Последовательность праймера (5' → 3') ²
<i>OR1</i>	XM_006358136.2 LOC102601642	GTGGACTTCTAGCACCCAGT AGAGATCACCCCAACTGCAC
<i>OR2</i>	XM_006341022.2 LOC102594717	GGTCAGATGCAGTTTCAAGAAATC TGGCATCTCATTTTCATCTTCACC
<i>PSY1</i>	XM_006343240.2 LOC102593756	CATGCTCGATGGTGCTTTGTC GACTTCCTCAAGTCCATACGCA
<i>PSY2</i>	XM_015309093.1 LOC102589336	AACTGAGCTCTGCTAGTAGATG GCACTAGAGATCTTGCATAAGCA
<i>PSY3</i>	XM_006354167.1 LOC102603193	GCCTAGTTTAGCCATTCAATAGAC GCCTAGAGTTGATCGAACGATTC
<i>PDS</i>	XM_015306724.1 LOC102577582	GAAGCTTTACCCGCTCCTTTAAA CTTGCTTTCTCATCCAGTCCTT
<i>ZDS</i>	XM_015308927.1 LOC102598493	CAGCAGATACGCAATCTAGAT ACAGTCAATGAATCCAAGAGCA
<i>Z-ISO</i>	XM_015309776.1 LOC102600257	GGATTGACAATTCTACTGGATTTGG CTAGCAAGACCACTGTGGACT
<i>CRTISO</i>	XM_006339123.2 LOC102591604	ATGAAGCGAAGAAAGAGCTTGT GCAAGGTATCGTCTGTGGGTCT
<i>LCYB1</i>	XM_006351202.2 LOC102597428	TGTCTTCATGGTGAGCACTTACT CAGGATTTCAAGAAAGTCCCTAC
<i>LCYB2</i>	XM_006364371.2 LOC102595971	CAAGATTATAGGACCCCATTTGC GGCTTCACAGAGCTAAAGGTAC
<i>LCYE</i>	XM_006353482.2 LOC102577922	TATGTCAGACACGACGCTCAAT CATGCTAGCAGCAGCACCA
<i>VDE</i>	XM_006340432.2 LOC102588520	CCTGATGAAACAGAATGTCAG AGTCACCAACATCAGATTTACGA
<i>ZEP</i>	NM_001287910.1 LOC102592281	ATGAATGCTGGCTGCATCACT AAGTCCACGTTCCACTGCT
<i>NSY</i>	NM_001318672.1 LOC102601215	TCGGGCTCAATTCGACGTGA ATGGCCTATGACTTGTGTACATAT
<i>NCED1</i>	NM_001288174.1 LOC102577783	TGCTCTTAGCTACGATGTGAT GCGAAATCATGCATCATTGTTGG
<i>NCED2</i>	NM_001288034.1 LOC102577733	TATGCCCGTGGAGTTTTCGG GTTTGAAGATCGCCAGAAGGCAA
<i>NCED6</i>	XM_006349464.2 LOC102579540	GTGGTATTCAAGTTATCCGAG CACTACATTTTGGCCATGGTTC
<i>ef1</i> ¹	LOC102600998	ATTGGAAACGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
<i>SEC3A</i> ¹	LOC102599118	GCTTGCACACGCCATATCAAT TGGATTTTACCACCTTC-CGCA

Примечание. ¹ – данные из [40, 41]. Праймеры разрабатывали на основе доступных в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) транскриптов генов у нескольких видов рода *Solanum* (включая картофель, томат и баклажан) и проверяли на специфичность (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>); последовательности праймеров разделены как минимум одним интроном. Для выравнивания последовательностей использовали пакет программ MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>).

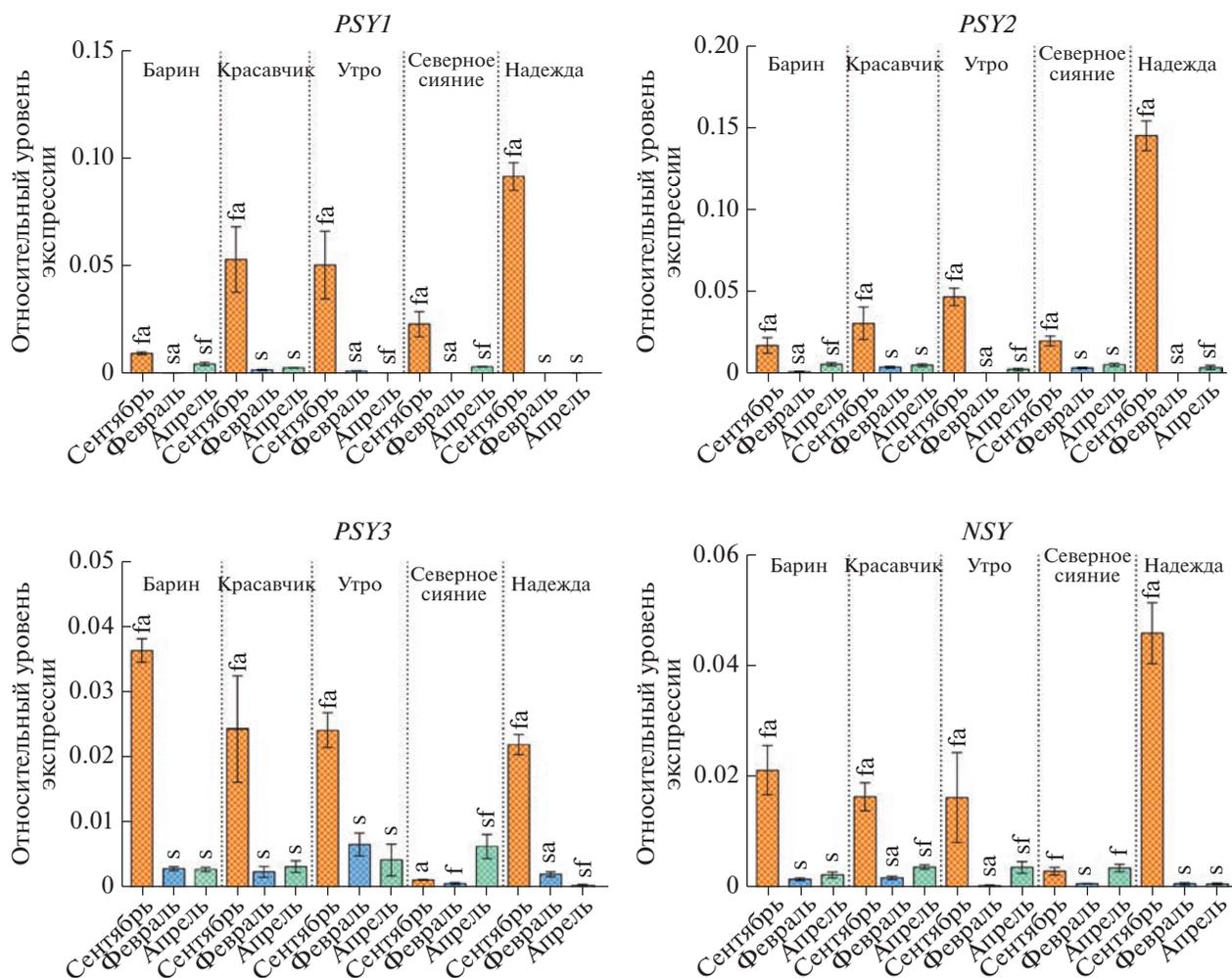


Рис. 2. Профиль экспрессии генов *PSY1*, *PSY2*, *PSY3* и *NSY* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель). Для рис. 2–6 буквами s, f и a над столбцами обозначено достоверное отличие ($p < 0.05$) конкретного значения экспрессии гена от значений для двух других месяцев внутри каждого образца (s – сентябрь, f – февраль, a – апрель).

Было показано, что в сентябре наиболее высокий уровень экспрессии генов характерен для клубней сорта Надежда, за исключением *PSY3* (выше у сорта Барин) и *LCYE* (выше у сортов Северное сияние и Утро). Самыми низкими уровнями отличался сорт Северное сияние, кроме генов *LCYE* (напротив, самый высокий уровень), *PSY1* и *NCED1* (ниже у сорта Барин) (рис. 2–5).

Профиль экспрессии всех анализируемых генов биосинтеза каротиноидов по мере хранения клубней характеризовался существенным снижением уровней транскриптов в феврале в сравнении с сентябрем, за некоторыми исключениями (рис. 2–5). А именно: неизменным остался уровень транскриптов *CRTISO*, *LCYB1* и *NCED1* у сорта Северное сияние, одновременно вырос уровень транскриптов *LCYE* и *NCED1* у сорта Барин (рис. 3, 5).

В период с февраля по апрель, уровень транскриптов генов менялся незначительно, однако статистически значимо (рис. 2–5). Так, в клубнях сорта Барин возросла экспрессия генов *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *VDE* и *ZDS* и упала – *Z-ISO*. В случае сорта Красавчик повысился уровень транскриптов *NSY*, *CRTISO*, *LCYB1*, *VDE*, *ZDS*, *Z-ISO*, *ZEP*, *LCYE*, *NCED2* и *NCED6*. Клубни сорта Утро характеризовались ростом экспрессии генов *PSY2*, *NSY*, *LCYB2*, *VDE*, *ZDS*, *Z-ISO* и *LCYE*, а также падением уровня *PSY1*. В случае сорта Северное сияние произошло повышение активности генов *PSY1*, *PSY3*, *NSY*, *LCYB1*, *LCYB2*, *VDE*, *ZDS*, *ZEP*, *LCYE*, *NCED2* и *NCED6*. В клубнях сорта Надежда поднялся уровень транскриптов *PSY2*, *PDS*, *LYCB1*, *VDE*, *ZDS* и *ZEP* и упал – *PSY3* (рис. 2–5).

Таким образом, мы наблюдали, за некоторым исключением, общую для всех сортов тенденцию к снижению уровня экспрессии анализируемых

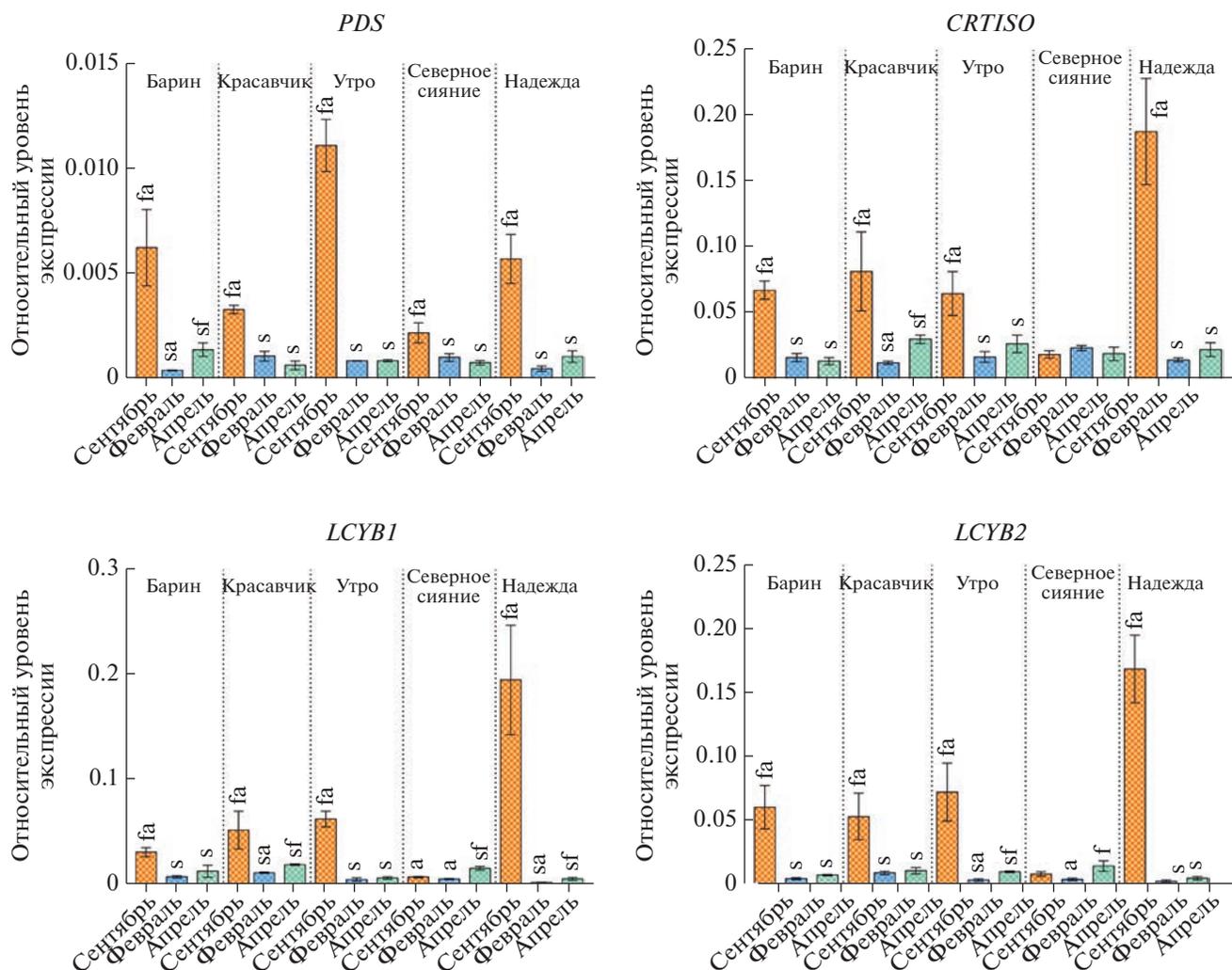


Рис. 3. Профиль экспрессии генов *PDS*, *CRTISO*, *LCYB1* и *LCYB2* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель).

генов в период с момента сбора урожая по февраль (низкотемпературное хранение в течение 3.5–4 мес.).

Определение профиля экспрессии генов, предположительно связанных с инициацией дифференцировки хромопластов

В тех же тканях, которые были использованы для определения содержания каротиноидов, был проведен анализ экспрессии двух генов, вовлеченных в инициацию дифференцировки хромопластов (*OR1* и *OR2*), в динамике длительного низкотемпературного хранения клубней (рис. 6).

Было показано, что в ткани клубней всех сортов присутствует мРНК *OR1* и *OR2* на сходном (между генами) уровне (~0.01–0.10) (рис. 6). По мере хранения уровень транскриптов *OR1* падал (сорта Барин, Утро и Северное сияние), оставал-

ся неизменным (сорт Красавчик) или возрастал (сорт Надежда). Ген *OR2* имел сходный с *OR1* профиль экспрессии, за исключением уровня транскриптов в клубнях сортов Северное сияние (не менялся) и Надежда (падал) (рис. 6).

С целью оценки возможных корреляций между уровнями транскриптов генов биогенеза каротиноидов и суммарным содержанием каротиноидов в клубнях сортов картофеля при длительном холодом хранении был проведен регрессионный анализ. В результате достоверная корреляция ($p < 0.05$) была обнаружена только в случае гена *PDS* (табл. S1).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе был охарактеризован профиль экспрессии генов ферментов биогенеза каротиноидов (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*,

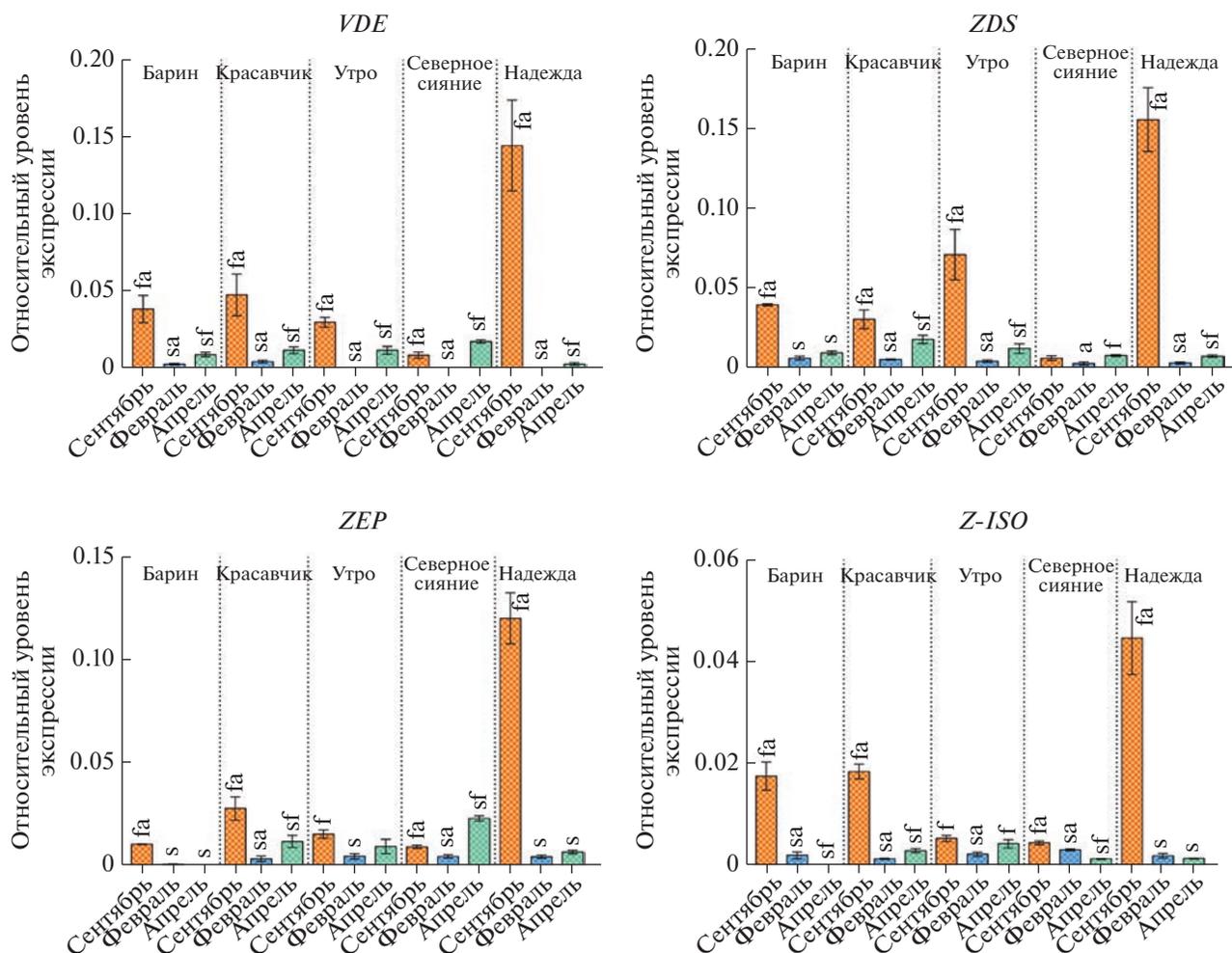


Рис. 4. Профиль экспрессии генов *VDE*, *ZDS*, *ZEP* и *Z-ISO* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель).

CRTISO, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2* и *NCED6*), а также генов, связанных с дифференцировкой хромопластов (*OR1* и *OR2*), в клубнях картофеля, хранящихся при температуре +3°C (в момент сбора урожая и спустя 3.5–4 и 7 мес. содержания при +3°C). Одновременно в клубнях было измерено суммарное содержание каротиноидов.

Выбранные для анализа пять сортов делились на образцы с клубневой мякотью кремовой (Надежда и Красавчик), светло-желтой (Барин и Утро) и сине-пестрой (Северное сияние) окраски (рис. S2). Это могло быть связано с относительным содержанием пигментов – каротиноидов (и, в случае сорта Северное сияние, дополнительно антоцианов синих оттенков), так как ранее показано, что и бледно-желтый, и белый цвет клубней согласуется с накоплением ксантофиллов (различные соотношения виолакантина, β-криптоксантина, лютеина, неоксантина и антраксантина) [33, 42, 43].

Анализ суммарного содержания каротиноидов показал отсутствие межсортных различий на момент сбора урожая, за исключением клубней сорта Утро, где значение оказалось примерно в 2 раза больше, чем у остальных четырех сортов (рис. 1), что согласовалось с более желтой окраской мякоти (рис. S2). При этом содержание каротиноидов за 7 мес. при +3°C (к апрелю) выросло (сорты Барин и Надежда), снизилось (сорты Утро и Красавчик) или не изменилось (сорт Северное сияние) (рис. 1). Учитывая стабильность содержания каротиноидов при 9-месячном хранении в холоде клубней сорта Désirée, при котором заметные различия наблюдаются только в уровнях отдельных каротиноидов [33], исследуемый показатель, по всей вероятности, зависит от генотипа. Повышение содержания каротиноидов может быть также связано с некоторым высушиванием клубней в процессе длительного хранения, поскольку в картофелехранилище ВНИИКХ показатели влажности не контролируются, хотя по современным нормам такой

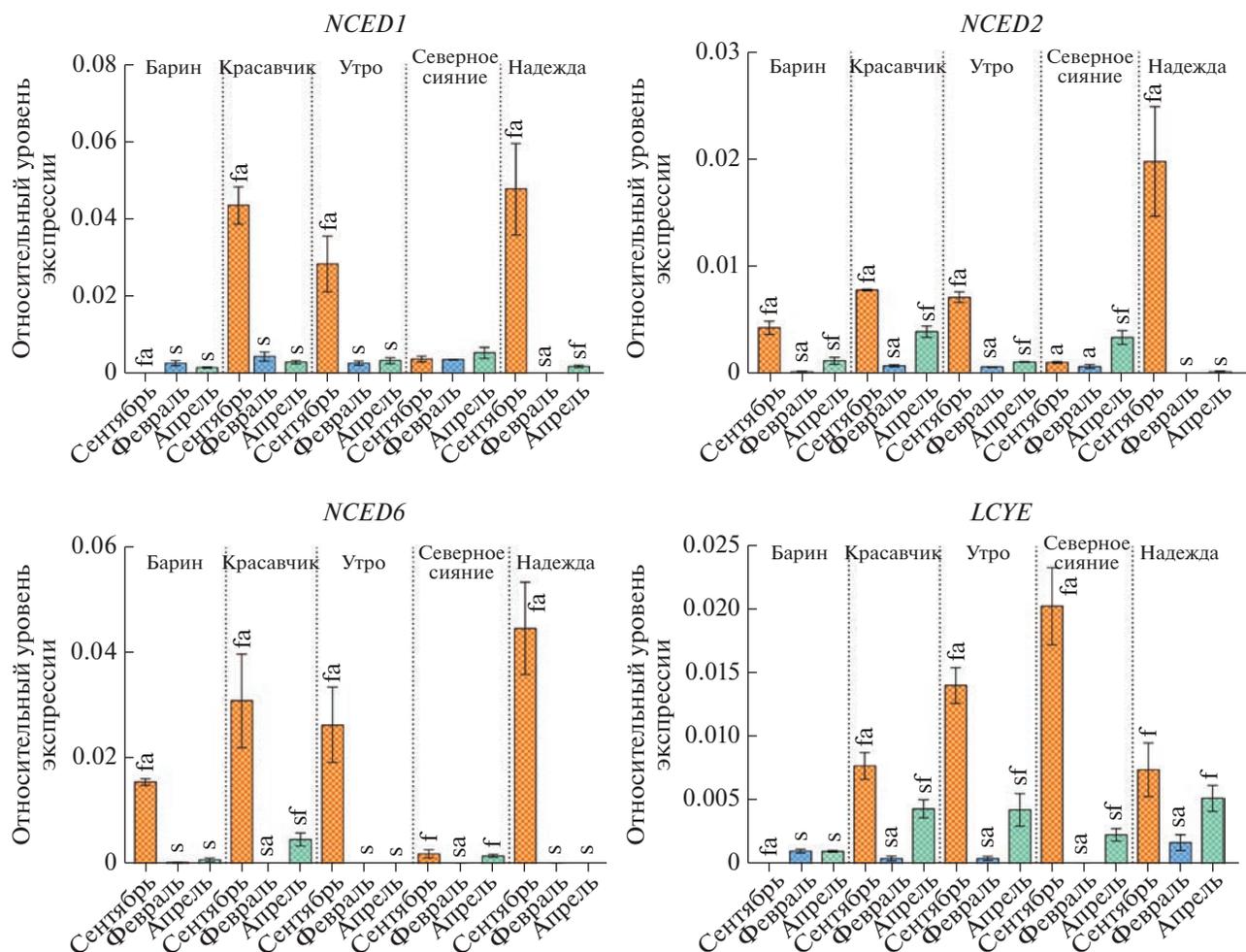


Рис. 5. Профиль экспрессии генов *NCED1*, *NCED2*, *NCED6* и *LCYE* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель).

контроль необходим во избежание, в частности, существенной потери клубнями влаги [32].

Значения суммы каротиноидов в клубнях анализируемых сортов (рис. 1) были сопоставлены с полученным профилем экспрессии генов биосинтеза каротиноидов (рис. 2–5), так как эти показатели считаются тесно связанными [1]. Ранее анализ экспрессии некоторых генов каротиногенеза в клубнях картофеля в динамике развития клубней [37], а также в свежесобранных клубнях [33, 34] продемонстрировал генотип-зависимость уровня транскриптов генов и отсутствие корреляций уровня с содержанием соответствующих типов каротиноидов. В настоящей работе экспрессия 16 генов биогенеза каротиноидов и апокаротиноидов была впервые определена в динамике длительного низкотемпературного хранения. В результате не было обнаружено зависимости между уровнями транскриптов отдельных генов и суммарным содержанием пигмента, за исключением корреляции для гена *PDS* (табл. S1), продукт которого (фи-

тоиндесатураза) катализирует первые стадии модификации предшественника каротиноидов 15-цис-фитоина [5]. Несмотря на то что для гена *PSY1* была показана прямая корреляция с суммой каротиноидов при исследовании растений различных видов с суперэкспрессией данного гена [10–14], наши результаты такой корреляции не показали (табл. S1). В согласии с исследованиями [34, 37] профили экспрессии генов носили генотип-специфичный характер. Следует отметить, что для всех сортов был характерен повышенный уровень транскриптов почти всех анализируемых генов в сентябре перед закладкой на хранение, в сравнении с февралем–апрелем. Это может свидетельствовать об активно протекающем биогенезе каротиноидов на момент сбора урожая и о состоянии физиологического покоя клубней при хранении. В то же время вариации экспрессии генов, относящихся к разным этапам пути, могут быть связаны с изменениями в типах каротиноидов, которые синтезируются и накапливаются в

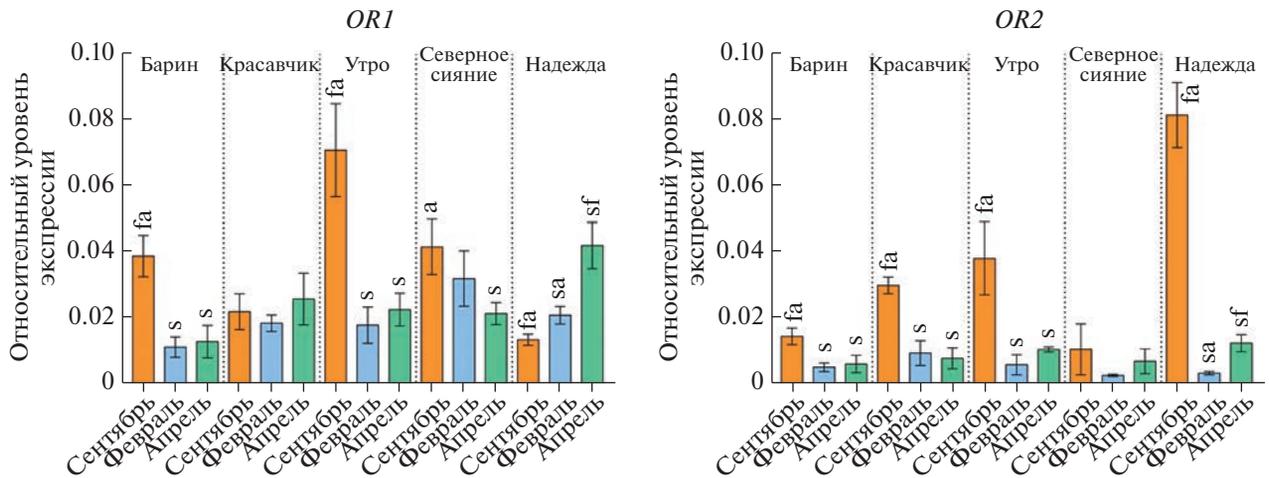


Рис. 6. Профиль экспрессии генов *OR1* и *OR2* в клубнях сортов Барин, Красавчик, Утро, Северное сияние и Надежда в динамике длительного низкотемпературного хранения (сентябрь, февраль, апрель).

процессе хранения клубней, как продемонстрировано в ранних исследованиях [33].

Интересно, что в клубнях обнаружались транскрипты всех трех генов *PSY*, кодирующих различные паралоги фитоинсинтазы (рис. 2). *PSY1* считается специфичным преимущественно для хромопластов [44]. Тем не менее суперэкспрессия *PSY1* значительно усиливает каротиногенез в клубнях картофеля [15], где хромопластов нет [4]. Ген *PSY2* функционирует, прежде всего, в хлоропластах фотосинтезирующей ткани [45], вместе с тем его суперэкспрессия приводит к значительному росту содержания каротиноидов в клубнях картофеля, при этом фермент локализуется в амилопластах [46]. Ген *PSY3* участвует в стрессовом ответе, способствуя синтезу апокаротиноидов в корнях растений [47]. Таким образом, присутствие мРНК всех трех генов в сопоставимых (между генами) количествах в клубнях сортов (рис. 2) может указывать на равноценное участие *PSY1* и *PSY2* в определении скорости биосинтеза каротиноидов в амилопластах, а также на реакцию свежесобраных клубней на стресс (погодные условия, патогены и др.) и ее снижение при хранении. Заметим, что в клубнях сорта Северное сияние наблюдался низкий (относительно других сортов) уровень транскриптов *PSY3* в сентябре и его рост по мере хранения (рис. 2). Сине-пестрая окраска клубней данного сорта (рис. S2) имеет антоциановую природу. С учетом известного участия антоцианов в ответе на абиотические стрессы, включая то, что растения с высоким содержанием антоцианов обладают повышенной стрессоустойчивостью [48], можно предположить, что в ответе на стресс в клубнях сорта Северное сияние участвуют, скорее, антоцианы, чем каротиноиды, и сильной активации *PSY3* не происходит.

Учитывая полученные уровни транскриптов генов *LCYB1*, *LCYB2* и *LCYE* (рис. 3, 5) и известное влияние ликопин-циклаза на соотношение β-каротин/α-каротин [16–20], можно предположить, что в случае сортов Барин и Северное сияние идет преимущественный синтез β,β-каротиноидов и ε,β-каротиноидов соответственно, тогда как в клубнях остальных трех сортов они могут синтезироваться в сопоставимых количествах.

Синтез АБК, играющей критическую роль в контроле физиологического покоя клубней [49], осуществляется диоксигеназами *NCED* с использованием β,β-каротиноидов 9-цис-виолаксантина и 9-цис-неоксантина в качестве субстратов [8, 9]. Присутствие в клубнях сортов транскриптов *NCED1*, *NCED2* и *NCED6* (рис. 5) свидетельствует о возможном синтезе АБК. Динамика экспрессии генов с сентября по февраль (рис. 5) согласуется с ранее показанным падением или со стабильностью уровней транскриптов *NCED1* и *NCED2* в клубнях картофеля спустя 5 мес. хранения в холоде в сравнении с моментом сбора урожая [49].

Кроме степени активности генов биосинтеза каротиноидов, на содержание данных пигментов влияет наличие структур, способных накапливать и хранить каротиноиды, а именно хромопластов и специфических липопротеиновых структур внутри них, с дифференцировкой которых связывают ген *OR* [29, 30]. Транскрипты обоих гомологов гена *OR* картофеля – *OR1* и *OR2* были обнаружены нами в сопоставимом (между генами) количестве в клубнях всех анализируемых сортов во всех анализируемых временных точках (рис. 6). Их присутствие было ожидаемым, поскольку активность фитоинсинтазы *PSY* обусловлена формированием белкового комплекса *PSY*–*OR*, в результате чего фермент приобретает каталитически активную форму, в то время как неассоциированный *PSY*

подвергается деградации протеазами Clp [50]. Интересно, что другой функцией *OR* является действие в образовании накапливающих каротиноиды структур [51]. При этом в клубнях картофеля хромопласты отсутствуют [2, 4] и образуются лишь в случае суперэкспрессии мутантного аллеля гена *OR B. oleracea* [30]. Исходя из этого, две вышеупомянутые функции *OR* могут быть разделены, и роли в образовании каротиноид-связывающих структур может способствовать присутствие мутации, изменяющей нужным образом укладку белка *OR*. Действительно, именно мутантный аллель *OR B. oleracea* сцеплен с образованием хромопластов [30]. Оранжевые и красные корнеплоды моркови содержат большое количество хромопластов благодаря присутствию мутантного аллеля *DcOR3^{Leu}* [29]. Также показано, что замена Arg на His в последовательности белка *OR* отвечает за оранжевую окраску мякоти плодов дыни *Cucumis melo* [52]. Аналогичная замена (R90H), внесенная в последовательность белка *OR Arabidopsis thaliana*, способствует появлению хромопластов и супернакоплению каротиноидов в трансгенном каллусе, не меняя при этом способность посттранскрипционно регулировать уровень белка *PSY* [53]. Можно предположить, что *OR1* и *OR2* картофеля осуществляют только первую функцию из вышеозначенных двух, а именно связываются с белками *PSY*, делая их каталитически активными. Косвенным подтверждением этому может быть зеленая окраска плодов картофеля, свидетельствующая об отсутствии хромопластов.

Таким образом, на примере пяти сортов картофеля нами было охарактеризовано влияние длительного холодного хранения клубней на активность 18 генов, участвующих в биогенезе (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP* и *NSY*) и катаболизме (*NCED1*, *NCED2* и *NCED6*) каротиноидов, а также дифференцировке хромопластов (*OR1* и *OR2*). Кроме того, определено суммарное содержание каротиноидов в клубнях в динамике хранения и проведена оценка возможной корреляции между полученными биохимическими и экспрессионными данными. Присутствие мРНК *OR1* и *OR2* на всех этапах хранения позволило предположить структурозависимое разделение двух ролей *ORANGE*, касающихся участия в инициации дифференцировки хромопластов и функциональной активации фитоинсинтазы *PSY*. Снижение (за некоторым исключением) уровня транскриптов анализируемых генов биосинтеза и катаболизма каротиноидов спустя 3.5–4 и 7 мес. со времени закладки клубней на низкотемпературное хранение предположительно является свидетельством периода физиологического покоя. Показанное изменение суммарного содержания каротиноидов при длительном холодном хранении

указывает на возможную зависимость данного параметра от генотипа сорта.

Таким образом, в работе впервые была определена динамика изменения уровня транскриптов большинства генов каротиногенеза в процессе длительного холодного хранения клубней, что существенно дополняет известные данные по экспрессионному ответу этих генов на низкотемпературный стресс. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований процессов, происходящих в клубнях картофеля при хранении, например для поиска корреляций содержания конкретных каротиноидов с экспрессией генов соответствующих этапов пути.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФНТП развития сельского хозяйства РФ на 2017–2025 гг. (подпрограмма “Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации”).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Howitt C.A., Pogson B.J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues // *Plant, Cell and Environment*. 2006. V. 29. P. 435–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01492.x>
2. Lopez A.B., Van Eck J., Conlin B.J. et al. Effect of the cauliflower *Or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. № 2. P. 213–223. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm299>
3. Wurtzel E.T. Chapter five genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis // *Recent Adv. Phytochemistry*. 2004. V. 38. P. 85–110. [https://doi.org/10.1016/S0079-9920\(04\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S0079-9920(04)80006-6)
4. Brown C.R., Culley C., Yang C.P. et al. Variation of anthocyanin and carotenoid contents and associated antioxidant values in potato breeding lines // *J. Am. Soc. Horticultural Sci.* 2005. V. 130. P. 174–180. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.174>
5. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color // *Subcell. Biochem.* 2016. V. 79. P. 35–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
6. Dhar M.K., Mishra S., Bhat A. et al. Plant carotenoid cleavage oxygenases: structure-function relationships and role in development and metabolism // *Brief Funct. Genomics*. 2020. V. 19. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz037>
7. Huang X., Shi H., Hu Z. et al. ABA is involved in regulation of cold stress response in Bermudagrass // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01613>

8. Nambara E., Marion-Poll A. Abscisic acid biosynthesis and catabolism // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005. V. 56. P. 165–185.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046>
9. Cutler S.R., Rodriguez P.L., Finkelstein R.R. et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010. V. 61. P. 651–679.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
10. Fujisawa M., Watanabe M., Choi S.K. et al. Enrichment of carotenoids in flaxseed (*Linum usitatissimum*) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene *crtB* // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 105. № 6. P. 636–641.
<https://doi.org/10.1263/jbb.105.636>
11. Maass D., Arango J., Wüst F. et al. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels // *PLoS One.* 2009. V. 4.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006373>
12. Naqvi S., Zhu C., Farre G. et al. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways // *PNAS.* 2009. V. 106. № 19. P. 7762–7767.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0901412106>
13. Ampomah-Dwamena C., Tomes S., Thrimawithana A.H. et al. Overexpression of *PSYI* increases fruit skin and flesh carotenoid content and reveals associated transcription factors in apple (*Malus × domestica*) // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.967143>
14. Fraser P.D., Romer S., Shipton C.A. et al. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner // *PNAS.* 2002. V. 99. № 2. P. 1092–1097.
<https://doi.org/10.1073/pnas.241374598>
15. Ducreux L.J., Morris W.L., Hedley P.E. et al. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of beta-carotene and lutein // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. № 409. P. 81–89.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri016>
16. Diretto G., Tavazza R., Welsch R. et al. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase // *BMC Plant Biol.* 2006. V. 6.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-13>
17. Harjes C.E., Rocheford T.R., Bai L. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification // *Science.* 2008. V. 319. № 5861. P. 330–333.
<https://doi.org/10.1126/science.1150255>
18. Yu B., Lydiate D.J., Young L.W. et al. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase // *Transgenic Res.* 2008. V. 17. № 4. P. 573–585.
<https://doi.org/10.1007/s11248-007-9131-x>
19. Zunjare R.U., Chhabra R., Hossain F. et al. Molecular characterization of 5' UTR of the *lycopen epsilon cyclase* (*lycE*) gene among exotic and indigenous inbreds for its utilization in maize biofortification // *3 Biotech.* 2018. V. 8. № 1.
<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1100-y>
20. Zhu K., Zheng X., Ye J. et al. Building the synthetic biology toolbox with enzyme variants to expand opportunities for biofortification of provitamin A and other health-promoting carotenoids // *J. Agric. Food Chem.* 2020. V. 68. № 43. P. 12048–12057.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04740>
21. Ye X., Al-Babili S., Klöti A. et al. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm // *Science.* 2000. V. 287. № 5451. P. 303–305.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5451.303>
22. Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S. et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 4. P. 482–487.
<https://doi.org/10.1038/nbt1082>
23. D'Ambrosio C., Giorio G., Marino I. et al. Virtually complete conversion of lycopene into β -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato *lycopen beta-cyclase* (*tlcy-b*) cDNA // *Plant Science.* 2004. V. 166. P. 207–214.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.09.015>
24. Gerjets T., Sandmann G. Ketocarotenoid formation in transgenic potato // *J. Exp. Bot.* 2006. V. 57. № 14. P. 3639–3645.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erl103>
25. Arnoux P., Morosinotto T., Saga G. et al. A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell.* 2009. V. 21. № 7. P. 2036–2044.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.068007>
26. Pastori G.M., Kiddle G., Antoniw J. et al. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling // *Plant Cell.* 2003. V. 15. № 4. P. 939–951.
<https://doi.org/10.1105/tpc.010538>
27. Tran B.Q., Tran L.H., Kim S.J. et al. Altered regulation of porphyrin biosynthesis and protective responses to acifluorfen-induced photodynamic stress in transgenic rice expressing *Bradyrhizobium japonicum* Fe-chelatase // *Pestic. Biochem. Physiol.* 2019. V. 159. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.017>
28. Zita W., Bressoud S., Glauser G. et al. Chromoplast plastoglobules recruit the carotenoid biosynthetic pathway and contribute to carotenoid accumulation during tomato fruit maturation // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277774>
29. Zhang Y.M., Wu R.H., Wang L. et al. Plastid diversity and chromoplast biogenesis in differently coloured carrots: role of the *DcOR3^{Leu}* gene // *Planta.* 2022. V. 256(6). Article 104.
<https://doi.org/10.1007/s00425-022-04016-9>
30. Lu S., Van Eck J., Zhou X. et al. The cauliflower *Org* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation // *Plant Cell.* 2006. V. 18. № 12. P. 3594–3605.
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.046417>
31. Sierra J., McQuinn R.P., Leon P. The role of carotenoids as a source of retrograde signals: Impact on plant devel-

- opment and stress responses // *J. Exp. Bot.* 2022. V. 73. № 21. P. 7139–7154.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erac292>
32. *Eltawil M.A., Samuel D.K., Singhal O.P.* Potato storage technology and store design aspects // *Agricultural Engineering Intern.: CIGR J.* 2006. V. VIII. № 11. P. 1–18.
 33. *Brown C.R., Edwards C.G., Yang C.P. et al.* Orange flesh trait in potato – inheritance and carotenoid content // *J. Am. Soc. Horticultural Science.* 1993. V. 118. P. 145–150.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.118.1.145>
 34. *Payyavula R.S., Navarre D.A., Kuhl J.C. et al.* Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression // *BMC Plant Biol.* 2012. V. 12. 39.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-39>
 35. *Fogelman E., Oren-Shamir M., Hirschberg J. et al.* Nutritional value of potato (*Solanum tuberosum*) in hot climates: anthocyanins, carotenoids, and steroidal glycoalkaloids // *Planta.* 2019. V. 249. № 4. P. 1143–1155.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-03078-y>
 36. *Haider M.W., Nafees M., Ahmad I. et al.* Postharvest dormancy-related changes of endogenous hormones in relation to different dormancy-breaking methods of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.945256>
 37. *Wiberley-Bradford A.E., Busse J.S., Jiang J. et al.* Sugar metabolism, chip color, invertase activity, and gene expression during long-term cold storage of potato (*Solanum tuberosum*) tubers from wild-type and vacuolar invertase silencing lines of Katahdin // *BMC Res. Notes.* 2014. V. 7. Article 801.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-801>
 38. *Efremov G.I., Slugina M.A., Shchennikova A.V. et al.* Differential regulation of phytoene synthase PSY1 during fruit carotenogenesis in cultivated and wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*) // *Plants.* 2020. V. 9. № 9.
<https://doi.org/10.3390/plants9091169>
 39. *Filyushin M.A., Dzhos E.A., Shchennikova A.V. et al.* Dependence of pepper fruit colour on basic pigments ratio and expression pattern of carotenoid and anthocyanin biosynthesis genes // *Rus. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 1054–1062.
<https://doi.org/10.31857/S0015330320050048>
 40. *Lopez-Pardo R., de Galarreta J.I.R., Ritter E.* Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress // *Mol. Breeding.* 2013. V. 31. № 1. P. 39–45.
<https://doi.org/10.1007/s11032-012-9766-z>
 41. *Tang X., Zhang N., Si H. et al.* Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress // *Plant Methods.* 2017. V. 13. № 85.
<https://doi.org/10.1186/s13007-017-0238-7>
 42. *Nesterenko S., Sink K.C.* Carotenoid profiles of potato breeding lines and selected cultivars // *Hortscience.* 2003. V. 38. P. 1173–1177.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.6.1173>
 43. *Morris W.L., Ducreux L., Griffiths D.W. et al.* Carotenogenesis during tuber development and storage in potato // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. № 399. P. 975–982.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh121>
 44. *Bartley G.E., Viitanen P.V., Bacot K.O. et al.* A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 5036–5039.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42724-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42724-X)
 45. *Bartley G.E., Scolnik P.A.* cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 25718–25721.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)74448-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)74448-2)
 46. *Pasare S., Wright K., Campbell R. et al.* The sub-cellular localisation of the potato (*Solanum tuberosum* L.) carotenoid biosynthetic enzymes, CrtRb2 and *PSY2* // *Protoplasma.* 2013. V. 250. № 6. P. 1381–1392.
<https://doi.org/10.1007/s00709-013-0521-z>
 47. *Stauder R., Welsch R., Camagna M. et al.* Strigolactone levels in dicot roots are determined by an ancestral symbiosis-regulated clade of the *PHYTOENE SYNTHASE* gene family // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00255>
 48. *Naing A.H., Kim C.K.* Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses // *Physiol. Plant.* 2021. V. 172. № 3. P. 1711–1723.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13373>
 49. *Destefano-Beltrán L., Knauber D., Huckle L. et al.* Effects of postharvest storage and dormancy status on ABA content, metabolism, and expression of genes involved in ABA biosynthesis and metabolism in potato tuber tissues // *Plant Mol. Biol.* 2006. V. 61. № 4-5. P. 687–697.
<https://doi.org/10.1007/s11103-006-0042-7>
 50. *Welsch R., Zhou X., Yuan H. et al.* Clp protease and OR directly control the proteostasis of phytoene synthase, the crucial enzyme for carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis* // *Mol. Plant.* 2018. V. 11. № 1. P. 149–162.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.003>
 51. *Osorio C.E.* The role of *Orange* gene in carotenoid accumulation: manipulating chromoplasts toward a colored future // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01235>
 52. *Tzuri G., Zhou X., Chayut N. et al.* A ‘golden’ SNP in *CmOr* governs the fruit flesh color of melon (*Cucumis melo*) // *Plant J.* 2015. V. 82. P. 267–279.
<https://doi.org/10.1111/tjpi.12814>
 53. *Yuan H., Owsiany K., Sheeja T.E. et al.* A single amino acid substitution in an *ORANGE* protein promotes carotenoid overaccumulation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. № 1. P. 421–431.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00971>

Таблица S1. Значения коэффициентов корреляции Пирсона (r) и множественной корреляции (R^2), а также p -value, полученные при оценке зависимости суммарного содержания каротиноидов от уровней экспрессии отдельных генов пути биосинтеза каротиноидов в клубнях сортов картофеля при длительном холодовом хранении

Коэффициент	<i>PDS</i>	<i>CRTISO</i>	<i>LCYB1</i>	<i>LCYB2</i>	<i>PSY1</i>	<i>PSY2</i>	<i>PSY3</i>	<i>NSY</i>	<i>VDE</i>	<i>ZDS</i>	<i>ZEP</i>	<i>Z-ISO</i>	<i>LCYE</i>	<i>NCED1</i>	<i>NCED2</i>	<i>NCED6</i>
r	0.52	0.08	0.07	0.12	0.23	0.11	0.16	0.06	-0.01	0.15	-0.02	-0.05	0.37	0.23	0.08	0.21
R^2	0.27	0.007	0.005	0.015	0.055	0.013	0.027	0.003	<0.0001	0.022	<0.0004	0.003	0.14	0.053	0.006	0.044
p -value	0.047	0.763	0.806	0.654	0.399	0.683	0.559	0.834	0.97	0.594	0.943	0.846	0.169	0.408	0.78	0.453

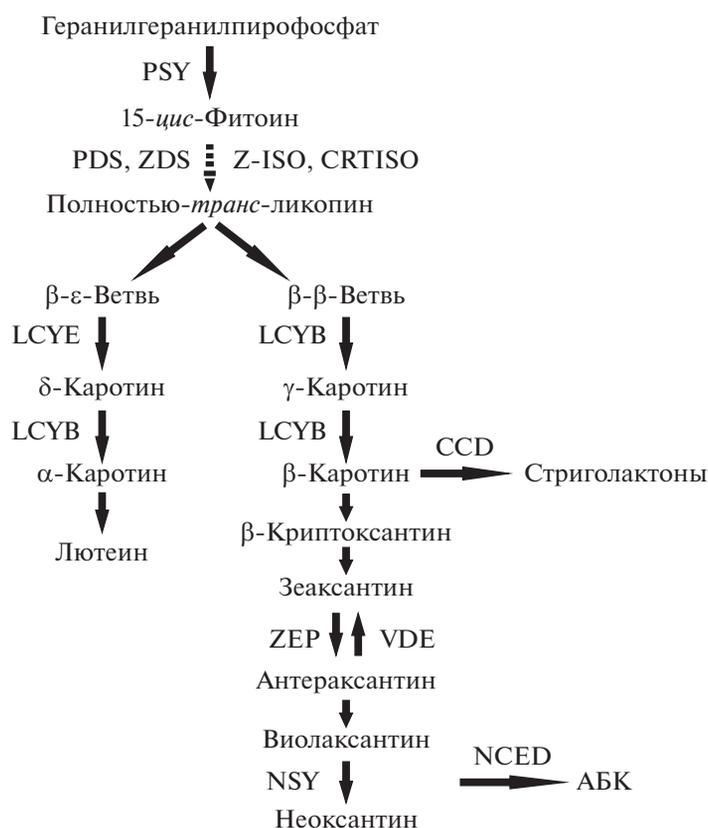


Рис. S1. Схематическое изображение пути биосинтеза каротиноидов. Фитоинсинтаза (PSY) катализирует конденсацию двух молекул геранилгеранилпирофосфата (GGPP) в 15-цис-изомер фитоина (бесцветен). Далее четыре последовательные реакции десатурации и изомеризации приводят к образованию ликопина (красный). Первые две десатурации катализируются фитоиндесатуразой (PDS) и последние две – ζ-каротиндесатуразой (ZDS). 15-цис-ζ-Каротинизомераза (Z-ISO) и каротиноид-цис-транс-изомераза (CRTISO) катализируют цис-транс-превращение продукта PDS в субстрат для ZDS и поли-цис-ликопина в транс-ликопин соответственно. Дальнейшая циклизация ликопина представляет собой первую точку ветвления каротиноидного пути. Ликопин-β-циклаза (LCYB) и ликопин-ε-циклаза (LCYE) конкурируют за ликопин в качестве субстрата, что приводит к каротиноидам либо с β/β-, либо с ε/β-иононовыми кольцами. Фермент LCYB катализирует циклизацию одного конца линейной молекулы ликопина с образованием γ-каротина и далее формирование второго β-кольца с образованием β-каротина. LCYE вводит одно ε-кольцо в ликопин с образованием δ-каротина, а последующая циклизация с помощью LCYB генерирует α-каротин. Из α- и β-каротина образуются ксантофиллы: лютеин (ε,β-ветвь) и зеаксантин (β,β-ветвь). Зеаксантин эпоксируется зеаксантинэпоксидазой (ZEP), что приводит к синтезу антраксантина, виолаксантина и неоксантина; обратная реакция осуществляется виолаксантиндеэпоксидазой (VDE). Виолаксантин с помощью неоксантинсинтазы (NSY) превращается в неоксантин [5]. β,β-Каротиноиды могут расщепляться до апокаротиноидов (абсцизовой кислоты (АБК) или стриголактонов) с помощью каротиноид-расщепляющих диоксигеназ [6]. Так, первую стадию пути биосинтеза АБК специфически катализируют 9-цис-эпоксикаротиноид-диоксигеназы (NCED) с использованием 9-цис-виолаксантина и 9-цис-неоксантина в качестве субстратов [8, 9]. В схеме указаны ферменты, гены которых использованы в настоящей работе.



Рис. S2. Фотографии клубней (целиком и в разрезе): *S. tuberosum* сорта Барин (каталожный номер в Госсортреестре – 8854151; <https://teestr.gossortrf.ru/>; кожура светло-бежевая, мякоть светло-желтая), Утро (9253216; кожура светло-бежевая, мякоть светло-желтая), Красавчик (9553926; кожура красная, мякоть светло-кремовая), Северное сияние (8558886; кожура синяя, мякоть сине-пестрая), Надежда (9463920; кожура светло-бежевая, мякоть кремовая).

The Content of Carotenoids and the Expression Profile of Carotenoid Biogenesis Genes during Long-Term Cold Storage of Potato Tubers

A. M. Kulakova^a, *, A. V. Shchennikova^a, and E. Z. Kochieva^a

^aInstitute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: kulakova_97@mail.ru

Carotenoids are secondary metabolites that are synthesized and stored in all types of plant plastids. These pigments play a significant role in protection against oxidative stress, as well as in the color of flowers and sink organs. Tubers of potato *Solanum tuberosum* L. synthesize carotenoids, including during post-harvest storage. The state of physiological dormancy and cold stress response are controlled, among other things, by abscisic acid (ABA), which is an apocarotenoid. In this study, we analyzed the expression of carotenoid biogenesis pathway genes (*PSY1*, *PSY2*, *PSY3*, *PDS*, *ZDS*, *Z-ISO*, *CRTISO*, *LCYB1*, *LCYB2*, *LCYE*, *VDE*, *ZEP*, *NSY*, *NCED1*, *NCED2*, and *NCED6*), as well as genes putatively involved in initiation of chromoplast differentiation (*OR1* and *OR2*), in the dynamics of long-term cold storage (September, February, April) of tubers of potato cultivars Barin, Utro, Krasavchik, Sevemoe siyanie and Nadezhda. It was shown that *OR1*, and *OR2* mRNAs are present in tubers of all cultivars at all stages of storage. The expression profile of all analyzed carotenoid biosynthesis genes during tuber storage was characterized by a significant decrease in transcript levels in February compared to September, with some exceptions. In the period from February to April, the level of gene transcripts changed insignificantly. The biochemical analysis of the carotenoid content in the dynamics of cold storage showed that at the time of harvesting, the highest carotenoid content was in tubers of the cv. Utro; tubers of other cultivars were characterized by a similar amount of carotenoids. During storage from September to April, the total carotenoids changed in a genotype-dependent manner without any trend common to all cultivars.

Keywords: *Solanum tuberosum*, potato cultivars, tuber storage, carotenoid biosynthesis, chromoplasts, gene expression.

ХРОМОСОМНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНА *b-Amy-A1* И РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЕГО АЛЛЕЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ© 2023 г. В. П. Нецветаев^{1, 2, *}, Я. О. Козелец¹, А. П. Ащеулова^{1, 2},
А. В. Петренко¹, О. В. Акиншина¹¹Белгородский федеральный аграрный научный центр Российской академии наук, Белгород, 308001 Россия²Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

*e-mail: v.netsvetaev@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.01.2023 г.

После доработки 06.02.2023 г.

Принята к публикации 07.02.2023 г.

Проведен анализ хромосомной локализации гена *b-Amy-A1*, контролирующего синтез изоферментов бета-амилазы пшеницы, путем оценки сцепления с маркерным геном *B1* (безостость), расположенным в длинном плече хромосомы 5A. Результаты получены на основе исследования F_2 и $F_{\rightarrow\infty}$ Delta × Selection 2092. Лocus *b-Amy-A1* показал сцепление с геном *B1* величиной в $6.55 \pm 2.10\%$ рекомбинации. Параллельно идентифицированы аллели локуса *Rht8*, обуславливающего низкорослость растений, и установлено его сцепление с геном *C* (плотноколосость) в $22.59 \pm 6.28\%$ (F_2) и $24.22 \pm 1.18\%$ ($F_{\rightarrow\infty}$) рекомбинации в хромосоме 2D. Сорт Delta несет аллель *Rht8a*, а образец Selection 2092 – аллель *Rht8c*. Исследовали коллекцию сортов озимой мягкой пшеницы, созданных и районированных в России. Отобранные сорта несли идентичные аллели *b-Amy-B1a* и *b-Amy-D1a* локусов хромосом 4В и 4D. В то же время сорта отличались наиболее распространенными аллелями *b-Amy-A1a* и *b-Amy-A1b* хромосомы 5A. Установлено, что в направлении с юга на север европейской части России увеличивается частота аллеля *b-Amy-A1a* с 24.2% (Северный Кавказ) до 75.0% (Московская–Ульяновская области). Соответственно частота альтернативного аллеля *b-Amy-A1b* уменьшалась с 75.8% (Северный Кавказ) до 25.0% (Московская–Ульяновская области). В Ростовской обл. соотношение встречаемости аллеля *b-Amy-A1a* к *b-Amy-A1b* составляло 46.7 : 53.3%. В то же время уже в Центрально-Черноземном регионе проявилось значительное доминирование аллеля *b-Amy-A1a* над *b-Amy-A1b*. Использование коллекции сортов как популяции $F_{\rightarrow\infty}$ продемонстрировало сцепление *b-Amy-A1* с *B1* величиной в $5.56 \pm 1.90\%$ рекомбинации.

Ключевые слова: мягкая пшеница, бета-амилаза, изоферменты, генетический контроль, хромосомная локализация, маркерные гены.

DOI: 10.31857/S001667582307007X, EDN: QKKYRQ

Среди сортов озимой мягкой пшеницы наиболее широко распространены зимотипы бета-амилазы А и В [1]. Изоферменты этого фермента контролируются тремя локусами: *b-Amy-A1*, *b-Amy-B1* и *b-Amy-D1*, расположенными соответственно в хромосомах 5AL, 4BL и 4DL [2–5]. Различия между зимотипами бета-амилазы А и В носили моногенный характер [1]. Позднее было показано, что различия в медленно подвижной зоне зимограмм этого фермента обусловлены аллелями гена *b-Amy-A1* [6]. Учитывая эти сведения, одной из целей исследования было установление хромосомного контроля, обуславливающего различия между зимотипами А и В бета-амилазы. Другой целью было выявление закономерностей в распространении аллелей, контролирующих варианты А и В данного фермента, в европейской части России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для идентификации хромосомы, ответственной за синтез изоферментов бета-амилазы типа А и В, хромосома 5A маркировалась генами *B1/b1* (безостость vs. остистость). Безостость колоса контролируется доминантным геном *B1*, расположенным в длинном плече хромосомы 5A [7, 8]. В качестве родителей использовались сорта озимой пшеницы Delta и Selection 2092. Материнская форма Delta имела рост 92 см, характеризовалась остистым колосом и была рыхлоколосой. Отцовский родитель Selection 2092 имел рост 85 см, был безостым и плотноколосым. По изоферментному составу бета-амилазы родители различались так, как представлено на рис. 1. Соответственно Delta имеет зимотип А, а Selection 2092 – зимотип В.

Учитывая, что родительские формы различались и по другим качественным признакам, оценивали

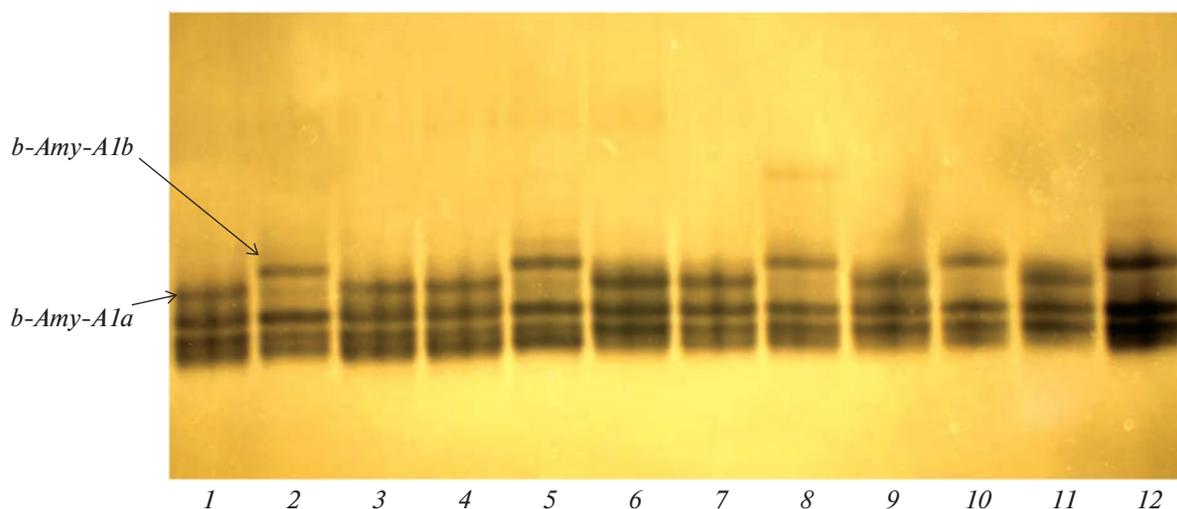


Рис. 1. Типы зимограмм бета-амилазы родителей Delta (1) и Selection 2092 (2), а также гомозиготного потомства F_{∞} от их скрещивания (3–12). Стрелками показаны изоферменты бета-амилазы, контролируемые хромосомой 5A. Аллели *b-Amy-A1b* (Selection 2092) и *b-Amy-A1a* (Delta).

также их генетический контроль. Известно, что плотность колоса у пшеницы контролируется доминантным геном *C*, который локализован в длинном плече хромосомы 2D [9, 10]. Низкорослость пшеницы контролируется целым рядом генов, обозначенных символом *Rht*, и делится на генотипы нечувствительные к гиббереллину, которые контролируют локусы *Rht-B1*, *Rht-D1*, и чувствительные на гиббереллин, определяемые генами *Rht4–Rht22* [2].

β -Амилазу выделяли из зрелых предварительно раздавленных плоскогубцами зерен. В пробирки с раздавленными зерновками добавляли по 250 мкл 3%-ного раствора Na_2SO_3 и оставляли на ночь. После измельчения зерен в пробирках палочкой из нержавеющей стали полученную суспензию центрифугировали 4 мин при 10 000 об./мин. Затем в чистые пробирки отбирали по 10 мкл надосадочной жидкости и приливали по 10 мкл раствора, содержащего 2%-ный β -меркаптоэтанол, 40%-ную сахарозу и 0.03%-ный бромфеноловый синий. В стартовые ячейки геля наносили по 5 мкл экстракта. Условия электрофореза и состав компонентов геля подобны ранее описанным для ячменя [11]. Разделяющий гель содержал: акриламид 4.88 г, метиленбисакриламид 130 мг, трис 162.5 мг, глицин 0.98 г, персульфат аммония 41 мг, воду дистиллированную – до 65 мл, ТЕМЕД 24 мкл. В состав 1 л электродного буфера (рН 8.3) входило 1.2 г трис и 5 г глицина. Электрофорез вели при напряжении 300 В. Деление прекращали после выхода 1.5 меток красителя (1.5 ч). Инкубацию амилаз вели в ацетатном буфере, рН 5.7. Ацетатный буфер содержал 2.7 г уксусно-кислого натрия, 50.3 мл 0.2 М уксусной кислоты и доводился водой до 300 мл. В этот раствор добавляли 3–5 г

гидролизованного картофельного крахмала, и данная взвесь доводилась до кипения при постоянном размешивании. Время инкубации 20–25 мин. Все работы проводили при комнатной температуре. По окончании инкубации гелевые пластины промывали проточной водой и окрашивали раствором йода в йодном калии, содержащем KI – 2.5 г, I (кристалл.) – 1.3 г, ТХУ – 25.2 г, воду – до 500 мл.

Для оценки сцепления использовали χ^2 -тест [12, 13]. Величину рекомбинации определяли методом максимального правдоподобия [14]. Оценку сцепления на основе гомозиготных популяций старших поколений определяли по формулам, представленным ранее [15, 16].

Частоты аллелей рассчитывались из условий: если сорт имеет один аллель, то его количество составляет 1, а если сорт гетерогенен и несет два аллеля, то количество каждого аллеля составляло 0.5. Ошибки оценки частот генов определяли для диаллельного распределения, используя известные формулы, описанные П.Ф. Рокицким [12]. Существенность различий между частотами определяли по критерию Стьюдента [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты генетического анализа по некоторым морфологическим признакам в F_2 Delta \times Selection 2092 представлены в табл. 1.

Как видно, рост растений (*Rht/rht*) наследовался независимо к признаку, определяющему безостость vs. остистость колоса (*B1/b1*). То же касается признаков плотноколосость vs. рыхлоколосость (*C/c*), которые также наследовались независимо. Проявление данных признаков иллюстрирует рис. 2.

Таблица 1. Анализ комбинации F₂ Delta × Selection 2092 по морфологическим признакам

Символы аллелей	Фенотипические классы в F ₂ (тестирование по F ₃)				Размер выборки	χ ² _L	Рекомбинация, %
		BB	Bb	bb			
$\frac{A}{a} \times \frac{B}{b}$							
$\frac{Rht}{rht} \times \frac{B1}{b1}$	A- aa	10 3	19 4	13 7	56	2.13	Независимая
$\frac{Rht}{rht} \times \frac{C}{c}$	A- aa	6 9	22 4	14 1	56	13.81	22.59 ± 6.28
$\frac{B1}{b1} \times \frac{C}{c}$	AA Aa aa	4 5 6	7 10 9	2 8 5	56	1.75	Независимая

В то же время обнаружено сцепление между признаками, определяющими рост растений и плотность колоса. Следовательно, локус *rht* расположен в хромосоме 2D на расстоянии 22.59 ± ± 6.28% рекомбинации от гена *C* (плотный колос). Судя по сводке генов, определяющих высоту растений пшеницы [2], данное расщепление обусловлено различиями в аллелях гена *Rht8*, распо-

ложенного в коротком плече хромосомы 2D [17, 18]. Учитывая фенотипическое проявление высоты растений по результатам генетического анализа, можно заключить, что сорт Delta несет ген *Rht8a*, расположенный в хромосоме 2D. Другой родитель Selection 2092 является носителем аллеля *Rht8c*, снижающего высоту растений пшеницы приблизительно на 7 см [19].



Рис. 2. Расщепление по типам колоса в F→∞ Delta × Selection 2092 (1–4): 1 – тип колоса, характерен для Selection 2092; 4 – тип колоса, характерен для сорта Delta.

Таблица 2. Генетический анализ комбинации $F_{\rightarrow\infty}$ Delta \times Selection 2092

Символы аллелей	Фенотипические классы в F_4			Размер выборки	χ^2_L	Рекомбинация, %
		BB	bb			
$\frac{A}{a} \times \frac{B}{b}$						
$\frac{C}{c} \times \frac{Rht8a}{Rht8c}$	AA aa	35 20	11 29	95	11.47	24.22 \pm 1.18
$\frac{B1}{b1} \times \frac{Rht8a}{Rht8c}$	AA aa	25 30	17 23	95	0.01	Независимая
$\frac{B1}{b1} \times \frac{C}{c}$	AA aa	19 27	23 26	95	0.27	Независимая
$\frac{B1}{b1} \times \frac{b-Amy-A1a}{b-Amy-A1b}$	AA aa	38 7	4 46	95	56.10	6.55 \pm 2.10

Генетический анализ данной комбинации скрещивания был продолжен в более старших поколениях самоопыления ($F_{\rightarrow\infty}$). Результаты представлены в табл. 2.

Самоопыляющиеся популяции более удобны тем, что являются гомозиготными, а отсутствие гетерозигот позволяет избежать возможных ошибок при классификации фенотипов. Более того, отсутствие гетерозигот увеличивает информативность таких выборов. Данный генетический анализ подтвердил сцепление генов *C* и *Rht8*. Полученная величина сцепления между этими генетическими факторами (24.22 \pm 1.18%) близка к оценкам, полученным по результатам анализа F_2 (табл. 1), – 22.59 \pm 6.28%. Представленная популяция $F_{\rightarrow\infty}$ Delta \times Selection 2092 подтвердила независимость наследования генов *B1* и *Rht8a*, а также *B1* и *C* (табл. 2).

Учитывая различия по зимотипам бета-амилазы родительских форм Delta и Selection 2092 (рис. 1), провели генетический анализ наследования данных вариантов фермента. Аллель, обуславливающий наличие более быстрого компонента бета-амилазы в медленно подвижной зоне зимограммы, обозначили символом *b-Amy-A1a*, а более медленного в этой зоне – *b-Amy-A1b*. Полученное соотношение гомозиготных фенотипов в $F_{\rightarrow\infty}$ по аллелям *b-Amy-A1a* и *b-Amy-A1b* составило 45 : 50 (табл. 2), что соответствует моногенному наследованию ($\chi^2_{1;1} = 0.16$; $P > 0.50$). Данные зимотипы обнаружили сцепление с геном *B1*. Так, фенотипы, несущие аллель *b-Amy-A1b*, как правило, были безостыми; наоборот, носители аллеля *b-Amy-A1a* чаще были остистыми. Величина сцепления локусов *b-Amy-A1* и *B1* составила 6.55 \pm 2.10% (табл. 2).

Следовательно, различия в изоферментах бета-амилазы, несущих зимотипы А и В, обусловлены аллелями *b-Amy-A1a* и *b-Amy-A1b* хромосомы 5А, контролирующей синтез этого фермента.

В культуре озимой мягкой пшеницы наибольшее распространение имеют аллели *b-Amy-A1a* и *b-Amy-A1b*. По остальным локусам, контролирующим синтез бета-амилазы, сорта оказались менее разнообразными. Как правило, носители генетических факторов *b-Amy-A1a* и *b-Amy-A1b* по остальным локусам несли одинаковые аллели, обозначенные здесь как *b-Amy-B1a* и *b-Amy-D1a*. Следовательно, есть возможность оценить зональную ценность аллелей *b-Amy-A1a* и *b-Amy-A1b* хромосомы 5А на фоне аллелей *b-Amy-B1a* и *b-Amy-D1a* хромосом 4В и 4D.

Для установления особенностей зонального распространения аллелей *b-Amy-A1a* и *b-Amy-A1b* на фоне одинаковых генов *b-Amy*- хромосом 4В и 4D исследовали генотипы сортов озимой мягкой пшеницы, допущенных к использованию в сельскохозяйственном производстве [20] и несущих только указанные аллели (табл. 3). Следовательно, данный набор сортов прошел двойной отбор на условия внешней среды соответствующих регионов. Во-первых, отбор в региональных селекционных центрах и, во-вторых, отбор в результате государственных испытаний в этих регионах. Среди данного набора сортов было найдено несколько, имеющих новый аллель, обозначенный как *b-Amy-A1c*, контролирующий синтез наименее подвижного изофермента в медленной части зимограммы бета-амилазы. Остальные компоненты зимограммы этого фермента были идентичны носителям зимотипов А и В (рис. 3).

В связи с поставленной целью среди представленного списка сортов озимой мягкой пшеницы были выбраны их группы, созданные в соответствующих регионах европейской части России с юга на север. Результаты такой группировки и оценки частот встречаемости аллелей *b-Amy-A1a* и *b-Amy-A1b* данных наборов представлены в табл. 4.

Как видно, на юге европейской части России (регион I – Северный Кавказ) среди сортов озимой

Таблица 3. Дифференциация сортов озимой мягкой пшеницы по генам *V1/b1* и изоферментам бета-амилазы, обусловленным локусом *b-Amy-A1*

№	Название сорта	Фенотипы по генам		Оригинатор
		<i>V1/b1</i>	<i>b-Amy-A1</i>	
1	Аксинья	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
2	Альмера	b1b1	A1a	Шестопалов И.О., Белгород
3	Армада	b1b1	A1a	СКФНАЦ, Ставрополь, 53
4	Ариадна	b1b1	A1a + A1b	БелФАНЦ РАН, Белгород, 5829
5	Акапелло	b1b1	A1b	ФРАНЦ, Ростов, 223
6	Аскет	b1b1	A1a + A1b	АНЦ “Донской”, зерноград
7	Белгородская 16	b1b1	A1a	БелГАУ, Белгород, 133
8	Богданка	b1b1	A1a*	БелФАНЦ РАН, Белгород, 5829
9	Везелка	b1b1	A1a	БелФАНЦ РАН, Белгород, 5829
10	Виктория	b1b1	A1b	СКФНАЦ, Ставрополь, 53
11	Волжская К	b1b1	A1a	НПЦ “Селекция”, Ульяновск
12	Волжская С 3	b1b1	A1a	НПЦ “Селекция”, Ульяновск
13	Волжская 100	b1b1	A1b	НПЦ “Селекция”, Ульяновск
14	Вольница	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград, 5917
15	Губернатор Дона	b1b1	A1a + A1b	ФРАНЦ, Ростов, 223
16	Донская степь	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
17	Дон 107	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
18	Донэра	b1b1	A1a	ФРАНЦ, Ростов, 223
19	Ермак	b1b1	A1a*	АНЦ “Донской”, зерноград
20	Жаворонок	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
21	Зарница	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград, 5917
22	Звонница	b1b1	A1a	Шестопалов И.О., Белгород
23	Капитан	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
24	Корочанка	b1b1	A1a	БелФАНЦ РАН, Белгород, 5829
25	Коротышка	b1b1	A1a	БелФАНЦ РАН, Белгород, 5829
26	Лариса	b1b1	A1a	БелФАНЦ РАН, Белгород, 5829
27	Левобережная 3	b1b1	A1c	ФАНЦ Юго-Востока, Саратов
28	Льговская 8	b1b1	A1a	ВНИИСС, Льгов, 95
29	Магия	b1b1	A1a	ФРАНЦ, Ростов, 223
30	Майская юбилейная	b1b1	A1a	БелГАУ, Белгород, 133
31	Московская 56	b1b1	A1a	ФИЦ “Немчиновка”, Москва, Москва, 168
32	Московская 40	b1b1	A1a	ФИЦ “Немчиновка”, Москва, Москва, 168
33	Немчиновская 17	b1b1	A1a	ФИЦ “Немчиновка”, Москва, Москва, 168
34	Немчиновская 57	b1b1	A1a	ФИЦ “Немчиновка”, Москва, Москва, 168
35	Оксана	b1b1	A1b	СГИ, Одесса
36	Партнер	b1b1	A1a	СКФНАЦ, Ставрополь, 53
37	Пионерская 32	b1b1	A1b	ОренбургГАУ
38	Прасковья	b1b1	A1a	НЦЗ, Краснодар, 25
39	Ростовчанка 3	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
40	Ростовчанка 7	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
41	Сирена	b1b1	A1a	БелФАНЦ РАН, Белгород, 5829
42	Синтетик	b1b1	A1a + A1b	БелФАНЦ РАН, Белгород, 5829
43	Северо-донецкая юбилейная	b1b1	A1a	ФРАНЦ, Ростов, 223
44	Софийка	b1b1	A1a	СГИ, Одесса
45	Станичная	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
46	Сурава	b1b1	A1a	Шестопалов И.О., Белгород
47	Тарасовская 70	b1b1	A1a	ФРАНЦ, Ростов, 223
48	Шеф	b1b1	A1a	АНЦ “Донской”, зерноград
49	Черноброва	b1b1	A1b + A1a	СГИ, Одесса
50	Авеста	V1B1	A1b	ФРАНЦ, Ростов, 223
51	Агра	V1B1	A1b	ФРАНЦ, Ростов, 223

Таблица 3. Окончание

№	Название сорта	Фенотипы по генам		Оригинатор
		<i>B1/b1</i>	<i>b-Amy-A1</i>	
52	Алексеич	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25
53	Ахмат	B1B1	A1b + A1a	НЦЗ, Краснодар, 25
54	Безенчукская 380	B1B1	A1b	СФНЦ РАН, Самара, 21181
55	Безостая 100	B1B1	A1c	НЦЗ, Краснодар, 25
56	Бригада	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25
57	Виктория 95	B1B1	A1b	ФАНЦ Юго-Востока, Саратов
58	Вольный Дон	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград, 5917
59	Гром	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25
60	Гомер	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25
61	Дар Зернограда	B1B1	A1b + A1c	АНЦ “Донской”, Зерноград
62	Девиз	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
63	Доля	B1B1	A1a + A1c	НЦЗ, Краснодар, 25
64	Дон 95	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград, 5917
65	Доминанта	B1B1	A1b	ФРАНЦ, Ростов, 223
66	Дон 105	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
67	Донстар	B1B1	A1b	ФРАНЦ, Ростов, 223
68	Донской маяк	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград, 5917
69	Донской сюрприз	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
70	Девиз	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
71	Джангаль	B1B1	A1b	ФАНЦ Юго-Востока, Саратов
72	Донщина	B1B1	A1a	АНЦ “Донской”, Зерноград
73	Ершовская 11	B1B1	A1a	ФАНЦ Юго-Востока, Саратов
74	Жемчужина Поволжья	B1B1	A1b	ФАНЦ Юго-Востока, Саратов
75	Зерноградка 9	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
76	Зерноградка 11	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
77	Зимница	B1B1	A1c	НЦЗ, Краснодар, 25
78	Золушка	B1B1	A1b	ФРАНЦ, Ростов, 223
79	Изюминка	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
80	Калач	B1B1	A1b	ФАНЦ Юго-Востока, Саратов
81	Капризуля	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
82	Конкурент	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
83	Краса Дона	B1B1	A1b + A1a	АНЦ “Донской”, Зерноград
84	Лауреат	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25
85	Левобережная 1	B1B1	A1c	ФАНЦ Юго-Востока, Саратов
86	Лилит	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
87	Льговская 4	B1B1	A1b	ВНИИСС, Льгов, 95
88	Марафон	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
89	Мелодия	B1B1	A1a	Омский АНЦ
90	Морозко	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25
91	Находка	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
92	Немчиновская 24	B1B1	A1b	ФИЦ “Немчиновка”, Москва, 168
93	Нива Ставрополя	B1B1	A1b	СКФНАЦ, Ставрополь, 53
94	Омская 5	B1B1	A1a	ОмскАНЦ
95	Омская 6	B1B1	A1b	ОмскАНЦ
96	Паритет	B1B1	A1b	СКФНАЦ, Ставрополь, 53
97	Табор	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25
98	Танаис	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
99	Тимирязевская 150	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25
100	Черноземка 115	B1B1	A1a	ВоронФАНЦ, Воронеж
101	Этюд	B1B1	A1b	АНЦ “Донской”, Зерноград
102	Юка	B1B1	A1b	НЦЗ, Краснодар, 25

Примечание. Жирным шрифтом выделены рекомбинантные по аллелям гена *B1 – b-Amy-A1* фенотипы.

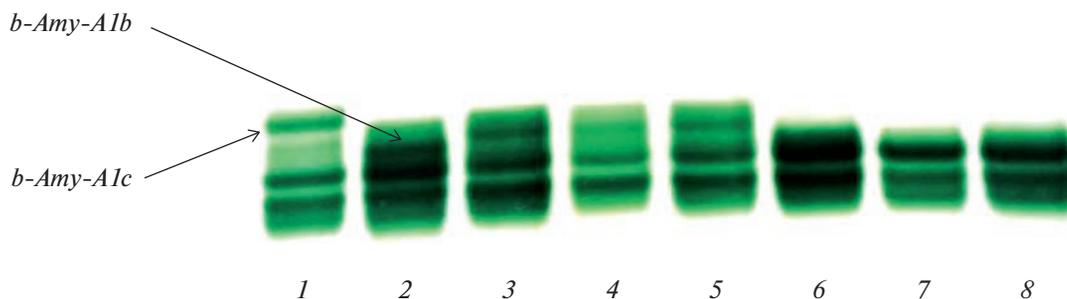


Рис. 3. Зимограммы некоторых сортов озимой мягкой пшеницы (1, 2 – Дар Зернограда, 3–5 – Донской маяк, 6–8 – Станичная), являющихся носителями следующих аллелей локуса *b-Amy-A1*: 1 – *A1c*, 2–5 – *A1b*, 6–8 – *A1a*.

мой пшеницы доминирует аллель *b-Amy-A1b*, контролирующей синтез бета-амилазы. По частоте встречаемости он существенно превышает альтернативный аллель *b-Amy-A1a* ($t = 4.87^{***}$). В пределах Ростовской области частоты данных аллелей близки между собой и различия в частотах между ними находились в пределах ошибки опыта (табл. 4). Двигаясь севернее (регион IV – ЦЧР + Нижневолжье), наблюдается доминирование аллеля *b-Amy-A1a* и уменьшение частоты встречаемости аллеля *b-Amy-A1b*. В данном случае различия в частотах распространения этих генетических факторов значимы – $t = 4.32^{**}$. Аналогичная ситуация наблюдается при дальнейшем продвижении на север. Так, на широте Московской области (регион V – Север ЦФО + Средневолжье) частота аллеля *b-Amy-A1a* составила 72.5%, а аль-

тернативного – лишь 25.0%. Различия в частотах значимы – $t = 3.27^*$ (табл. 4).

Не менее важно было оценить различия в уровне изменения частот аллелей при сравнении выделенных регионов. В данном случае наиболее контрастные различия наблюдались при сравнении географически более отдаленных регионов. Так, например, при сравнении частоты встречаемости аллеля *b-Amy-A1b* региона V (Север ЦФО + Средневолжье) с частотой этого аллеля из региона I (Северный Кавказ) наблюдалось существенное уменьшение его с юга на север – на 50.8% ($t = 2.60^*$; $P > 0.95$). Аналогичная закономерность прослеживается при сравнении частот встречаемости этого аллеля в условиях IV региона (Центрально-Черноземный регион + Нижневолжье) и I региона (Северный Кавказ). В этом слу-

Таблица 4. Распространение аллелей локуса *b-Amy-A1* среди районированных сортов озимой мягкой пшеницы в Российской Федерации, сгруппированных по широтному происхождению

Выделенные регионы	Встречаемость аллелей локуса <i>b-Amy-A1</i> в европейских регионах РФ с юга на север				Ошибка частоты встречаемости	Значимость (t)
	количество сортов с аллелями		частота аллелей			
	<i>A1a</i>	<i>A1b</i>	<i>A1a</i>	<i>A1b</i>		
I. Сев. Кавказ (НЦЗ, Краснодар; СКФНАЦ, Ставрополь)	4	12.5	0.242	0.758	0.106	4.87***
II. Юг Ростовской обл. (АНЦ “Донской”)	14	18.5	0.431	0.569	0.087	1.59
III. Север Ростовской обл. (ФРАНЦ, Тарасовский р-н)	4.5	6.5	0.409	0.591	0.148	1.23
IV. ЦЧР + Нижневолжье (БелФАНЦ РАН, Белгород; ВНИИСС, Воронеж, Льгов, Саратов)	15	6	0.714	0.286	0.099	4.32**
V. ЦФО + Средневолжье (ФИЦ “Немчиновка”, Москва; НПП, “Селекция”, Ульяновск)	6	2	0.725	0.250	0.153	3.27*
Итого	43.5	45.5	0.489	0.511	0.053	0.415

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые различия между частотами встречаемости.

*. **. *** Уровень вероятности соответственно равен 0.95, 0.99 и 0.999.

Таблица 5. Анализ коллекции сортов озимой мягкой пшеницы как $F_{\rightarrow\infty}$ для оценки сцепления локусов $B1/b1$ и $b-Amy-A1$

Символы аллелей	Фенотипические классы в F_4			Размер выборки	χ^2_L	Рекомбинация, %
	$\frac{A}{a} \times \frac{B}{b}$	BB	bb			
$\frac{B1}{b1} \times \frac{b-Amy-A1a}{b-Amy-A1b}$	AA aa	6.5 39.5	42.5 7.0	95.5	49.13	5.56 ± 1.90

чае частота его с юга на север уменьшилась на 47.2% ($t = 3.26^{**}$; $P > 0.99$). В то же время различия между географически близкими регионами были малозначимы. Так, изменения в частотах аллеля $b-Amy-A1a$ между регионами V (Север ЦФО + Средневолжье) и IV (Центрально-Черноземный + Нижневожье) составило лишь 1.1% ($t = 0.06$; $P < 0.95$).

В целом наблюдается значимая закономерность в сторону уменьшения частоты встречаемости аллеля $b-Amy-A1b$ и увеличения частоты альтернативного генетического фактора $b-Amy-A1a$ в направлении с юга на север европейской части Российской Федерации.

Ранее было показано, что коллекцию сортов самоопылителя можно охарактеризовать как гомозиготную популяцию старших поколений, т.е. как $F_{\rightarrow\infty}$. В таком случае ее можно использовать для оценки сцепления генов, расположенных в одной группе сцепления [21]. Учитывая, что при данном подходе коллекция сортов озимой мягкой пшеницы сгруппирована по признакам остистость vs. безостость (гены $b1$ и $B1$), а также по аллелям $b-Amy-A1a$ и $b-Amy-A1b$, расположенным в хромосоме 5A, оценили встречаемость соответствующих фенотипов и определили величину сцепления между локусами $B1$ и $b-Amy-A1$.

Итак, соотношение представленных в табл. 3 фенотипов составило: $b1b1 + A1a : b1b1 + A1b : B1B1 + A1a : B1B1 + A1b = 39.5 : 7.0 : 6.5 : 42.5$. Расщепление в соответствии с ожидаемым в $F_{\rightarrow\infty}$ при моногенном наследовании должно составлять 1 : 1. Соответствие данному соотношению фенотипов по признаку остистость vs. безостость выразилось величиной $\chi^2_{b1} = 0.063$, что значимо при $P > 0.25$. По аллелям локуса $b-Amy-A1$ получены близкие значения, $\chi^2_{b-Amy-A1} = 0.124$, $P > 0.25$. При расчете на дигенное наследование (расщепление 1 : 1 : 1 : 1) величина $\chi^2_0 = 49.32$; $P < 0.01$. Это свидетельствует об отклонении от независимого наследования данных генетических факторов. Соответственно в табл. 5 представлена величина χ^2 , обусловленная уровнем сцепления изученных локусов (χ^2_L).

Величина рекомбинации, рассчитанная на основе представленной коллекции сортов озимой мягкой пшеницы, составила $5.56 \pm 1.90\%$.

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. *Нецветаев В.П., Акиншина О.В., Бондаренко Л.С., Моторина И.П.* Полиморфизм по бета-амилазе зерна озимой мягкой пшеницы // Генетика. 2012. Т. 48. № 2. С. 168–174.
2. *McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al.* Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 12th Intern. Wheat Genetics Symp. 8–13 September 2013. Japan: Yokohama, 2013. P. 1–167.
3. *Ainsworth C.C., Gale M.D., Baird S.* The genetics of beta-amylase isozymes in wheat. Allelic variation among hexaploid varieties and intrachromosomal gene locations // Theor. Appl. Genet. 1983. V. 66. P. 39–49.
4. *Dabrowska T.* Studies on chromosomal location of genes involved in beta-amylase isozymes in wheat kernels (*Triticum aestivum* L.) // Genetica Polonica. 1983. V. 24. P. 9–19.
5. *Joudrier P., Cauderon Y.* Localisation chromosomique de genes controlant la synthese de certains constituants beta-amylasique du grain de Ble tendre // Comptes Rendus Ac. Sc. Paris, D. 1976. V. 282. P. 115–118.
6. *Нецветаев В.П., Акиншина О.В., Козелец Я.О., Ащелова А.П.* Хромосомная локализация генов, контролирующих изоферменты бета-амилазы мягкой пшеницы // Актуальные проблемы функционирования устойчивых агроценозов в системе адаптивно-ландшафтного земледелия: Матер. Всерос. научно-практ. конф. с междунар. участием и Всерос. школы молодых ученых 15–17 сентября 2020. Белгород, 2020. С. 284–293.
7. *Sears E.R.* The aneuploids of common wheat // Missouri Agricultural Experiment Station Res. Bull. 1954. 572. P. 59.
8. *Chalmers K.J., Campbell A.W., Kretschmer J. et al.* Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum* // Austr. J. Agricultural Res. 2001. V. 52. P. 1089–1119.
9. *Rao M.V.P.* Mapping of the compactum gene C on chromosome 2D of wheat // Wheat Information Service. 1972. № 35. P. 9.

10. *Unrau J.* The use of monosomes and nullisomes in cytogenetic studies in common wheat // *Scientific Agriculture*. 1950. V. 30. P. 66–89.
11. *Нецветаев В.П.* Расположение β -амилазного локуса (*Bmy 1*) в хромосоме 4 ячменя // *Цитология и генетика*. 1993. Т. 27. № 5. С. 74–78.
12. *Рокицкий П.Ф.* Введение в статистическую генетику. Минск: Выш. шк., 1974. 442 с.
13. *Persson G.* An attempt to find suitable genetic markers for dense ear loci in barley I // *Hereditas*. 1969. V. 62. P. 25–96.
14. *Allard R.W.* Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity // *Hilgardia*. 1956. V. 24. № 10. P. 235–278.
15. *Нецветаев В.П., Образцов И.С., Созинов А.А.* Картирование локуса *Hrd G* в хромосоме 5 ячменя // *Мол. механизмы генет. процессов (V Всес. симп. Тезисы)*. М.: Наука, 1983. С. 110.
16. *Netsvetaev V.P., Sozinov A.A.* Location of a hordein G locus, *Hrd G*, on chromosome 5 of barley // *Barley Genetics Newsletter*. 1984. V. 14. P. 4–6.
17. *Korzun V., Röder M.S., Ganai M.W. et al.* Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 1998. V. 96. P. 1104–1109.
18. *Worland A.J., Korzun V., Röder M.S. et al.* Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening // *Theor. Appl. Genet.* 1998. V. 96. P. 1110–1120.
19. *Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Дробот Н.И. и др.* Пребридинговая оценка рекомбинантных и интрогрессивных пшенично-ржаных гибридов по аллельному составу генов короткостебельности *Rht-B1*, *Rht-D1*, *Rht8* и *Ddw1* // *Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук*. 2018. Т. 63. № 2. С. 146–154.
20. Электронный реестр ФГБУ “Госсорткомиссии” (вход доступа 22.12.2022) <https://reestr.gossortrf.ru>
21. *Нецветаев В.П., Календарь Р.Н.* Использование коллекции сортов самоопылителя для оценки эффекта сцепления между генами // *Генетика*. 1999. Т. 35. № 4. С. 474–483.

Chromosomal Location of the *b-Amy-A1* Gene and Distribution of Its Alleles in Winter Common Wheat Culture

V. P. Netsvetaev^{a, b, *}, Ya. O. Kozelets^a, A. P. Ascheulova^{a, b}, A. V. Petrenko^a, and O. V. Akinshina^a

^a*Belgorod Federal Agrarian Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Belgorod, 308001 Russia*

^b*Belgorod State University, Belgorod, 308015 Russia*

^{*}*e-mail: v.netsvetaev@yandex.ru*

The analysis of the chromosomal location of the *b-Amy-A1* gene, which controls the synthesis of wheat beta-amylase isoenzymes, was carried out by assessing the linkage with the *B1* (Awnless) marker gene located in the long arm of chromosome 5A. Results based on F₂ and F_{→∞} Delta × Selection 2092 study. The *b-Amy-A1* locus showed 6.55 ± 2.10% linkage to the *B1* gene. In parallel, alleles of the *Rht8* locus, which causes dwarfing of plants, were identified and its linkage to the *C* gene (Compact spike) was established in 22.59 ± 6.28% (F₂) and 24.22 ± 1.18% (F_{→∞}) of recombination in chromosome 2D. The Delta variety carries the *Rht8a* allele, and the Selection 2092 accession carries the *Rht8c* allele. A collection of winter common wheat varieties created and released in the Russia was studied. The selected cultivars carried identical *b-Amy-B1a* and *b-Amy-D1a* alleles of the 4B and 4D chromosome loci. At the same time, the most common *b-Amy-A1a* and *b-Amy-A1b* alleles of chromosome 5A differed. It was found that in the direction from south to north of European part, the frequency of the *b-Amy-A1a* allele increases from 24.2% (Northern Caucasus) to 72.50% (Moscow–Ulyanovsk regions). Accordingly, the frequency of the alternative allele *b-Amy-A1b* decreased from 75.8% (Northern Caucasus) to 25.0% (Moscow–Ulyanovsk regions). In the Rostov region, the ratio of the occurrence of alleles *b-Amy-A1a* to *b-Amy-A1b* was 42.5 to 57.5%. At the same time, already in the Central Chernozem region⁺, a significant dominance of the *b-Amy-A1a* allele over *b-Amy-A1b* was manifested. Using the collection of varieties as a population of F_{→∞} demonstrated the linkage of *b-Amy-A1* with *B1* value in 5.56 ± 1.90% recombination.

Keywords: common wheat, beta-amylase, isoenzymes, genetic control, chromosomal location, marker genes.

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК (*COOLAIR*, *COLDAIR* и *COLDWRAP*) ПРИ ЯРОВИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana* СЕВЕРНЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

© 2023 г. М. В. Зарецкая¹, *, О. Н. Лебедева¹, О. М. Федоренко¹, **

¹Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: genmg@mail.ru

**e-mail: fedorenko_om@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.2023 г.

После доработки 16.03.2023 г.

Принята к публикации 28.03.2023 г.

Выявлены особенности экспрессии lncРНК – *COOLAIR*, *COLDAIR* и *COLDWRAP*, выполняющие важную функцию в яровизационно-опосредованном эпигенетическом механизме перехода к цветению растений *A. thaliana* северных природных популяций (Карелия). Полученные результаты частично отличаются от данных других авторов, выполняющих исследования на чистых линиях и других экотипах этого вида. Предполагается, что генетические и эпигенетические механизмы, участвующие в процессе яровизации и контроле темпов зацветания, могут различаться у растений популяций разных географических регионов.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, северные природные популяции, яровизация, экспрессия *FLC*, экспрессия lncРНК, *COOLAIR*, *COLDAIR*, *COLDWRAP*.

DOI: 10.31857/S0016675823080118, **EDN:** XUADPR

В последнее время наблюдается огромный прогресс в изучении генетических и эпигенетических механизмов, участвующих в процессах адаптации. Именно эпигенетические механизмы позволяют организму адаптироваться к флуктуациям климатических условий быстрее, чем изменение генотипа в результате отбора и эволюции. Поэтому изучение генетического контроля адаптивно-значимых признаков и эпигенетических механизмов регуляции активности генов, отвечающих за процессы адаптации, представляет большой научный интерес.

Использование модельных организмов с коротким жизненным циклом и хорошо изученным геномом, каким является *Arabidopsis thaliana*, позволяет быстрее и успешнее решать поставленные задачи. Выводы, полученные с их помощью, могут иметь общебиологическое значение. Примером эпигенетического механизма адаптации *A. thaliana* к нестабильным условиям на северной периферии ареала вида является репрессия гена *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, который кодирует ингибирующий цветение фактор транскрипции FLC [1]. Время начала цветения является адаптивно-значимым признаком для растений, способствуя максимальному репродуктивному успеху. Репрес-

сия *FLC* происходит под воздействием низких температур – яровизации, которая необходима многим растениям умеренных широт для индукции цветения. В рамках описанной проблемы большое внимание уделяется исследователями длинным некодирующим РНК (lncРНК – long noncoding RNA): *COOLAIR*, *COLDAIR* и *COLDWRAP*, которые, при участии репрессирующего комплекса PRC2, подавляют транскрипцию *FLC* путем метилирования гистонов H3 по Lys²⁷ с образованием репрессирующих меток H3K27me3.

COOLAIR – антисмысловая РНК, транскрибируется у *A. thaliana* в ранней фазе яровизации из промотора, локализованного в 3'-фланкирующей некодирующей области *FLC* в ответ на низкие температуры [2–5]. *COLDAIR* – транскрипт, закодированный на смысловой цепи в составе 5'-концевого района первого интрона *FLC*. Он транскрибируется при продолжительном воздействии низких температур (20 дней и более) и выполняет свою роль, физически связываясь с PRC2, и перемещает этот комплекс вместе с репрессирующими метками H3K27me3 в *FLC*-хроматин [6]. *COLDWRAP* – еще одна lncРНК, которая была идентифицирована D. Kim и S. Sung сравнительно недавно [7]. Она участвует в эпиге-

нетическом контроле экспрессии *FLC* совместно с *COLD AIR* и транскрибируется с репрессированного промотора в смысловом направлении относительно *FLC*. Эти две lncРНК необходимы для удерживания комплекса PRC2 на промоторе *FLC* путем формирования репрессивной внутригенной петли, которая способствует установлению стабильно репрессированного хроматина. Петля формируется между областью промотора, откуда происходит *COLD WRAP*, и первым интроном, где начинается *COLD AIR*. Авторы [7] также полагают, что “внутригенное” образование петель может быть общим механизмом репрессии генов. Однако, что касается механизма, посредством которого происходит активация наборов lncРНК, до сих пор нет ясного понимания. St. Rosa с соавт., используя одномолекулярную флуоресцентную гибридизацию *in situ* (smFISH) показали, что транскрипция *COOL AIR* антикоррелирует с транскрипцией *FLC*, т.е. транскрипция *COOL AIR* и *FLC* является взаимоисключающей [3].

В предыдущих наших исследованиях были выявлены особенности экспрессии гена *FLC* в процессе яровизации растений *A. thaliana* северных природных популяций (Карелия) [8], отчасти несовпадающие с литературными данными [3, 5, 6, 9]. Установлен низкий уровень экспрессии *FLC* до холодого воздействия в популяциях, представленных в основном поздноцветущими формами растений. В процессе яровизации происходило увеличение уровня транскриптов мРНК *FLC* на 10-й и 20-й день с последующим снижением ее к 30-му дню. Особенным образом представлена динамика экспрессии *FLC* в процессе яровизации у S1-потомства одного раннецветущего растения, при этом экспрессия *FLC* у них изменялась согласно классическим представлениям: первоначально высокий уровень транскриптов *FLC* в процессе яровизации снижался. Предполагается, что генетические и эпигенетические механизмы, участвующие в контроле темпов зацветания, могут различаться у растений популяций разных географических регионов.

В связи с этим, с целью выявления причины особенности экспрессии *FLC* в процессе яровизации карельских популяций *A. thaliana*, мы проанализировали транскрипционную активность lncРНК – *COOL AIR*, *COLD AIR* и *COLD WRAP*, у растений до холодого воздействия и в процессе яровизации от 20 до 63 дней. В качестве дополнительных были поставлены следующие задачи: 1) определение длительности яровизации растений северных природных популяций, необходимой для инициации цветения; 2) изучение влияния разных способов яровизации (на стадии семян или на стадии проростков) на динамику транскрипционной активности *FLC*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали растения *A. thaliana*, выращенные из собранных в природе семян северных природных популяций, в Карелии. Анализ экспрессии lncРНК и гена *FLC* проводили на молодых листьях растений из трех карельских популяций: Царевичи, Шуйская, Кончезеро. Названия популяций даны в соответствии с близлежащими населенными пунктами. Популяции Шуйская и Кончезеро представлены поздноцветущими формами растений, а Царевичи – смешанная по времени начала цветения популяция (присутствуют как ранние, так и поздние формы растений). В качестве контроля использована раннецветущая линия – *Ler* (*Landsberg erecta*).

Выращивание растений в лабораторных условиях

Выращивание растений в лабораторных условиях проводили по общепринятым методикам культивирования арабидопсиса [10]. Семена высеивали в чашки Петри на простую среду по Гихнеру–Велеминскому, которая готовилась на основе 8%-ного агар-агара с добавлением растворов макро- и микроэлементов. Яровизацию проводили на намоченных семенах и проростках (стадия розетки). Для яровизации чашки Петри с семенами или 14-дневными проростками переносили на холод (2–4°C) на 10, 20, 30, 40 или 63 (9 недель) дней. Яровизированные семена в чашках Петри проращивали под люминесцентными лампами при температуре 22–24°C и круглосуточном освещении (10000 лк). Для определения времени начала цветения молодые растения пересаживали из чашек Петри в почву (смесь земли и песка 1 : 1) и выращивали в тех же условиях.

Анализ уровня транскриптов lncРНК и гена *FLC*

Выделение суммарной РНК из листьев растений осуществлялось с использованием набора Extract RNA (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Качество и количество РНК определяли на спектрофотометре SmartSpec (Bio-Rad, США). Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген). Содержание мРНК оценивали методом ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green на приборе iCycler iQ5 (Bio-Rad) с набором для ПЦР-РВ (Евроген). Для определения уровня экспрессии lncРНК каждую ПЦР проводили три раза, на четырех независимых образцах кДНК. Последовательности праймеров для анализа экспрессии: *FLC* f: 5'-GCCAAGAAGACCGAACTCATGTTGA-3', r: 5'-CAACCGCCGATTAAAGGTGGCTA-3'; *COOL AIR* f: 5'-CAACCCTCCAATATAATAACC-3', r: 5'-TGCATCAAGTGAGAATCG-3'; *COLD AIR* f: 5'-ACCCTCCAATATAATAACCAATG-3', r:

5'-AGTTCTAGTCAGGTGTCTCG-3'; *COLDWRAP* f: 5'-GCATCACTCTCGTTTACCCC-3', r: 5'-CAG-GTTTGGGTTCAAGTCGC-3' [7].

Анализ относительного содержания транскриптов проводился с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [11], основанного на нормализации данных по экспрессии относительно двух референсных генов. Рассчитывалась разница значений C_t (ΔC_t) между целевым и референсными генами, затем сравнивались значения ΔC_t контрольного и опытного образцов. В качестве референсных использованы гены *18sRNA*, *ACTIN8* и *UBQ1*, которые характеризуются конститутивной экспрессией. Последовательности праймеров референсных генов: *18sRNA* f: 5'-TGCCCGTTGCTCTGATGA-3', r: 5'-GGATGTGGTAGCCGTTTCT-3'; *ACTIN8* f: 5'-GCAGACCGTATGAGCAAAGAG-3', r: 5'-TGAGGGAAGCAAGGATAGAACC-3'; *UBQ10* f: 5'-TCTTCTTTATCATCGCTTTCG-3', r: 5'-GCTCAACACTTTCGCTACAT-3'. О специфичности фрагментов судили по кривым плавления.

Статистическая обработка данных

Экспериментальные данные обрабатывали с использованием статистических программ Microsoft Excel и Statgraphics 2.1 (ANOVA). Достоверность различий содержания мРНК *IncRNK* и *FLC* в листьях растений разных популяций и между отдельными группами растений по длительности яровизации оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (*U*-тест).

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние длительности яровизации на сокращение времени до начала цветения растений карельских популяций *A. thaliana*

Известно, что самые поздние по срокам зацветания экотипы *A. thaliana* часто произрастают в северных широтах [12]. Вероятно они имеют селективное преимущество в условиях короткого и холодного лета по сравнению с раннецветущими формами. Карелия является северной границей ареала вида. Предыдущие наши исследования показали, что карельские популяции *A. thaliana* представлены в основном позднецветущими формами растений (это популяции Кончезеро и Шуйская), которым для цветения требуется продолжительная яровизация. Однако одна из изученных популяций (Царевичи) оказалась гетерогенной по срокам зацветания: в ее состав входят как раннецветущие, так и позднецветущие формы растений. При этом увеличение длительности холодо-

вого воздействия приводило к сокращению доли поздно зацветающих растений. Выявлена также неодинаковая реакция растений отдельных популяций на яровизацию различной продолжительности [13, 14].

Растения *A. thaliana* популяций северных широт как правило требуют очень длительную яровизацию [15, 16]. Ранее было показано, что эффект позднего цветения растений этого вида полностью элиминируется 40-дневной холодной обработкой [17]. Однако для некоторых северных экотипов эпигенетическое замолкание экспрессии *FLC* (с помощью накопления триметилированных гистонов H3K27me3 в *FLC* хроматине) идет более медленно, и 40-дневная яровизация не приводит к стабильной репрессии *FLC*. Для них требуется более длительная, до 12 нед., яровизация [18, 19].

В связи с этим, мы увеличили время яровизации растений карельских популяций *A. thaliana* до девяти нед. (63 дня), при этом яровизировали 14-дневные проростки на стадии розетки. Результаты показали, что девятидневная яровизация привела к более синхронному зацветанию всех растений в короткие сроки – 20–45 дней по сравнению с 40-дневной яровизацией (рис. 1).

Анализ транскрипционной активности *FLC* при разных способах яровизации растений

Ранее нами были выявлены особенности транскрипционной активности гена *FLC* в процессе яровизации *A. thaliana* карельских популяций [8]. В отличие от предыдущих исследований, в данной работе применили разные способы яровизации: яровизировали не только намоченные семена, но и 14-дневные растения. Яровизация на стадии розетки наилучшим образом соответствует природным условиям. В случае яровизации семян требуется дополнительный период выращивания растений – примерно 14 дней при 22°C, которые затем используются для анализа.

В настоящем исследовании уровень транскриптов мРНК *FLC* определяли у неяровизированных растений и растений после холодного воздействия разной продолжительности: 10, 20, 30, 40 и 63 дней. Анализ показал низкий уровень экспрессии *FLC* у неяровизированных растений, что отличается от данных других исследователей [6, 20–22]. Предполагается, что это может быть связано с чрезмерной активностью генов-регуляторов автономного пути, оказывающих супрессирующий эффект на экспрессию *FLC* – *FCA*; *FLD*, *FVE* [23]. Далее, как видно на графиках (рис. 2), при увеличении длительности яровизации идет усиление транскрипционной активности гена. При яровизации семян увеличение экспрессии происходит быстрее, уже на десятый день яровизации. Тогда как при яровизации растений увеличение тран-

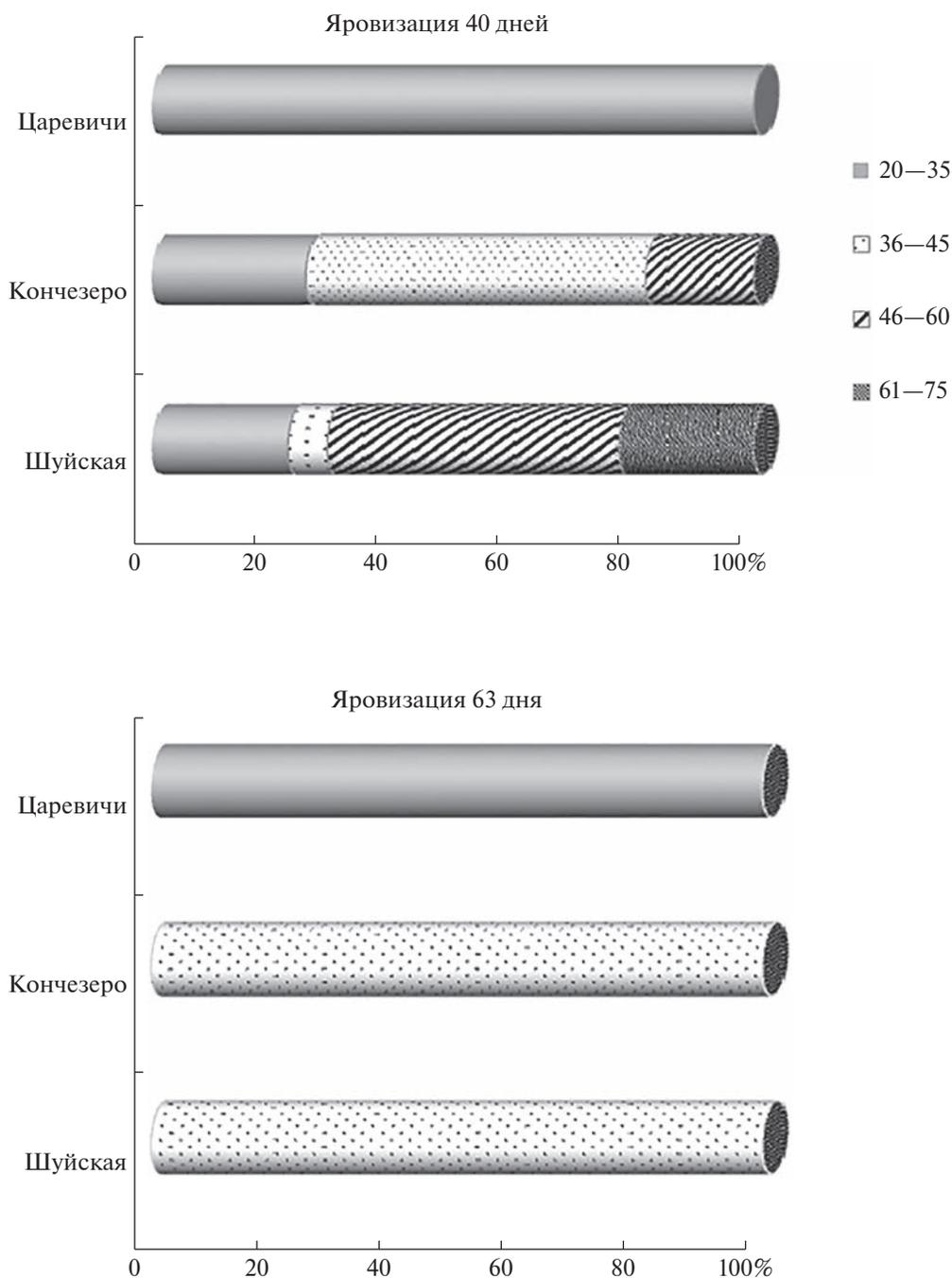


Рис. 1. Влияние длительности яровизации на время начала цветения растений *A. thaliana* северных природных популяций.

скриптов мРНК *FLC* наблюдается на более позднем сроке: на 20-й день в популяции Царевичи и на 30-й день в популяциях Шуйская и Кончезеро. Интересно, что у растений смешанной по времени цветения популяции — Царевичи, отмечен более значительный подъем по сравнению с растениями из популяций поздно зацветающих растений. Такой неожиданный подъем может объясняться ге-

нетическими особенностями позднецветущих растений *A. thaliana* карельских популяций, а также возможно связан с активностью гистоновых деметилаз.

Известно, что пять белков, содержащих домен Jumonji-C (JMJ) — JMJ11, JMJ12, JMJ13, JMJ30 и JMJ32, обладают активностью по удалению гистоновых репрессивных меток H3K27me3 и, таким

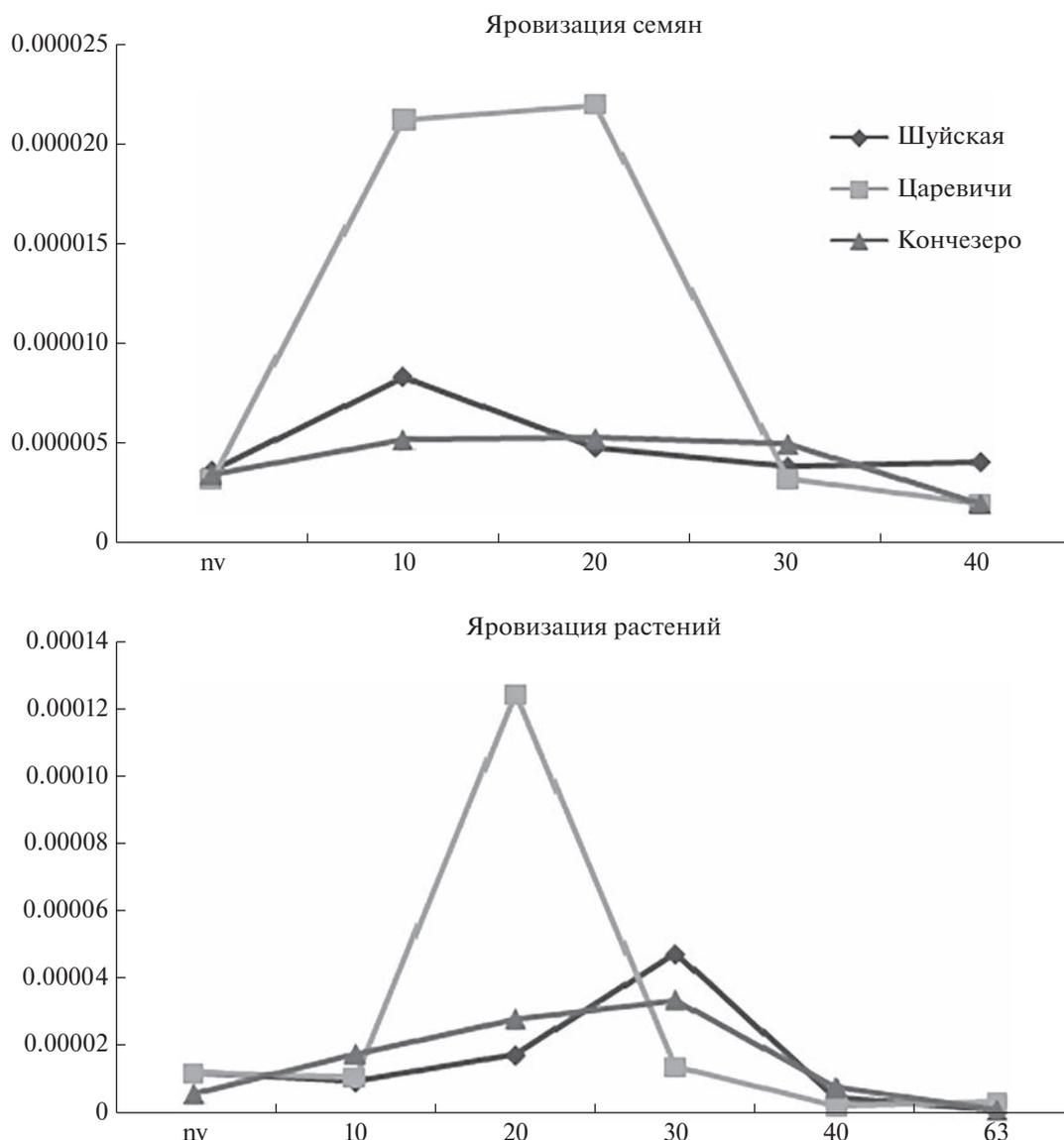


Рис. 2. Изменение уровня транскриптов гена *FLC* в процессе яровизации семян и растений *A. thaliana* северных природных популяций. По оси *X* – условия выращивания растений: nv – без яровизации; 10, 20...63 – длительность яровизации в сутках; по оси *Y* – относительный уровень транскриптов *FLC*.

образом, могут модулировать скорость яровизации [24]. Также установлено, что двойные мутанты *jmj30jmj32* характеризуются ранним цветением после двухнедельной яровизации при активном *FLC*. Далее, к 40-му дню яровизации происходит постепенное снижение экспрессии *FLC*, что согласуется с результатами других исследователей [6, 20, 21]. Таким образом, выявленные нами ранее особенности транскрипционной активности гена *FLC* в процессе холодого воздействия у растений *A. thaliana* карельских популяций, сохраняются независимо от способа яровизации растений.

Изучение динамики транскрипционной активности COOLAIR, COLDAIR и COLDWRAP в процессе яровизации растений A. thaliana северных природных популяций

Анализ уровня транскриптов *COOLAIR*, *COLDAIR*, *COLDWRAP* карельских популяций проводился нами на неяровизированных растениях и растениях после холодого воздействия различной продолжительности: 20, 30 и 63 дня. Результаты представлены на диаграммах (рис. 3). Динамика экспрессии всех трех лncРНК оказалась сходной: относительно высокий уровень транскриптов у неяровизированных растений в начале холодого-

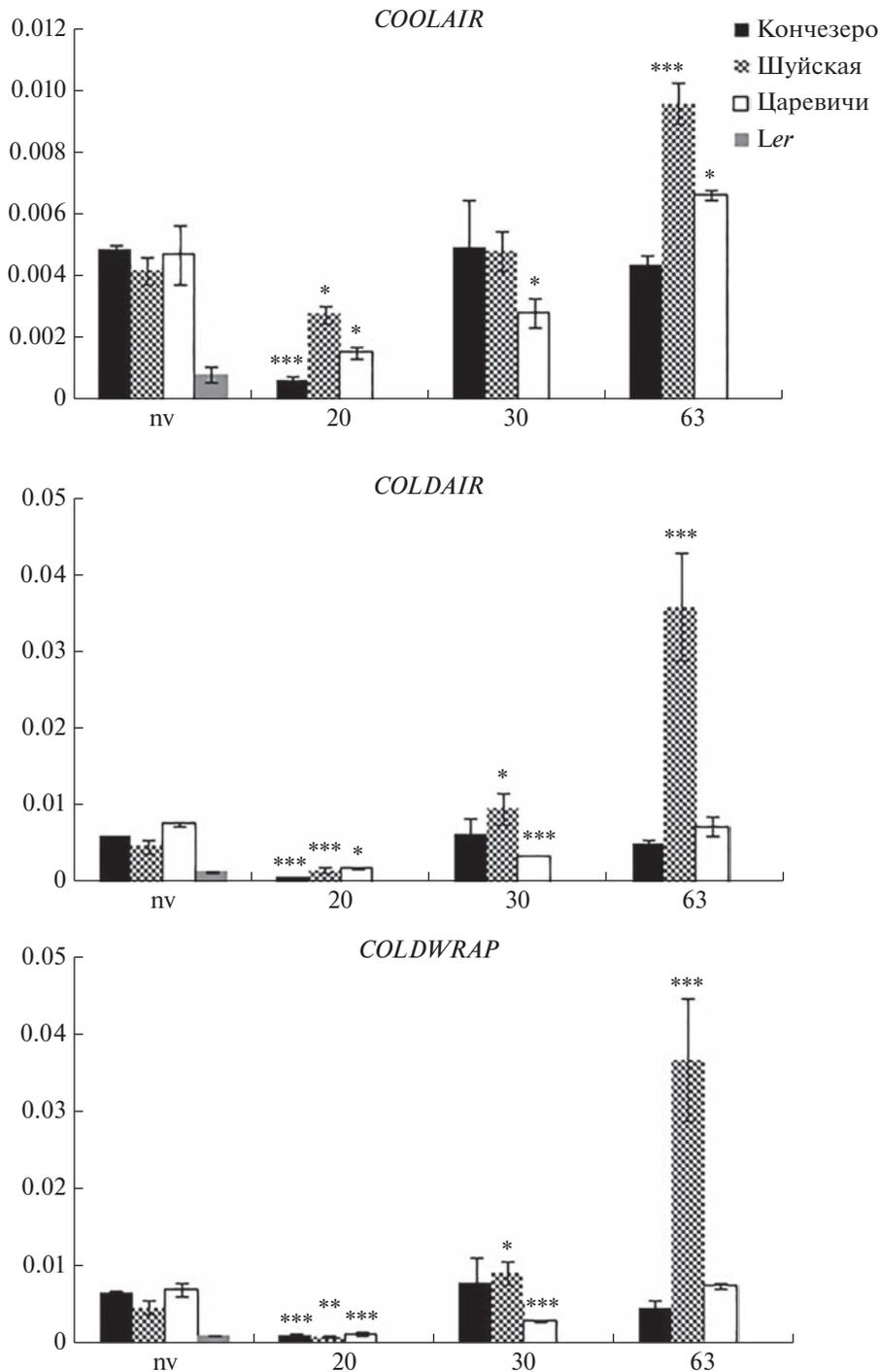


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии lncРНК в процессе яровизации растений *A. thaliana* северных природных популяций. По оси X – продолжительность яровизации: nv – без яровизации; 20, 30, 63 – длительность яровизации в сутках; по оси Y – уровень транскриптов lncРНК в отн. ед. Значимость различий неяровизированных растений с яровизированными: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

го воздействия (20 дней) снижались, а затем, либо имел тенденцию к постепенному повышению (в популяции Кончезеро), либо достоверно повышался (популяции Шуйская и Царевичи) к 30-му или 63-му дню яровизации. При этом все три про-

анализированные популяции, как представленные только позднецветущими растениями (Кончезеро и Шуйская), так и смешанная по времени начала цветения (Царевичи), проявили сходную картину изменения транскрипционной актив-

сти lncРНК. Раннецветущая линия *Ler* служила контролем экспрессии lncРНК для неярковизированных растений. Транскрипционная активность каждой из трех lncРНК у растений карельских популяций оказалась значительно выше, чем у раннецветущей линии *Ler*, которой не требуется яровизация.

Результаты зарубежных исследований [3, 5–7], полученные на других линиях и экотипах *A. thaliana*, показывают, что низкий уровень экспрессии *COOLAIR*, *COLDAIR* и *COLDWRAP* до холодового воздействия повышался и достигал пика к 20-му дню яровизации, а затем падал к 40-му дню. Однако, в целом, наши результаты находятся в соответствии с выводами, сделанными St. Rosa с коллегами [3]: транскрипция *COOLAIR* обратно коррелирует с транскрипцией *FLC*.

Таким образом, проведенное исследование показало, что для *A. thaliana* карельских популяций требуется длительная яровизация: холодовое воздействие в течение девяти недель приводит к более синхронному зацветанию всех растений в короткие сроки (20–45 дней) по сравнению с 40-дневной яровизацией. Выявленные нами ранее особенности транскрипционной активности *FLC* у *A. thaliana* карельских популяций, подтвердились в данной работе, при этом они сохраняются независимо от способа яровизации растений. Полученные результаты позволяют судить о своеобразии генетических процессов и эпигенетических механизмов, участвующих в регуляции транскрипционной активности генов и lncРНК, контролирующих адаптивно-значимый признак растений *A. thaliana* – время начала цветения – в популяциях, расположенных на северной периферии ареала вида в нестабильных условиях произрастания.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (№ темы FMEN-2022-0009).

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. Dennis E.S., Peacock W.J. Epigenetic regulation of flowering // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007. V. 10(5). P. 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.06.009>
2. Marquardt S., Raitskin O., Wu Z. et al. Functional consequences of splicing of the antisense transcript *COOLAIR* on *FLC* transcription // *Mol. Cell.* 2014. V. 54(1). P. 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.026>
3. Rosa St., Duncan S., Dean C. Mutually exclusive sense-antisense transcription at *FLC* facilitates environmentally induced gene repression // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13031>
4. Chen M., Penfield St. Feedback regulation of *COOLAIR* expression controls seed dormancy and flowering time // *Science.* 2018. V. 360. P. 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.aar7361>
5. Zhao Y., Zhu P., Hepworth J. et al. Natural temperature fluctuations promote *COOLAIR* regulation of *FLC* // *Genes Dev.* 2021. V. 35(11, 12). P. 888–898. <https://doi.org/10.1101/gad.348362.121>
6. Heo J.B., Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA // *Science.* 2011. V. 331. P. 76–79. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>
7. Kim D.H., Sung S. Vernalization-triggered intragenic chromatin loop formation by long noncoding RNAs // *Developmental Cell.* 2017. V. 40. P. 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.12.021>
8. Федоренко О.М., Топчиева Л.В., Зарецкая М.В., Лебедева О.Н. Динамика экспрессии *FLC* и *VIN3* в процессе яровизации растений *Arabidopsis thaliana* северных природных популяций // *Генетика.* 2019. Т. 55. № 7. С. 811–818. <https://doi.org/10.1134/S0016675819060031>
9. Choi J., Hyun Y., Kang M.J. et al. Resetting and regulation of *Flowering Locus C* expression during *Arabidopsis* reproductive development // *Plant J.* 2009. V. 57. P. 918–931. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03776.x>
10. Иванов В.И., Касьяненко А.Г., Санина А.В. и др. Краткая характеристика *A. thaliana* и некоторые сведения о его культивировании, технике скрещиваний и учете изменчивости // *Генетика.* 1966. Т. 8. С. 115–120.
11. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method // *Methods.* 2001. V. 25. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
12. Kranz A.R., Kircheim B. Genetic resources in *Arabidopsis* // *AIS.* 1987. № 24. P. 20.
13. Федоренко О.М., Грицких М.В., Николаевская Т.С. Полиморфизм по времени начала цветения у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. на северной границе его ареала // *Тр. КарНЦ РАН. Серия эксперим. биология.* 2012. № 2. С. 139–146.
14. Курбидова А.С., Зарецкая М.В., Солтабаева А.Д. и др. Генетические механизмы адаптации растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. к экстремальным условиям северной границы ареала // *Генетика.* 2013. Т. 49. № 8. С. 943–953. <https://doi.org/10.7868/S0016675813080092>
15. Kuitinen H., Sillanpaa M.J., Savolainen O. Genetic basis of adaptation: Flowering time in *Arabidopsis thaliana* // *Theor. Appl. Genet.* 1997. V. 95. P. 573–583.
16. Shindo C., Lister C., Crevillen P. et al. Variation in the epigenetic silencing of *FLC* contributes to natural variation in *Arabidopsis* vernalization response // *Genes and Development.* 2006. V. 20. P. 3079–3083. <https://doi.org/10.1101/gad.405306>

17. Lee I., Amasino R.M. Effect of vernalization, photoperiod and light quality on the flowering phenotype of *Arabidopsis* plants containing the *FRIGIDA* gene // *Plant Physiol.* 1995. V. 108. P. 157–162.
18. Coustham V., Li P., Strange A. et al. Quantitative modulation of polycomb silencing underlines natural variation in vernalization // *Science.* 2012. V. 337. P. 584–587.
<https://doi.org/10.1126/science.1221881>
19. Duncan S., Holm S., Questa J. et al. Seasonal shift in timing of vernalization as an adaptation to extreme winter // *ELIFE.* 2015. V. 23. № 4.
<https://doi.org/10.7554/eLife.06620>
20. Saleh A., Alvarez-Venegas R., Avramova Z. Dynamic and stable histone H3 methylation patterns at the *Arabidopsis FLC* and *API* loci // *Gene.* 2008. V. 423. P. 43–47.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.06.022>
21. Sheldon C.C., Hills M.J., Lister C. et al. Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 2214–2219.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0711453105>
22. Chiang G.C.K., Barua D., Kramer E.M. et al. Major flowering time gene, *Flowering Locus C*, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana* // *PNAS.* 2009. V. 106. № 28. P. 11661–1666.
<https://doi.org/10.1073/pnas.090367106>
23. Ausin L., Alonso-Blanco C., Martinez-Zapater J.M. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. P. 162–166.
24. Maruoka T., Gan E.S., Otsuka N. et al. Histone demethylases *JMJ30* and *JMJ32* modulate the speed of vernalization through the activation of *FLOWERING LOCUS C* in *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant Sci.* 2022 V. 13. P. 837831–837839.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.837831>

Peculiarities of Transcriptional Activity of Long Non-Coding RNAs (*COOLAIR*, *COLDAIR*, and *COLDWRAP*) during the Vernalization of the Plant *Arabidopsis thaliana* of Northern Natural Populations

M. V. Zaretskaya^{a, *}, O. N. Lebedeva^a, and O. M. Fedorenko^{a, **}

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

^{*}*e-mail: genmg@mail.ru*

^{**}*e-mail: fedorenko_om@mail.ru*

Peculiarities of the lncRNA expression – *COOLAIR*, *COLDAIR*, and *COLDWRAP*, which perform an important function in the vernalization-mediated epigenetic mechanism of the transition to flowering in *A. thaliana* plants of northern natural populations (Karelia), were revealed. The results obtained are partly differ from the data of other authors performing studies on pure lines and other ecotypes of this species. It is suggested that the genetic and epigenetic mechanisms involved in the process of vernalization and control of flowering times may differ in plant populations from different geographic regions.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, northern natural populations, vernalization, *FLC* expression, lncRNA expression, *COOLAIR*, *COLDAIR*, *COLDWRAP*.

ИСТОРИЯ КОЛОНИЗАЦИИ ОСТРОВА ИТУРУП КРАСНО-СЕРОЙ ПОЛЕВКОЙ *Craseomys rufocanus* ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА ФРАГМЕНТА ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* (*cytb*)

© 2023 г. Н. И. Абрамсон¹, *, Л. С. Турсунова¹, Т. В. Петрова¹, И. Ю. Попов², В. В. Платонов¹, А. В. Абрамов¹

¹Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: natalia_abr@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.2023 г.

После доработки 10.04.2023 г.

Принята к публикации 11.04.2023 г.

С целью исследования путей колонизации красно-серой полевкой о. Итуруп на основе распределения и численности гаплотипов фрагмента митохондриального гена цитохрома *b* (662 пн) проведен сравнительный анализ генетической изменчивости популяций полевок из разных локалитетов по периметру острова и полевок островов Хоккайдо, Кунашир и Сахалин, а также прилежащих районов материковой суши. Все изученные экземпляры красно-серой полевки с о. Итуруп (68) представлены единственным гаплотипом, наиболее близким к гаплотипам полевок с о. Сахалин. Только один экземпляр с о. Кунашир, ближайшего к Итурупу, обладал таким же гаплотипом. Еще три экземпляра с этого острова были близки к гаплотипам полевок с о. Сахалин и попадали с ними в одну кладу, большинство же гаплотипов полевок Кунашира близки к гаплотипам полевок Хоккайдо и составляют с ними одну самостоятельную кладу, сильно отличающуюся генетически от особей Сахалина и Итурупа. Полученные данные о генетической изменчивости полевок с о. Итуруп убедительно свидетельствуют в пользу недавнего завоза красно-серой полевки *C. rufocanus* на этот остров, вероятнее всего с морским транспортом с Сахалина.

Ключевые слова: красно-серая полевка, филогеография, цитохром *b*, о. Итуруп, Курильские острова.

DOI: 10.31857/S0016675823080027, **EDN:** XSESJW

История формирования островной фауны Курильской гряды и Японского архипелага изучалась на различных модельных объектах. В предыдущих исследованиях были показаны пути, по которым на Японские и Курильские острова проникли полевки, бурундуки, зайцы и другие мелкие млекопитающие [1, 2]. Последний крупный рост численности и биоразнообразия наземной фауны этих островов связывают с максимумом последнего оледенения (МПО) 20–18 тыс. лет назад и наличием сухопутных мостов, соединяющих острова с Евразийским континентом [3–6]. Вместе с потеплением в голоцене уровень моря поднимался, мосты затапливались, что стало преградой для миграции фауны с материка.

Курильскую гряду делят на два крупных биогеографических района [7]. Флора и фауна северных островов (от Парамушира до Симушира) сходны с фауной Камчатского п-ва, фауна и флора южных островов (от Урупа до Хоккайдо и Сахалина) ближе к таковым приморских территорий на континенте. Пролив Буссоль между Уру-

пом и Симуширом является биогеографическим рубежом – в период плейстоценовых оледенений данный пролив из-за сильных течений не покрывался льдом, в то время как проливы меньшего размера покрывались коркой льда, что позволяло фауне мигрировать с материка на острова [7].

Предполагается, что большая часть фауны появилась на Курильских островах порядка 60–68 тысяч лет назад (т.л.н.), в период существования сухопутного моста [8]. Одними из первых (~15 т.л.н.) островов, окончательно отделившихся от островной цепочки, связанной с материком, были Итуруп и Уруп [9]. Это вулканические острова, находящиеся в значительном отдалении от материка и других островов. На о. Итуруп примерно 8–9 т.л.н. произошло крупное извержение вулкана Львиная пасть. В результате извержения слой тефры накрыл большую часть острова, что повлияло на формирование флоры и фауны [10]. Есть данные о намеренном антропогенном завозе млекопитающих на Итуруп [9–11]. Для сохранения и размножения видов на Итуруп в XIX в. российско-

Таблица 1. Сведения о материале, использованном в работе

№ на карте	Место сбора материала	Номера последовательностей в Генбанке
1	о. Итуруп, 2 км ю-в г. Курильск, Курильский рыболовный завод, 45.216° N, 147.901° E	OP246032–OP246040
2	о. Итуруп, северная часть, устье р. Славная, 45.488° N, 148.610° E	OP246041–OP246049
3	о. Итуруп, северная часть, устье р. Славная, 45.389° N, 148.481° E	OP246050–OP246072
4	о. Итуруп, южная часть, Одесский залив, 44.809° N, 147.244° E	OP246050–OP246072
5	о. Итуруп, залив Касатка, 44.979° N, 147.627° E	OP246089–OP246097
6	о. Итуруп, бухта Доброго Старта, 44.041° N, 145.863° E	OP246098
7	о. Кунашир, кальдера Головина, 43.859° N, 145.513° E	OP246103
8	о. Кунашир, Андреевка, 43.888° N, 145.624° E	OP246105–OP246106, OP246108–OP246110, OP246112
9	о. Кунашир, Саратовка, 44.266° N, 146.107° E	OP246104, OP246107, OP246111
10	о. Сахалин, Институт морской геологии и геофизики, 47.029° N, 142.717° E	OP246099, OP246100, OP246102
11	о. Сахалин, биостанция Сокол, 47.243° N, 142.774° E	OP246101

американские исследователи завозили: песцов *Vulpes logopus* L., 1758, в XX в. — европейских норок *Mustela lutreola* L., 1761 (и случайно завезли серых крыс *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), а также собак *Canis familiaris* L., 1758.

В настоящий момент фауна млекопитающих Итурупа насчитывает восемь видов [12], в том числе: лисица *Vulpes vulpes* L., 1758, соболь *Martes zibellina* L., 1758, бурый медведь *Ursus arctos* L., 1758. Из грызунов на острове распространены: домовая мышь *Mus musculus* L., 1758, серая крыса *Rattus norvegicus* и красно-серая полевка *Craseomys rufocanus* Sundevall, 1846.

Красно-серая полевка — один из самых широкоарельных евразийских видов грызунов. Ее ареал охватывает всю лесную зону от Финляндии до Приморского края России, северного Китая, Камчатки, Японских и части Курильских островов (в том числе островов Итуруп, Кунашир, Парамушир) [12, 13]. Результаты анализа изменчивости митохондриального гена цитохрома *b* (*cytb*) в популяциях красно-серой полевки со всего видового ареала [13] показали, что полевки относятся к четырем генетическим линиям. Характерная генетическая структура могла возникнуть в результате фрагментации ареала в эпохи плейстоценовых оледенений и изоляции популяций в рефугиумах. Подробные исследования истории расселения красно-серой полевки [13–16] с анализом данных митохондриальной ДНК в регионе не включали материал с о. Итуруп, и до настоящего времени пути и время проникновения этого вида на остров остаются неизвестными.

Стоит отметить, что лесные полевки, занимающие аналогичные биотопы: *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779 и *Craseomys rex* Imaizumi, 1971, обитают на соседних крупных островах Хоккайдо и Сахалине, но на Итурупе не обнаружены. Цель данной работы — на основе сравнительного анализа последовательностей цитохрома *b* полевок с о. Итуруп, соседних регионов материка и с островов Японского моря проверить гипотезы о путях колонизации Итурупа красно-серой полевкой и выявить генетическую структуру ее популяции на острове.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 68 образцов тканей красно-серой полевки из коллекции Зоологического института РАН, собранных в пяти локалитетах, расположенных по периметру о. Итуруп, девять образцов с о. Кунашир и четыре образца с Сахалина. Новые данные представлены в табл. 1.

ДНК выделяли из тканей, фиксированных 96%-ным этанолом, с помощью набора GeneJET Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific). Фрагмент гена цитохрома *b* (1010 пн) был амплифицирован с использованием протокола ПЦР и праймеров UCSBU-LM [17]. Полученные ПЦР-продукты были визуализированы в агарозном геле и очищены с помощью набора Cleanup S-Cap (Евроген, Россия). Секвенирование проводили с теми же праймерами в обоих направлениях на автоматическом секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) с

Таблица 2. Генетическое разнообразие островных популяций

Популяции	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>Pi</i> (SD)	<i>Hd</i> (SD)	TajimaD	TajimaD's <i>P</i> -value	Fu's <i>F_s</i>	Fu's <i>P</i> -value
Итуруп	67	1	0.000	0.000	—	—		
Кунашир	19	13	0.014 (0.007)	0.959 (0.02)	0.2870	0.655	−1.536	0.253
Сахалин	28	22	0.011 (0.007)	0.968 (0.02)	−1.163	0.116	−10.690	0.001
Хоккайдо	77	37	0.005 (0.003)	0.956 (0.01)	0.000	1.000	−26.366	0.000

Примечание. *N* – количество образцов, *H* – количество гаплотипов, *Pi* – нуклеотидное разнообразие, *Hd* – гаплотипическое разнообразие, SD – стандартное отклонение.

наборами BigDye Terminator kit v. 3.1/1.1 (Applied Biosystems, США).

Прямые и обратные последовательности фрагмента *cytb* были объединены в консенсусную последовательность в программе Bioedit 7.0 [18]. Множественное выравнивание построено алгоритмом MUSCLE в программе Unipro Ugene ver. 37 [19]. Для наиболее полной картины к полученным последовательностям *cytb* добавлены ортологичные последовательности из базы данных NCBI Nucleotide с Японских о-вов, Сахалина и материковой части Дальнего Востока, полученные в рамках предыдущих работ [13, 16, 20], № в Генбанке: JF713616–17, JF713623–24, JF713628–30, JF713632–33, JF713637, JF713639, JF713642–44, JF713649, JF713654–55, JF713663–65, JF713678, JF713680, JF713571–72, JF713581–85, JF713593–94, JF713598–99, JF713602–03, JF713537, JF713540, JF713548, JF713552–54, JF713567–71, JF713573, AB031555–61, AB031563, AB031565, AB031570–73, AB031576–77, AB031579, JF713560–61, JF713534, JF713549, JF713547, JF713527–28, JF713673–74, JF713676–77, JF713666, JF713668–70, AB675444–46, FJ792779, FJ792776, FJ792778, FJ792781, FJ792788–92, LC406450, AF429816, KY968261, KY968263–65, KY968282, KY968275, KY968284, KY968286.

Количество гаплотипов, информативных сайтов и единичных мутаций, гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие подсчитано в программе DnaSP ver. 5 [21]. Парные генетические дистанции посчитаны в программе Mega11 [22].

Для поиска всех возможных генетических связей между выявленными гаплотипами в программе PopArt ver. 1.7 [23] была построена медианная сеть гаплотипов методом Median-Joining [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Окончательное выравнивание содержало 371 последовательность длиной в 662 пн. Среди них 152 переменных сайта, 93 информативных и 59 сайтов с единичными заменами. Новые последо-

вательности загружены в базу данных NCBI под номерами OP246032–OP246112 (табл. 1).

Все 68 образцов с о. Итуруп представлены одним гаплотипом, такой же гаплотип обнаружен и у одного образца с острова Кунашир. Этот гаплотип всего на две нуклеотидных замены отличается от большинства гаплотипов полевок с Сахалина. Три из девяти новых исследованных экземпляров с о. Кунашир имеют гаплотипы, идентичные двум самым распространенным гаплотипам среди полевок о. Сахалин, и попадают в так называемую Сахалинскую кладу (рис. 1). Тогда как большинство гаплотипов полевок с о. Кунашир (и вновь исследованные, и изученные ранее [12]) сильно отличаются от полевок с Сахалина, и близки к гаплотипам полевок с Хоккайдо, с которыми составляют единую кладу (рис. 1). Так как образцы с точек по всей протяженности о. Итуруп представлены одним гаплотипом, измерение базовых статистик генетической изменчивости не имеет смысла.

На медианной сети гаплотипов (рис. 1) видна структура из четырех клад: Сахалинской, Хоккайдо, и двух материковых клад. Топология сети, полученной в этой работе, показывает схожую топологию с сетью, построенной в предыдущих исследованиях [13], однако имеется ряд различий, описанных ниже. В работе N.I. Abramson с соавт. [13] все образцы красно-серой полевки с о. Кунашир попадали в единую кладу с полевками с островов Японского архипелага: Хоккайдо, Тобетсу и Рисири. Среди дополнительно исследованных в данной работе образцов с Кунашира, четыре попали в кладу вместе с сахалинскими образцами, а три из четырех новых образцов с Сахалина попали в одну кладу с гаплотипами полевок с Хоккайдо и Кунашира.

Генетическое разнообразие в островных популяциях красно-серой полевки с Сахалина, Кунашира и Хоккайдо оценивали для каждой группы.

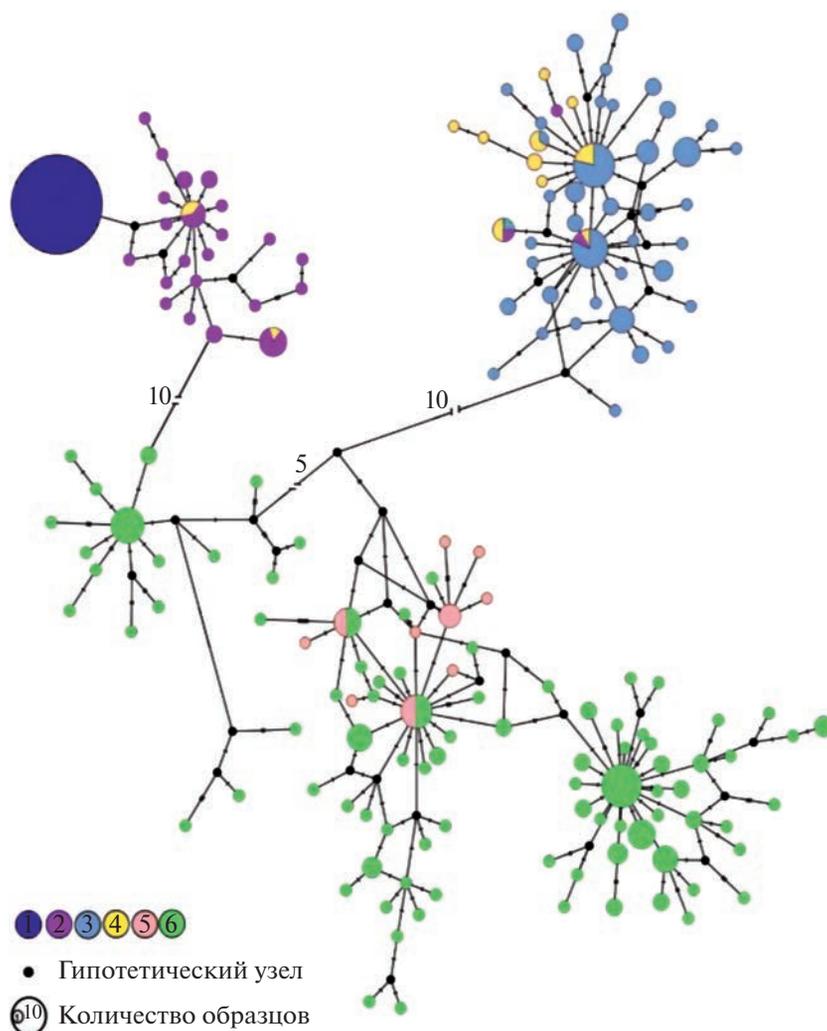


Рис. 1. Сеть гаплотипов, построенная методом Median Joining на основе участка *cytb*. Цифрами обозначены образцы Итурупа (1), Сахалина (2), Хоккайдо (3), Кунашира (4), Камчатки и Парамушира (5), и части Дальнего Востока (6), в который включены Китай, Монголия, Россия (Магаданская и Амурская области, Приморский и Хабаровский край, Республика Саха (Якутия), Республика Бурятия, Чукотский А.О.).

Во всех группах (табл. 2) наблюдалось низкое нуклеотидное разнообразие – от 0.005 ± 0.003 до 0.014 ± 0.007 , и высокое гаплотипическое разнообразие ($0.96–0.97 \pm 0.2$). Анализ попарных генетических дистанций между островными популяциями (табл. 3) выявил наибольшие значения для популяций с Итурупа и Хоккайдо (3.5%) и наи-

меньшие (0.8%) – для популяций с Итурупа и Сахалина.

ОБСУЖДЕНИЕ

Остров Итуруп – вулканический остров, сходный по флористическому составу с Хоккайдо и

Таблица 3. Попарные генетические дистанции между группами популяций

Группа	Сахалин	Хоккайдо	Кунашир	Итуруп
Сахалин	–	–	–	–
Хоккайдо	0.03299	–	–	–
Кунашир	0.02546	0.01200	–	–
Итуруп	0.00838	0.03513	0.02594	–

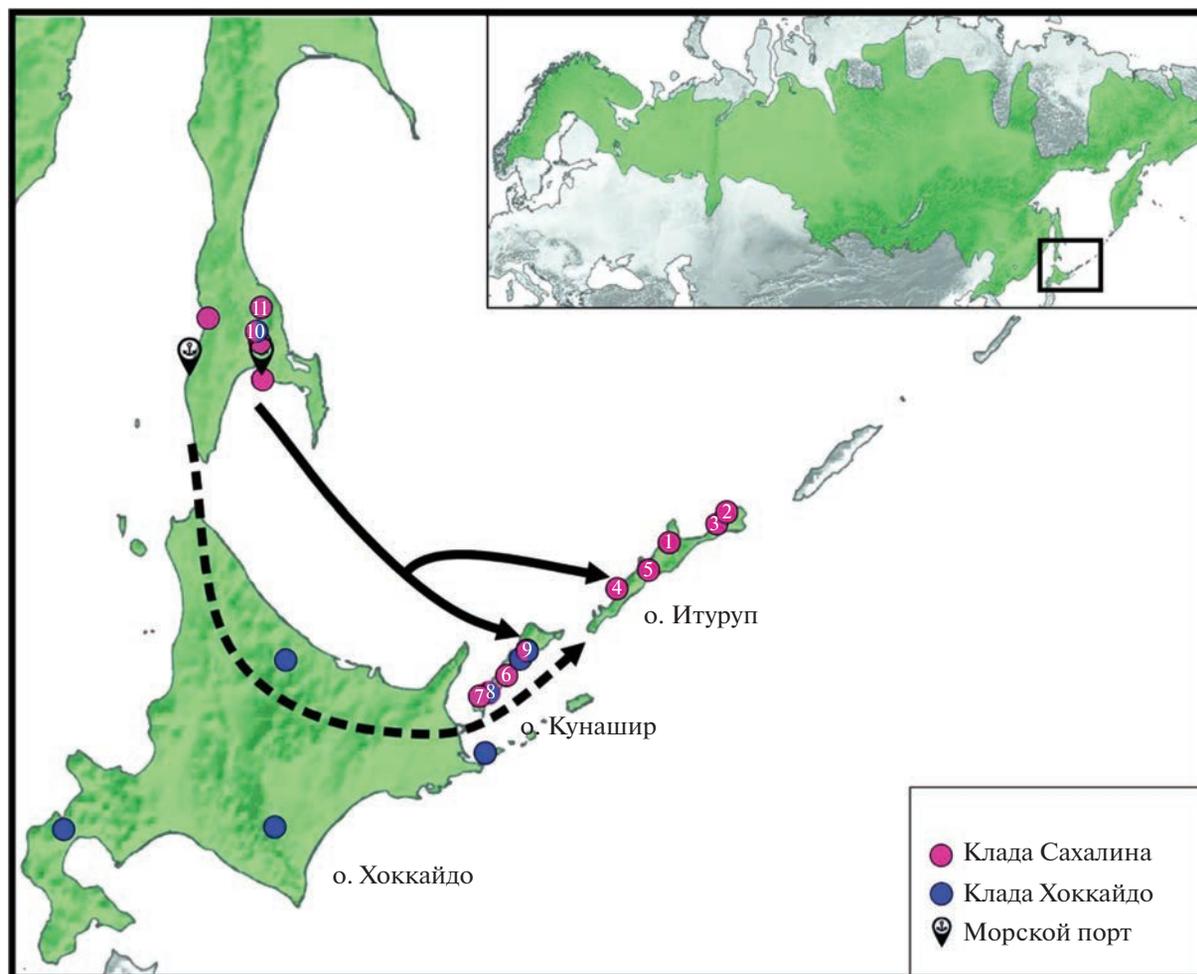


Рис. 2. Карта-схема – две вероятные гипотезы о путях колонизации о. Итуруп красно-серой полевкой. Зеленым цветом обозначен ареал *Craseomys rufocanus*. Стрелками обозначены возможные пути миграции *C. rufocanus*; пунктирной линией – согласно гипотезе о естественной миграции, сплошной линией – согласно гипотезе непреднамеренной интродукции с морским транспортом. Значок с якорем обозначает место расположения морского порта, синими и розовыми кружками обозначены точки сбора образцов, номера точек соответствуют номерам в табл. 1.

Сахалином. На островах присутствуют фрагменты горной тайги, горные елово-пихтовые леса с подлеском из курильского бамбука и заросли кедрового стланика [25]. Фаунистический состав Итурупа значительно беднее, чем на Хоккайдо и на Сахалине [8, 26]. Явление постепенного обеднения видового разнообразия в зависимости от удаления от материка отмечалось ранее [27]. Чаще всего на отдаленные острова животные попадают с ближайших островов, однако регистрируются случаи интродукций с отдаленных территорий [9, 11].

Возможны несколько вариантов появления красно-серой полевки на Итурупе (рис. 2). Согласно первой гипотезе, красно-серые полевки могли мигрировать по сухопутному мосту с Евразийского континента, где обосновались не позднее 15 т.л.н. (это срок предположительной

изоляции Итурупа от соседнего острова). В результате извержения вулкана Львиная Пасть около девяти т.л.н. большая часть популяции могла погибнуть. Так как на территории Евразии красно-серые полевки заселяют места недавних пожаров, можно предположить, что полевки могли выжить и после извержения вулкана, а в дальнейшем распространиться по всему острову. Вторая гипотеза – красно-серые полевки не мигрировали на Итуруп по сухопутному мосту в позднем плейстоцене; если же мигрировали, то не смогли выжить при масштабном природном катаклизме. А те популяции, которые населяют остров в настоящее время, являются потомками небольшого количества особей, появившихся на острове в результате случайной недавней инвазии.

В пользу первой гипотезы о заселении Итурупа по сухопутному мосту могло бы свидетельство-

вать наблюдаемое постепенное снижение видо-вого разнообразия в направлении материк—Хоккайдо—Кунашир—Итуруп. Геологические и флористические паттерны этих территорий похожи, на дальних островах обитают те же виды, что и на Хоккайдо. На островах Японского архипелага, как и на Сахалине отмечается экспансивный рост популяций *C. rufocanus*, *Apodemus* sp. и других мелких млекопитающих, начало которого соотносится с началом потепления около десяти тысяч лет назад [28]. По аналогии можно было бы предположить, что популяции Итурупа так же испытала экспансивный рост в данный период. Большинство видов могли обосноваться на острове до исчезновения сухопутного моста. Впоследствии большое расстояние (>22 км) до ближайших островов и материка ограничило миграцию. На видовое разнообразие в значительной степени влияли природные катаклизмы, в том числе извержение вулкана Львиная пасть, в результате чего фауна и флора острова попали под эффект “бутылочного горлышка” [29]. Извержение вулкана Львиная пасть могло нанести значительный урон популяции, тем не менее нельзя исключать, что небольшая часть ее могла выжить и впоследствии размножиться. Однако такому сценарию противоречат полученные данные о генетическом разнообразии полевок о. Итуруп. Сухопутный мост проходил через Хоккайдо, следовательно, и в случае такого сценария, гаплотипы полевок Итурупа должны были бы быть генетически близки к гаплотипам полевок о-вов Хоккайдо и Кунашир, однако это не так. Кроме того, даже в случае прохождения через бутылочное горлышко 8–9 т.л.н. и последующем экспансивном росте мы наблюдали бы тогда хотя бы несколько гаплотипов, отличающихся одной—двумя случайными заменами и характерную звездообразную структуру на сети. В пользу гипотезы о естественном заселении Итурупа мог бы свидетельствовать тот факт, что красно-серые полевки способны плавать и преодолевать водные преграды [15]. Однако мы не рассматриваем вариант такого естественного недавнего заселения Итурупа, так как расстояние между ближайшим островом, на котором обнаружены красно-серые полевки, 23 километра (расстояние от Итурупа до Кунашира по данным Google maps, 26.04.2022), такую водную преграду полевки преодолеть не могут. Севернее Итурупа находится о. Уруп, на котором красно-серых полевок не обнаружено.

Таким образом, вторая гипотеза наиболее вероятна. Особи с Итурупа генетически близкородственны особям с Сахалина. Три особи с Сахалина, принадлежащие к кладе Хоккайдо, были выловлены в южной части Сахалина (рис. 2). Возможно благодаря морскому сообщению животные были случайно завезены с Кунашира на

Сахалин и там выловлены. Все исследуемые красно-серые полевки Итурупа по данным анализа участка гена *cytb* имеют один гаплотип, отличающийся всего на две замены от гаплотипов сахалинских зверьков, что говорит о недавнем однократном завозе этих животных на Итуруп с Сахалина. Все факты однозначно говорят в пользу второй гипотезы о недавнем случайном завозе красно-серой полевок *C. rufocanus* на Итуруп морским транспортом. Это вполне логично, если учесть, что со второй половины XX в. морское судоходство между о-вами Сахалин, Кунашир и Итуруп интенсивно развивалось.

Авторы признательны С.Ю. Бодрову и О.В. Бондаревой за конструктивные замечания при проведении работы. И.Ю. Попов благодарит Русское географическое общество за организацию экспедиции “Восточный бастион. Курильская гряда”, в ходе которой была собрана часть материала.

Исследование выполнено в рамках проекта Министерства науки и высшего образования РФ (№ 075-15-2021-1069) и государственного задания № 122031100282-2.

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

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parent C.E., Caccone A., Petren K. Colonization and diversification of Galápagos terrestrial fauna: A phylogenetic and biogeographical synthesis // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2008. V. 363. № 1508. P. 3347–3361. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0118>
2. Sartono S. On pleistocene migration routes of vertebrate fauna in Southeast Asia // Geol. Soc. of Malaysia. Bulletin. 1973. № 6. P. 273–286.
3. Sato J. A review of the processes of mammalian faunal assembly in Japan: Insights from molecular phylogenetics // Species Diversity of Animals in Japan. Diversity and Commonality in Animals. Tokyo: Springer, 2016. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56432-4_3
4. Dobson M. Patterns of distribution in Japanese land mammals // Mammal Review. 1994. V. 24. № 3. P. 91–111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1994.tb00137.x>
5. Wakana S., Sakaizumi M., Tsuchiya K. et al. Phylogenetic implications of variations in rDNA and mtDNA in red-backed voles collected in Hokkaido, Japan, and in Korea // Mammal Study. 1996. V. 21. № 1. P. 15–26. <https://doi.org/10.3106/mammalstudy.21.15>

6. Kohli B., Fedorov V., Waltari E., Cook J. Phylogeography of a Holarctic rodent (*Myodes rutilus*): Testing high-latitude biogeographical hypotheses and the dynamics of range shifts // *J. Biogeography*. 2014. V. 42. P. 377–389.
<https://doi.org/10.1111/jbi.12433>
7. Богатов В.В. Биогеографические проблемы Курильского архипелага // *Растительный и животный мир Курильских островов*. Владивосток: Дальнаука, 2002. С. 150–160.
8. Hoekstra H., Fagan W. Body size, dispersal ability and compositional disharmony: The carnivore-dominated fauna of the Kuril Islands // *Diversity and Distributions*. 1998. V. 4. P. 135–149.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1998.00016.x>
9. Belousova M., Belousov A., Miller T. Kurile Islands // *Encyclopedia of Islands*. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press, 2009. P. 520–524.
10. Razjigaeva N.G., Ganzey L.A., Grebennikova T.A. et al. Holocene climatic changes and vegetation development in the Kuril Islands // *Quaternary International*. 2013. V. 290–291. P. 126–138.
<https://doi.org/10.1016/j.quaint.2012.06.034>
11. Khlyap L.A., Bobrov V.V., Warshavsky A.A. Biological invasions on Russian territory: Mammals // *Russ. J. Biol. Invasions*. 2010. V. 1–2. P. 127–140.
<https://doi.org/10.1134/S2075111710020128>
12. Frisman L.V., Kartavtseva I.V., Pavlenko M.V. et al. Gene-geographic variation and genetic differentiation in red-backed voles of the genus *Clethrionomys* (Rodentia, Cricetidae) from the Region of the Sea of Okhotsk // *Russ. J. Genetics*. 2002. V. 38. P. 538–547.
<https://doi.org/10.1023/A:1015595315205>
13. Abramson N., Petrova T., Dokuchaev N. et al. Phylogeography of the gray red-backed vole *Craseomys rufocanus* (Rodentia: Cricetidae) across the distribution range inferred from nonrecombining molecular markers // *Russ. J. Theriology*. 2012. V. 11. P. 137–156.
<https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.11.2.04>
14. Ishibashi Y., Saitoh T., Abe S., Yoshida M.C. Sex – related spatial kin structure in a spring population of grey – sided voles *Clethrionomys rufocanus* as revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analyses // *Mol. Ecology*. 1997. V. 6. № 1. P. 63–71.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1997.00152.x>
15. Ims R.A. Kinship and origin effects on dispersal and space sharing in *Clethrionomys rufocanus* // *Ecology*. 1989. V. 70. № 3. P. 607–616.
<https://doi.org/10.2307/1940212>
16. Iwasa M.A., Utsumi Y., Nakata K. et al. Geographic patterns of cytochrome *b* and *sry* gene lineages in the gray red-backed vole *Clethrionomys rufocanus* from Far East Asia including Sakhalin and Hokkaido // *Zool. Sci.* 2000. V. 17. № 4. P. 477–484.
[https://doi.org/10.2108/0289-0003\(2000\)17\[477:GPO-CBA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2108/0289-0003(2000)17[477:GPO-CBA]2.0.CO;2)
17. Abramson N., Melnikova E., Kostygov A. Genetic variation and phylogeography of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*, Arvicolinae, Rodentia) in Russia with special reference to the introgression of the mtDNA of a closely related species, red-backed vole (*Cl. rutilus*) // *Russ. J. Genetics*. 2009. V. 45. P. 533–545.
<https://doi.org/10.1134/S1022795409050044>
18. Hall T. BioEdit: An important software for molecular biology // *GERF Bull. of Biosciences*. 2011. V. 2. № 1. P. 60–61.
19. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. The UGENE team Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. № 8. P. 1166–1167.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
20. Cook J.A., Runck A.M., Conroy C.J. Historical biogeography at the crossroads of the northern continents: Molecular phylogenetics of red-backed voles (Rodentia: Arvicolinae) // *Mol. Phylogenet. and Evol.* 2004. V. 30. № 3. P. 767–777.
[https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00248-3)
21. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C. et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. № 12. P. 3299–3302.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
22. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis Version 11 // *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38. I. 7. P. 3022–3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
23. Bryant L.J. Popart: Full-feature software for haplotype network construction // *Meth. Ecol. Evol.* 2015. V. 6. № 6. P. 1110–1116.
<https://doi.org/10.1111/2041-210x.12410>
24. Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
25. Мартыненко А.Б., Бочарников В.Н. Экологическое районирование Дальнего Востока // *Известия РАН. Серия географическая*. 2008. № 2. С. 76–84.
26. Abe H. Winter food of the red fox, *Vulpes vulpes schrenckii* Kishida (Carnivora: Canidae), in Hokkaido, with special reference to vole populations // *Applied Entomol. and Zool.* 1975. V. 10. № 2. P. 40–51.
<https://doi.org/10.1303/aez.10.40>
27. Brown J.H. Mammals on mountaintops: Nonequilibrium insular biogeography // *Am. Naturalist*. 1971. V. 105. № 945. P. 467–478.
<https://doi.org/10.1086/282738>
28. Honda A., Murakami S., Harada M. et al. Late Pleistocene climate change and population dynamics of Japanese *Myodes* voles inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences // *J. Mammalogy*. 2019. V. 100. № 4. P. 1156–1168.
<https://doi.org/10.1093/jmammal/gyz093>
29. Nei M., Maruyama T., Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations // *Evolution*. 1975. V. 29. № 1. P. 1–10.
<https://doi.org/10.2307/2407137>

The Colonization History of Iturup Island by the Red-Backed Vole *Craseomys rufocanus* according to the Analysis of the Cytochrome *b* (*cytb*) Fragment

N. I. Abramson^{a, *}, L. S. Tursunova^a, T. V. Petrova^a,
I. Yu. Popov^b, V. V. Platonov^a, and A. V. Abramov^a

^aZoological Institute, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 199034 Russia

^bSaint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: natalia_abr@mail.ru

The hypotheses on colonization history of red-backed vole of Iturup Island comparative analysis of distribution and number of haplotypes of mitochondrial cytochrome *b* gene (662 bp) in vole sampled at various sites along the Iturup Island perimeter and Hokkaido, Kunashir and Sakhalin Islands and adjacent regions of the mainland has been carried out. All studied samples from the Iturup Island (68) belonged to the only one haplotype most close to the haplotypes of voles from the Sakhalin Island. The only sample from the Kunashir Island, nearest to the Iturup Island possessed the same haplotype, three additional samples from this island have haplotypes related to haplotypes of voles from the Sakhalin Island and fall within the so called “Sakhalin” clade, while the majority of haplotypes of voles from the Kunashir Island appeared to be close to haplotypes of voles from the Hokkaido Island and make up with them one independent clade, genetically very different from clade of Sakhalin and Iturup samples. The obtained data on the genetic variability of voles from the Iturup Island provides convincing evidence in favour of the recent introduction of the red-backed vole *C. rufocanus* to the Iturup Island, most likely with sea transport from Sakhalin.

Keywords: red-backed vole, phylogeography, cytochrome *b*, Iturup Island, Kuril Islands.

УДК 577.21:616.895

ПОЛНОГЕНОМНОЕ АССОЦИАТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РИСКА РАЗВИТИЯ ШИЗОФРЕНИИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

© 2023 г. А. Э. Гареева^{1, 2, *}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450008 Россия

*e-mail: annagareeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.

После доработки 13.03.2023 г.

Принята к публикации 16.03.2023 г.

Полногеномные ассоциативные исследования оказались мощным подходом к открытию генов подверженности к шизофрении; их выводы имеют важное значение не только для нашего понимания генетической архитектуры данного заболевания, но и для потенциальных применений в области персонализированной медицины. Цель настоящего исследования – изучение генетических факторов риска развития шизофрении при проведении полногеномного анализа ассоциации в Республике Башкортостан.

Ключевые слова: генетика, шизофрения, полногеномный анализ ассоциаций, этническая принадлежность, Республика Башкортостан, международный консорциум по психиатрической генетике.

DOI: 10.31857/S0016675823080076, **EDN:** XTJAXD

В мире проведено более 143 полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) с риском развития шизофрении. Результаты ряда исследований GWAS показали наличие существенной генетической дифференциации популяций по полиморфным вариантам генов, ассоциированных с данным заболеванием [1, 2]. Самый масштабный на сегодняшний день полногеномный анализ ассоциаций в рамках международного консорциума по психиатрической генетике PGC, с участием 76755 больных шизофренией и 243649 здоровых индивидов, выявил 120 генов, участвующих в таких фундаментальных процессах как организация синапсов, дифференцировка нейронов и нейрональная трансмиссия. Среди них были обнаружены ген субъединицы рецептора глутамата *GRIN2A*, фактор транскрипции *SP4*, ген конститутивного коактиватора PPAR-гамма-подобного белка 1 *FAM120A*, ген субъединицы когезина SA-1 (*SA1*) *STAG1*, а также ряд других редких разрушительных вариантов генов у больных шизофренией [3].

Недавно проведенное крупнейшее полногеномное секвенирование экзома (WES), включавшее 24248 больных шизофренией и 97322 здоровых индивидов, идентифицировало ультраредкие мутации, приводящие к появлению укороченных форм белка в 32 генах, большинство из которых вовлечены в формирование, структуру и функции синапсов и

ассоциированы с высоким риском развития шизофрении [4]. Это открытие указывает на синаптическую дисфункцию как на возможную причину развития шизофрении. А идентификация ультраредких вариантов генов субъединицы рецептора NMDA *GRIN2A* и *GRIA3* предполагает нарушение регуляции глутаматергической системы и образование синапсов интернейронов [4]. Важно отметить, что в результате последнего GWAS также были идентифицированы гены *STAG1*, *FAM120A*, *GRIN2A*, *SP4*, содержащие редкие варианты [4].

Таким образом, конвергенция частых и редких вариантов генов, ассоциированных с шизофренией, поддерживается тем фактом, что недавние крупнейшие GWAS и WES выявили группу генов, участвующих в сходных биологических процессах, таких как пре- и постсинаптические процессы в возбуждающих и тормозных нейронах.

Цель настоящего исследования – изучение генетических факторов риска развития шизофрении при проведении полногеномного анализа ассоциации в Республике Башкортостан (рис. 1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – 437 мужчин, 379 женщин (из них 320 русских, 357 татар, 139 башкир) с диагнозом параноидная шизофрения (ПШ) F20.xx

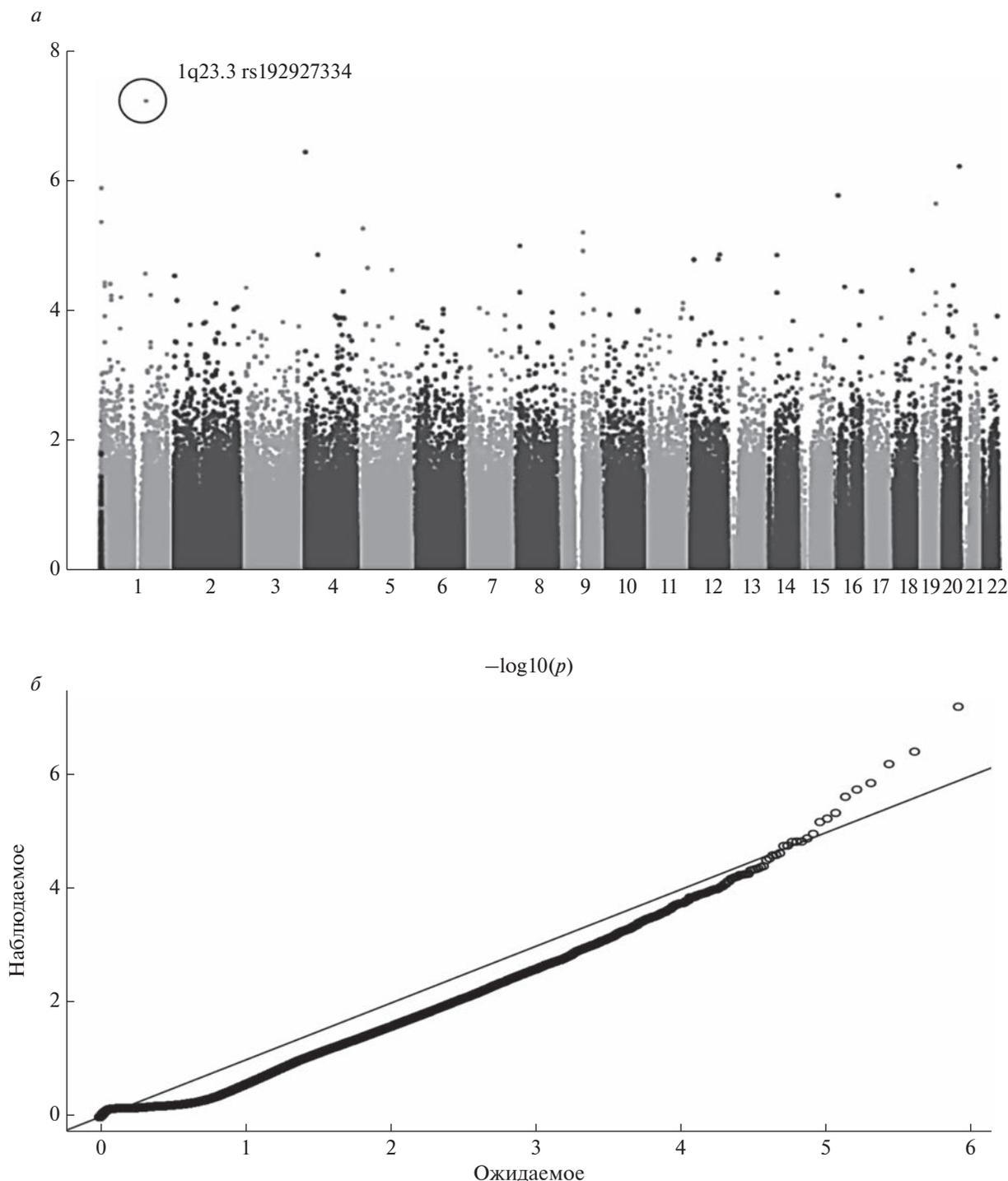


Рис. 1. Графическое изображение результатов полногеномного анализа ассоциации 395832 ОНП с параноидной шизофренией (Manhattan plot). По оси X – хромосомная локализация ОНП, по оси Y – значения отрицательного десятичного логарифма уровня значимости P -value (a); b – квантиль-квантиль график (плот) Q-Q plot. Иллюстрация оценки наличия популяционной стратификации.

согласно международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10), находящихся на лечении в Республиканской клинической психиатрической больнице № 1 Министерства здравоохранения Республики Башкортостан. Сред-

ний возраст больных составил 24.9 ± 8.9 лет. Средний возраст начала заболевания составил 22.4 ± 7.3 лет. Информацию по этнической принадлежности до третьего поколения получали путем опроса.

Контрольная группа состояла из 402 русских, 383 татар, 204 башкир той же возрастной группы, не состоявших на учете у психиатра и нарколога и отрицавших у себя отягощенную наследственность по психическим заболеваниям. Средний возраст здоровых доноров составил 32.4 ± 12.4 года.

Независимая выборка больных состояла из 190 индивидов (68 русской, 61 татарской и 61 башкирской этнической принадлежности).

Независимая выборка контроля состояла из 238 здоровых индивидов: 95 русских, 83 татар и 60 башкир.

ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [5].

Полногеномное генотипирование образцов ДНК было проведено на биочипе Illumina Human 610-Quad PsychChip, включавшем 610000 однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОМП).

Полногеномный анализ ассоциации однонуклеотидных полиморфных локусов выполнен с помощью пакета программ PLINK 2.0 [6] в Институте Брода при Гарвардском университете в рамках МКПГ [3].

Проверка качества образцов ДНК и прогено-типированных ОМП подразумевала исключение из дальнейшего анализа образцов ДНК с выявленным несоответствием между обозначенным и установленным при генотипировании полом, а также образцов ДНК, в которых более чем у 2% маркеров не прошло генотипирование. Дублированные образцы ДНК и образцы ДНК возможных близких родственников были выявлены и исключены на основе анализа доли идентичных аллелей у различных индивидов и доли аллелей с вероятным общим происхождением. Были исключены ОМП, по которым не прошло генотипирование более чем у 5% индивидов, ОМП с частотой редкого аллеля менее 0.01 и ОМП со статистически значимым отклонением ($p = 1.0E-06$) от равновесия Харди–Вайнберга. В результате проведения всех этапов контроля качества и корректировки генетической стратификации 395832 однонуклеотидных полиморфных вариантов были включены в дальнейших анализ. Полногеномный уровень значимости для данного исследования составил $p = 1.26E-07$.

Для снижения ошибки 1-рода была применена поправка FDR-BH (False Discovery Rate Benjamini-Hochberg) на число множественных сравнений [7].

Выборка больных и контроля, изучаемая в настоящей работе, является генетически гетерогенной, поскольку в нее входят представители различных этнических групп (русских, татар и башкир), которые сформировались на основе различных популяций западно-евразийского и восточно-евразийского происхождения. Нами была применена поправка на этническую гетерогенность групп

больных и контроля методом EIGENSTRAT [8], так как смешанное происхождение выборки, отличия по частотам аллелей полиморфных маркеров между этническими группами и различная представленность индивидов из разных этносов в выборках больных и контроля могут привести к случайной ассоциации маркеров с заболеванием.

В основе данного метода лежит вычисление главных компонент генетической изменчивости в исследуемых выборках. Установив оси генетической изменчивости выборки, обусловленные популяционной структурой, но не связанные с заболеванием, метод позволяет для каждого маркера оценить его вес в определении той или иной оси и провести тем самым индивидуальную поправку для каждого кандидатного маркера. Это минимизирует появление ложноположительных ассоциаций в силу генетической гетерогенности выборки и одновременно увеличивает вероятность определения достоверных ассоциаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты полногеномного анализа ассоциации параноидной шизофрении представлены на рис. 1.

Наиболее высокий уровень ассоциации параноидной шизофрении был обнаружен с полиморфным вариантом rs192927334 ($p = 5.99E-08$; $p_{\text{fdr}} = 2.11E-03$), локализованным в межгенном пространстве хромосомной области 1q23.3. В данном регионе расположен ген *PBX1* на расстоянии 448316 тпн от полиморфного локуса rs192927334 (рис. 1).

Ген *PBX1* кодирует гомеодомен-содержащий белок, максимально экспрессируется в почках и головном мозге плода [9]. Известно, что белки *PBX1* способны взаимодействовать с *NOX*-белками и рассматриваются как важные *NOX* кофакторы, участвующие в регуляции генов онтогенеза [10–12]. В частности, белки *Prep1* и *PBX1* образуют с фактором *Hoxb1* тройной комплекс, регулирующий экспрессию генов в эмбриогенезе [10–13]. Было показано, что белки *PBX* совместно с *NOX* индуцируют транскрипцию гена *SHN*. Известно, что белок *SHN* существует для развития различных тканей во время эмбриогенеза. Изучение функции *SHN* во время развития нервной трубки и сомитов было сфокусировано на его роли в спецификации дорсо-вентральной полярности этих структур, однако получены доказательства, что *SHN* выполняет дополнительные функции по выживанию и пролиферации клеток. Нарушения передачи сигналов *SHN* после ранней дорсовентральной спецификации краниальной части нервной трубки ведут к усилению клеточной гибели как в нервной трубке, так и нейральном гребне. Это указывает на то, что *SHN* постоянно необходим как трофиче-

Таблица 1. Однонуклеотидные полиморфные варианты, локализованные в области 1q23.3 и ассоциированные с параноидной шизофренией

Ген	№ rs	ОНП	Аллель 1	Частота аллеля 1 – больные, %	Частота аллеля 1 – контроль, %	Аллель 2	<i>p</i>	<i>p</i> _{fidr}
–	rs192927334	g.164146979C>A	A	0.0061	0.0363	C	5.99E-08	2.11E-03
<i>PBX1</i>	rs61803803	g.90024C>A	A	0.0196	0.0363	C	3.03E-03	0.884
–	rs10918018	g.164505021T>C	C	0.3556	0.3152	T	0.011	0.914
–	rs10753623	g.163744981T>C	T	0.4492	0.4099	C	0.014	0.924
–	rs4085003	g.164076924C>A	C	0.286	0.2518	A	0.019	0.930
–	rs7530102	g.163791020T>A	A	0.4221	0.4597	T	0.02	0.929
–	rs10753629	g.163769110T>G	T	0.4027	0.3666	G	0.021	0.929
<i>PBX1</i>	rs6672521	g.59759A>G	G	0.0863	0.1083	A	0.032	0.948
–	rs6656557	g.164209417G>A	G	0.4725	0.4386	A	0.035	0.957
–	rs10917897	g.164031874G>A	G	0.3756	0.4088	A	0.035	0.955
–	rs1745611	g.163686336C>T	C	0.451	0.4848	T	0.041	0.960
<i>PBX1</i>	rs1618566	g.83750G>A	A	0.2506	0.2805	G	0.047	0.962
–	rs1416261	g.164478592C>T	T	0.4578	0.424	C	0.047	0.962

ский и митогенетический фактор во время развития мозга [14]. Нокаут как *Prep1*, так и *PBX1* приводит к гибели мышечных эмбрионов на ранних стадиях развития [15, 16]. Снижение экспрессии *PBX1* в выделенных из жировой ткани мезенхимальных стромальных клетках приводит к значительному усилению способности к дифференцировке [17].

Анализ распределения частот генотипов полиморфного локуса rs192927334 показал, что генотип *rs192927334**C/C у больных ПШ встречается с более высокой частотой (98.78%), чем у индивидов контрольной группы (92.74%) ($p = 8.3E-09$; OR = 6.32; CI95% 3.24–12.33) (табл. 1, 2). При введении поправки на множественное сравнение для оценки доли ложноположительных результатов, проведенной с помощью метода FDR (False Discovery Rate), уровень значимости p остался статистически достоверным ($p_{fidr} = 4.68E-04$) (табл. 2). Генотип *rs192927334**A/C, напротив, чаще встречается в группе контроля – в 7.26%, по сравнению с 1.22% у больных. Показатель отношения шансов (ОШ) для генотипа *rs192927334**A/C составил 0.16 (CI95% 0.08–0.31), $p = 8.3E-09$; $p_{fidr} = 5.85E-04$ (табл. 2). Частота гомозиготного генотипа *rs192927334**A/A составила 0.00% как у больных, так и у здоровых.

Частота встречаемости аллеля *rs192927334**A у больных ПШ была значительно ниже (0.61%), чем в контрольной группе индивидов, – 3.63% ($p = 5.99E-08$; $p_{fidr} = 2.11E-03$). Показатель ОШ развития ПШ для аллеля *rs192927334**A составил

0.16 (CI95% 0.08–0.31), для аллеля *rs192927334**C – 6.12 (CI95% 3.15–11.9) (табл. 2).

Распространенность аллеля *rs192927334**A у здоровых индивидов (3.63%) была сходной с таковой у индивидов европейского происхождения: финнов (3.0%), англичан (1.6%) (табл. 3).

Учитывая этническую гетерогенность исследуемых нами выборок больных и контроля, мы также провели анализ ассоциации полиморфного локуса rs192927334, локализованного в области 1q23.3, с ПШ с учетом этнической принадлежности индивидов для оценки эффективности и достоверности проведения полногеномного анализа ассоциации в объединенной группе больных ПШ и здоровых индивидов с коррекцией на популяционную гетерогенность.

Наиболее выраженная ассоциация ПШ с ОНП rs192927334, локализованным в области 1q23.3, была выявлена у русских. Как и при анализе ассоциации объединенной группы больных и контроля, с самым высоким уровнем значимости был ассоциирован ОНП rs192927334 (табл. 2). Частота аллеля *rs192927334**A у русских больных ПШ (0.31%) была значительно ниже, чем у здоровых (4.23%) ($p = 2.4E-04$; OR = 0.07; CI95% 0.02–0.29), однако после введения поправки FDR различия оказались статистически недостоверными ($p_{fidr} = 0.999$) (табл. 2).

Анализируя ассоциацию ОНП rs192927334 с ПШ у татар, мы также обнаружили статистически значимые различия между группами больных и контроля (табл. 2). Полиморфный локус rs192927334

Таблица 2. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs192927334 в выборках больных параноидной шизофренией и в контрольных группах различной этнической принадлежности

Генотип/ аллель	Больные		Контроль		<i>p</i>	<i>p</i> _{idr}	OR (CI95%)
	<i>n</i> _i	<i>p</i> _i ± <i>s</i> _p , CI95%	<i>n</i> _i	<i>p</i> _i ± <i>s</i> _p , CI95%			
В целом							
A/A	0	—	0	—	—	—	—
A/C	10	1.22 ± 0.38 0.59–2.24	72	7.26 ± 0.82 5.72–9.05	8.3E-09	5.85E-04	0.16 (0.08–0.31)
C/C	807	98.78 ± 0.38 97.76–99.41	920	92.74 ± 0.82 90.95–94.28	8.3E-09	4.68E-04	6.32 (3.24–12.33)
A	10	0.61 ± 0.19 0.29–1.12	72	3.63 ± 0.42 2.85–4.55	5.99E-8	2.11E-03	0.16 (0.08–0.31)
C	1624	99.39 ± 0.19 98.88–99.71	1912	96.37 ± 0.42 95.45–97.15	5.99E-8	2.11E-03	6.12 (3.15–11.9)
Русские							
A/A	0	—	0	—	—	—	—
A/C	2	0.62 ± 0.44 0.08–2.24	34	8.46 ± 1.39 5.93–11.62	3.6E-06	0.999	0.07 (0.02–0.29)
C/C	318	99.38 ± 0.44 97.76–99.92	368	91.54 ± 1.39 88.38–94.07	3.6E-06	0.508	14.69 (3.5–61.63)
A	2	0.31 ± 0.22 0.04–1.12	34	4.23 ± 0.71 2.95–5.86	2.4E-04	0.999	0.07 (0.02–0.29)
C	638	99.69 ± 0.22 98.88–99.96	770	95.77 ± 0.71 94.14–97.05	2.4E-04	0.999	14.09 (3.37–58.88)
Татары							
A/A	0	—	0	—	—	—	—
A/C	4	1.12 ± 0.56 0.31–2.84	27	7.05 ± 1.31 4.7–10.09	5.7E-05	0.999	OR = 0.15 (0.05–0.43)
C/C	353	98.88 ± 0.56 97.16–99.69	356	92.95 ± 1.31 89.91–95.3	5.7E-05	0.947	OR = 6.69 (2.32–19.32)
A	4	0.56 ± 0.28 0.15–1.43	27	3.52 ± 0.67 2.34–5.09	4.4E-04	0.999	OR = 0.15 (0.05–0.43)
C	710	99.44 ± 0.28 98.57–99.85	739	96.48 ± 0.67 94.91–97.66	4.4E-04	0.999	OR = 6.49 (2.26–8.64)
Башкиры							
A/A	0	—	0	—	—	—	—
A/C	4	2.88 ± 1.42 0.79–7.2	11	5.42 ± 1.59 2.74–9.49	0.260	0.966	—
C/C	135	97.12 ± 1.42 92.8–99.21	192	94.58 ± 1.59 90.51–97.26	0.260	0.966	—
A	4	1.44 ± 0.71 0.39–3.64	11	2.71 ± 0.81 1.36–4.8	0.267	0.968	—
C	274	98.56 ± 0.71 96.36–99.61	395	97.29 ± 0.81 95.2–98.64	0.267	0.968	—

Примечание (для табл. 2, 4). *n*_i – численность групп; *p*_i – частота аллеля (генотипа).

Таблица 3. Распределение частот аллелей полиморфного варианта rs192927334 в различных популяциях по данным проекта “1000 Геномов”

Популяция	Аббревиатура	Частота аллеля A, %	Частота аллеля C, %
Китайцы	CDX/CHB	0.0000	100.0
Европейцы (север/запад)	CEU	1.52	98.48
Финны	FIN	3.03	96.97
Англичане	GBR	1.65	98.35
Мексиканцы	MXL	1.56	98.44
Африканцы	ACB	0.0000	100.0
Японцы	JPT	0.0000	100.0

был ассоциирован с уровнем значимости $p = 4.4E-04$. Показатель ОШ для аллеля rs192927334*A, определенного с частотой 0.56% у больных и 3.52% в контроле, составил 0.15 (CI95% 0.05–0.43), однако после введения поправки FDR различия оказались статистически недостоверными ($p_{\text{fdr}} = 0.999$) (табл. 2).

Аллель rs192927334*A у больных ПШ башкирской этнической принадлежности также встречался реже, чем в контрольной группе (1.44% vs 2.71%), но различия оказались не достоверны ($p = 0.267$; $p_{\text{fdr}} = 0.968$) (табл. 2).

В рамках проекта “1000 Геномов” было проведено генотипирование полиморфного локуса rs192927334 в ряде популяций мира (табл. 3). Частоты аллелей полиморфного локуса rs192927334 в популяциях Волго-Уральского региона схожи с таковыми у финнов (табл. 2, 3).

Таким образом, при анализе ассоциации ОНП rs192927334 (1q23.3) с учетом этнической принадлежности индивидов было показано, что ассоциация, установленная нами с полногеномным уровнем значимости в объединенной группе больных и контроля, наблюдается с разной степенью выраженности и при анализе ассоциации в отдельных этнических группах — русских, татар и башкир, что соответствует данным других исследований, согласно которым данная хромосомная область ассоциирована с шизофренией в популяциях европейского и азиатского происхождения [18–25].

Для подтверждения результатов полногеномного анализа был проведен репликативный анализ ассоциации в независимой выборке (табл. 4).

Распределение частот генотипов ОНП rs192927334 в объединенной независимой выборке больных и контроля различной этнической принадлежности соответствовало распределению Харди–Вайнберга (табл. 4). Частоты аллелей и ге-

нотипов ОНП rs192927334 в данной независимой выборке больных ПШ и контроля оказались сходными с таковыми в первоначально исследованных группах. Аллель rs192927334*C встречался с более высокой частотой у больных ПШ — 99.2% по сравнению с 96.82% в контроле ($p = 0.017$; OR = 4.06 (CI95% 1.17–14.13)) (табл. 4).

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs192927334 в отдельных этнических группах русских, татар и башкир независимой выборки было схожим с таковым в первоначально исследованных группах. Однако ассоциации полиморфного локуса rs192927334 с ПШ в этнических группах русских, татар и башкир выявлено не было (табл. 4).

Таким образом, результаты репликативного исследования подтверждают данные, полученные в ходе полногеномного анализа, об ассоциации ОНП rs192927334, локализованного в хромосомной области 1q23.3, с развитием параноидной шизофрении у русских, татар и башкир.

Литературных данных, посвященных изучению ассоциации ОНП rs192927334 с параноидной шизофренией, психическими заболеваниями и другими многофакторными заболеваниями, не найдено.

Тем не менее результаты целого ряда исследований демонстрируют вовлеченность полиморфных вариантов генов данной хромосомной области в развитие шизофрении (*RGS4* [20], *UHMK1* [21], *NOSIAP1* [26]), других психических заболеваний, нарушений нейронального развития. Так, была подтверждена вовлеченность ОНП хромосомной области 1q23–25 с развитием шизофрении у 1236 китайцев [23]. Другое полногеномное исследование выявило ассоциацию двух ОНП rs10218843 ($p = 3.04E-07$), rs11265461 ($p = 1.94E-07$) гена, кодирующего семейство белков, передаю-

Таблица 4. Распределение частот генотипов и аллелей полиморфного варианта rs192927334 в независимой выборке больных параноидной шизофренией и в контрольных группах различной этнической принадлежности

Генотип/аллель	Больные		Контроль		<i>p</i>	OR (CI95%)
	<i>n_i</i>	<i>p_i ± s_p, CI95%</i>	<i>n_i</i>	<i>p_i ± s_p, CI95%</i>		
В целом						
A/A	0	—	0	—	—	—
A/C	3	1.6 ± 0.92 0.33–4.62	15	6.36 ± 1.59 3.6–10.27	0.016	0.24 (0.07–0.84)
C/C	184	98.4 ± 0.92 95.38–99.67	221	93.64 ± 1.59 89.73–96.4	0.016	4.16 (1.19–14.59)
A	3	0.8 ± 0.46 0.17–2.33	15	3.18 ± 0.81 1.79–5.19	0.017	0.25 (0.07–0.87)
C	371	99.2 ± 0.46 97.67–99.83	457	96.82 ± 0.81 94.81–98.21	0.017	4.06 (1.17–14.13)
H-W		0.229 (0.632)		0.254 (0.614)		
Русские						
A/A	0	—	0	—	—	—
A/C	1	1.49 ± 1.48 0.04–8.04	5	5.32 ± 2.31 1.75–11.98	0.402	
C/C	66	98.51 ± 1.48 91.96–99.96	89	94.68 ± 2.31 88.02–98.25	0.402	
A	1	0.75 ± 0.75 0.02–4.09	5	2.66 ± 1.17 0.87–6.1	0.407	
C	133	99.25 ± 0.75 95.91–99.98	183	97.34 ± 1.17 93.9–99.13	0.407	
Татары						
A/A	0	—	0	—	—	—
A/C	1	1.69 ± 1.68 0.04–9.09	6	7.23 ± 2.84 2.7–15.07	0.239	
C/C	58	98.31 ± 1.68 90.91–99.96	77	92.77 ± 2.84 84.93–97.3	0.239	
A	1	0.85 ± 0.85 0.02–4.63	6	3.61 ± 1.45 1.34–7.7	0.245	
C	117	99.15 ± 0.85 95.37–99.98	160	96.39 ± 1.45 92.3–98.66	0.245	
Башкиры						
A/A	0	—	0	—	—	—
A/C	1	1.64 ± 1.63 0.04–8.8	4	6.78 ± 3.27 1.88–16.46	0.203	
C/C	60	98.36 ± 1.63 91.2–99.96	55	93.22 ± 3.27 83.54–98.12	0.203	
A	1	0.82 ± 0.82 0.02–4.48	4	3.39 ± 1.67 0.93–8.45	0.207	
C	121	99.18 ± 0.82 95.52–99.98	114	96.61 ± 1.67 91.55–99.07	0.207	

щих сигнал об активации лимфоцитарной молекулы член 1 (*SLAMF1*), расположенных в хромосомной области 1q23.3 с резистентной к терапии шизофрении у 795 больных и 806 здоровых китайцев [24]. Кроме того, GWAS выявил ассоциацию ОНП rs1289726 ($p = 2.0E-04$), локализованного на расстоянии 297 тпн от гена *PBX1* (1q23.3), с шизофренией у европейцев [22]. Сцепление хромосомной области 1q23 с шизофренией в семьях англичан и исландцев было продемонстрировано в ходе GWAS [18].

Была установлена ассоциация аллеля rs2275558*А гена *PBX1* подверженности к обсессивно-компульсивному расстройству как в общей выборке бразильцев, так и в выборке мужчин [27].

GWAS в европейских и афро-американских популяциях подтвердил ассоциацию ОНП rs4657247 гена *RGS5*, лежащего в области 1q23.3, с развитием биполярного расстройства [28]. GWAS-исследование J. Namkung с соавт. [29] подтвердило ранее полученные результаты работы K. Chowdari, показавшие сцепление хромосомной области 1q23.3 с риском развития шизофрении у индусов и индивидов европейского происхождения [19], выявив ассоциацию полиморфного маркера tsc1457991-tsc1254625 гена *PBX1* с алкоголизмом у 668 больных алкоголизмом и 285 здоровых индивидов, корейцев по этнической принадлежности [29]. Деления хромосомной области 1q23.3 (1.871 Mb) приводит к синдрому врожденной аномалии почек и мочевыводящих путей SACUT, для которого характерны проявляющиеся в более позднем возрасте аутизм, шизофрения, эпилепсия, нарушения интеллекта [30–32].

Таким образом, в результате настоящего исследования нами была обнаружена ассоциация однонуклеотидного полиморфного варианта rs192927334, находящегося на расстоянии 448316 тпн от гена *PBX1* в хромосомной области 1q23.3, сцепленной с риском развития шизофрении и других психических заболеваний по данным целого ряда исследований с развитием параноидной шизофрении в трех этнических группах — русских, татар и башкир, проживающих в Республике Башкортостан. Это может свидетельствовать о вероятной вовлеченности гена *PBX1* в патогенезе развития шизофрении. Особенно учитывая, что данный ген кодирует транскрипционный фактор, способствующий межбелковому взаимодействию и играющему решающую роль в целом ряде процессов развития, включая формирование структур головного мозга.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хель-

синкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

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

Автор выражает огромную благодарность сотрудникам департамента Психиатрической медицины и клинических нейронаук Кардиффского Университета (г. Кардифф, Великобритания) М. O'Donovan, V. Escott-Price, M. Owen, G. Leonenko за советы по генерации и анализу данных и участие в проекте, а также директору ИБГ УФИЦ РАН проф. Э.К. Хуснутдиновой за научное консультирование, экс-Главному врачу РКПБ № 1 Р.Г. Валинурову за помощь в организации забора материала в 2008–2012 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lam M., Chen C.Y., Li Z. et al. Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. № 12. P. 1670–1678. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0512-x>
2. Bigdeli T.B., Genovese G., Georgakopoulos P. et al. Contributions of common genetic variants to risk of schizophrenia among individuals of African and Latino ancestry // *Mol. Psychiatry.* 2020. V. 10. № 10. P. 2455–2467. <https://doi.org/1038/s41380-019-0517-y>
3. Trubetskoy V., Pardiñas A.F., Qi T. et al. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia // *Nature.* 2022. V. 604. № 7906. P. 502–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04434-5>
4. Singh T., Poterba T., Curtis D. et al. Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia // *Nature.* 2022. V. 604. P. 509–516. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04556-w>
5. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // *Methods in Molecular Biology* / Ed. Walker J.M. N.Y.: Haman Press, 1984. V. 2. P. 31–34.
6. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. et al. PLINK: A toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis // *Am. J. Hum. Genet.* 2007. V. 81. № 3. P. 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
7. Benjamini Y., Drai D., Elmer G. et al. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research // *Behav. Brain Res.* 2001. V. 125. № 1–2. P. 279–284. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00297-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00297-2)
8. Price A.L., Patterson N.J., Plenge R.M. et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. № 8. P. 904–909. <https://doi.org/10.1038/ng1847>
9. Le Tanno P., Breton J., Bidart M. et al. *PBX1* haploinsufficiency leads to syndromic congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in humans // *J.*

- Med. Genet. 2017. V. 54. № 7. P. 502–510.
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104435>
10. Mann R.S., Affolter M. Hox proteins meet more partners // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998. V. 8. № 4. P. 423–429.
[https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(98\)80113](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80113)
 11. Moens C.B., Selleri L. Hox cofactors in vertebrate development // *Dev. Biol.* 2006. V. 291. № 2. P. 193–206.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.10.032>
 12. Luo M., Gu X., Zhou T., Chen C. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic analyses of a paternal inherited deletion of 1q23.3 encompassing *PBX1* gene // *Mol. Cytogenet.* 2022. V. 15. № 1. P. 53.
<https://doi.org/10.1186/s13039-022-00632-y>
 13. Ferretti E., Cambronero F., Tümpel S. et al. Hoxb1 enhancer and control of rhombomere 4 expression: Complex interplay between PREP1–PBX1–HOXB1 binding sites // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. № 19. P. 8541–8552.
<https://doi.org/10.1128/MCB.25.19.8541-8552.2005>
 14. Takács-Vellai K., Vellai T., Chen E.B. et al. Transcriptional control of Notch signaling by a HOX and a PBX/EXD protein during vulval development in *C. elegans* // *Dev. Biol.* 2007. V. 302. № 2. P. 661–669.
<https://doi.org/10.1242/dev.050567>
 15. Selleri L., Depew M.J., Jacobs Y. et al. Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation // *Development.* 2001. V. 128. № 18. P. 3543–3557.
<https://doi.org/10.1242/dev.128.18.3543>
 16. Fernandez-Diaz L.C., Laurent A., Girasoli S. et al. The absence of Prep1 causes p53-dependent apoptosis of mouse pluripotent epiblast cells // *Development.* 2010. V. 137. № 20. P. 3393–3403.
<https://doi.org/10.1242/dev.050567>
 17. Monteiro M.C., Sanyal M., Cleary M.L. et al. PBX1: A novel stage-specific regulator of adipocyte development // *Stem. Cells.* 2011. V. 29. № 11. P. 1837–1848.
<https://doi.org/10.1002/stem.737>
 18. Gurling H.M., Kalsi G., Brynjolfsson J. et al. Genome-wide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21–22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3–24 and 20q12.1–11.23 // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 68. № 3. P. 661–673.
<https://doi.org/10.1002/stem.737>
 19. Chowdari K.V., Mirmics K., Semwal P. et al. Association and linkage analyses of *RGS4* polymorphisms in schizophrenia // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 12. P. 1373–1380.
<https://doi.org/10.1093/hmg/11.12.1373>
 20. Chowdari K.V., Bamne M., Wood J. et al. Linkage disequilibrium patterns and functional analysis of *RGS4* polymorphisms in relation to schizophrenia // *Schizophr. Bull.* 2008. V. 34. № 1. P. 118–126.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbm042>
 21. Puri V., McQuillin A., Datta S. et al. Confirmation of the genetic association between the U2AF homology motif (UHM) kinase 1 (*UHMK1*) gene and schizophrenia on chromosome 1q23.3 // *Eur. J. Hum. Genet.* 2008. V. 16. № 10. P. 1275–1282.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.76>
 22. Need A.C., Ge D., Weale M.E. et al. A genome wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 2. P. e1000373.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000373>
 23. Holliday E.G., McLean D.E., Nyholt D.R., Mowry B.J. Susceptibility locus on chromosome 1q23–25 for a schizophrenia subtype resembling deficit schizophrenia identified by latent class analysis // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2009. V. 66. № 10. P. 1058–1067.
<https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.136>
 24. Liou Y.J., Wang H.H., Lee M.T. et al. Genome-wide association study of treatment refractory schizophrenia in Han Chinese // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. P. e33598.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033598>
 25. Shrieberman Y., Yitzhaky A., Kosloff M., Hertzberg L. Gene expression meta-analysis in patients with schizophrenia reveals up-regulation of *RGS2* and *RGS16* in Brodmann Area 10 // *Eur. J. Neurosci.* 2023. V. 57. № 2. P. 360–372.
<https://doi.org/10.1111/ejn.15876>
 26. Cheah S.Y., Lawford B.R., Young R.M. et al. Association of *NOS1AP* variants and depression phenotypes in schizophrenia // *J. Affect. Disord.* 2015. V. 188. P. 263–269.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.08.069>
 27. Melo-Felippe F.B., Fontenelle L.F., Kohlrusch F.B. Gene variations in *PBX1*, *LMX1A* and *SLITRK1* are associated with obsessive-compulsive disorder and its clinical features // *J. Clin. Neurosci.* 2019. V. 61. P. 180–185.
<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.042>
 28. Smith E.N., Bloss C.S., Badner J.A. et al. Genome-wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals // *Mol. Psychiatry.* 2009. V. 14. № 8. P. 755–763.
<https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.76>
 29. Namkung J., Kim Y., Park T. Whole-genome association studies of alcoholism with loci linked to schizophrenia susceptibility // *BMC Genet.* 2005. V. 6. Suppl. 1. P. S9.
 30. Sun M., Lou J., Li Q. et al. Prenatal findings and molecular cytogenetic analyses of a *de novo* interstitial deletion of 1q23.3 encompassing *PBX1* gene // *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 2019. V. 58. № 2. P. 292–295.
<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2019.01.022>
 31. Luo M., Gu X., Zhou T., Chen C. Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic analyses of a paternal inherited deletion of 1q23.3 encompassing *PBX1* gene // *Mol. Cytogenet.* 2022. V. 15. № 1. P. 53.
<https://doi.org/10.1186/s13039-022-00632-y>
 32. Hoshina T., Seto T., Shimono T. et al. Narrowing down the region responsible for 1q23.3q24.1 microdeletion by identifying the smallest deletion // *Hum. Genome Var.* 2019. V. 6. P. 47.
<https://doi.org/10.1038/s41439-019-0079-1>

Genome-Wide Association Study of the Risk of Schizophrenia in the Republic of Bashkortostan

A. E. Gareeva^{a, b, *}

^a*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b*Bashkir State Medical University, Ufa, 450008 Russia*

**e-mail: annagareeva@yandex.ru*

Genome-wide association studies (GWAS) have proven to be a powerful approach to discovering genes for susceptibility to schizophrenia; their findings are important not only for our understanding of the genetic architecture of a given disease, but also for potential applications in the field of personalized medicine. The aim of this study was to study the genetic risk factors for the development of schizophrenia during a genome-wide association analysis in the Republic of Bashkortostan.

Keywords: genetics, schizophrenia, genome-wide association analysis, ethnicity, Republic of Bashkortostan, international consortium on psychiatric genetics.

УДК 575.17

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНГУШЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В СЕВЕРНОЙ ОСЕТИИ-АЛАНИИ

© 2023 г. Г. И. Ельчинова¹, *, Н. В. Балинова¹, В. В. Кадышев¹, И. С. Тебиева²,
Ю. А. Ревазова³, Р. А. Зинченко^{1,4}

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

²Северо-Осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ, 362019 Россия

³Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана, Москва, 141000 Россия

⁴Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья им. Н.А. Семашко,
Москва, 105064 Россия

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

Поступила в редакцию 23.01.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 02.03.2023 г.

В соответствии с Протоколом генетико-эпидемиологического обследования населения проведено изучение популяционно-генетических характеристик ингушей Северной Осетии-Алании. Обнаружен расширенный характер воспроизводства (3.62). Индекс Кроу рассчитан двумя способами – классическим и по методу, предложенному Н.Х. Спицыной, при котором учитываются не только дорепродуктивные, но и пренатальные потери. Возрастные параметры репродукции находятся в тех же рамках, как и для некоторых других обследованных популяций. Проведен графический сравнительный анализ компонентов индекса Кроу, полученных разными методами. Выявлена низкая эндогамность (0.13), положительная, но невысокая этническая брачная ассортативность (1.96). На схеме фамильного ландшафта прослеживаются два кластера, соответствующие ингушскому и осетинскому населению.

Ключевые слова: ингуши, эндогамия, индекс Кроу.

DOI: 10.31857/S0016675823070044, EDN: QJPMYG

Основными задачами генетической эпидемиологии является оценка распространенности наследственной патологии в популяции и выявление факторов, определяющих груз и спектр имеющихся наследственных болезней. Неоднократно показано, что особенности популяционной структуры существенным образом влияют на отягощенность популяции наследственными заболеваниями. Таким образом, изучение особенностей популяционной структуры обследуемого региона входит в обязательном порядке в Протокол генетико-эпидемиологического обследования населения любого региона [1, 2]. В настоящее время сотрудники лаборатории генетической эпидемиологии с коллегами завершают работы в Республике Северная Осетия-Алания.

Ингуши – автохтонный нахский народ Северного Кавказа, чья древнейшая история уходит корнями во второе тысячелетие до нашей эры. В России наибольшее число ингушей проживает в Республике Ингушетия – 385 537 человек. Значительная часть – 28 336 человек, проживают в Пригородном р-не Северной Осетии. От 1000 до 5000

ингушей живут в Республиках Чечня и Кабардино-Балкария, также в Москве, Ставропольском крае, Тюменской и Ростовской областях. Ингуши относятся к кавкасионскому антропологическому типу европеоидной расы [3]. Традиционная форма семьи – патриархальная, чаще малая или трехпоколенная. Традиционными религиями ингушей были анимизм, тотемизм, магические верования. В средние века в регионе значительно распространилось христианство, о чем свидетельствуют сохранившиеся каменные церкви, кресты. Ислам начинает проникать в регион в XIII–XV вв., однако на равнинах укореняется лишь в XVII–XVIII столетиях, в горах еще позже – в конце XIX в. Ингуши исповедуют ислам суннитского толка [4]. Ингушский язык близок к чеченскому языку и относится к нахской группе иберийско-кавказских языков [5]. Ингушские фамилии имеют древнее происхождение и наследуются патроклинно [6], что предполагает использование ингушских фамилий в качестве маркера в популяционно-генетических исследованиях.

Таблица 1. Основные репродуктивные характеристики ингушей, проживающих в Северной Осетии-Алании

Среднее число	Сельское население
Беременностей	4.21 ± 0.18
Живорождений	3.63 ± 0.14
Мертворождений	0.029 ± 0.020
Выкидышей	0.35 ± 0.07
Медицинских абортов	0.19 ± 0.07
Выживших детей	3.62 ± 0.15
Умерших детей	0.015 ± 0.015

Таблица 2. Возрастные параметры репродукции ингушей, проживающих в Северной Осетии-Алании

Параметр	Сельское население
Менархе	13.20 ± 0.15
Начало половой жизни	22.80 ± 0.45
Менопауза	48.88 ± 0.51
Рождение первого ребенка	24.17 ± 0.49
Рождение последнего ребенка	29.64 ± 0.56
Средний возраст рожениц	26.58 ± 0.29

Таблица 3. Индекс Кроу с модификацией Н.Х. Спицыной (с учетом пренатальных потерь)

Этнос	I_m	I_f	I_{tot}
Ингуши	0.162	0.110	0.291
Осетины	0.592	0.206	0.920
Кумыки	0.217	0.159	0.411
Русские РСО	1.084	0.244	1.594
Карачаевцы	0.395	0.316	0.836
Абазины	0.580	0.163	0.838
Русские КЧР	0.893	0.170	1.215
Ногайцы	0.799	0.202	1.163
Черкесы	0.469	0.163	0.710

Пригородный район – муниципальное образование на юго-востоке Северной Осетии (РСО), самый восточный район республики и самый населенный. Он полукольцом окружает территорию городского округа Владикавказ, образуя две части, соединенные узким перешейком. В западной части преобладает осетинское население, в восточной – ингушское. Райцентр – село Октябрьское, расположено в ингушской части и является пригородом Владикавказа [7].

Витальные статистики и возрастные параметры репродукции рассчитаны по 68 анкетам, полученным в ходе опроса сельских ингушек пострепродуктивного возраста. Опрос проводился по

нашей просьбе сотрудниками местного здравоохранения. 66 анкет получены из Пригородного р-на и две – из села Эльхотово. Средний возраст опрошенных женщин составил 53.83 ± 0.79 лет. Все расчеты выполнены стандартными методами. Общая плодовитость (4.21) свидетельствует о планировании семьи, а эффективная плодовитость (3.62) – о расширенном характере репродукции в ингушской популяции (табл. 1). Почти 87% семей являются многодетными, модальный класс – семьи с четырьмя детьми (42.6%). Лишь 13.2% женщин прерывали беременность искусственно.

Достаточно поздний возраст вступления в брак (22.8 лет) обуславливает и позднее рождение первого ребенка (24.17) (табл. 2). Возраст рожениц варьировал от 18 до 40 лет. При этом в возрасте 35 лет и старше было всего 5.5% рожениц. Возраст менархе и менопаузы находится в физиологических границах. Индекс Кроу [8] составил: $I_m = 0.004$, $I_f = 0.110$, $I_{tot} = 0.115$. На рис. 1 показано схематичное расположение некоторых северокавказских популяций в ортогональных осях $I_m I_f$. Не выявляются никакие характерные кластеры.

С учетом модификации метода, предложенной Н.Х. Спицыной [9], при которой учитываются не только дорепродуктивные, но и пренатальные потери, включая медаборты, получаем следующие значения: $I_m = 0.162$, $I_f = 0.110$, $I_{tot} = 0.291$. Индексы подчеркнуты, чтобы не путать их с классическим индексом Кроу. Результаты представлены в табл. 3. Расположение популяций в ортогональных осях $I_m I_f$ меняется (рис. 2). Прослеживается в первую очередь связь с социокультурными установками: традициями, религиозными убеждениями и т.д.

Положение осетин-христиан дальше от русских по сравнению с ногайцами. Возможно репродуктивное поведение ногайцев связано с происхождением, формированием и этническим окружением данной группы. Антропологи отмечают значительную метисированность ногайцев [10]. По нашим данным [11] среди метисных браков ногайцев в 26.5% вторым брачным партнером является русский, а в 30% – черкес или абазин, что в определенной степени влияет на такое расположение. Православие пришло в Осетию более 1000 лет назад, в настоящее время православными себя считают 52% осетин, а 29% придерживаются традиционной религии предков [12]. Возможно, что существенное влияние на такое расположение оказывают именно древние традиции, которые неизбежным образом влияют на культуру этносов на протяжении столетий. И религия, и даже иногда ее замена, не стирает исторической памяти народа. Заметим, что на обеих схемах ингуши расположены в нижней части, что обусловлено

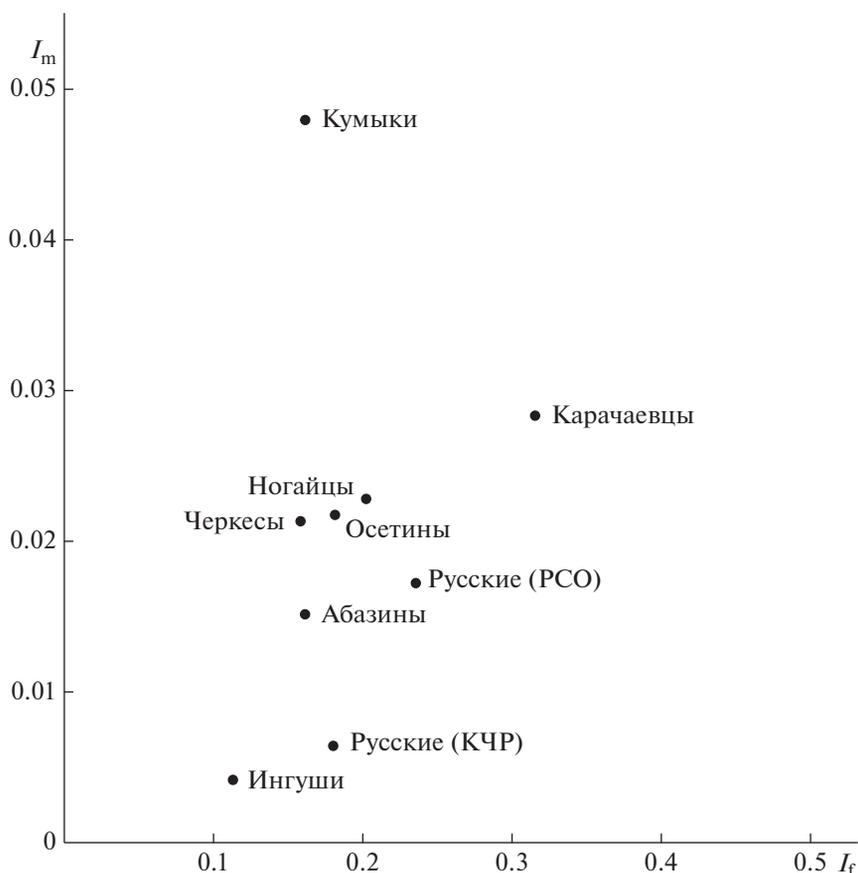


Рис. 1. Расположение некоторых северокавказских сельских популяций в осях $I_m I_f$. PCO – Северная Осетия-Алания, КЧР – Карачеево-Черкесия.

минимальным значением как дорепродуктивных, так и пренатальных потерь.

По понятным причинам существенно изменились значения индекса смертности и тотального индекса отбора, тем не менее, при отсутствии корреляции между индексами смертности, вычисленными разными способами ($r = -0.30 \pm 0.36$), линейная корреляция между тотальным индексом Кроу, вычисленным двумя методами, положительна и значима ($r = 0.41 \pm 0.34$). Ранговая корреляция составила 0.50. И это можно считать свидетельством того, что основной численный вклад в значение индекса Кроу дает эффективная плодовитость.

Национальный состав ингушских браков представлен в табл. 4. Суммарно по PCO интенсивность метисации ингушей составляет 16.5%, при этом в Пригородном р-не – 8.03, а в Моздокском – 48.6%. Основными брачными партнерами в межэтнических браках являются русские, осетины и чеченцы. Мужчины и женщины Пригородного р-на вступают в межэтнические браки примерно одинаково (46.7 и 53.3% соответственно).

Этническая брачная ассортативность, рассчитанная по методу Н.П. Бочкова с соавт. [13], составила 1.96, т.е. положительна, но не высокая.

На рис. 3 представлена схема фамильного ландшафта восточной части Пригородного р-на. Обнаруживаются два кластера, верхний из которых представлен в основном ингушским населением (63.1% – Чермен, 97.0 – Майское, 76.7 – Куртат), а нижний (с центром в Октябрьском) – осетинским (87.3% – Октябрьское, 65.0 – Донгарон, 88.9 – Ир, 87.9 – Камбилеевское, 96.1 – Сунжа, 70.8 – Тарское, 96.8 – Комгарон) [14]. В целом же эквидистантные линии концентричны, не пересекаются. Кластеры ориентированы вдоль дорог. Завершение кластеризации на уровне 0.80 указывает на то, что и та, и другая части являются составляющими более крупной подразделенной популяции. Об этом же свидетельствует невысокая эндогамность как ингушей, так и осетин Пригородного р-на. Индекс эндогамии по 326 ингушским внутриэтническим бракам в Пригородном р-не составил 0.13, при этом 45% браков составляют миграции женщин в данный район. Эндогамия осетин Пригородного р-на – 0.18, а в райцентре Октябрьское – лишь 0.04 [15].

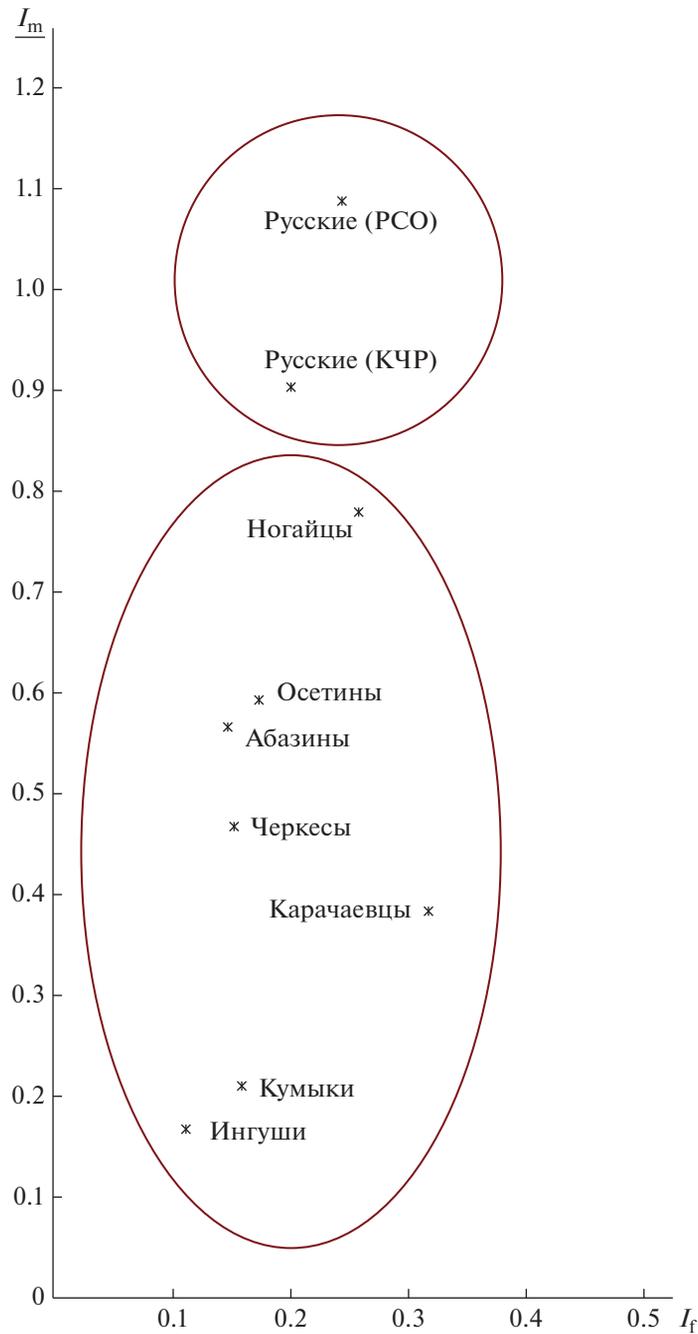


Рис. 2. Расположение ряда северокавказских популяций в осях I_m I_f с учетом пренатальных потерь. PCO – Северная Осетия-Алания, КЧР – Карачеево-Черкесия.

Параметры изоляции расстоянием Малекосоставили: $N_e = 7751$, $\sigma = 65.8$, $a = 0.00033$, $b = 0.01165$. Эти параметры находятся в границах таковых для осетинского населения [16]. Таким образом, ингуши, проживающие в Северной Осетии, являются частью крупной популяции ингушей, характеризуются низкой эндогамностью, низкой положительной брачной ассортативностью, расширенным

характером воспроизводства, низкими дорепродуктивными и пренатальными потерями.

Авторы благодарны сотрудникам местного здравоохранения, проводившим анкетирование женщин пострепродуктивного возраста.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ.

Таблица 4. Национальный состав браков ингушей в Северной Осетии - Алании

Тип брака	Влади- кавказ	Право- бережный р-н	Ардонский р-н	Дигорский р-н	Ирафский р-н	Пригородный р-н	Алагирский р-н	Кировский р-н	Моздокский р-н	Суммарно
Греко-ингушский									1	1
Еврейско-ингушский									1	1
Ингушко-ингушский	12					355		1	37	405
Ингушко-кабардинский									4	4
Ингушко-кумыкский									2	2
Ингушко-мордовский									1	1
Ингушко-немецкий									1	1
Ингушко-осетинский	5	5			1	15		2	7	35
Ингушко-русский						13		1	10	24
Ингушко-тагский									1	1
Ингушко-украинский						2			2	4
Ингушко-чеченский						1			5	6
Суммарно	17	5	0	0	1	386	0	4	72	485

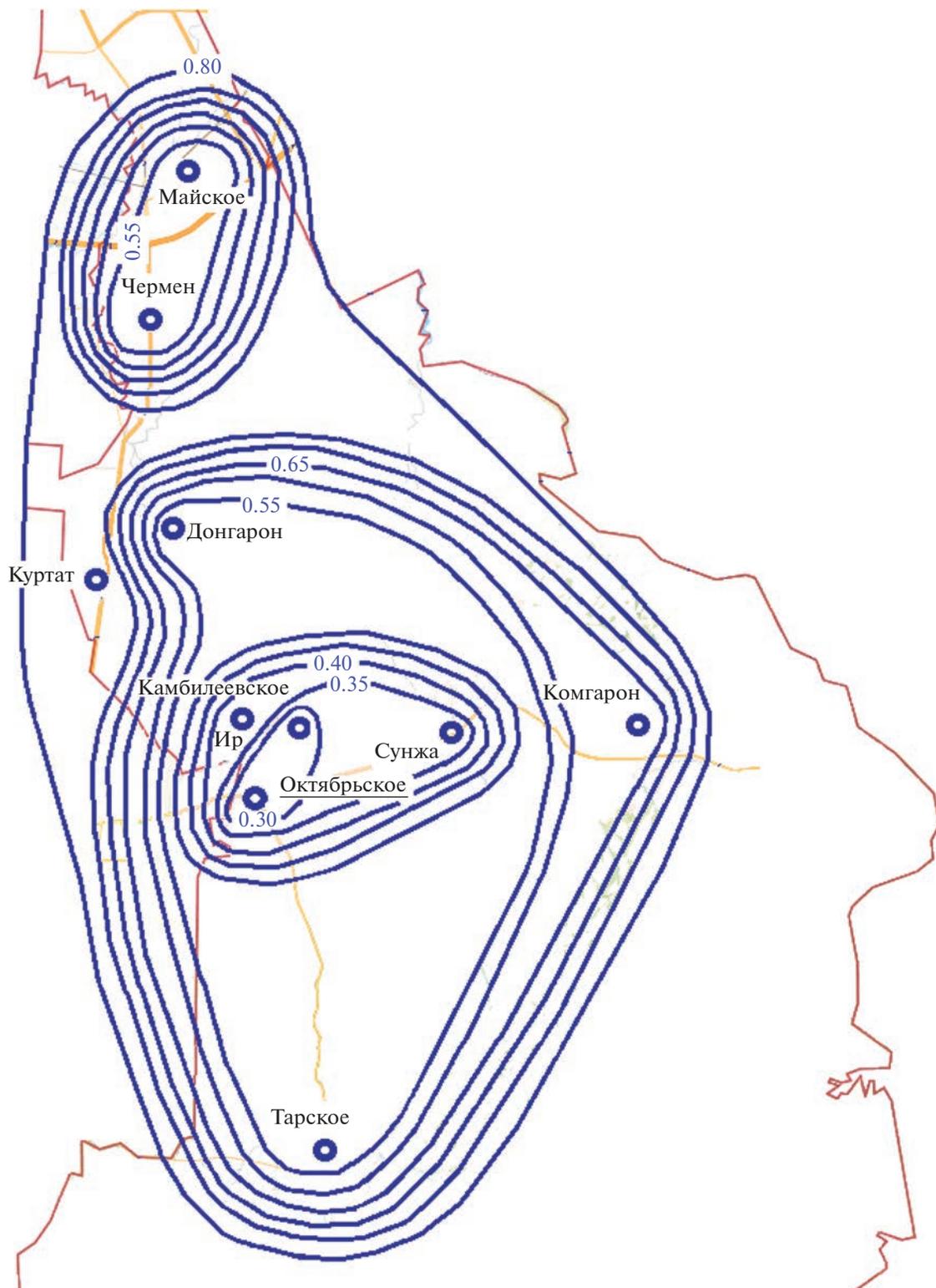


Рис. 3. Схема фамильного ландшафта восточной части Пригородного р-на.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-

го 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.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zinchenko R.A., Макаов А.К., Marakhonov A.V. et al. Epidemiology of hereditary diseases in Karachay-Cherkess Republic // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(1). P. 325–331. <https://doi.org/10.3390/ijms21010325>
2. Зинченко Р.А., Куцев С.И., Александрова О.Ю., Гинтер Е.К. Основные методологические подходы к выявлению и диагностике моногенных наследственных заболеваний и проблемы в организации медицинской помощи и единых профилактических программ // *Пробл. соц. гигиены, здравоохран. и истории медицины.* 2019. Т. 27. № 5. С. 865–877. <https://doi.org/10.32687/0869-866X-2019-27-5-865-877>
3. <https://ru.wikipedia.org/wiki/Ингуши> (1 ноября 2022 г.)
4. Семенова А. Ингуши: семья и честь превыше всего <https://travelask.ru/articles/ingushi-semya-i-chest-prevyshhe-vsego> (1 ноября 2022 г.)
5. Дахкильгов Ш. Происхождение ингушских фамилий <https://magas.mybb.ru/viewtopic.php?id=599> (13 декабря 2022 г.)
6. Баринова В. Ингушские фамилии. <https://fb.ru/article/428883/ingushskie-familii-osobennosti-istoriya-i-interesnyie-faktyi> (13 декабря 2022 г.)
7. <https://tochka-na-karte.ru/Goroda-i-Gosudarstva/14940-Prigorodnyj-rajon.html> (1 ноября 2022 г.)
8. Crow J.F. Some possibilities for measuring selection intensities in man // *Hum. Biol.* 1958. V. 30. P. 1–13.
9. Спицына Н.Х. Демографический переход в России. М.: Наука, 2006. 212 с.
10. Материалы по изучению историко-культурного наследия Северного Кавказа. Вып. IV. Антропология ногайцев. М.: Наука, 2003. 244 с.
11. Ельчинова Г.И., Ревазова Ю.А., Макаов А.Х.-М., Зинченко Р.А. Популяционно-генетическая характеристика ногайцев Карачаево-Черкесии (по данным о распределении фамилий и брачных миграциях) // *Вестник Моск. ун-та. Серия XXIII. Антропология.* 2016. № 1. С. 109–115.
12. <https://proreligiu.club/religii-mira/narody/osetiny-religiya.html> (16 января 2023 г.)
13. Бочков Н.П., Николаева И.В., Тихоной М.В. и др. Брачная ассортативность в населении современного города // *Генетика.* 1984. Т. 20. № 7. С. 1224–1229.
14. https://ru.wikipedia.org/wiki/Пригородный_район (10 января 2023 г.)
15. Ельчинова Г.И., Кадышев В.В., Гетоева З.К. и др. Эндогамность населения Северной Осетии (конец XX века) // *Генетика.* 2020. Т. 56. № 7. С. 855–860. <https://doi.org/10.31857/S0016675820070048>
16. Ельчинова Г.И., Кадышев В.В., Зинченко Р.А. Изоляция расстоянием у северных осетин // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 3. С. 358–360. <https://doi.org/10.31857/S0016675821030073>

Population-Genetic Characteristics Ingush in the North Ossetia-Alania

G. I. Elchinova^{a, *}, N. V. Balinova^a, V. V. Kadyshev^a, I. S. Tebieva^b,
Yu. A. Revazov^c, and R. A. Zinchenko^{a, d}

^aResearch Center for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

^bNorth-Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, 362019 Russia

^cErisman Federal Scientific Center of Hygienere, Moscow, 141000 Russia

^dSemashko National Research Institute, Moscow, 105064 Russia

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

In accordance with the Protocol of the genetic and epidemiological survey of the population, the study of the population-genetic characteristics of the Ingush of North Ossetia-Alania was carried out. The extended nature of reproduction was found (3.62). The Crow index is calculated in two ways – the classical one and according to the method proposed by N.H. Spitsina, which takes into account not only pre-productive, but also prenatal losses. The age parameters of reproduction are within the limits of those for other surveyed populations. A graphical comparative analysis of the components of the Crow's index obtained by different methods is carried out. Low endogamy was revealed (0.13), positive but low ethnic marital assortativeness (1.96). The scheme of the surname landscape shows two clusters corresponding to the Ingush and Ossetian populations.

Keywords: Ingush, endogamy, Crow' index.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ТЕТРАПЛОИДНОЙ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛИНИЙ ФИОЛЕТОВОЗЕРНОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ АНТОЦИАНОВ

© 2023 г. А. В. Фисенко¹, *, А. Ю. Драгович¹, **

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

*e-mail: fisenko800@mail.ru

**e-mail: dragova@mail.ru

Поступила в редакцию 02.03.2023 г.

После доработки 04.04.2023 г.

Принята к публикации 06.04.2023 г.

В статье рассмотрены результаты работы по созданию и изучению генетического разнообразия фиолетовозерной мягкой пшеницы. Среди пшениц только вид *Triticum aestivum* Jakubz. $2n = 28$ несет гены фиолетовой окраской зерновки, сопровождающиеся повышенным содержанием антоцианов. В результате двухэтапной межвидовой гибридизации фиолетовозерной формы *T. aestivum* k-19068 с образцами *T. aestivum* k-14333 (Иран) и сортом Лиза (НИИСХ ЦРНЗ, РФ) выделены линии мягкой пшеницы с фиолетовой окраской зерна и с повышенным содержанием антоцианов. Показано невысокое генетическое разнообразие полученных линий ($H = 0.410$) и преобладание аллелей глиадина, полученных от высокопродуктивного родителя – сорта Лиза. Не выявлено аллелей глиадина, которые можно было бы идентифицировать, как принадлежащие *T. aestivum*. Сравнение группы фиолетово- и светлозерных линий показывает, что они достоверно не различаются между собой по урожайности и элементам ее структуры, что указывает на отсутствие отрицательной корреляции между высоким содержанием антоцианов в зерне и зерновой продуктивностью.

Ключевые слова: межвидовая гибридизация, пшеница, гены антоциановой окраски, глиадин-кодирующие локусы.

DOI: 10.31857/S0016675823080064, EDN: XTERRF

В селекции пшеницы появилось новое направление, ориентированное на повышение в зерне биологически активных веществ, положительно влияющих на здоровье человека. К ним относятся антоцианы – фенольные соединения класса флавоноидов. Показано, что антоцианы обладают антиоксидантными [1, 2], противовоспалительными, бактериостатическими, противораковыми и антивозрастными функциями [3–5]. Антоцианы синтезируются в различных частях зерновки, а к моменту созревания концентрируются в перикарпе (околоплоднике), который приобретает фиолетовую окраску различных оттенков: от светло-фиолетового до почти черного. В дополнение к антоциану фиолетовое зерно содержит также повышенную по сравнению с обычной пшеницей концентрацию железа, цинка, марганца, меди, селена, магния, калия и фосфора [6, 7]. Биообогащение пшеницы микронутриентами является приоритетной областью исследований генетиков и селекционеров [8].

Фрукты и овощи темной окраски также являются богатым источником антоцианов, однако для северных регионов мира их потребление сезонно ограничено, и создание пшеницы, обогащенной антоцианами, – это возможность получать функциональное питание круглый год. Первоначальным источником признака фиолетовозёрности и повышенного содержания антоцианов является тетраплоидная эфиопская пшеница *T. aestivum* Jakubz. Признак фиолетового зерна впервые был успешно интрогрессирован из эфиопской пшеницы в мягкую в 80-х гг. XX в. [9]. Позднее в мягкой пшенице была исследована регуляция биосинтеза антоцианов и контролирующие ее два комплементарных гена. Эти гены расположены на хромосомах 2A и 7D, они кодируют транскрипционные факторы – *TaPpm1* (MYB-подобный) и *TaPpb1* (bHLH 1/MYC-подобный) [10]. Эти два транскрипционных фактора, взаимодействуя друг с другом, активируют все гены биосинтеза антоцианов [11, 12].

Показано, что сорта и линии цветных пшениц, полученные в южных агроклиматических условиях, плохо адаптируются к северным широтам. Это создает необходимость скрещивания цветных линий с сортами, хорошо приспособленными к местным условиям [13]. Экспериментально доказано, что лучшие линии фиолетовозерной пшеницы, полученные на основе местных коммерческих сортов, превосходят по содержанию антоцианов и урожайности лучшие донорские линии [14]. Основным недостатком фиолетовозерных сортов — низкая урожайность, вызываемая, как предполагается, сопротивлением генетического сцепления, связывающего урожайность с признаком фиолетовой окраски перикарпа, который привносится в мягкую пшеницу низкоурожайным эндемичным видом пшеницы в виде замещенных, добавленных линий или транслокаций [13, 15]. Требуется тщательная селекция для разрушения этих связей и создания линии как с высоким содержанием антоцианов, так и с удовлетворительным уровнем урожайности [14].

Цели работы. 1. Получить фиолетовозерные линии мягкой пшеницы ($2n = 6x = 42$) при гибридизации ее с тетраплоидным видом *T. aestivum* ($2n = 4x = 28$). 2. Оценить разнообразие полученных линий по генам запасных белков и показателям урожайности.

Фиолетовозерные формы мягкой пшеницы созданы в два этапа. На первом этапе проведена гибридизация образца эфиопской фиолетовозерной пшеницы *T. aestivum* k-19068 со старым местным сортом *T. aestivum* из Ирана k-14333, который, согласно нашим предварительным исследованиям, легко скрещивался с разными видами пшеницы. На втором этапе из гибридных растений F2 выделено растение, морфологически идентичное мягкой пшенице, с числом хромосом $2n = 42$, с высокой озёрненностью колоса, но с темно-фиолетовой окраской зерна. Потомство этого растения было опылено пылью высококачественного и высокопродуктивного сорта мягкой пшеницы Лиза, созданного для Нечерноземной зоны РФ.

В полученной гибридной комбинации (k-14333 (Иран, *T. aestivum*) × k-19068 (Эфиопия, *T. aestivum*) × Лиза (Нечерноземье, *T. aestivum*) в поколениях F2 и F3 проводился отбор растений с фиолетовым зерном, крупным колосом и хорошей его озёрненностью, а также устойчивостью растений к полеганию. В F4 отобрано 40 фиолетовозёрных растений с продуктивным колосом, потомство которых было высеяно для сортоиспытания в селекционном питомнике. Поскольку в ряде семей F4 наблюдалось расщепление по морфологическим признакам, в F5 был проведен повторный отбор лучших колосьев из четырех лучших семей: отбирались самые крупные и хорошо озёрненные колосья как с фиолетовым, так и с белым зерном.

Полученные из этих колосьев линии F6 (каждая линия — потомство одного колоса) оценены нами в 2022 г. по показателям урожайности (табл. 1). Посев и полевые опыты проводились по стандартным методикам¹. Из-за ограниченного числа зерен в линиях оценка проводилась в однократной повторности. Полученные данные по линиям сравнивались с показателями у сортов-стандартов КВС Аквилон и Лиза (лучший родительский сорт), оценка достоверности различий между группами линий проводилась по критерию Стьюдента. Генетическое разнообразие линий F6 оценивалось по генам запасных белков — глиадинов (табл. 1), с использованием стандартной методики [16, 17], показатель гетерогенности оценивался по Нею [18].

Показатели зерновой продуктивности и элементов структуры урожая светлозерных и фиолетовозерных линий, а также их аллельное разнообразие по глиадин-кодирующим локусам представлены в табл. 1. Сразу отметим, что ограниченное количество исследованных растений и только однократное измерение показателей структуры урожая не позволяли нам достоверно сравнить между собой отдельные линии. Для сравнительного анализа все полученные линии были разбиты на две группы: фиолетово- и светлозерные (табл. 1). Не выявлено значимых различий при сравнении между собой средних значений этих групп: группа линий с фиолетовым зерном не отличается по продуктивности от светлозерной группы. Кроме того, нет достоверного различия между группами и по элементам структуры урожая.

Такой результат позволяет предположить, что гены, контролирующие фиолетовую окраску зерна, не входят в жестком взаимодействии с генами, влияющими на урожайность и элементы ее структуры. Поэтому вполне возможно получение линий, сочетающих фиолетовую окраску зерна и высокую продуктивность. В то же время сравнение по элементам структуры урожая обеих групп линий как со стандартным сортом КВС Аквилон, так и с лучшим родительским сортом Лиза, показывает, что среднее значение зерновой урожайности линий (44–49 г/рядок) значительно уступает стандартам (63–65 г/рядок), и достоверность этого различия достигает уровня $P \leq 0.01$ (табл. 1). Только отдельные линии (№ 1–4, 1–9, 7–4) характеризуются повышенной урожайностью — 56–58 г/рядок, именно они рассматриваются как

¹ Посев проводился рядками, в каждом высевалось по 35 зерен одной линии. Расстояние между рядками — 15 см, сроки посева и агротехника — стандартные для региона. Гибридизация, отбор и полевой анализ гибридов F1–F4 проводились на полях ГБС им. Н.В. Цицина (Московская обл.) на дерново-подзолистых почвах среднего механического состава, а гибридов F5 и F6 — в селекционном питомнике на полях ООО «Агроресурс» (Воронежская обл.), на черноземной тяжелосуглинистой почве.

Таблица 1. Показатели урожайности линий F6 и их аллельное разнообразие по глиадин-кодирующим локусам

Сорта и линии	Высота, см	Элементы структуры урожая					Аллели шести глиадин-кодирующих локусов						
		число колосков на рядок	продуктивная кустистость	масса зерна с колоса, г	число зерен в колосе	масса 1000 зерен, г	продуктивность, г/рядок	Gli-A1	Gli-B1	Gli-D1	Gli-A2	Gli-B2	Gli-D2
КВС Аквилон, st	73	44*	1.5*	1.48	38.9	38.0	65.1*	a	e	b	o	o	p
Лиза, родительский сорт	68	53*	1.8*	1.20	33.8	35.5	63.6*	a	f	a	e	e	f
k-14333, иранский сорт, родитель	110–120	–	–	–	–	–	–	f+m+i	n+b+e	a+g	new+u+z**	r+o+new-1	c+f+i
Группа линий со светлым зерном													
Линии со светлым зерном, №													
12–2	90	33	1.1	1.33	34.7	38.3	43.8	a	f	a+i	e	new-2	f
1–3	88	32	1.1	1.22	36.7	33.3	39.1	a	k	a	f	new-2	f
1–4	103	37	1.2	1.59	39.3	40.4	58.8	a	k	a	e	e	f
7–3	96	33	1.1	1.15	40.3	28.4	37.8	a	f	a+i	e	new-2	f
1–7	101	36	1.2	1.22	34.5	35.2	43.9	a	k	a	e	e	f
Среднее по линиям	95.6	34.2	1.1	1.30	37.1	35.1	44.7	–	–	–	–	–	–
Группа линий с фиолетовым зерном													
Линии с фиолетовым зерном, №													
7	108	34	1.1	1.22	32.0	38	41.4	a	f	i	f	new-2	f
12–1	108	42	1.4	1.29	39.7	32.4	54.0	a	f	a	e	e	f
10–1	87	32	1.1	1.48	38.1	38.9	47.4	a	f	i	f	e	f+c
10	89	35	1.2	1.26	31.6	39.9	44.1	i+f	f+n	i	new(k-14333)	e+r	c
1–9	84	38	1.3	1.48	39.0	37.9	56.1	a	f	i	f	new-2	f
7–2	83	37	1.2	1.14	31.1	36.7	42.2	a	k	i	f	new-2	f
7–4	113	43	1.5	1.33	42.1	31.7	58.7	a	f	i	f	new-2	f
1–8	101	40	1.3	1.27	33.7	37.6	50.8	a	k	a	e	e	f
Среднее по линиям	96.6	37.8	1.3	1.31	35.9	36.6	49.3	–	–	–	–	–	–

Примечание. * отмечены показатели сортов Аквилон и Лиза, которые отличаются от средних для обеих групп линий на уровне значимости $P < 0.01$; ** – z – редкий аллель, обнаруженный у староместных сортов Средней Азии, st – стандарт.

наиболее перспективные. Необходимо отметить, что полученные нами линии в среднем не уступают стандартным сортам по озерненности колоса, массе 1000 зерен и массе зерна с колоса, однако они существенно уступают по таким параметрам, как число колосьев на рядок и продуктивная кустиность — именно эти показатели, очевидно, и обуславливают пониженную урожайность полученных селекционных линий.

Можно предположить, что низкая кустиность у отобранных линий связана с типом отбора в селекционных поколениях. Так, для поколений F2–F4 селекция была направлена на отбор только крупноколосых форм, кустиность же начала оцениваться только после поколения F4. Необходимо учитывать и крайне низкую продуктивность родительских форм *T. aethiopicum* из Эфиопии и *T. aestivum* из Ирана (k-14333), участие которых, по-видимому, привело к появлению в гибридной популяции значительной доли генов, отрицательно влияющих на показатели продуктивности. Урожайность *T. aethiopicum* на родине, в Эфиопии, составляет в среднем 2.7 т/га [19]. Однако испытание этого вида в Нечерноземной зоне (Подмосковье) показало, что погодные условия нашей страны не стимулируют реализацию потенциала зерновой продуктивности [20]. В наших опытах как *T. aethiopicum*, так и k-14333 сильно полегали, характеризовались доуборочным прорастанием зерна на корню, что сделало невозможным изучение структуры урожая этих образцов, и они были использованы только как доноры отдельных ценных признаков.

Генетическое разнообразие полученных фиолетовозёрных линий в сравнении с родительскими сортами проанализировано с помощью генов запасных белков — глиадинов (табл. 1). Все аллели шести глиадинкодирующих локусов, присутствующие в родительском сорте Лиза (генетическая формула глиадинов: *a.f.a.e.e.f*), обнаружены нами и в изученных линиях, причем такие аллели как *Gli-D2f*, *Gli-B1f* представлены в большинстве линий (табл. 1). В то же время с другими родительскими сортами ситуация не столь однозначная. У родительских образцов *T. aestivum* k-14333 и *T. aethiopicum* k-19068 обнаружена высокая внутрисортная гетерогенность. Для k-14333 установлена генетическая формула: *f + m + i.n + b + e.a + g.new + u + z.r + o + new-l.c + f + i*, включающая 14 аллелей глиадинов на шесть локусов. Большинства этих аллелей не оказалось среди полученных нами линий. Только линия № 10 несет несколько аллелей, унаследованных от k-14333, причем в гетерозиготном состоянии. Ситуация с аллелями, которые могли быть привнесены в гибридный материал от *T. aethiopicum*, осложняется тем, что тетраплоидные пшеницы этого вида ранее практически не изучались по составу запасных белков, и существующий каталог блоков компонентов, составленный для твердой пшеницы *T. durum*, может не включать многие

варианты, присутствующие у эфиопских пшениц. При изучении отобранных форм мягкой фиолетовозёрной пшеницы и сравнении их с электрофоретическими спектрами (э/ф-спектрами) эфиопской пшеницы k-19068 нами не обнаружено блоков компонентов, которые можно было бы однозначно идентифицировать как принадлежащие родительской форме *T. aethiopicum*.

Помимо аллелей родительских сортов в линиях обнаружены аллели, не принадлежащие родителям: *Gli-B1k*, *Gli-D1i*, *Gli-A2f*, *Gli-B2new-2*. Вероятно эти аллели маркируют отдельный генотип, принимавший участие в гибридизации в качестве родительской формы. Это мог быть один из редких биотипов в составе гетерогенного иранского образца k-14333, не обнаруженный в текущем исследовании, но, возможно, на ранних стадиях селекционного процесса произошла спонтанная гибридизация с неизвестным сортом пшеницы, когда из-за открытого цветения в F1 и F2 межвидовые гибриды особо восприимчивы к попаданию чужеродной пыльцы. Таким образом, можно предположить участие в ступенчатой гибридизации до четырех генотипов: *T. aethiopicum* как донор фиолетовой окраски зерна, гетерогенный образец мягкой пшеницы из Ирана k-14333, из состава которого в гибридизацию вошли один или два разных генотипа, неизвестный образец *T. aestivum* (с аллельным составом глиадинов: *a.k.i.f.new2.?*) и современный сорт Лиза. При этом в F6 удалось получить морфологически выровненные и стабильные линии, большинство из которых (9 линий из 13) и по составу глиадинов являются гомогенными (табл. 1). В то же время, несмотря на широкую исходную наследственную базу, генетическое разнообразие дошедших до F6 линий сравнительно невысокое: доминирующими в популяции являются всего десять аллелей на шесть глиадинкодирующих локусов, еще шесть аллелей встречаются в единичных случаях. Некоторые линии полностью идентичны по аллельному составу глиадинов (это линии № 1–4, 1–7 и 1–8, а также 7 и 7–4).

Среди линий F6, характеризующихся идентичным набором аллелей глиадинкодирующих локусов и отобранных из одной семьи F4, встречаются как фиолетовозёрные (№ 1–8), так и светлозёрные (№ 1–4 и 1–7) растения. Следовательно, нет генетического сцепления между генами, контролирующими синтез глиадинов и генами, контролирующими синтез антоцианов.

Невысокий показатель генетической гетерогенности у созданных линий ($H = 0.410$) также свидетельствует о небольшом аллельном разнообразии глиадинов у линий F6. Вероятно жесткая браковка материала в F4–F5 по селекционно-ценным признакам стала причиной резкого сокращения разнообразия и сохранения только тех генов и генных ассоциаций, на которые шел от-

бор – фиолетовое зерно, продуктивность колоса и растения. Тем не менее, высокая исходная насыщенность гибридной популяции генами, связанными с низкой продуктивностью, привела к тому, что даже лучшие из отобранных линий уступают родительскому сорту Лиза и сортам-стандартам по этому признаку. Однако они представляют собой ценный материал в селекции для дальнейших насыщающих скрещиваний, что позволит, сохранив важнейший признак фиолетовой окраски зерна, поднять зерновую продуктивность до уровня лучших районированных сортов.

Таким образом, при межвидовой гибридизации созданы перспективные селекционные линии, которые могут быть использованы в качестве доноров признака фиолетовой окраски перикарпа зерновки. Установлен невысокий показатель генетического разнообразия у фиолетовозерных линий ($H = 0.410$), и преобладание аллелей глиадина, полученных от высокопродуктивного родителя – сорта Лиза (*Gli-A2a*, *Gli-B1f*, *Gli-D1a*, *Gli-A2e*, *Gli-B2e*, *Gli-D2f*), что связано с жестким отбором на высокую озерненность колоса и продуктивность в гибридных поколениях. Показано, что наличие фиолетовой окраски перикарпа, обусловленное повышенным синтезом антоцианов, не влияет отрицательно на урожайность, что дает возможность совмещать в одном генотипе признаки высокой продуктивности и фиолетовозерность. Полученные данные позволяют сделать вывод, что такой признак, как низкая кустистость обуславливает пониженную урожайность полученных селекционных линий. Это позволяет точно планировать дальнейший селекционный процесс, подбирая второго родителя для гибридизации по признакам высокой продуктивной кустистости.

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. He J., Giusti M.M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties // *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* 2010. V. 10. № 1. P. 163–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100754>
2. Khoo H.E., Lim S.M., Azlan A. Evidence-based therapeutic effects of anthocyanins from foods // *Pak. J. Nutr.* 2019. V. 18. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.3923/pjn.2019.1.11>
3. Bagchi D., Sen C.K., Bagchi M. et al. Anti-angiogenic, antioxidant and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula // *Biochem. (Mosc.)* 2004. V. 69. № 1. P. 75–80. <https://doi.org/10.1023/b:biry.0000016355.19999.93>
4. Cui J., Li X.Y. Progress on anti-tumor mechanisms of anthocyanins (Chinese) // *Food Sci.* 2014. V. 35. P. 310–315.
5. Chen W.C., Liu H.M., Liu J.S. Progress in the research on anticarcinogenic activities of anthocyanins (Chinese) // *Food Res. Dev.* 2016. V. 37. P. 211–215.
6. Guo Z., Zhang Z., Xu P. Analysis of nutrient composition of purple wheat // *Cereal Res. Commun.* 2012. V. 41. № 2. P. 293–303. <https://doi.org/10.1556/CRC.2012.0037>
7. Kaur S., Pandey A.K., Kumari A., Garg M. Physiological and molecular response of colored wheat seedlings against phosphate deficiency is linked to accumulation of distinct anthocyanins // *Plant Physiology and Biochemistry.* 2022. V. 170. P. 338–349. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.12.017>
8. Gupta P.K., Balyan H.S., Sharma S., Kumar R. Biofortification and bioavailability of Zn, Fe and Se in wheat: Present status and future prospects // *Theor. Appl. Genet.* 2021. V. 134. № 1. P. 1–35. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03709-7>
9. Тихвинский С.Ф., Доронин С.В. Антоциановые пигменты растений и их роль в адаптивной селекции сельскохозяйственных культур // *Теор. и прикладная экология.* 2007. № 3. С. 15–19.
10. Гордеева Е.И. Генетическая регуляция фиолетовой окраски перикарпа зерна мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Автореф. дис. канд. биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2014. 16 с.
11. Khlestkina E.K., Tereshchenko O.Yu., Salina E.A. Flavonoid biosynthesis genes in wheat and wheat-alien hybrids: Studies into gene regulation in plants with complex genomes // *Radiobiology and Environmental Security.* Dordrecht, Netherlands: Springer, 2012. P. 31–41.
12. Jiang W., Liu T., Nan W. et al. Two transcription factors *TaPpm1* and *TaPpb1* co-regulate anthocyanin biosynthesis in purple pericarps of wheat // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. № 10. P. 2555–2567. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery101>
13. Garg M., Chawla M., Chunduri V. et al. Transfer of grain colors to elite wheat cultivars and their characterization // *J. Cereal Sci.* 2016. V. 71. P. 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.08.004>
14. Sharma S., Kapoor P., Kaur S. et al. Changing nutrition scenario: Colored wheat – a new perspective // *Physiological, Molecular, and Genetic Perspectives of Wheat Improvement.* Cham, Switzerland: Springer, 2021. (eBook). https://doi.org/10.1007/978-3-030-59577-7_4
15. Martinek P., Jirsa O., Vaculova K. et al. Use of wheat gene resources with different grain colour in breeding // Conference. Tagungsband der 64. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. 25–26 November 2013. Raumberg-Gumpenstein. 2014. V. 1. P. 75–78.
16. Metakovsky E.V., Novoselskaya A.Yu. Gliadin allele identification in common wheat. I. Methodological aspects // *J. Genet. Breed.* 1991. V. 45. P. 319–323.
17. Metakovsky E.V. Gliadin allele identification on common wheat. II. Catalogue of gliadin allele in common wheat // *J. Genet. Breed.* 1991. V. 45. P. 325–344.

18. Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. Amsterdam: Holland Press, 1975. 278 p.
19. Central Statistical Agency of Ethiopia. Area and Production of Major Crops, Agricultural Sample Survey. Statistical Bulletin 586. Ethiopia: Addis Ababa, 2018.
20. Мурашев В.В., Морозова З.А. Особенности морфогенеза пшеницы эфиопской *T. aethiopicum* Jacubz. (1974) в ЦРНЗ России; секция Dicossoides; $2n = 28$, геномы A^uV // Научный альманах. Биологические науки. 2018. № 10-2(48). С. 163–173. <https://doi.org/10.17117/na.2018.10.02.163>

The Use of the Genetic Resources of Tetraploid Wheat *Triticum aethiopicum* on the Developing of Purple-Grain Common Wheat with a High Content of Anthocyanins

A. V. Fisenko^{a, *} and A. Yu. Dragovich^{a, **}

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

*e-mail: fisenko800@mail.ru

**e-mail: dragova@mail.ru

The article considers the results on the developing of purple-grain common wheat and the study of its genetic diversity. *Triticum aethiopicum* Jakubz. $2n = 28$ is the only source of genes for the purple grains color among the wheat species. The trait of purple grain is accompanied by an increase in the content of anthocyanins and micronutrients in the grain. To develop common wheat lines with purple grain, *T. aethiopicum* k-19068 was first hybridized with the Iranian landrace *T. aestivum* k-14333. The resulting hybrids were then crossed with the highly productive common wheat cultivar Liza. The developing lines F6 ($2n = 42$) characterize low diversity on multiple alleles of gliadin-coding loci ($H = 0.410$). They were dominated by alleles inherited from the parent variety Liza. No gliadin alleles that could belong to *T. aethiopicum* have been identified. Comparison of groups of lines with purple and white grains made it possible to show that they do not significantly differ from each other in terms of yield and elements of its structure. As a result, we have not found a negative correlation between the high content of anthocyanins in grain and grain productivity. This allows us to hope for the possibility of developing high-yielding lines of common wheat with purple grain enriched with anthocyanins.

Keywords: interspecific hybridization, wheat, anthocyanin genes, gliadin-coding loci.